



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* em complexo com o inibidor de serinoproteases BTCI de *Vigna unguiculata*

Luisa Meneghetti

Proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* em complexo com o inibidor de serinoproteases BTCI de *Vigna unguiculata*

Aluna: Luisa Meneghetti

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Maria de Freitas

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, para a defesa do título de Mestre em Biologia Molecular realizada no dia 05/03/2018.

Brasília
Março/2018

Dedico este trabalho a Deus, Àquele que cumpre as Suas promessas, à Maria, minha Mãe celestial e à minha família e amigos, especialmente à minha avó Luci e minha mãe Lenise.

*"Science can purify religion from error and superstition;
Religion can purify science from idolatry and false
absolutes. Each can draw the other into a wider world, a
world in which both can flourish."*

Karol Wojtyla, Papa João Paulo II

"Tudo a Jesus por Maria, tudo a Maria para Jesus."

São Marcelino Champagnat

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, Àquele que é a minha fortaleza e o meu refúgio. À Maria, aquela a quem consagrei a minha vida (*Totus tuus Mariae*). E ao meu anjo da guarda que esteve sempre presente comigo durante a realização deste trabalho.

À minha família, em especial à minha avó Luci e à minha mãe Lenise, que são as pessoas que mais amo. Aos meus tios, Marco Antônio e Rosângela, que sempre me deram suporte. Ao meu “primão”, Marco Aurélio, que sempre esteve ao meu lado. E à todos os outros pertencentes a minha família materna e paterna.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Sônia Maria de Freitas, que me deu a oportunidade de integrar ao seu grupo de pesquisa e que foi um grande exemplo de mulher na academia e na vida, contribuindo para o meu aprendizado e amadurecimento pessoal.

Agradecimento especial ao professor Dr. Aisel Valle Garay. Por ser um exemplo de ser humano, que vive alegremente e está sempre disposto a ajudar. Agradeço aos ensinamentos e a atenção destinada a mim e pelo exemplo de dedicação a pesquisa que me deste. Um professor que tem grandes conhecimentos e que transmite aos outros com humildade. Obrigada por me inspirar com seu caráter.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biofísica Molecular (UnB), pelo apoio, companhia e sorrisos compartilhados. Vocês fizeram esse caminhar se tornar mais leve e prazeroso. Obrigada Paulo, Julia, Pathy, Amanda, Gideane, Gustavo, Alzira, Diego, Jonatas, Azadeh, Diogo, Claudia, João Paulo, Nayara, Faheem, Liem, Marisol, prof^o Dr. Napoleão e prof^o Dr. João Alexandre.

A todos do Laboratório de Microbiologia (LAMP), em especial à professora Dr^a Tatiana Amabile de Campos, por ter cedido espaço em seu laboratório para a realização de experimentos deste trabalho e a minha grande amiga Laura Fernandes, por sempre estar ao meu lado quando precisei, tanto na pesquisa, quanto na vida.

Ao técnico de Laboratório Chiquinho, por todo seu zelo e auxílio para comigo. Sempre lembrarei com carinho de ti.

Aos porteiros do IB, por serem sempre solícitos e atenciosos para comigo, principalmente durante as noites de trabalho. Muito obrigada Sr. Valdecir.

A Comunidade Católica da UnB (CCUnB), por proporcionar a eucaristia diária que tanto me amparou e me fortaleceu nesses últimos dois anos. Agradeço àqueles que também partilharam momentos no RU comigo e que auxiliaram na minha caminhada de fé, Gabriel Dias, Eduardo, Raul, Bernardo, Biel, Beto, Victor, Thais, Arthur, Isla, Miguel, Rafa (das Artes) e Renata.

A toda a comunidade Ágape de Jovens, por sempre ser um refúgio ao meu coração e estar trilhando o caminho à santidade juntamente comigo. Em especial, a minha amiga Carinne, por toda a sua atenção, a minha amiga Ingrid, por ser sempre um refúgio, a minha amiga (e filhota) Eduarda, por sempre partilhar sua alegria, a minha

amiga Ana Clara, pelas suas conversas afáveis, a minha amiga Ruth, por ser sempre um amparo no caminho a santidade e principalmente ao meu melhor amigo Gustavo Vilarinho, aquele que durante estes dois anos esteve sempre perto, me auxiliando com seu discernimento e sempre sendo solícito quando eu mais precisava.

Ao meu diretor espiritual Pe. Vinicius de Lima Podda, por toda a sua atenção e zelo pastoral para comigo. Mais do que as suas palavras, o seu exemplo de caminhada à santidade me fortaleceram durante esse tempo. A consideração por ti só pode ser resumida na seguinte frase de São Josemaria Escrivá: “Amar a Deus e não venerar o Sacerdote... não é possível”.

A todos meus amigos, do colégio e da Universidade, pelas risadas e companhias durante todos os momentos da minha formação. Em especial a Luara, Helena, Anna Clara, Matheus (Choplay), Lucas, Diogo, Rafa, Tay, Dani (Planaltina) e Ana Paula.

A todos os professores que contribuíram para a minha jornada acadêmica.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular e à Universidade de Brasília, pela oportunidade de formação profissional.

Ao CNPq, à Capes e à FAPDF pelo auxílio financeiro a mim e ao grupo de pesquisa.

E a todos que sempre fizeram parte da minha formação acadêmica, pessoal e espiritual. Àqueles que auxiliaram na minha caminhada, fazendo parte na minha vida.

Obrigada!

Resumo

O proteassoma é um complexo enzimático multicatalítico responsável por processos de degradação proteica e pela manutenção da homeostase celular. A inibição do proteassoma induz a diminuição da progressão de processo tumoral por induzir a apoptose das células cancerígenas. Têm-se caracterizado os inibidores de serinoproteases da família Bowman-Birk como potentes agentes anticancerígenos, sendo parte desse efeito consequência da inibição do proteassoma 20S. O inibidor de tripsina e quimotripsina pertencente à família Bowman-Birk denominado black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inibitor (BTCI), isolado de sementes de *Vigna unguiculata*, possui ação anticancerígena às células de câncer de mama devido a capacidade de inibir o proteassoma 20S. Neste trabalho, estudos de interação entre o BTCI e o proteassoma, por métodos físico-químicos foram propostos visando caracterizar a estequiometria e os parâmetros termodinâmicos dessa interação. O BTCI foi purificado por cromatografia de troca iônica a partir do extrato bruto de sementes de *V. unguiculata*. O proteassoma foi obtido da linhagem RJD1144 de *Saccharomyces cerevisiae*, por cromatografia de afinidade a níquel, seguido de uma cromatografia de troca aniônica. Foram realizados os ensaios de inibição da atividade proteolítica do proteassoma 20S na presença do BTCI, análises de caracterização físico-química e estrutural do BTCI, do proteassoma 20S e do complexo BTCI-proteassoma por ultracentrifugação analítica e ensaios de calorimetria com as duas proteínas, possibilitando mensurar os parâmetros termodinâmicos e a estequiometria da interação do proteassoma 20S com o BTCI. Os valores de K_i obtidos pelos ensaios de inibição a 31 °C, 34 °C e 46 °C foram, respectivamente, iguais a $2,72 \pm 0,28 \times 10^{-5}$ M, $2,97 \pm 0,12 \times 10^{-5}$ M e $1,940 \pm 0,004 \times 10^{-6}$ M. Resultados obtidos por ultracentrifugação analítica sugerem a formação do complexo BTCI-proteassoma 20S com uma estequiometria de 4,2 moléculas de inibidor para cada proteassoma. Para o ensaio de calorimetria realizado a 30°C, a constante de afinidade obtida foi $1,34 \times 10^8 \pm 6,42 \times 10^7$ M⁻¹, e os parâmetros termodinâmicos obtidos foram ΔH , $1,888 \times 10^5 \pm 1,191 \times 10^4$ cal/mol, ΔS , 660 cal/mol/deg, e ΔG , -11,1 Kcal.mol⁻¹. A estequiometria estimada por calorimetria foi de 5,3 moléculas de BTCI para cada molécula de proteassoma 20S. Os valores estequiométricos obtidos por calorimetria (ITC) e ultracentrifugação analítica sugerem a ideia da formação do complexo molecular com 4 a 5 moléculas de BTCI para cada proteassoma, sendo formado por processo endotérmico ($\Delta H > 0$), entropicamente favorável ($\Delta S > 0$) e espontâneo ($\Delta G < 0$). A contribuição do fator entrópico ($T \cdot \Delta S$), maior que a variação da entalpia, foi determinante para a espontaneidade da reação.

Palavras-chave: Inibidores de serinoproteases; Proteassoma 20S; Inibidores de proteassoma.

Abstract

Proteasome is a multicatalytic enzymatic complex responsible for protein degradation and maintenance of cellular homeostasis. Inhibition of proteasome induces a decrease in progression of tumor process by inducing apoptosis of the cancer cells. Bowman-Birk family of serine protease inhibitors have been characterized as potent anticancer agents, part of which is a consequence of inhibition of 20S proteasome. The trypsin and chymotrypsin inhibitor of the Bowman-Birk family called black-eyed pea trypsin / chymotrypsin inhibitor (BTCI), isolated from *Vigna unguiculata* seeds, has anticancer action on breast cancer cells due proteasome inhibition. In this work, interaction studies between BTCI and proteasome, by physical-chemical methods were proposed aiming to characterize the stoichiometry values and the thermodynamic parameters of this interaction. The BTCI was purified by ion exchange chromatography from the crude extract of *V. unguiculata*. The proteasome was obtained from the RJD1144 strain of *Saccharomyces cerevisiae* by nickel affinity chromatography, followed by anion exchange chromatography. Inhibition of proteolytic activity of 20S proteasome in the presence of BTCI, physical-chemical and structural characterization of BTCI, 20S proteasome and BTCI-proteasome complex by analytical ultracentrifugation and calorimetry assays with this proteins were performed to measure the thermodynamic parameters and the stoichiometry of the 20S proteasome interaction with BTCI. The K_i values obtained by the inhibition tests at 31 ° C, 34 ° C and 46 ° C were, respectively, $2.72 \pm 0.28 \times 10^{-5}$ M, $2.97 \pm 0.12 \times 10^{-5}$ M and $1.940 \pm 0.004 \times 10^{-6}$ M. Results obtained by analytical ultracentrifugation suggest the formation of the BTCI-proteasome complex with a stoichiometry of 4.2 molecules of BTCI for each molecule of proteasome. In calorimetry test performed at 30 ° C, the affinity constant obtained was $1.34 \times 10^8 \pm 6.42 \times 10^7$ M⁻¹, and the thermodynamic parameters obtained were ΔH , $1,888 \times 10^5 \pm 1,191 \times 10^4$ cal / mol, ΔS , 660 cal / mol / K, and ΔG , -11.1 Kcal.mol⁻¹. Stoichiometry estimated by calorimetry was 5.3 molecules of BTCI for each proteasome molecule. The stoichiometric values obtained by calorimetry (ITC) and analytical ultracentrifugation suggest the formation idea of a molecular complex with 4 or 5 BTCI molecules for each proteasome, being formed by endothermic ($\Delta H > 0$), entropically favorable ($\Delta S > 0$) and spontaneous ($\Delta G < 0$) process. The contribution of the entropic factor ($T \cdot \Delta S$), higher than the enthalpy variation, was determinant for the spontaneity of reaction.

Key-words: Serine proteases inhibitors; 20S proteasome; Proteasome inhibitors.

Sumário

Lista de Figuras	15
Lista de abreviações e símbolos	18
I. Introdução	19
I.1 Proteases e Serinoproteases	19
I.2 Proteassoma: complexo enzimático tipo serinoproteases	22
I.3 Inibidores de Proteassoma	27
I.4 Inibidores de Serinoproteases	29
I.5 O inibidor Black-eyed-pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor (BTCI)	31
I.6 BTCI e proteassoma 20S	35
II. Justificativa	37
Objetivos	39
III. Materiais e Métodos	40
III.1 Extração e purificação do BTCI	40
III.1.1 Preparação do extrato bruto de sementes de feijão-de-corda.	40
III.1.2 Purificação do BTCI	40
III.2 Análise da pureza do BTCI por espectrometria de massa - MALDI-TOF	41
III.3 Determinação da concentração do BTCI	42
III.4 Eletroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes e não desnaturantes	42
III.4.1 Eletroforese em condições desnaturantes	42
III.4.2 Eletroforese em condições não desnaturantes	43
III.5 Expressão e purificação do proteassoma 20S	43
III.5.1 Expressão: curva de crescimento e cultura celular	43
III.5.2 Purificação do proteassoma 20S de levedura.	44
III.6 Determinação da concentração do proteassoma 20S	44
III.7 Ensaio de atividade peptidásica do proteassoma 20S	44
III.8 Ensaio de inibição da atividade peptidase do proteassoma 20S	45
III.9 Determinação de parâmetros hidrodinâmicos do BTCI e proteassoma 20S por ultracentrifugação analítica e espalhamento dinâmico de luz (ELD)	46
III.9.1 Ultracentrifugação analítica	46
III.9.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD)	47
III.10 Calorimetria (ITC)	48
IV. Resultados e Discussão	49
IV.1 Purificação do BTCI	49
IV.2 Expressão e purificação do proteassoma 20S	51

IV.2.1	Curva de crescimento e cultura celular	51
IV.2.2	Purificação do proteassoma 20S.....	52
IV.3	Coefficiente de extinção molar do proteassoma 20S.....	57
IV.4	Parâmetros hidrodinâmicos do proteassoma 20S por espalhamento de Luz dinâmico (ELD)	58
IV.5	Parâmetros hidrodinâmicos do BTCI e do proteassoma 20S por ultracentrifugação analítica	58
IV.6	Ensaio de atividade peptidásica do proteassoma 20S.....	60
IV.7	Ensaio de inibição da atividade peptidase do proteassoma 20S	61
IV.8	Cálculo dos parâmetros termodinâmicos do complexo BTCI-proteassoma 20S de forma indireta 64	
IV.9	Calorimetria (ITC).....	65
IV.10	Parâmetros hidrodinâmicos e estequiometria do complexo BTCI-proteassoma 20S por ultracentrifugação analítica.....	68
V.	Considerações finais: termodinâmica, estrutura e estequiometria da interação BTCI-Proteassoma.	70
VI.	Conclusões	77
VII.	Referências Bibliográficas	79
VIII.	Apêndice	87
VIII.I	Efeito inibitório do BTCI em linhagens de bactérias	87
VIII.II.i	Introdução.....	87
VIII.II.ii	Materiais e Métodos	88
VIII.II.iii	Resultados	89
VIII.II.iv	Discussão.....	91
VIII.II.v	Referências Bibliográficas	93
IX.	Anexo 1	96
o	Metodologia: simulação computacional.....	96
X.	Anexo 2	97
o	Resumo submetido em congresso – SBBq 2018.....	97
o	Comprovante de submissão de resumo	98

Lista de Figuras

I. Introdução	19
Figura 1.1 – Mecanismo de hidrólise de peptídeos pela quimotripsina.	20
Figura 1.2. -Representação esquemática da nomenclatura proposta por Schechter e Berger (1967).....	21
Figura 2.1 – Esquema do proteassoma 26S e seus anéis.....	23
Figura 2.2 – Estrutura secundária das subunidades α (a) e β (b) do proteassoma 20S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
Figura 2.3 - Posicionamento e rede de ligação de hidrogênio entre os resíduos envolvidos no sítio ativo do proteassoma 20S.	26
Figura 2.4 - Mecanismos de Autólise (a) e Catálise (b) do proteassoma 20S.....	26
Figura 3.1 – Esquema dos principais efeitos farmacológicos dos inibidores de protease extraídos de plantas.	30
Figura 4.1 – Estrutura tridimensional do BTCI.....	34
Figura 4.2 – Complexo ternário do BTCI com Tripsina e Quimotripsina.	35
IV. Resultados e Discussão	49
Figura 5.1. Purificação do BTCI a partir do extrato bruto obtido de sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	49
Figura 5.2. Análise da pureza e da massa molecular do BTCI por espectrometria de massas (MALDI-TOF).	50
Figura 6.1. Curva de crescimento e perfil eletroforético da cultura celular.	51
Figura 7.1. Perfil cromatográfico do proteassoma 20S purificado em coluna de afinidade a níquel.....	52
Figura 7.2 Segunda etapa de purificação do proteassoma 20S de levedura	53
Figura 8.1. Correlação da absorvância a 280 nm pela concentração de proteassoma 20S	57
Figura 9.1. Porcentagem do volume pelo diâmetro hidrodinâmico do proteassoma 20S <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
Figura 10.1. Parâmetros hidrodinâmicos do BTCI e do proteassoma 20S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por ultracentrifugação analítica.	59

Figura 11.1. Curva da atividade catalítica tipo quimotripsina do proteassoma 20S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pelo tempo a temperatura de 25°C.....	60
Figura 12.1. Curvas de inibição da atividade catalítica tipo quimotripsina do proteassoma 20S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com o aumento da concentração do BTCI nas temperaturas de 25 °C (A), 31 °C (B), 34 °C (C), 40 °C (D), 43 °C (E) e 46 °C (F).	61
Figura 12.2. Curvas de inibição da atividade catalítica tipo quimotripsina do proteassoma 20S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com o aumento da concentração do BTCI nas temperaturas de 31 °C (A), 34 °C (B) e 46 °C (C).....	62
Figura 13.1. Aproximação de van't Hoff para os ensaios de ligação do BTCI ao proteassoma 20S.....	64
Figura 14.1. Dados calorimétricos da interação do BTCI com proteassoma 20S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 25 °C	66
Figura 14.2. Dados calorimétricos da interação do BTCI com proteassoma 20S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 30 °C.	67
Figura 14.3. Parâmetros termodinâmicos da interação do BTCI com proteassoma 20S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
Figura 15.1. Parâmetros hidrodinâmicos e estequiometria do complexo BTCI-proteassoma 20S <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por ultracentrifugação analítica.....	69
V. Considerações finais: termodinâmica, estrutura e estequiometria da interação BTCI-Proteassoma	70
Figura 16.1. Esquema de formação do complexo molecular entre quatro moléculas de BTCI e uma de proteassoma 20S.	71
Figura 16.2. Nuvens de soluções de <i>docking</i> com BTCI.	73
Figura 16.3. <i>Docking</i> entre proteassoma 26S e BTCI.....	74
Figura 16.4. Padrão de dispersão entre a coordenada Z do centro geométrico de cada solução de <i>docking</i> e a respectiva energia de ligação.....	75
VIII. Apêndice	87
Figura A1. Efeito do inibidor BTCI no crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> a diferentes concentrações	89
Figura A2. Efeito do inibidor BTCI no crescimento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentrações.....	90

Figura A3. Percentual do crescimento relativo de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* variando as concentrações do inibidor BTCl.90

Lista de abreviações e símbolos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

BBI – Inibidor Bowman Birk

BSA – Albumina Bovina sérica

BTCI – *Black-eyed-pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor*

c_(s) - Coeficiente de sedimentação

ClpP - *Proteolytic subunit of bacterial caseinolytic protease*

DEAE – Dietilaminoetil

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO_{600nm} - densidade óptica a 600 nm

DO_{280nm} - densidade óptica a 280 nm

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ELD – Espalhamento de Luz Dinâmico

FDA – *Food and Drug Administration*

IBBF - Inibidores da família *Bowman-Birk*

ITC – Calorimetria de titulação isotérmica

JcTI - *Inibidor de tripsina extraído de pinhão-mansô*

K_a – Constante de associação

K_i – Constante de inibição

LMA - Leucemia Mieloide Aguda

MALDI-TOF – Espectrometria de massas de ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo.

MCF-7 *Michigan Cancer Foundation-7*

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PMSF – Fluoreto de fenilmetanosulfonil

PSA - Persulfato de amônia

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

s-LLVY-MCA - *Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-metilcoumarina*

TCA – Ácido Tricloacético

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

UCA-SV - Ultracentrifugação analítica por velocidade de sedimentação

UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

YPD – Meio de cultura com extrato de levedura, peptona e dextrose.

ΔG - variação da energia livre de Gibbs.

ΔH - variação da entalpia de ligação

ΔS - variação de entropia

I. Introdução

I.1 Proteases e Serinoproteases

As proteases participam de diversos processos biológicos como a coagulação sanguínea e fibrinólise; na resposta imune; na liberação de hormônios proteicos, a partir de moléculas precursoras; no transporte de proteínas secretoras pela membrana; no controle da digestão de proteínas; na fertilização e no processo de montagem de estruturas macromoleculares, como as fibras de colágeno e alguns vírus (Neurath H.; Walsh K. A. 1976; Hedstrom 2002;).

Apesar da participação dessas moléculas em vários processos vitais, a função básica das proteases é a quebra de ligações peptídicas. Essa quebra da ligação peptídica ocorre por meio de um ataque nucleofílico ao carbono da ligação carbono-oxigênio, assistida por uma doação de prótons ao nitrogênio. A doação de prótons e o ataque nucleofílico são realizados pela tríade catalítica presentes no sítio ativo e cada família das proteases apresenta um arranjo característico entre estes três resíduos de aminoácidos. Este é o mecanismo de clivagem que ocorre mais frequentemente (Neurath 1984). O mecanismo catalítico das enzimas é classificado de acordo com o resíduo ou elemento que realiza o ataque nucleofílico na ligação, realizando a hidrólise desta (Hartley B. S., 1960). De acordo com esta classificação, existem atualmente nove classes mecanicistas de proteases: serina, cisteína, aspártica, treonina, glutâmica, asparagina, metal, modo misto e mecanismo catalítico desconhecido (Barrett A., Rawlings N., e Woessner J., 1998; Rawlings *et al.*, 2013).

A classe das serinoproteases é assim chamada devido a presença do resíduo de serina reativo na tríade catalítica. Dentro desta classe destaca-se a família da quimotripsina, que é caracterizada pela tríade catalítica Asp¹⁰², Ser¹⁹⁵, His⁵⁷. O mecanismo de ação enzimática de uma serinoprotease (Figura 1.1) consiste em dois estágios, a acilação referente à formação da Acil-enzima (etapas 2, 3 e 4), e a desacilação referente a saída do grupo abandonador (etapas 5, 6 e 7). Após a ligação com o substrato (etapa 1, Figura 1.1), a Ser¹⁹⁵ realiza o ataque nucleofílico ao carbono da ligação carbono-hidrogênio do substrato peptídico (etapa 2, Figura 1.1). Normalmente, para a quimotripsina e tripsina, o resíduo utilizado é His⁵⁷ (Berg J. M. *et al.* 2002).

A His⁵⁷, ao receber o H⁺ da hidroxila da Ser¹⁹⁵, induz a formação de um íon alcóxido reativo, um nucleófilo forte (Berg J. M. *et al.* 2002). O resíduo de Asp¹⁰², ao realizar uma ligação de hidrogênio com a His⁵⁷, a torna um melhor acceptor de prótons, ajudando a estabilizar a sua forma protonada, demonstrando a importância das ligações de hidrogênio entre estes aminoácidos, que formam a tríade catalítica (Hedstrom 2002).

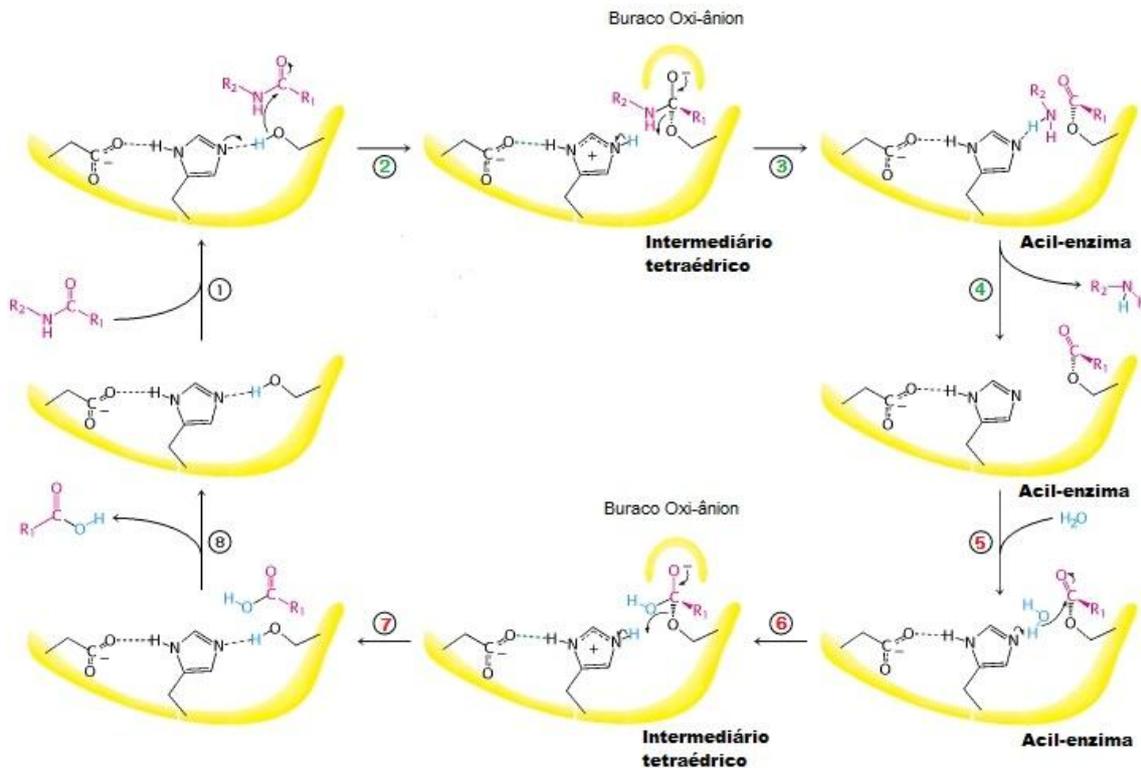


Figura 1.1 – Mecanismo de hidrólise de peptídeos pela quimotripsina. Etapa 1: Ligação com o substrato. Etapa 2: Ataque nucleofílico da Ser195 ao carbono da ligação carbono-hidrogênio do substrato peptídico. Etapa 3: Transferência de um próton da His⁵⁷ para o grupamento amina. Etapa 4: Quebra da ligação peptídica com o componente amina liberado. Etapa 5: Interação com uma molécula de água. Etapa 6: Hidrólise da molécula de água gerando um intermediário tetraédrico. Etapa 7: Geração de um ácido carboxílico. Etapa 8: Regeneração da enzima. Imagem adaptada (Berg J. M. *et al.* 2002).

O ataque nucleofílico ao carbono da ligação C-H altera a geometria molecular de trigonal plana para tetraédrica (Figura 1.1). O estado intermediário formado é chamado de intermediário tetraédrico. Ele é um estado instável devido à carga formal negativa gerada sobre o átomo de oxigênio proveniente da carbonila. Esta carga é estabilizada por interações com grupos NH presentes no buraco oxi-ânion. Com a transferência de um próton, da His⁵⁷ carregada positivamente, para o grupamento amina (etapa 3), ocorre a quebra da ligação peptídica, liberando o componente de amina (etapa 4), substituindo-o por uma molécula de água (etapa 5). A molécula de água ataca a carbonila, enquanto a His⁵⁷ atua como um ácido catalisador e retira um próton da água,

gerando um intermediário tetraédrico (etapa 6). Por ser um estado instável, a estrutura decompõe, gerando um produto de ácido carboxílico (etapa 7). Após a liberação deste produto (etapa 8), a enzima pode reiniciar o processo de hidrólise do seu substrato (Berg J. M. *et al.* 2002).

Entretanto, os sítios de reconhecimento de substrato não compreendem somente aos sítios de ligação do polipeptídeo, mas também inclui os bolsões de ligação. No sítio ativo, existem grupos de resíduos de aminoácidos próximos aos resíduos da tríade que formam bolsões. Estes bolsões formados pelos aminoácidos adjacentes à tríade influenciam na especificidade de cada enzima. Estudos a respeito da especificidade de proteases geralmente focam na interação de P_1/S_1 .

Segundo o sistema de nomenclatura de Schechter e Berger (1967), os resíduos do substrato são nomeados como (N-terminal) $P_n \dots P_4, P_3, P_2, P_1 - P_1', P_2', P_3', P_4' \dots P_n'$ (C-terminal). Os resíduos da enzima em contato com os resíduos do substrato correspondentes são nomeados como $S_n \dots S_4, S_3, S_2, S_1 - S_1', S_2', S_3', S_4' \dots S_n'$. Sendo que a numeração dos resíduos é dada a partir da ligação cindível, ligação peptídica, em que ocorre a hidrólise, entre os resíduos $P_1 - P_1'$.

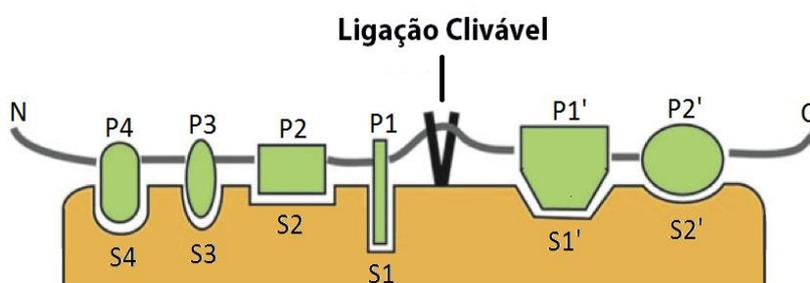


Figura 1.2. -Representação esquemática da nomenclatura proposta por Schechter e Berger (1967). Em laranja são indicados os subtipos S_x da enzima em contato com os sítios P_x do substrato a ser hidrolisado. Imagem adaptada (Farady e Craik 2010).

A influência dos aminoácidos presentes nos bolsões de ligação na especificidade de serinoproteases pode ser observada ao comparar enzimas como a quimotripsina e a tripsina. Os bolsões de ligação de substrato de ambas as enzimas apresentam uma estrutura semelhante, porém as sequências de aminoácidos são ligeiramente diferentes, Ser^{189}, Gly^{216} e Gly^{226} para quimotripsina e Asp^{189}, Gly^{216} e Gly^{226} para tripsina. O bolsão de ligação da quimotripsina possui resíduos neutros e hidrofóbicos que estabilizam as cadeias laterais dos aminoácidos apolares do substrato por meio de

interações hidrofóbicas. Isto acarreta na característica da quimotripsina de clivar ligações peptídicas do lado C-terminal de resíduos hidrofóbicos. Já na tripsina, o seu bolsão de ligação é um ambiente negativo devido a presença do Asp¹⁸⁹ que é um resíduo carregado negativamente. Assim, a tripsina cliva ligações peptídicas no lado C-terminal de aminoácidos básicos, como a arginina e a lisina (Koolman J.; Roehm K. H. 2005).

I.2 Proteassoma: complexo enzimático tipo serinoproteases

O proteassoma é um complexo enzimático multicatalítico expresso no núcleo e no citoplasma de todas as células eucariotas. O proteassoma 26S é uma protease constituída por duas unidades distintas, uma unidade catalítica (20S), e uma unidade regulatória (19S), sendo que esta pode estar presente em uma ou em ambas as extremidades da unidade 20S (Figura 2.1) (Tomko RJ; Hochstrasser M. 2013).

A unidade 19S apresenta topologia semelhante à uma base e uma tampa, com massa molecular de 700 kDa, sendo composta por 19 subunidades. A parte basal é constituída por um anel hexamérico de ATPase, dois receptores de ubiquitina e mais outras duas subunidades. Na parte referente a tampa existem 7 subunidades de suporte, 1 enzima deubiquitilante e a subunidade Rpn8. As principais funções atribuídas à unidade 19S são a seleção de substratos, reconhecendo proteínas poli-ubiquitiladas, a preparação destes para a degradação, clivando as cadeias de poli-ubiquitina e posteriormente participando da desnaturação do substrato proteico, a translocação destes para o interior da unidade 20S, bem como provavelmente influenciando na natureza dos produtos gerados pelo proteassoma 20S (Glickman H.; Maytal V. 2002; Voet, D.; Voet J. G. 2013).

A unidade 20S apresenta topologia semelhante a um cilindro, sendo composta por 4 anéis heptaméricos, 2 anéis β centrais e 2 anéis α nas extremidades. Os anéis α estão interligados com as unidades 19S, envolvendo-se com a abertura da unidade 20S e com a translocação do substrato proteico para o interior desta. Os anéis β possuem as subunidades catalíticas do proteassoma, β 1, tipo caspase, β 2, tipo tripsina, e β 5, tipo quimotripsina (Figura 2.1). Em eucariotos com sistema imune adaptativo, o interferon- γ estimula a expressão de três tipos adicionais de subunidades β , β 1i, β 2i e β 5i, as quais substituem as subunidades catalíticas do proteassoma para formar o imunoproteassoma (Zwickl P. 2002).

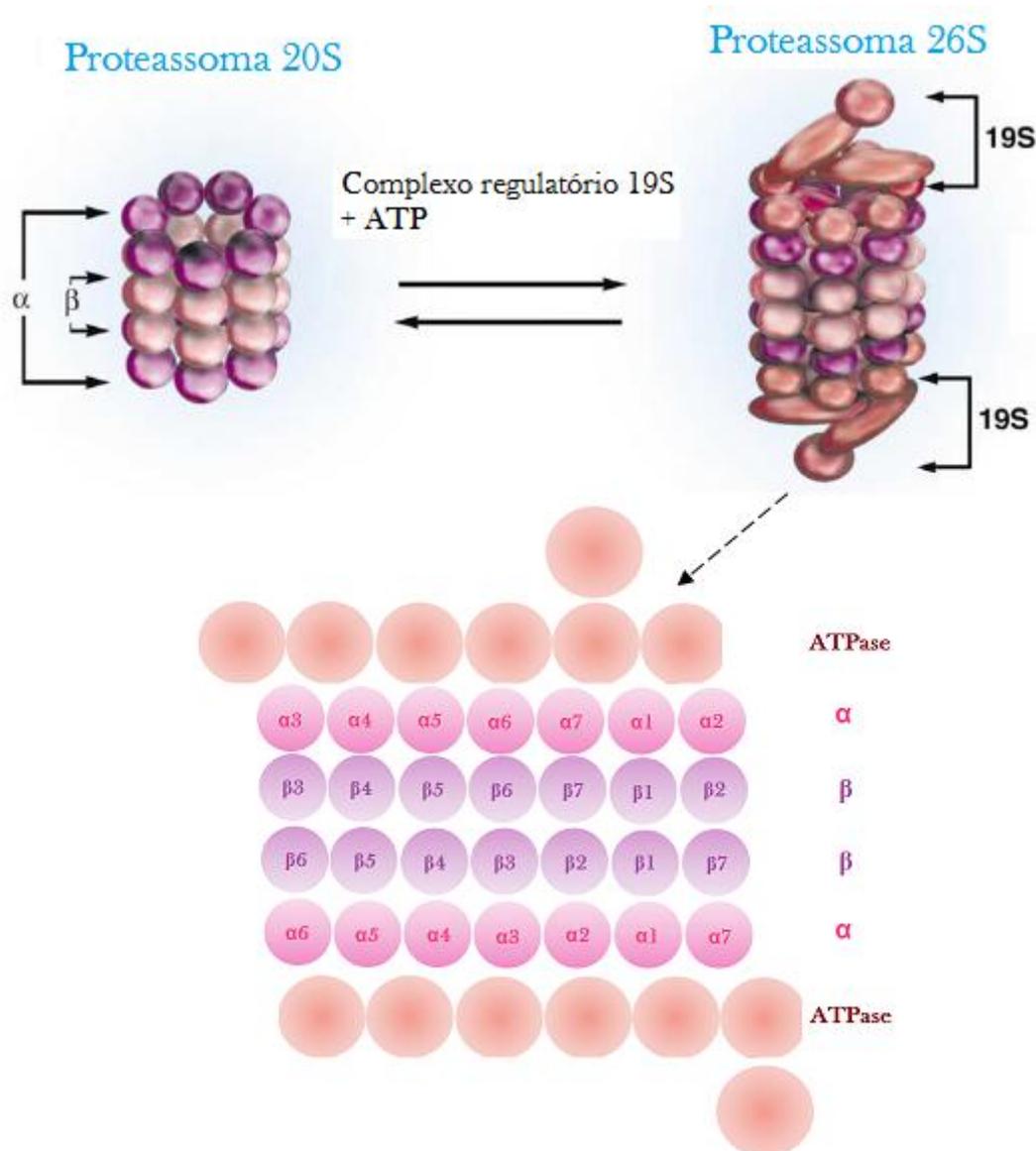


Figura 2.1 – Esquema do proteassoma 26S e seus anéis. A unidade 19S de 700 kDa, é composta por 19 subunidades de um anel hexamérico de ATPase, dois receptores de ubiquitina, 7 subunidades de suporte, 1 enzima deubiquitilante e a subunidade Rpn8. A unidade 20S está composta por 4 anéis heptaméricos, 2 anéis β centrais e 2 anéis α nas extremidades. Os anéis α estão interligados com as unidades 19S, envolvendo-se com a abertura da unidade 20S e com a translocação do substrato proteico para o interior desta. Os anéis β possuem as subunidades catalíticas do proteassoma, $\beta 1$, tipo caspase, $\beta 2$, tipo tripsina, e $\beta 5$, tipo quimotripsina. Imagem adaptada (Adams J. 2003; Hartmann-Peterson R. *et al.* 2001).

Todas as 7 subunidades α e β estão organizadas em estrutura β -sanduíche, típica da família das Ntn-hidrolases. Esta estrutura é formada por duas folhas- β antiparalelas, com camadas helicoidais, sendo as superiores compostas pelas hélices H3, H4, H5 e as inferiores por H1 e H2 (Figura 2.2). As diferenças entre as subunidades aparecem nas voltas, as quais variam em comprimento por um ou dois aminoácidos de diferença, em longas inserções que conectam elementos de estrutura secundária e nas regiões amino e carbono terminais. Nas subunidades do tipo β , em um dos seus terminais, a folha- β

encontra-se fechada por 4 *hairpin loops*. Já o outro terminal encontra-se aberto, com a formação de uma fenda no sítio catalítico que está orientada para o interior da cavidade central do proteassoma. Nas subunidades α uma extensão N-terminal gera uma hélice adicional que preenche esta abertura (Groll M. *et al.* 1997; Zwickl P. 2002).

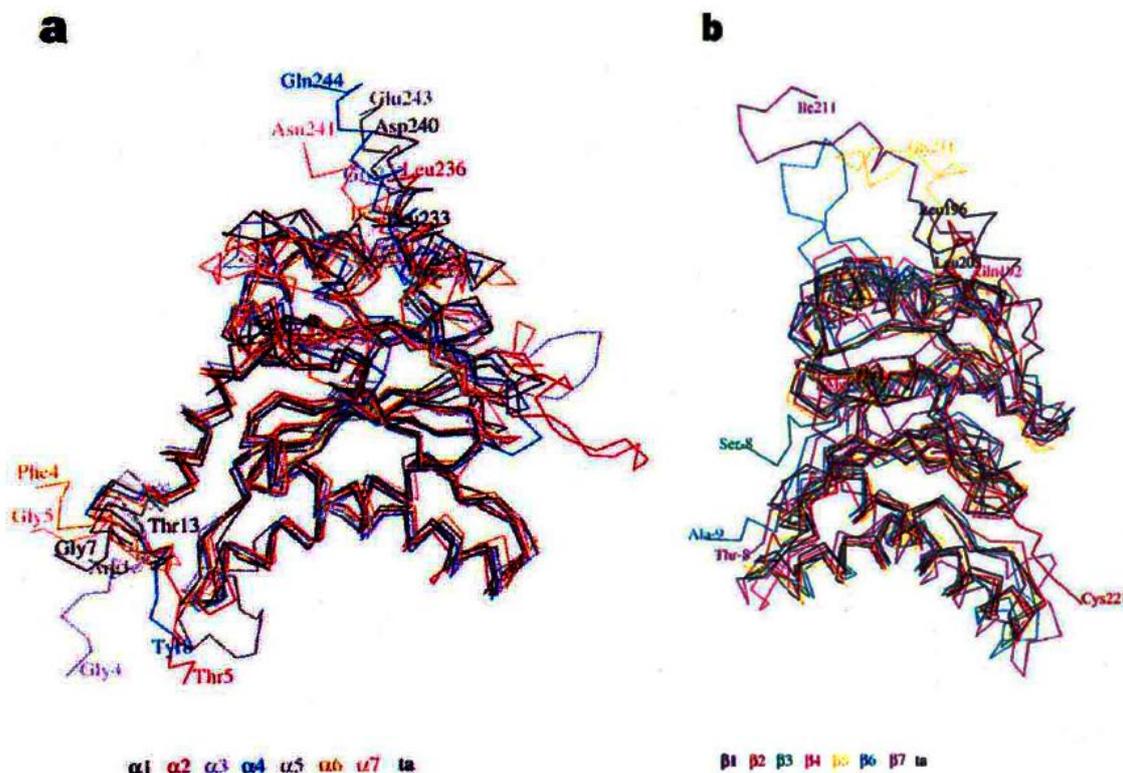


Figura 2.2 – Estrutura secundária das subunidades α (a) e β (b) do proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae*. As subunidades α e β são formadas por estrutura β -sanduíche, constituída por duas folhas- β antiparalelas, com camadas helicoidais, sendo as superiores compostas pelas hélices H3, H4, H5 e as inferiores por H1 e H2. Imagem adaptada (Groll M. *et al.* 1997).

Por apresentarem especificidade e atividade proteolítica semelhantes aos da quimotripsina e da tripsina, estruturas como as subunidades $\beta 5$ e $\beta 2$ do proteassoma 20S são chamadas de *chymotrypsin-like*, por clivar o substrato proteico após resíduos hidrofóbicos, e de *trypsin-like*, por clivar após resíduos básicos, respectivamente. Porém o resíduo reativo destas subunidades é a Thr¹ e não uma Ser, caracterizando-as como hidrolases com nucleófilo no N-terminal, família das Ntn-hidrolases (Groll M. *et al.* 1997; Huber E. M. *et al.*, 2016).

Huber E. M. *et al.* (2016), mostrou as vantagens da Thr¹ sobre a Ser¹ como nucleófilo no sítio ativo do proteassoma. Para isso, induziu a mutação no genoma de organismos de *S. cerevisiae* para que o resíduo de Thr¹ fosse substituído por uma Ser¹ no sítio ativo do proteassoma. Nesse caso, a atividade catalítica do mutante para Ser¹

chega a ser 45% menor do que a do proteassoma selvagem, devido a defasagem de 60° do resíduo de Ser no bolsão catalítico, que requer primeiramente uma reorientação estrutural para que ocorra o ataque nucleofílico. Considerando-se que o grupo hidroxila da Thr¹ não necessita de uma reorientação antes da clivagem do substrato, este é mais catalítico do que a Ser¹. Além disso, foi observado que em temperaturas acima de 37 °C, o mutante para Ser não cresceu. Neste mesmo trabalho, também foi analisado os efeitos da mutação da Thr¹ por Cys, onde observou-se a quebra da ligação de hidrogênio existente no sítio ativo do selvagem entre a Thr¹ e a Lys³³, o que acarretou em fortes efeitos no crescimento da levedura mutante. Considerando estes resultados, Huber E. M. *et al.* (2016) pode extrair ideias a respeito do porquê a Thr como o nucleófilo do sítio ativo é conservado nos três domínios.

A tríade catalítica do proteassoma (Thr¹, Lys³³ e Asp¹⁷/Glu¹⁷) e a orientação de cada um dos resíduos, na rede de ligações de hidrogênio em que estes se encontram envolvidos, também é estritamente conservada nas subunidades catalíticas (Figura 2.3-b). A Thr¹ realiza ligação de hidrogênio com a Lys³³, que por sua vez interage com o Asp¹⁷. O N-terminal da Thr¹ está envolvido em ligações de hidrogênio com resíduos de Ser¹²⁹, Asp¹⁶⁶, Ser¹⁶⁹ e o resíduo 168. (Figura 2.3-a) (Huber E. M. *et al.*, 2016).

O ataque nucleofílico ao carbono da ligação cindível durante a catálise é realizado pela Thr¹, mas antes é necessário que ocorra a maturação do proteassoma 20S por um processo de autólise. A autólise inicia-se com a desprotonação da Thr¹ pela Lys³³ e a formação do estado intermediário tetraédrico. A Gly⁴⁷, na Figura 2.4-a, estabiliza a carga negativa do buraco oxi-ânion do intermediário tetraédrico. Por ser um estado instável, a estrutura decompõe, liberando o N-terminal da Thr¹, que em seguida é protonada pela Asp¹⁶⁶ via Ser¹²⁹. Em sequência, a extremidade N-terminal da Thr¹ polariza uma molécula de água para que esta realize um ataque nucleofílico à Acil-enzima. Assim, ocorre a liberação do propeptídeo, Gly¹, e a Thr¹ está pronta para participar da catálise (Figura 2.4 – a). A catálise inicia-se com o ataque nucleofílico pela cadeia lateral da Thr¹ ao carbono da carbonila da ligação cindível e é seguida pela doação de um próton ao nitrogênio, da ligação peptídica, pela extremidade N-terminal da Thr¹. Assim, ocorre a quebra da ligação peptídica e a liberação do componente amina. A Thr¹ desprotonada ativa uma molécula de água para que ocorra a hidrólise da Acil-enzima, gerando um composto de ácido carboxílico e liberando o sítio ativo do proteassoma (Figura 2.4 – b) (Huber E. M. *et al.* 2016).

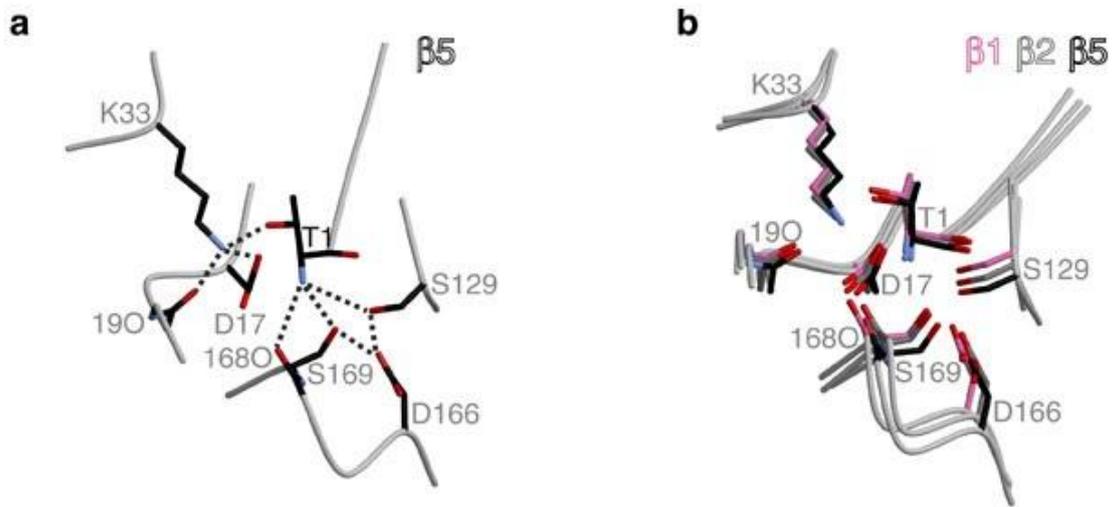


Figura 2.3 - Posicionamento e rede de ligação de hidrogênio entre os resíduos envolvidos no sítio ativo do proteassoma 20S. A tríade catalítica do proteassoma (Thr1, Lys33 e Asp17/Glu17) é estritamente conservada nas subunidades catalíticas. A Thr1 realiza ligação de hidrogênio com a Lys33, que por sua vez interage com o Asp17, além disso, faz ligações de hidrogênio com resíduos de Ser129, Asp166, Ser169 e o resíduo 168. Imagem adaptada (Huber E. M. *et al.*, 2016).

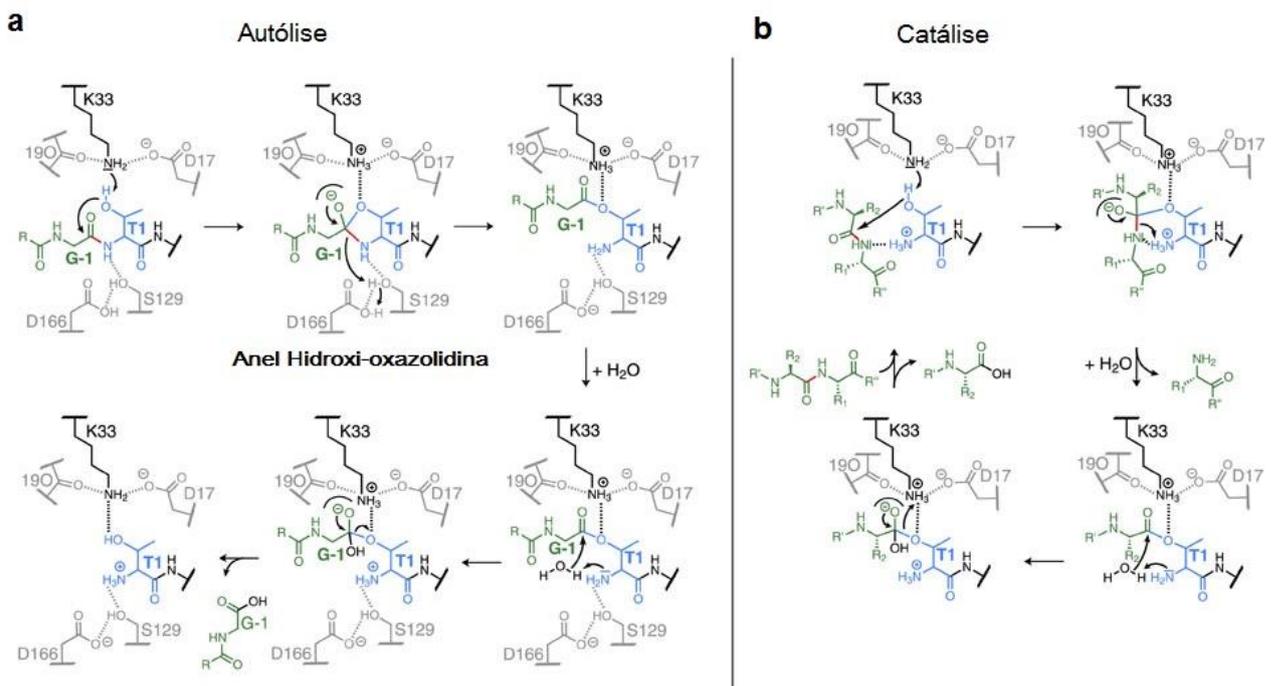


Figura 2.4 - Mecanismos de Autólise (a) e Catálise (b) do proteassoma 20S. A autólise inicia-se com a desprotonação da Thr¹ pela Lys³³ e a formação do estado intermediário tetraédrico. A Gly⁴⁷ estabiliza a carga negativa do buraco oxi-ânion do intermediário tetraédrico. O N-terminal da Thr¹ é liberado e, em seguida, protonado pela Asp¹⁶⁶ via Ser¹²⁹. Uma molécula de água realiza um ataque nucleofílico à Acil-enzima. Assim, ocorre a liberação do propeptídeo, Gly¹, e a Thr¹ está pronta para participar da catálise. Imagem adaptada (Huber E. M. *et al.* 2016).

A degradação de proteínas oxidadas e o controle de proteínas regulatórias são duas importantes funções em que o proteassoma se encontra envolvido. Sendo que, ao considerar a importância da degradação de proteínas para a manutenção da homeostase

celular, pode-se relacionar a funcionalidade do proteassoma em diversos processos celulares como a apoptose, a transdução de sinal, transcrição de genes, reparação de DNA, respostas imunes e a progressão do ciclo celular por exemplo. Células que estão com uma alta atividade metabólica por estarem em rápido e contínuo processo de divisão celular, como as células tumorais, dependem da atividade do proteassoma para regular a degradação de proteínas como reguladores de ciclo celular, moléculas de sinalização, fatores de transcrição, supressores tumorais e proteínas anti-apoptose. Quando a degradação destas proteínas é interrompida, observa-se uma desaceleração na progressão do câncer, pois a inibição da atividade do proteassoma induz à apoptose nas células cancerígenas. Indicando um potencial em aplicações clínicas para os inibidores de proteassoma (Sadoul R *et al.* 1996; Drexler HC 1997; Lopes UG *et al.* 1997; Jana NR *et al.* 2001; Adams J. 2002; Jana NR *et al.* 2004; Adams J. 2004).

I.3 Inibidores de Proteassoma

Diversos compostos que inibem o proteassoma têm sido descritos, os quais podem ser classificados como sintéticos ou naturais e serem relacionados conforme a maneira em que se ligam aos sítios ativos, podendo ser reversivelmente ou irreversivelmente (Adams J. 2003).

Os primeiros inibidores de proteassoma sintéticos desenvolvidos foram os aldeídos peptídeos, pois estudos anteriores já indicavam o potencial uso destes peptídeos como inibidores, além de obtidos a partir de processo de síntese relativamente simples (Wilk and Figueiredo-Pereira 1993; Vinitzky *et al.* 1994; Harding *et al.* 1995; Iqbal *et al.* 1995).

Aldeídos peptídeos como os inibidores de leupeptina, inibidores de calpaína I e II, assim como compostos correlatos, como os inibidores sintéticos MG-132 e MG-115, são frequentemente utilizados para inibir a atividade do proteassoma, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A maioria destes compostos inibem primeiramente a atividade tipo quimotripsina do proteassoma, mas em altas concentrações são capazes de modificar a atividade das três subunidades catalíticas (Bogyo M.; Wang E. W. 2002).

Inibidores de proteassoma sintéticos reversíveis apresentam algumas limitações como ampla especificidade e instabilidade em solução. Portanto, para superar estes problemas, os compostos sintetizados devem ser suficientemente potentes para em baixa dosagem, eliminando assim problemas como reatividade cruzada e outros efeitos

tóxicos, como trombocitopenia, hiponatremia, hipocalcemia, fadiga e mal-estar (Bogyo M.; Wang E. W. 2002; Orłowski R.Z. 2002).

Outra importante classe de inibidores de proteassoma sintéticos são compostos que inativam o nucleófilo catalítico, Thr¹, por formação de um adutor covalente irreversível. Estes inibidores muitas vezes são chamados de substratos suicidas e sua utilização é limitada a estudos laboratoriais, por não terem utilização clínica viável devido à inibição permanente do proteassoma (Bogyo M.; Wang E. W. 2002).

Com o desenvolvimento dos estudos a respeito da estrutura e topologia do proteassoma, surgiu uma nova classe de inibidores, os quais são sintetizados com base nos mapas detalhados da cavidade interna do proteassoma. Assim pode-se gerar inibidores com *designs* específicos para cada sítio ativo, ou até inibidores que abrangem vários sítios concomitantemente. Estes inibidores são chamados de inibidores sintéticos bivalentes (Bogyo M.; Wang E. W. 2002).

Algumas moléculas encontradas na natureza, também funcionam como inibidores de proteassoma. Sendo que, muitas delas chegam a ser muito mais específicas e potentes do que diversos inibidores sintéticos já produzidos. Estes inibidores naturais podem ser moléculas pequenas como a lactacistina e a epoxomicina, ou macromoléculas proteicas, como moduladores do proteassoma, endógenos, e inibidores de proteínas, exógenos (Bogyo M.; Wang E. W. 2002).

Em alguns estudos, inibidores de serinoproteases têm sido reportados com potencial para inibir o proteassoma, que pode levar à alterações de processos vitais, como ciclo celular, mitocondrial, o que os caracterizam como potenciais moléculas que podem atuar como agentes anti-carcinogênicos (Chen Y.W. *et al.* 2005; Souza L.C. *et al.* 2014; Mehdad A. *et al.* 2016). Inibidores da família *Bowman-Birk* (BBI) apresentaram efeitos de inibição mais potentes sobre o proteassoma do que alguns inibidores comumente utilizados como ALLN e MG132. Especificamente, em células de MCF-7 intactas, o BBI suprimiu mais a atividade tipo quimotripsina do proteassoma do que o inibidor ALLN, além de demonstrar ser capaz de inibir as outras atividades catalíticas do complexo, 25% para atividade tipo tripsina e apenas 10% para tipo caspase (Chen Y.W. *et al.* 2005). Outro inibidor da mesma família, o BTCl (do inglês *black-eyed-pea trypsin/chymotrypsin inhibitor*), objeto de estudo da presente dissertação, apresentou inibição similar ao MG132 para as atividades tipo caspase e quimotripsina do proteassoma, mas em relação à atividade tipo tripsina, este inibidor foi mais potente do que MG132. Além disso, ao ser utilizado a uma concentração de 20

μM , o BTCI inibiu praticamente 100% das três atividades catalíticas do proteassoma (Souza L.C. *et al.* 2014), demonstrando que inibidores de serinoproteases também são funcionalmente ativos como inibidores de proteassoma.

I.4 Inibidores de Serinoproteases

Assim como já mencionado, serinoproteases estão envolvidas em diversos processos fisiológicos. O estudo de inibidores destas enzimas tem sido relacionado com respostas imunológicas e ações pró-inflamatórias (Safavi F.; Rostami A. 2012). Inibidores de serinoproteases podem ser responsáveis pela supressão de citocinas inflamatórias, podem estar envolvidos na ativação e na regulação do sistema complemento, podem apresentar efeitos supressores em doenças alérgicas inflamatórias do sistema respiratório, podem demonstrar efeitos anti-inflamatórios e imunoregulatórios e podem ter potencial terapêutico para doenças autoimunes (Maryanoff *et al.* 2010; Karpuzoglu *et al.* 2011; Lewis 2012). Além do efeito anti-inflamatório, recentemente foi verificado o potencial anti-HIV do BBI, que bloqueou a entrada do vírus em macrófagos (Ma TC *et al.* 2018).

Sobre os principais efeitos farmacológicos dos inibidores da protease de planta (Figura 3.1), está a indução da apoptose em células de leucemia (A), os efeitos anticancerígenos *in vitro* na iniciação (B), proliferação (C) e progressão (D) de diferentes tipos de câncer (câncer gástrico, cólon, pulmão, ovário e próstata), os efeitos anti-inflamatórios (E) e anti-coagulantes (F), a ação contra doenças cardiovasculares atuando contra a formação de placa em um vaso sanguíneo (G), atividade antibacteriana (H) e antifúngica (I). Contudo, o potencial terapêutico mais estudado a respeito de inibidores de serinoproteases, mais especificamente os da família *Bowman-Birk*, está relacionado com o tratamento de diversos tipos de câncer e carcinomas (Kennedy 1994; Srikanth and Chen 2016).

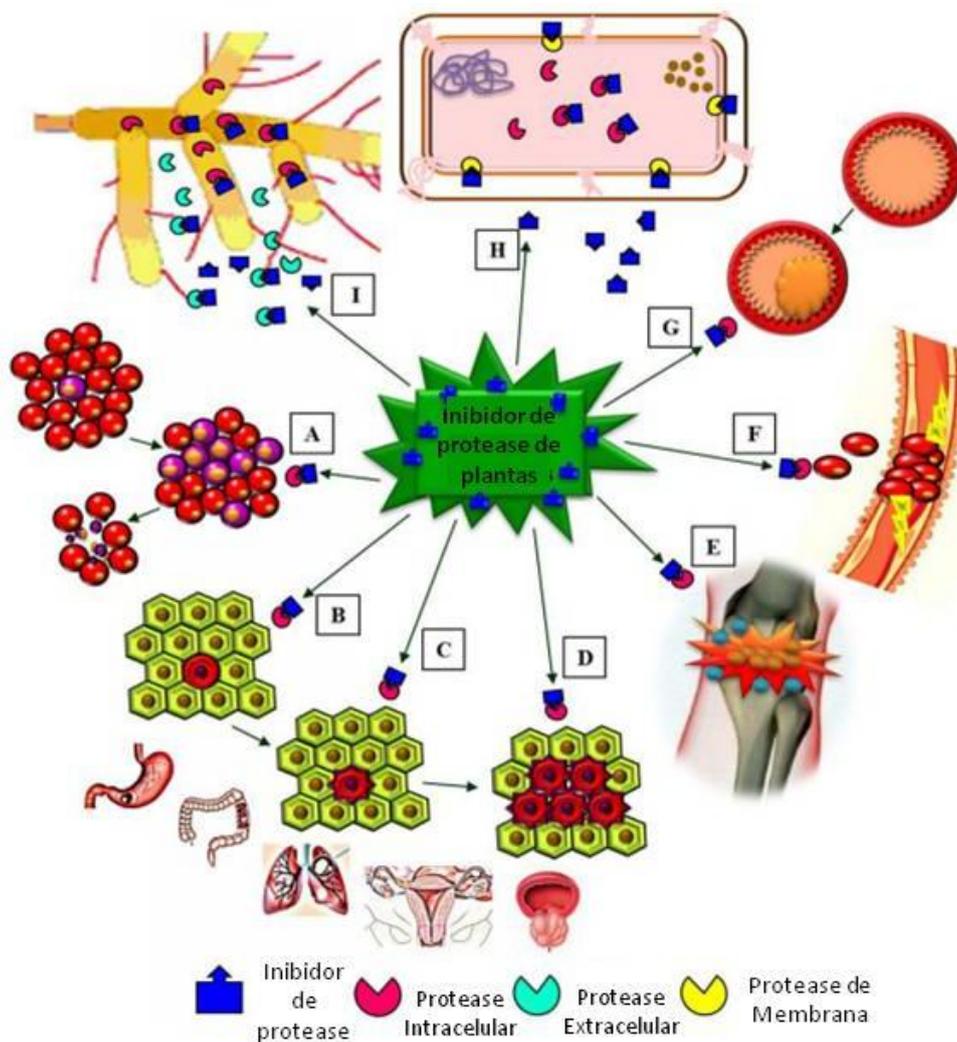


Figura 3.1 – Esquema dos principais efeitos farmacológicos dos inibidores de protease extraídos de plantas. Indução da apoptose de células de glóbulos vermelhos saudáveis e leucemia células sanguíneas (A), efeitos anticancerígenos *in vitro* na iniciação (B), proliferação (C) e progressão (D) de diferentes tipos de câncer como câncer gástrico, cólon, pulmão, ovário e próstata, efeitos anti-inflamatórios (E) e anti-coagulantes (F), a ação contra doenças cardiovasculares atuando contra a formação de placa em um vaso sanguíneo(G), atividade antibacteriana (H) e antifúngica (I). Imagem adaptada (Srikanth and Chen 2016).

Inibidores da família *Bowman-Birk* (IBBF) são frequentemente encontrados em sementes de espécies de leguminosas (Laskowik; Kato, 1980; Clemente *et al.* 2011; Srikanth; Chen 2016) e foram primeiramente isolados e caracterizados em 1946 e 1963 pelos pesquisadores que nomearam a família, Bowman e Birk. Os membros desta família são pequenas moléculas, com massa molecular entre 8 a 10 kDa, que inibem principalmente a atividade da tripsina e da quimotripsina. A interação dos inibidores, por ligações não-covalentes, leva à inativação da protease, sendo que os sítios reativos dos inibidores adotam uma conformação semelhante à do substrato proteico desta. (Bode *et al.*, 2000; Clemente *et al.*, 2006).

Geralmente, os IBBFs têm dois sítios reativos, um para quimotripsina e outro para tripsina, que apresentam capacidade de atuarem independentes e simultaneamente, devido à interação em regiões opostas na estrutura da enzima. Os dois subdomínios de ligação são compostos por grampos β em folhas β antiparalelas, que são estabilizadas por 5 a 7 ligações dissulfeto que conferem uma maior estabilidade, rigidez e simetria à molécula. Os *Loops* contendo os sítios reativos estão presentes na superfície da molécula, o que facilita o acesso ao sítio ativo da protease. Em IBBFs, é comum a presença de partes hidrofóbicas expostas ao solvente, característica que influencia na associação entre eles, frequentemente formando dímeros, trímeros ou outros oligômeros mais complexos (Gennis, L.S.; Cantor C.R. 1976; Odani S.; Ikenaka T. 1978; Terada, S. *et al.* 1994; Voss, R. H. *et al.* 1996; de Freitas S. M. *et al.* 1997; Koepke, J. *et al.* 2000; Silva *et al.* 2005; Barbosa J. A. R. G. *et al.* 2007).

O *Bowman-Birk Inhibitor* (BBI) é o inibidor mais estudado dessa família e é obtido a partir de sementes de *Glycine max*, a soja. Ele é uma proteína pequena com 71 aminoácidos e massa molecular equivalente a 8 kDa. Apresenta atividade inibitória para tripsina e quimotripsina e uma alta estabilidade em diferentes pHs e temperaturas (Birk 1985).

Assim como a soja, outras espécies de leguminosas também já foram utilizadas para a extração e purificação de diferentes IBBFs, por exemplo, a lentilha (*Lens culinaris*), o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a ervilha (*Pisum sativum*) e o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (Ventura M. M. and Xavier-Filho J. 1966; Xavier-Filho J. and Ventura M. M. 1988; Clemente *et al.* 2011; Srikanth and Chen 2016).

I.5 O inibidor Black-eyed-pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor (BTCI)

O BTCI é um inibidor pertencente à família *Bowman-Birk*, obtido a partir de sementes de *Vigna unguiculata*. O BTCI é uma proteína globular estável, com massa molecular de 9.1 kDa, contendo 83 resíduos de aminoácidos, sendo 14 de cisteína que formam sete ligações dissulfeto (Morhy L. and Ventura MM. 1987; Xavier-Filho and Ventura M. M. 1988; de Freitas S. M. *et al.* 1997; da Silva L. P. *et al.* 2001; Barbosa J.A.R.G. *et al.* 2007). A atividade inibitória do BTCI praticamente não varia com mudanças de pH e temperatura (da Silva L. P. *et al.* 2001). A atividade inibitória de 96% do BTCI foi mantida após um aquecimento a 95 °C por 60 minutos, e com

variações de pH entre 3 a 11, o que demonstrou a alta estabilidade estrutural da molécula.

O BTCI apresenta potencial diverso com aplicações em áreas de saúde e com aplicações biotecnológicas na agricultura. Em 2003 (Franco *et al.*) demonstrou-se o potencial do BTCI para o controle de pragas, como a do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). As larvas deste inseto apresentaram alterações na morfologia do tecido intestinal e uma redução de aproximadamente 46% do peso após serem submetidos à ingestão do BTCI. Já os insetos adultos, apresentaram uma taxa de mortalidade de 62% na concentração de 100 µM de BTCI administrado (Franco *et al.* 2003).

O potencial biotecnológico do BTCI em áreas da saúde foi demonstrado em ensaios *in vitro* e *in vivo*, tendo como foco os efeitos natriuréticos, cardiovasculares e, principalmente efeitos anticarcinogênicos. O BTCI apresentou efeitos na regulação da homeostase de fluidos e eletrólitos devido seu papel potencializador do efeito natriurético da guanilina, aumentando o fluxo urinário e a excreção de Na⁺ (Carvalho *et al.* 2008). O BTCI também potencializa a ação hipotensora de bradicinina, atuando como molécula carreadora e moduladora de bradicinina (Álvares A. C. M. *et al.* 2014). Além disso, o BTCI apresentou efeitos anticarcinogênicos em células de câncer de mama. O tratamento de células MCF-7 com este inibidor a uma concentração de 200 µM por 72 horas induziu uma redução significativa da viabilidade e da proliferação celular, bloqueando as células nas fases S e G2/M. Modificações morfológicas como fragmentação da membrana plasmática, presença de vesículas com membrana dupla, aumento do tamanho dos lisossomos, alterações no núcleo e o inchaço das mitocôndrias foram observados, além de detectar o aumento do número de células anexina V⁺, a acidificação do citoplasma, redução do potencial de membrana e a fragmentação do material genético. Estes resultados demonstram o efeito citotóxico do BTCI que induz a morte celular programada associada com a permeabilização da membrana lisossomal nas células de linhagem proliferativa, indicando seu potencial terapêutico contra o câncer (Joanitti *et al.* 2010; Mehadad A. *et al.* 2016). Apesar dos mecanismos pelos quais o BTCI atua nos processos acima referenciados não estarem ainda completamente elucidados, a atividade inibitória contra as proteases tripsina e quimotripsina deve ser o principal fator responsável por sua ação em amplo espectro.

Assim como o BBI, o BTCI apresenta dois sítios reativos distintos e independentes para tripsina e quimotripsina, sendo Lys²⁶ e Phe⁵³ os respectivos resíduos

P1 (Voss, R. H. U. *et al* 1996; Koepke, J. U., *et al* 2000; Barbosa J. A. R. G. *et al.* 2007). A interação das serinoproteases, tripsina e quimotripsina, com este inibidor ocorre por processos endotérmicos, espontâneos e entropicamente favoráveis, com constantes de ligação respectivas a 10^9 M^{-1} e 10^7 M^{-1} , segundo Fachetti H. C. S. *et al.* (1984) e de Freitas S. M. *et al.* (1999). Em Brand G. D. *et al.* (2017), a formação do complexo do BTCI com a α -quimotripsina também é entropicamente favorável, mas, diferente dos resultados previamente descritos, apresentou uma interação exotérmica. Os resultados para as constantes de ligação para tripsina e quimotripsina com este inibidor são 10^{10} M^{-1} e 10^{10} M^{-1} (Brand G. D. *et al.* 2017). E os complexos binários e ternários formados apresentam maior estabilidade em pH 7,0 (Ventura M.M. *et al.* 1975), embora não haja diferenças significativas na estrutura tridimensional do complexo ternário entre pHs neutro e ácido (Esteves *et al.* 2010).

O BTCI possui resíduos aromáticos que contribuem para a formação oligomérica, pois ficam expostos ao solvente (Ventura *et al.* 1984). Foram identificados, por espalhamento de luz e por microscopia de força atômica, diferentes estados multiméricos do BTCI, em equilíbrio entre monômeros, dímeros, trímeros e hexâmeros (Ventura *et al.* 1981; Silva *et al.* 2005).

A estrutura do BTCI consiste em dois subdomínios, com aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos cada, e uma região entre os subdomínios. Os subdomínios possuem 3 fitas- β , formando folhas- β antiparalelas. Um *loop* conservado associado a duas destas fitas- β formam o sítio reativo. Sendo, o sítio reativo para tripsina, o *loop* entre as fitas 1 e 2 contendo o resíduo reativo de **Lys²⁶** e, o sítio reativo para quimotripsina, o *loop* entre as fitas 4 e 5 contendo o resíduo reativo de **Phe⁵³** (Figura 4.1) (Barbosa J.A.R.G. *et al.* 2007).

Na região entre os subdomínios, o BTCI possui um conjunto de aminoácidos carregados que ficam enterrados na estrutura (**Asp³⁶**, **Arg³⁸** e **His⁴³**), sendo que a **Asp⁶³**, também pertencente a esse conjunto de aminoácidos, realizando ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água (Barbosa J.A.R.G. *et al.* 2007). O BTCI têm três aminoácidos aromáticos posicionados numa geometria ortogonal (**His⁴³**, **Phe⁶⁷** e **Tyr⁶⁹**) e esta característica associada com a rede de ligações de hidrogênio e as 7 ligações dissulfeto têm sido utilizadas para justificar a alta estabilidade conferida aos IBBFs (Barbosa J.A.R.G. *et al.* 2007; Burley S. K.; Petsko. G. A. 1985; Catalano, M., L. *et al.* 2003) (Figura 4.1).

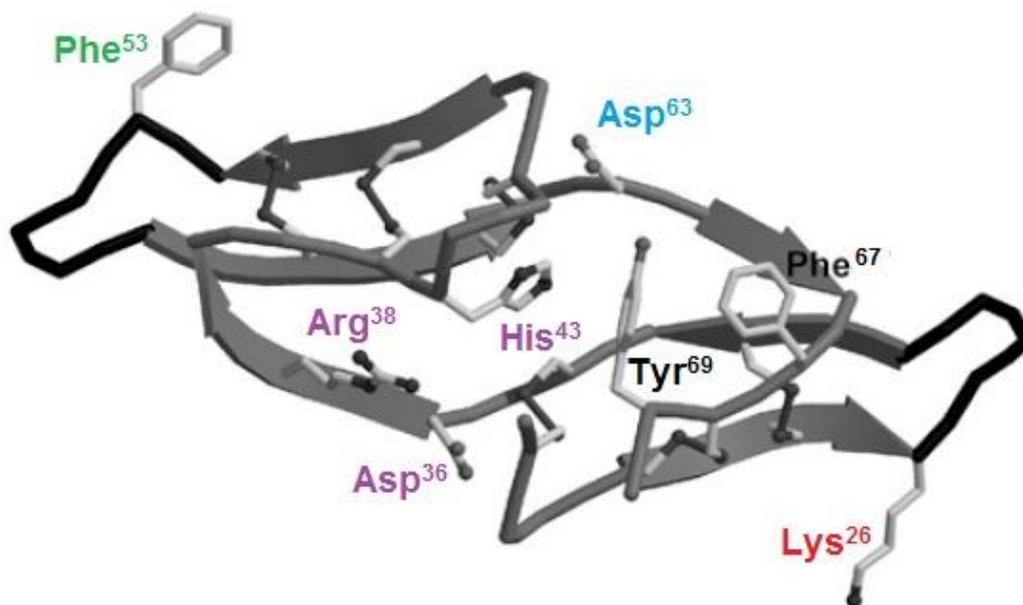


Figura 4.1 – Estrutura tridimensional do BTCl. Os resíduos reativos e aminoácidos da região entre os subdomínios estão indicados com suas respectivas cadeias laterais.. O sítio reativo para inibição da tripsina contém o resíduo Lys26 e o sítio para inibição da quimotripsina contém o resíduo Phe53. Imagem adaptada (Barbosa J.A.R.G. *et al.* 2007).

Em Esteves G.F. (2010) verificou-se que os complexos binários e ternários entre BTCl, tripsina e quimotripsina favoreceram a estabilização das estruturas, aumentando a temperatura de transição dos complexos durante o desdobramento das proteínas. Além disso, observou-se modificações estruturais localizadas nas enzimas e na interface proteica durante a formação dos complexos. O complexo ternário contém uma molécula de quimotripsina, outra de tripsina e do BTCl e isto é confirmado pela densidade eletrônica corresponder a sequência das duas proteases e não de duas cópias da mesma, além de nenhum choque estereoquímico ser encontrado entre as enzimas.

Na estrutura representada na Figura 4.2, pode-se observar o resíduo reativo **Lys²⁶**, entre as fitas 1 e 2, interagindo com uma molécula de tripsina (magenta) e o resíduo **Phe⁵³**, entre as fitas 4 e 5, com a molécula de quimotripsina (azul). A distância entre os átomos de carbono da cadeia principal dos resíduos P1 dos dois sítios reativos apresentou distância semelhante no complexo ternário (32,86 Å) e binário (32,59 Å) (Esteves *et al.* 2010).

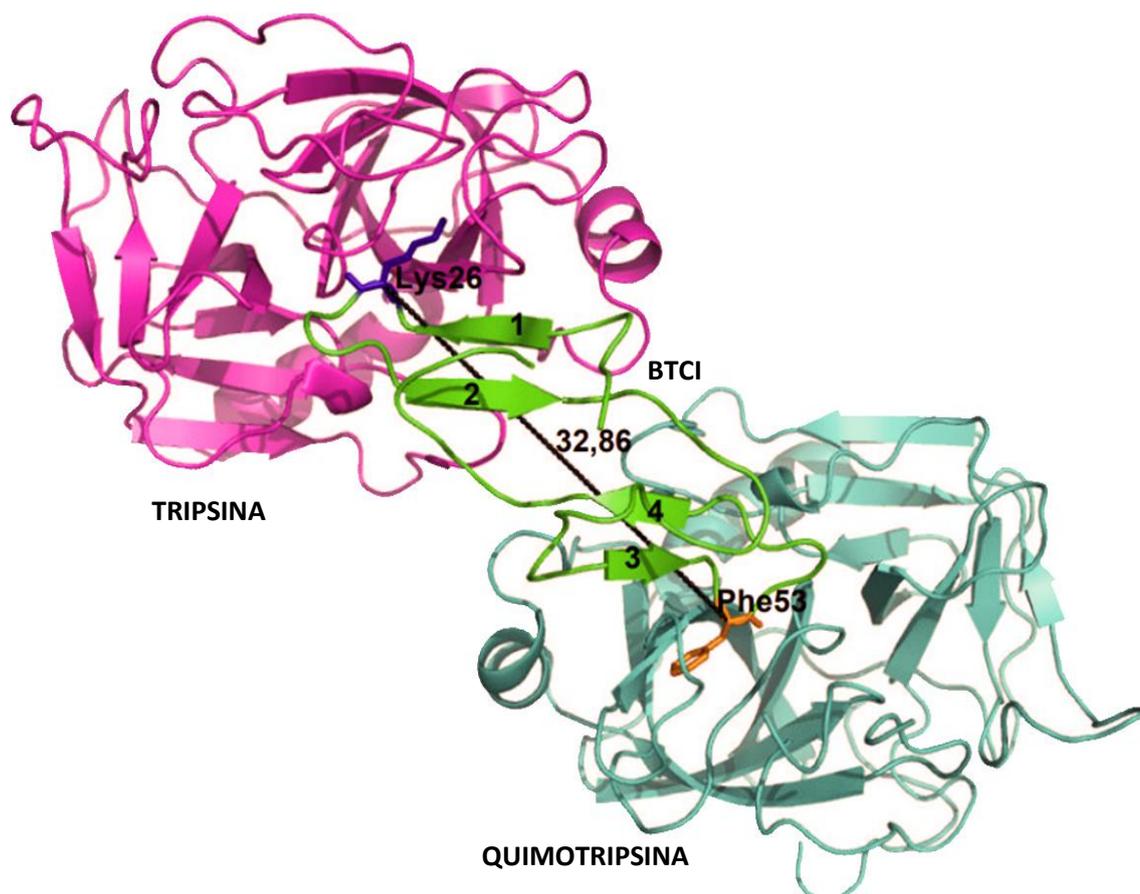


Figura 4.2 – Complexo ternário do BTCI com Tripsina e Quimotripsina. O resíduo reativo Lys26 interage com uma molécula de tripsina (cor magenta) e o resíduo Phe53 com a molécula de quimotripsina (cor azul). A distância entre os átomos de carbono da cadeia principal dos resíduos P1 dos dois sítios reativos apresentou uma distância de 32,86 Å. Imagem adaptada (Esteves *et. al.* 2010).

I.6 BTCI e proteassoma 20S

Devido aos efeitos anticarcinogênicos do BTCI e a relação de inibidores naturais de proteassoma 20S com os efeitos citotóxicos às células de câncer, Souza L.C. *et al.* (2014) relatou os efeitos deste inibidor com o proteassoma 20S, purificado de eritrócitos de cavalo, e realizou experimentos de imunocolocalização de BTCI e proteassoma em células de mama MCF-7.

A imunocolocalização de BTCI e o proteassoma em células de câncer de mama MCF-7 mostrou que as duas moléculas co-localizam no citoplasma e no núcleo após duas horas de incubação, mostrando a permeabilidade celular ao BTCI (Souza L.C. *et al.* 2014).

Em análises por DLS do complexo BTCI-proteassoma, demonstrou-se a influência da presença do inibidor na estrutura do proteassoma, indicando uma mudança conformacional que levou o aumento do diâmetro hidrodinâmico do complexo de 21,8

nm a 22,7 nm. O complexo também foi caracterizado termicamente estável a pH 7,5 e até 55 °C. Sendo que a 60 °C ocorreu a dissociação do complexo, levando a agregação (Souza L.C. *et al.* 2014).

Em ensaios de atividade proteolítica, o BTCI inibiu a ação do proteassoma tipo quimotripsina, tipo tripsina e tipo caspase, com os respectivos valores de constantes de inibição de $7,0 \times 10^{-7}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M e $14,0 \times 10^{-7}$ M. O BTCI apresentou uma inibição mais potente para atividade tipo tripsina do que o inibidor de proteassoma classicamente utilizado, MG132. Além disso, o BTCI foi o primeiro inibidor de sua família a inibir as três atividades proteolíticas do proteassoma. Supõe-se que a inibição da atividade tipo caspase seja devido a um impedimento estérico (Souza L.C. *et al.* 2014).

O BTCI, como inibidor de proteassoma, influencia na via de degradação de proteínas ubiquitina-proteassoma (Mehdad A. *et al.* 2016). Assim, encontra-se associado a efeitos citotóxicos, citostáticos e à interferência na progressão do ciclo celular em células de câncer de mama, como fragmentação de DNA, permeabilização da membrana lisossomal e apoptose. (Joanitti *et al.*, 2010; Mehdad A. *et al.* 2016). Em Mehdad *et al.* (2016) demonstrou um rápido aumento de ROS e a perda do potencial de membrana da mitocôndria induzido pelo BTCI, provavelmente devido a inibição do proteassoma por essa molécula. Isto pode justificar a indução da morte celular programada na presença do inibidor devido a provável influência da disfunção do proteassoma e a geração de ROS sobre a regulação gênica associada ao crescimento celular, diferenciação e a apoptose (Mehdad A. *et al.* 2016).

II. Justificativa

Um dos objetivos nas pesquisas relacionadas a câncer é a busca de novas moléculas que impedem o desenvolvimento da doença e que apresentam efeitos colaterais diminuídos ou com uma menor gravidade para os pacientes. Uma alimentação baseada em leguminosas, plantas que possuem inibidores de protease, tem sido relacionada com a baixa incidência de câncer em certas populações humanas. Isto atribui aos inibidores de protease o efeito de reduzirem o índice do desenvolvimento de câncer nesses indivíduos (Messina M.; Barnes S. 1991; Kennedy AR. 1993; Messina MJ *et al.* 1994).

Tendo isto como princípio, aumentaram-se o número pesquisas sobre a relação de inibidores de protease e o câncer. Estes estudos têm sido atribuídos à capacidade dos inibidores de protease de interferir na clivagem de proteínas, principal atividade do proteassoma que está relacionada ao desenvolvimento de neoplasias (Kennedy AR. 1998; Deryugina *et al.* 2002; , Zucker *et al.* 2003). Mais estudos sobre a via de indução da morte celular de células cancerígenas pela utilização de inibidores de protease foram desenvolvidos e estabeleceu-se estes inibidores como agentes anticancerígenos em vários tipos de câncer como o hepático, colorretal, oral, mamário, prostático, esofágico, do trato gastrointestinal, do colón, leucemia de células *Jurkat* e leucoplasia oral (Messadi D. V. *et al.* 1986; Clair W.H.S.. *et al.* 1990; Billings P. C. *et al.* 1990; Von Holf E. *et al.* 1991; Kennedy A. R. *et al.* 1993; An W.G. *et al.* 2000; Armstrong W. B. *et al.* 2000; Armstrong W. B.; Jensen J. *et al.* 2000; Malkowicz S. B.*et al.* 2001; Chen Y. W., *et al.* 2005; Clemente A. *et al.* 2010; Joanitti G. A. *et al.* 2010; Armstrong W. B. *et al.* 2013; Mehdad A. *et al.* 2016).

Existem cerca de 20 famílias de inibidores de protease naturais, (Laskowski M.; Qasim M.A. 2000; De Leo F. *et al.* 2002) sendo a família do *Bowman-Birk Inhibitor* (BBI) uma das mais estudadas. O BBI, principal inibidor desta família, é obtido a partir da purificação de sementes de soja e apresenta atividade inibitória sobre a quimotripsina e a tripsina, atuando na prevenção e supressão de câncer em diferentes órgãos e tecidos *in vitro* e *in vivo*, como exemplo cólon, fígado, pulmão, esôfago, epitélio oral, ovário, próstata, células hematopoiéticas, e do tecido conjuntivo (Kennedy AR. 1998; Kennedy AR.; Wan X. S. 2002; Chen Y. W., *et al.* 2005; Saito H. *et al.* 2007). O extrato de soja enriquecido em BBI, denominado concentrado de BBI (BBIC), está sendo testado como nova droga pela US *Food and Drug Administration* (FDA) e está na fase clínica II/IIB

para ser utilizado na prevenção de leucoplasia oral, na fase clínica I para prevenção de hiperplasia prostática e em ensaios clínicos randomizados, duplo-cego e controlado por placebo para estudos de colites ulcerativas (Armstrong *et al.*, 2000; Armstrong; Meyskens *et al.* 2000; Malkowicz *et al.* 2001; Lichtenstein GR *et al.* 2008; Meyskens *et al.* 2010). Outro membro desta família é o BTCI, que apresenta também atividade inibitória a tripsina e quimotripsina e é extraído do feijão de corda (*Vigna unguiculata*) (Ventura M.M., Xavier-Filho J., 1966). O BTCI é capaz de induzir efeitos citostáticos e citotóxicos significativos em células de câncer de mama, afetando a viabilidade e proliferação de células cancerígenas, MCF-7, sem afetar células normais da mama, reduzindo os efeitos colaterais (Joanitti G. A. *et al.* 2010).

Sabendo que o proteassoma 20S apresenta atividades catalíticas semelhantes a tripsina, quimotripsina e caspase, e que, ao ser inibido, ocorre a indução da apoptose em células cancerígenas, foram testados os efeitos de inibição do BTCI ao proteassoma, para relacionar a inibição do proteassoma pelo BTCI com os efeitos citotóxicos deste em células de câncer de mama (Joanitti G. A. *et al.* 2010; Souza L.C. *et al.* 2014). Em Mehdad A. *et al.* (2016), demonstrou-se que a citotoxicidade do BTCI à células de câncer deve-se, diretamente, à inibição do proteassoma 20S e, indiretamente, à geração de moléculas intermediárias responsáveis pelo estresse oxidativo.

O BTCI, diferentemente de outros BBIs, inibiu as três atividades catalíticas do proteassoma, demonstrando o seu grande potencial como alternativa para os tratamentos de câncer (Souza L.C. *et al.* 2014). Mais estudos sobre a interação do BTCI com o proteassoma necessitam ser realizados para que o BTCI possa vir a ser utilizado em terapias contra o câncer. Portanto, no presente trabalho, foi priorizado o estudo físico-químico, termodinâmico e estrutural do proteassoma e do complexo proteassoma com o BTCI, visando contribuir para compreensão da relação estrutura e função destas moléculas associadas aos processos antitumorais.

Objetivos

1) Objetivo geral

Caracterizar e analisar os aspectos físico-químicos, termodinâmicos e estruturais do complexo BTCl-proteassoma 20S, visando contribuir para a compreensão da relação estrutura e função destas moléculas associadas aos processos antitumorais.

2) Objetivos específicos

- a) Expressar e purificar o proteassoma 20S em linhagem RJD1144 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- b) Purificar o BTCl a partir do extrato bruto de sementes de *V. unguiculata*.
- c) Analisar a atividade proteolítica do proteassoma 20S na presença do inibidor (BTCl) por fluorescência.
- d) Realizar e analisar ensaios de caracterização físico-química, termodinâmica e estrutural do complexo do proteassoma 20S com o BTCl por fluorescência, calorimetria e ultracentrifugação analítica.

III. Materiais e Métodos

III.1 Extração e purificação do BTCl

III.1.1 Preparação do extrato bruto de sementes de feijão-de-corda.

O BTCl foi purificado a partir do extrato bruto de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*- variedade Seridó). As sementes foram obtidas do banco de sementes mantido pelo Departamento de Bioquímica da Universidade de Fortaleza e estão sendo cultivadas na Estação de Biologia Experimental da Universidade de Brasília. Após três meses do plantio, as vagens maduras foram colhidas e os grãos selecionados manualmente e estocados a 4 °C até a produção do extrato bruto.

O extrato bruto foi obtido segundo a metodologia descrita por Ventura e Xavier-Filho (1966). As sementes de *V. unguiculata* coletadas foram trituradas e, a partir de 500 g destas, iniciou-se o processo de extração. Primeiramente, as 500 g de sementes de *V. unguiculata* trituradas foram dissolvidas em 2 litros de água destilada na presença de inibidor de protease sintético, flúor fenilmetilsulfonil (PMSF), 1×10^{-5} M. Esta suspensão foi mantida sob agitação constante a 4 °C por 12 horas e, após este período, foi homogeneizada em liquidificador, filtrada em fralda de tecido de algodão e centrifugada a 8.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi submetido à precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 2,5% e mantido a 4 °C sob agitação por 1 hora. A suspensão foi filtrada e submetida à precipitação com sulfato de amônio, na forma sólida, a 50%. Essa mistura foi mantida à agitação constante por 1 hora e depois foi centrifugada a 8.000 g por 40 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em água destilada, dialisado por 12 horas e armazenado a -20 °C até o uso.

III.1.2 Purificação do BTCl

O BTCl foi purificado, a partir do extrato bruto de sementes de *V. unguiculata*, por cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE-Celulose (3,5 × 23 cm). A ativação prévia da coluna foi realizada por lavagens sucessivas de 150 mL de HCL 0,2 M, 500 mL de água destilada, 150 mL de NaOH 0,2 M, 500 mL de água destilada, 50 mL de tampão fosfato 100 mM (10X), pH 7,3 e 500 mL de tampão fosfato 10 mM (1X), pH 7,3. Antes de passar o extrato bruto pela coluna, o pH do sobrenadante foi equilibrado com o tampão fosfato para uma concentração final de 10 mM. A amostra foi

aplicada na coluna, lavada com 700 mL do mesmo tampão (1X) e submetida a um gradiente linear de 0 a 800 mM de NaCl, para um volume de gradiente total de 800 mL, em um fluxo aproximado de 3,0 mL/min. Os primeiros 150 mL a partir do início do gradiente foram descartados e a partir daí a coluna de DEAE-Celulose foi acoplada ao sistema *ÄKTA prime* (GE Healthcare, EUA) para monitoramento da eluição das proteínas, mediante leituras da absorvância a 280 nm. Como o gradiente não é realizado pelas bombas do próprio sistema *ÄKTA*, o gradiente foi monitorado pelo aumento da condutividade proporcionado pelo aumento gradual da concentração de sal. As frações que correspondem ao pico de eluição de BTCI foram dialisadas com água destilada por 12 horas e liofilizadas. .

III.2 Análise da pureza do BTCI por espectrometria de massa - MALDI-TOF

Os componentes moleculares obtidos das purificações do BTCI foram analisados, em colaboração com o professor Marcelo Ramada na Universidade Católica de Brasília, utilizando-se um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF *UltraFlex III* sob controle do programa computacional *Flex Control 3.3* (BrukerDaltonics, Alemanha), para verificação de sua pureza por meio da identificação da massa molecular. A amostra do BTCI liofilizado foi dissolvida em água ultrapura (10-20 µL). Após isto, em um parafilme, 1,0 µL da amostra analisada foi misturado com 3 µL de uma solução de matriz saturada de ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico contendo 5 mg de ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico, 200 µL de água ultrapura, 250 µL de acetonitrila e 50 µL de ácido trifluoroacético). Ao ser realizada a mistura, 1 µL desta foi depositado sobre uma placa de *MTP AnchorChip 600/384* e em temperatura ambiente, e esperou-se a secagem completa das amostras para que as análises por meio da espectrometria de massa fossem realizadas.

Os espectros foram adquiridos a partir de 200 disparos de laser tipo *SmartBeam* à frequência de 100 Hz em modo linear. Para as análises foi realizada a calibração externa com uma mistura padrão de proteínas em uma faixa m/z 4000 a 20000, sendo que a faixa molecular do calibrante foi escolhida devido à massa do BTCI, aproximadamente 9100 Da.

III.3 Determinação da concentração do BTCI

A determinação da concentração do BTCI foi realizada espectrofotometricamente de acordo com a seguinte equação:

$$C(M) = \left(\frac{A_{280\text{nm}} \times 10}{A_{280\text{nm}1\%}} \right) \div 9200$$

Sendo $A_{280\text{nm}1\%}$ a absorvância do BTCI a 1% no comprimento de onda de 280 nm:

$$A_{280\text{nm}1\%} = 8,23$$

III.4 Eletroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes e não desnaturantes

III.4.1 Eletroforese em condições desnaturantes

A confirmação da expressão e purificação do proteossoma 20S e do BTCI foram feitas a partir de ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel separador foi preparado com poliacrilamida 15% m/v, de acordo com Laemmli (1970), (sendo acrilamida 14,5% e bisacrilamida 0,5%), tris-HCl 250 mM pH 8,8, SDS 0,3% m/v, persulfato de amônia (PSA) 0,1% e 3 µl tetrametiletenodiamina (TEMED). O gel concentrador foi preparado com poliacrilamida 5% m/v (sendo acrilamida 4,85% e bisacrilamida 0,15%), tris-HCl 140 mM pH 6,8, SDS 0,3% m/v, PSA 0,1% m/v e 3 µl TEMED.

As amostras de proteossoma 20S analisadas por SDS-PAGE consistiram de alíquotas de 50 µl a 100 µl das frações resultantes da purificação, precipitadas com volumes iguais de uma solução de acetona:metanol (1:1), incubadas a -20 °C durante 1 h e centrifugadas a 14 000 g por 20 min. Estas foram ressuspensas em 25 µl de tampão de amostra Laemmli (SDS 2% m/v, β-mercaptoetanol 2 mM, azul de bromofenol 0,01% m/v, glicerol 40% e tris-HCl 40 mM pH 6,8) e aquecidas a 95 °C por 10 min.

O procedimento de eletroforese foi executado utilizando uma fonte de eletroforese *EPS301 (Amersham Pharmacia Biotech, Suíça)* e tampão de corrida contendo Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% m/v e pH≈8,3, conforme Laemmli (1970). A corrente para cada gel e tensão aplicadas foram limitadas a 35 mA e 220 V, respectivamente. Para os géis em que foram aplicadas apenas as amostras de

BTCl, a coloração foi em *Coomassie brilliant blue* R-250 0,1% m/v, metanol 50% v/v e ácido acético 10% v/v) e descorados em ácido acético 20% v/v, para os géis com amostras de proteassoma 20S foi realizado coloração por nitrato de prata (Oakley, Kirsch e Morris 1980).

III.4.2 Eletroforese em condições não desnaturantes

O gel separador foi preparado com poliacrilamida 5% m/v (sendo acrilamida 4,85% e bisacrilamida 0,15%), Tris-HCl 250 mM pH 8,8, persulfato de amônia (PSA) 0,1% e 3 µl tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel concentrador foi preparado com poliacrilamida 5% m/v (sendo acrilamida 4,85% e bisacrilamida 0,15%), Tris-HCl 140 mM pH 6,8, SDS 0,3% m/v, PSA 0,1% m/v e 3 µl TEMED. O procedimento de eletroforese foi executado utilizando uma fonte de eletroforese *EPS301* (*Amersham Pharmacia Biotech*, Suíça) e a corrente para cada gel e tensão aplicadas foram limitadas a 35 mA e 220 V, respectivamente. A coloração realizada foi por nitrato de prata.

III.5 **Expressão e purificação do proteassoma 20S**

III.5.1 Expressão: curva de crescimento e cultura celular.

Para a expressão do proteassoma 20S, foi utilizada a linhagem RJD1144 (MATa his3_200 leu2-3,112, lys2-801 trp1_63 ura3-52 PRE1^{FH} :: *Ylplac211* URA3) de *Saccharomyces cerevisiae* que nos foi gentilmente cedida pela Dra. Marilene Demasi do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Esta linhagem possui uma cauda de polihistidina e a sequência do peptídeo *Flag* (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) fusionadas à subunidade β4 do proteassoma. As leveduras cresceram em meio rico padrão YPD, contendo dextrose 4% (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 4% de dextrose) e foram coletadas após 60 horas de incubação a 30 °C sob agitação. As células, para a curva de crescimento celular, cresceram até chegarem à absorbância a 600 nm (DO_{600nm}) igual a 0,1. A partir disso, as medições de absorbância foram feitas nos intervalos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 36, 48 e 60 horas. Com os dados obtidos, construiu-se um gráfico para a análise da curva de crescimento celular. O conteúdo de proteínas totais das células a diferentes tempos de crescimento foram analisados por gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE a 15%) para quantificar a expressão das subunidades de proteassoma e determinar o tempo ótimo para a expressão.

III.5.2 Purificação do proteassoma 20S de levedura.

As células coletadas após 60 horas de incubação a 30 °C, foram ressuspensas em tampão Tris-HCl (50 mM pH 7,5, 5 mM de MgCl₂ e KCl 20 mM) contendo NaCl 500 mM e imidazol 20 mM. As células foram rompidas por sonicação, repousando a cada 6 min sobre o gelo, por um tempo total de 24 min. Em seguida o extrato celular foi obtido por centrifugação a 11.100 g por 15 minutos a 4 °C. A purificação do proteassoma contido no extrato protéico foi realizada utilizando colunas de afinidade a níquel *HisTrapTM HP* (GE Healthcare, EUA), de acordo com o manual do fabricante, a um fluxo de 1 mL/min. A eluição do proteassoma foi realizada em gradiente linear de imidazol de 20 mM até 400 mM no sistema *ÄKTA prime* (GE Healthcare, EUA). Uma segunda etapa de purificação utilizando uma coluna de troca aniônica *Mono Q 4.6/100 PE* (GE Healthcare, EUA) foi realizada no sistema *ÄKTA pure* (GE Healthcare, EUA) a um fluxo de 2 mL/min. Nesta etapa o proteassoma foi eluído com um gradiente linear de NaCl de 0 até 1 M. A pureza das amostras foi avaliada por gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 15%) e nativo. Posteriormente, a determinação da atividade proteolítica do proteassoma foi avaliada.

III.6 **Determinação da concentração do proteassoma 20S**

A concentração do proteassoma 20S foi determinada espectrofotometricamente, com base no coeficiente de extinção molar que foi determinado experimentalmente. Para isso, foi construído um gráfico da correlação da absorbância a 280 nm pela concentração da amostra, que foi determinada pelo método de quantificação de proteína, Bradford (1976). Neste método utilizou-se albumina sérica bovina – BSA (*Sigma-Aldrich*, Alemanha) como padrão. A cada 1 ml de reagente de *Quick Start Bradford 1x* reagente (*Bio-Rad*, EUA) adicionou-se 20 µl de amostra. O tempo de incubação foi de 5 min a temperatura ambiente, com leitura a 595 nm em cubetas de plástico de 1 cm de caminho óptico.

III.7 **Ensaio de atividade peptidásica do proteassoma 20S**

A atividade catalítica tipo-quimotripsina do proteassoma em relação ao tempo foi determinada utilizando-se do peptídeo fluorogênico *Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-metilcoumarina* (*s*-LLVY-MCA) como substrato. Alíquotas de proteassoma foram

incubadas com 62,5 µg/ml do substrato fluorogênico em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 com 500 mM de NaCl por 60 minutos a 25 °C e a emissão de fluorescência foi medida a cada 15 min a 480 nm (excitação a 380 nm) em um espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (*Jasco Analytical Instruments*, Japão), acoplado a um sistema Peltier JASCO ETC-273T (*Jasco Analytical Instruments*, Japão) com circulação de água.

III.8 Ensaio de inibição da atividade peptidase do proteassoma 20S

Nesse ensaio, a atividade enzimática do proteassoma 20S foi medida em relação atividade tipo-quimotripsina na presença do BTCI em diferentes concentrações. Para o controle negativo, foram utilizados somente o substrato do proteassoma (62,5 µg/ml): s-LLVY-MCA, dissolvido previamente em dimetilsulfóxido (DMSO). O ensaio correspondente à amostra “controle positivo” foi realizado com 2 µg/mL de proteassoma e 62,5 µg/ml de substrato. Os testes de inibição do proteassoma foram realizados da mesma maneira, mas com o BTCI nas concentrações de 1,5 - 30 µM. A reação ocorreu por 60 minutos, com temperaturas variáveis, e foi interrompida com a solução de parada (ácido acético 6%). As amostras foram lidas em um espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (*Jasco Analytical Instruments*, Japão), acoplado a um sistema Peltier JASCO ETC-273T (*Jasco Analytical Instruments*, Japão) com circulação de água, no comprimento de onda de excitação de 380 nm e de emissão de 480 nm para o substrato fluorogênico. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O cálculo das constantes de inibição (K_i) do BTCI para a atividade tipo quimotripsina do proteassoma 20S em cada temperatura foi realizado a partir das curvas ajustadas utilizando o programa GRAFIT (versão 3.0.1.0) e segundo a equação de Morrison (1969).

$$V_i/V_0 = 1 - \{E_t + I_t + K_i - [(E_t + I_t + K_i)^2 - 4 E_t I_t]\}^{1/2} / 2E_t$$

Onde V_i e V_0 são as velocidades na presença e na ausência do inibidor, respectivamente; E_t corresponde à concentração total de enzima e I_t corresponde à concentração total do Inibidor.

Os parâmetros termodinâmicos foram calculados por meio da equação de Van't Hoff:

$$\ln(Ka) = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R}$$

Pode-se estabelecer uma relação linear entre $\ln K_a$ e $1/T$ da qual a inclinação da reta (a) pode ser usada para determinar o valor da variação de entalpia (ΔH) e a intercepção com o eixo y (b) pode ser utilizada para determinar o valor da variação de entropia (ΔS). Assim, com as constantes de inibição das diferentes temperaturas analisadas nos ensaios de atividade catalítica do proteassoma 20S, pode-se construir um gráfico da relação do logaritmo natural da constante de associação (K_a) pelo inverso da temperatura (K). Considerando a equação da reta ajustada, os valores dos parâmetros termodinâmicos foram obtidos da seguinte maneira:

$$a = \frac{-\Delta H}{R} \quad e \quad b = \frac{\Delta S}{R}$$

E baseando-se na relação de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

Obteve-se uma estimativa preliminar dos parâmetros termodinâmicos e da constante da interação entre proteassoma e BTCI, visando auxiliar na concepção das medidas experimentais de calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

III.9 Determinação de parâmetros hidrodinâmicos do BTCI e proteassoma 20S por ultracentrifugação analítica e espalhamento dinâmico de luz (ELD)

III.9.1 Ultracentrifugação analítica

Os experimentos de ultracentrifugação analítica por velocidade de sedimentação (UCA-SV) foram realizados em uma ultracentrífuga analítica *ProteomeLab XL-A/XL-I* (Beckman Coulter, EUA), equipada com um rotor de titânio *An-60 Ti* de quatro posições (Beckman, EUA). Células de alumínio padrão com uma peça central de duplo canal e janelas de quartzo foram utilizadas.

As análises de BTCI foram realizadas a 50 000 rpm a 20 °C e os dados de varredura de absorvância foram adquiridos a 280 nm com resolução radial de 20 μm, em intervalos de 5 minutos para cada leitura da amostra. As análises foram realizadas usando a proteína purificada que foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 20 mM (pH

7,5) com NaCl 500 mM. As concentrações das amostras de BTCI foram 213,52 μM , 154,52 μM e 66,59 μM .

Para as amostras de proteassoma 20S, as análises foram realizadas a 42 000 rpm a 20 °C e os dados de varredura de absorvância foram adquiridos a 216 nm com resolução radial de 20 μm , em intervalos de 5 minutos para cada leitura da amostra, durante 48 horas. As análises foram realizadas usando a proteína resultante da etapa de purificação por cromatografia de troca aniônica em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) com NaCl 500 mM. As concentrações das amostras do proteassoma foram 213,7 ηM , 173,3 ηM e 147,5 ηM .

Por final, as análises do complexo BTCI-proteassoma foram realizadas a 25 000 rpm a 20 °C e os dados de varredura de absorvância foram adquiridos a 220 nm com resolução radial de 20 μm , em intervalos de 5 minutos para cada leitura da amostra, durante 48 horas. As análises foram realizadas utilizando as proteínas resultantes das análises de calorimetria, estando em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) com NaCl 500 mM. O complexo BTCI-proteassoma foi analisado a partir de amostras previamente utilizadas nas análises de calorimetria e concentradas.

O volume específico parcial proteico (v), a densidade (ρ) e a viscosidade do tampão (η) foram estimados por meio do software *SEDENTERP* (<http://www.rasmb.bbri.org>). O software *SEDFIT v14.7* foi utilizado considerando o modelo de análise de distribuição contínua do coeficiente de sedimentação [$c_{(s)}$] e as varreduras radiais coletadas. Utilizando o modelo global de análise de espécies do software *SEDPHAT*, calculou-se a distribuição de massa molecular e $c_{(s)}$ das proteínas. Todas as variáveis foram permitidas flutuar livremente durante o cálculo dos parâmetros acima citados. Em seguida, estes dados foram submetidos a análises estatísticas por regressão não-linear de *Monte Carlo*, com pelo menos 200 iterações e um nível de confiança de 0,68. A porcentagem de espécies moleculares foi obtida por meio da integração da gama de coeficientes de sedimentação, dos picos identificados pelo software *SEDFIT*. Usando a correção apropriada para a viscosidade e densidade da água a 20 °C ($S_{20,w}$), o $c_{(s)}$ foi calculado e a distribuição $c_{(s)}$ foi convertida em $c(S_{20,w})$ usando o software *SEDFIT* e *SEDPHAT*.

III.9.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD)

As medições de ELD foram feitas em um *Zetasizer Nano Series Nano-ZS* (Malvern Instruments, Reino Unido) para determinação do tamanho de partícula/moléculas a 20 °C. Um laser He-Ne com $\lambda = 633 \text{ nm}$ foi usado para medições, em ângulo de 173°, com detecção de retrodispersão, usando a cubeta de plástico. Os experimentos foram realizados com a proteína em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) com NaCl 500 mM. As amostras de proteassoma 20S purificadas foram centrifugadas a 10 000 g durante 15 min a 4 °C antes das medições. O ELD foi utilizado para avaliar as populações das proteínas em solução, verificando a polidispersividade, a massa molecular e diâmetros hidrodinâmicos.

III.10 Calorimetria (ITC)

Com o objetivo de analisar a interação do BTCI com o proteassoma 20S foram realizadas duas análises de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) a 25 °C e 30 °C com diferentes parâmetros. Amostras do inibidor e proteassoma foram adicionadas ao injetor e célula do microcalorímetro ITC, após preparação em uma solução tampão (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 com 500 mM de NaCl) para equilíbrio do pH em ambas soluções. Estas amostras foram preparadas na mesma solução tampão por uma cromatografia de dessalinização em uma coluna *HiTrap* de 5 mL, a um fluxo de 3 mL/min. As frações de eluição de 1 mL foram coletadas em um sistema de cromatografia *ÄKTAprimer* (GE Healthcare, EUA).

A primeira análise foi realizada com amostras de BTCI 30 μM e proteassoma 20S 175 ηM , a 25 °C. Vinte e nove injeções de 10 μL do proteassoma a 0,5 $\mu\text{L}/\text{seg}$ foram feitas automaticamente, da seringa para a célula do microcalorímetro, com intervalos regulares de 462 seg. A segunda análise foi realizada com amostras de BTCI 2 μM e proteassoma 20S 40 ηM , a 30 °C. Vinte e nove injeções de 10 μL do BTCI 0,5 $\mu\text{L}/\text{seg}$ foram feitas automaticamente, da seringa para a célula do microcalorímetro, com intervalos regulares de 462 seg. O calor absorvido, resultante da interação entre as proteínas, foi registrado. Os dados foram ajustados, considerando o calor de diluição do tampão, e as curvas de titulação (isotérmicas), usando o software ORIGIN v7 (*OriginLab*, Northampton, EUA) fornecido com a *MicroCal VP-ITC* (GE Healthcare Corporation, EUA). Os dados foram analisados para determinar a estequiometria de ligação, o número de moléculas envolvidas na ligação (N), a constante de afinidade da ligação (K), a entalpia de ligação (ΔH) entre outros parâmetros termodinâmicos da reação, como as mudanças na entropia (ΔS) e na energia livre de Gibbs (ΔG).

IV. Resultados e Discussão

IV.1 Purificação do BTCI

O BTCI foi purificado do extrato bruto de sementes de *Vigna unguiculata*, conforme demonstrado no cromatograma obtido na purificação por cromatografia de troca iônica (Figura 5.1). O gráfico representa o tempo em minutos das frações coletadas, a partir do início da coleta no sistema ÄKTA *prime* (GE Healthcare, EUA), pela leitura da absorbância a 280 nm, conforme aumentava o valor da condutividade. O aumento gradual da condutividade está associado à presença de um gradiente linear de NaCl. No cromatograma pode-se visualizar a presença de três picos (I, II, e III), sendo que o BTCI puro é encontrado a partir da descida do terceiro pico (96,1-120 min).

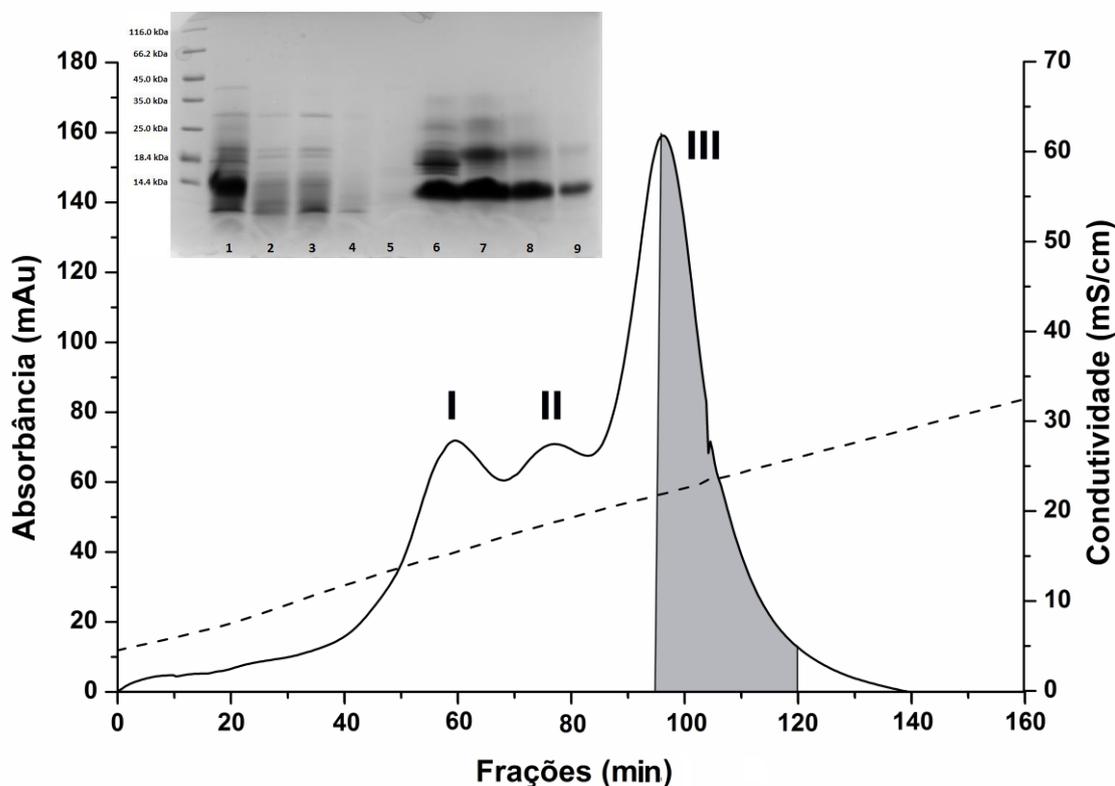


Figura 5.1. Purificação do BTCI a partir do extrato bruto obtido de sementes de *Vigna unguiculata*. A eluição dos picos I, II e III foi realizada com um gradiente linear de concentração de NaCl (condutividade linha pontilhada) de 0 a 800 mM de sal. **Inserto:** Análise da purificação por SDS-PAGE 15%: 1- extrato bruto, 2 e 3- frações de proteínas não fixadas a coluna, 4 e 5- frações de proteínas da lavagem da coluna, 6- frações de proteínas do início do gradiente, 7- frações de proteínas do pico I, 8- frações de proteínas do pico II, 9- frações de proteínas do pico III.

A pureza do BTCI foi analisada em gel de poliacrilamida de SDS-PAGE 15% (Inserto Figura 5.1) e por espectrometria de massa (Figura 5.2). No Inserto da Figura 5.1, está mostrado o perfil eletroforético de frações obtidas no processo de purificação do BTCI.

A banda em aproximadamente 10 kDa, poços 1, 6 a 9, corresponde ao BTCI e mostra que o BTCI ficou ligado à resina sem saturá-la, não aparecendo nos poços 2 a 5. Além disso, outras proteínas não se ligaram a coluna de DEAE-Celulose e, conseqüentemente, foram eluídas durante a passagem de extrato bruto na coluna e nos processos de lavagens (poços 2 a 5). Também pode-se observar que, do início até a metade do gradiente de eluição, o BTCI é eluído com proteínas contaminantes a baixas concentrações de sal (poços 6 a 8). Além disso, foi observado que as frações iniciais do pico III (85-96 min) possuem proteínas contaminantes além do BTCI, indicando ser necessária uma recromatografia destas frações. No poço 9, é observável uma banda majoritária de 9 kDa, correspondente a estrutura monomérica do BTCI. Uma banda minoritária observada a 18 kDa poderia ser o dímero de BTCI, o qual tem sido descrito por outros autores em amostras purificadas pelo mesmo procedimento (Freitas S. M. *et al.* 1997; Silva L. P. *et al.* 2005). Na figura 5.2 pode-se observar o espectro de massa do BTCI, onde os dois picos representam a massa do inibidor ionizado (9118.791) e a massa do inibidor duplamente carregado (4563.893). Este padrão comprova o alto grau de pureza do inibidor, possibilitando a sua utilização nos demais ensaios.

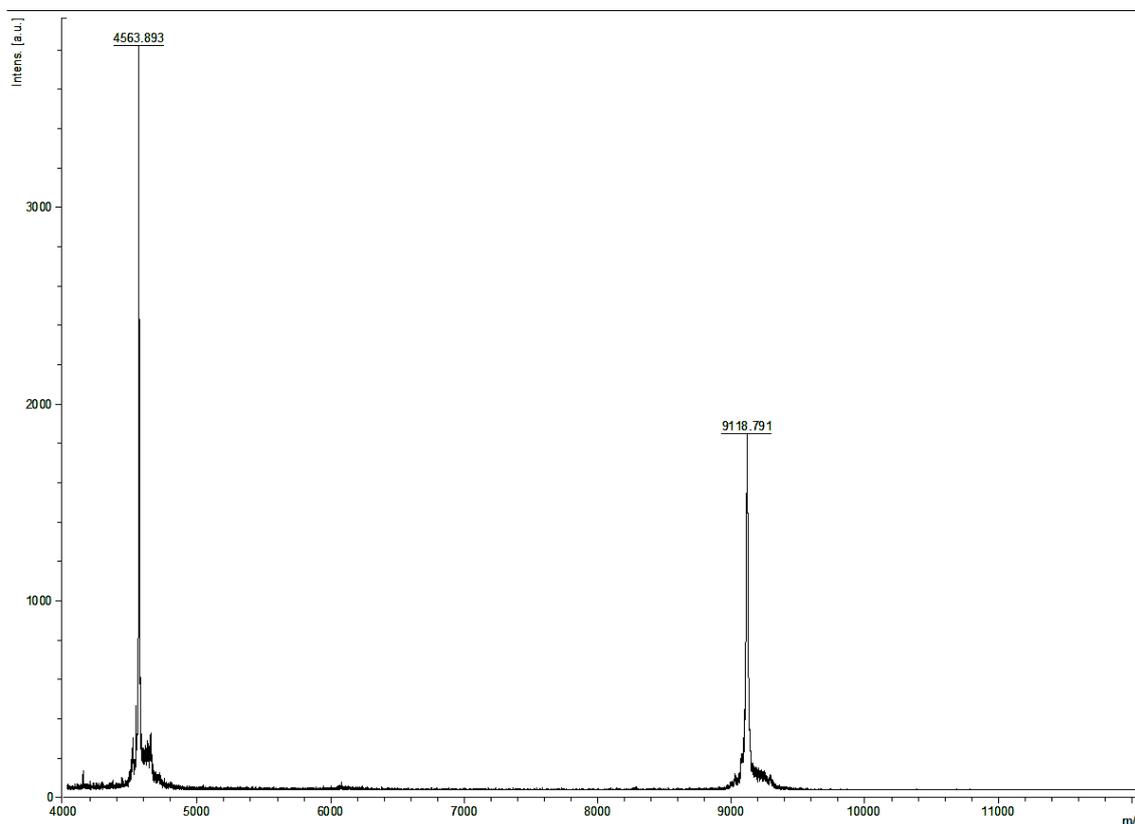


Figura 5.2. Análise da pureza e da massa molecular do BTCI por espectrometria de massas (MALDI-TOF). A massa do inibidor ionizado é 9118.791 Da e a massa do inibidor duplamente carregado é 4563.893 Da.

IV.2 Expressão e purificação do proteassoma 20S

IV.2.1 Curva de crescimento e cultura celular

Para analisar o tempo de expressão ótima em que são alcançados os mais altos níveis de expressão das subunidades que compõem o proteassoma 20S, uma curva de crescimento celular foi construída com as células da linhagem RJD1144. As células, para a curva de crescimento celular, cresceram até chegarem à densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) igual a 0,1. A partir disso, as medições de absorbância foram feitas nos intervalos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 36, 48 e 60 horas. Com os dados obtidos, construiu-se um gráfico de crescimento celular em relação ao tempo (Figura 6.1A). Observou-se, que assim como em Leme J. M. M. (2016), a fase de crescimento exponencial do número de células (fase log), foi durante as primeiras 12 hrs e que após isto até o fim do experimento as células se encontraram na fase estacionária de crescimento. Para preparação das amostras, baseando-se na DO_{600nm} mensurada para curva de crescimento, as amostras foram diluídas para que ficassem na mesma proporção de células antes de serem preparadas para a corrida de eletroforese. O proteassoma 20S é mais expresso durante a fase estacionária (Chen Q. *et al.* 2004), assim, o tempo para a expressão de proteassoma 20S, selecionado no presente trabalho, foi de 60 horas.

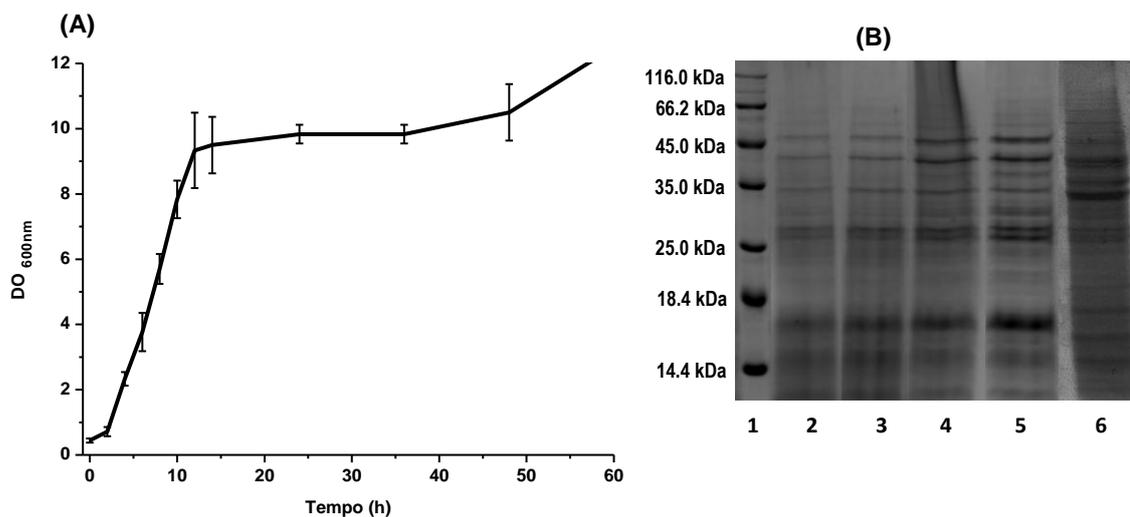


Figura 6.1. Curva de crescimento e perfil eletroforético da cultura celular. (A) O crescimento foi acompanhado de duas em duas horas nas primeiras 14h e depois num intervalo de 12 em 12 h até completar-se no tempo final de 60 h. Os dados referem-se à média com desvio padrão de uma triplicata. (B) As amostras coletadas e avaliadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% são de 2, 4, 6, 8 e 60 h de crescimento, sendo respectivamente os números dos poços 2, 3, 4, 5 e 6. O poço 1 refere-se ao padrão de massa molecular. A chave indica a região de bandas do proteassoma 20S a ser observada (22-33 kDa).

IV.2.2 Purificação do proteassoma 20S

A purificação do proteassoma 20S por cromatografia de afinidade a níquel foi realizada em colunas *HisTrap HP* no sistema de *ÄKTA prime* (*GE Healthcare*, EUA). A cromatografia foi monitorada pela absorbância a 280 nm ($A_{280\text{ nm}}$) e o pico de proteína eluída foi verificado a partir de 68%, tendo seu valor máximo ($A_{280\text{ nm}} = 387,63\text{ mAu}$) próximo a 70% do tampão B (indicado pela seta). (Figura 7.1)

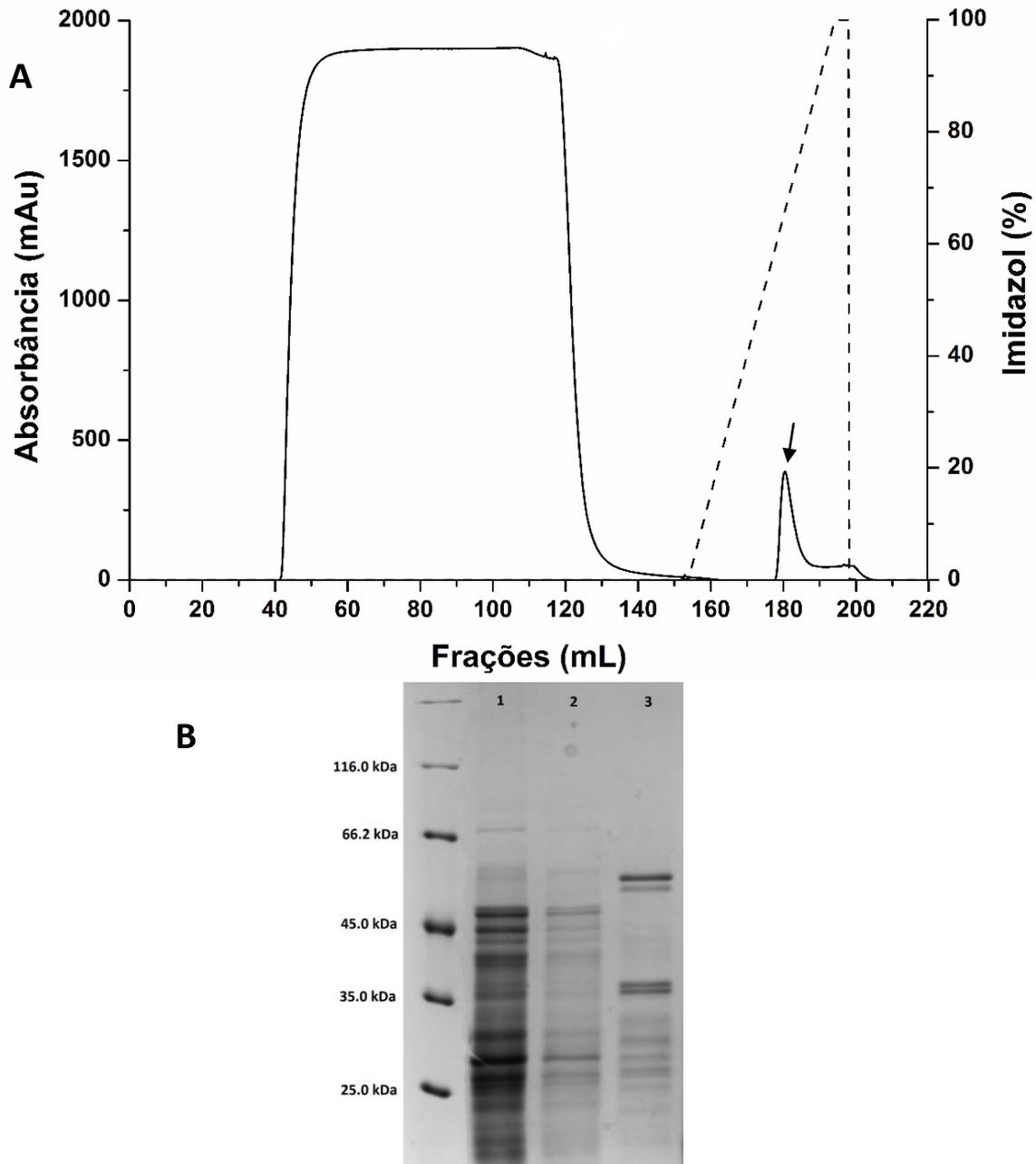


Figura 7.1. Perfil cromatográfico do proteassoma 20S purificado em coluna de afinidade a níquel. **A:** eluição realizada com um gradiente contínuo de concentração de imidazol (porcentagem do tampão B na linha pontilhada) de 20 a 400 mM. **B:** Análise da purificação por SDS-PAGE 12%: No primeiro poço está o marcador de massa molecular. Nos poços indicados pelos números, 1- extrato celular de *S. cerevisiae*, 2- frações de proteínas não fixadas à coluna e 3- frações de proteínas do pico indicado pela seta.

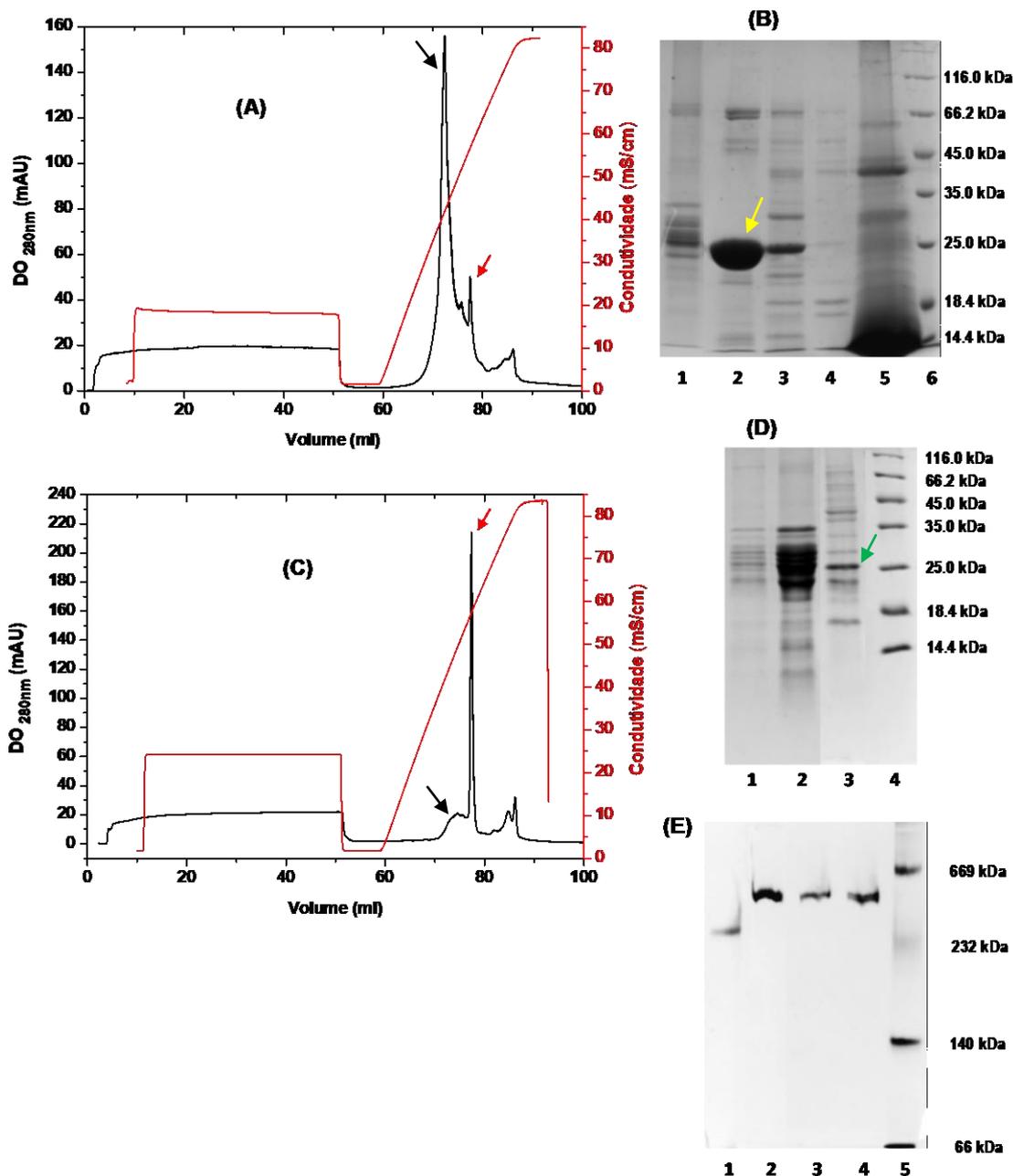


Figura 7.2 Segunda etapa de purificação do proteassoma 20S de levedura. (A) Perfil de cromatografia de troca aniônica com concentração de sal inicial menor e (C) maior durante a injeção da amostra. Linha vermelha referente à condutividade, o que está diretamente proporcional ao gradiente linear de Cloreto de sódio, e linha preta referente à absorbância a 280 nm. Setas vermelhas referentes à eluição do proteassoma 20S e preta à eluição da proteína contaminante. (B) e (D) SDS-PAGE 12% de poliacrilamida e (E) Gel Nativo. Em (B), poço 1: fração da eluição do proteassoma 20S; poço 2: fração da eluição da proteína contaminante (indicada pela seta amarela); poço 3: frações que saíram da coluna durante a lavagem prévia a eluição com o gradiente linear de sal; poço 4: frações de proteínas não fixadas à coluna; poço 5: alíquota da amostra injetada e poço 6: marcador de massa molecular. Em (D), poço 1: fração da eluição do proteassoma 20S; poço 2: a mesma fração do poço 1, porém submetida ao procedimento de precipitação com acetona e metanol; poço 3: frações de proteínas não fixadas à coluna (proteína contaminante indicado pela seta verde) e poço 4: marcador de massa molecular. Em (E), poço 1: fração da eluição da proteína contaminante; poços 2, 3 e 4: frações de diferentes eluições do proteassoma 20S e poço 5: marcador de massa molecular.

A presença de proteassoma foi posteriormente confirmada nas frações por gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (B na Figura 7.1). Na figura 7.1 podem ser observadas as diversas subunidades proteassomais, caracterizando o padrão de bandas do proteassoma 20S (22-33 kDa) (Tanaka *et al.* 1988). As amostras foram aplicadas ao gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% na seguinte ordem: Poço 1, extrato celular de *S. cerevisiae*, em 2 - frações de proteínas não fixadas à coluna e em 3- frações de proteínas do pico indicado pela seta.

Ao comparar o padrão de bandas dos três poços pode-se verificar a presença de proteassoma 20S apenas nos poços 1 e 3 e atestar que diversas outras proteínas não se ligaram a coluna de *HisTrap* e, conseqüentemente, foram eluídas durante o processo de lavagem com o tampão A com imidazol 20 mM (etapa referente ao intervalo de 110 ml a 150 ml na Figura 7.1).

Uma segunda etapa de purificação foi realizada, uma cromatografia de troca aniônica (Figura 7.2) em uma coluna Mono Q 4.6/100 PE - *GE Healthcare*, monitorada a 280 nm. Nesta etapa o proteassoma foi eluído com um gradiente linear de NaCl, tendo o pico respectivo ao proteassoma eluído (indicado pelas setas vermelhas) próximo a 50% do tampão B (tampão contendo NaCl a 1M). A amostra proveniente da purificação por afinidade a níquel encontrava-se em tampão com NaCl 500 mM e para realizar a cromatografia de troca iônica, esta amostra foi diluída de forma arbitrária, diminuindo assim a concentração de sal. Foi observado que ao ser diluída em um volume maior (Figura 7.2- A), mantendo a condutividade da amostra próxima a 18 mS/cm, o primeiro pico do cromatograma (seta preta) apresenta uma absorbância maior, porém, ao ser observado no gel de poliacrilamida (Figura 7.2- B), não é equivalente ao perfil proteico do proteassoma e, sim, de alguma outra proteína contaminante. Também é observado que o pico equivalente ao proteassoma (seta vermelha) nesta situação apresentou uma baixa absorbância. Porém, quando a amostra injetada apresenta condutividade semelhante à condutividade que o primeiro pico eluí (Figura 7.2- C), próximo a 25 mS/cm, a absorbância equivalente ao pico do proteassoma (seta vermelha) aumenta significativamente, enquanto que a absorbância relativa ao pico da proteína contaminante diminui (seta preta), tornando o processo de purificação mais eficiente, aumentando o rendimento.

Isto demonstra que esta modificação no protocolo de purificação auxilia a diminuir a competitividade das duas proteínas (o proteassoma e a proteína contaminante) pela coluna Mono Q. Em Leme J. M. M. (2016) foi observada a competitividade da proteína

Pnc1 (*pyrazinamidase/nicotinamidase 1*) com o proteassoma durante o processo de purificação por afinidade a Níquel. Nestas condições, a Pnc1 apresenta ponto isoelétrico e tamanho semelhante às subunidades do proteassoma, eluindo concomitantemente com o proteassoma. O problema na competição de Pnc1 e proteassoma é que esta possui uma maior afinidade a níquel do que o proteassoma (Leme J. M. M. 2016), reduzindo o rendimento no processo de purificação do proteassoma. Pnc1 apresenta 26 kDa (Ghishain M., Talla E. and François J. 2002), tamanho semelhante a banda proteica eluída da proteína contaminante (Figura 7.2 –B, seta amarela).

Na Figura 7.2 – B, está apresentado o perfil eletroforético do proteassoma 20S (22-33 kDa). As amostras estão na seguinte ordem: poço 1: fração da purificação indicada pela seta vermelha (em A); poço 2:, fração da purificação indicada pela seta preta (em A); poço 3:, frações que saíram da coluna durante a lavagem prévia a eluição com o gradiente linear de sal; poço 4:, frações de proteínas não fixadas à coluna; poço 5:, alíquota da amostra injetada e poço 6:, marcador de massa molecular.

Na Figura 7.2 – D, observa-se o perfil eletroforético do proteassoma 20S (22-33 kDa) na seguinte ordem: poço 1: fração da purificação indicada pela seta vermelha (em C); poço 2: a mesma fração do poço 1, porém submetida ao procedimento de precipitação com acetona e metanol; poço 3: frações de proteínas não fixadas à coluna e poço 4: marcador de massa molecular.

Ao comparar o perfil proteico dos géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (B) e (D), observa-se que, o aumento da concentração de sal na amostra a ser injetada mantém a condutividade da solução próxima a que a proteína contaminante é eluída, e, dessa forma, esta praticamente nem interage com a coluna. Nas frações de proteínas não fixadas à coluna na primeira cromatografia (poço 4 da Figura 7.2 – B), não é observado banda de proteína próximo a 26 kDa, significando que a proteína contaminante interagiu com a coluna. Já na segunda cromatografia, nas frações de proteínas não fixadas à coluna (poço 3 da Figura 7.2 – D), observa-se uma banda proteica equivalente a 26 kDa (seta verde), indicando que a interação da proteína contaminante com a coluna foi afetada pelo aumento da condutividade inicial da amostra.

Este resultado sugere que as proteínas contaminantes provavelmente competem com o proteassoma na união com a matriz e contribuem para sua saturação. Desta forma, a modificação feita no procedimento cromatográfico de purificação, reduz a competitividade do proteassoma e as proteínas contaminantes pela coluna Mono Q, e

garante a captura mais eficaz do proteassoma, tornando o processo de purificação mais eficiente e com melhores rendimentos de purificação.

Na Figura 7.2 – E está apresentado o gel de eletroforese não desnaturante, onde observa-se a presença de apenas uma banda, na mesma altura, nas frações respectivas a eluição do proteassoma 20S (poços 2, 3 e 4) e uma banda em altura distinta na fração respectiva a fração da proteína contaminante (poço 1). O poço 5 refere-se ao marcador de massa molecular. A mobilidade das proteínas não desnaturadas em um gel de poliacrilamida depende da sua conformação, do seu tamanho, da relação carga/massa (Wittig and Schägger, 2008). Logo, para estimar a massa de uma proteína não desnaturada, é necessária a realização de diferentes géis de poliacrilamida em concentrações distintas, conforme descrito no protocolo da empresa do kit do marcador de massa molecular para géis nativos (*Amersham, GE Healthcare*). O gel apresentado (em E) é de concentração única, o que justifica as bandas citadas anteriormente não terem ficado de acordo com a massa molecular do padrão. O importante a se ressaltar é a pureza das amostras de proteassoma 20S, onde todas apresentaram uma banda única o que indica que todas as bandas das subunidades do proteassoma observadas em SDS-PAGE (poço 1 Figura 7.2 – B e poços 1, 2 Figura 7.2- D) são oligomerizadas na estrutura do proteassoma. A proteína contaminante teve uma maior migração eletroforética do que o proteassoma 20S (poço 1 Figura 7.2 – B e poço 1 Figura 7.2- E).

IV.3 Coeficiente de extinção molar do proteassoma 20S

A concentração do proteassoma 20S foi determinada espectrofotometricamente, com base no coeficiente de extinção molar que foi determinado experimentalmente. Para isso, foi construído o gráfico da correlação da absorbância a 280 nm pela concentração da amostra (Figura 8.1) previamente determinada pelo método de quantificação de proteína, Bradford (1976). Sabendo que pela lei de Lambert-Beer, a absorbância a 280 nm é igual à concentração multiplicada pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280\text{nm}}$) e pelo caminho óptico, e, sendo este último equivalente a 1 cm, podemos afirmar que a inclinação da reta (Figura 8.1) corresponde ao valor do coeficiente de extinção molar do proteassoma 20S estudado ($\epsilon_{280\text{nm}} = 1,22 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ou $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%} = 12,2$). Em 1988, Tanaka *et al.* observou-se $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ igual a 12,3, para proteassoma 20S de rã, 10,8, para frango, 9,6, para rato, 11,2 para humano e 7,4 para levedura. A variação no coeficiente de extinção molar do proteassoma 20S de levedura encontrado por Tanaka *et al.* (1988) e do valor estimado nas amostras analisadas nesta dissertação pode ser explicada pelos acréscimo da cauda de polihistidina e da sequência do peptídeo *Flag* (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) à subunidade $\beta 4$ do proteassoma. Neste caso, a tirosina e as histidinas acrescentadas podem influenciar no valor da absorbância a 280 nm, contribuindo para o aumento do coeficiente de extinção molar, assim como fora observado.

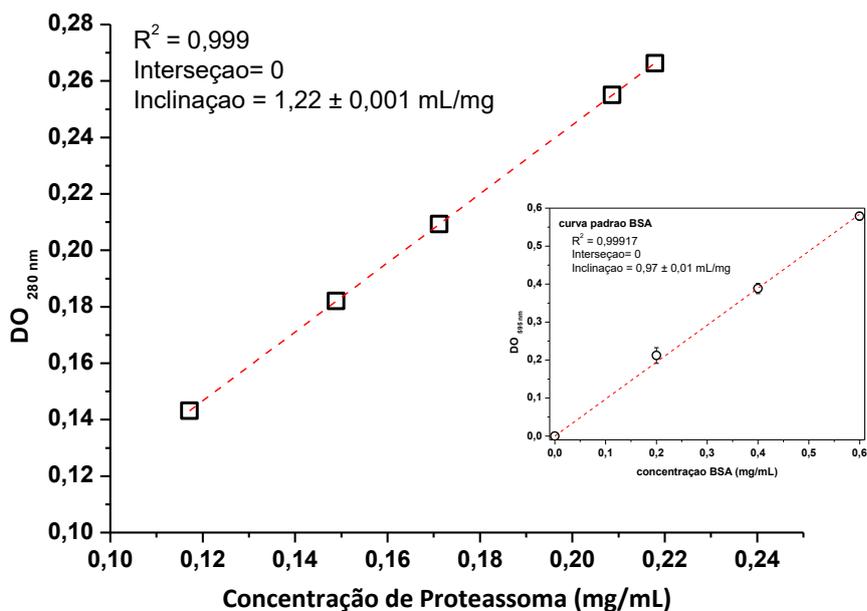


Figura 8.1. Correlação da absorbância a 280 nm pela concentração de proteassoma 20S. A concentração de proteassoma foi previamente determinada pelo método de quantificação de proteína, Bradford (1976). *Insero:* Curva padrão de BSA.

IV.4 Parâmetros hidrodinâmicos do proteassoma 20S por espalhamento de Luz dinâmico (ELD)

A pureza das alíquotas de proteassoma 20S também foi atestada por análises de ELD, indicado pelo baixo valor da polidispersividade de 11,3%, correspondendo à presença de uma única forma molecular (monodispersa). A massa molecular aproximada obtida foi de 697,3 kDa, próximo ao valor reportado para essa estrutura molecular (~ 700 kDa) e seu diâmetro hidrodinâmico observado foi de 19,54 ηm (raio de Stokes 9,77 ηm) (Figura 9.1), próximo aos observados por Tanaka *et al.* (1988) que obteve raios de Stokes próximos a 9,8 ηm , para proteassoma 20S de rã, 10,6 ηm , para frango, 8,5 ηm , para rato, 9,4 ηm para humano e 8,2 ηm para levedura.

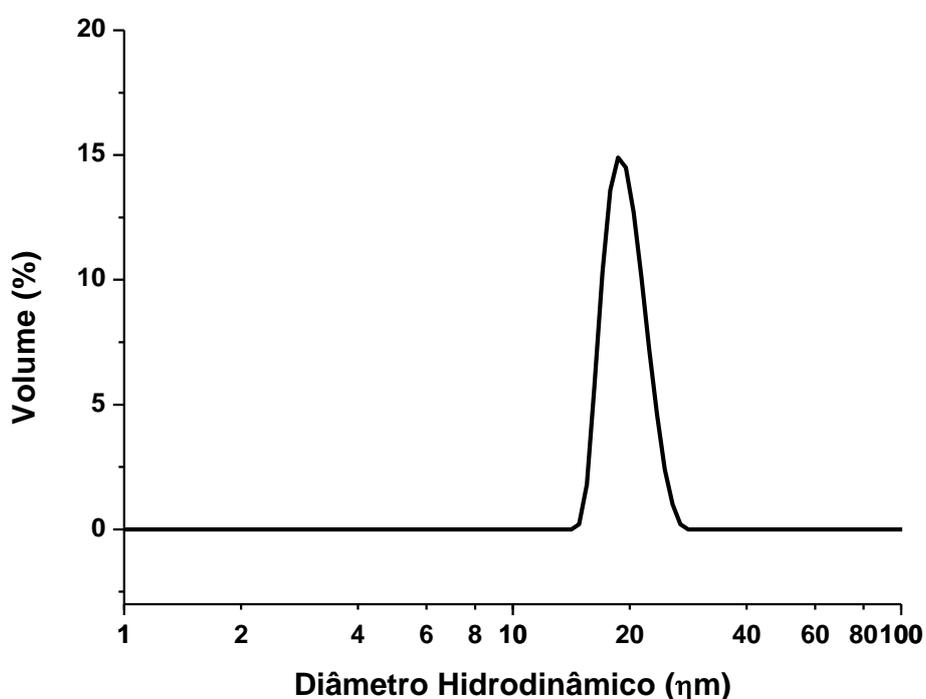


Figura 9.1. Porcentagem do volume pelo diâmetro hidrodinâmico do proteassoma 20S *Saccharomyces cerevisiae*. A massa molecular estimada foi de $697,3 \pm 182,4$ KDa e a polidispersividade de 11,3% (monodispersa).

IV.5 Parâmetros hidrodinâmicos do BTCI e do proteassoma 20S por ultracentrifugação analítica

A massa molecular e o coeficiente de sedimentação para o BTCI e o proteassoma 20S foram obtidos por experimentos de ultracentrifugação analítica pela técnica de velocidade de sedimentação. Para analisar os dados, o volume específico parcial

proteico (ν), a densidade (ρ) e a viscosidade do tampão (η) foram estimados por meio do software *SEDEXTER*, obtendo os seguintes valores, 0,687283, para o BTCl, 0,738196, para o proteassoma 20S e 1,0192, 0,0105396, para a densidade e viscosidade do tampão, respectivamente. Usando a correção apropriada para a viscosidade e densidade da água a 20 ° C ($S_{20,w}$), o $c(s)$ foi calculado e a distribuição $c(s)$ foi convertida em $c(S_{20,w})$.

Nas análises de BTCl (Figura 10.1 - A e C), a massa molecular estimada foi equivalente a 9286 Da, valor próximo ao obtido por MALDI-TOF (9118.791 Da, Figura 5.2), e o coeficiente de sedimentação a 20 °C em água ($S_{20,w}$) foi estimado em 1,57 S, sendo o coeficiente de sedimentação experimental próximo a 1,42 S.

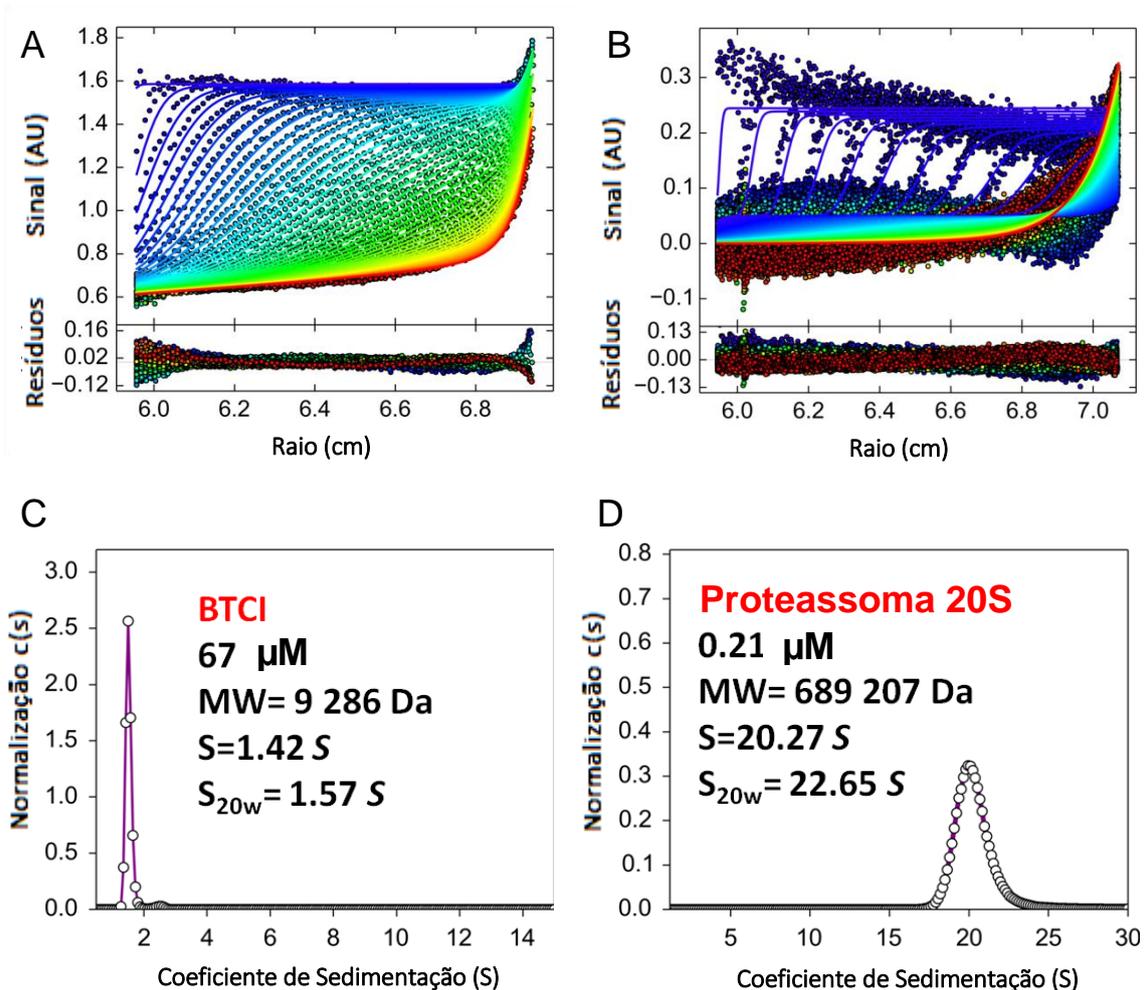


Figura 10.1. Parâmetros hidrodinâmicos do BTCl e do proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* por ultracentrifugação analítica. Perfis de sedimentação do BTCl a 280 ηm (A) e do proteassoma 20S a 216 ηm (B). Curvas de distribuição dos coeficientes de sedimentação do BTCl (C) e do proteassoma 20S (D).

Nas análises de proteassoma 20S (Figura 10.1 - B e D), a massa molecular estimada foi equivalente a 689 207 Da, valor próximo àquele obtido por EDL ($697,3 \pm 182,4$ KDa, Figura 9.1), e o coeficiente de sedimentação a 20 °C em água ($S_{20,w}$) foi estimado em 22,65 S, sendo o coeficiente de sedimentação experimental próximo a 20,27 S. Os valores do coeficiente de sedimentação do proteassoma 20S estimado foi próximo aos observados por Tanaka *et al.* (1988), sendo o valores de $S_{20,w}$ próximos a 19,6 S, para rã, 20 S, para frango, 19,8 S, para rato, 21,8 S para humano e 20 S para levedura.

IV.6 Ensaio de atividade peptidásica do proteassoma 20S

A atividade catalítica tipo-quimotripsina do proteassoma em relação ao tempo foi determinada utilizando-se do peptídeo fluorogênico *s*-LLVY-MCA como substrato (Figura 11.1). Foi observado que a intensidade de fluorescência aumentou com o passar do tempo, significando que o proteassoma 20S purificado estava ativo, clivando o peptídeo fluorogênico ao longo do tempo. Além disso, o ponto de maior emissão de fluorescência foi o tempo final de 60 min, indicando que durante todo o intervalo de tempo o substrato esteve em concentrações disponíveis, não sendo esgotado durante o ensaio enzimático.

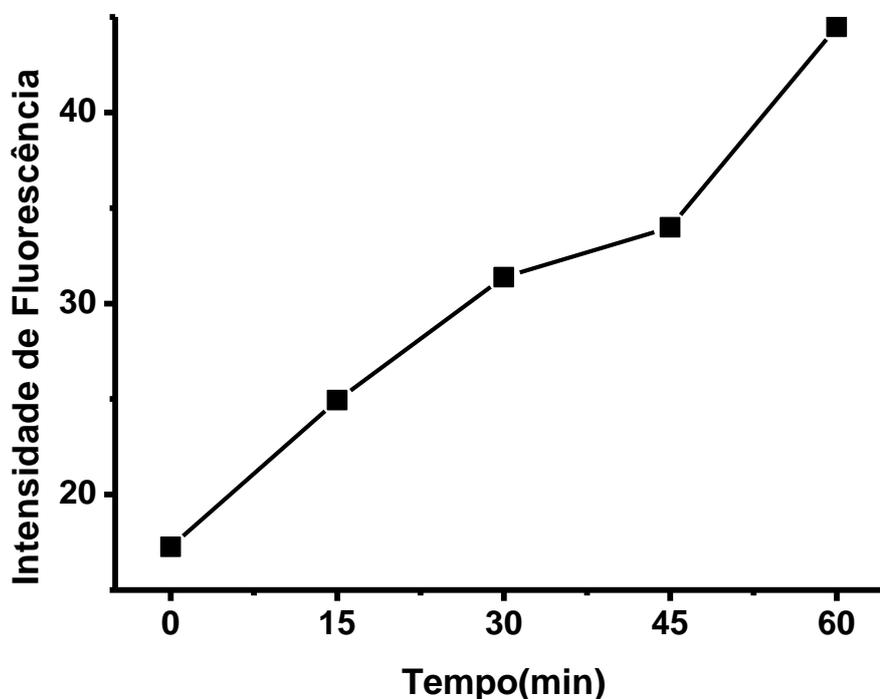


Figura 11.1. Curva da atividade catalítica tipo quimotripsina do proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* pelo tempo a temperatura de 25°C. Alíquotas de proteassoma 2 µg/ml foram incubadas com 62,5 µg/ml do substrato fluorogênico em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 com NaCl 500 mM por 60 minutos a 25 °C e a emissão de fluorescência foi medida a cada 15 min a 480 nm (excitação a 380 nm).

IV.7 Ensaio de inibição da atividade peptidase do proteassoma 20S

Os ensaios de inibição da atividade peptidásica do proteassoma 20S, similar a quimotripsina, foram realizados na presença do BTCI variando as temperaturas de 25 a 46 °C (Figuras 12.1 e 12.2). O BTCI inibiu a atividade tipo quimotripsina em todas as temperaturas testadas.

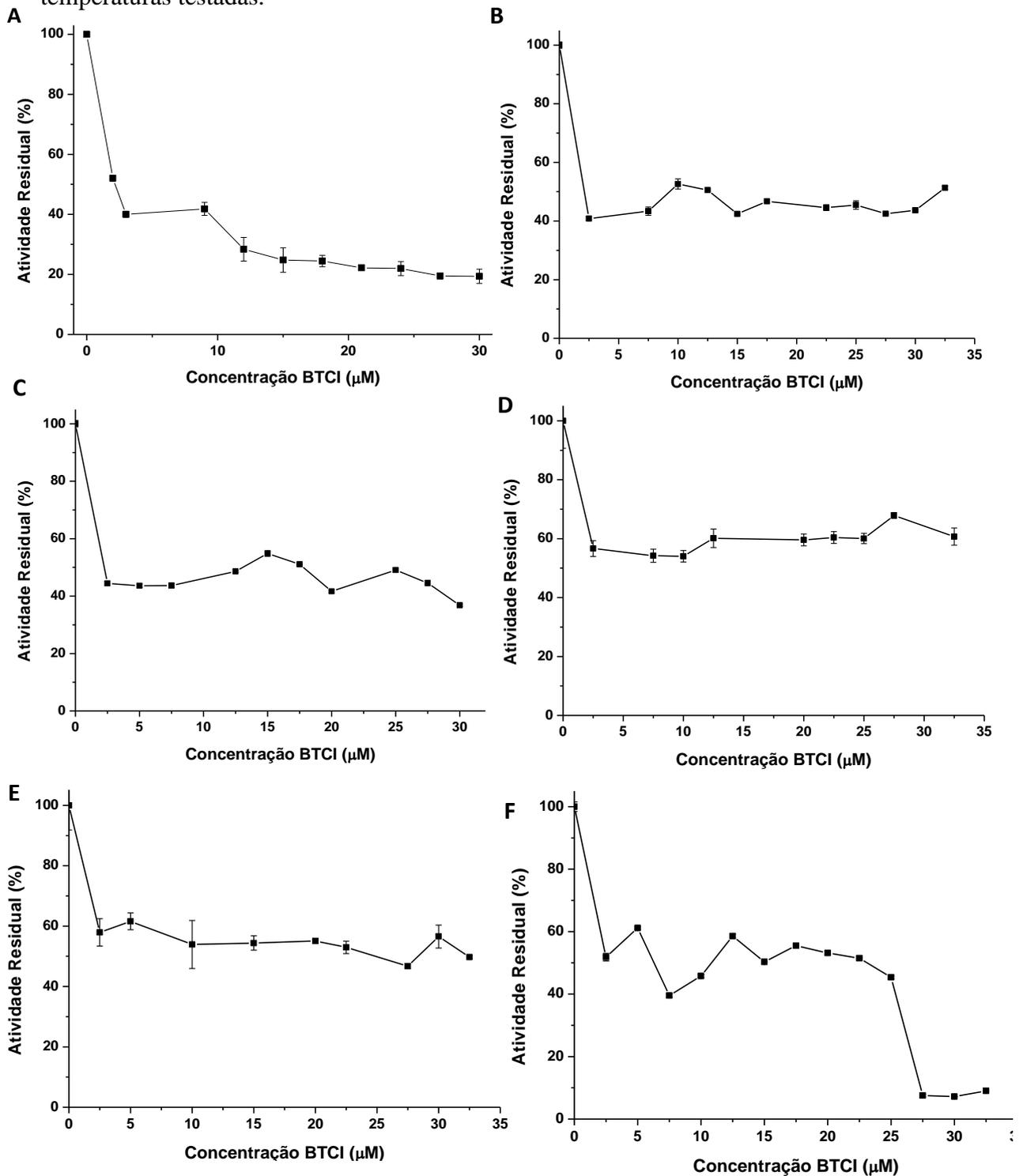


Figura 12.1. Curvas de inibição da atividade catalítica tipo quimotripsina do proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* com o aumento da concentração do BTCI nas temperaturas de 25 °C (A), 31 °C (B), 34 °C (C), 40 °C (D), 43 °C (E) e 46 °C (F). As barras mostram o desvio padrão do ensaio realizado em triplicata.

O cálculo das constantes de inibição (K_i) do BTCI para a atividade tipo quimotripsina do proteossoma 20S em cada temperatura foi realizado a partir das curvas ajustadas (Figura 12.2 – A, B e C). Os valores de K_i foram obtidos a partir do ajuste somente para as temperaturas 31 °C, 34 °C e 46 °C, considerando que houve um erro instrumental nos ensaios em outras temperaturas (Figura 12.1 – A, D e E). Os valores de K_i para as temperaturas acima citadas foram: $2,72 \pm 0,28 \times 10^{-5}$ M, para 31 °C, $2,97 \pm 0,12 \times 10^{-5}$ M, para 34 °C e $1,940 \pm 0,004 \times 10^{-6}$ M, para 46 °C. Os ajustes das curvas foram satisfatórios, indicados pelos valores de Chi quadrado (χ^2) iguais a 0,00204, 0,00177, 0,00139, respectivamente.

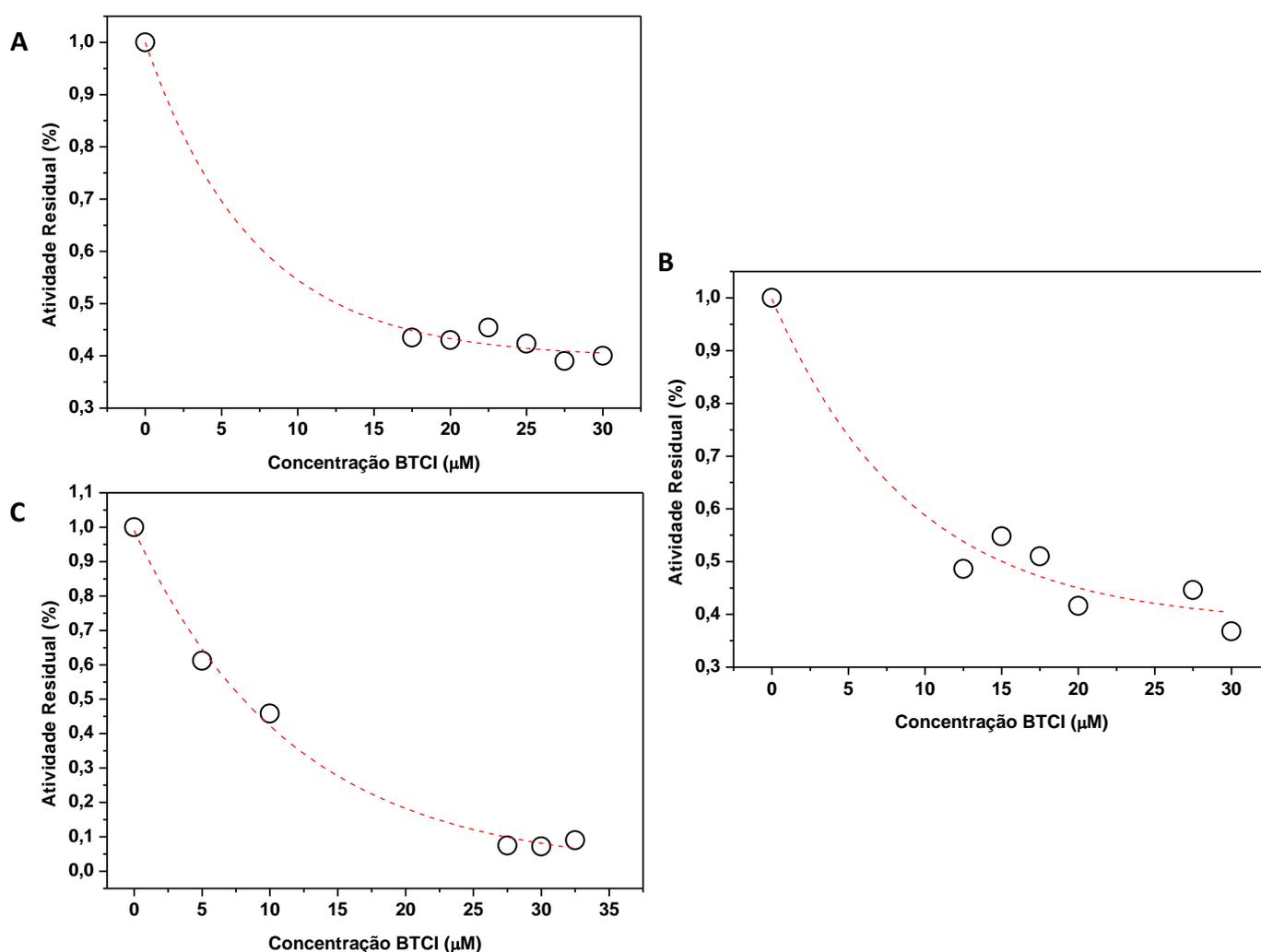


Figura 12.2. Curvas de inibição da atividade catalítica tipo quimotripsina do proteossoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* com o aumento da concentração do BTCI nas temperaturas de 31 °C (A), 34 °C (B) e 46 °C (C). Curvas ajustadas utilizando o programa GRAFIT (versão 3.0.1.0) e segundo a equação de Morrison (1969). O ajuste das curvas resultaram em valores de K_i de $2,72 \pm 0,28 \times 10^{-5}$ M, para 31 °C, $2,97 \pm 0,12 \times 10^{-5}$ M, para 34 °C e $1,940 \pm 0,004 \times 10^{-6}$ M, para 46 °C.

A distinção entre os valores das constantes de inibição obtidas neste trabalho para a constante de inibição da atividade tipo quimotripsina observada por Souza, L. C. *et al.* (2014), $K_i = 7,0 \times 10^{-7}$ M, pode ser explicada pela influência da concentração de sal nos tampões utilizados. No trabalho de Souza, L. C. (2010), também foi observado à influência da força iônica sobre a estabilidade do complexo BTCI-proteassoma 20S por Espalhamento de Luz dinâmico (ELD). Observou-se que a partir de 2 mM de NaCl ocorreu a dissociação do complexo, justificada pelo NaCl alterar a conformação do proteassoma 20S, aumentando a flexibilidade da molécula, colaborando para a dissociação do inibidor do complexo (Souza, L. C. 2010). Nos ensaios de inibição realizados por Souza, L. C. *et al.* (2014), optou-se por utilizar um tampão sem sal. Neste presente trabalho, o tampão utilizado para os ensaios de inibição continha 500 mM de NaCl, uma concentração superior do que a anteriormente testada por Souza, L. C. *et al.* (2014). Assim, a força iônica do tampão e a sua influência sobre a estabilidade do complexo BTCI-proteassoma 20S, justifica a menor inibição do proteassoma 20S pelo BTCI neste presente trabalho, se comparado ao trabalho anteriormente realizado. Os valores das constantes de inibição da atividade tipo quimotripsina do proteassoma são menores em condições de maior força iônica devido ao acréscimo de NaCl na solução tampão, o qual promove a dissociação do complexo BTCI-proteassoma 20S. Vale ressaltar que mesmo na presença de sal, ocorreu a inibição do proteassoma 20S, indicando que no organismo humano, que possui em média 150 mM de sal, esta concentração não seria suficiente para impedir a formação do complexo BTCI-proteassoma, ocasionando a inibição das atividades proteolíticas destes.

Também é possível observar um aumento na inibição da atividade proteolítica tipo quimotripsina do proteassoma 20S de acordo com o aumento da temperatura. Conforme observado em Souza, L. C. (2010), a estabilidade estrutural do complexo BTCI-proteassoma é até a temperatura de 55 °C, pois a esta temperatura, as subunidades do proteassoma 20S estão propensas a dissociarem. Além disso, foi observado em Souza, L. C. (2010) a diminuição do diâmetro hidrodinâmico do complexo BTCI-proteassoma 20S entre as temperaturas de 40 °C a 55 °C, devido à perda de moléculas de água da camada de solvatação. Isto também pode estar relacionado à maior inibição observada neste trabalho ocorrer na temperatura de 46°C.

IV.8 Cálculo dos parâmetros termodinâmicos do complexo BTCl-proteassoma 20S de forma indireta

Para fazer uma estimativa preliminar dos parâmetros termodinâmicos e da constante da interação entre proteassoma e BTCl, visando auxiliar na concepção das medidas experimentais de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), foi estabelecida a relação linear entre logaritmo natural da constante de associação ($\ln K_a$) e inverso da temperatura ($1/T$) (Figura 13.1).

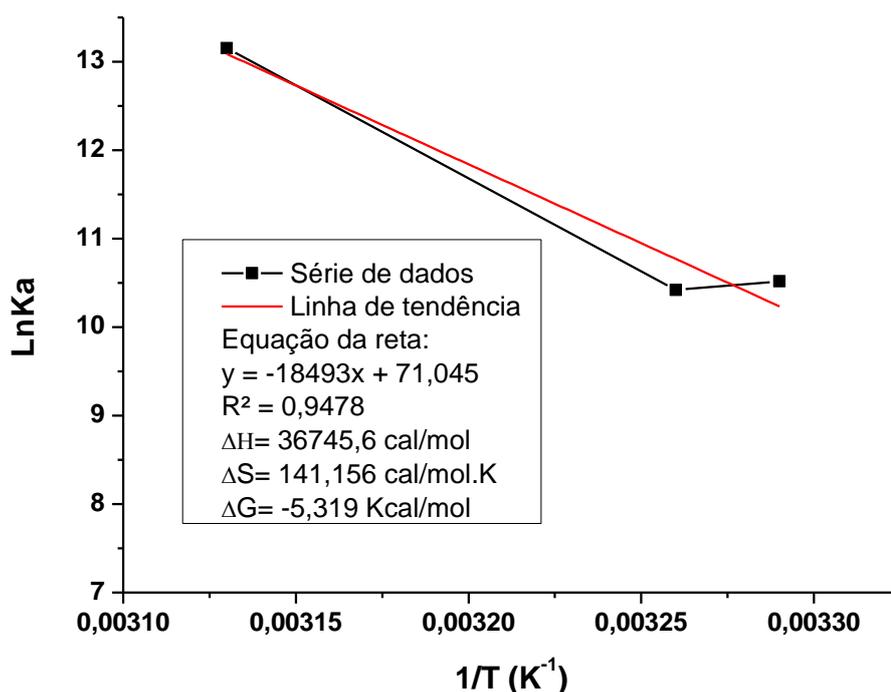


Figura 13.1. Aproximação de van't Hoff para os ensaios de ligação do BTCl ao proteassoma 20S. Os valores dos parâmetros termodinâmicos estão mostrados *in set* sendo o valor de ΔG estimado para 25 °C .

Por meio da equação de Van't Hoff pode-se determinar a inclinação da reta (a), a qual é utilizada para determinar o valor da variação de entalpia (ΔH), e a intercepção com o eixo y (b), que é utilizada para determinar o valor da variação de entropia (ΔS). Assim, com as constantes de inibição das diferentes temperaturas analisadas nos ensaios de atividade catalítica do proteassoma 20S, pode-se construir um gráfico da relação do logaritmo natural da constante de associação (K_a) pelo inverso da temperatura (K) (Figura 13.1). Considerando a equação da reta ajustada, os valores de a e b foram iguais a -18493 e 71,045; respectivamente. Com a constante universal dos gases $R=1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ o valor da entalpia e da entropia foram $\Delta H= 36745,6 \text{ cal.mol}^{-1}$ e $\Delta S= 141,156 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Estes dados indicam que a interação do BTCl com o

proteassoma 20S é endotérmica e entropicamente favorável. Além disso, verificou-se que a interação do proteassoma 20S com o BTCI é espontânea, indicado pelo valor negativo da variação da energia livre de *Gibbs-Helmholtz* $\Delta G = -5,319 \text{ Kcal.mol}^{-1}$.

IV.9 Calorimetria (ITC)

Com o objetivo de analisar a interação do BTCI com o proteassoma 20S e calcular os parâmetros termodinâmicos e sua estequiometria, foram realizadas duas análises de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) a 25 °C e 30 °C com diferentes concentrações. A primeira análise foi realizada com amostras de BTCI 30 μM e proteassoma 20S 175 ηM , a 25 °C. Vinte e nove injeções do proteassoma foram feitas automaticamente, da seringa para a célula do microcalorímetro, de injeções de 10 μL a 0,5 $\mu\text{L/seg}$, com intervalos regulares de 462 seg. O calor absorvido ou liberado, resultante da interação entre as proteínas, foi registrado e os dados foram ajustados, considerando o calor de diluição do tampão, e as curvas de titulação (isotérmicas) (Figura 14.1). Segundo a análise dos dados, o número de moléculas envolvidas na ligação (N) foi igual a $5,68 \times 10^{-4} \pm 2,94 \times 10^{-5}$ sítios, a constante de afinidade da ligação (K_a) foi $4,73 \times 10^8 \pm 1,47 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, a entalpia de ligação (ΔH), $5,115 \times 10^6 \pm 0,3765 \times 10^6 \text{ cal/mol}$, a variação de entropia (ΔS), $1,72 \times 10^4 \text{ cal/mol/K}$, e a energia livre de Gibbs (ΔG), $-10,6 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (Figura 14.1). Estes dados corroboram novamente que a interação do BTCI com o proteassoma 20S é um processo endotérmico e entropicamente favorável. Além disso, verificou-se novamente, e similar aos resultados de inibição por emissão de fluorescência, que é uma interação espontânea, indicado pelo valor negativo da variação da energia livre de *Gibbs-Helmholtz*.

A segunda análise foi realizada com amostras de BTCI 2 μM e proteassoma 20S 40 ηM , a 30 °C. Vinte e nove injeções do BTCI foram feitas automaticamente, da seringa para a célula do microcalorímetro, de 10 μL a 0,5 $\mu\text{L/seg}$, com intervalos regulares de 462 seg. O calor absorvido ou liberado, resultante da interação entre as proteínas, foi registrado e os dados foram ajustados, considerando o calor de diluição do tampão, e as curvas de titulação (isotérmicas) (Figura 14.2). Segundo a análise dos dados, o número de moléculas envolvidas na ligação (N) foi igual a $5,31 \pm 0,247$ Sítios, a constante de afinidade da ligação (K_a) foi $1,34 \times 10^8 \pm 6,42 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, a entalpia de ligação (ΔH), $1,888 \times 10^5 \pm 0,1191 \times 10^5 \text{ cal/mol}$, a variação de entropia (ΔS), 660 cal/mol/K , e a energia livre de Gibbs (ΔG), $-11,1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (Figura 14.2). Estes

resultados corroboram novamente que a interação do BTCI com o proteossoma 20S é um processo endotérmico, entropicamente favorável, e espontâneo.

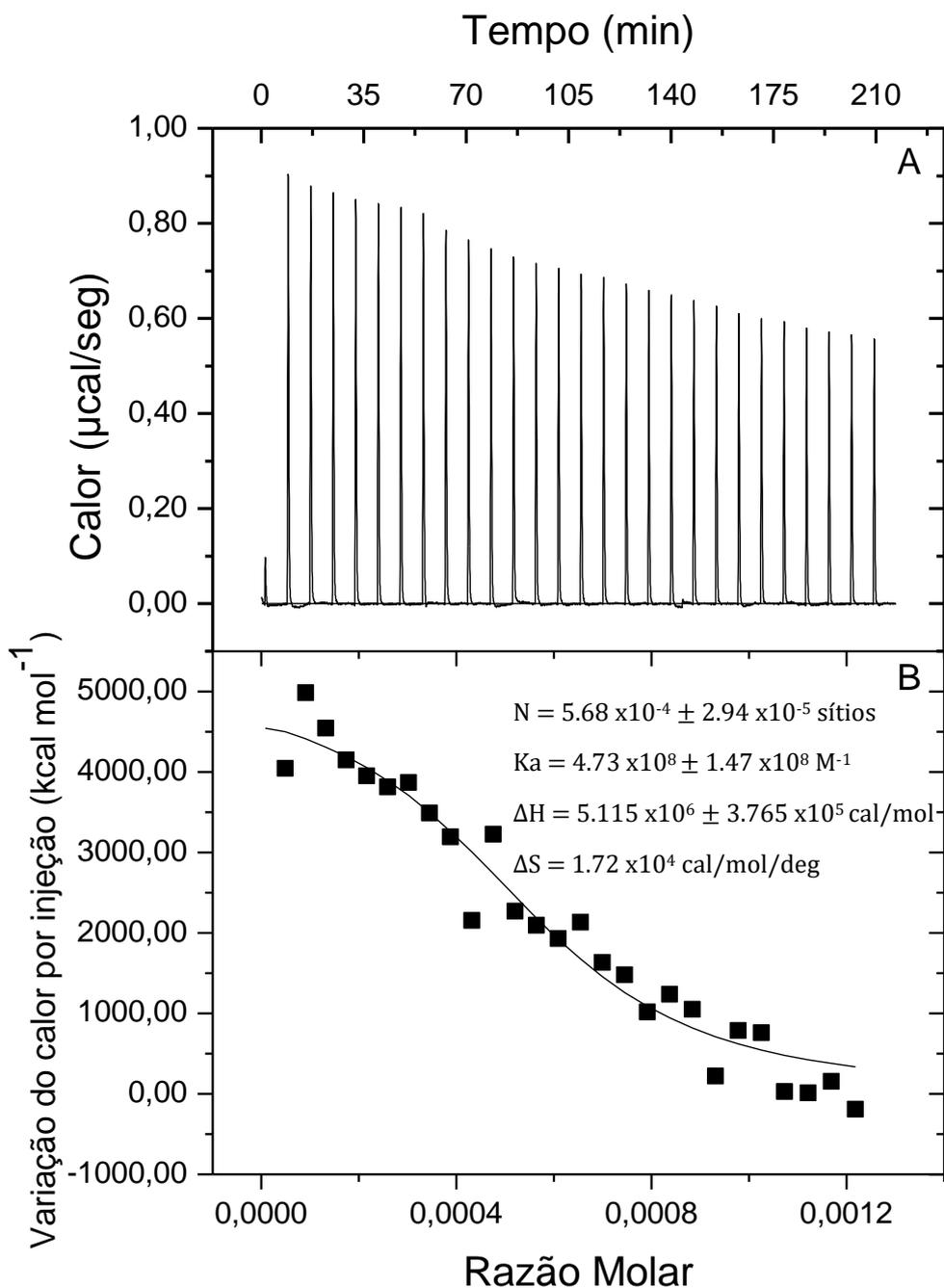


Figura 14.1. Dados calorimétricos da interação do BTCI com proteossoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* a 25 °C. Dados brutos (A) e isotémas de ligação (B) de vinte e nove injeções (10 μl) do proteossoma 20S a 175 ηM sobre o BTCI a 30 μM .

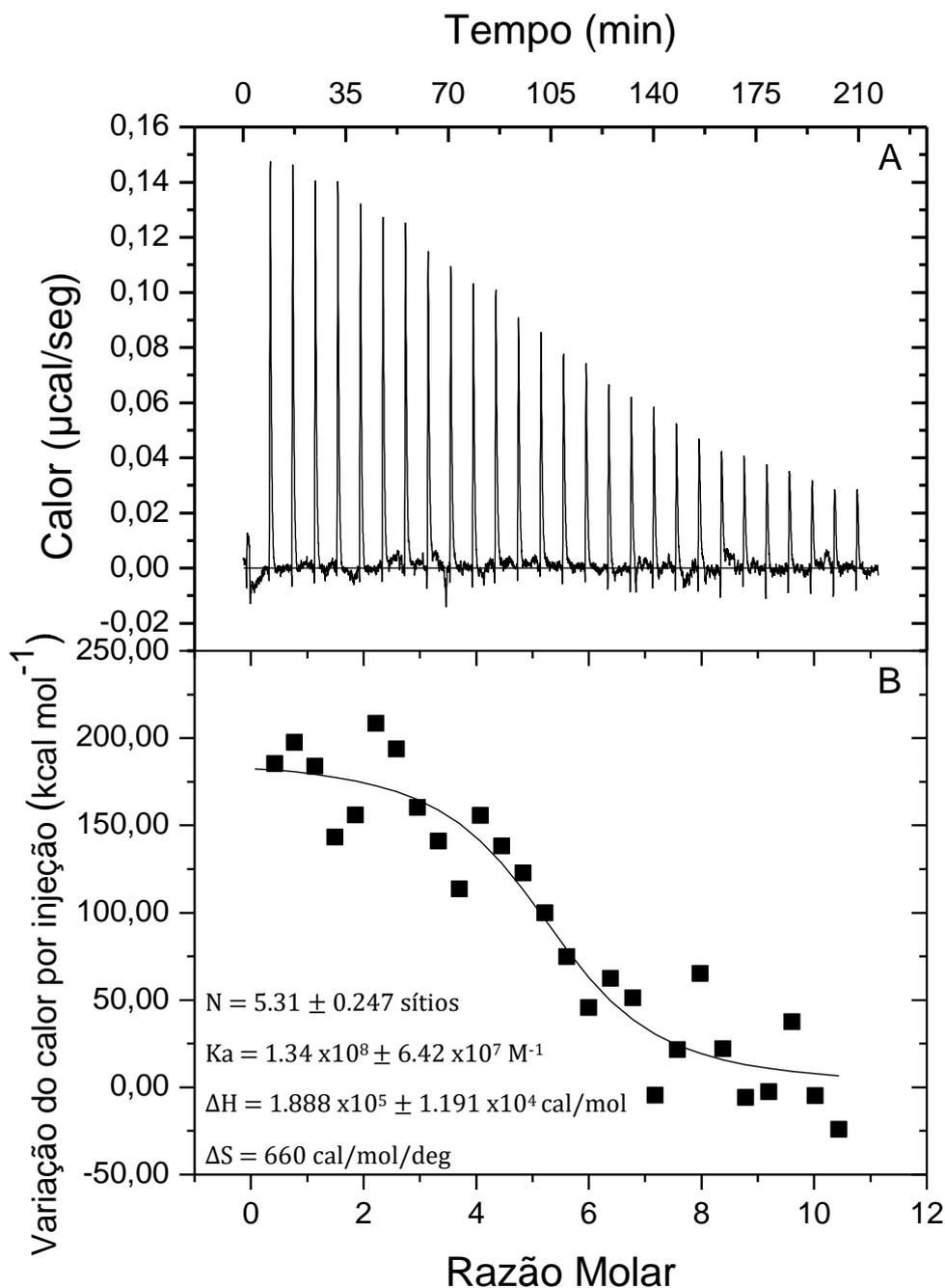


Figura 14.2. Dados calorimétricos da interação do BTCI com proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* a 30 °C. Dados brutos (A) e isotémas de ligação (B) de vinte e nove injeções (10µl) do o BTCI a 2 µM sobre o proteassoma 20S a 40 ηM.

Em ambos os ensaios de calorimetria a interação do BTCI com o proteassoma 20S foi endotérmica ($\Delta H > 0$), entropicamente favorável ($\Delta S > 0$) e espontânea ($\Delta G < 0$), assim como o observado por Fachetti H. C. S. *et al.* (1984) e de Freitas S. M. *et al.* (1999) para a interação do BTCI com a tripsina e a quimotripsina, respectivamente. Em Brand G. D. *et al.* (2017), a formação do complexo do BTCI com a tripsina também é endotérmica, entropicamente favorável e espontânea. A Figura 14.3 mostra a

contribuição dos componentes entálpicos e entrópicos para a espontaneidade na reação. Mostrando que, considerando o valor positivo para o ΔH , a reação só é espontânea uma vez que o valor do fator entrópico ($T.\Delta S$) é maior que a variação de entalpia. Além disso, é perceptível que os valores dos parâmetros termodinâmicos variam consideravelmente entre os dois ensaios calorimétricos e no ensaio por fluorescência. O primeiro ensaio de calorimetria não tem os seus parâmetros termodinâmicos considerados, apenas considerou-se que neste ensaio o processo dirigido corroborou com o segundo ensaio por ser endotérmico, entropicamente favorável e espontâneo.

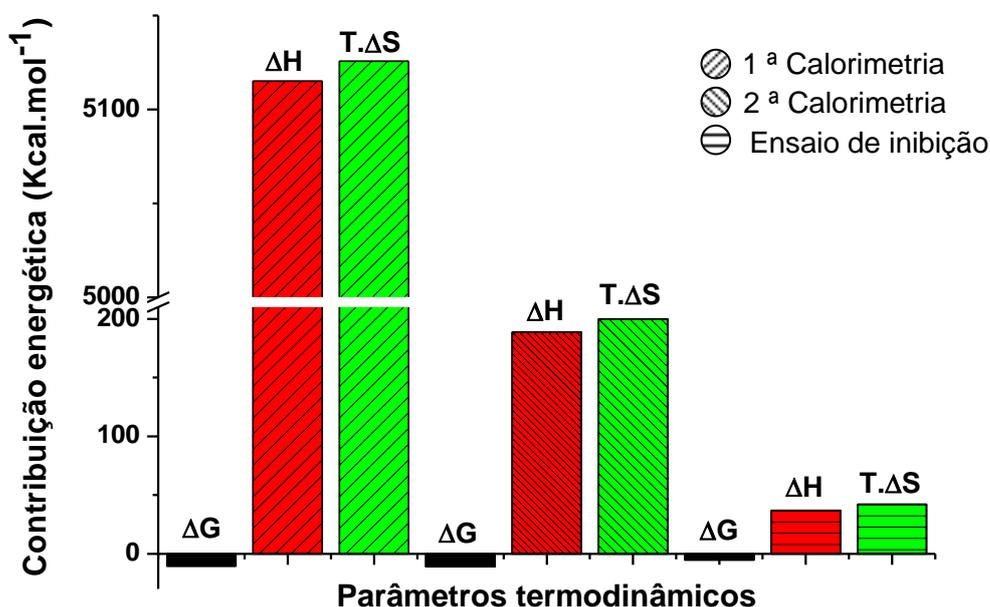


Figura 14.3. Parâmetros termodinâmicos da interação do BTCI com proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae*. Energia livre, ΔG , entalpia de ligação, ΔH , e fator entrópico, $T.\Delta S$, para cada uma das análises realizadas: o primeiro ensaio de calorimetria, o qual foi injetado o proteassoma 20S a 175 η M sobre o BTCI a 30 μ M, o segundo ensaio de calorimetria, o qual foi injetado o BTCI a 2 μ M sobre o proteassoma 20S a 40 η M e o ensaio de inibição, com valores dos parâmetros termodinâmicos estimados segundo a equação de Van't Hoff.

IV.10 Parâmetros hidrodinâmicos e estequiometria do complexo BTCI-proteassoma 20S por ultracentrifugação analítica.

A massa molecular e o coeficiente de sedimentação para o complexo BTCI-proteassoma 20S foram obtidos por experimentos de ultracentrifugação analítica pela técnica de velocidade de sedimentação. Para analisar os dados, o volume específico proteico do complexo (v), a densidade (ρ) e a viscosidade do tampão (η) foram

estimados por meio do software *SEDENTER*, obtendo os seguintes valores, $\nu=0,737483$, $\rho=1,0192$ L/g, e $\rho=0,0105396$. Usando a correção apropriada para a viscosidade e densidade da água a 20 °C ($S_{20,w}$), o $c(s)$ foi calculado e a distribuição $c(s)$ foi convertida em $c(S_{20,w})$.

Nas análises de complexo BTCl-proteassoma (Figura 15.1), apresentaram um coeficiente de sedimentação a 20 °C de 19,05 S e o corrigido respeito à água ($S_{20,w}$) foi estimado em 21,29 S (Figura 15.1 - B). A massa molecular estimada para o complexo foi equivalente a 728 029 Da (Figura 15.1 - B), maior do que o valor previsto para o complexo bimolecular BTCl-proteassoma (1:1). Se levarmos em consideração as massas moleculares de BTCl e proteassoma determinadas por ultracentrifugação neste trabalho, equivalente a 9 286 Da e 689 207 Da, respectivamente (Figura 10.1 - C e D); podemos estimar uma estequiometria para o complexo BTCl-proteassoma igual a 4,2 moléculas de BTCl por proteassoma 20S. Esta estequiometria demonstra, assim com os valores determinados pelos ensaios de calorimetria, que foram equivalentes a 5,3 moléculas de BTCl por proteassoma (Figura 14.2), que a interação BTCl-proteassoma 20S ocorre com mais de uma molécula, tendo a estequiometria entre 4 a 5 moléculas de inibidor por proteassoma. Isto corrobora com os resultados preliminares do *docking* do BTCl com o proteassoma 26S (comunicação pessoal, resultados não publicados, Figura 16.3), que mostram a interação de 4 moléculas de BTCl com a região central respectiva ao proteassoma 20S.

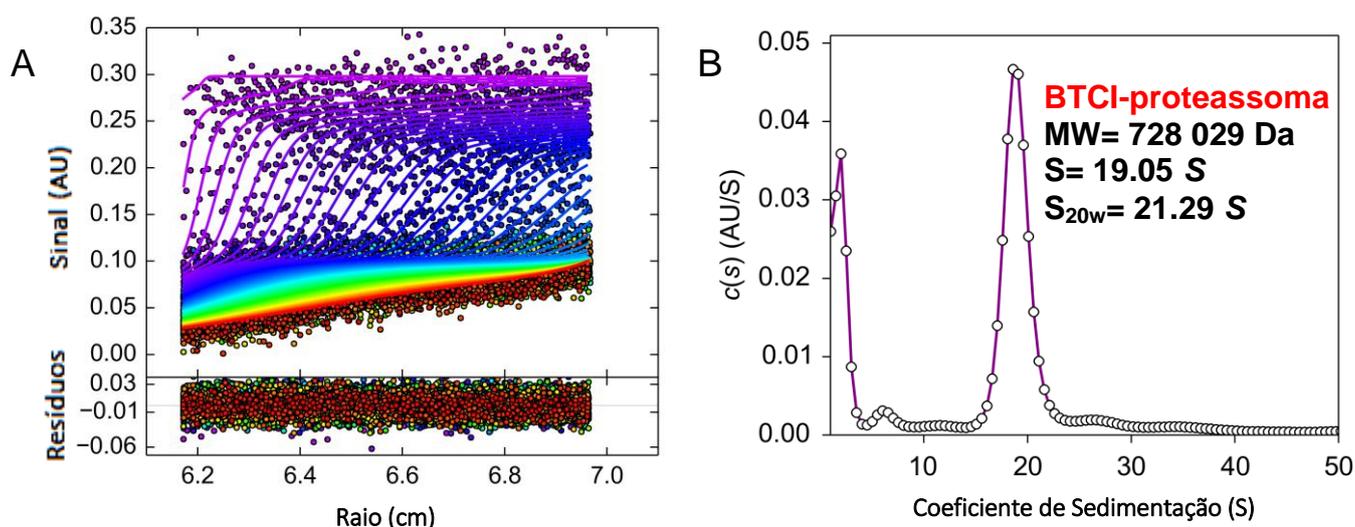


Figura 15.1. Parâmetros hidrodinâmicos e estequiometria do complexo BTCl-proteassoma 20S *Saccharomyces cerevisiae* por ultracentrifugação analítica. Perfis de sedimentação do BTCl-proteassoma 20S a 220 η m (A). Curvas de distribuição dos coeficientes de sedimentação (B).

V. Considerações finais: termodinâmica, estrutura e estequiometria da interação BTCI-Proteassoma.

A inibição por BTCI das atividades semelhantes à tripsina, quimotripsina e caspase do proteassoma 20S foi determinada indiretamente por meio de ensaios de inibição da atividade enzimática por técnicas espectroscópicas (Souza *et al.*, 2014). Os valores das constantes de inibição foram na ordem de 10^{-6} - 10^{-9} M, que são semelhantes aos valores da maioria dos inibidores da família *Bowman-Birk* (Ikenaka e Norioka, 1986) e às constantes de inibição de BTCI nas atividades das enzimas tripsina e quimotripsina (Ventura *et al.*, 1975; Fachetti *et al.*, 1984; Freitas *et al.*, 1999; Brand *et al.*, 2017). No entanto, até a presente data, nenhum trabalho foi realizado para demonstrar com metodologias diretas a interação do proteassoma com o BTCI e estimar a estequiometria de formação dos complexos moleculares. Os resultados obtidos na presente dissertação possibilitaram descrever a termodinâmica do processo global de interação BTCI-proteassoma 20S, a estequiometria molecular, bem como propostas hipotéticas da interação estrutural para explicar a inibição da atividade proteolítica do complexo multienzimático.

Na estrutura do proteassoma 20S existem duas subunidades (β_1) com atividade semelhante à caspase, duas (β_2) com atividade semelhante à tripsina e duas (β_5) com atividade semelhante à quimotripsina (Figura 16.1). Ou seja, cada molécula de proteassoma 20S possui seis potenciais sítios de inibição. Os parâmetros termodinâmicos do processo global de interação BTCI-proteassoma foram obtidos por calorimetria de titulação isotérmica a 30 °C (Figura 14.2) usando um modelo de interação simples de formação de complexo, onde N moléculas de BTCI interagem com uma molécula de proteassoma. Os resultados mostraram um comportamento monofásico, indicando que o processo de associação do BTCI ocorreu mediante a ocupação de sítios no proteassoma com a mesma afinidade aparente, definida pelo valor da constante de associação, K_a , de $K_a=1,34 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Além disso, foi demonstrado que a formação do complexo BTCI-proteassoma é mediada por um processo endotérmico ($\Delta H=1,888 \times 10^5 \text{ cal/mol}$), entropicamente favorável ($\Delta S=660 \text{ cal/mol/K}$), e espontâneo ($\Delta G=-11,1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$). A interação BTCI com proteassoma corrobora com o descrito para as interações de inibidores de proteases da família

Bowman-Birk com proteases, sendo um mecanismo orientado pelo aumento da entropia (Freitas *et al.*, 1999).

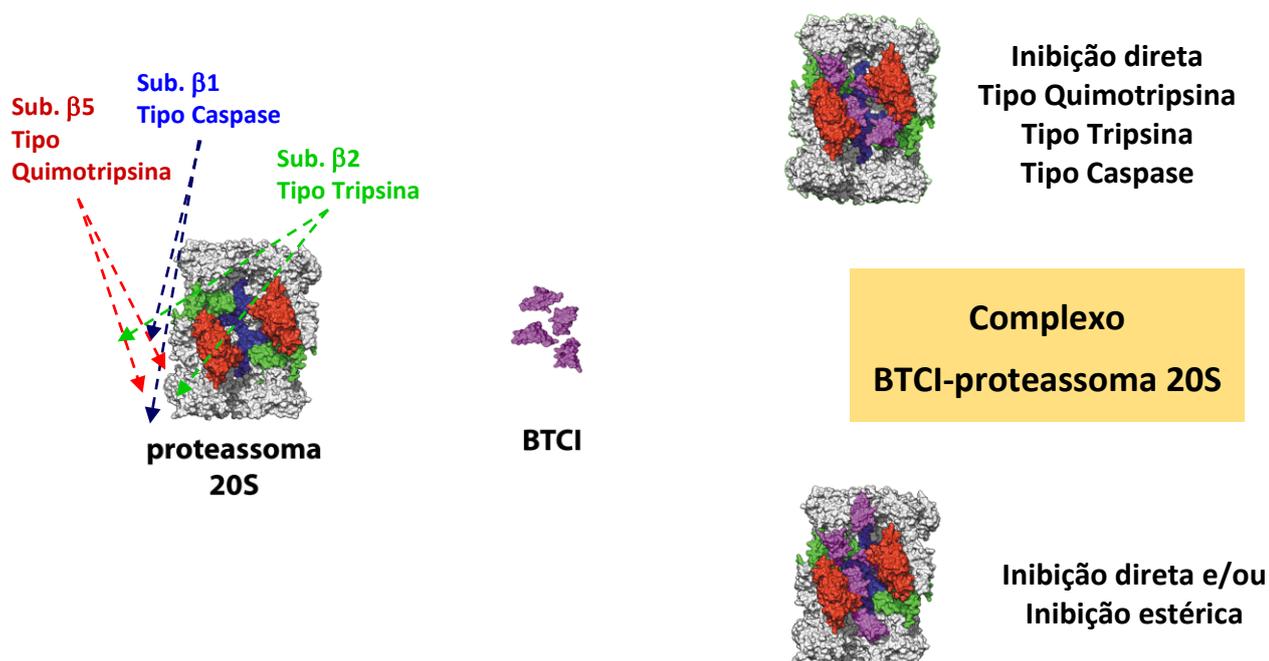


Figura 16.1. Esquema de formação do complexo molecular entre quatro moléculas de BTCI e uma de proteassoma 20S.

As subunidades do proteassoma 20S estão representadas em branco, exceto aquelas com atividade catalítica: duas subunidades β_1 com atividade semelhante à caspase (em azul), duas β_2 com atividade semelhante à tripsina (em verde) e duas β_5 com atividade semelhante à quimotripsina (em vermelho). Os sítios catalíticos de cada subunidade estão indicados com esferas coloridas. No modelo proposto, à direita e acima, a formação dos complexos ocorre entre 4 a 5 moléculas de BTCI que interagem diretamente com os sítios catalíticos das subunidades β_1 , β_2 , e β_5 . No modelo proposto, à direita e abaixo, o complexo pode ser formado por inibição estérica concomitante devido à interação das moléculas de BTCI com subunidades α que bloqueiam o acesso do substrato ao canal catalítico do proteassoma. A figura foi feita usando os PDBs do proteassoma de levedura ID: 3mg0 e BTCI ID: 2r33.

A ligação de BTCI ao proteassoma foi impulsionada pela entropia e essa contribuição entropica para a ligação está relacionada aos efeitos do solvente. Este processo é conhecido como “efeito hidrofóbico”, onde a mudança positiva de entropia geralmente é uma forte indicação de que as moléculas de água foram liberadas da superfície de interação das proteínas (interface do complexo) para o solvente (Durr, Jelesarov e Bosshard, 1999). Por outro lado, sugeriu-se que a água que permanece na interface após a ligação também pode contribuir positivamente para a entropia total da interação (Fischer e Verma, 1999). A diminuição da área superficial acessível a água, após o evento de ligação, deve resultar na liberação de moléculas de água confinadas ou interfaciais para o solvente, e isso deve contribuir favoravelmente para o aumento da entropia total da interação. Essa contribuição entropica favorável da desolvatação do

bolso de ligação do BTCI no proteassoma pode ser prevista como uma interação hidrofóbica clássica.

Os resultados de ITC obtidos nesta dissertação apresentaram processos dirigidos de maneira semelhante ao que foi obtido por fluorescência (Figura 3.12), sendo processos endotérmicos, entropicamente favoráveis e espontâneos, assim como o observado para os complexos bimoleculares α -quimotripsina-BTCI e tripsina-BTCI, com alteração de entalpia endotérmica e um aumento entropico moderado (Fachetti *et al.*, 1984, de Freitas *et al.*, 1999; Brand *et al.*, 2017). Porém, um estudo de inibição de tripsina e quimotripsina pelo BTCI, mediante imobilização em superfície combinado com a ressonância de plasmons de superfície, e a calorimetria de titulação isotérmica, mostraram que o aumento da concentração do inibidor (ordem micromolar), começam a prevalecer eventos endotérmicos secundários que afetam a cinética, a termodinâmica e a estequiometria das associações moleculares (Brand *et al.*, 2017).

O inibidor BTCI forma homomultímeros (monômeros, dímeros, trímeros e hexâmeros) dependentes da concentração, como foi demonstrado por dispersão de luz e microscopia de força atômica (Ventura *et al.*, 1981; Silva *et al.*, 2005). Portanto, não pode ser descartado que as entidades oligoméricas do BTCI interagem com o proteassoma envolvendo interações secundárias nos locais catalíticos. Não obstante, segundo a análise dos dados da calorimetria, o número de moléculas de BTCI envolvidas na ligação foi de aproximadamente 5 (Figura 14.2). Adicionalmente, a análise do complexo de proteassoma BTCI por ultracentrifugação analítica, por velocidades de sedimentação, mostrou uma estequiometria de 4 moléculas BTCI por proteassoma (Figura 15.1), que é muito semelhante ao determinado pelo ITC. Dada a semelhança dos resultados obtidos por duas metodologias biofísicas moleculares com diferentes princípios, podemos assumir que a estequiometria de interação do BTCI: proteassoma é 4 ou 5:1.

Paralelamente, um modelo de complexo entre BTCI e proteassoma foi obtido por simulação computacional (“*docking*”), em colaboração com o Ms. Caio de Souza (comunicação pessoal, não publicado, metodologia em Anexo 1). Para esta simulação foi utilizada a estrutura cristalográfica (código PDB 1FNT) de uma quimera do proteassoma (subunidade 11S de tripanossoma e subunidade 20S de levedura), considerando que esta forma o complexo completo 26S, além de manter a sua atividade catalítica. A busca foi realizada com diversas caixas de dimensões de 160Å x 160Å x

100Å e centro com a coordenada Z variando em 10Å, de modo a varrer todo o complexo do proteassoma. A Figura 16.2 mostra as várias soluções encontradas para interação do BTCI com o proteassoma, ao longo das subunidades 11 e 20S. Em detalhe, observa-se que o BTCI ocupa inicialmente a entrada da subunidade 11S e adentra por todo o canal do proteassoma.

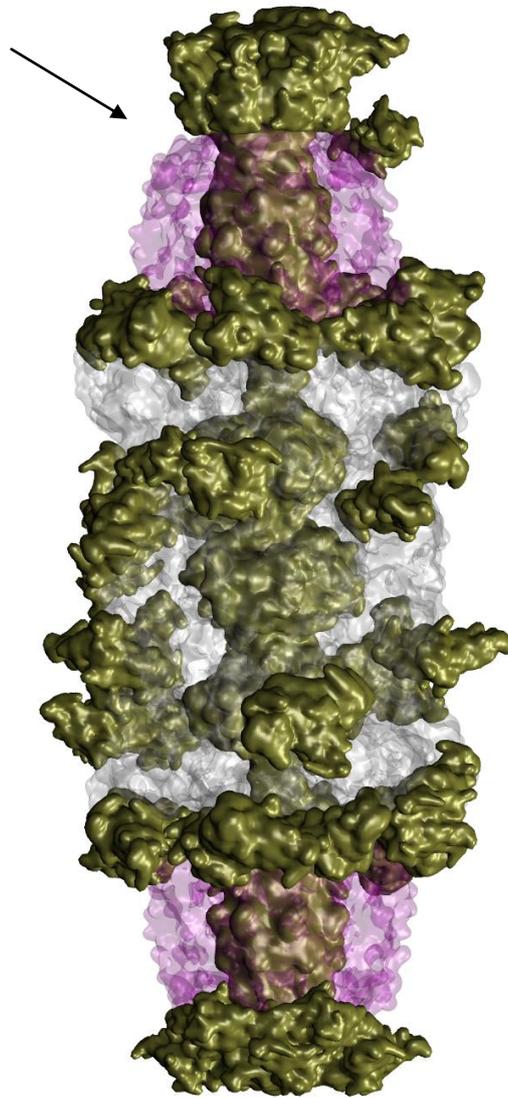


Figura 16.2. Nuvens de soluções de *docking* com o BTCI. O BTCI (ocre) ocupa toda a extensão da cavidade central do proteassoma via entrada pela subunidade 11S (seta).

Estas várias soluções obtidas foram analisadas segundo o padrão de colocação entre as soluções de docking de menores energias, considerando um “cut off” de -15 Kcal/mol. Estas soluções estão representadas na Figura 16.3, onde se observa uma e

quatro moléculas de BTCl nas regiões das subunidades 11S e catalítica do proteassoma, respectivamente.

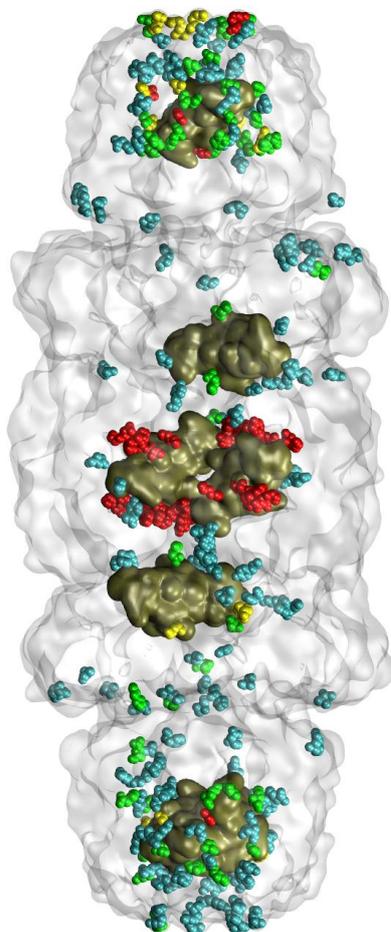


Figura 16.3. Docking entre proteassoma 26S e BTCl. Colocalização entre as soluções de docking de menores energias de ligação (ocre) com os resíduos do proteassoma que apresentaram maior ocupância (quantidade de soluções em contato com um de seus átomos) com as regiões inibitórias do BTCl. Resíduos com 8 a 15 contatos em ciano, resíduos com 16 a 23 contatos em verde, resíduos com 24 a 31 contatos em amarelo, resíduos com 32 ou mais contatos em vermelho. Os resíduos em vermelho encontram-se na cavidade catalítica do proteassoma. O padrão de dispersão entre a coordenada Z, referenciada do centro geométrico para as bordas do complexo, foi analisado mediante a amostragem dos valores da energia de ligação para formação do complexo, considerando-se o “cut off” de -15 Kcal/mol (Figura 16.4). Observa-se que a energia tende a diminuir durante a entrada do BTCl no proteassoma 11S e durante a passagem do mesmo para a subunidade 20S do proteassoma, tornando a cavidade central uma região propícia para a acomodação do BTCl. As soluções de menor energia encontraram-se próximas ao centro da proteína.

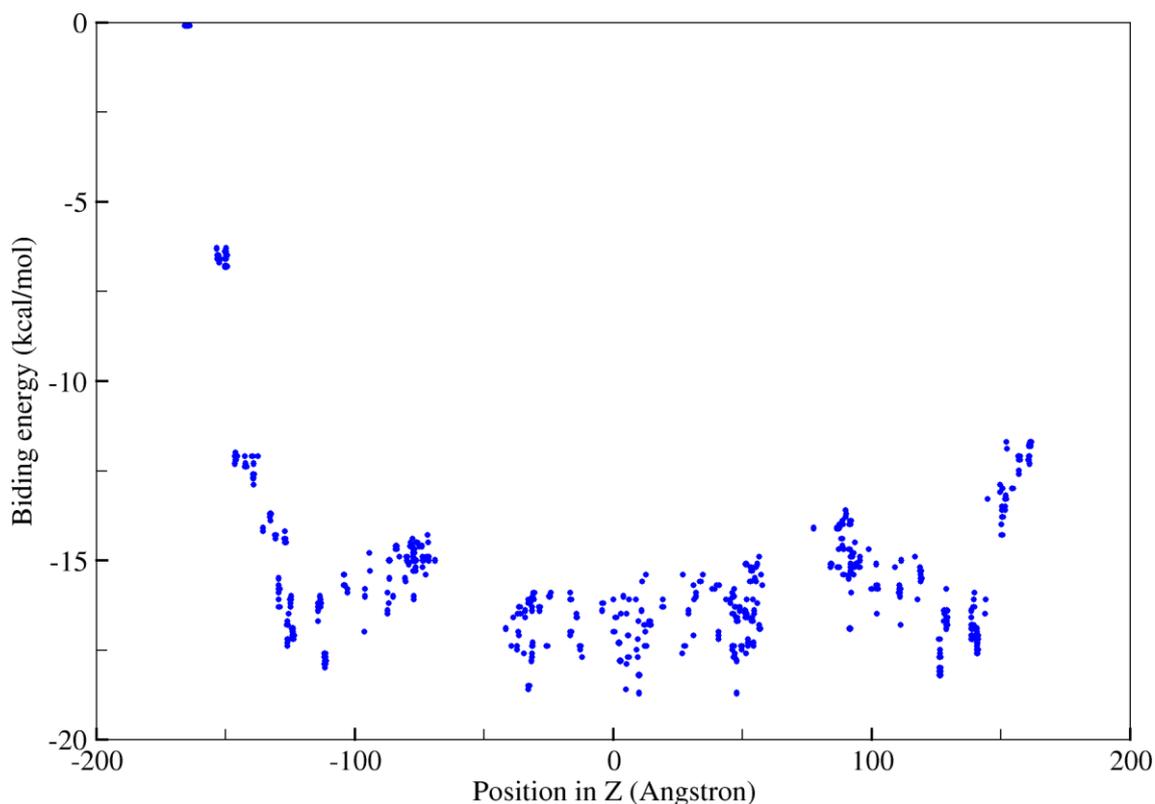


Figura 16.4. Padrão de dispersão entre a coordenada Z do centro geométrico de cada solução de docking e a respectiva energia de ligação. A origem da coordenada Z encontra-se no centro geométrico da proteína. As soluções de menor energia encontraram-se próximas ao centro da proteína.

Portanto, todos os resultados apresentados nesta dissertação permitem propor que, na estrutura do proteassoma 20S, 4 a 5 moléculas de BTCI podem interagir diretamente e com similar afinidade com os sítios catalíticos das subunidades β_2 , inibindo a atividade semelhante à tripsina, com a β_5 , inibindo a atividade semelhante à quimotripsina, e também com as β_1 , inibindo a atividade semelhante à caspase (Figura 16.1).

De acordo com uma previsão teórica por simulação computacional (“*docking*”) entre BTCI e proteassoma, foi sugerido que a maioria das soluções obtidas indicava a acomodação de pelo menos 4 moléculas de BTCI no interior do proteassoma (comunicação pessoal, resultados não publicados, Figura 16.3). De acordo com a previsão duas moléculas do BTCI interagem diretamente com as subunidades catalíticas β e duas com subunidades não catalíticas α (Figura 16.3). A partir desse resultado preditivo, outra variante de interação do BTCI com o proteassoma pode ser proposta.

Além das interações inibitórias do BTCI com o proteassoma nos centros catalíticos, uma inibição estérica concomitante pode estar presente devido à interação das moléculas de BTCI com subunidades α que bloqueiam o acesso do substrato ao canal catalítico do proteassoma (Figura 16.1). Para demonstrar essas hipóteses de interação molecular, estudos estruturais de maior resolução combinados com previsões de “docking” moleculares mais robustas deveriam ser realizados. No entanto, nossos resultados mostram que a interação do BTCI com o proteassoma é espontânea, endotérmica, entrópicamente favorável e provavelmente com uma estequiometria de 4-5:1.

VI. Conclusões

- O proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* foi purificado a partir de uma cromatografia de afinidade a níquel combinada a uma cromatografia de troca aniônica (Mono Q). Os melhores rendimentos do processo de purificação foram obtidos com a otimização da interação do proteassoma 20S à matriz da coluna de troca aniônica (condutividade aproximada de 25 mS/cm), reduzindo a competição com proteínas contaminantes e a saturação da coluna. Portanto, as modificações no método de purificação do proteassoma de levedura, realizadas neste trabalho, foram relevantes para rendimento e eficiência do processo.
- A inibição da atividade tipo quimotripsina do proteassoma 20S pelo BTCI, em tampão Tris-HCl 20 mM, pH7,5 e NaCl 500 mM, aumentou com o incremento da temperatura. O aumento da temperatura favoreceu a interação do BTCI com o proteassoma, provavelmente por promover mudanças conformacionais na estrutura oligomérica do proteassoma. Os parâmetros termodinâmicos determinados indiretamente pela aproximação de van't Hoff indicaram que o processo de interação do BTCI com o proteassoma é endotérmico e entropicamente favorável. Estes parâmetros, apesar de terem sido calculados indiretamente, possibilitaram o desenho racional dos ensaios de microcalorimetria de titulação isotérmica.
- A inibição da atividade tipo quimotripsina do proteassoma é menor em condições de alta força iônica, a qual favorece mudanças conformacionais e dissociação do complexo BTCI-proteassoma 20S.
- Segundo os experimentos de calorimetria (ITC), a interação do BTCI com o proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* é um processo endotérmico, com ΔH igual a 1.888×10^5 cal/mol, entropicamente favorável, com ΔS igual a 660 cal/mol/deg, e espontâneo, com ΔG igual a $-11,1$ Kcal.mol⁻¹. A contribuição do fator entrópico ($T.\Delta S$), maior que a variação da entalpia, foi determinante para a espontaneidade da reação. A estequiometria do

complexo BTCI-proteassoma 20S foi de 5,3 moléculas de inibidor para cada proteassoma. Isto demonstra a formação deste complexo molecular.

- Os estudos de ultracentrifugação analítica sugerem a formação do complexo BTCI-proteassoma 20S com uma estequiometria de 4,2 moléculas de inibidor para cada proteassoma. Resultado que coincide com os valores obtidos por calorimetria (ITC), corroborando a ideia da formação do complexo molecular.

VII. Referências Bibliográficas

- ADAMS, Julian. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug discovery today*, v. 8, n. 7, p. 307-315, 2003.
- ADAMS, Julian. Proteasome inhibitors as new anticancer drugs. *Current opinion in oncology*, v. 14, n. 6, p. 628-634, 2002.
- ADAMS, Julian. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 5, p. 349-360, 2004.
- ÁLVARES, Alice da Cunha M. *et al.* Bowman-birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds enhances the action of bradykinin-related peptides. *Molecules*, v. 19, n. 11, p. 17536-17558, 2014.
- AN, W. G. *et al.* Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia*, v. 14, n. 7, p. 1276, 2000.
- ARMSTRONG, William B. *et al.* Bowman birk inhibitor concentrate and oral leukoplakia: a randomized phase IIb trial. *Cancer Prevention Research*, v. 6, n. 5, p. 410-418, 2013.
- ARMSTRONG, William B. *et al.* Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. *Clinical Cancer Research*, v. 6, n. 12, p. 4684-4691, 2000.
- ARMSTRONG, William B. *et al.* Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, v. 9, n. 1, p. 43-47, 2000.
- BARBOSA, João Alexandre RG *et al.* Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with β -Trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical journal*, v. 92, n. 5, p. 1638-1650, 2007.
- BARRETT, Alan J.; WOESSNER, J. Fred; RAWLINGS, Neil D. (Ed.). *Handbook of proteolytic enzymes*. Elsevier, 2012.
- BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. *Lipids and cell membranes*. Biochemistry, fifth edition. New York: WH Freeman, v. 1050, 2002.
- BILLINGS, Paul C.; NEWBERNE, Paul M.; KENNEDY, Ann R. Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*, v. 11, n. 7, p. 1083-1086, 1990.
- BIRK, Yehudith. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin-and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 25, n. 2, p. 113-131, 1985.

BODE, Wolfram; HUBER, Robert. Structural basis of the endoproteinase–protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1477, n. 1, p. 241-252, 2000.

BOGYO, M.; WANG, E. W. Proteasome inhibitors: complex tools for a complex enzyme. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 268, p. 185-208, 2002.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAND, G. D. *et al.* Oligomerization affects the kinetics and thermodynamics of the interaction of a Bowman-Birk inhibitor with proteases. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 618, p. 9-14, 2017.

BURLEY, S. K.; PETSKO, Gregory A. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science*, v. 229, p. 23-29, 1985.

CARVALHO, A. F. *et al.* BTCI enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 1, p. 149-154, 2008.

CATALANO, M. *et al.* Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): solution structure and analysis of self-association behavior. *Biochemistry*, v. 42, n. 10, p. 2836-2846, 2003.

CHEN, Qinghua *et al.* Proteasome synthesis and assembly are required for survival during stationary phase. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 6, p. 859-868, 2004.

CHEN, Yu-Wen *et al.* Bowman–Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*, v. 26, n. 7, p. 1296-1306, 2005.

CLAIR, William H. St *et al.* Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer research*, v. 50, n. 3, p. 580-586, 1990.

CLEMENTE, Alfonso *et al.* The cytotoxic effect of Bowman–Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Molecular nutrition & food research*, v. 54, n. 3, p. 396-405, 2010.

CLEMENTE, Alfonso; DOMONEY, C. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Current protein and peptide science*, v. 7, n. 3, p. 201-216, 2006.

CLEMENTE, Alfonso; SONNANTE, Gabriella; DOMONEY, Claire. Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. *Current Protein and Peptide Science*, v. 12, n. 5, p. 358-373, 2011.

DA SILVA, Luciano *et al.* Stability of a black eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor (BTCI). *Protein and Peptide Letters*, v. 8, n. 1, p. 33-38, 2001.

DE FREITAS, Sonia M. *et al.* Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor- α -chymotrypsin complex. *FEBS letters*, v. 409, n. 2, p. 121-127, 1997.

DE FREITAS, Sonia M.; IKEMOTO, Hiroaki; VENTURA, Manuel M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI). *Journal of protein chemistry*, v. 18, n. 3, p. 307-313, 1999.

DERYUGINA, Elena I.; SOROCEANU, Liliana; STRONGIN, Alex Y. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. *Cancer research*, v. 62, n. 2, p. 580-588, 2002.

DREXLER, Hannes CA. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 3, p. 855-860, 1997.

DÜRR, Eberhard; JELESAROV, Ilian; BOSSHARD, Hans Rudolf. Extremely fast folding of a very stable leucine zipper with a strengthened hydrophobic core and lacking electrostatic interactions between helices. *Biochemistry*, v. 38, n. 3, p. 870-880, 1999.

ESTEVEES, Gisele Ferreira. Resolução da estrutura tridimensional do inibidor trípico e quimotríptico de *Vigna unguiculata* em complexos binário e ternário. 2010. 163 f.,il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

FACHETTI, H. C. S.; MIZUTA, K.; VENTURA, M. M. Thermodynamics of the association of trypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. *Anais-Academia Brasileira de Ciencias*, 1984.

FARADY, Christopher J.; CRAIK, Charles S. Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. *Chembiochem*, v. 11, n. 17, p. 2341-2346, 2010.

FISCHER, Stefan; VERMA, Chandra S. Binding of buried structural water increases the flexibility of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 17, p. 9613-9615, 1999.

FRANCO, Octavio L. *et al.* Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry*, v. 65, n. 1, p. 81-89, 2003.

GENNIS L.S., CANTOR C.R. Double-headed protease inhibitors from black-eyed peas. III. Subunit interaction of the native and half site chemically modified proteins. *J. Biol. Chem.* 251:747-753, 1976.

- GHISLAIN, Michel; TALLA, Emmanuel; FRANÇOIS, Jean M. Identification and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamidase gene, PNC1. *Yeast*, v. 19, n. 3, p. 215-224, 2002.
- GLICKMAN, M. H.; MAYTAL, V. Regulating the 26S proteasome. In: *The Proteasome—Ubiquitin Protein Degradation Pathway*. Springer Berlin Heidelberg, 2002. p. 43-72.
- GROLL, Michael *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, v. 386, n. 6624, p. 463, 1997.
- HARDING, Clifford V. *et al.* Novel dipeptide aldehydes are proteasome inhibitors and block the MHC-I antigen-processing pathway. *The Journal of Immunology*, v. 155, n. 4, p. 1767-1775, 1995.
- HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. *Annual review of biochemistry*, v. 29, n. 1, p. 45-72, 1960.
- HEDSTROM, Lizbeth. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews*, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.
- HUBER, Eva M. *et al.* A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome. *Nature communications*, v. 7, 2016.
- IKENAKA ,T.; NORIOKA, S. Bowman-Birk family serine proteinase inhibitors. In: Barrett A. J.; Salvesen, G. (eds). *Proteinase Inhibitors*, Wagenigen, Elsevier Science, cap. 9, p. 361 – 371, 1986.
- IQBAL, Mohamed *et al.* Potent inhibitors of proteasome. *Journal of medicinal chemistry*, v. 38, n. 13, p. 2276-2277, 1995.
- JANA, Nihar Ranjan *et al.* Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Human molecular genetics*, v. 10, n. 10, p. 1049-1059, 2001.
- JANA, Nihar Ranjan *et al.* Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 12, p. 11680-11685, 2004.
- JOANITTI, Graziella Anselmo; AZEVEDO, Ricardo Bentes; FREITAS, Sonia Maria. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer letters*, v. 293, n. 1, p. 73-81, 2010.

KARPUZOGLU, Ebru; GOGAL, Robert M.; AHMED, S. Ansar. Serine protease inhibitor, 4-(2-aminoethyl)-benzene sulfonyl fluoride, impairs IL-12-induced activation of pSTAT4 β , NF κ B, and select pro-inflammatory mediators from estrogen-treated mice. *Immunobiology*, v. 216, n. 12, p. 1264-1273, 2011.

KENNEDY, Ann R. Anticarcinogenic Activity of Protease Inhibitors Overview. In: *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents*. Springer US, 1993. p. 9-64.

KENNEDY, Ann R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacology & therapeutics*, v. 78, n. 3, p. 167-209, 1998.

KENNEDY, Ann R. Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. *Cancer Research*, v. 54, n. 7 Supplement, p. 1999s-2005s, 1994.

KENNEDY, Ann R.; WAN, X. Steven. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *The Prostate*, v. 50, n. 2, p. 125-133, 2002.

KOEPKE, Jürgen *et al.* Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *Journal of molecular biology*, v. 298, n. 3, p. 477-491, 2000.

KOOLMAN, Jan *et al.* *Color atlas of biochemistry*. Stuttgart: Thieme, 2005.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LASKOWSKI, Michael; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1477, n. 1, p. 324-337, 2000.

LEME, Janaina de Moraes Maciel. *Mutação sítio-específica de cisteínas glutationiladas na subunidade α 5 do proteassomo 20S da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: implicações no metabolismo de proteínas oxidadas e na longevidade celular*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

LEO, F. De *et al.* PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 1, p. 347-348, 2002.

LEWIS, Eli C. Expanding the clinical indications for α 1-antitrypsin therapy. *Molecular medicine*, v. 18, n. 1, p. 957, 2012.

LICHTENSTEIN, Gary R. *et al.* Bowman-Birk inhibitor concentrate: a novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*, v. 53, n. 1, p. 175, 2008.

LOPES, Ulisses Gazos *et al.* p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 20, p. 12893-12896, 1997.

- MA, Tong-Cui *et al.* Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor (BBI) blocks HIV entry into macrophages. *Virology*, v. 513, p. 91-97, 2018.
- MALKOWICZ, S. Bruce *et al.* Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*, v. 48, n. 1, p. 16-28, 2001.
- MARYANOFF, Bruce E. *et al.* Dual inhibition of cathepsin G and chymase is effective in animal models of pulmonary inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 181, n. 3, p. 247-253, 2010.
- MEHDAD, A. *et al.* A Bowman-Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. *Cell death discovery*, v. 2, 2016.
- MESSADI, Diana Victor *et al.* Inhibition of Oral Carcinogenesis by a Protease Inhibitor 2 3. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 76, n. 3, p. 447-452, 1986.
- MESSINA, Mark J. *et al.* Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutrition and cancer*, v. 21, n. 2, p. 113-131, 1994.
- MESSINA, Mark; BARNES, Stephen. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*, v. 83, n. 8, p. 541-6, 1991.
- MEYSKENS, Frank L. *et al.* Abstract CN02-05: Phase IIb randomized clinical chemoprevention trial of a soybean-derived compound (Bowman-Birk inhibitor concentrate) for oral leukoplakia. 2010.
- MORHY, Lauro; VENTURA, Manuel Mateus. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 59, n. 1-2, p. 71-81, 1987.
- NEURATH, Hans. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, v. 224, p. 350-358, 1984.
- NEURATH, Hans; WALSH, Kenneth A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 73, n. 11, p. 3825-3832, 1976.
- OAKLEY, Berl R.; KIRSCH, Donald R.; MORRIS, N. Ronald. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, v. 105, n. 1, p. 361-363, 1980.
- ODANI, Shoji; IKENAKA, Tokuji. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors: XIII. Preparation and Characterization of Active Fragments from Bowman-Birk Proteinase Inhibitor. *The Journal of Biochemistry*, v. 83, n. 3, p. 747-753, 1978.
- ORLOWSKI, Robert Z. *et al.* Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 22, p. 4420-4427, 2002.
- RAWLINGS, Neil D. *et al.* MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D503-D509, 2013.

SADOUL, Remy *et al.* Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *The EMBO Journal*, v. 15, n. 15, p. 3845, 1996.

SAFAVI, Farinaz; ROSTAMI, Abdolmohamad. Role of serine proteases in inflammation: Bowman–Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Experimental and molecular pathology*, v. 93, n. 3, p. 428-433, 2012.

SAITO, Teruyoshi *et al.* Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman–Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. *Cancer letters*, v. 253, n. 2, p. 249-257, 2007.

SCHECHTER, Israel; BERGER, Arieh. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.

SCHRADER, Jil *et al.* The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science*, v. 353, n. 6299, p. 594-598, 2016.

SILVA, Luciano P. *et al.* Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 61, n. 3, p. 642-648, 2005.

SOUZA, Larissa C. *et al.* Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*, v. 9, n. 1, p. e86600, 2014.

SOUZA, Larissa da Costa. Associação entre o proteassoma e o inibidor de protease BTCl: caracterização físico-química e efeitos moleculares em células de câncer de mama (MCF-7). 2010. xiii, 123 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

SRIKANTH, Sandhya; CHEN, Zhong. Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology*, v. 7, 2016.

TANAKA, K. *et al.* Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 31, p. 16209-16217, 1988.

TERADA, Shigeyuki *et al.* Purification and characterization of three proteinase inhibitors from *Canavalia lineata* seeds. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 58, n. 2, p. 371-375, 1994.

TOMKO JR, Robert J.; HOCHSTRASSER, Mark. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual review of biochemistry*, v. 82, p. 415-445, 2013.

VENTURA M.M., MARTIN CO, MORHY L. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.). VI. Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin. *An Acad Brasil Cienc* 47: 335–346, 1975.

VENTURA, M. M.; MIZUTA, K.; IKEMOTO, H. Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution—a study by light-scattering. *An Acad Brasil Cienc*, v. 53, n. 1, p. 195-201, 1981.

VENTURA M.M., XAVIER-FILHO J., A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and partial characterization, *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 38, 553–566, 1966.

VINITSKY, Alexander *et al.* Inhibition of the proteolytic activity of the multicatalytic proteinase complex (proteasome) by substrate-related peptidyl aldehydes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 47, p. 29860-29866, 1994.

VOET, Donald; VOET, Judith G. *Bioquímica*. Artmed Editora, 2013.

VON HOFE, Eric; NEWBERNE, Paul M.; KENNEDY, Ann R. Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal neoplasms by the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis*, v. 12, n. 11, p. 2147-2150, 1991.

VOSS, R. *et al.* Crystal Structure of the Bifunctional Soybean Bowman-Birk Inhibitor at 0.28-nm Resolution. *The FEBS Journal*, v. 242, n. 1, p. 122-131, 1996.

XAVIER-FILHO, J. and VENTURA, M. M. Trypsin inhibitors in Cowpea: a review. *Comments Agric. Food Chem*, v. 1, p. 239-314, 1988.

WILK, Sherwin; FIGUEIREDO-PEREIRA, Maria E. Synthetic inhibitors of the multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme and Protein*, v. 47, p. 306-313, 1993.

WITTIG, Ilka; SCHÄGGER, Hermann. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, v. 8, n. 19, p. 3974-3990, 2008.

ZUCKER, Stanley *et al.* Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Current topics in developmental biology*, v. 54, p. 1-74, 2003.

ZWICKL, Peter; BAUMEISTER, Wolfgang (Ed.). *The Proteasome—Ubiquitin Protein Degradation Pathway*. Springer Science & Business Media, 2012.

VIII. Apêndice

Durante o desenvolvimento deste mestrado, outras atividades acadêmicas/científicas foram realizadas, visando obtenção de dados relacionados à atividade inibitória do BTCI em linhagens bacterianas, bem como para formação complementar. Os resultados estão apresentados a seguir.

VIII.I Efeito inibitório do BTCI em linhagens de bactérias

Estão apresentados a seguir, resultados de pesquisa realizada em colaboração com a Profa Dra. Tatiana Amabile de Campos e a aluna de mestrado Laura Fernandes, com o objetivo de determinar o efeito inibitório do BTCI sobre linhagens bacterianas, como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

VIII.II.i Introdução

Infecção hospitalar e resistência a antibióticos por patógenos relacionados a estas infecções tem sido assuntos bastante discutidos e de grande preocupação, por ser a principal causa da morte para pacientes em estado crítico de saúde (Mulvey e Simor, 2009; Becker *et al.*, 2012; Ramsamy *et al.*, 2013). Assim, há extrema necessidade em desenvolver novos fármacos como alternativa para o tratamento de infecções por microorganismos multirresistentes (Fitzgerald-Hughes *et al.*, 2012). Neste contexto, estudos sobre compostos biologicamente ativos extraído de plantas tem sido realizados (Savoia 2012), visando o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos com alta eficácia e menor toxicidade (Ngo *et al.* 2013).

Proteases bacterianas desempenham papéis fundamentais na fisiologia celular, replicação e sobrevivência, estando envolvidas na virulência, por regularem a produção e secreção de fatores de virulência, coordenarem as respostas ao estresse importantes para a sobrevivência no hospedeiro e por serem responsáveis pela destruição do tecido hospedeiro e a degradação das proteínas de defesa do hospedeiro (Culp e Wright 2017). Isto torna as proteases bacterianas alvos para o desenvolvimento de medicamentos antivirulentos e antibióticos (Culp e Wright 2017).

Diversos trabalhos têm demonstrado a toxicidade de inibidores de tripsina sobre fungos e bactérias (Giudici, Regente e Canal 2000; Chilose *et al.* 2000; Yang, Sugio e White 2006; Wang 2006; Kim *et al.* 2006; Lima *et al.* 2011), atuando também sobre microorganismos patogênicos (Kim *et al.* 2006; Backer 2009; Costa H. P. S. *et al.* 2014). Estudos têm sido realizados para o possível uso de inibidores de proteases de plantas como antimicrobianos (Kim *et al.* 2006; Backer 2009; Costa H. P. S. *et al.* 2014; Rehman S. 2016), sendo observado a inibição de crescimento bacteriano por um inibidor de tripsina extraído de pinhão-mansão. Outros estudos também relacionam os inibidores de proteases de plantas com efeitos contra a resistência bacteriana e fúngica (Rehman S. 2016).

O BTCI é um inibidor pertencente à família *Bowman-Birk*, obtido a partir de sementes de *Vigna unguiculata*. Este inibidor apresenta um potencial com aplicações biotecnológicas na agricultura, tendo apresentado potencial para o controle de pragas, como a do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), e em áreas da saúde, demonstrando efeitos natriuréticos, cardiovasculares e, principalmente efeitos anticarcinogênicos em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Franco *et al.* 2003, Carvalho *et al.* 2008; Álvares A. C. M. *et al.* 2014; Joanitti *et al.* 2010; Mehadad A. *et al.* 2016).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito inibitório do BTCI em linhagens bacterianas, visando investigar seu papel como agente antimicrobiano e reconhecer uma nova aplicabilidade potencial para este inibidor.

VIII.II.ii Materiais e Métodos

Para avaliar a atividade antibacteriana do BTCI foi empregado o método de inibição de crescimento em meio líquido. Para tanto, foram utilizadas duas bactérias gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) e *Escherichia coli* (ATCC J96). As bactérias foram incubadas em caldo Mueller-Hinton numa estufa a 37 °C. Para o ensaio a suspensão de células utilizada tinha 10⁶ UFC/mL.

O ensaio foi conduzido em placas de microtitulação (96 poços) por meio da adição do BTCI autoclavado e ressuspenso em meio Mueller-Hinton de acordo com a proporção da concentração indicada para cada poço. O experimento foi realizado com *K. pneumoniae* e *E. coli* variando a concentração de BTCI em 0 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM e 400 µM. Como controle positivo foi utilizado poços com apenas o

meio Mueller-Hinton, e negativo foram utilizados 100 μL da suspensão de células com 100 μL de meio. Em cada poço foi colocado 100 μL da suspensão de células com 10^6 UFC/mL. O volume final de cada poço foi de 200 μL .

As leituras de absorvância foram realizadas no espectrofotômetro (BioTeK-Synergy™ HT) no comprimento de onda de 630 nm a cada 30 min por um período total de 4 h. Entre os intervalos de leitura a placa ficava incubada em estufa a 37 °C. Para a interpretação das leituras os poços que continham apenas meio foram considerados como o branco da absorvância, subtraindo assim os valores da absorvância de cada poço pela media do valor dos poços do controle negativo.

VIII.II.iii Resultados

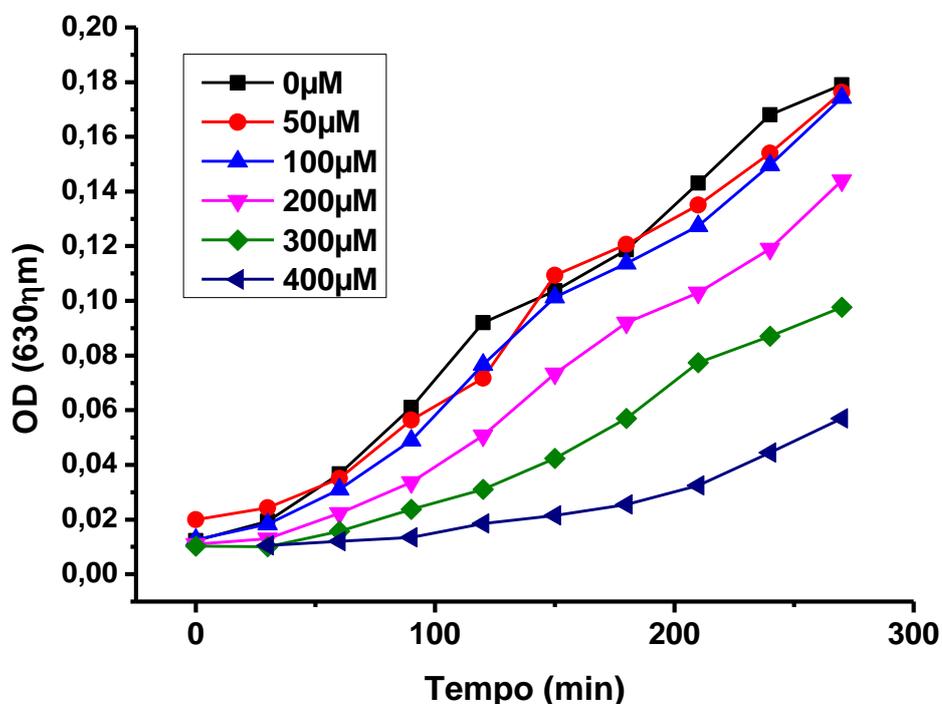


Figura A1. Efeito do inibidor BTCI no crescimento de *Klebsiella pneumoniae* a diferentes concentrações. Experimento realizado em triplicata para cada concentração do inibidor. Desvio padrão menor que 10%.

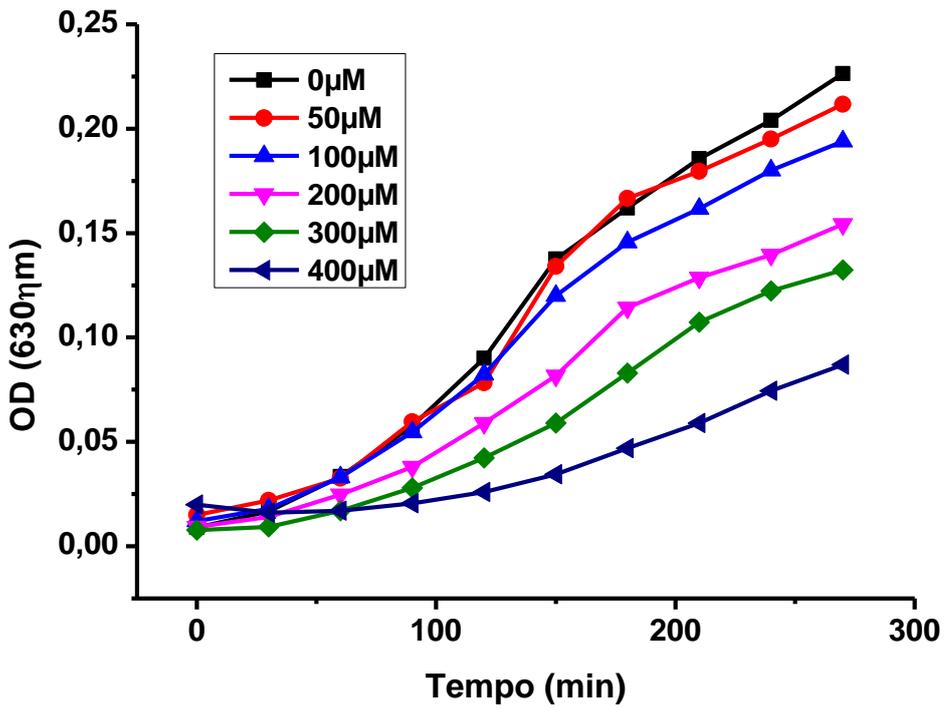


Figura A2. Efeito do inibidor BTCI no crescimento de *Escherichia coli* a diferentes concentrações. Experimento realizado em triplicata para cada concentração do inibidor. Desvio padrão menor que 10%.

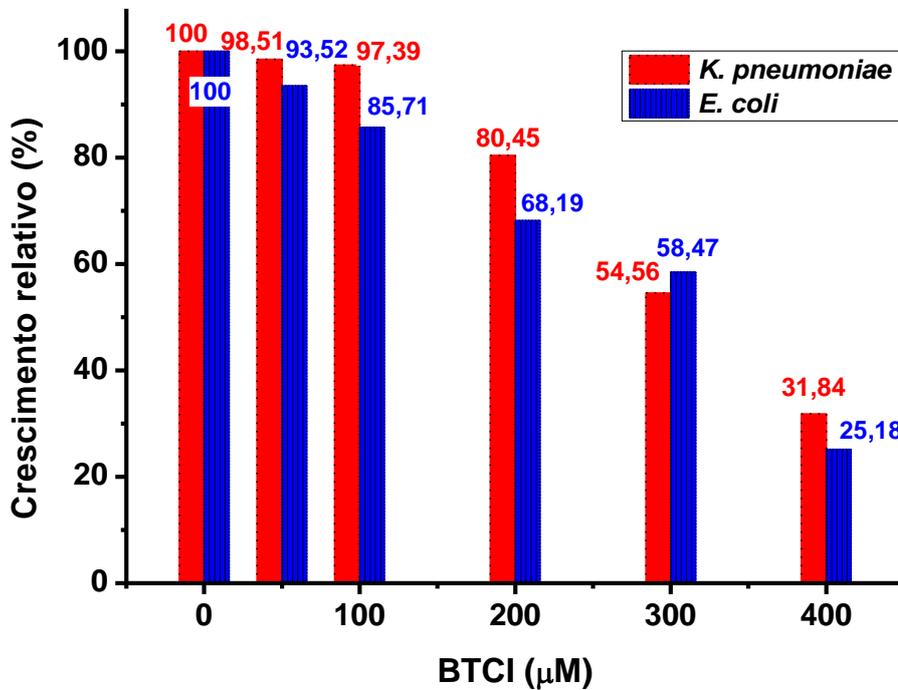


Figura A3. Percentual do crescimento relativo de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* variando as concentrações do inibidor BTCI.

VIII.II.iv Discussão

O apêndice deste trabalho apresenta ensaios de inibição do crescimento bacteriano, em meio líquido, pelo inibidor de serinoprotease BTCl. Os resultados obtidos nos ensaios com *K. pneumoniae* e *E. coli* (Figuras A1 e A2) demonstram que a presença de BTCl no meio de cultura influencia diretamente no crescimento destas bactérias, reduzindo em 68,16% e 74,82% o crescimento relativo de *K. pneumoniae* e *E. coli*, respectivamente, na presença de BTCl a 400 μ M (Figura A3). Segundo o regulamento técnico para produtos com ação antimicrobiana presente em anexo na RDC nº 14 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), uma droga bacteriostática, inibe o crescimento do microorganismo sem chegar necessariamente a produzir-se a morte do mesmo. Aparentemente, o comportamento apresentado assemelha-se a uma droga bacteriostática nas primeiras 3 h, para *K. pneumoniae* e 2 h, para *E. coli*, onde nos ensaios com maiores concentrações de BTCl ocorreu um retardo no crescimento microbiano, se comparado aos ensaios sem inibidor. Mas, para comprovação destes resultados, seriam necessários outros experimentos elevando as concentrações do inibidor.

Seria muito simples relacionar a conexão existente entre o trabalho principal e o apêndice apresentado apenas pela presença do mesmo inibidor de serinoprotease em ambos os trabalhos. Ou até ir um pouco além, como correlacionar as funcionalidades biológicas e aparências estruturais semelhantes do proteassoma 20S com um dos complexos proteolíticos bacterianos (Kessel *et al.* 1995). Mesmo sem os a totalidade dos resultados necessários, pode-se hipotetizar a correlação dos efeitos induzidos por BTCl em células de câncer MCF-7 como o rápido aumento de ROS e a perda do potencial de membrana da mitocôndria, que foram relatados por Mehdad *et al.* (2016) e Joanniti *et al.* (2010), com a inibição do crescimento bacteriano por BTCl.

Proteases mitocondriais humanas são ortólogas da maioria dos complexos proteolíticos encontrados em bactérias e muitas delas são estudadas como potenciais alvos para drogas anticancer (Goard e Schimmer 2014). Em Cole *et al.* (2015), estudou-se a inibição da protease mitocondrial ClpP (*Proteolytic subunit of bacterial caseinolytic protease*) como estratégia de tratamento para leucemia mieloide aguda (LMA). E neste trabalho foi observado o efeito citotóxico de inibidores de ClpP a células de LMA, o prejuízo a fosforilação oxidativa pela inibição do ClpP. Além disso,

em camundongos *knockdown* para o gene de ClpP foi observado a redução do crescimento e da viabilidade de células LMA, mostrando a importância dessa protease mitocondrial para a viabilidade celular durante o stress. Em Mehdad *et al.* (2016) foi discutido que o BTCI induziu a apoptose em adenocarcinoma mamário por danos a mitocôndria e stress oxidativo por meio da inibição ao proteassoma 20S por este inibidor.

Com os resultados existentes, só é possível atribuir a citotoxicidade do BTCI a inibição do proteassoma 20S (Mehdad *et al.* 2016). Mas, podemos instigar estudos a serem feitos sobre a possível inibição do ClpP por BTCI. Talvez os danos à mitocôndria apresentados em Mehdad *et al.* (2016) e Joanitti *et al.* (2010) não sejam gerados diretamente pela inibição do proteassoma 20S, mas como em Cole *et al.* (2015), podem ter influência da inibição da ClpP. O inibidor sintético de proteassoma, MG132, apresentou inibição contra a atividade de hidrólise da ClpP de *C. elegans* (Haynes C.M. *et al.* 2007), o que leva a questão, ‘o que poderia ser consequência da inibição do proteassoma 20S e o que poderia ser consequência da inibição da ClpP na redução da viabilidade celular?’ ‘Será que, os testes em camundongos *knockdown* para o gene ClpP terem apresentado uma redução no crescimento e na viabilidade celular de LMA, como visto em Cole *et al.* (2015), seriam indícios de que o funcionamento ineficiente de ClpP influencia na viabilidade celular de forma independente da inibição do proteassoma 20S?’ ‘Será que o inibidor de serinoprotease BTCI, também teria ação inibitória sobre essa protease mitocondrial que possui 14 sítios de serinoproteases (Culp e Wright 2017), ou a possível inibição da ClpP, além do proteassoma 20S, poderia influenciar os efeitos citotóxicos nas células de MCF-7?’

Estudos relatam a ortologia entre a ClpP de bactérias e eucariotos (Maurizi *et al.* 1990). Assim, espera-se que os inibidores de proteases possam ter efeitos semelhantes em seus ortólogos (Culp e Wright 2017). O BTCI apresentou um efeito inibidor do crescimento de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, reduzindo a sua taxa de crescimento em proporção ao aumento da concentração do inibidor. Outros inibidores de protease de plantas foram estudados como possíveis antimicrobianos (Kim *et al.* 2006; Backer 2009; Costa H. P. S. *et al.* 2014; Rehman S. 2016). Em Costa H. P. S. *et al.* 2014 a inibição do crescimento bacteriano por *JcTI*, um inibidor de tripsina extraído de pinhão-mansão, também foi proporcional ao aumento da concentração do inibidor, com exceção a *S. aureus* que foi completamente inibida em todas as concentrações de

inibidor testadas. Rehman S. 2016 ressalta sobre a correlação de inibidores de proteases em plantas apresentarem efeitos contra a resistência bacteriana e fúngica.

Algumas proteases intracelulares são importantes para viabilidade e a virulência de microorganismos (Gaillot *et al.* 2000). Regulação da produção e secreção de fatores de virulência, e o gerenciamento das respostas importantes ao stress para a sobrevivência no hospedeiro são funções atribuídas a algumas proteases intracelulares e que as tornam alvos de desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (Culp e Wright 2017). ClpP tem sido o complexo proteico mais estudado (Culp e Wright 2017). ClpP está envolvido com processos de regulação, divisão celular, tolerância ao stress, virulência, diferenciação morfológica e resistência a antibióticos (Culp e Wright 2017). A inibição da ClpP em *S. aureus* apresentou uma atenuação na produção de fatores de virulência, o que sugeriu uma atrativa estratégia de neutralização do patógeno para auxiliar o sistema imune do hospedeiro a combatê-lo (Bottcher T. e Sieber S. A. 2008). Mas seria a possível inibição de ClpP que explicaria o aparente efeito bacteriostático do BTCl? Não é possível responder ainda a estas perguntas, pela inexistência de estudos relacionados a estas duas proteínas associadas. Mas, vale ressaltar a importância dos estudos relacionados ao desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, assim como estudos de potenciais alvos para drogas anti-cancer, que podem estar atrelados com a ortologia existente entre os complexos proteicos bacterianos e os mitocondriais humanos.

VIII.II.v Referências Bibliográficas

ÁLVARES, Alice da Cunha M. *et al.* Bowman-birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds enhances the action of bradykinin-related peptides. *Molecules*, v. 19, n. 11, p. 17536-17558, 2014.

BAKER, R. L. *et al.* A maize trypsin inhibitor (ZmTIp) with limited activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of food protection*, v. 72, n. 1, p. 185-188, 2009.

BECKER, A. P. *et al.* First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil. *Epidemiology & Infection*, v. 140, n. 8, p. 1372-1375, 2012.

BÖTTCHER, Thomas; SIEBER, Stephan A. β -Lactones as specific inhibitors of ClpP attenuate the production of extracellular virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 44, p. 14400-14401, 2008.

BRASIL. Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o “Regulamento técnico para produtos com ação antimicrobiana” constante do anexo desta Resolução. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br> => Acesso em: 29 de janeiro de 2018.

CARVALHO, A. F. *et al.* BTCI enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 1, p. 149-154, 2008.

CHILOSI, G.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; BUZI, A.; NOBILE, M.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Antifungal activity of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor from wheat kernel. *Journal of Phytopathology*, v. 148, p. 477-481, 2000.

COLE, Alicia *et al.* Inhibition of the mitochondrial protease ClpP as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, v. 27, n. 6, p. 864-876, 2015.

COSTA, Helen Paula S. *et al.* JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. *Frontiers in microbiology*, v. 5, p. 5, 2014.

CULP, Elizabeth; WRIGHT, Gerard D. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of antibiotics*, v. 70, n. 4, p. 366, 2017.

FITZGERALD-HUGHES, Deirdre; DEVOCELLE, Marc; HUMPHREYS, Hilary. Beyond conventional antibiotics for the future treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: two novel alternatives. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 399-412, 2012.

FRANCO, Octavio L. *et al.* Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry*, v. 65, n. 1, p. 81-89, 2003.

GAILLOT, Olivier *et al.* The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, v. 35, n. 6, p. 1286-1294, 2000.

GIUDICI, A. M.; REGENTE, M. C.; CANAL, A. L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 881-888, 2000.

GOARD, C. A.; SCHIMMER, A. D. Mitochondrial matrix proteases as novel therapeutic targets in malignancy. *Oncogene*, v. 33, n. 21, p. 2690, 2014.

HAYNES, Cole M. *et al.* ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Developmental cell*, v. 13, n. 4, p. 467-480, 2007.

JOANITTI, Graziella Anselmo; AZEVEDO, Ricardo Bentes; FREITAS, Sonia Maria. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer letters*, v. 293, n. 1, p. 73-81, 2010.

KESSEL, Martin *et al.* Homology in Structural Organization Between *E. coli* ClpAP Protease and the Eukaryotic 26 S Proteasome. 1995.

KIM, Mi-Hyun *et al.* Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety “Golden Valley”. Biochemical and biophysical research communications, v. 346, n. 3, p. 681-686, 2006.

LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; MIGLIOLO, L.; SOUZA-FILHO, C. R.; GONÇALVES, E. G.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; AMARAL, A. C.; FRANCO, O. L. A Kunitz proteinase inhibitor from corms of *Xanthosoma blandum* with bactericidal activity. Journal of Plant Products, v. 74, p. 969-975, 2011.

MAURIZI, M. R. *et al.* Clp P represents a unique family of serine proteases. Journal of Biological Chemistry, v. 265, n. 21, p. 12546-12552, 1990.

MEHDAD, A. *et al.* A Bowman–Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. Cell death discovery, v. 2, 2016.

MULVEY, Michael R.; SIMOR, Andrew E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be?. Canadian Medical Association Journal, v. 180, n. 4, p. 408-415, 2009.

NGO, Linh T.; OKOGUN, Joseph I.; FOLK, William R. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. Natural product reports, v. 30, n. 4, p. 584-592, 2013.

RAMSAMY, Yogandree; MUCKART, David James Jackson; HAN, Khine Swe Swe. Microbiological surveillance and antimicrobial stewardship minimise the need for ultrabroad-spectrum combination therapy for treatment of nosocomial infections in a trauma intensive care unit: An audit of an evidence-based empiric antimicrobial policy. South African medical journal, v. 103, n. 6, p. 371-376, 2013.

REHMAN, Shazia *et al.* Structural and functional characteristics of plant proteinase inhibitor-II (PI-II) family. Biotechnology letters, v. 39, n. 5, p. 647-666, 2017.

SAVOIA, Dianella. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. Future microbiology, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

WANG, H. X.; NG, T. B. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Peptides, v. 27, p. 27–30, 2006.

YANG, B.; SUGIO, A.; WHITE, F. F. Os8N3 is a host disease susceptibility gene for bacterial blight of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103, p. 10503- 10508, 2006.

IX. Anexo 1

- Metodologia: simulação computacional

A metodologia a seguir é referente à simulação computacional “docking” para prever as inúmeras possibilidades de interação do BTCI com a molécula do proteossoma de levedura, realizada em colaboração com o aluno de doutorado Caio Souza, com anuência de seu orientador, Dr. Werner Treptow.

A estrutura cristalográfica do proteossoma (código PDB 1FNT) foi utilizada como receptor em uma série de cálculos de “docking” molecular com o BTCI. Inicialmente, a estrutura cristalográfica do BTCI foi complementada com átomos que faltavam, incluindo os hidrogênios, e foi submetida à dinâmica molecular em solução aquosa explícita com o programa NAMD a fim de minimizar a energia dessa estrutura. Foram escolhidas aleatoriamente 120 estruturas diferentes dos 6 ns finais dessa simulação para levar em consideração a flexibilidade inerente às proteínas.

Os cálculos de “docking” foram realizados em série, mantendo-se os átomos de hidrogênio, utilizando o programa *AutoDock Vina*. Cada simulação foi repetida com diferentes caixas de busca de modo a englobar a totalidade do proteossoma. As soluções com RMSD menores que 0,5 Å foram desconsideradas. O valor do parâmetro “exhaustiveness” foi fixado em 200 e foram coletadas as 50 melhores soluções de cada simulação. Após as simulações, foram consideradas as 50 melhores soluções para a interação de cada uma das estruturas do BTCI no proteossoma. As soluções de todas as simulações foram agrupadas e classificadas segundo os valores da energia de ligação fixada em até -15 kCal/mol, calculada segundo a distância do centro geométrico do proteossoma à superfície molecular.

X. Anexo 2

- Resumo submetido em congresso – SBBq 2018

Thermodynamics Parameters of the Interaction between 20S Proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* with a Black-eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor (BTCI) from *Vigna unguiculata*

Luisa Meneghetti¹, Azadeh Mehdad¹, Aisel Valle Garay¹, João Alexandre R. G. Barbosa¹ and Sonia Maria de Freitas¹

Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, DF – Brazil – 70910900.¹

Introduction: The Bowman-Birk Inhibitor named black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI) was isolated from *Vigna unguiculata* seeds. Bowman-Birk family of serine protease inhibitors has been described as a potent anticarcinogenic agent, part of which is a consequence of inhibition of the 20S proteasome. The proteasome is a multicatalytic enzymatic complex present in all eukaryotes responsible for protein degradation and, consequently, for the maintenance of cellular homeostasis. Proteasome inhibition decreases tumor progression by inducing apoptosis in cancer cells. BTCI was characterized as a potent anticarcinogenic agent on breast cancer cells mainly due to 20S proteasome inhibition. **Objectives:** In this work, thermodynamic parameters characterizing the BTCI-20S proteasome interaction were estimated by physical-chemical methods. **Materials and methods:** BTCI was purified by ion exchange chromatography and 20S proteasome was obtained by heterologous expression and purified by nickel affinity chromatography, followed by ion exchange chromatography. **Results and conclusions:** Inhibition assays of 20S proteasome proteolytic activity in the presence of BTCI at 31 °C, 34 °C and 46 °C were performed and K_i values were 2.72×10^{-5} M, 2.97×10^{-5} M, and 1.94×10^{-6} M, respectively. The thermodynamic parameters indirectly estimated by van't Hoff approximation were $\Delta H = 36745.6 \text{ cal.mol}^{-1}$, $\Delta S = 141.156 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ e $\Delta G = -5.319 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. Isothermal titration calorimetry assays were performed in order to calculate the thermodynamic parameters directly. Association constants, K_A , values at 25 °C and 30 °C were $4.73 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and $1.34 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectively. The thermodynamic parameters at same temperatures were, ΔH , $5.115 \times 10^6 \text{ cal.mol}^{-1}$ and $1.888 \times 10^5 \text{ cal.mol}^{-1}$, ΔS , $1.72 \times 10^4 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{deg}^{-1}$ and $660 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{deg}^{-1}$, and ΔG , $-10.6 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ and $-11.1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, respectively. All together these results showed that the interaction of BTCI with the 20S proteasome is endothermic ($\Delta H > 0$), entropically favorable ($\Delta S > 0$) and spontaneous ($\Delta G < 0$).

Key-words: Serine proteases inhibitors; 20S proteasome; Proteasome inhibitors.

Acknowledgements: CNPq, CAPES, FAPDF

- Comprovante de submissão de resumo



Luisa Meneghetti [Menu Principal](#) [Logoff](#)

SUBMISSÃO DE TRABALHOS

[Enviar Trabalho](#)

Certifique-se que você possui todos os dados necessários para efetuar a submissão de trabalhos(s).

Manutenção

Clique na coluna - **Opções** - para alterar ou remover os dados (incluindo autores) de trabalhos existentes.

Caso a situação de seu trabalho esteja como "ENVIO COMPLETO" significa que o envio do trabalho foi concluído com êxito e já está disponível para ser avaliado. Nesse caso você não terá mais a opção de excluí-lo.

Caso esteja como "ENVIO INCOMPLETO" você deve voltar ao último passo do envio e clicar em "FINALIZAR SUBMISSÃO" para que seu trabalho possa ser avaliado.

ID	Título	Área	Situação	Opções
00001	THERMODYNAMICS PARAM...	Biologia Estrutural	Envio completo	
ID	Título	Área	Situação	Opções

11 38155798
 congress@sbbq.org.br

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia
Molecular - SBBq

