

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

ESTUDO TERMODINÂMICO DA ESTABILIDADE DO
TRIPSINOGÊNIO E DA β -TRIPSINA E DE SUAS
INTERAÇÕES INTERDOMÍNIOS

Eustáquio Resende Bittar

Orientador: Prof. Dr Marcelo Matos Santoro

ICB – UFMG

Belo Horizonte – 2003

EUSTÁQUIO RESENDE BITTAR

***ESTUDO TERMODINÂMICO DA ESTABILIDADE DO
TRIPSINOGÊNIO E DA β -TRIPSINA E DE SUAS INTERAÇÕES
INTERDOMÍNIOS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Enzimologia e Físico-Química de Proteínas

Orientador: Prof. Dr Marcelo Matos Santoro

ICB – UFMG

Belo Horizonte 2003

*A minha querida e amada Joely
por ser minha vida e minha alegria*

AGRADECIMENTOS

A *Deus* que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida, principalmente nas horas que mais precisava e sempre colocou pessoas boas no meu caminho para me apoiar e ajudar neste percurso.

Ao Prof. Dr Marcelo Matos Santoro pela confiança em meu trabalho e contribuição na minha carreira profissional;

Ao Dr. Marcelo Porto Bemquerer pela amizade e pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho;

Ao Dr Edyr Rogana pelo apoio, credibilidade e colaboração;

Ao Prof Custódio Donizetti dos Santos e Benedito Lemos de Oliveira que me deram oportunidade no campo da pesquisa;

À amizade e companheirismo de Alexandre M.C. Santos durante toda a realização deste trabalho;

Ao amigo Jamil Silvano pela amizade e inestimável contribuição na realização deste trabalho;

Aos amigos do laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas “Prof Marcos dos Mares-Guia” Thiago, Vanderlei, Márcio, Léo, Roberta, Jaqueline, Malu, Janete, Ellen, Ana Carolina, Simone, Ana Luíza, Poliana, José Maurício, André, Calouro, Maria Cristina, Clarice e Márcio Tadeu, pela amizade, agradável convivência e ajuda nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho;

Aos Amigos do Curso de Bases: Thiago, Luiz, Maria Cristina, Roberta, Ana, Júnia, Roseane, Iriani, Ariane, Michele, Alexia, Patrícia, pela convivência e por propiciar momentos alegres;

Aos amigos Neide e Rodrigo pela convivência e apoio nos momentos difíceis;

Aos Amigos de Belo Horizonte, Aparecida, Herbert, Felipe, Júnior e Maria Luíza, Dizinha, Wellington, Camila e Rafael, Eunice, Djavan, Lucas e Leandro, que muito nos ajudaram e nos ensinaram a tornar nossas vidas cada vez melhor e mais alegres;

Aos companheiros de república João Henrique, Webel e Jairo pelos excelentes momentos de convivência.

À minha família, meus pais *Issac e Marilda* e meus irmãos *Elias, Mário, Issac e Ássima*, que sempre me incentivaram a conquistar novos horizontes, por sempre estarem ao meu lado me amparando nos momentos mais difíceis e por me fazer tão feliz. A vocês agradeço por tudo que sou;

Ao Sr Joaquim e D Elisa; Jonisy e Ricardo; Josely e Jairo; Cíntia, Mario Henrique, Flávia e Ricardo; Mariângela, Guilherme e Vinícius; Reinaldo, Gustavo e Rafael, pelo apoio, amizade e bons momentos.

A todos os amigos cuja presença e convívio fortaleceram a concretização do meu ideal, tornando mais agradável o trabalho realizado;

Ao CNPq pelo fornecimento da bolsa de estudo;

A **todos** **meus** **sinceros** **agradecimentos!**

Excluído: ¶

... Quem deve ser levado em conta não é aquele que censura, que denuncia os tropeços dos fortes ou as limitações dos beneméritos...

“O valor pertence ao homem que está de fato na arena, cujo rosto está desfigurado pela poeira, pelo suor e pelo sangue;

que luta valentemente e torna a falhar;

que conhece os grandes entusiasmos, as grandes dedicações;

que se empenha numa causa justa e que quando vence, conhece finalmente a vitória das grandes realizações

e, na pior das hipóteses se fracassa, será enquanto se aventura magnificamente, de modo que seu lugar nunca será junto aquelas almas timoratas que não conhecem a vitória nem a derrota”

Theodore Roosevelt

Índice

	Pág
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Estabilidade termodinâmica de proteínas	17
1.2. Estabilidade de domínios de proteínas	18
1.3. Termodinâmica	19
1.4. Técnicas para o estudo da estabilidade termodinâmica das proteínas	20
1.4.1. Microcalorimetria	21
1.4.2. Parâmetros avaliados pelo DSC	22
1.5. Serino proteases	24
1.5.1. Características	24
1.5.2. Síntese	25
1.5.3. Estrutura	28
1.5.3.1. Aspectos estruturais da enzima	28
1.5.3.1.1 Estrutura Primária	29
1.5.3.1.2 Estruturas secundária e terciária	30
1.5.3.2. Domínios da enzima	33
1.5.4. Mecanismos de ativação	35
1.5.5. Mecanismo de ação	36
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivo geral:	39

	Pág
2.2. Objetivos específicos:	39
3. MÉTODOS	40
3.1. Obtenção do Tripsinogênio e da β -Tripsina	41
3.2. Verificação da pureza de Tripsinogênio por HPLC, FPLC e espectrometria de massa e verificação de pureza da β -Tripsina por espectrometria de massa.	42
3.2.1. Preparação das amostras aplicadas	42
3.2.1.1. Modo de operação Especificações do experimento	43
3.3. Atividade amidásica	43
3.4. Diálise	44
3.5. Titulação do centro ativo	44
3.6. Estudo microcalorimétrico de Tripsinogênio e β -Tripsina considerando diferentes tipos de interações	45
3.6.1. Desnaturação térmica da β -Tripsina e Tripsinogênio em meio ácido.	47
3.6.2. Desnaturação da β -Tripsina e Tripsinogênio em pH 3,0 na presença de desnaturante e solventes orgânicos	48
3.6.2.1. Agente desnaturante	48
3.6.2.2. Comportamento da β -Tripsina em pH 3,0 em solventes orgânicos (Álcoois)	49
3.6.3. Determinação da estabilidade da proteína em variados valores de pH.	49

	Pág
3.6.4. Determinação da concentração ótima para se trabalhar com monômeros no microcalorímetro através da análise da relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ e avaliação do efeito da concentração na formação de dímeros.	49
3.6.5. Determinação do T_m , ΔC_p , ΔH , $\Delta S_{(T_m)}$ e $\Delta G_{(D)}$ de β -Tripsina em solvente aquoso.	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Teste de pureza de Tripsinogênio comercial por FPLC, HPLC e espectrometria de massa.	52
4.2. Purificação de β -Tripsina.	55
4.2.1. Cálculo das porcentagens relativas das isoformas obtidas na cromatografia.	56
4.2.1.1. Cálculo das porcentagens relativas de cada isoforma	57
4.3. Teste de pureza de β -Tripsina por espectrometria de massa.	57
4.4. Atividade amidásica de isoformas de Tripsina.	59
4.4.1. Atividade amidásica específica de Tripsina e de beta e alfa Tripsina.	60
4.5. Titulação do centro ativo	60
4.6. Microcalorimetria de Tripsinogênio e β -Tripsina em meio ácido	61
4.7. Efeitos das variações de pH sobre o processo de desnaturação térmica	65

	Pág
4.7.1. Efeito do pH sobre a relação ΔH calorimétrico e ΔH vant'Hoff ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$)	66
4.7.2. Cálculo de $\Delta G_{(D)}$ e ΔC_p em função do T_m	69
4.7.3. Influência de estabilizante (sorbitol) e de desestabilizantes de proteínas (cloridrato de guanidina) sobre o processo de desnaturação térmica.	71
4.7.4. Análise calorimétrica para β -Tripsina em solventes orgânicos	79
4.7.4.1. Influência do aumento da cadeia carbônica na variação do T_m	79
4.7.4.2. Cálculo da variação do ΔH_{cal} em função do aumento da cadeia carbônica na função álcool.	82
4.7.4.3. Comparação do $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ em relação ao aumento da cadeia carbônica de álcoois.	83
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES	97
7. PERSPECTIVAS	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

Lista de Figuras e Tabelas

	Pág
Figura 1: Superposição estrutural de cinco serino proteases e de seus sítios ativos em Quimiotripsina bovina (amarelo), Kalicreína porcina (rosa), Tripsina bovina (azul), Tonina de rato (cinza) e Elastase porcina (verde).	25
Figura 2: Conversão de Tripsinogênio a isoformas de Tripsina.	26
Figura 3: Indicação dos pontos de clivagem na passagem de Tripsinogênio para as isoformas ativas de Tripsina.	27
Figura 4: Estrutura primária do tripsinogênio em disposição esquemática	28
Figura 5: Seqüência dos 229 aminoácidos do Tripsinogênio bovino.	29
Figura 6: Estrutura terciária de β -Tripsina exibindo sua tríade catalítica Ser (195) (azul), His (57) (vermelho) e Asp. (102) (amarelo). N-terminal (azul claro) e C-terminal (laranja).	30
Figura 7: Esquema das α hélices presentes na estrutura de β -Tripsina	31
Figura 8: Esquema das folhas β antipararelas presentes na estrutura de β -Tripsina	31
Figura 9: Esquema das folhas β antipararelas formando dois beta barris presentes na estrutura de β -Tripsina. As figuras A e B comparam as formas de beta barris em rotação de 90°.	32
Figura 10: Estrutura tridimensional da β -Tripsina apresentando folhas β antipararelas (A, azul), α hélice (A, vermelho) e <i>turns</i> (A,B, amarelo).	32
Figura 11: Estrutura tridimensional da β -Tripsina com seus dois domínios. Domínio I (azul) e domínio II do resíduo (vermelho)	33

Figura 12: Pontes dissulfeto na β -Tripsina. Primeiro domínio (azul) possui uma ponte dissulfeto (amarelo). Segundo domínio (cinza) possui quatro pontes dissulfeto (vermelho). Os dois domínios são ligados por uma ponte dissulfeto (ponte interdomínio) (amarelo-vermelho).	34
Figura 13: Sistema de funcionamento do DSC.	46
Figura 14: Figura ilustrativa dos dados obtidos através do microcalorímetro onde: ΔH_{cal} : Variação de entalpia calorimétrica, C_{pN} : capacidade calorífica da forma nativa da proteína, C_{pD} : capacidade calorífica da forma desnaturada da proteína, T_m : temperatura de transição.	46
Figura 15: FPLC de Tripsinogênio Bovino comercial SIGMA (T-1143 LOTE 40K7653)	52
Figura 16: Cromatografia por HPLC de Tripsinogênio comercial Bovino SIGMA (T-1143 LOTE 40K7653)	53
Figura 17: Espectrometria de massa de Tripsinogênio	54
Figura 18: Cromatografia padronizada para separação de β -Tripsina bovina.	55
Figura 19: Cálculo da área total do cromatograma de purificação de isoformas de Tripsina.	56
Figura 20: Espectrometria de massa de β -Tripsina	58
Figura 21: Atividade amidásica de isoformas de Tripsina. Linha preta: detecção a 280nm e linha vermelha: detecção a 405nm.	59
Figura 22: Atividade específica de Tripsina comercial e de suas isoformas	60

- Figura 23:** Curva de desnaturação de β -Tripsina contra tampão β -Alanina (β -Alanina 50mM; CaCl_2 20mM; pH 3,00). Resultado obtido, sem nenhum processamento, por Calorimetria Diferencial de Varredura. Linha de base (verde): corrida feita tampão contra Tampão, *scan* (vermelho): corrida teste usada para avaliar a termoestabilidade protéica, *rescan* (azul): corrida seqüencial a corrida teste, usada para avaliar a reversibilidade protéica. **62**
- Figura 24:** Curva de desnaturação de β -Tripsina contra tampão β -Alanina (β -Alanina 50mM; CaCl_2 20mM; pH 3,00). Resultado obtido por Calorimetria Diferencial de Varredura. A linha preta representa os dados processados após subtração da linha de base e a normalização da concentração de proteína e a linha vermelha representa o ajuste dos dados ao modelo matemático de transição de dois estados. **64**
- Figura 25:** Curva de pH para análise de estabilidade através do T_m . **65**
- Figura 26:** Relação entre ΔH_{cal} e ΔH_{vH} de β -Tripsina, Tripsinogênio, entre pH 2,0 a 4,2. β -Tripsina (preto), Tripsinogênio (azul). **67**
- Figura 27:** ($\Delta H_{\text{cal}}/\Delta H_{\text{vH}}$) valores de β -Tripsina em pH 3,70 em função de concentração de proteína (de 0,05 a 2,30 mg/ml) e tampão β -Alanina (β -Alanina 50,0 mM, com CaCl_2 20,0 mM, pH 3,70). **68**
- Figura 28:** ΔH por T_m para o Tripsinogênio em pH 3,00 e diferentes concentrações de Sorbitol (0,5 M; 1,0 M; 1,5 M) e de Cloreto de Guanidina (0,3 M 0,5 M). A inclinação da reta é $\Delta C_p = 2,60 \pm 0,35 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$. **72**

- Figura 29:** ΔH por T_m para β -Tripsina em diferentes pH (3,00; 3,20; 2,90; 2,80; 2,70; 2,50), concentrações de Sorbitol (1,0M; 2,0M), concentrações de Cloridrato de Guanidina (0,5M; 1,0M), concentrações de Uréia (0,5M), e tampões (Acetato, Glicina, β -Alanina). A inclinação da reta é $\Delta C_p = 2,50 \pm 0,07 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. **73**
- Tabela 1:** Resultados obtidos das análises calorimétricas do Tripsinogênio em tampão 50,0 mM de β -Alanina; 20,0mM de CaCl_2 , variando-se pH, e concentrações de Cloridrato de guanidina (GndCl) e Sorbitol. **75**
- Tabela 2:** Resultados obtidos das análises calorimétricas da β -Tripsina em tampão β -Alanina 50,0 mM; CaCl_2 20,0 mM, variando-se pH, e concentrações de Gnd HCl, sorbitol, NaCl, e uréia. **76**
- Figura 30:** ΔG de desnaturação de Tripsinogênio ($\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1}$), em função da temperatura ($^\circ\text{C}$). **77**
- Figura 31:** ΔG de desnaturação de β -Tripsina ($\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1}$), em função da temperatura ($^\circ\text{C}$). Os valores a 25°C foram obtidos por Günther, (1998), por desnaturação com uréia, analisando os dados como sendo uma transição de dois estados. **78**
- Figura 32:** Fórmula estrutural dos álcoois utilizados nos experimentos calorimétricos **79**
- Figura 33:** Corridas de β -Tripsina em soluções alcoólicas com diferentes álcoois, com concentração de 10%v/v em tampão 50,0mM β -Alanina, 20mM CaCl_2 pH 3,0 mostrando-se a variação no valor de T_m . **80**

	Pág
Figura 34: Relação entre o n° de carbonos na cadeia da função álcool com o Tm. Sendo que N 0 (Tampão 50mM β-alanina, 20mM CaCl ₂ , pH 3,0), N 1 (N 0 + 10% Metanol), N 2 (N 0 + 10% Etanol), N 3 (N 0 + 10% Propanol), N 4 (N 0 + 10% Butanol).	81
Tabela 3: Variação do Tm em função do aumento do número de carbonos na série homóloga de álcoois.	82
Figura 35: Relação entre o n° de carbonos na cadeia da função álcool com o ΔH _{cal} . Sendo que N 0 (Tampão 50mM β-alanina, 20mM CaCl ₂ , pH 3,0), N 1 (N 0 + 10% Metanol), N 2 (N 0 + 10% Etanol), N 3 (N 0 + 10% Propanol), N 4 (N 0 + 10% Butanol)	83
Figura 36: Variação da relação ΔH _{cal} /ΔH _{vH} em álcoois com número de carbonos crescentes.	84
Figura 37: Ciclo termodinâmico de β-Tripsina	95

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DE PROTEÍNAS

Atualmente, a termodinâmica vem auxiliando as pesquisas à resolver ou mesmo elucidar com maior clareza diversas questões importantes para a bioquímica, como os processos de enovelamento e desenovelamento das proteínas.

As proteínas possuem atividades biológicas dependentes das estruturas e arranjos tridimensionais das suas cadeias polipeptídicas, e esses arranjos ocorrem devido ao enovelamento direcionado da seqüência linear dos aminoácidos, fazendo dessa forma que as proteínas passem de uma estrutura desordenada e sem função para uma estrutura bem definida, compacta e muitas vezes ativa.

Apesar do grande interesse, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no enovelamento das proteínas. Segundo Finn et al., (1992) o domínio desse conhecimento poderá ser utilizado em diversas áreas, como por exemplo: na predição da estrutura tridimensional de seqüências lineares de aminoácidos provenientes das informações geradas pelo projeto Genoma; na alteração da seqüência natural das proteínas, aumentando estabilidade, atividade enzimática, e outras atividades biológicas das proteínas; na montagem de novas proteínas com capacidade enzimática não existentes na natureza; na melhor eficiência da recuperação de proteínas recombinantes, direcionando assim, seu enovelamento e desenvolvimento de tratamentos eficazes para doenças genéticas do tipo fibrose cística; certos tipos de demência e alguns tipos de doenças neurodegenerativas que parecem estar associadas ao enovelamento de proteínas (Carrell & Lomas, 1997, Qu et al., 1997, Krakauer et al., 1998).

Sabendo-se que a conformação nativa das proteínas pode ser facilmente desfeita e que a cadeia polipeptídica pode se desenovelar por meio de processos físicos (temperatura e pressão) ou químicos (variação do pH e adição de substâncias desnaturantes) (Privalov, 1997), torna-se importante entender os mecanismos relacionados à estabilidade das proteínas.

A estabilidade é importante para manter a estrutura nativa da proteína para que ela não adquira outras conformações que seja diferente da sua conformação nativa, mas também esta estabilidade não pode ser tão rígida a ponto de impedir mudanças conformacionais ou ajustes necessários as funções das proteínas (Becktel & Schellman, 1987).

1.2. ESTABILIDADE DE DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS

A estabilidade das proteínas é baseada nas forças que direcionam o dobramento das cadeias polipeptídicas, como as interações a curtas distâncias, densidade de empacotamento ótimo e os efeitos entrópicos devido ao colapso hidrofóbico das cadeias polipeptídicas (Dill, 1990, Jaenicke, 1987, 1991, Richards, 1992, Matthews, 1995, Fersht, 1995, Peng et al., 1995, Dill et al., 1993, Chan et al., 1995).

A via de dobramento das proteínas se inicia com as interações a curtas distâncias, sendo que estas interações podem permanecer ou não na estrutura nativa da proteína. Após a consolidação da estrutura secundária nativa, que ocorre imediatamente após as interações intermoleculares ultrapassarem a energia térmica, ocorre a formação de parte da estrutura terciária nativa caracterizada por dobramento e baixa superfície hidrofóbica, sendo este intermediário conhecido como estado de “*Molten globule*”. Esse

estado de *Molten globule* é acompanhado pela exclusão de água do interior dos subdomínios e dobramento dos domínios (Jaenicke & Lauffer, 1969).

É necessário o conhecimento e o entendimento dos detalhes da cinética de dobramento das proteínas. Mas é evidente a dificuldade de se entender os mecanismos desse dobramento, visto que, além da heterogeneidade do estado desnaturado existe ainda, a incerteza sobre a natureza física e a existência de estados intermediários de dobramento (Baldwin, 1995, Laurents & Baldwin, 1998, Dill & Chan, 1997).

Focalizando proteínas de dois ou mais domínios, quatro áreas se tornam de especial interesse, como: o mecanismo de dobramento e desdobramento; a caracterização de estados intermediários (*Molten globule*); os processos de reconhecimento e dobramento dos domínios através de chaperoninas e as reações de dobramento e empacotamento devido a perdas de domínios com subsequente agregação.

Em resumo, pode-se observar que existem intermediários no processo de dobramento das proteínas, que a cinética de dobramento não é sincronizada e que os dobramentos intermediários são estabilizados pelas interações terciárias que lembram aquelas encontradas no estado nativo da proteína (Kim & Baldwin, 1982, 1990, Baldwin, 1991, 1995, Barrick & Baldwin, 1993).

1.3. TERMODINÂMICA

O processo reversível de enovelamento e desenovelamento (dois estados) das proteínas podem ser estudados por vários métodos sensíveis capazes de detectar mudanças na estrutura da molécula.

Entretanto, torna-se necessário obter dados sobre entalpia e entropia dos processos relacionados a enovelamento e desenovelamento das proteínas, bem como a respeito da capacidade calorífica desses estados, a sua dependência a diferentes condições de solventes e sob variações de temperatura em diferentes níveis.

Segundo Jackson & Brandts, (1970) e Tishchenko & Gorodkov (1979), o processo de desnaturação em dois estados que considera apenas os extremos, pode ser utilizado para análise de proteínas pequenas e de estruturas tridimensionais simples. A análise termodinâmica permite considerar o processo de desnaturação como sendo uma simples transição entre dois estados macroscópicos (nativo e desnaturado), em contraste, para as grandes proteínas cuja temperatura induz um desenovelamento em domínios simples isolados e este processo não pode ser visto como sendo um processo simples em dois estados (Privalov & Potekhin, 1986).

1.4. TÉCNICAS PARA O ESTUDO DA ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DAS PROTEÍNAS

O estudo da estabilidade termodinâmica de proteínas pode ser realizado através de técnicas físico-químicas que modificam a estrutura tridimensional da forma nativa da proteína, podendo induzir desde pequenas alterações até a perda completa das estruturas terciárias e secundárias (proteína completamente desnaturada). Os métodos físico-químicos utilizados para a indução do processo de desnaturação podem ser por variação da temperatura, pressão, pH e presença de certos aditivos desnaturantes como uréia e o cloreto de guanidina (Privalov, 1996). Estas modificações estruturais podem ser monitoradas pelas técnicas de Espectrofotometria (UV), Fluorescência, Dicroísmo

Circular (CD), Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Martins & Santoro (1999), Martins (1999) e Martins et al., (2003) realizaram estudos termodinâmicos do processo de desnaturação do Tripsinogênio e desnaturação de α , β e Ψ -Tripsina em pH 3,00, monitoradas por espectrofotometria e dicroísmo circular. Brumano et al. (2000) estudou o processo de desnaturação da β -Tripsina em pH 2,80 utilizando UV e CD. Tamura & Privalov (1997) avaliou o custo entrópico da associação de proteínas utilizando CD, NMR, e DSC. Hilser et al., (2001) avaliaram o efeito da variação do pH sobre o processo de desnaturação de proteínas através da fluorescência.

É importante ressaltar que as técnicas utilizadas para o estudo termodinâmico apresentam características particulares que devem ser levadas em consideração ao se realizar as análises, e que são ferramentas que apresentam relevância indiscutível no estudo da estabilidade termodinâmica das proteínas.

Entre essas técnicas a microcalorimetria surge como uma ferramenta sensível e adequada para se trabalhar na análise do enovelamento e desenovelamento de proteínas, pois, permite trabalhar com pequenas quantidades de amostras e reagentes e obter diretamente os parâmetros termodinâmicos de interesse.

1.4.1. Microcalorimetria

A microcalorimetria é uma técnica sensível capaz de gerar dados de variação de energia livre ($\Delta G_{(D)}$), entalpia ($\Delta H_{(D)}$), entropia ($\Delta S_{(D)}$) e de capacidade calorífica

(ΔC_p). Estes parâmetros são associados a uma dada modificação conformacional da proteína, induzida por variação de temperatura.

Para este tipo de estudo, necessita-se de um microcalorímetro especial, que possui características técnicas adequadas para a aquisição de dados experimentais com soluções aquosas de proteínas em concentrações relativamente baixas. O aparelho possui características que integram Hardware e Software que permitem aquisição, análise e deconvolução dos dados (Brandts et al., 1989).

1.4.2. Parâmetros avaliados pelo DSC

A análise dos dados experimentais (C_p x Temperatura) permite avaliar dois tipos de variação de entalpia (Privalov & Potekhin, 1986):

- a) A variação da entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) representa a área sob a curva de desnaturação, descontado a contribuição da variação de capacidade calorífica (ΔC_p) entre a forma nativa e a forma desnaturada da proteína. Este é um parâmetro modelo-independente e as unidades são cal/mol de proteína (monômero), mas também pode ser expresso como cal/mol dímero, se necessário.

- b) A variação da entalpia de vant'Hoff (ΔH_{vH}) reflete o formato da curva de desnaturação e descreve a dependência da constante de equilíbrio (K_D) em função da temperatura. É um parâmetro modelo-dependente e as unidades são cal/mol de unidades cooperativas, responsáveis pelas transições

conformacionais observadas. Um importante parâmetro experimental é a razão ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$), que representa a razão:

$$\frac{Cal}{mol\ Proteína} \Big/ \frac{Ca}{mol\ unidades\ cooperativas} = \frac{mol\ unidades\ cooperativas}{mol\ proteína\ (monômero)}$$

Para um monômero, uma transição de dois estados é descrita por um valor ($\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$) = 1,0, isto é, o monômero é a unidade cooperativa responsável pela transição conformacional. No caso de um dímero, a razão ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$) = 0,5, isto é, temos 0,5 mol de unidade cooperativa por mol de monômero. Para um monômero com dois domínios de tamanhos semelhantes, quando desacoplados, devem gerar uma razão ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$) = 2,0, isto é, detectaríamos 2 moles de unidades cooperativas por mol de monômero.

Lembrando que a tripsina tem dois domínios fortemente acoplados em sua estrutura, pode-se descrever a desnaturação desta proteína como:

$$\Delta G_D = \Delta G_{Dom\ 1} + \Delta G_{Dom\ 2} + \Delta G_{Interação}$$

Onde: ΔG_D = variação de energia livre de desnaturação da proteína

$\Delta G_{Dom\ 1}$ = variação de energia livre de desnaturação da proteína do domínio1 (desacoplado)

$\Delta G_{Dom\ 2}$ = variação de energia livre de desnaturação da proteína do domínio2 (desacoplado)

$\Delta G_{Interação}$ = variação de energia livre de interação interdomínios.

1.5. SERINO PROTEASES

O Tripsinogênio e a Tripsina, que fazem parte da família das serino proteases, constituem um modelo interessante para o estudo microcalorimétrico, visto que suas estruturas tridimensionais já são conhecidas, os seus processos de desnaturação são altamente reversíveis (desnaturações térmicas) e suas formas nativas apresentam grande estabilidade térmica.

1.5.1 Características

A Tripsina, Quimiotripsina, Elastase e Trombina fazem parte da super família das enzimas homólogas da Quimiotripsina (Figura 1). Essas enzimas apresentam dois domínios similares, provavelmente originados de duplicação gênica divergente contendo a tríade catalítica e a fenda oxianiónica em seu centro ativo (Lesk & Fordman, 1996). O primeiro domínio compreende os resíduos 1 a 105 e o segundo os resíduos restantes.

Vários processos fisiológicos são relacionados às atividades dessas enzimas como, por exemplo, a digestão (Barret, 1970), coagulação sanguínea (Daive et al., 1991), fertilização (Baba et al., 1989), ativação da resposta imune via complemento (Reid, 1986) e outros processos como enfisemas (Watorek et al., 1988), metástase de

tumores (Henderson et al., 1992) e artrites (Froelich et al., 1993). Essas enzimas estão presentes em vírus, bactérias, plantas e animais.



Figura 1: Superposição estrutural de cinco serino proteases e de seus sítios ativos nas respectivas enzimas: Quimotripsina bovina (amarelo), Kalicreina porcina (rosa), Tripsina bovina (azul), Tonina de rato (cinza) e Elastase porcina (verde).

1.5.2. Síntese

A Tripsina bovina é uma enzima proteolítica produzida nas células acinares do tecido pancreático, na forma de seu zimógeno, o Tripsinogênio, e tem atividade proteolítica restrita (Bode et al., 1976). Seguindo sua secreção no intestino, o Tripsinogênio é convertido para a forma ativa da Tripsina, reação esta catalisada pela

enteroquinase e pela própria Tripsina β , recém formada (autólise) (Bode et al., 1976) (Figura 2).

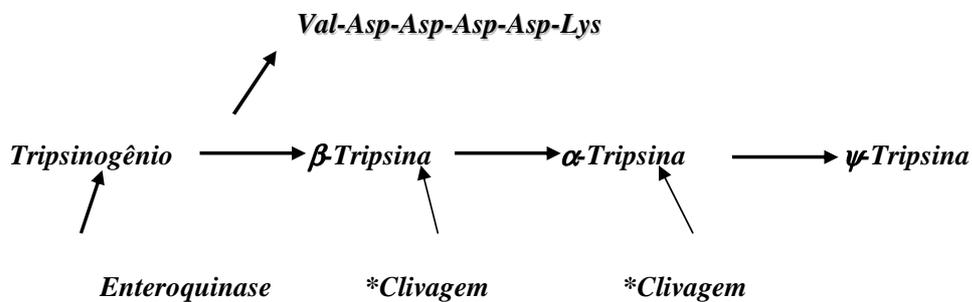


Figura 2: Conversão de Tripsinogênio em isoformas de Tripsina.

*A β -Tripsina recém formada também atua na ativação junto a enteroquinase e nas clivagens adicionais.

A ativação consiste na clivagem da ligação peptídica entre os aminoácidos Lys 15 e Ile 16 (nomenclatura baseada na seqüência do Quimiotripsinogênio) no lado carboxílico o que promove a saída do hexapeptídeo N terminal Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys... (Davie & Neurath, 1955, Desunelle & Fabre, 1955).

O recém formado α -amino grupo da Ile 16 forma uma ponte salina com Asp 194 (Perkins, 1980) introduzindo, assim, significativas modificações estruturais do Tripsinogênio. No Tripsinogênio o sítio de especificidade e o espaço oxaniônico estão imprópriamente formados, mas, mesmo assim apresenta uma atividade residual de aproximadamente 1,0% da atividade da β -Tripsina. Essa nova conformação assumida

pela β -Tripsina faz com que ela se torne cem vezes mais ativa (Robinson et al., 1973) que o Tripsinogênio.

Seguindo o processo de autólise do Tripsinogênio para a formação da β -Tripsina, a seqüência peptídica desta sofre uma clivagem adicional entre os resíduos Lys 145 e Ser 146 (Figura 3), que origina a formação de uma segunda forma ativa da Tripsina, conhecida como α -Tripsina (Schroeder & Shaw, 1968). A α -Tripsina formada possui basicamente a mesma estrutura da forma β , sendo a diferença baseada na menor porcentagem de estruturas em hélice (Foucal et al., 1974a). Contudo, apresenta-se 40% menos ativa que a β -Tripsina frente ao substrato amidásico Benzoyl-DL-arginine p-Nitroanilide (BAPNA) e nenhuma diferença significativa frente a substratos ésteres como acetato de p-nitrofenila, em pH ótimo (Foucal et al., 1974b).

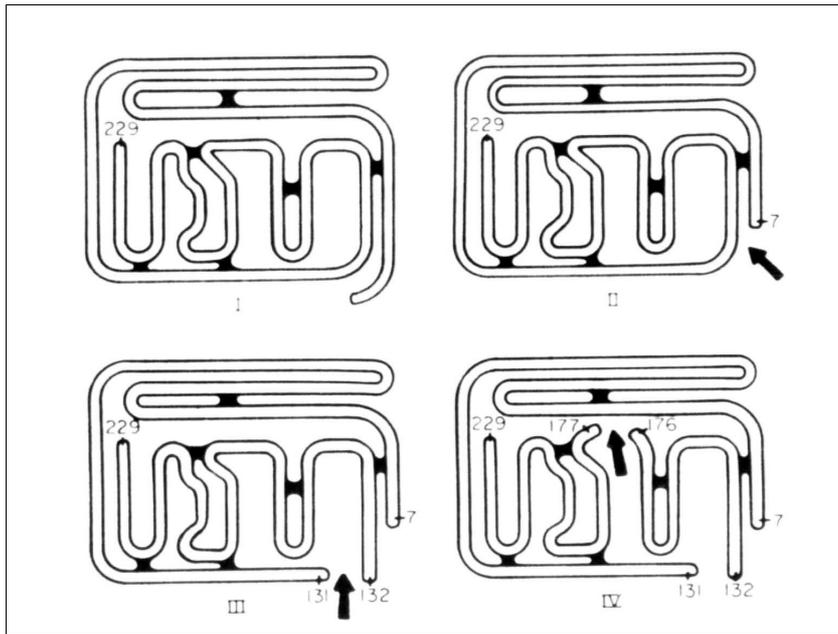


Figura 3: Indicação dos pontos de clivagem na passagem de Tripsinogênio para as isoformas ativas de Tripsina. I- tripsinogênio, II- Beta Tripsina , III Alfa Tripsina , IV pseudotripsina (psi) (Keil, 1971).

Segundo Smith & Shaw (1969), uma nova clivagem entre os resíduos Lys 169 e Ser 170 resulta na forma ψ -Tripsina, que possui três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfeto. Essa nova forma é menos específica que as outras formas e possui uma maior atividade esterásica que amidásica (Foucalt et al., 1974 a,b)

Uma quarta forma ativa da Tripsina observada após clivagem entre os resíduos Lys 155 e Ser 156 foi purificada, caracterizada e denominada δ -Tripsina (Teixeira, 1977).

1.5.3. Estrutura

1.5.3.1 Aspectos estruturais da enzima

O Tripsinogênio é constituído de 229 aminoácidos e as isoformas de Tripsina de 223 aminoácidos (Figura 4 e 5).

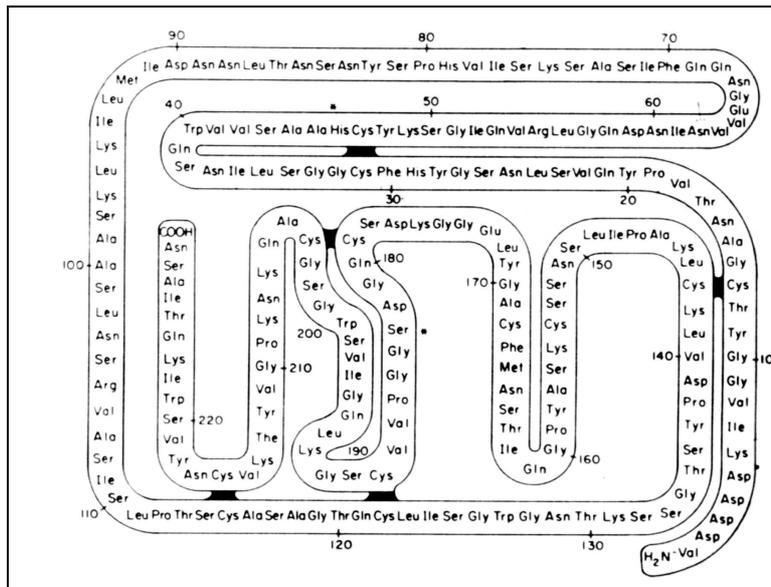


Figura-4 Estrutura primária do tripsinogênio em disposição esquemática (Keil 1971).

1.5.3.1.1.Estrutura Primária

<u>Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys</u> Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Gly Ala Asn Thr Val	27*
Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn	46
Ser Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Lys Ser Gly Ile Gln Val Arg Leu	65
Gly Gln Asp Asn Ile Asn Val Val Glu Gly Asn Glu Gln Phe Ile Ser Ala Ser Lys	84
Ser Ile Val His Pro Ser Tyr Asn Ser Asn Thr Leu Asn Asn Asp Ile Met Leu Ile	103
Lys Leu Lys Ser Ala Ala Ser Leu Asn Ser Arg Val Ala Ser Ile Ser Leu Pro Thr	122
Ser Cys Ala Ser Ala Gly Thr Gln Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Asn Thr Lys Ser	141
Ser Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Val Leu Lys Cys Leu Lys Ala Pro Ile Leu Ser Asp	160
Ser Ser Cys Lys Ser Ala Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Ser Asn Met Phe Cys Ala Gly	179
Tyr Leu Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val	198
Cys Ser Gly Lys Leu Gln Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Gly Cys Ala Gln Lys Asn	217
Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Asn Tyr Val Ser Trp Ile Lys Gln Thr Ile	236
Ala Ser Asn	239

Figura 5: Sequência dos 229 aminoácidos do Tripsinogênio bovino. **Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys** (verde): Hexapeptídeo liberado na passagem de Tripsinogênio à β -Tripsina. **His (57)** (vermelho), **Asp (102)** (amarelo), **Ser (195)** (azul): Aminoácidos que participam da tríade catalítica.

*Numeração baseada no quimiotripsinogênio.

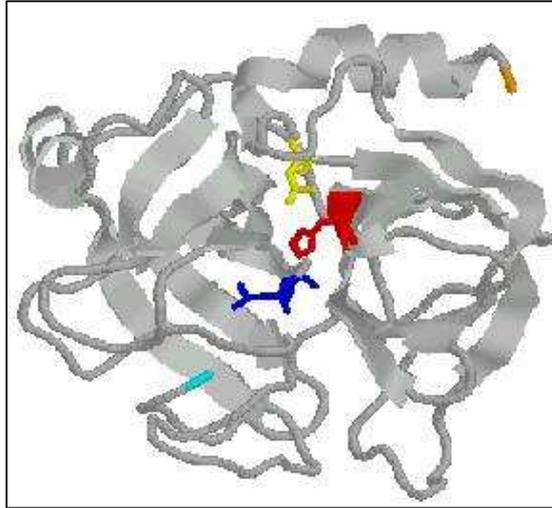


Figura 6: Estrutura terciária de β -Tripsina exibindo sua tríade catalítica **Ser (195)** (azul), **His (57)** (vermelho) e **Asp. (102)** (amarelo). **N-terminal** (cor cyan) e **C-terminal** (laranja) (5ptp-Protein Data Bank).

1.5.3.1.2. Estruturas secundária e terciária

No que se refere à estrutura tridimensional da Tripsina e do Tripsinogênio pode-se observar, por métodos cristalográficos, semelhança entre as duas formas. Segundo Huber & Bode (1978) e Bode et al. (1983), ambas apresentam um arranjo tridimensional globular e suas estruturas secundárias apresentam 85% de identidade e são caracterizadas por estruturas de α hélices (Figura 6 e 7) e folhas β antiparalelas (Figura 8) que juntas se organizam formando dois beta barris (Figura 9 A, B). As Figura 10 A e B mostram a estrutura tridimensional da Tripsina apresentando folhas β antipararelas (A), α hélice (A) e *turns* (A, B).

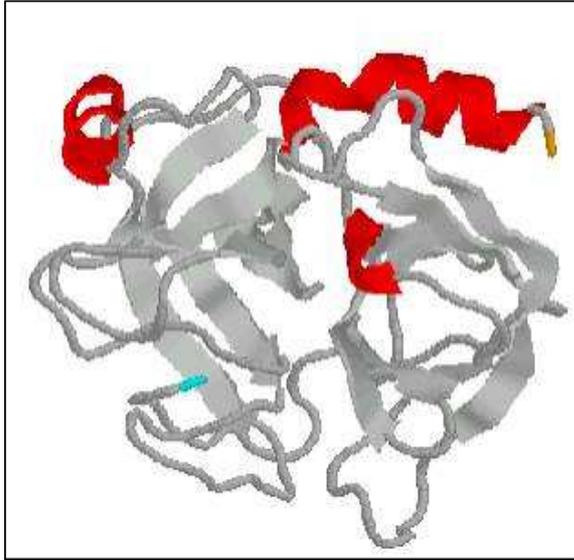


Figura 7: Esquema das α hélices (vermelho) presentes na estrutura de β -Tripsina (5ptp- Protein Data Bank)

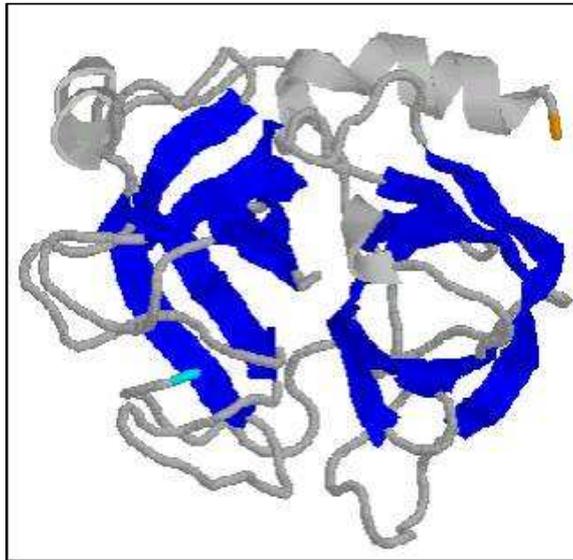


Figura 8: Esquema das folhas β antipararelas presentes na estrutura de β -Tripsina (5ptp- Protein Data Bank)

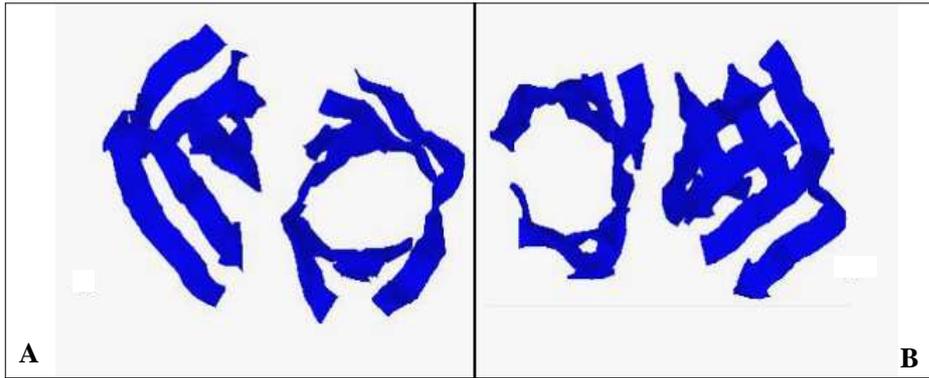


Figura 9: Esquema das folhas β antipararelas formando dois beta barris presentes na estrutura de β -Tripsina. As figuras A e B comparam as formas de beta barris em rotação de 90° . (5ptp- Protein Data Bank)

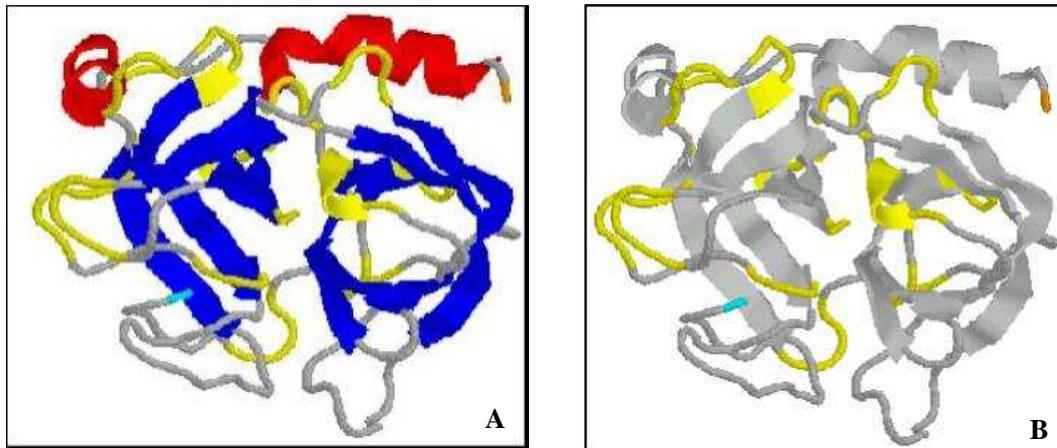


Figura 10: Estrutura tridimensional da Tripsina apresentando folhas β antipararelas (A, azul), α hélice (A, vermelho) e *turns* (A, B, amarelo). (5ptp- Protein Data Bank)

1.5.3.2 Domínios da enzima

A Tripsina é uma proteína globular possuindo dois domínios de estruturas similares, sendo que o primeiro domínio vai do 1º aminoácido ao 105º e o segundo do 106º ao 223º, e estes são unidos assimetricamente e entre eles esta localizado o sítio catalítico (Figura 11).

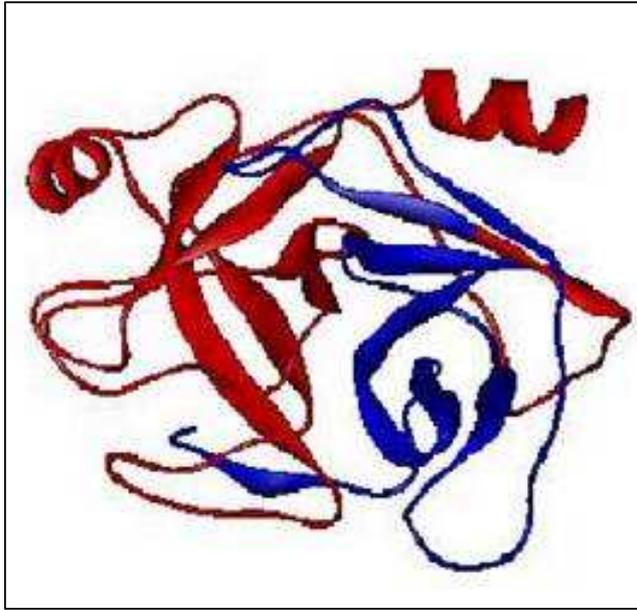


Figura 11: Estrutura tridimensional da Tripsina com seus dois domínios. Domínio I do resíduo 1-105 (azul), domínio II do resíduo 106-223 (vermelho). (5ptp-Protein Data Bank)

Tanto a β -Tripsina quanto o Tripsinogênio são constituídos, respectivamente, por uma cadeia polipeptídica sendo essa cadeia interligada por seis pontes dissulfeto

(Figura 12) localizadas nos resíduos Cys 22-Cys 157, Cys 42-Cys 58, Cys 128-Cys 232, Cys 136-Cys 201, Cys 168-Cys 182 e Cys 191-Cys 220 (Hartley, 1960, Walsh & Neurath, 1964). Note que a ponte dissulfeto (22-157) interliga os dois domínios, enquanto que as pontes dissulfeto restantes são intradomínios. O primeiro domínio possui uma ponte dissulfeto (Cys 42-Cys 58), outras quatro estão no segundo domínio.

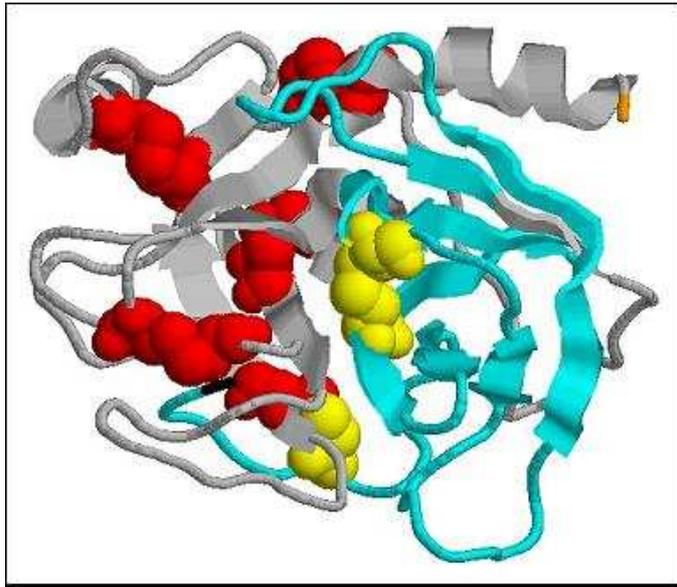


Figura 12: Pontes dissulfeto na Tripsina. Primeiro domínio (azul) possui uma ponte dissulfeto (amarelo). Segundo domínio (cinza) possui quatro pontes dissulfeto (vermelho). Os dois domínios são ligados por uma ponte dissulfeto (ponte interdomínio) (amarelo-vermelho) (5ptp Protein Data Bank).

O Tripsinogênio possui dois sítios específicos para ligação do íon cálcio, o primeiro de baixa afinidade $pKCa^{2+} = 1,8$ que é formado por dois aminoácidos os **Asp** 13 e 14, e o outro de alta afinidade $pKCa^{2+} = 3,4$ que é formado por um grupo de

aminoácidos e moléculas de água (**Glu70, Asn72, Val75, Gln80, H₂O 711 e 714**). A Tripsina possui apenas um sítio de ligação ao cálcio, pois, o primeiro sítio de ligação é perdido com a clivagem do hexapeptídeo N-terminal (Bode & Schawager, 1975) e (Chiancone, 1985). O cálcio estabiliza a estrutura e diminui a produção de fragmentos inativos (Abita et al., 1969). Segundo Robinson et al. (1973), isso poderia explicar a menor atividade catalítica do Tripsinogênio (1% da atividade da Tripsina).

1.5.4. Mecanismos de ativação

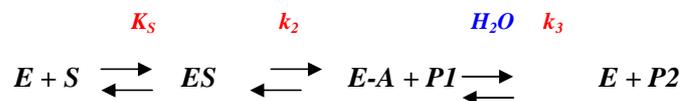
Trabalho realizado por McDonald & Kunitz (1942), demonstrou *in vitro* que a Tripsina produzida a partir de Tripsinogênio por ativação lenta em pH 8,0 a 4°C na presença de cloreto de cálcio, produz principalmente a forma β e na ausência de cálcio produz a forma α .

Em relação à tríade catalítica e fenda oxianiônica do centro ativo, observa-se que na Tripsina a tríade é formada por arranjo preciso das cadeias laterais dos resíduos Asp, His e Ser e a fenda oxianiônica por dois grupos NH da cadeia polipeptídica, enquanto que no Tripsinogênio a fenda oxianiônica encontra-se deslocada e a tríade catalítica apresenta-se orientada na posição definitiva (Blowm et al., 1976, Kraut, 1977, Nakagawa & Umeyama, 1984, Fehlhammer, 1977, Kossiakov et al., 1977). O aumento da atividade enzimática da β -Tripsina em relação ao Tripsinogênio reflete uma otimização da orientação dos grupamentos que formam o centro ativo envolvidos na catálise.

1.5.5. Mecanismo de ação

Sabendo-se que a função biológica da Tripsina é hidrolisar polipeptídio na digestão, é interessante observar como ocorre o mecanismo de ação da enzima. A Tripsina catalisa a clivagem de ligações peptídicas internas envolvendo carboxilas de resíduos de aminoácidos básicos, lisina e arginina, sendo o mecanismo de ação da β -Tripsina semelhante ao da α -Tripsina (Inagami, 1972).

Segundo Inagami (1972), o modelo cinético geral proposto é o seguinte:



Onde:

$P1$ e $P2$ são produtos da reação

S é o substrato

E é a enzima livre

$E - A$ é o intermediário acil-enzima

K_S = constante de equilíbrio ;

k_2 e k_3 = constantes cinéticas

Neste modelo, uma cadeia polipeptídica (ou substrato sintético) se liga à Tripsina por resíduo de arginina ou lisina para formar o complexo de Michaelis (ES). A tríade catalítica Asp 102, His 57 e Ser 195, posiciona-se e polariza a cadeia lateral da Ser 195 para o ataque nucleofílico no átomo de carbono da ligação peptídica ou do grupo éster. Em seguida um intermediário com o carbono tetraédrico é estabilizado pelo espaço oxianiónico. Um próton é transferido do resíduo Ser 195 para o resíduo His 57 e o átomo O^{γ} do resíduo Ser 195 forma uma ligação covalente com o substrato, quebrando

a ligação e liberando produto P1 que difunde do centro ativo. Uma molécula de água entra no sítio ativo, e promove-se a hidrólise do acil-enzima, gerando P2 e regenerando a enzima livre.

Pelo exposto, este trabalho visa utilizar as formas já conhecidas, por cristalografia, de Tripsina e Tripsinogênio e associá-las a parâmetros termodinâmicos para se fazer inferências de como discretas modificações estruturais podem alterar a estabilidade termodinâmica das proteínas.

Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas (LEFQP) *Prof. Marcos Mares-Guia* e objetiva desacoplar termodinamicamente os domínios dessas proteínas visando avaliar as contribuições separadas e combinadas (desacopladas e acopladas) destes dois domínios à estabilidade termodinâmica destas serino-proteases, possibilitando assim, avaliar a contribuição termodinâmica da interação interdomínio para o processo de ativação do zimogênio.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Analisar a estabilidade termodinâmica da isoforma β -Tripsina e do Tripsinogênio em meio ácido sob condições experimentais que permitam o estudo termodinâmico das interações interdomínios dessas proteínas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a influência do pH sobre a estabilidade termodinâmica de Tripsinogênio e de β -Tripsina
- Verificar a influência de agentes desnaturantes e solventes orgânicos sobre estabilidade termodinâmica de Tripsinogênio e de β -Tripsina.
- Verificar a influência dessas variáveis experimentais sobre o grau de desacoplamento termodinâmico entre os domínios da β -Tripsina e do tripsinogênio.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DO TRIPSINOGENÍO E DA β -TRIPSINA

O Tripsinogênio foi obtido de amostra comercial SIGMA (T-1143 LOTE 40K7653) e a β -Tripsina a partir de Tripsina comercial Bovina (SIGMA T8253 LOTE 125HO676) por purificação cromatográfica conforme descrito por Schroeder & Shaw (1968) e Higaki & Light (1986).

Para a purificação utilizou-se 200,0 mg de Tripsina comercial bovina (Sigma) dissolvida em 10,0 mL de tampão Tris-HCl pH 7,1 (0,1M Tris-HCl, 0,02M Cloreto de cálcio, 0,1M Cloreto de Sódio e 1,0 mM de Benzamidina). A solução foi conservada em banho de gelo até o momento do uso.

A Tripsina bovina dissolvida em tampão Tris-HCl pH 7,1 foi eluída com o mesmo tampão (modo isocrático) em coluna com a resina SE-SEPHADEX C-50 (110,0 x 1,0 cm; volume 332,0 cm³) com fluxo constante de 0,120 mL/min. As frações coletadas utilizando coletor automático (Pharmacia-LKB Frac 100) foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV 160-A) a 280 nm e posteriormente à espectrometria de massa (item 3.2) para avaliação da pureza das frações (picos). Cada *pool* de fração teve avaliado a sua atividade amidásica (item 3.3).

3.2. VERIFICAÇÃO DA PUREZA DE TRIPSINOGÊNIO POR HPLC E FPLC E ESPECTROMETRIA DE MASSA, E VERIFICAÇÃO DE PUREZA DA β -TRIPSINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.

A cromatografia do Tripsinogênio foi realizada em FPLC, com a coluna SUPERDEX-75, com fluxo de 250 μ L/min e em HPLC com a coluna ULTRAHIDROGEL TM-250 com fluxo de 800 μ L /min.

A espectrometria de massa foi realizada no Centro Nacional de Genética (CENARGEN), pelo Dr. Carlos Block, utilizando o espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS (VOYAGER DE-STR, APPLIED BIOSYSTEMS FOSTER –CITY, CA).

As amostras testadas por espectrometria de massa foram:

- Tripsinogênio SIGMA, SIGMA (T-1143 LOTE 40K7653)
- β -Tripsina bovina purificada.

3.2.1. Preparação das amostras aplicadas:

-As amostras aplicadas foram exaustivamente dializadas a fim de se retirar o excesso de sal que poderia estar contido na amostra. E em seguida foram liofilizadas;

-As amostras foram ressuspensas em 5,0 μ L de 50% de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoroacético, e logo em seguida foram sonicadas por 15 minutos;

-Alíquotas de 0,5 μ L foram aplicadas na placa de aplicação e deixou que a placa secasse a temperatura ambiente;

-Subseqüentemente, 0,3µL de solução de matriz (1% w/v de Ácido α -ciano-4-hidroxicinamico em 50% de acetonitrila, 0,1% v/v de acido trifluoroacetico) foi aplicado na amostra seca e deixou-se novamente a placa secar ;

3.2.1.1. Modo de operação e especificações do experimento

Modo de operação: Linear

Polaridade: positiva

Voltagem de aceleração: 25000 V

Faixa de aquisição de dados: 3000-28000 Da

3.3. ATIVIDADE AMIDÁSICA

A atividade amidásica foi realizada utilizando metodologia descrita por Ascenzi et al. (1991) e substrato N α -Benzoyl-dl-Arginine-p-nitroanilide (D-L-BAPNA).

Alíquota de 50 µL de cada fração coletada foi acrescida de 2,9 mL de tampão Tris-HCl pH 8,15 (0,1M Tris-HCl, 0,02 M Cloreto de cálcio e $9,0 \times 10^{-4}$ M D-L BAPNA), incubada por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, 300 µL de ácido acético 60% (v/v) foram acrescentados no intuito de interromper a atividade enzimática e então a leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro Shimadzu UV 160-A a 410 nm.

3.4. DIÁLISE

As frações selecionadas, após cromatografia por SE SEPHADEX C-50 e avaliação da atividade amidásica, foram submetidas à diálise por 24 horas (trocas de solução a aproximadamente seis horas) à 4°C em membranas com limite de exclusão de 6000 – 8000 Da, frente HCl 1,0 mM pH 3,0. As amostras dialisadas foram liofilizadas e armazenadas à - 20°C.

3.5. TITULAÇÃO DO CENTRO ATIVO

A titulação do centro ativo das amostras da enzima foi executada segundo metodologia descrita por Dias (1986) com modificações.

Neste método, a β -Tripsina catalisa a hidrólise do NPGb (4-nitrofenil-4-guanidinobenzoato). A primeira etapa da catálise é mais rápida que a segunda o que torna possível a detecção espectrofotométrica da enzima acilada em um comprimento de onda de 410 nm.

Para a realização da titulação utilizou-se cubeta de referência com tampão Veronal (0,1 M de Veronal, pH 8,3, 20mM de CaCl_2) e cubeta amostra contendo tampão Veronal acrescido de Tripsina. Adotou-se o valor de 40.000 e 16.595 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o coeficiente de extinção molar (ϵ) da β -Tripsina e 4-Nitro fenol pH 8,3 respectivamente, comprimento de onda de 410 e 280 nm para o 4 Nitrofenol e β -Tripsina, respectivamente, e as leituras foram registradas a cada cinco segundos. A fórmula empregada para os cálculos foi a seguinte:

$$[\text{Centro ativo}] \% = \frac{\Delta A_{280} / 40.000}{\Delta A_{410} / 16.595 \times f} \times 100 \%$$

Onde: **f** = fator de diluição da enzima

3.6. ESTUDO MICROCALORIMÉTRICO DE TRIPSINOGENIO E β -TRIPSINA CONSIDERANDO DIFERENTES TIPOS DE INTERAÇÕES

OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS MICROCALORIMÉTRICOS POR DSC DO TRIPSINOGENIO E β -TRIPSINA

O DSC é um aparelho (Figura 13) que possui duas câmaras ou células adiabáticas, onde são colocadas as amostras referência (R) e teste (Sample / S), possuem volume aproximado de 0,7 mL e operam em pressão constante.

O microcalorímetro fornece o ΔH indiretamente, visto que o aparelho mede a quantidade de calor absorvida ou liberada pela amostra (Figura 13).

A Figura 14 mostra um esquema de como o processo de desnaturação térmica de proteína é registrado. A área total sobre a curva corresponde à somatória da capacidade calorífica do estado nativo da proteína; variação de entalpia do processo de desnaturação e capacidade calorífica do estado desnaturado da proteína. Portanto, a variação da capacidade calorífica é igual à área total menos área referente as capacidades caloríficas das proteínas nativa e desnaturada.

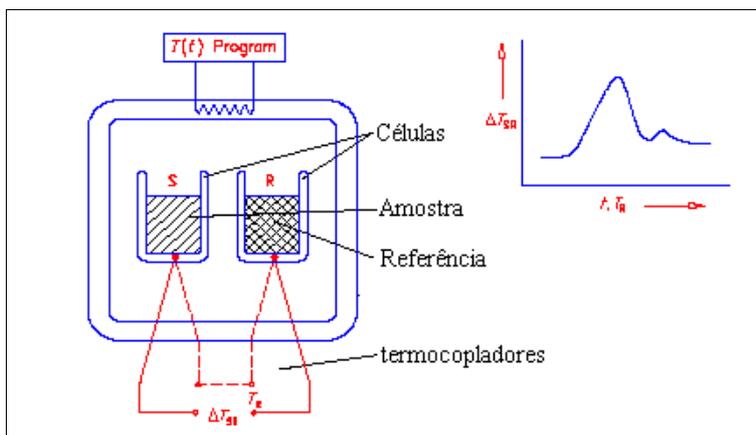


Figura 13: Sistema de funcionamento do DSC.

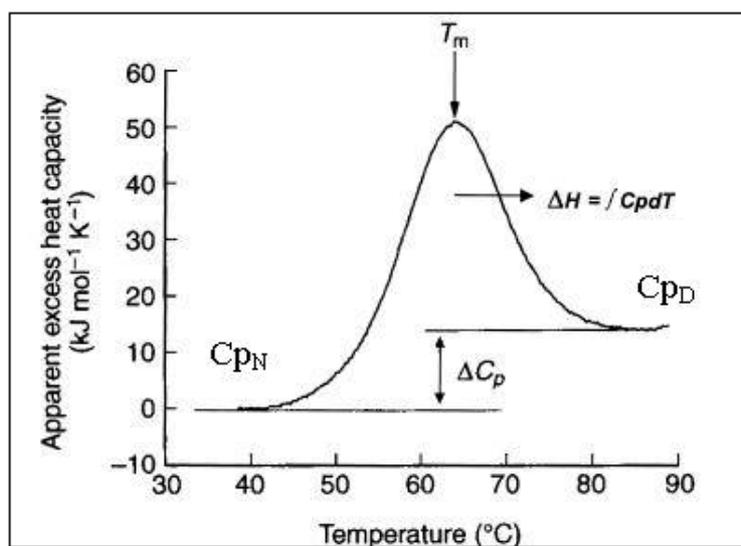


Figura 14: Figura ilustrativa que mostra os dados obtidos através do microcalorímetro onde: ΔH_{cal} : Variação de entalpia calorimétrica, C_{pN} : capacidade calorífica da forma

ativa da proteína, C_{pD} : capacidade calorífica da forma desnaturada da proteína, T_m : temperatura de transição.

3.6.1. Desnaturação térmica da β -Tripsina e Tripsinogênio em meio ácido.

O estudo microcalorimétrico da desnaturação térmica das isoformas em pH 2,0 - 3,5 foi realizado conforme metodologia descrita por Privalov & Potekhin, (1986), e Freire et al., (1992).

Para a realização do estudo microcalorimétrico utilizou-se o aparelho VP-DSC MicroCal (VP-DSC Microcalorimeter Microcal[®]), o software padrão DA-2 para a aquisição e análise dos dados.

Para análise em meio ácido, as amostras de Tripsina ressuspendidas em tampão β -Alanina pH 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,25 e 3,5 (50,0mM β -Alanina, 20,0mM CaCl_2), de concentração aproximada de 1,0 mg/mL, determinada por espectrofotometria a 280nm, foram submetidas a um processo de deaeração por 30 minutos e posteriormente, aplicadas no DSC MicroCal. As corridas foram realizadas com velocidade de varredura de 60°C por hora (*Scan rate* 60), ou seja, a temperatura nas células aumenta de 1,0 °C / min. Os dados foram analisados no programa de análise de dados Origin[®] DSC. Os dados obtidos foram subtraídos de uma linha de base de água contra água ou tampão contra tampão (β -Alanina nos pH correspondentes) seguido da normalização da velocidade de varredura e da concentração de proteína.

A preparação da amostra aplicada no calorímetro seguiu os seguintes procedimentos:

- Dissolução da proteína em tampão;

- Determinação da concentração através de método espectrofotométrico para ajustar concentração sempre para 1,0 mg/mL;
- Degasificação da solução protéica e do tampão da célula de referência durante 30 min exceto para soluções tampão que contenham álcool, neste caso o tampão foi degasificado antes de se adicionar o álcool;
- Antes de se aplicar às amostras no calorímetro cada célula foi lavada com água miliQ com aproximadamente 100 vezes o volume da câmara que é de 0,7 mL.

3.6.2. Desnaturação da β -Tripsina e Tripsinogênio em pH 3,0 na presença de desnaturante e solventes orgânicos

A microcalorimetria da β -Tripsina e do Tripsinogênio com agente desestabilizante e solventes orgânicos foi realizada conforme metodologia descrita abaixo:

3.6.2.1. Agente desnaturante

Para a realização desse estudo com agente desnaturante utilizou-se o cloridrato de guanidina nas concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75 M em tampão β -Alanina pH 3,00 (50,0 mM β -Alanina, 20,0 mM CaCl_2).

3.6.2.2. Comportamento da β -Tripsina em pH 3,0 em solventes orgânicos (Álcoois)

Para se desenvolver a microcalorimetria da β -Tripsina em soluções alcoólicas utilizou-se os seguintes solventes orgânicos de índice cromatográfico (SIGMA[®]): solução de metanol; etanol; 1-propanol; butanol, todos 10% v/v em tampão 50,0 mM β -Alanina, 20,0mM CaCl₂ pH 3,00. A solução tampão foi filtrada, deaerada e sonicada durante 50 minutos para se retirar as bolhas, e só então foram adicionados o álcool e a proteína e feito em seguida a medida da concentração espectrofotometricamente, ajustando a solução protéica para 1,0 mg/ml.

3.6.3. Determinação da estabilidade da proteína em variados valores de pH.

Foram realizadas corridas no microcalorímetro variando o pH na faixa de 2,0 até 4,2 e na faixa de temperatura de 293 a 348 K. Os tampões utilizados foram KCl, Acetato de Sódio, e Glicina contendo sempre 50,0 mM do composto tamponante e 20,0 mM de CaCl₂.

3.6.4. Determinação da concentração ótima para se trabalhar com monômeros no microcalorímetro através da análise da relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ e avaliação do efeito da concentração na formação de dímeros.

Para esta verificação aplicou-se no aparelho concentrações variando desde 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/ml de β -Tripsina Bovina em tampão Glicina pH 3,7 (50,0 mM Glicina e 20,0 mM CaCl_2), as concentrações foram avaliadas por espectrofotometria a 280 nm.

3.6.5 Determinação do T_m , ΔC_p , ΔH , $\Delta S_{(T_m)}$ e $\Delta G_{(D)}$ de β -Tripsina em solvente aquoso.

Para determinação de tais parâmetros foi necessário realizar várias corridas com valores de pH variando desde 2,0 a 4,2 e outras com pH fixo, porém, com a adição de perturbantes como, por exemplo, sorbitol (1,0 a 2,0 Mol/L); Cloreto de Guanidina (0,5 a 1,0 Mol/L); Uréia (0,5 Mol/L). Em algumas corridas foram adicionados sais como, por exemplo, NaCl para poder variar a força iônica da solução. Todas essas corridas forneceram dados para o cálculo da T_m , ΔC_p e ΔH e $\Delta G_{(D)}$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. TESTE DE PUREZA DE TRIPSINOGÊNIO COMERCIAL BOVINO POR FPLC, HPLC E ESPECTROMETRIA DE MASSA.

No teste de pureza do Tripsinogênio por FPLC (Figura 15) pode-se observar que a amostra comercial apresentava um grau de pureza satisfatório, apesar do aparecimento de um pequeno “ombro” que pode ser observado no início da saída da amostra da coluna.

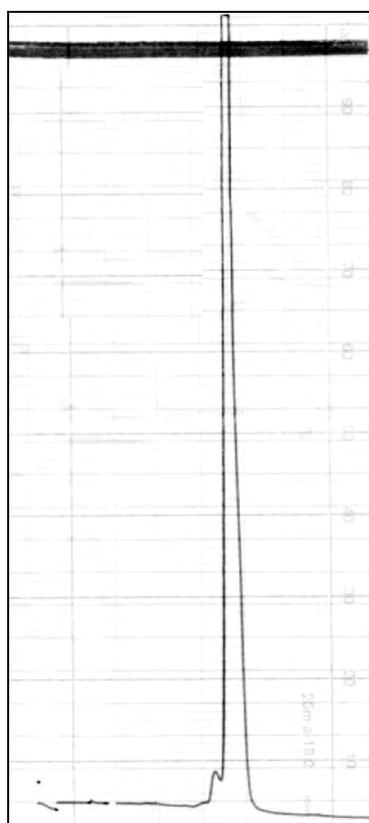


Figura 15: FPLC de Tripsinogênio Bovino comercial SIGMA (T-1143 LOTE 40K7653)

Para visualizar melhor a presença do possível contaminante, uma análise por HPLC foi realizada. Como se pode notar na Figura 16, o ombro que foi visualizado no perfil do FPLC não pode ser mais detectado no perfil do HPLC.

A fim de comprovar que as amostras estavam realmente livres de pequenos peptídeos foi realizada uma análise de pureza através de espectrometria de massa (MALDI-TOF).

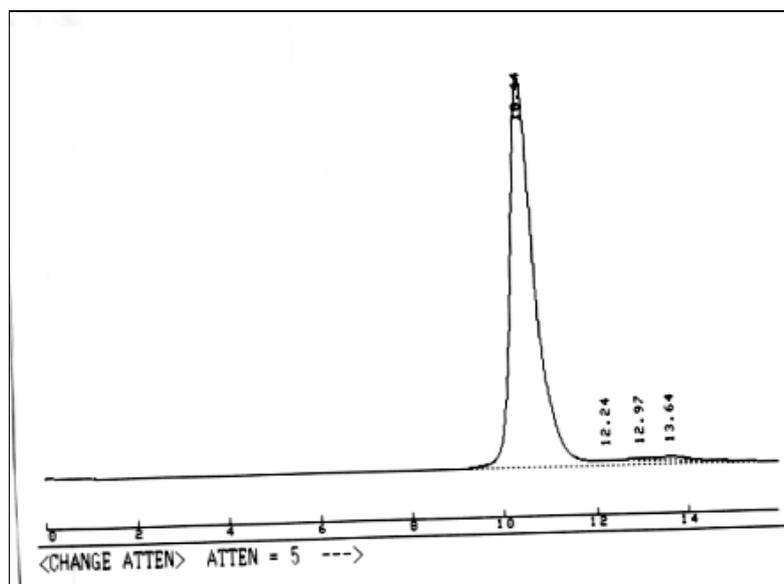


Figura 16: Cromatografia por HPLC de Tripsinogênio comercial Bovino SIGMA (T-1143 LOTE 40K7653)

Na espectrometria de massa do Tripsinogênio (Figura 17) pode se notar a presença de cinco picos. Os mais representativos em relação à intensidade do sinal foram os picos de Mr 23951.48 Da; 13775.09 Da; 11982.74 Da. Picos com sinal abaixo de 10% de intensidade e com pequena massa molecular não foram considerados como impurezas potenciais para o experimento calorimétrico.

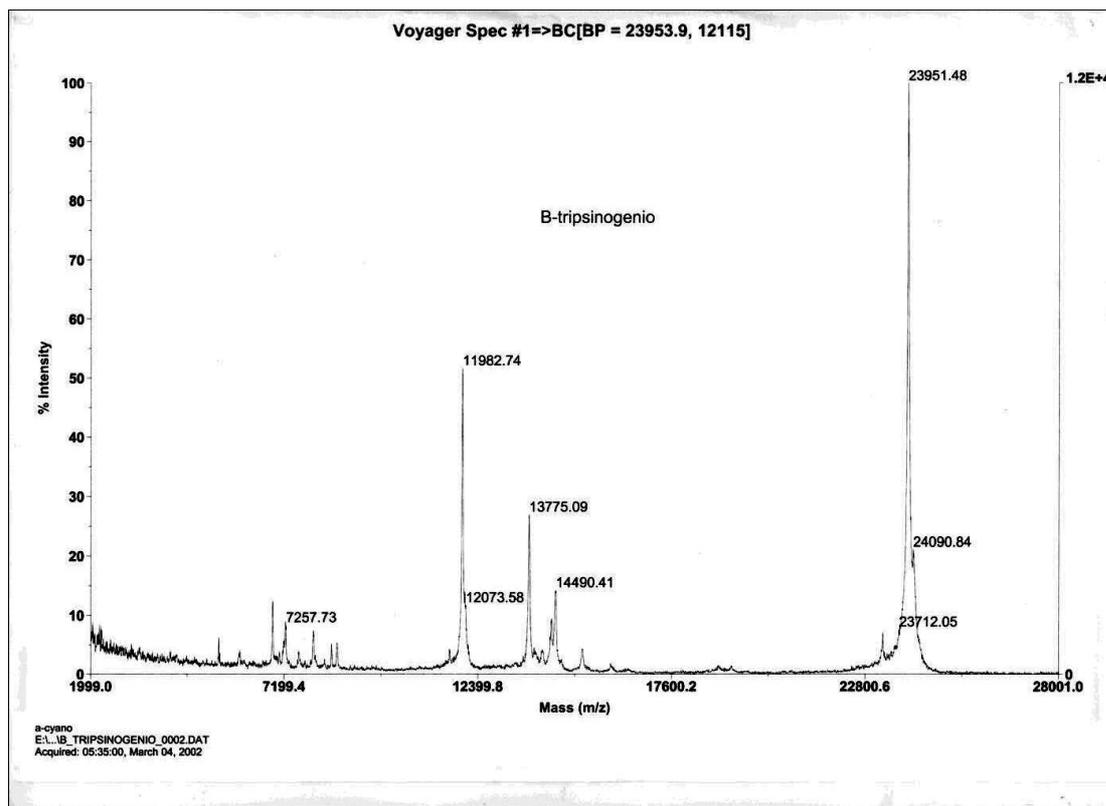


Figura 17: Espectrometria de massa (MALDI_TOF) de Tripsinogênio.

4.2. PURIFICAÇÃO DE β -TRIPSINA.

Após a realização da cromatografia por troca iônica pode observar que as isoformas α e β -Tripsina (Figura 18) foram separadas por aproximadamente 45,0 mL de tampão. Observou-se também pelo cromatograma, que a isoforma α -Tripsina teve uma separação satisfatória da isoforma ψ -Tripsina, porém a resolução entre estas isoformas não foi total.

As isoformas γ , δ e τ não foram obtidas pela purificação cromatográfica por ser a isoforma β -Tripsina o objetivo de separação. A purificação cromatográfica foi realizada em 15 dias.

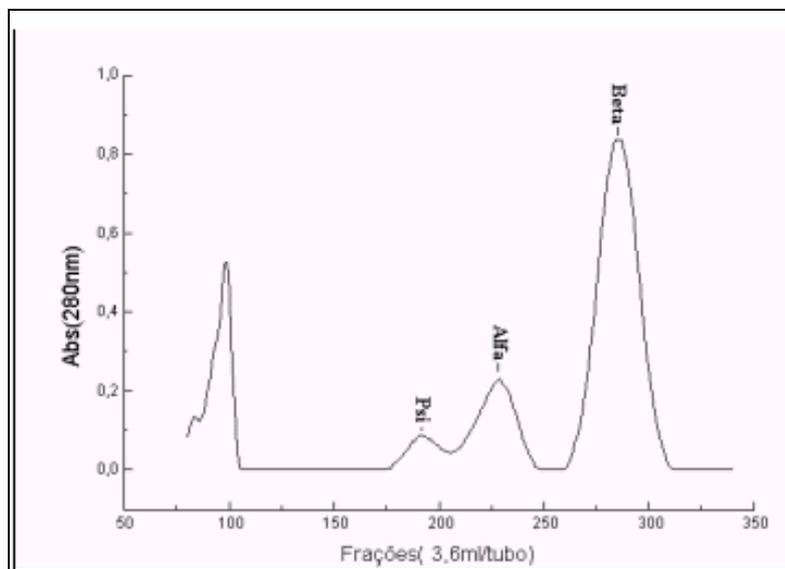


Figura 18: Cromatografia padronizada para separação de β -Tripsina bovina.

4.2.1. Cálculo das porcentagens relativas das isoformas obtidas na cromatografia.

Para se conhecer as quantidades que cada isoforma representava em relação ao material aplicado na coluna, utilizou-se método matemático. Para isso, integrou-se a área sob as curvas dos *pools* de cada isoforma e comparou-se as áreas de cada uma com a área do cromatograma (Figura 19). Deste modo obteve-se as relações em porcentagem de cada isoforma. Todos o procedimentos desde a plotagem do cromatograma até o cálculo das áreas foram realizados com o programa Origin scientific 4.0[®].

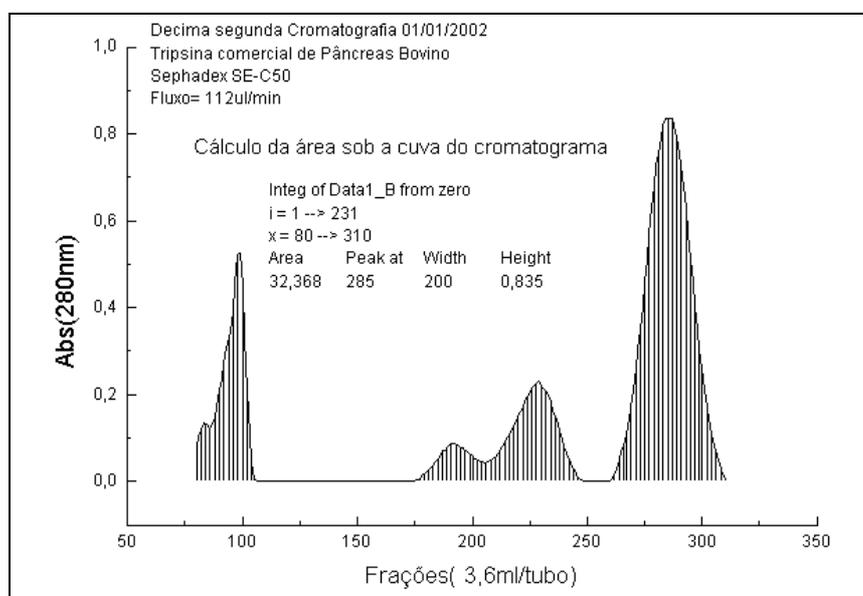


Figura 19: Cálculo da área total do cromatograma de purificação de isoformas de Tripsina.

4.2.1.1 Cálculo das porcentagens relativas de cada isoforma

A partir da área total de 32.368 calculou-se a área de cada isoforma como descrito abaixo:

- Beta (19.676)
- Alfa (5.091)
- Psi (1.617)
- Gama, Delta e Zeta (5.984).

Área total do cromatograma.....100%

Área da isoforma..... X%

Portanto, a percentagem relativa de cada isoforma é:

- β -Tripsina: 60,8%
- α -Tripsina: 15,7%
- ψ -Tripsina: 5,0%
- Pool de Gama, Delta e teta Tripsina e formas inativas: 18,5%

4.3 TESTE DE PUREZA DE β TRIPSINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.

A avaliação da pureza da amostra de β -Tripsina bovina foi realizada por espectrometria de massa e pode-se notar oito picos (Figura 20), entre eles o Mr 23277.26 Da, 11653.19 Da, 7452.52 Da, 5458.84Da e 16137.57Da.

O valor teórico para massa de β -Tripsina é 23293 Da. O pico de 23277 Da representa a proteína com carga +1 e o pico de 11253 Da representa a espécie com carga +2. Destes dois valores calculou-se o valor médio da massa da proteína como sendo 23290 Da. Os picos 7452 Da, 5458 Da e 16137 Da provavelmente representam fragmentações da proteína.

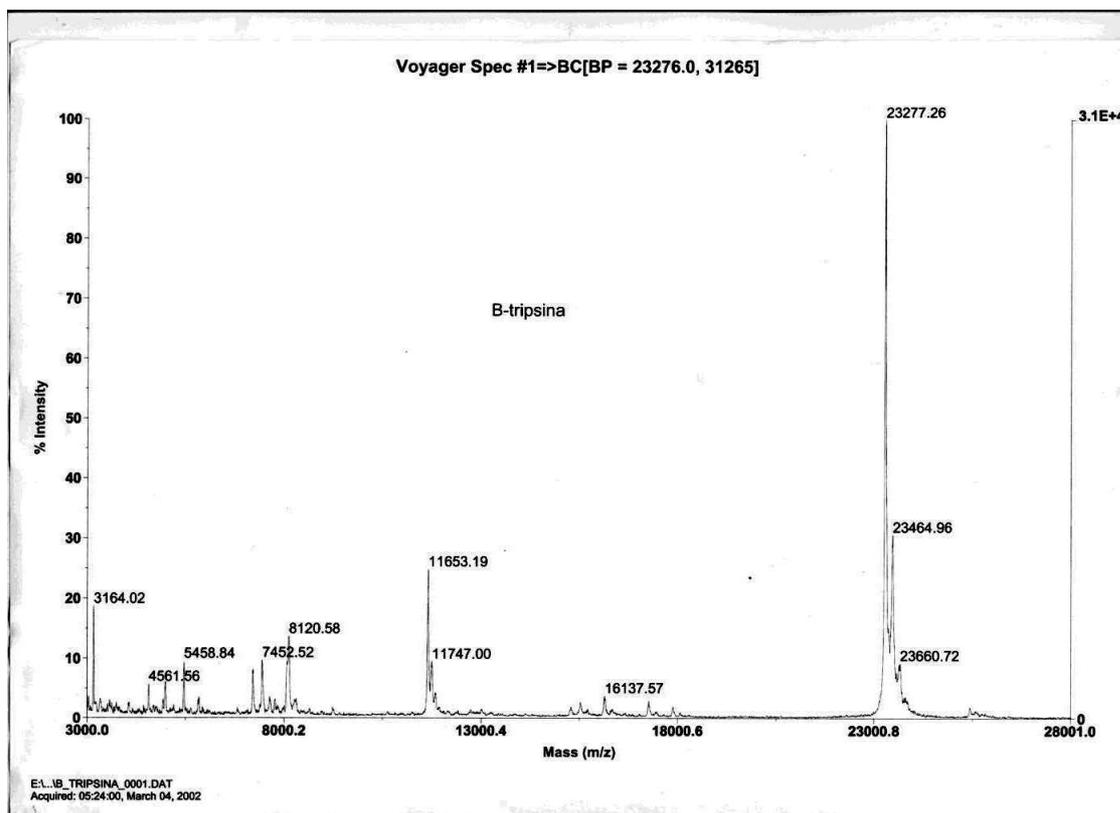


Figura 20: Espectrometria de massa (MALDI-TOF) de β -Tripsina

4.4 ATIVIDADE AMIDÁSICA DE ISOFORMAS DE TRIPSINA.

Como se pode observar pela Figura 21 a isoforma β e α -Tripsina possuem atividade amidásica. Entretanto, a atividade da β -Tripsina é superior a atividade de α -Tripsina em aproximadamente 11% frente ao substrato BAPNA. Pode-se notar ainda que a atividade amidásica vai diminuindo em direção a isoforma ψ -Tripsina. As isoformas gama, delta e teta Tripsina não apresentaram atividade amidásica.

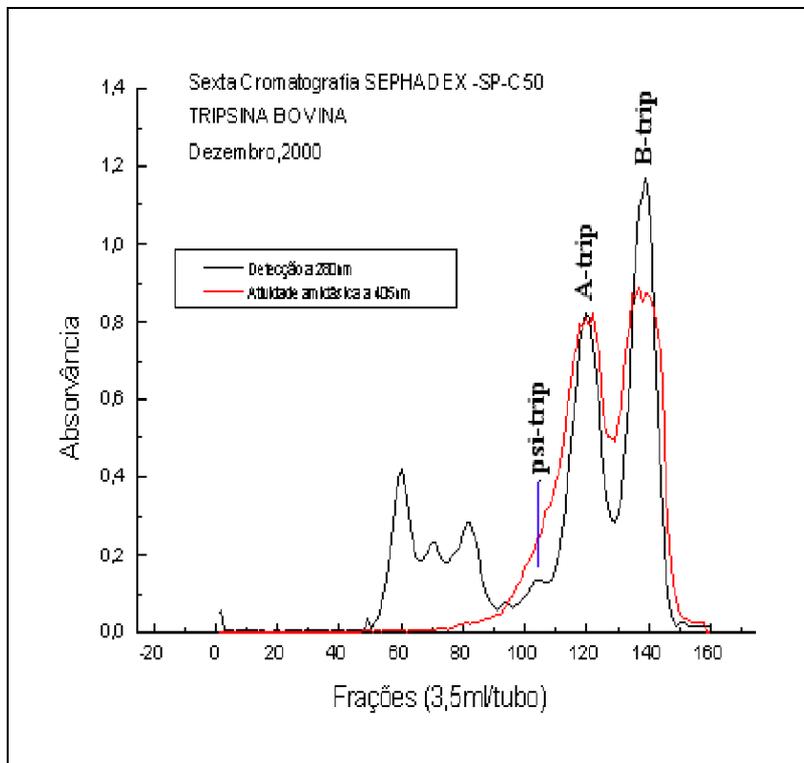


Figura 21: Atividade amidásica de isoformas de Tripsina. Linha preta: detecção à 280nm e linha vermelha: detecção à 410nm.

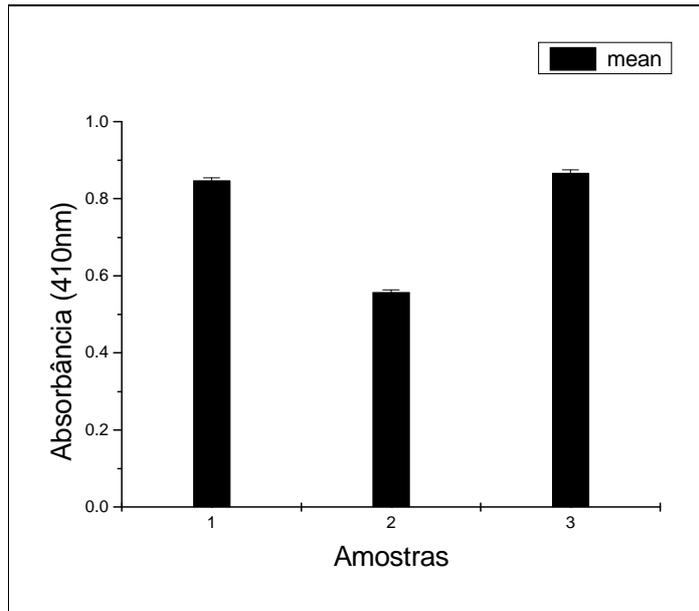


Figura-22: Atividade específica de Tripsina e de suas isoformas frente ao substrato BAPNA. Amostra 1 (Beta Tripsina,), 2 (Alfa Tripsina) 3 (Tripsina comercial).

4.5 TITULAÇÃO DO CENTRO ATIVO

Para proteínas recém purificadas o valor da titulação do centro ativo foi de 91% e para proteínas armazenadas acima de quinze dias não se detectou variação significativa no valor anteriormente encontrado. Para proteínas armazenadas acima trinta dias e menos de 60 dias o valor foi de 86% de centros ativos.

4.6. MICROCALORIMETRIA DE TRIPSINOGENIO E β -TRIPSINA EM MEIO ÁCIDO

Em pH 3,0 as desnaturações térmicas do Tripsinogênio e β -Tripsina (Figura 23) tiveram uma reversibilidade igual ou maior que 90%. Para estas proteínas o processo de desnaturação foi avaliado como sendo uma transição em dois estados, conforme demonstra a Figura 24. Os resultados do Tripsinogênio são semelhantes aos da β -Tripsina (dados não mostrados).

Pode se observar, pela Figura 23, que a forma característica de curva endotérmica gerada pela absorção de calor pela proteína foi reproduzida no experimento. A reversibilidade da proteína foi calculada a partir da realização de corridas consecutivas (*Rescan*) da mesma proteína nas mesmas condições. Assim realizou-se uma comparação entre os valores das energias absorvidas entre as corridas consecutivas e determinou-se o quanto é reversível o processo.

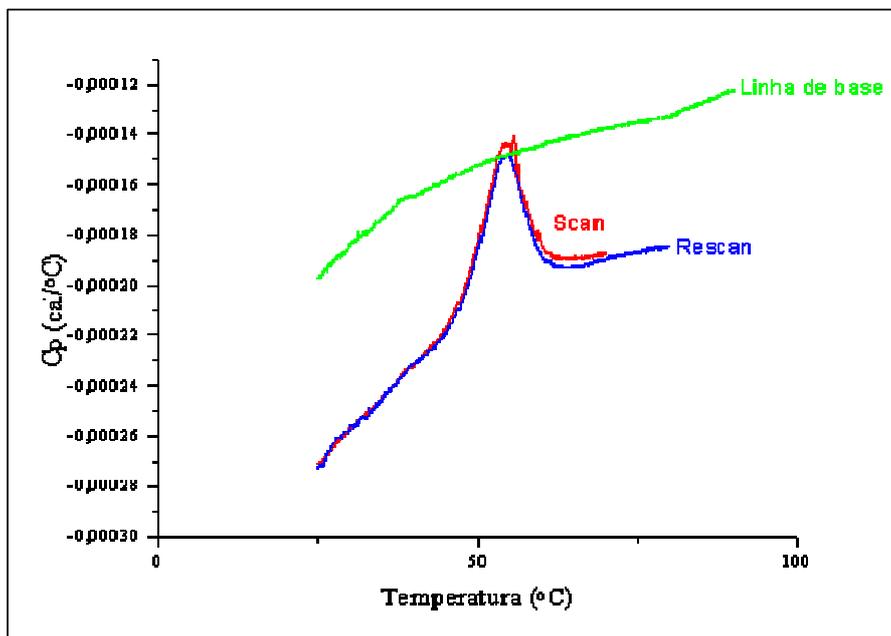


Figura 23: Curva de desnaturação de β -Tripsina contra tampão β -Alanina (β -Alanina 50mM; CaCl_2 20mM; pH 3,00). Resultado obtido, sem nenhum processamento, por Calorimetria Diferencial de Varredura. Linha de base (verde): corrida feita tampão contra Tampão, *Scan* (vermelho): corrida teste usada para avaliar a termoestabilidade protéica, *Rescan* (azul): corrida seqüencial a corrida teste, usada para avaliar a reversibilidade protéica.

A linha de base (Figura 23) representa a média de varreduras de água x água e através dela pode-se verificar pequenas variações entre as câmaras (amostra referência). Essas corridas eram realizadas anteriormente a uma série de experimentos com o intuito de subtrair o seu resultado das corridas com proteínas.

O resultado apresentado na Figura 24 (linha preta) é o dado original que posteriormente sofreu os seguintes tratamentos:

- subtração da linha de base que pode ser de água contra água ou de tampão contra tampão;
- normalização da concentração de proteína que é corrigida em função do número de sítios ativos presente na proteína. Isto é feito através dos valores da titulação do centro ativo;
- Subtração da contribuição da capacidade calorífica;
- Ajuste matemático da curva mais próxima da experimental. Este ajuste pode ser para modelos que seguem uma transição em dois estados ou para modelos que tem estados intermediários (linha contínua),

O resultado final é representado pela linha vermelha.

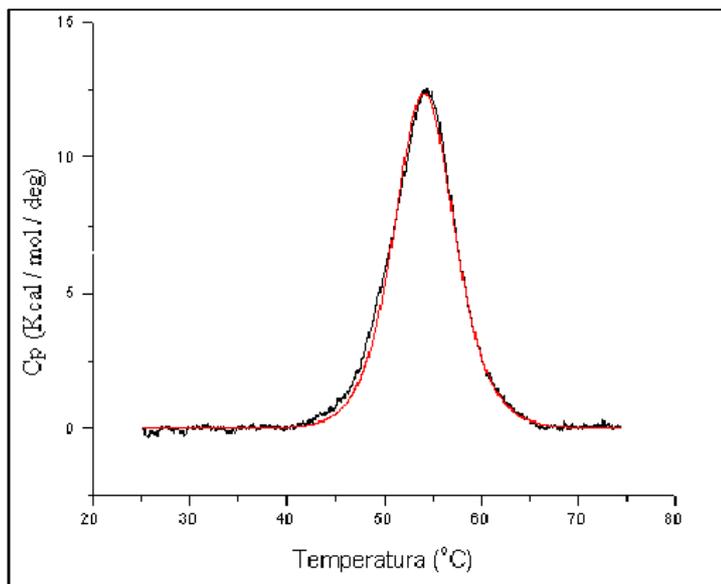


Figura 24: Curva de desnaturação de β -Tripsina contra tampão β -Alanina (β -Alanina 50mM; CaCl_2 20mM; pH 3,00). Resultado obtido por Calorimetria Diferencial de Varredura. A linha preta representa os dados processados após subtração da linha de base e a normalização da concentração de proteína, e a linha vermelha representa o ajuste dos dados ao modelo matemático de transição de dois estados.

4.7. Efeitos das variações de pH sobre o processo de desnaturação térmica

A Figura 25 mostra como o pH interfere no processo de desnaturação térmica das proteínas. Como se pode observar, à medida que o pH vai abaixando, as corridas mostram áreas sobre a curva de transição menores, portanto ΔH e T_m proporcionalmente menores.

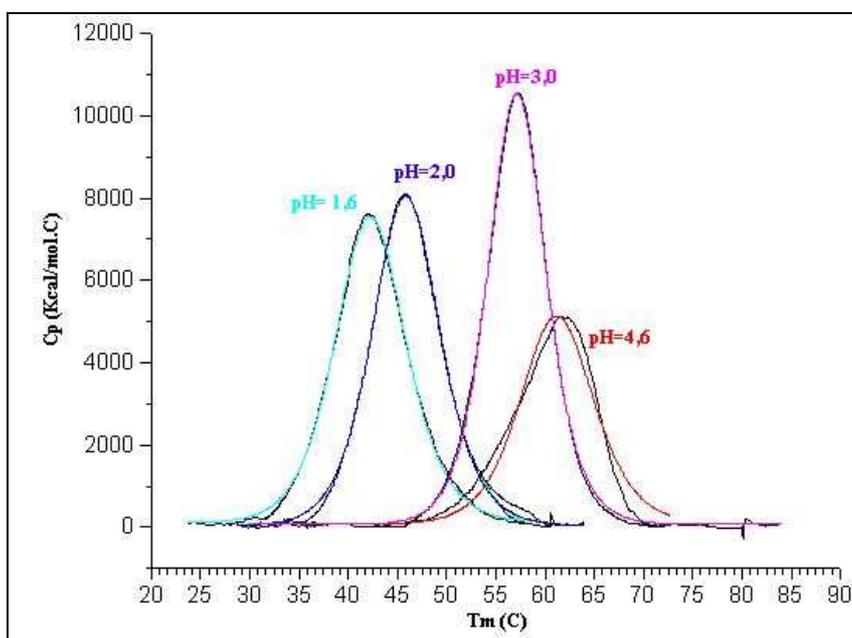


Figura 25: Curva de pH para análise de estabilidade através do T_m .

4.7.1. Efeito do pH sobre a relação $\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}}$ calorimétrico e ΔH vant' Hoff ($\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}}$)

Para a β -Tripsina, os dados de DSC em pH variando entre 3,2 - 4,2 revelou que a relação $\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}}$ variou de 1,0 a 0,5 (Figura 26), o que sugere a dimerização da proteína. Para tentar confirmar esta interpretação, experimentos utilizando gel filtração e HPLC foram realizados sob diferentes concentrações de sal, pH e temperatura, no intuito de observar se o volume de eluição variaria, porém o volume não variou significativamente (dados não mostrados).

Em relação aos experimentos utilizando pH 3,7 onde a relação $\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}}$ foi aproximadamente de 0,75, realizou-se uma série de experimentos na faixa de concentração de proteína de 0,05 a 2,30 mg/mL pode-se perceber novamente uma oligomerização da proteína (Figura 27), visto que, a razão tendeu ao valor igual ou inferior 0,5 para altas concentrações da proteína. Porém, quando um ajuste matemático, abaixo mostrado, foi desenvolvido pode-se constatar que os resultados acima obtidos não ajustavam perfeitamente a uma curva de dimerização (Figura 27). Os valores de concentração protéica de 0,05 a 1,0 mg/mL se ajustaram a curva de dimerização, enquanto valores superiores sugeriram a formação de estados de agregação (trímeros, tetrâmeros, etc), visto que não se ajustavam a equação.

Equação 1 :

$$(\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}})_{\text{obs}} = 0.5 - (1 / 4 * K_D * [P]) + ((1 + 4 * K_D * [P])^{1/2} / (4 * K_D * [P]))$$

Onde: **[P]**: é a concentração de proteína total e,

K_D: é a constante de dimerização

($\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}}$)_{obs} : é o valor da relação observado

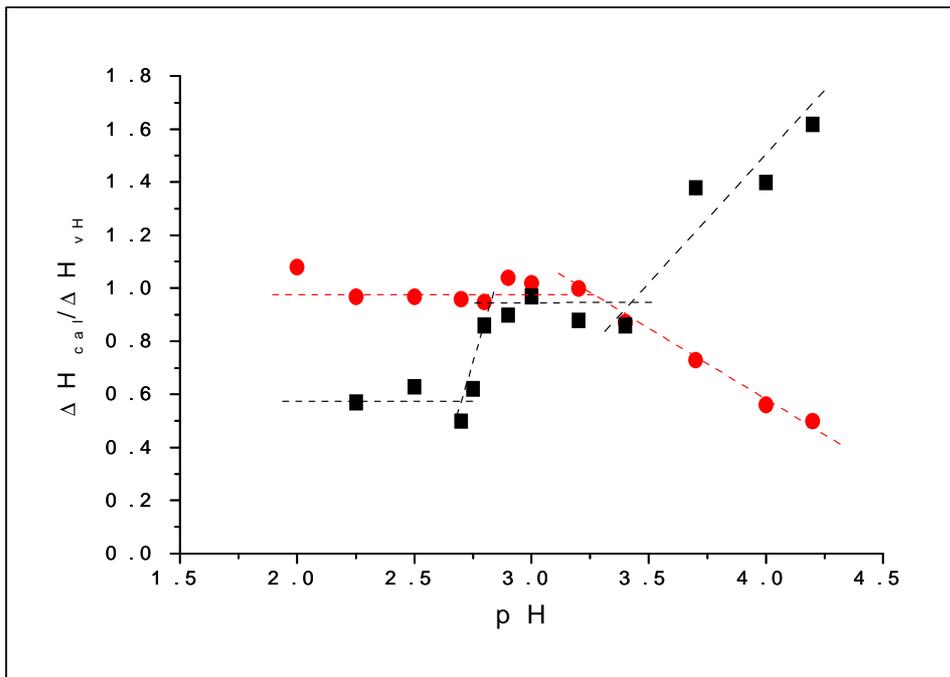


Figura 26: Relação entre ΔH_{cal} e ΔH_{vH} de β -Tripsina, Tripsinogênio, entre pH 2,0 a 4,2.

β -Tripsina (preto), Tripsinogênio (vermelho).

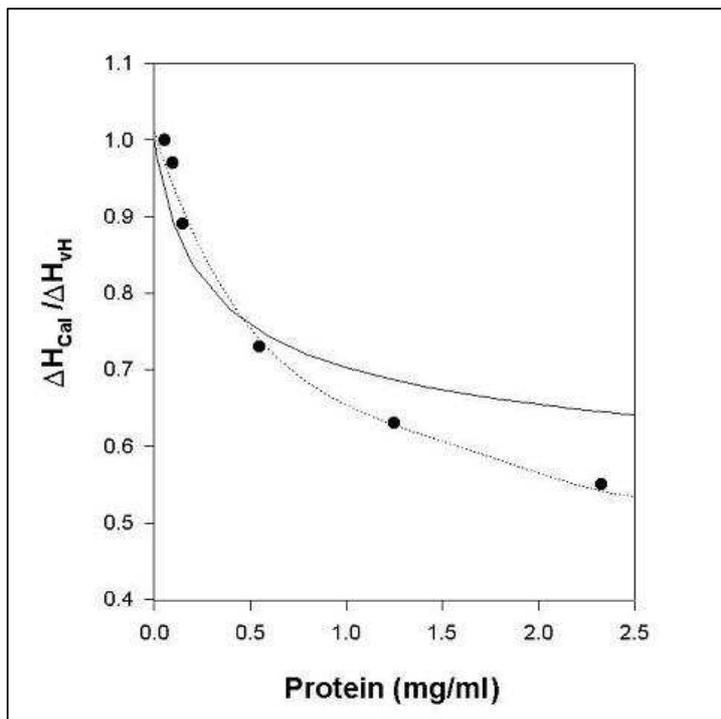


Figura 27: ($\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$) valores de β -Tripsina em pH 3,70 em função de concentração de proteína (de 0,05 a 2,30 mg/ml) e tampão β -Alanina (β -Alanina 50,0 mM, com CaCl_2 20,0 mM, pH 3,70). Linha pontilhada: polinomial de quarto grau fitada para guiar os olhos. Linha sólida: representa valores ajustados matematicamente de acordo com a equação-1.

Já a β -Tripsina, em pH variando entre 3,0 a 2,0 apresentou uma relação entre ΔH_{cal} e ΔH_{vH} sempre próximo de 1,0 (Figura 26), o que permitiu inferir que não houve dimerização da enzima nessas condições.

Em relação ao Tripsinogênio, em valores de pH entre 3,0 e 2,25 a relação ΔH_{cal} e ΔH_{vH} variou de 1,0 a 0,57, isto poderia sugerir uma tendência à dimerização da proteína nessa condição experimental, mas é mais provável que um dos domínios tenha desnaturado.

Já os resultados referentes ao Tripsinogênio na faixa de pH entre 3,4 e 4,2 sugerem um desacoplamento dos domínios, visto que a relação $\Delta H_{\text{cal}}/\Delta H_{\text{vH}}$ variou de 1,0 a 1,75.

4.7.2. Cálculo de ΔG e ΔC_p em função do T_m

Sabendo-se que, na temperatura de transição (T_m) o $\Delta G_{(T_m)}$ é igual a zero cal/mol e que para uma transição de dois estados o K_D é igual a 1,0, temos:

Equação2:

$$\Delta G_{(T_m)} = \Delta H_{(T_m)} - T_m \times \Delta S_{(T_m)} \quad \therefore \quad \Delta S_{(T_m)} = \frac{\Delta H_{(T_m)}}{T_m}$$

A dependência de $\Delta H_{(T_m)}$ e T_m permite calcular ΔC_p , que é a variação da capacidade calorífica entre a forma nativa e desnaturada da proteína. De fato, tem-se:

Equação 3:

$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H}{dT}$$

Integrando-se entre os limites (ΔC_p constante) tem-se:

Equação 4 :

$$\int_{T_m}^T d\Delta H = \Delta C_p * \int_{T_m}^T dT$$

Equação 5:

$$\therefore \Delta H_{(T)} = \Delta H_{(T_m)} + \Delta C_p (T - T_m)$$

De acordo com essa equação, deve existir uma relação linear entre ΔH e T , e o coeficiente angular permite avaliar o ΔC_p

De maneira análoga, pode-se demonstrar que:

Equação 6:

$$\Delta S_{(T)} = \Delta S_{(T_m)} + \Delta C_p \ln (T / T_m)$$

Uma vez conhecidos $\Delta H_{(T_m)}$, T_m e ΔC_p , pode-se calcular a estabilidade da proteína $\Delta G_{(T)}$ na faixa de temperatura de interesse de acordo com a fórmula descrita por Pace, et al. (1990):

Equação 7 :

$$\Delta G_{(T)} = \Delta H_{(T_m)}(1-T/T_m) - \Delta C_p[(T_m - T) + T * \ln (T/T_m)]$$

4.7.3. Influência de estabilizante (sorbitol) e de desestabilizantes de proteínas (cloreto de guanidina) sobre o processo de desnaturação térmica.

Com a adição de sorbitol em concentrações crescentes observou-se um aumento significativo na estabilidade termodinâmica do Tripsinogênio e Tripsina. Essa estabilidade pode ser visualizada através do aumento do ΔH e T_m do processo de desnaturação.

Em relação ao cloridrato de guanidina pode-se observar uma redução do ΔH e T_m do processo de desnaturação protéica. Esses dados estão demonstrados nas Figuras 28 e 29 e nas Tabelas 1 e 2.

Tripsinogênio

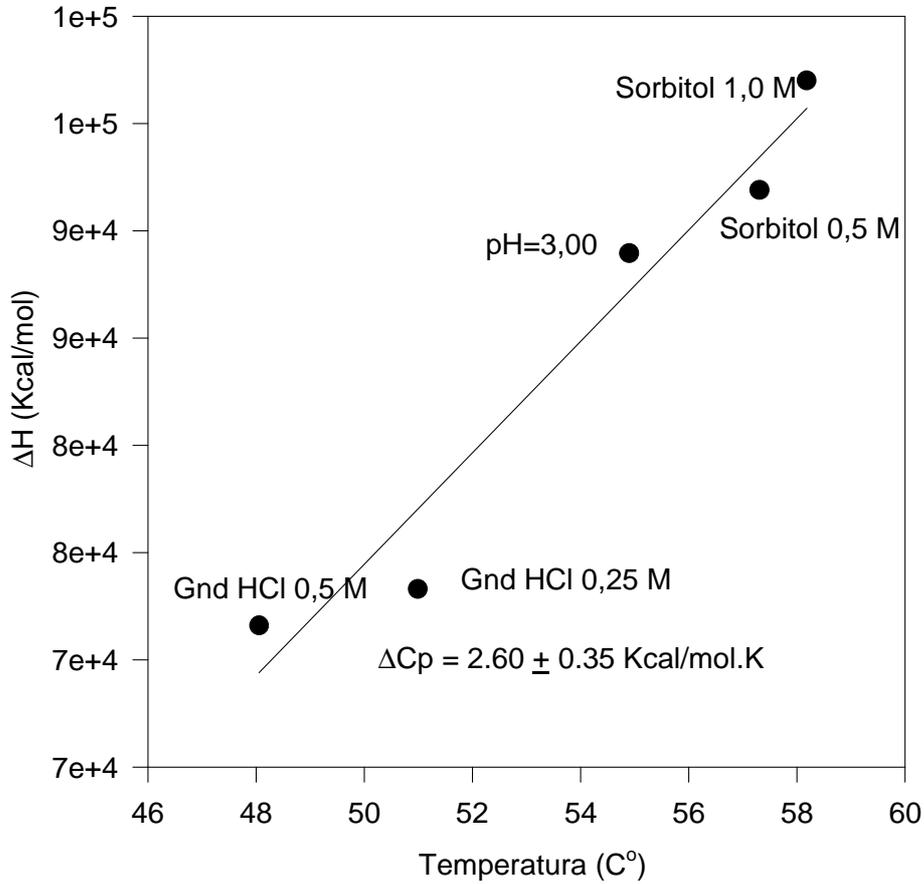


Figura 28: ΔH por T_m para o Tripsinogênio em pH 3,00 e diferentes concentrações de Sorbitol (0,50 M; 1,00 M; 1,50 M) e de Cloridrato de Guanidina (0,30 M 0,50 M). A inclinação da reta é $\Delta C_p = 2,60 \pm 0,35 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

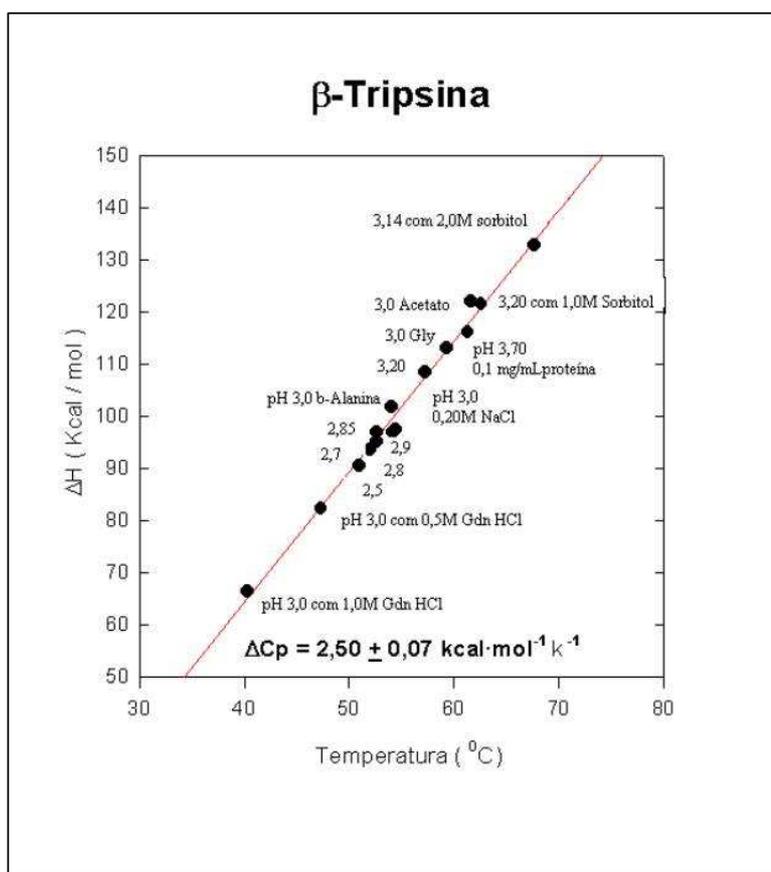


Figura 29: ΔH por T_m para β -Tripsina em diferentes pH (3,00; 3,20; 2,90; 2,80; 2,70; 2,50), concentrações de Sorbitol (1,0M; 2,0M), concentrações de Cloridrato de Guanidina (0,5M; 1,0M), concentrações de Uréia (0,5M), e tampões (Acetato, Glicina, β -Alanina). A inclinação da reta é $\Delta C_p = 2,50 \pm 0,07 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Em pH 3,0 a desnaturação da β -Tripsina, apresentou T_m de 54,0 °C e ΔH de 101,8 Kcal.mol⁻¹. Nas mesmas condições a desnaturação do Tripsinogênio apresentou T_m de 51,1 °C e ΔH de 78,3 Kcal.mol⁻¹. A variação da capacidade calorífica entre as formas nativas e desnaturadas da proteína (ΔC_p) foi estimada em $2,50 \pm 0,07$ Kcal/mol/K para a β -Tripsina; e $2,60 \pm 0,35$ Kcal.mol⁻¹.K⁻¹ para o Tripsinogênio.

Considerando as diferenças estruturais entre as isoformas, os valores de ΔG obtidos por DSC em pH 3,0 e 298K foram de 3,5 Kcal.mol⁻¹ para o Tripsinogênio (Figura 30) e de 5,7 Kcal/mol para a β -Tripsina (Figura 31).

Tabela 1: Resultados obtidos das análises calorimétricas do Tripsinogênio em tampão β -Alanina 50,0 mM; CaCl_2 20,0 mM, variando-se pH, e concentrações de Gnd HCl e Sorbitol.

pH	Aditivos	T _m (°C)	ΔH (cal/mol)	T _m * (°C)	ΔH_{cal} (cal/mol)	ΔH_{VH} (cal/mol)	$\Delta H_{cal} / \Delta H_{VH}$	Revers %
3,00	-----	54,90	93950	54,92	92600	95900	0,97	99,9
3,00	Gnd HCl 0,50M	48,06	76600	48,10	70200	86040	0,86	96,4
3,00	Gnd HCl 0,25M	50,99	78300	51,04	68550	93780	0,82	99,0
3,00	Sorbitol 1,00M	58,18	102000	58,14	109000	92200	1,18	100,9
3,00	Sorbitol 0,50M	57,31	96900	57,32	91900	104000	0,88	89,1
2,70	-----	52,07	76650	52,15	63100	101900	0,62	101,6
2,50	-----	50,34	77600	50,41	64400	101400	0,63	101,5
2,25	-----	47,43	70900	47,68	56400	98700	0,57	101,3
2,80	-----	52,93	85900	52,97	80600	93700	0,86	99,2
2,90	-----	54,62	89300	54,64	85400	94940	0,89	99,9
3,20	-----	57,63	92900	57,66	88100	105000	0,83	102,0

*T_m *:* é o valor de T_m na análise em que se permite ΔH_{cal} diferente de ΔH_{VH} .

Revers: significa reversibilidade, ou seja, representa o quanto uma proteína é reversível após a desnaturação.

Tabela 2: Resultados obtidos das análises calorimétricas da β -Tripsina em tampão β -Alanina 50,0 mM; CaCl_2 20,0 mM, variando-se pH, e concentrações de Gnd HCl, sorbitol, NaCl, e uréia.

pH	Aditivos	T _m (°C)	ΔH (cal/mol)	T _m * (°C)	ΔH_{cal} (cal/mol)	ΔH_{HV} (cal/mol)	$\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{HV}}$	Revers. %
3,00	-----	53,89	101000	53,89	99400	102000	0,97	94,0
3,00	NaCl 0,20M	54,57	97900	54,57	99200	96100	1,03	98,0
3,20	-----	57,14	108000	57,18	106000	109000	0,97	99,0
3,40	-----	59,14	104000	59,57	92900	121000	0,77	101,0
4,00	-----	64,10	101000	64,13	85500	128000	0,67	91,0
4,20	-----	64,57	82100	64,57	66600	122000	0,54	76,0
3,70	-----	61,09	103000	61,09	94400	116000	0,81	99,0
3,00	Sorbitol 1,00M	61,50	101000	61,50	94600	109000	0,87	100,9
3,20	Sorbitol 1,00M	61,99	103000	62,01	100000	110000	0,91	99,0
3,15	Sorb 2,00M	67,66	133000	67,65	139000	127000	1,09	100,0
3,00	Uréia 0,50M	50,61	81600	50,68	73500	89600	0,82	98,0
3,00	Gnd HCl 1,00 M	40,45	71100	40,44	70000	72400	0,96	97,0
3,00	Gnd HCl 0,50 M	48,15	82400	48,15	80600	84800	0,95	99,0
2,90	-----	54,18	96600	54,20	92200	101000	0,92	97,0
2,80	-----	52,53	94900	52,59	93600	95000	0,99	98,4
2,70	-----	52,01	92000	52,01	90400	94100	0,96	98,3
2,50	-----	51,03	88950	51,03	88100	91900	0,96	100,0
2,25	-----	47,21	88100	47,41	87750	88700	0,99	91,0
2,00	-----	41,95	79300	41,95	83750	79450	1,07	98,2

*T_m *:* é o valor de T_m na análise em que se permite ΔH_{cal} diferente de ΔH_{VH}

Revers: significa reversibilidade, ou seja, representa o quanto uma proteína é reversível após a desnaturação.

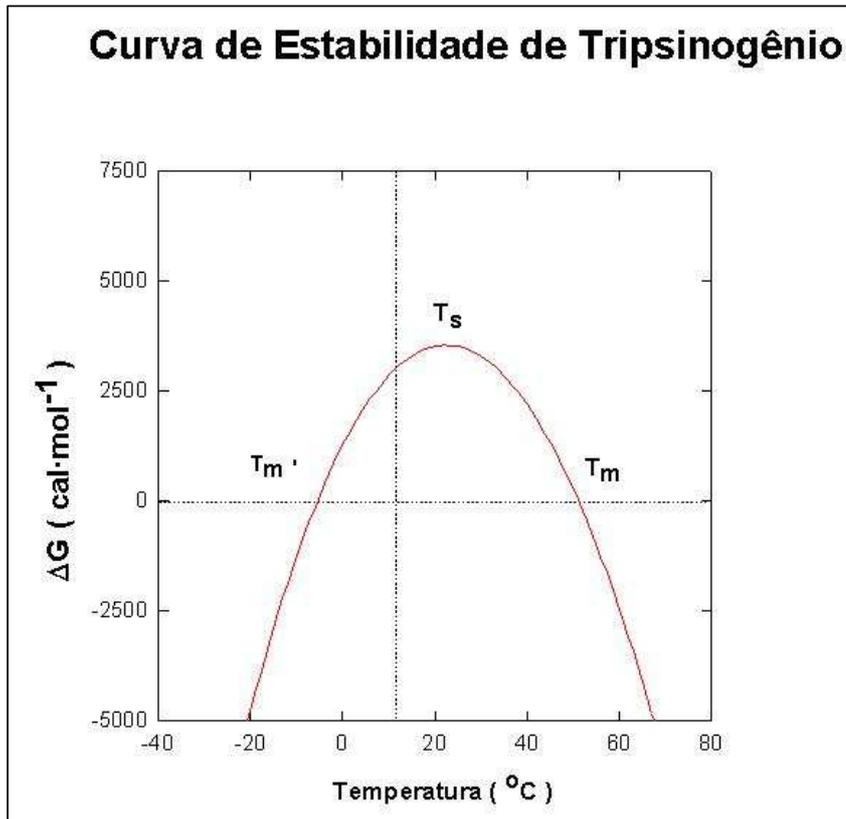


Figura 30: ΔG de desnaturação de Tripsinogênio (cal·mol⁻¹), em função da temperatura (°C).

Usando a equação $T_{max} = \frac{\Delta H_m}{\Delta C_p \ln \left[\frac{\Delta H_m}{\Delta C_p (T_m - T_{ref})} + 1 \right]}$ (**Equação 8**) pode se determinar a temperatura na qual a proteína é mais estável:

Assim calculou-se para o tripsinogênio a T_{max} de 28,2°C.

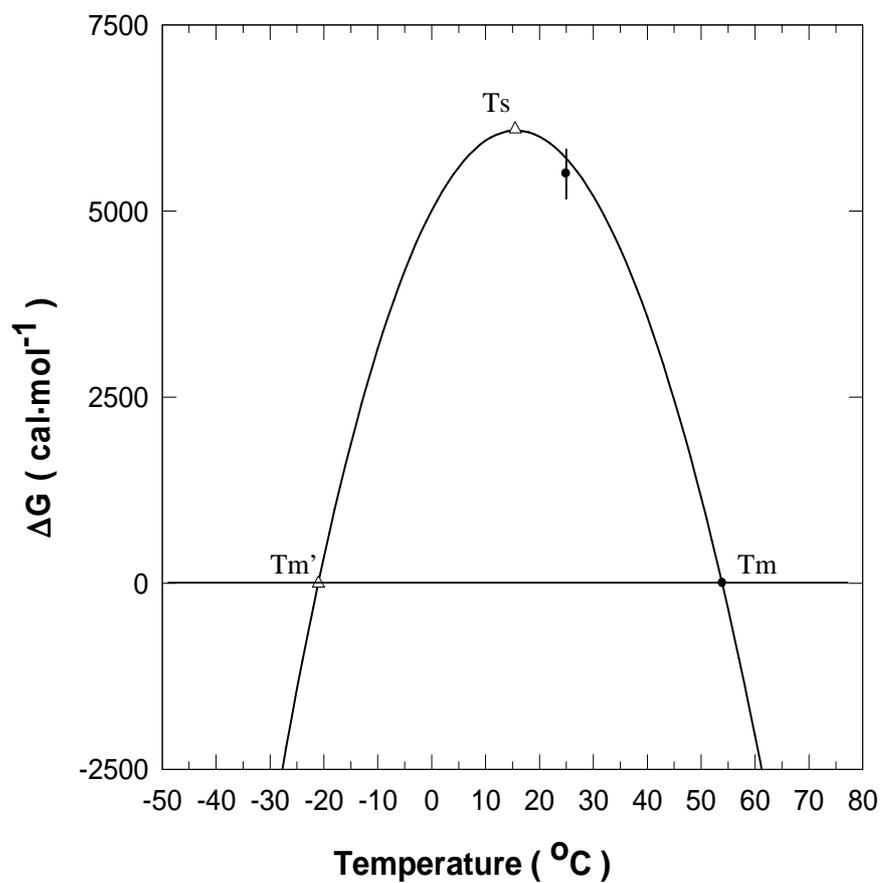


Figura 31: ΔG de desnaturação de β -Tripsina ($\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1}$), em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Os valores a 25°C (média ± 1 DP) foram obtidos por Günther, (1998), por desnaturação com uréia, analisando os dados como sendo uma transição de dois estados.

Usando a equação $T_{\text{max}} = / \{ \exp[\Delta H_m / (\Delta C_p T_m)] \}$ (Equação-8) pode se determinar a temperatura na qual a proteína é mais estável:

Assim calculou-se para o tripsinogênio a $T_{\text{max}} = 26.4^{\circ}\text{C}$

4.7.4. Análise calorimétrica para β -Tripsina em solventes orgânicos

4.7.4.1. Influência do aumento da cadeia carbônica na variação do T_m

Para se avaliar a influência da cadeia carbônica na variação do T_m uma série de álcoois (Figura 32) foi testada no intuito de se desacoplar os domínios das proteínas. Os álcoois utilizados foram: metanol, etanol, propanol e butanol.

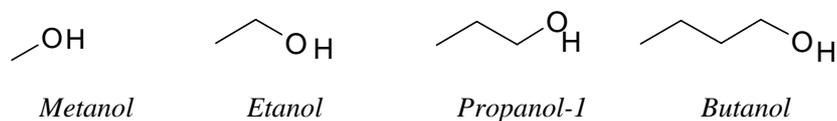


Figura 32: Fórmula estrutural dos álcoois utilizados nos experimentos calorimétricos

Todos os álcoois utilizados possuíam índices cromatográficos, porém mesmo assim foram testadas suas purezas. Essas aferições foram feitas espectrofotometricamente comparando os valores obtidos experimentalmente com aqueles fornecidos pelo catálogo SIGMA[®].

Pode-se observar pelas Figuras 33 e 34, o resultado obtido pela aplicação no calorímetro de 1,0mg/ml de β -Tripsina bovina em tampão 50,0mM de β -Alanina, 20,0mM de CaCl_2 , mais 10 % de Álcool (Metanol, Etanol, Propanol e Butanol), pH 3,0

que a medida que se aumenta a cadeia carbônica do álcool ocorre uma maior desestabilização da proteína, isto pode ser evidenciado notando-se que o T_m das soluções alcoólicas vai diminuindo gradativamente com o aumento da cadeia carbônica em comparação a corrida padrão que é constituída do tampão sem álcool (Tabela 3).

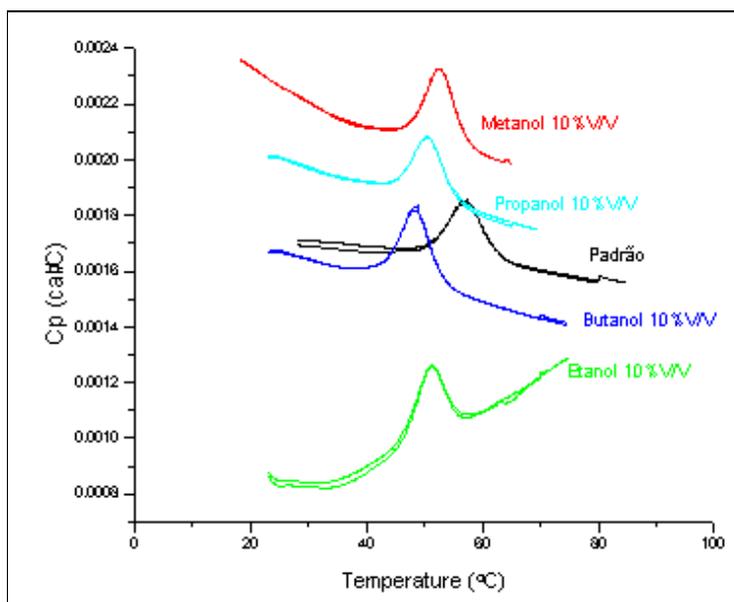


Figura 33: Corridas de β -Tripsina em soluções alcoólicas com diferentes álcoois, com concentração de 10% v/v em tampão 50,0mM β -Alanina, 20mM CaCl_2 pH 3,0 mostrando-se a variação no valor de T_m .

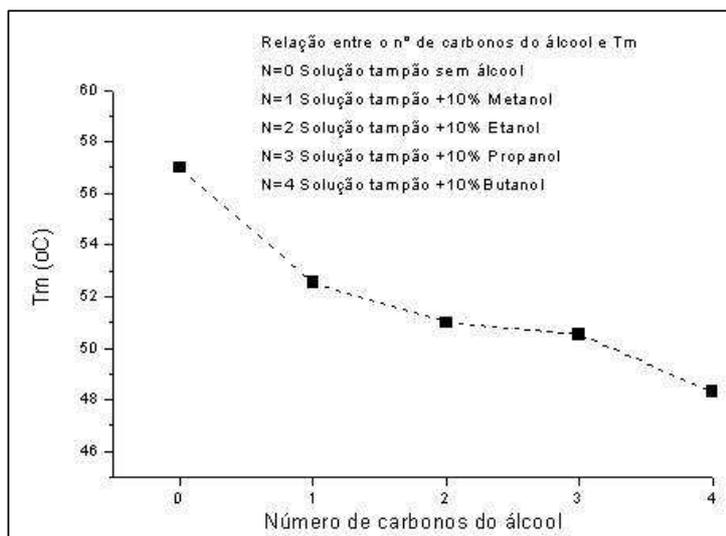


Figura 34: Relação entre o n° de carbonos na cadeia da função álcool com o Tm. Sendo que N 0 (Tampão 50mM β -alanina, 20mM CaCl₂, pH 3,0), N 1 (N 0 + 10% Metanol), N 2 (N 0 + 10% Etanol), N 3 (N 0 + 10% Propanol), N 4 (N 0 + 10% Butanol).

Tabela 3: Variação do T_m em função do aumento do número de carbonos na série homóloga de álcoois.

N° de carbonos	T_m
0	$56,95 \pm 0,05$
1	$52,52 \pm 0,35$
2	$51,10 \pm 0,11$
3	$50,49 \pm 0,18$
4	$48,26 \pm 0,25$

*N=0 refere-se a corrida feita com tampão Glicina sem álcool

4.7.4.2. Cálculo da variação do ΔH_{cal} em função do aumento da cadeia carbônica na função álcool.

Nota-se através da Figura 35 que o valor de ΔH calorimétrico segue uma contínua diminuição em seu valor, pois à medida que a cadeia carbônica do álcool vai crescendo sua interação torna-se cada vez maior com a forma desnaturada da proteína de modo a desestabiliza-la cada vez mais.

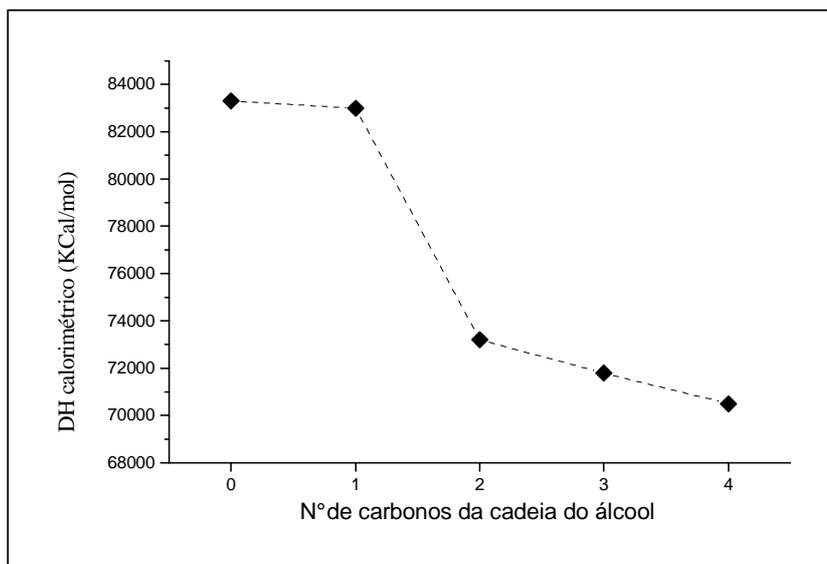


Figura 35: Relação entre o n° de carbonos na cadeia da função álcool com o ΔH_{cal} . Sendo que N 0 (Tampão 50mM β -alanina, 20mM $CaCl_2$, pH 3,0), N 1 (N 0 + 10% Metanol), N 2 (N 0 + 10% Etanol), N 3 (N 0 + 10% Propanol), N 4 (N 0 + 10% Butanol)

4.7.4.3. Comparação do $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ em relação ao aumento da cadeia carbônica de álcoois.

Pode se notar através da Figura 36 que a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ apresenta valores acima de 1,0 significando que inicialmente o processo está ocorrendo em dois estados e que um possível desacoplamento dos domínios pode estar acontecendo para valores acima de 1,0 pois tende a apresentar intermediários de desnaturação.

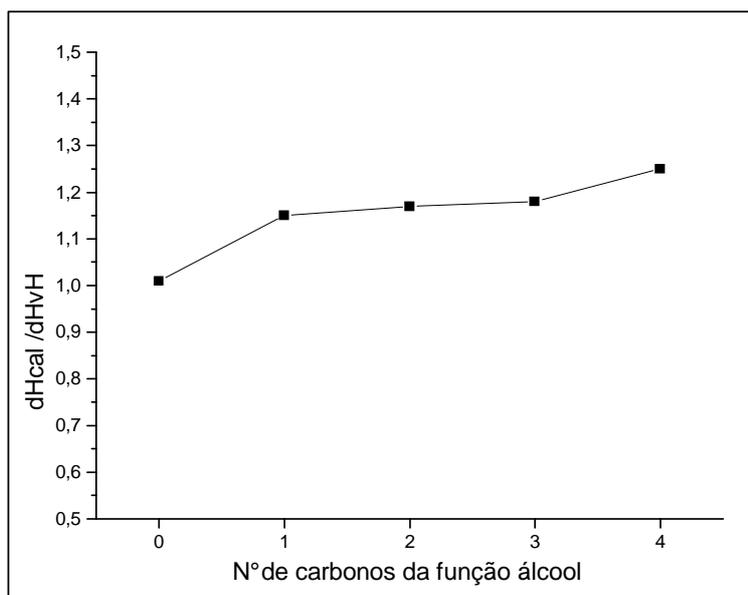


Figura 36: Variação da relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ em álcoois com número de carbonos crescentes.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A β -Tripsina e o Tripsinogênio são proteínas que apresentam estruturas tridimensionais bem conhecidas, determinadas por métodos cristalográficos e possui alta reversibilidade no processo de desnaturação térmica sendo portanto, um excelente modelo para o estudo termodinâmico (Huber & Bode, 1978; Bode et al, 1976, 1978, 1983).

Ambas apresentam dois domínios de estrutura similar, unidos assimetricamente sendo que entre eles está localizado o sítio catalítico e a fenda oxianiônica. No Tripsinogênio a fenda oxianiônica encontra-se deslocada em relação a tríade catalítica enquanto que na β -Tripsina a tríade catalítica, formada por um arranjo preciso das cadeias laterais dos resíduos Asp, His e Ser, e a fenda catalítica se encontram juntas no centro ativo da enzima (Blowm et al., 1976, Kraut, 1977, Nakagawa & Umeyama, 1984, Fehlammer, 1977, Kossiakof et al., 1977).

Essas diferenças estruturais entre o Tripsinogênio e a β -Tripsina são decorrentes do processo de ativação, que com a remoção do peptídeo N-terminal permite a formação de uma ponte salina (Ile16 e Asp194) ausente na estrutura do zimogênio desencadeando um aumento da energia de ligação e levando a um aumento da estabilidade da forma nativa da enzima que segundo Hedstrom et al. (2002), é aumentada em 3,00 Kcal/mol.

A estabilidade termodinâmica é determinada pelo processo de desnaturação, que pode ser monitorada pelas técnicas de Espectrometria Diferencial (UV) e fluorescência, Dicroísmo Circular, Ressonância Magnética Nuclear e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

O que se sabe sobre o dobramento de proteínas é que o processo é termodinamicamente dirigido, dependente da estrutura primária da proteína podendo

apresentar intermediários estáveis com estruturas bastante semelhantes à forma nativa da proteína (*Molten globule*) (Anfinsen, 1973, Privalov, 1997).

Para proteínas pequenas o processo de desnaturação é bastante simples e envolve uma transição de dois estados: nativo (N) e desnaturado (D). Já para proteínas grandes e com vários domínios o processo de desnaturação pode apresentar vários estados intermediários entre nativo e desnaturado (Privalov, 1997).

Para estudarmos o processo de desnaturação de proteínas utilizamos a calorimetria diferencial de varredura (DSC) que é usualmente utilizada no estudo de proteínas que apresentam mais de um domínio, objetivando avaliar as contribuições energéticas de cada um dos domínios e de suas interações para a estabilidade da proteína como um todo (Brandts et al., 1989).

Para a avaliação da desnaturação das isoformas de proteínas foi necessário confirmar o grau de pureza do Tripsinogênio e da β -Tripsina.

Inicialmente, o Tripsinogênio foi aplicado a uma coluna de gel filtração em FPLC (Figura 15) para observação do perfil cromatográfico e pode-se notar a existência de uma pequena quantidade de proteína de peso molecular muito próximo ao do Tripsinogênio. Posteriormente, o Tripsinogênio foi analisado por HPLC e não se observou a presença dessa proteína de baixo peso molecular, o que nos permitiu inferir que a amostra estava pura e que não continha contaminações de outras isoformas ou de peptídeos muito grandes que pudessem interferir no experimento calorimétrico. Mesmo assim, a amostra foi analisada através de espectrometria de massa (MALDI-TOF) para a confirmação do grau de pureza. Esses resultados podem ser observados na Figura 17.

Na análise da espectrometria de massa pode se deduzir que o pico de 23951.48 Da era o de massa molecular do Tripsinogênio (teórico: 23980,6 Da) e este pico estava relacionado com o pico de Mr 11982.74 Da que é o pico de carga +2. Nota-se que o

valor médio calculado deste pico (23957,0 Da) tem um erro percentual de 0,1% do valor esperado. Os picos de Mr 13775,09 Da e 14490,41 são impurezas que devem ser oriundas do processamento da purificação da amostra comercial pela empresa responsável (SIGMA).

O pico de 23277,26 Da é massa da proteína de teste β -Tripsina. Essa massa difere apenas de 15,63 Da do valor da literatura 23292,9 Da (Ashton, 1994) encontrado por Electrospray-mass spectroscopy. O pico de Mr 23277,26 Da se relaciona com o pico de Mr 11653,19 Da, pois este é o pico carga +2 e este pico está desviado de um erro de 0,05% do valor teórico. Especial atenção deve se dar aos picos de massa molecular 5458,84Da e 16137,57Da pois, fragmentos com massas moleculares semelhantes a estes são encontradas em diversas amostras de Tripsina comercial bovina de diferentes fabricantes (Ashton, 1994). Conforme o estudo realizado por Vestling et al., (1990) estes fragmentos são produtos de clivagem proteolítica de α -Tripsina em Arg (49)-Leu (50) e Arg (99) – Val (100) por β -Tripsina. Sendo que o fragmento de Mr5447,08 não possui ligações dissulfeto, já o fragmento de Mr17864,26Da possui as ligações dissulfeto intactas originárias da α -Tripsina. Excetuando os fragmentos acima citados os outros encontrados no perfil são gerados devido ao processo cromatográfico ser longo (20 dias) resultando assim na formação de alguns fragmentos de peso molecular menores.

Os erros observados na espectrometria de massa não foram significativos e, portanto, não comprometem a realização dos experimentos.

Os experimentos com β -Tripsina iniciaram com a separação das isoformas (α , β e ψ) presentes na amostra comercial (SIGMA) por cromatografia de troca iônica (Figura 16). As preparações comerciais de Tripsina bovina contêm uma mistura de componentes

ativos e inativos (Maroux et al., 1967). O primeiro método eficaz de separação das duas principais formas de ativa e inativa de Tripsina foi desenvolvido por Schroeder & Shaw, (1968), porém, foi modificado e adaptado por vários outros pesquisadores, como Smith & Shaw (1969) que conseguiram isolar uma terceira forma ativa de Tripsina, e por Teixeira (1977) que isolou e caracterizou uma quarta forma. Dias & Rogana (1986) aprimoraram o método de Schroeder & Shaw, (1968) o que permitiu a separação de grandes quantidades de forma de Tripsina.

Posteriormente, a obtenção das isoformas realizou-se o cálculo das percentagens relativas onde se pode notar que a percentagem de β -Tripsina foi superior a das outras isoformas e também a avaliação do grau de pureza da β -Tripsina por espectrometria de massa, podendo assim, atestar a pureza da amostra de β -Tripsina utilizada neste experimento de estudo microcalorimétrico.

Outros critérios observados se referiram à atividade amidásica das isoformas de Tripsina e a titulação dos centros ativos. Em relação a atividade amidásica pode-se notar uma atividade superior da β -Tripsina (11%) em relação a α -Tripsina frente ao substrato BAPNA e a não atividade das outras isoformas. Focault et al., (1974 a,b) demonstraram experimentalmente, que a forma β era 40% mais ativa que a forma α frente ao substrato amidásico benzoil-L-arginina e que a ψ -Tripsina possui maior atividade para substratos esterásicos e é menos específica que as outras formas.

A atividade amidásica ainda alta apresentada pela isoforma ψ -Tripsina, neste trabalho, se deve a não separação total da isoforma, estando assim contaminada com a isoforma α -Tripsina.

A titulação do centro ativo permitiu observar que após trinta dias de armazenamento do liofilizado a atividade enzimática reduzia de 91% para 86%. Devido

a essa observação, anteriormente aos experimentos, eram realizadas titulações dos centros ativos e sempre se trabalhava com enzimas com atividades superiores a 86%. Isto porque a análise da desnaturação era realizada com base nos valores de concentração de centro ativo.

A análise da estabilidade termodinâmica das proteínas é importante porque a sua função é dependente da sua estrutura e do arranjo tridimensional da cadeia polipeptídica.

O estudo comparativo da estabilidade entre o Tripsinogênio e a β -Tripsina não foi possível ser realizado em pH neutro, devido ao processo de autólise sofrido pela β -Tripsina nesta faixa de pH. A alternativa foi realizar os experimentos em pH ácido (2,00 - 4,50). Segundo Pace (1990) as proteínas são mais estáveis próximas ao seu ponto isoelétrico (pI)

Nessa faixa de pH a primeira comparação realizada foi entre a relação da variação da entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}) e da entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}), com o objetivo de definir o número de unidades estruturais cooperativas envolvidas na desnaturação térmica de proteínas.

Nesse contexto, os resultados provenientes da relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ indicaram que nas faixas de pH entre 2,0 e 3,0 o processo de desnaturação térmica da Tripsina ocorre em uma transição em dois estados.

Apesar da β -Tripsina apresentar dois domínios, estes se comportam como uma única unidade cooperativa no processo de desnaturação. Este comportamento já foi mostrado em estudos utilizando DSC para observação na desnaturação da β -Tripsina em pH 2,8 sendo atribuído à grande similaridade e a forte interação entre os domínios (Brumano et al., 2000). Tishchenko & Gorodkov (1979) descreveram desnaturação

térmica da β -Tripsina em nesta faixa de pH como sendo uma transição em dois estados com uma relação $\Delta H_{Cal}/\Delta H_{VH}$ igual a um, e associou este resultado com as pontes dissulfetos presentes na estrutura desta proteína.

Martins (1999), encontrou valores termodinâmicos associados a desnaturação de β -Tripsina semelhantes aos nossos, porém, com melhor ajuste para transição de três estados, uma vez que o processo de desnaturação foi provocado pela uréia. Também Ruan, et al. (1997) mostraram a presença de intermediários do tipo *Molten globule* na desnaturação de Tripsina sob pressão. Assim os resultados obtidos por esses trabalhos confirmam a existência de intermediários na desnaturação, porém para o caso relatado por Ruan e colaboradores a amostra de Tripsina bovina não tinha sido purificada, ou seja, possivelmente existiam outras isoformas de Tripsina.

Para o Tripsinogênio a relação $\Delta H_{Cal} / \Delta H_{VH} = 1,0$ ficou restrita a faixa de pH entre 2,80 e 3,20. Na faixa de pH entre 2,00 e 2,70 a relação $\Delta H_{Cal} / \Delta H_{VH}$ manteve-se em torno de 0,6 o que a princípio imaginamos estar relacionado com um processo de dimerização desta proteína. Para se verificar esta hipótese foram realizados experimentos de desnaturação térmica do Tripsinogênio em pH 2,75 em concentrações variando entre 0,1 a 2,0 mg/ml, e constatamos que mesmo em concentrações extremamente baixas de proteínas a relação $\Delta H_{Cal} / \Delta H_{VH}$ manteve-se em torno de 0,6 (dados não apresentados). Este dado nos permite propor que nesta faixa de pH um dos domínios do Tripsinogênio encontra-se desnaturado, e que possivelmente este seja o primeiro domínio por apresentar uma única ponte dissulfeto. Com relação à desnaturação de um único domínio do Tripsinogênio, devemos lembrar que o hexapeptídeo n-terminal presente na sua estrutura possui quatro aspartatos que nesta

faixa de pH (2,0 a 2,7) provavelmente estejam protonados, desestabilizando assim, este domínio.

Experimentos com β -Tripsina realizados nas faixas de pH variando entre 3,20 e 4,20 a relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ apresentou um declínio de 1 para 0,5 (Figura 26) o que também permite pensar em dimerização.

Para tentar confirmar esta interpretação, experimentos utilizando gel filtração e HPLC foram realizados sob diferentes concentrações de sal, pH e temperatura, no intuito de observar se o volume de eluição variaria, porém o volume de eluição não variou significativamente (dados não apresentados). No entanto, existem dados na literatura sugerindo a dimerização da β -Tripsina em valores de pH em torno de 4,0 (Jaenicke & Rudolph, 1986). Hans-Jürgen (1986) apresentou resultados que confirmam essa dimerização em pH 4,0, e explica que esta seria proveniente da desprotonação de alguns carboxilatos, o que proporcionaria o aparecimento de regiões de interação na superfície das moléculas. A dimerização poderia ser desfeita a partir do momento em que se fazia diluições da solução de proteína. Entretanto Tishchenko & Gorodkov (1979) demonstraram em seus experimentos que a β -Tripsina na faixa de pH entre 2,5 e 4,0 apresentaram relações $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ sempre próximo de 1.

Com o objetivo de confirmarmos nossos resultados realizamos experimentos em pH 3,70 em concentrações de proteínas entre 0,05 a 2,00 mg/ml (Figura 27). E buscamos desenvolver um modelo matemático que ajustasse uma curva de dimerização.

Assumindo-se que na dimerização a proteína apresenta um equilíbrio entre dois monômeros e um dímero, podemos utilizar a constante de dimerização dada pela seguinte equação:

Equação 9:

$$K_D = \frac{[\text{Dimer}]}{[\text{Monomer}]^2} = \frac{(1-f)}{f^2 * [P]}$$

Onde: [P] é a concentração de proteína total e,

f é a fração da proteína total que se apresenta como monômero.

Se resolvermos a equação quadrática em função de f encontraremos um valor positivo e um valor negativo, sendo este último sem significado físico. Para uma relação $\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}}$ observada podemos assumir que:

Equação 10:

$$(\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}})_{\text{obs}} = f * (\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}})_{\text{monomer}} + (1-f) * (\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}})_{\text{dimer}}$$

lembrando que: $(\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}})_{\text{monômero}} = 1,0$ e

$$(\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}})_{\text{dímero}} = 0,5$$

Se combinarmos esta equação com o valor de f podemos obter uma equação de $(\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}})_{\text{obs}}$ em função da concentração de proteína total:

Equação 11

$$: (\Delta H_{\text{cal}} / \Delta H_{\text{vH}})_{\text{obs}} = 0.5 - (1 / 4 * K_D * [P]) + ((1 + 4 * K_D * [P])^{1/2} / (4 * K_D * [P]))$$

Simulações matemáticas indicaram que esta equação limita os valores da equação em 0,5 para valores elevados de concentração de proteínas, e 1,0 para concentrações de proteínas tendendo a zero.

Isto nos mostrou que os dados experimentais não se dispõem de acordo com o modelo matemático proposto e nos induz a acreditar que o processo apresentado pela β -Tripsina na faixa de pH entre 3,0 e 4,2 na realidade não condiz simplesmente com um dimerização, e sim com oligomerização.

Objetivando verificar a influência de agentes estabilizantes e desestabilizantes de proteínas sobre o processo de desnaturação térmica utilizou-se respectivamente o sorbitol e o cloridrato de guanidina.

Sabendo-se que a estabilidade termodinâmica de uma proteína pode ser avaliada através da variação de energia livre entre os estados nativo e desnaturado e que este valor é a função da variação de entropia e entalpia entre as formas nativa e desnaturada, numa determinada temperatura pode-se inferir que o sorbitol em concentrações crescentes aumentou significativamente a estabilidade da Tripsina e do Tripsinogênio. Isso pode ser confirmado através da observação do aumento do ΔH e do T_m no processo de desnaturação. Segundo Shirley (1995) o aumento da estabilidade de uma proteína ocorre quando há aumento da energia de ligação ou quando há diminuição na variação de entropia entre as formas nativa e desnaturada.

Para diminuir a estabilidade conformacional das proteínas utilizamos o cloreto de guanidina como agente desnaturante. Após as análises pode-se observar redução do ΔH e do T_m .

Considerando as diferenças estruturais entre as isoformas, os valores de ΔG obtidos por DSC em pH 3,0 e 298K foram de 5,7 Kcal/mol para a β -Tripsina e 3,5 Kcal/mol para o Tripsinogênio (Figuras 30 e 31), este resultado para β -Tripsina é semelhante ao obtido por Günther, (1998) por desnaturação por adição de uréia ($\Delta G = 6,10 \pm 1,03$ Kcal/mol).

Usando o ciclo termodinâmico e os dados calculados por Günther para a determinação da estabilidade de β -Tripsina em pH 7,0. Temos indícios que o mesmo procedimento poderá ser aplicado ao Tripsinogênio. Finalmente seria interessante avaliar a estabilidade termodinâmica da β -Tripsina em pH = 7,0. Não é possível realizar este experimento no microcalorímetro devido a autólise da forma desnaturada da proteína pela forma nativa (ativa) desta enzima proteolítica. No entanto é possível calcular este valor com auxílio do seguinte ciclo termodinâmico.

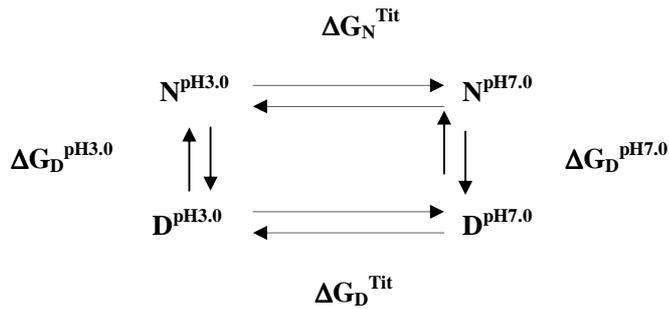


Figura- 37: Ciclo termodinâmico de β -Tripsina onde $\Delta G_D^{\text{pH}=3,00}$ = medida da estabilidade de proteínas em $\text{pH}= 3,00$; $\Delta G_D^{\text{pH}=7,00}$ = estabilidade calculada da proteína em $\text{pH} 7,00$; ΔG_D^{Tit} = variação de energia livre da espécie desnaturada originada de $\text{pH}= 3,00$ para $7,00$; $\Delta G_N^{\text{pH}=7,00}$ = variação de energia livre de titulação da espécie nativa originada de $\text{pH} 3,00$ para $7,00$.

Do ciclo termodinâmico temos :

$$\Delta G_N^{\text{Tit}} + \Delta G_D^{\text{pH} 7,00} = \Delta G_D^{\text{pH} 3,00} + \Delta G_D^{\text{Tit}}$$

$$\therefore \Delta G_D^{\text{pH} 7,00} = (\Delta G_D^{\text{Tit}} - \Delta G_N^{\text{Tit}}) + \Delta G_D^{\text{pH} 3,00}$$

$$\therefore \Delta G_D^{\text{pH} 7,00} = \Delta \Delta G^{\text{Tit}} + \Delta G_D^{\text{pH} 3,00}$$

A titulação da forma nativa desta proteína de $\text{pH} 3,00$ a $\text{pH} 7,00$ é afetado por qualquer mudança reversível no estado da proteína incluindo agregação que ocorre em torno do $\text{pH} 4,5$, e é conhecido que esta enzima é monomérica em pH neutro. No presente estudo foi avaliado que o $\Delta G_D^{\text{pH} 3,00} = 5,71 \pm 0,06 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ a 25°C . O termo $\Delta \Delta G^{\text{Tit}} = 9,51 \pm 0,06 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ foi determinado por Günther et al 1997, quando as formas nativas e desnaturada das enzimas foram independentemente tituladas em do $\text{pH} 7,00$

a 3,00 a 25°C. Baseado neste valor podemos estimar a estabilidade de β -Tripsina em pH 7,00 a 25°C como sendo $15,22 \pm 0,07 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ um valor típico para uma proteína pequena em pH neutro.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Em pH 3,0 as desnaturações térmicas do Tripsinogênio e β -Tripsina são altamente reversíveis.
- Em pHs na faixa de 3,2 a 4,2 a β -Tripsina apresenta-se parcialmente agregadas, enquanto que em pHs variando de 3,0 a 2,0, a β -Tripsina apresenta-se monomérica
- O Tripsinogênio apresenta perfil sugestivo de desnaturação de um dos domínios em pHs variando de 2,9 a 2,0.
- Os ΔC_p de desnaturação térmico do Tripsinogênio e β -Tripsina em pH 3,0, são semelhantes e próximos de 2,6 Kcal/mol/K
- O valor de ΔG de desnaturação térmica da β -Tripsina em pH 3,0 a 298 K é próximo de 6 kcal/mol. O valor em pH 7,0 é igual a 15 Kcal/mol.
- O valor de ΔG de desnaturação térmica do Tripsinogênio está em torno de 3,5 Kcal/mol em pH 3,0 e 298 K.
- O Tripsinogênio é significativamente menos estável que a β -Tripsina em pH 3,0 e 298 K. Este fato deve-se provavelmente, ao acoplamento termodinâmico dos domínios que ocorre no processo de ativação do zimôgeno desta proteína.

7 PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

Baseando-se nos resultados até o momento obtidos temos as seguintes perspectivas:

- Comparar a ocorrência de formas dimerizadas em estudos microcalorimétricos de α e β -Tripsina e Tripsinogênio em pHs variando de 3,2 a 5,0.
- Verificar o comportamento calorimétrico da α , β -Tripsina e Tripsinogênio em pHs entre 1,0 e 2,5, visando desacoplar os dois domínios da proteína.
- Tentar desacoplar os dois domínios com uso de solventes orgânicos e/ou desestabilizantes (Gnd HCl).
- Verificar se com o bloqueio do N-terminal da β -Tripsina a proteína apresentará características termodinâmicas semelhantes ao Tripsinogênio
- Verificar se o Tripsinogênio mais o dipeptídeo Ile-Val apresentam características termodinâmicas semelhantes as da β -Tripsina.
- Verificar se é possível se separar os domínios do Tripsinogênio e de suas isoformas pela proteólise limitada, entre os resíduos 105 e 106.
- Verificar se é possível desacoplar termicamente os domínios do Tripsinogênio e de suas isoformas pela redução seletiva da ponte dissulfeto entre os domínios.
- Determinar a curva potenciométrica do Tripsinogênio entre pH 3,0 e 7,0 (colaboração com o Prof Arno Günther – UFSC)
- Descrever, do ponto de vista termodinâmico, o processo de ativação do Tripsinogênio a β -Tripsina em pH 3,0 e em pH 7,0, à 298K.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITA, J.P., DELAAGE, M., LAZDUNSKI, M. The mechanism of activation of trypsinogen. The role of the four N-terminal aspartyl residues. **Eur. J. Biochem.**, v. 3, p. 314-324. 1969

ANFENSEN, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v. 96, p. 223-230, 1973

ASCENZI, P., MENEGATTI, E., BORLOTTI, F. et al. Steady state and pre-steady state kinetics of the trypsin-catalysed hydrolysis of alpha-CBZ-L-lysine-p-nitrophenyl ester. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 658, p. 158-164, 1991.

ASHTON, D.S., ASHCROFT, A.E., BEDDEH, C.R., et al. On the analysis of Bovine Trypsin by electrospray-mass spectrometry. **Bioch. Bioph. Res. Comun.**; v. 199, p. 694-698; 1994.

BABA, T., KASWABARA, S., WATANABE, K. et al. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 11920-11927, 1989.

BALDWIN, R.L. Experimental studies of pathways of protein folding. **Ciba Found Symp.**, v. 161, p.190-201; discussion 201-5, 1991.

BALDWIN, R.L. The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view. **J. Biomol. N.M.R.**, v. 5, p. 103-109, 1995.

BARRET, D. Zymogen activation as a sensitive enzyme amplifying assays for a protease with tryptic specificity. **Biochem. J.**, v. 117, p. 57-59, 1970.

BARRICK, D., BALDWIN, R.L. Stein and Moore Award address. The molten globule intermediate of apomyoglobin and the process of protein folding. **Protein Sci.**, v. 2, p. 869-876, 1993.

BRANDTS, J.F., HU, C.Q., LIN, L.N., MOS, M.T. A simple model for proteins with interacting domains. Applications to scanning calorimetry data. **Biochemistry**. v. 17, p. 8588-8596, 1989.

BECKTEL, W., SCHELLMAN, J.A. Protein stability curves. **Biopolym.**, v. 26, p. 1859-1877, 1987.

BLOW, D.W., BIRKOFF, J.J., HARTLEY, B.S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. **Nature**, v.221, p.337-340, 1976.

BODE, W., SCHWAGER, P. The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8. Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. **J. Mol. Biol.**, v. 15, p. 693-717, 1975.

BODE, W., FEHLHAMMER, H., HUBER, R. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1,8 angstrom resolution. I data collection, application of patterson search techniques and preliminary structural interpretation. **J. Mol. Biol.**, v.106, p.325-335, 1976.

BODE W, SCHWAGER P, HUBER R. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. **J Mol Biol.** v. 118, p. 99-112, 1978.

BODE, W., CHEN, Z., BRATELS, K. et al. Refined 2^Å X-ray crystal structure of porcine pancreatic Kallikrein A, a specific trypsin like serine proteinase. Crystallization, structure determination, crystallographic refinement, structure and its comparison with bovine trypsin. **J. Mol. Biol.**, v. 164, p. 237-282, 1983.

BRANDTS, J.F., HU, C.G., LIN, L.N. A simple model for proteins with domains. Applications to scanning calorimetry data. **Biochem.**, v. 28, p. 8588-8596, 1989.

BRUMANO, M.H.N., ROGANA, E., SWAUSGOOD, H.E. Thermodynamics of unfolding of β trypsin at pH 2.8. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 382, p. 57-62, 2000.

CARREL, R.W., LOMAS, D.A. Conformational Disease. Abstract. **Lancet**, v. 350, p. 134-138, 1997.

CHAN, H.S., DILL, K.A. Origins of structure in globular proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U SA.**, v. 87, p. 6388-92, 1990.

CHAN, H.S., BROMBERG, S., DILL, K.A. Models of cooperativity in protein folding.

Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., v. 29, p. 61-70, 1995.

CHIANCONE, E. Dynamic and structural properties of the calcium binding site of bovine serine proteases and their zymogens. **J. Mol. Biol.**, v. 185, p. 201-207, 1985.

DAVIE, E.W., NEURATH, H. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. **J. Biol. Chem.**, v. 212, p. 515, 1955.

DAVIE, E.W., FUJIKAWA, K., KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. ABSTRACT. **Biochem.**, v. 30, p. 10363-10370, 1991.

DESNUELLE, P., FABRE, C. Sur la sequence N-terminal du trypsinogene et son ablation pendant l'activation de ce zymogène. **Biophys. Biochem. Acta**, v. 18, p. 49-57.

Braz. J. Med. Biol. Res. v. 19, p. 1-18, 1955.

DIAS, C.L.F. **Estudo cinético da autólise de Tripsina beta bovina: efeito de ions cálcio e de temperatura.** Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, 1986.

DIAS, C.L., ROGANA, E. Autolysis of beta-trypsin at pH 3.0. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19, p. 11-18, 1986

DILL, K.A. Dominant forces in protein folding. **Biochemistry.**, v. 29, p. 7133-55, 1990.

DILL, K.A., CHAN, H.S. From the Levinthal to pathways to funnels. **Nat. Struct. Biol.**, v. 4;p. 10-9, 1997.

DILL, K.A., FIEBIG, K.M., CHAN, H.S. Cooperativity in protein-folding kinetics. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 5, p. 1942-1946, 1993.

FEHLAMMER, A. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1,8 angstrom resolution. **J. Mol. Biol.**, v.111, p.415-438, 1977.

FERSHT, A.R. Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 10869-10873, 1995.

FINN, B.E., CHEN, X., JENNINGS, P.A. et al. Principles of protein stability. **Part 1 – Reversible unfolding of protein engineering – A practical Approach**, A.R. Rees, M.J. Sternberg, R. Wetzel, eds. Oxford University Press, Oxford, 1992.

FOUCAULT, G., SEYDOUX, F., YON, J. Comparative kinetic properties of α , β and ψ forms of trypsin. **Eur. J. Biochem.**, v. 47, p. 295-302, 1974 a.

FOUCAULT, G., KELLERSHOHN, F., SEYDOUX, J.Y. et al. Comparative study of some conformational properties of α , β and ψ forms of trypsin. **Biochem.**, v. 56, p. 1343-1350, 1974 b.

FREIRE, E., MURPHY, K.P., RUIZ, S. et al. The molecular basis of cooperativity in protein folding. Thermodynamic dissection of interactions in phosphoglycerate kinase. **Biochem.**, v 31, p. 250-256, 1992.

FROELICH, C.J., ZHANG, X., TURBOV, J. et al. Human granzyme β degrades proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. **J. Immunol.**, v. 151, p. 7161-7171, 1993.

GÜNTHER, A.R. **Variações de energia livre covalentes e não covalentes na hidrólise catalisada do 4-Nitrofenil-4-Guanidinobenzoato pela β -Tripsina.** Tese Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, 1998.

HANS-JÜRGEN Thermodynamic parameter for protein-protein and protein for interaction in differential scanning microcalorimetry methods in enzymology, **Academic press inc** (London) v. 130, p. 59-78, 1986.

HARTLEY, B.S. Proteolytic enzymes. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 29, p. 45-53, 1960.

HEDSTRON, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chem. Rev.**, v. 102, p 4501-4523, 2002.

HENDERSON, B.R., TANSY, W.P., PHILLIPS, S.M. et al. Transcriptional and post transcriptional activation of urokinase plasminogen activator gene expression in metastatic tumor cell. ABSTRACT. **Cancer Res.**, v. 52, p. 2489-2496, 1992.

HIGAKI, J.N., LIGHT, A. Independent refolding of domains in the pancreatic serine proteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 10606-10609, 1986.

HILSER, V.J. Modeling the native state ensemble. **Methods Mol. Biol.**; v.168, p. 93-116, 2001.

HUBER, R., BODE, W. Structural basis of activation and action of trypsin. **Acc. Chem. Soc.**, v.11, p.114-122, 1978.

INAGAMI, T. **Trypsin**. In: proteins structure and function, v.1, p.1-82, M. Funatsu, K. Hiromi, K. Imahori, T. Murachi, K. Narita eds, Wiley, N. York, 1972.

JACKSON, W., BRANDTS, J. Thermodynamics of protein denaturation. A calorimetric study of the reversible denaturation of chymotrypsinogen and conclusions regarding the accuracy of the two-state approximation. **Biochem.**, v. 9, p. 2294-2301, 1970.

JAENICKE, R. Folding and association of proteins. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**; v. 49, p. 117-237, 1987.

JAENICKE, R. Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. **Biochemistry.**, v. 2, p. 3147-3161, 1991.

JAENICKE, R., LAUFFER, M.A. Determination of hydration and partial specific volume of proteins with the spring balance. **Biochemistry.** 1969 Jul;8(7):3077-82.

JAENICKE, R., RUDOLPH, R. Refolding and association of oligomeric proteins. **In: Methods in Enzymology**, v. 131, p. 218-250, 1986.

KEIL, B. Trypsin. **Enzymes**, third edition, vol.3, chapter .8. Academic Press , New York and London, 1971.

KIM, P.S., BALDWIN, R.L. Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 51, p. 459-489, 1982.

KIM, P.S., BALDWIN, R.L. Intermediates in the folding reactions of small proteins. **Annu. Rev. Biochem.** ;v. 59, p. 631-60, 1990.

KOSSIAKOF, A.A., CHAMBERS, J.L., KAY, L.M et al. Structure of bovine trypsinogen at 1,9 angstrom resolution. **Biochem.**, v. 16, p. 654-664, 1977.

KRAKAUER, D.C., ZANOTTO, A.P.M., PAGEL, M. Prion's progress: patterns and rates of molecular evolution in relation to spongiform disease. ABSTRACT. **J. Mol. Evol.**, v. 47, p. 133-145, 1998.

KRAUT, J. Serine protease: Structure and mechanism of catalysis. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 46, p. 331-358, 1977.

LAURENTS, D.V., BALDWIN, R.L. Protein folding: matching theory and experiment. **Biophys. J.**, v. 1, p. 428-434, 1998.

LESK, A.M., FORDMAN, W.D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Mol. Biol.**, v. 258, p. 501-537, 1996.

MAROUX, S., ROVERY, M., DESNUELLE, P. An autolyzed and still active form of bovine trypsin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 140, p. 377-380, 1967.

MARTINS, N.F. **Purificação, caracterização e determinação da estabilidade termodinâmica de Tripsinogênio e formas ativas de Tripsina.** Tese Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, 1999.

MARTINS, N.F., SANTORO, M.M. Partially folded intermediates during trypsinogen denaturation. **Braz. J. Med. Biolog. Res.**, v. 32, p. 673-682, 1999.

MARTINS, N.F., FERREIRA, E., TORRES, K.C.L., SANTORO, M. M. The denaturation of α,β and ψ bovine Trypsin at pH3.0 : evidence of intermediates. **Protein andPeptides Letters**, v. 10, p. 73-81, 2003.

McDONALD, M., KUNITZ, M. The effect of calcium and other ions on the autocatalytic formation of trypsin from trypsinogen. **J. Gen. Physiol.**, v. 25, p. 53, 1942.

MATHEWS, F. S. X-ray studies of quinoproteins. **Methods Enzymol.**; v. 258, p.191-216, 1995.

NAKAGAWA, S., UMEYAMA, H. Role of catalytic residues in the formation of a tetrahedral adduct in the acylation reaction of bovine beta-trypsin. **J. Mo. Biol.**, v. 179, p. 103-123, 1984.

PACE, N.C. Measuring and increasing protein stability. **Trends Biotechnol.**, v. 8, p. 93-98, 1990.

PENG, Z.Y., WU, L.C., SCHULMAN, B.A., KIM, P.S. Does the molten globule have a native-like tertiary fold? **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 29, p. 43-47, 1995.

PERKINS, S.J. Conformation transition from trypsinogen to trypsin. **J. Mol. Biol.**, v. 138, p. 43-65, 1980.

PRIVALOV, P.L., POTEKHIN, S.A. **Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins.** In: *Methods in Enzymology*, v. 131, p. 4-50, 1986.

PRIVALOV, P.L. Intermediate states in protein folding. **J. Mol. Biol.**, v. 24; p. 707-725 1996.

PRIVALOV, P.L. Thermodynamics of protein folding. **J. Chem. Thermod.**, v.29, p.447-474, 1997.

Protein Data Bank (PDB). www.pdb.ufmg.br

QU, B.H., STRICKLAND, E., THOMAS, P.J. Cystic fibrosis: a disease of altered protein folding. ABSTRACT. **J. Bioenerg, biomem.**, v. 29, p. 483-490, 1997.

REID, K.B. Activation and control of the complement system. **Essays Biochem.**, v. 22, p. 27-68, 1986.

RICHARDS, B. From proteins to protein interacting drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44, p.172-177, 1992.

ROBINSON, N.C., NEURATH, H., WALSH, K.A. The relation of the alpha-amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation. **Biochem.**, v. 12, p. 420-426, 1973.

RUAN, K., LANGE, R., BEC, N. BALNY, C. A stable partly denatured state of trypsin induced by high hydrostatic pressure. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 239, p. 150-154, 1997.

SCHOROEDER, D.D., SCHAW, E. Chromatography of trypsin and its derivatives. Characterization of a new active form of bovine trypsin. **J. Biol. Chem.**, v. 243, p. 2943-2949, 1968.

SHIRLEY, B.A. Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. **Methods Mol. Biol.**, v. 40, p. 177-190, 1995.

SMITH, R.L., SHAW, E. Pseudotrypsin. A modified Bovine Produced by limited autodigestion. **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 1630-1637, 1969.

TAMURA, A., PRIVALOV, P.L. The entropy cost of protein association. **J. Mol. Biology**, v. 273, p.1048-1060, 1997.

TEIXEIRA, A.E. **Purificação e caracterização de uma nova forma ativa de Tripsina bovina**. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG. Brasil. 1977.

TISHCHENKO, V.M., GORODKOV, B.G. Calorimetric study of heat denaturation of beta-trypsin. **Biofizika**, v. 24, p. 334-335, 1979.

VESTLING, M.M., MURPHY, C.M., FENSELAU, C. Recognition of trypsin autolysis products by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 62, p. 2391-2394, 1990.

WALSH, K.A., NEURATH, H. Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins. **P. N. A. S.**, v. 52, p. 884-889, 1964.

WATOREK, K., FARLEY, D., SALVASEN, G. et al. Neutrophil elastase and cathepsin G: structure, function and biological control. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 240, p. 23-31, 1988.