UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

TICIANE FRAGA DAMASCENO

Função de subsítios de uma catepsina digestiva
de *Tenebrio molitor*

Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra
Orientador

Versão original da Dissertação defendida
São Paulo

Data de depósito na SPG:
02/04/2014

TICIANE FRAGA DAMASCENO

Função de subsítios de uma catepsina digestiva
de *Tenebrio molitor*

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

São Paulo

2014

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Walter Ribeiro Terra por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa, compartilhando sua grande experiência na área e proporcionando um ambiente muito favorável ao desenvolvimento da pesquisa.

À Dra. Maria A. Juliano por ter disponibilizado o espaço e recursos de seu laboratório e por ter contribuído na análise dos resultados.

Às Dras. Clélia Ferreira e Adriana Lopes, que possuem grande experiência na área e contribuíram com sugestões experimentais e discussões de resultados.

Aos amigos do laboratório Daniela de Jesus, Fernando, Fillippo Amorosino, Kátia Rebola, Jéssica de Jesus e Milene Janetti. Especialmente aos amigos André Pimentel, Gabriel Oliveira, Nathália Moreira e Walciane Silva, tanto pelas discussões experimentais quanto pelos momentos de descontração.

Aos técnicos Christiane Cardoso, Gilliard Faria, Ivanilde Marcelino, Luci Navarro e D. Margarida pelo apoio a este trabalho.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Biofísica da UNIFESP por terem me recebido tão bem, especialmente à aluna Juliana Oliveira, que contribuiu diretamente na parte experimental deste trabalho.

À Valquiria Souza, quem sempre pude procurar para discutir dúvidas e resultados desde os primeiros experimentos da graduação em Química.

Às amigas Alice e Iris pela já antiga amizade que continua forte após todas as mudanças passamos pela vida.

Ao meu irmão Leonardo, quem sempre considerei como um grande amigo.

Aos meus pais Giselda e Sergio, que sempre trataram meus estudos como prioridade, me incentivando e proporcionando as condições necessárias para que eu aprimorasse meus conhecimentos.

À Daniela da Cunha por todo carinho e dedicação. Seu constante incentivo e apoio e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, à FAPESP e ao INCT pelos auxílios concedidos ao laboratório e novamente ao CNPq, pela bolsa concedida.

RESUMO

Damasceno, T.F. **Função de subsítios de uma catepsina digestiva de *Tenebrio molitor***. 2014. 71p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A catepsina L, uma cisteína proteinase da família da papaína, é a principal proteinase digestiva do besouro *Tenebrio molitor*. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que existem três catepsinas L no intestino médio do *T. molitor*, uma delas é lisossômica (CAL 1) e as outras duas são digestivas (CAL 2 e CAL 3). As estruturas 3D das enzimas digestivas foram recentemente elucidadas. Com o objetivo de estudar em detalhes as propriedades das enzimas digestivas, CAL 3 foi expressa como um zimógeno em *E. coli*, purificada por cromatografia de afinidade e autoativada em meio ácido. Foram realizados ensaios de atividade com 63 peptídeos FRET derivados da sequência Abz-KLRSSKQ-EDDnp em um espectrofluorímetro termostatzado a 30 °C, monitorando-se continuamente a variação de fluorescência em 320 nm (λ_{ex}) e 420 nm (λ_{em}). Os parâmetros k_{cat} e K_M obtidos foram utilizados na determinação da hidrofobicidade dos subsítios (H) e da função de cada subsítio através da razão das energias livres de ativação do complexo enzima-substrato ($\Delta G^\ddagger_T$) e de ligação da enzima com o substrato (ΔG_S). Os resultados mostram que o subsítio S2 está envolvido prioritariamente em catálise e é bastante seletivo para substratos com resíduos hidrofóbicos em P2. Esse subsítio é o mais hidrofóbico dentre os analisados, encontrando-se num bolsão localizado no interior da enzima. O subsítio S'2, por outro lado, é o que apresentou a menor especificidade dentre os analisados. Este subsítio está envolvido prioritariamente na ligação com o substrato e se localiza na superfície da enzima, o que pode facilitar a acomodação de diferentes cadeias laterais em P'2 do substrato, não oferecendo muitas restrições espaciais. O subsítio S1, hidrofílico, não é muito seletivo, o que pode ser consequência de sua localização na superfície da enzima. Esse subsítio está prioritariamente envolvido na ligação com o substrato. O subsítio S'1, assim como S1, está localizado na superfície da enzima, é hidrofílico e não muito seletivo. No entanto, esse subsítio tem papel na catálise além de atuar na ligação do substrato. Numa análise inicial da estrutura 3D deste subsítio, sua função catalítica foi atribuída à presença de parte da cavidade oxiânica. Uma enzima com mutação no resíduo W187, pertencente à cavidade oxiânica e a S'1, foi produzida e purificada, no entanto essa enzima não apresentou atividade. Uma análise mais aprofundada mostrou que a falta de atividade pode ser atribuída ao fato do resíduo de aminoácido mutado fazer parte de um cluster aromático essencial à estabilização da tríade catalítica. Os dados obtidos na caracterização de S'1 e S'2 permitem inferir que a acilação é o passo limitante da reação da CAL 3. Além disso, os resultados deste trabalho mostram que o conceito de hidrofobicidade de subsítios proposto anteriormente pelo grupo parece ser aplicável a subsítios que apresentem especificidades mais restritas.

Palavras-chave: catepsina L-like proteinase, *Tenebrio molitor*, especificidade de substrato, papel de subsítio, hidrofobicidade de subsítio.

ABSTRACT

Damasceno, T.F. **Subsites role of a *Tenebrio molitor* digestive cathepsin**. 2014. 71p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cathepsin L, a cysteine proteinase of the papain family, is the major digestive proteinase in the beetle *Tenebrio molitor*. Previous studies of our group showed that there are three cathepsins L in *T. molitor* midgut, one is lysosomal (CAL1) and two are digestive (CAL2 and CAL3). The 3D structures of the digestive enzymes were recently elucidated. With the aim to study in details the digestive enzymes specificities, CAL3 was expressed in *E. coli* as a zymogen, purified by affinity chromatography and autoactivated in acid conditions. Activity assays were performed in a thermostated spectrofluorometer at 30 °C with 63 FRET peptides derived from the lead sequence Abz-KLRSSKQ-EDDnp, continuously monitoring the fluorescence changes at 320 nm (λ_{ex}) and 420 nm (λ_{em}). The parameters k_{cat} and K_M were used in the determination of subsite hydrophobicity (H) and subsite role based on the ratio of complex enzyme-substrate activation energy ($\Delta G_T^\ddagger$) and free energy of substrate binding (ΔG_s). The data obtained suggest that the S2 is mainly involved in catalysis and is very selective to substrates with hydrophobic residues in P2. This subsite is the most hydrophobic among the analyzed and is located in a pocket in the enzyme interior. S'2, on the other hand, is the less selective subsite and is mainly involved in substrate binding and is located on the enzyme surface, what can ease the accommodation of different side chains located in P'2 by not imposing many spatial restrictions. S1, is hydrophilic and not very selective, what may be a consequence of its location on the enzyme surface. This subsite is mainly involved in substrate binding. S'1, just like S1, is located on the enzyme surface, is hydrophilic and not very selective. However this subsite has a role in catalysis besides the role in substrate binding. In an initial 3D structure analysis its catalytic function was attributed to the presence of a part of the oxyanion hole. An enzyme with mutation in the residue W187, which apparently belonged both to the oxyanion hole and S'1, was produced and purified, but this enzyme was inactive. A better analysis showed that the lack of activity can be attributed to the fact that the mutated residue belongs to an aromatic cluster that is essential to the catalytic triad stabilization. The data obtained in S'1 and S'2 characterization suggest that acylation is the limiting step in CAL 3 reaction. The results presented in this work support the concept of subsite hydrophobicity previously proposed by our group, which seems to be true to subsites with more restrict specificities.

Keywords: cathepsin L-like proteinase, *Tenebrio molitor*, substrate specificity, subsite role, subsite hydrophobicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELO GENERALIZADO DO INTESTINO DOS INSETOS.	13
FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA DIGESTÃO DE PROTEÍNAS.....	15
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DO SÍTIO CATALÍTICO DE UMA CISTEÍNA PROTEINASE.	16
FIGURA 4 - ESQUEMA DA NOMENCLATURA UTILIZADA PARA A INTERAÇÃO DE UMA PROTEINASE COM SEU SUBSTRATO.	20
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS SUBSÍTIOS DE UMA PROTEINASE COM UM SUBSTRATO CROMOGÊNICO OU FLUOROGÊNICO.....	22
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS SUBSÍTIOS DE UMA PROTEINASE COM UM SUBSTRATO FRET.	23
FIGURA 7 - MAPA DO PLASMÍDEO UTILIZADO NA EXPRESSÃO DA PCAL 3.	27
FIGURA 8 - ANÁLISE EM SDS-PAGE DA INDUÇÃO E DA PURIFICAÇÃO DA PCAL 3.....	38
FIGURA 9 - TESTE DE ATIVIDADE DA CAL 3 PRODUZIDA.....	38
FIGURA 10 - ESTRUTURA DOS SUBSÍTIOS S2, S1, S'1 E S'2 DA CAL 3.....	40
FIGURA 11 - CURVA DE TITULAÇÃO ENZIMÁTICA DA CAL 3 COM EDTA.	41
FIGURA 12 - RAZÃO ENTRE $\Delta G^{\ddagger}_T$ E ΔG_S OBTIDA PARA CADA SUBSTRATO COM VARIAÇÕES EM P1.	44
FIGURA 13 - RAZÃO ENTRE $\Delta G^{\ddagger}_T$ E ΔG_S OBTIDA PARA CADA SUBSTRATO COM VARIAÇÕES EM P2.	46
FIGURA 14 - RAZÃO ENTRE $\Delta G^{\ddagger}_T$ E ΔG_S OBTIDA PARA CADA SUBSTRATO COM VARIAÇÕES EM P'2.	48
FIGURA 15 - RAZÃO ENTRE $\Delta G^{\ddagger}_T$ E ΔG_S OBTIDA PARA CADA SUBSTRATO COM VARIAÇÕES EM P'1.	50
FIGURA 16 - MECANISMO DE CATÁLISE DE UMA CISTEÍNA PROTEINASE.	51
FIGURA 17 - SUBSÍTIO S'1 DA CAL3.	53
FIGURA 18 - ALINHAMENTO DA CAL 3 E DO MUTANTE PCAL3 W187A.....	54
FIGURA 19 - ANÁLISE EM SDS-PAGE DA INDUÇÃO E DA PURIFICAÇÃO DA PCAL 3 W187A	55
FIGURA 20 - TESTE DE ATIVIDADE DA PCAL 3 W187 PRODUZIDA.	55
FIGURA 21 - RESÍDUOS PERTENCENTES AO CLUSTER AROMÁTICO DA CAL 3.....	56
FIGURA 22 - HIDROFOBICIDADES CALCULADAS PARA OS SUBSÍTIOS DA CAL 3.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VALORES DE PH EM DIFERENTES PORÇÕES DO INTESTINO DA LARVA DE <i>T. MOLITOR</i>	18
TABELA 2 - INICIADORES ESPECÍFICOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DA PCAL 3.	26
TABELA 3 - SUBSTRATOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DAS ESPECIFICIDADES DOS SUBSÍTIOS S1, S2, S'1 E S'2 DA CAL 3.	32
TABELA 4 - INICIADORES ESPECÍFICOS UTILIZADOS NA INSERÇÃO DE MUTAÇÃO NA PCAL 3.	36
TABELA 5 - PARÂMETROS OBTIDOS NA CARACTERIZAÇÃO DE S1.....	43
TABELA 6 - PARÂMETROS OBTIDOS NA CARACTERIZAÇÃO DE S2.....	45
TABELA 7 - PARÂMETROS OBTIDOS NA CARACTERIZAÇÃO DE S'2.....	47
TABELA 8 - PARÂMETROS OBTIDOS NA CARACTERIZAÇÃO DE S'1.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz: ácido *orto*-aminobenzóico

Carb: carbenicilina

CAL 2: catepsina L 2 de *Tenebrio molitor*

CAL 3: catepsina L 3 de *Tenebrio molitor*

cDNA: DNA complementar

ΔG_b : contribuição da porção compartilhada do oligopeptídeo na energia livre de ligação do substrato.

$\Delta G_{ES}^\ddagger$: energia livre de ativação dos passos de reação necessários para a formação e a quebra de ligações.

ΔG_R : contribuição da porção variável do oligopeptídeo na energia livre de ligação do substrato.

ΔG_S : energia livre de ligação do substrato.

$\Delta G_T^\ddagger$: energia livre total de ativação.

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DTT: ditioneitol

E-64: L-trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido (4-guanidinobutano)

EDDnp: N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FRET: transferência de energia por ressonância de Förster

h : constante de Planck

HCl: ácido clorídrico

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

k_B : constante de Boltzmann

k_{cat} : constante catalítica

K_M : constante de Michaelis

MALDI-TOF: espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz

LB: meio de cultura Luria-Bertani

NaCl: cloreto de sódio

pCAL 1: pró-catepsina L 1 de *Tenebrio molitor*

pCAL 2: pró-catepsina L 2 de *Tenebrio molitor*

pCAL 3: pró-catepsina L 3 de *Tenebrio molitor*

PCR: reação em cadeia da polimerase

PMSF: fluoreto de fenilmetanosulfonila

SDS: dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

T: temperatura

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

UAF: unidade arbitrária de fluorescência

V_i/V_o : velocidade remanescente

V_M : velocidade máxima de reação

Z-FR-MCA: carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
1.1 - Considerações gerais	12
1.2 - Digestão de proteínas.....	14
1.3 - Cisteína proteinases	16
1.4 - Catepsinas L de <i>Tenebrio molitor</i>	17
1.5 - Substratos para caracterização de proteinases	20
1.6 - Determinação do papel de subsítios de uma enzima	23
2 - OBJETIVOS.....	25
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 - Transformação de bactérias competentes	26
3.2 - Seleção das colônias de bactéria para expressão da proteína de interesse	27
3.3 - Expressão da proteína recombinante	28
3.4 - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	29
3.5 - Lise das células induzidas	29
3.6 - Purificação da proteína recombinante.....	30
3.7 - Teste de atividade	31
3.8 - Ensaios cinéticos com peptídeos FRET	31
3.9 - Titulação da CAL 3 com E-64	32
3.10 - Determinação da energia livre total de ativação e da energia livre de ligação com o substrato dos subsítios analisados	34
3.11 - Cálculo da hidrofobicidade dos subsítios da CAL 3	35
3.12 - Análise da estrutura tridimensional da CAL 3	35
3.13 - Obtenção do mutante pCAL 3 W187A	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 - Obtenção da proteína recombinante.....	37
4.2 – Determinação estrutural dos subsítios da CAL 3.....	39
4.3- Titulação da CAL 3 com E-64	40
4.4 - Caracterização cinética dos subsítios da CAL 3	42
4.4.1 - Subsítio S1	42
4.4.2 - Subsítio S2.....	44
4.4.3 - Subsítio S'2	46
4.4.4 - Subsítio S'1	48
4.5 – Etapa cineticamente limitante no caminho da reação	51
4.6 - Obtenção do mutante pCAL 3 W187A	52

4.7 - Relação estrutura-função dos subsítios da CAL 3	56
5 - CONCLUSÕES	60
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
Apêndice I	66
Apêndice II	68
Apêndice III	69

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais

Os insetos representam 75% das espécies animais conhecidas (Grimaldi e Engel 2005) e estão adaptados à vida em diferentes ambientes, exercendo importantes funções para a manutenção do ecossistema, como polinização de plantas e degradação de matéria orgânica. No entanto, alguns insetos, considerados pragas, podem ser prejudiciais aos homens. Estima-se que o prejuízo no Brasil causado por insetos-praga seja de aproximadamente 1,6 bilhões de dólares anuais (Oliveira et al., 2013), considerando-se apenas a destruição de plantações e alimentos armazenados. Além disso, insetos são vetores de diversas doenças (Gillot, 1995), que podem afligir tanto plantações e criações animais quanto a população em geral.

Desde a metade do século XX, foram desenvolvidos diferentes inseticidas sintéticos (organoclorados, em sua maioria) que permitiram o controle de insetos-praga. O uso do DDT, um composto de alta eficiência no controle de diversos artrópodes, permitiu, dentre outras coisas, o fim da malária endêmica em regiões da Europa (Godfray, 2013), rendendo a Paul Müller um Prêmio Nobel em Medicina em 1948 pelo descobrimento dessa propriedade do composto. No entanto, pouco depois de uma década de uso de inseticidas sintéticos, começaram a surgir estudos sobre os impactos ambientais causados pelo uso indiscriminado dessa estratégia de controle. Desde então, houve uma constante busca por novas tecnologias que fossem eficientes no controle de pragas e que causassem um menor impacto

ambiental. O controle de insetos-praga é, portanto, um desafio econômico, social e ambiental.

O tubo digestório de um inseto representa uma grande área de interface deste com seu ambiente e, por não ser recoberto de quitina, é relativamente desprotegido, podendo ser um alvo para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle de pragas. Dessa forma, nos últimos anos houve uma intensificação nos estudos sobre a fisiologia digestiva de insetos (Terra e Ferreira, 2005).

O intestino dos insetos pode ser dividido, de forma geral, em três porções: anterior, média e posterior, como apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Modelo generalizado do intestino dos insetos (Figura adaptada de Terra e Ferreira (1994)).

O intestino anterior consiste em boca, faringe, esôfago, papo e pró-ventrículo, sendo revestido por cutícula, o que o torna impermeável a moléculas hidrofílicas. O papo é um local de armazenamento de alimentos presente em alguns insetos, onde pode ocorrer também digestão inicial. O pró-ventrículo é capaz de triturar o alimento ingerido, mas, no caso de muitos insetos, essa estrutura funciona apenas como uma válvula que controla a entrada de alimentos no intestino médio.

O intestino médio é o principal local de digestão e absorção de nutrientes, sendo composto por um ventrículo, podendo conter ceco e membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em espaço endoperitrófico e espaço ectoperitrófico. Ao longo dessa porção do intestino são produzidas proteinases, carboidrases e lipases envolvidas na digestão do alimento ingerido.

O intestino posterior pode ser um tubo fino ou pode conter uma câmara de fermentação, armazenando alimento e abrigando microorganismos que participam da digestão. Ele contém túbulos de Malpighi, íleo, cólon, reto e ânus. Os túbulos de Malpighi estão localizados no início desta porção do intestino. A absorção de água e íons ocorre no reto (Terra e Ferreira, 2009).

1.2 - Digestão de proteínas

A digestão de proteínas é promovida por enzimas que apresentam diferentes características e especificidades, hidrolisando desde as ligações peptídicas expostas nas proteínas obtidas na dieta até a ligação peptídica entre dois resíduos de aminoácidos, gerando então aminoácidos livres que podem ser transportados ao citosol por transportadores específicos. Um esquema geral da digestão de proteínas está apresentado na Figura 2, destacando os tipos de enzima que atuam no processo e seus substratos.

Figura 2 - Esquema representativo da digestão de proteínas.

A digestão inicial das proteínas ingeridas consiste na hidrólise de suas ligações peptídicas expostas por ação das endopeptidases digestivas, que são divididas nas subclasses serina, cisteína e aspártico proteinases. Essa classificação considera as diferenças no sítio ativo de cada enzima e, portanto, no seu mecanismo catalítico. A digestão intermediária é mediada pelas exopeptidases, que atuam removendo aminoácidos das porções N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) dos oligopeptídeos formados pelas endopeptidases, liberando um resíduo de aminoácido a cada ciclo catalítico. A digestão final consiste na hidrólise da ligação peptídica dos dipeptídeos resultantes. Essa etapa pode ser promovida pela ação de dipeptidases ou mesmo de algumas aminopeptidases (Terra e Ferreira, 2005).

1.3 - Cisteína proteinases

Cisteína proteinases são endopeptidases que apresentam um resíduo catalítico de cisteína que media a hidrólise do grupo carboxílico de uma ligação peptídica suscetível via ataque nucleofílico. Todas as cisteína proteinases possuem também uma espécie doadora e aceptora de próton, papel desempenhado por um resíduo de histidina. Algumas famílias de cisteína proteinases dependem também de um terceiro resíduo, que exerce função de orientação do anel imidazólico da histidina (Barrett et al., 2004). A Figura 3 mostra a configuração do sítio catalítico de uma cisteína proteinase. Pode-se observar que a cadeia lateral da histidina interage com o hidrogênio ligado ao enxofre da cisteína. Dessa forma, esse resíduo adquire carga parcial negativa, tornando-se mais reativo para o ataque nucleofílico.

Figura 3 - Representação do sítio catalítico de uma cisteína proteinase.

As cisteína proteinases são classificadas em famílias e clãs. São agrupadas numa mesma família enzimas que apresentam grande similaridade em suas sequências primárias correspondentes à enzima inteira ou somente à região responsável pela catálise. Clãs são formados por famílias que apresentam sinais de relação evolutiva (Barrett et al., 2004).

Catepsinas são cisteína proteinases bastante conhecidas por seu envolvimento em degradação de proteínas no lisossomo (Barrett, 1992). Por motivos históricos, proteinases intracelulares foram chamadas de catepsinas, no entanto não

existe uma regra que associe a esse nome o mecanismo de reação ou localização da enzima. Atualmente sabe-se que todas as cisteína proteinases lisossomais são catepsinas, mas nem todas as catepsinas são lisossomais ou cisteína proteinases (Turk e Guncar, 2003). Dentre as cisteína proteinases, as catepsinas lisossomais B, H e L são as mais importantes em animais. As duas primeiras apresentam, além da atividade de endopeptidase, atividade de peptidil dipeptidase e de aminopeptidase, respectivamente, enquanto a terceira apresenta apenas atividade de endopeptidase (Barrett et al., 2004).

As catepsinas lisossomais são sintetizadas no retículo endoplasmático como pré-pró-enzimas, com a remoção do peptídeo-sinal ocorrendo durante a translocação da proteína nesta organela, originando pró-enzimas. O pró-peptídeo, localizado na porção N-terminal dessas catepsinas, é um inibidor de atividade que atua também como uma chaperona intramolecular, tendo um importante papel no enovelamento correto da enzima (Yamamoto et al., 1999). Essa estrutura é removida nos lisossomos por clivagem proteolítica, expondo o sítio catalítico da catepsina ativa resultante (Turk et al., 2000). *In vitro*, a pró-catepsina pode ser ativada pela ação de diferentes proteinases, como catepsina D ou pepsina, ou mesmo por processamento autocatalítico em meio ácido (Turk et al., 2001).

1.4 - Catepsinas L de *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor, também conhecido como verme da farinha, é um inseto pertencente à ordem dos Coleoptera que é praga de grãos e farelos estocados (Richards e Davies, 1977). Esta é considerada uma praga secundária, pois suas

larvas se desenvolvem do lado de fora de grãos, alimentando-se continuamente de cereais quebrados ou moídos, sendo incapazes de se alimentar de grãos intactos (Phillips e Throne, 2010).

As larvas de *T. molitor* não possuem enzimas salivares, portanto todo o processo digestivo ocorre sob ação das hidrolases produzidas no intestino médio (Terra et al., 1985). Em larvas dessa espécie, a secreção das diversas proteinases presentes no tubo digestivo ocorre em resposta à alimentação (Dadd, 1956).

O pH do conteúdo intestinal é uma propriedade importante do ambiente interno que afeta as enzimas digestivas. No intestino de insetos, o pH normalmente encontra-se na faixa entre 6 e 7,5. A Tabela 1 apresenta os valores de pH medidos nas diferentes porções do intestino do *T. molitor* (Terra et al., 1985). Na porção posterior do intestino médio, que é alcalina, são encontradas as principais serina proteinases envolvidas na digestão, que são a tripsina e a quimotripsina. Já a atividade de cisteína proteinase pode ser encontrada na porção anterior do intestino médio, que é ácida. Testes de estabilidade mostraram que essa enzima não é estável em meios mais alcalinos, como na região posterior do intestino médio (Terra e Cristofolletti, 1996).

Tabela 1 - Valores de pH em diferentes porções do intestino da larva de *T. molitor*.

Intestino anterior	Intestino médio anterior	Intestino médio posterior	Reto
6,0	5,6	7,9	6,4

Por muito tempo, as serina proteinases foram as únicas proteinases de intestino de inseto caracterizadas, embora já houvessem indícios de que enzimas similares às catepsinas de mamíferos poderiam também estar presentes (Gooding, 1969). Diferentemente do que é observado em outras espécies, no *T. molitor* (em

outros insetos da infraordem Cucujiformia de Coleoptera e em Hemiptera) cisteína e serina proteinases atuam na digestão de alimentos (Terra e Ferreira, 1994). Uma hipótese para explicar essa característica é que ela seja uma adaptação de um besouro ancestral da infraordem Cucujiformia à ingestão de alimentos que continham inibidores naturais de serina proteinases. Dessa forma, suas cisteína proteinases continuariam ativas após a alimentação, permitindo a digestão de proteínas (Terra e Cristofolletti, 1996).

Catepsinas L como enzimas digestivas são muito raras e só encontradas em poucos animais, como aranhas e insetos. Essas enzimas são endopeptidases que clivam preferencialmente ligações com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em P2 (Barrett et al., 2004). Em insetos, as catepsinas L são as únicas cisteína proteinases digestivas quantitativamente importantes. Em *T. molitor*, a enzima é instável no pH encontrado no intestino médio posterior (Terra e Cristofolletti, 1996).

No intestino do *Tenebrio molitor* estão presentes três diferentes catepsinas L. Duas delas são expressas somente em seu intestino médio (pCAL 2 e pCAL 3) e a outra é uma enzima constitutiva (pCAL 1), expressa também em outros tecidos. Anticorpos produzidos a partir de pCAL 1 recombinante reconheceram também a pCAL 2, mas com menor afinidade. Ensaios de imunocitocalização mostraram que é possível encontrar pCAL 1 em diversos tecidos, confinada em lisossomos, desempenhando possivelmente um papel de degradação proteolítica. A pCAL 2 foi encontrada no conteúdo luminal e em grandes vesículas, presentes principalmente no intestino médio anterior. Essas vesículas estão também envolvidas na secreção de amilase por um mecanismo apócrino (Cristofolletti et al., 2005).

A CAL 2 corresponde à catepsina já anteriormente isolada do conteúdo intestinal, sendo portanto a enzima digestiva principal, enquanto a CAL 3 é uma enzima digestiva minoritária. Tanto a pCAL 2 quanto a pCAL 3 tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas (Beton et al., 2012), possibilitando o estudo funcional das enzimas, relacionando os dados obtidos com a estrutura 3D das proteínas, o que significaria um grande avanço no conhecimento dessas enzimas.

1.5 - Substratos para caracterização de proteinases

O sítio ativo de uma proteinase pode ser dividido em diferentes subsítios, cada um acomodando um resíduo de aminoácido do substrato. Os resíduos de aminoácidos do substrato localizados na porção N-terminal do peptídeo hidrolisado são nomeados P1, P2, P3 etc., os subsítios que interagem com esses resíduos são nomeados S1, S2, S3, respectivamente. Já os resíduos localizados na porção C-terminal do substrato hidrolisado são nomeados P'1, P'2, P'3 etc., interagindo com os subsítios S'1, S'2, S'3 etc. A Figura 4 representa o sítio ativo de uma proteinase interagindo com o seu substrato, indicando a nomenclatura proposta por Schechter e Berger (1967).

Figura 4 - Esquema da nomenclatura utilizada para a interação de uma proteinase com seu substrato.

A caracterização de uma proteinase utilizando seu substrato natural é uma tarefa complexa. Uma proteína pode ter massa relativamente grande, sendo clivada pela enzima em mais de um local com eficiências diferentes, dependendo da composição de aminoácidos nas vizinhanças. Havendo um conhecimento prévio da estrutura do sítio catalítico e das interações dele com substratos e inibidores naturais (Cohen et al., 1991), essa grande complexidade no sistema pode ser evitada. Foram desenvolvidos peptídeos sintéticos de baixa massa molecular que simulam os requerimentos de especificidade da enzima e são clivados em apenas um ponto pela proteinase em estudo (Irving et al., 1941; Neurath, 1999).

Substratos cromogênicos simplificam ainda mais essa tarefa. Esse tipo de substrato, quando hidrolisado, libera um produto colorimétrico cujo espectro de absorção de luz difere do apresentado pelo substrato intacto. Dessa forma, o uso desse tipo de substrato facilita a medida quantitativa da hidrólise enzimática, que pode ser monitorada pela absorbância do produto colorimétrico. Substratos fluorescentes também foram desenvolvidos (Zimmerman et al., 1977), possibilitando a vantagem de se aumentar a sensibilidade da detecção do produto formado e de se utilizar uma menor quantidade de proteinase nos ensaios, já que nem sempre a enzima pode ser facilmente obtida. Os primeiros substratos cromogênicos específicos para a caracterização de cisteína proteinases foram desenvolvidos no final da década de 1980 (Fukal e Kasafirek, 1988).

Esses substratos sintéticos descritos possuem a estrutura apresentada na Figura 5. Como é possível observar, esse tipo de substrato permite a caracterização dos subsítios da enzima que interagem com os resíduos de aminoácidos localizados na porção N-terminal do substrato clivado, apresentando a desvantagem de não

permitir a caracterização dos subsítios que interagiriam com a porção C-terminal desse substrato.

Figura 5 - Representação da interação dos subsítios de uma proteínase com um substrato cromogênico ou fluorogênico.

A caracterização dos subsítios de uma proteínase que interagem com ambas as porções do substrato clivado é possível utilizando peptídeos FRET. Esse tipo de substrato, representado na Figura 6, possui um grupo fluorescente ligado a um resíduo de aminoácido do peptídeo, transferindo energia por um mecanismo ressonante a um acceptor ligado a um outro resíduo (Förster, 1948). Para o apagamento de fluorescência ocorrer, o espectro de emissão do fluoróforo deve se sobrepor ao espectro de absorção do acceptor e esses dois grupos devem estar relativamente próximos (Sapsford et al., 2006). Com a clivagem do peptídeo pela proteínase em estudo, há um aumento na distância entre o grupo fluorescente e o acceptor, impedindo o apagamento da fluorescência. Desse modo, a atividade da enzima pode ser acompanhada pelo monitoramento da fluorescência na reação (Carmona et al., 2009). Esse tipo de substrato é bastante apropriado para a caracterização de endopeptidases, por permitir a análise da especificidade de cada subsítio da enzima de acordo com sua interação com um respectivo resíduo de aminoácido do substrato (Schechter e Berger, 1967).

Figura 6 - Representação da interação dos subsítios de uma proteínase com um substrato FRET.

Substratos de fluorescência apagada específicos para cisteína proteínases foram desenvolvidos através de estudos com peptídeos derivados de cistatinas, inibidores proteicos de cisteína proteínase que interagem com grandes áreas da enzima, bloqueando seu sítio ativo (Abrahamson et al., 1987; Gauthier et al., 1993).

1.6 - Determinação do papel de subsítios de uma enzima

Em uma reação enzimática, a enzima liga-se melhor ao estado de transição do processo que catalisa que ao seu substrato, aumentando dessa forma a velocidade da reação. Existem na enzima regiões funcionais que podem contribuir energeticamente na estabilização de grupos do substrato que não sofrem rearranjos de carga durante a catálise ou podem atuar na ligação com o estado de transição, estabilizando as mudanças estruturais e eletrônicas associadas à quebra e à formação de ligações (Albery e Knowles, 1977). No entanto, alguns grupos funcionais da enzima podem contribuir das duas formas, participando com diferentes eficiências na estabilização do complexo enzima-substrato no estado fundamental e no estado de transição (Narlikar e Herschlag, 1998).

Marana et al. (2002) propuseram uma maneira de se determinar através de parâmetros cinéticos a função (n) dos diferentes subsítios que compõem o sítio ativo de uma enzima a partir dos parâmetros energia livre de ligação com o substrato (ΔG_S) e energia total de ativação ($\Delta G_T^\ddagger$), obtidos para uma série de substratos compostos pela mesma sequência de aminoácidos, exceto pela cadeia lateral do aminoácido da posição variável. A equação proposta, apresentada em [1] e deduzida no Apêndice I, mostra que é possível a estimativa da função de um subsítio (n) a partir de uma correlação linear de ΔG_S e $\Delta G_T^\ddagger$.

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_{ES}^\ddagger + n\Delta G_S + \Delta G_b(1 - n) \quad [1]$$

Ao se traçar os valores de $\Delta G_T^\ddagger$ em função de ΔG_S , é obtida uma reta cuja inclinação (n) indica a razão entre a energia livre total de estado de transição e a energia livre de ligação do subsítio com o substrato (Marana et al., 2002). Assim, a reta obtida na análise de um subsítio envolvido somente com a ligação do substrato apresentaria inclinação zero, enquanto uma inclinação de reta maior que 1 seria esperada para um subsítio envolvido na estabilização do estado de transição. Dessa forma, as funções de cada subsítio de uma enzima podem ser determinadas, sendo possível que um dado subsítio apresente função tanto de estabilizar o estado de transição quanto de ligar o substrato.

2 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi determinar a função de cada subsítio da enzima CAL 3 digestiva de *T. molitor*, utilizando substratos FRET e considerações teóricas termodinâmicas. Outro objetivo foi a avaliação do conceito de hidrofobicidade de subsítios através dos dados empíricos e da estrutura 3D disponível.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Transformação de bactérias competentes

O inserto codificante da pCAL 3, ligado ao plasmídeo pAE (Ramos et al., 2004) previamente ao início deste trabalho, foi obtido por PCR, a partir de uma biblioteca de cDNA de intestino de *Tenebrio molitor*. Na reação para amplificação do segmento de interesse, foram utilizados os iniciadores específicos apresentados na Tabela 2, que contém sítios de restrição para endonucleases.

Tabela 2 - Iniciadores específicos utilizados na amplificação da sequência da pCAL 3.

Iniciador específico	Sequência de nucleotídeos
FW – Sítio de restrição para Pst I	5' AACTGCAGCCTGCCAAAATCGCTCTTCC 3'
RV – Sítio de restrição para Hind III	5' CCCAAGCTTTTACAAAGCAGGTATGAAGCAG 3'

Os nucleotídeos sublinhados compõem a região de reconhecimento pelas enzimas de restrição utilizadas e não pertencem à sequência codificadora da pCAL 3. O códon destacado é o de terminação da tradução.

Para a obtenção da construção pCAL 3 / pAE, apresentada na Figura 7, tanto o fragmento de interesse, amplificado por PCR, quanto o vetor pAE foram digeridos pelas endonucleases Pst I e Hind II e ligados utilizando a enzima DNA ligase. O plasmídeo foi replicado em cepa XL1-Blue MRF' (Stratagene) e estocado a -20 °C até o início deste trabalho.

Figura 7 - Mapa do plasmídeo utilizado na expressão da pCAL 3.

Aproximadamente 25 ng de plasmídeo pCAL 3 / pAE foram utilizados para transformar 50 μ L de uma suspensão de bactérias competentes *Escherichia coli*, cepa Origami(DE3) (Novagen), previamente ativadas por cálcio e estocadas a - 80 °C. O conjunto foi mantido em gelo por 30 minutos, submetido a um choque térmico a 42 °C por 1 minuto e depois mantido novamente em gelo por 2 minutos. Após esse procedimento, foram adicionados 0,5 mL do meio de cultura LB líquido (Bertani, 1951) e o conjunto foi mantido por 1 hora a 37°C, para acondicionamento celular. Uma alíquota de 100 μ L e outra de 400 μ L foram plaqueadas em LB-ágar, contendo carbenicilina numa concentração de 50 mg/L. As placas foram mantidas a 37 °C por 16 horas.

3.2 - Seleção das colônias de bactéria para expressão da proteína de interesse

Colônias das placas de LB-ágar contendo o plasmídeo com o inserto de interesse foram selecionadas por PCR, utilizando-se iniciadores específicos para a

sequência pCAL 3, apresentados na Tabela 2. Os clones foram crescidos sob agitação de 180 rpm por 16 horas a 37 °C, em aproximadamente 5 mL de LB líquido contendo carbenicilina numa concentração de 50 mg/L.

A reação de PCR foi realizada aquecendo-se os tubos por 10 minutos a 94 °C, para rompimento da parede celular das bactérias, seguida por uma repetição de 30 ciclos de aquecimento a 94 °C, para desnaturação da fita dupla de DNA, resfriamento a 60 °C, para anelamento dos iniciadores específicos, e aquecimento a 72 °C, para polimerização dos nucleotídeos. As amostras foram analisadas sob luz na frequência ultravioleta em gel de agarose 1% (m/V), após tratamento deste com brometo de etídeo.

3.3 - Expressão da proteína recombinante

Os clones foram transferidos a frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 100 mL de LB líquido com 50 mg/L de carbenicilina, crescidos a 20 °C, sob agitação de 180 rpm, até que a absorbância do meio em 600 nm estivesse compreendida no intervalo de 0,5 a 0,9. Foi retirada uma alíquota de 1 mL para análise em SDS-PAGE, denominada “Não-Induzido”. Os clones foram então induzidos com IPTG em concentração final de 0,5 µM a 20 °C por aproximadamente 20 horas sob agitação (180 rpm). Foi retirada outra alíquota de 1 mL para análise denominada “Induzido”. As células restantes foram transferidas a tubos Falcon de 50 mL e sedimentadas por centrifugação a 1500 x g por 30 min, a 4 °C. A expressão da proteína recombinante foi verificada por SDS-PAGE das alíquotas reservadas.

3.4 - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As alíquotas de material “Não-Induzido” e “Induzido” foram centrifugadas por 5 minutos a 11.300 x g e 4 °C. As células sedimentadas foram ressuspensas em um tampão de amostra composto por Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (m/v), β -mercaptoetanol 120 mM e azul de bromofenol 0,001% (m/v). As amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 12% (m/v) contendo SDS 1% (m/v) (Laemmli, 1970). Foi aplicada uma diferença de potencial de 200 volts entre os eletrodos por aproximadamente 50 minutos. O gel foi tratado com Coomassie Blue ou com nitrato de prata (Blum et al., 1987) para revelação das bandas de proteínas.

3.5 - Lise das células induzidas

As células sedimentadas em cada tubo Falcon foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise, composto por Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, glicerol 10% (v/v) e PMSF 1 mM. O material foi então sonificado com 3 pulsos de 15 segundos em *output 3* (sonificador *Branson*, com microtip), intercalados com imersões por 1 minuto em gelo. Em seguida, o material foi centrifugado por 30 minutos a 11.300 x g a 4 °C. A presença da proteína recombinante nas frações resultantes foi verificada por SDS-PAGE e o material foi estocado a -20 °C, para posterior purificação.

3.6 - Purificação da proteína recombinante

A Figura 7 mostra que a sequência codificadora da proteína recombinante foi inserida no plasmídeo de forma que os seis resíduos de histidina são inseridos na porção N-terminal da pCAL 3 durante a tradução. A resina utilizada na purificação, Ni²⁺-NTA (Qiagen), permite a purificação de proteínas que possuam resíduos de histidina expostos através da complexação dos anéis imidazólicos presentes na cadeia lateral desse aminoácido com o níquel (II), imobilizado na resina. As proteínas imobilizadas dessa forma na resina podem ser novamente liberadas em solução ao se adicionar concentrações crescentes de imidazol ao meio, que compete com essas proteínas pela complexação com o níquel (II).

Para 1 mL de sobrenadante obtido, foram utilizados 200 µL da resina previamente equilibrada com tampão de lise. O conjunto foi mantido sob fraca agitação por 1 hora a 4 °C. O material que não interagiu com a resina foi recolhido e em seguida foram realizadas 5 lavagens com 750 µL de tampão de lise, seguidas de centrifugação a 11.300 x g por 1 minuto. A proteína foi eluída da resina com tratamento com tampão de lise contendo imidazol 300 mM por 15 minutos em gelo, seguido por centrifugação e recolhimento do purificado. O material eluído foi aplicado na coluna HiTrap Desalting (GE) previamente equilibrada com tampão de lise sem imidazol para a remoção desse sal. Em seguida, o material foi aplicado novamente na resina de níquel, com o objetivo de se removerem proteínas contaminantes.

3.7 - Teste de atividade

A ativação da pro-enzima recombinante foi realizada em incubação por 1 hora a 37 °C em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0, DTT 2 mM e EDTA 2 mM.

A CAL 3 foi ensaiada a 30 °C, utilizando-se como substrato Z-FR-MCA 10 μ M (concentração no ensaio), em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0, contendo cisteína 3 mM e EDTA 3mM. A hidrólise do substrato foi medida pela intensidade de fluorescência com excitação em 380 nm e emissão em 460 nm, fluorescência característica da 7-amino-4-metilcumarina. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, com leitura da fluorescência em espectrofluorímetro.

3.8 - Ensaios cinéticos com peptídeos FRET

Os substratos utilizados foram sintetizados em DMSO (Hirata et al., 1995) pelo grupo da professora Maria A. Juliano (Infar - UNIFESP). Foram analisadas as especificidades dos subsítios S2, S1, S'1 e S'2, utilizando-se os substratos apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Substratos utilizados na determinação das especificidades dos subsítios S1, S2, S'1 e S'2 da CAL 3.

Subsítio	Modelo de substrato	Variações testadas
S2	Abz-K <u>X</u> RSSKQ-EDDnp	<u>X</u> = A, C(Bzl), D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y
S1	Abz-KL <u>X</u> SSKQ-EDDnp	<u>X</u> = A, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
S'1	Abz-KLR <u>X</u> SKQ-EDDnp	<u>X</u> = A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
S'2	Abz-KLRS <u>X</u> KQ-EDDnp	<u>X</u> = A, E, G, H, P, R, S, V, W, Y

Os peptídeos foram ensaiados em um espectrofluorímetro termostatizado a 30 °C medindo-se continuamente as variações de fluorescência em 320 nm (λ_{ex}) e 420 nm (λ_{em}). Os dados coletados foram analisados no programa *GraFit* (Leatherbarrow, 2001) para determinação dos parâmetros V_M e K_M relativos a cada substrato. O parâmetro k_{cat} foi obtido a partir de V_M e da concentração de enzima ativa presente em casa ensaio. Após cada ensaio, os fragmentos resultantes dos substratos foram isolados por HPLC e posteriormente identificados por espectrometria de massas (MALDI-TOF).

3.9 - Titulação da CAL 3 com E-64

Foi utilizado como inibidor o composto E-64, um inibidor irreversível de cisteína proteinases. Em catepsinas L, ocorre a interação de apenas uma molécula do inibidor com o sítio ativo, modificando o resíduo catalítico (Fujishima et al., 1997).

Em uma titulação enzimática, considera-se que a reação entre uma enzima (E) e seu inibidor irreversível (I) em questão é rápida. Num ensaio em que $[I] < [E]$,

todo o inibidor presente reagirá com a enzima, formando um complexo inativo. A enzima remanescente poderá hidrolisar substrato, sendo possível a determinação da velocidade da catálise de uma concentração fixa de substrato (em excesso) em diferentes concentrações de inibidor. Quanto maior $[I]$, menor V_i/V_o . Em certa $[I]$, V_i/V_o permanece constante, mas diferente de zero. Como a reação da enzima com o inibidor é regida por uma constante, no equilíbrio existirá uma quantidade pequena de enzima e inibidor livres, sendo possível a detecção da formação de produto pela enzima livre.

Para estimar a concentração de enzima ativa presente num ensaio, é feita a aproximação da concentração de inibidor necessária para que a velocidade remanescente medida seja zero. Para isso, extrapola-se a porção linear de V_i/V_o para zero, uma situação teórica em que toda a enzima presente estaria na forma EI.

Este experimento foi realizado incubando-se concentrações crescentes do inibidor E-64 com uma concentração fixa de CAL 3 no espectrofluorímetro termostatizado a 30 °C. Após 5 minutos, as velocidades iniciais da catálise de uma concentração fixa do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, em excesso, foram determinadas nas diferentes concentrações do inibidor. A concentração de enzima ativa foi determinada por regressão linear dos pontos experimentais obtidos na porção linear de decréscimo de V_i/V_o .

3.10 - Determinação da energia livre total de ativação e da energia livre de ligação com o substrato dos subsítios analisados

O parâmetro cinético K_M determinado para cada substrato ensaiado foi utilizado no cálculo da energia livre de ligação (ΔG_S) de acordo com a Equação [2].

$$\Delta G_S = -RT \left(\ln \frac{1}{K_M} \right) \quad [2]$$

Para a determinação da energia livre total de ativação ($\Delta G_T^\ddagger$), foram utilizados os parâmetros cinéticos K_M e k_{cat} , de acordo com a Equação [3].

$$\Delta G_T^\ddagger = -RT \left(\ln \frac{k_{cat}}{K_M} \right) + RT \left(\ln \frac{k_B T}{h} \right) \quad [3]$$

Em ambos os casos, o valor utilizado para temperatura (T) foi de 303 K. R é a constante dos gases, k_B é a constante de Boltzmann e h é a constante de Planck (Marana et al., 2002).

As deduções das equações [2] e [3] estão apresentadas no Apêndice II e no Apêndice III, respectivamente.

Os valores de ΔG_S e $\Delta G_T^\ddagger$ foram inseridos na Equação [1] para a determinação do papel de cada subsítio analisado.

3.11 - Cálculo da hidrofobicidade dos subsítios da CAL 3

Os parâmetros cinéticos K_M e k_{cat} determinados para cada substrato ensaiado foram utilizados no cálculo da hidrofobicidade de subsítio (H), de acordo com a Equação [4] (Lopes et al., 2006).

$$H = \sum \{[(k_{catx}/K_{Mx})/A] \cdot HP_x\} \quad [4]$$

Na Equação [4], x representa cada resíduo de aminoácido ocupante do subsítio analisado, A é a soma das razões k_{cat} / K_M para cada x e HP_x é o valor de x no índice hidropático (Kyte e Doolittle, 1982).

Para a estimativa da hidrofobicidade de cada subsítio baseada na sua composição estrutural, foi feita a média da soma das hidropaticidades dos resíduos de aminoácido presentes em cada subsítio. Foi utilizado o índice hidropático de Kyte e Doolittle (1982).

3.12 - Análise da estrutura tridimensional da CAL 3

A estrutura tridimensional da pCAL 3 foi obtida no banco de dados do Protein Data Bank (código de acesso 3QT4). A estrutura foi manipulada utilizando o programa PyMOL (Schrödinger, 2010). As sobreposições estruturais foram realizadas utilizando-se a ferramenta “Super” desse programa e as estruturas 3OF8, 3OF9, 1PPP, além da 3QT4.

3.13 - Obtenção do mutante pCAL 3 W187A

Para a obtenção do plasmídeo mutante pCAL 3 W187A foram utilizados os iniciadores específicos apresentados na Tabela 4, além dos já apresentados na Tabela 2. A mutagênese foi realizada de acordo com o método de sobreposição da região mutada (Higuchi et al., 1988).

Tabela 4 - Iniciadores específicos utilizados na inserção de mutação na pCAL 3.

Iniciador específico	Sequência de nucleotídeos
FW	5' CCTGGGGCTCTGGAG <u>GCG</u> GGAGAGAGCGGA 3'
RV	5' TCCGCTCTCTCC <u>GCT</u> CCAGAGCCCCAGG 3'

O códon destacado corresponde à mutação inserida na sequência. Os nucleotídeos sublinhados são que foram alterados para substituição de um triptofano por alanina na sequência da pCAL 3.

Os procedimentos de expressão, purificação, ativação e ensaio da enzima mutante são idênticos aos descritos nos itens 3.1 a 3.7.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Obtenção da proteína recombinante

A transformação foi realizada como detalhado no item 3.1. Nos procedimentos executados para a expressão da proteína recombinante, foi utilizado o antibiótico carbenicilina no meio de crescimento para se evitar a contaminação deste com outras bactérias que não as de interesse. A indução das bactérias com IPTG resultou na síntese de uma proteína com o tamanho esperado para a pCAL 3.

O plasmídeo utilizado para a expressão da pCAL 3 apresenta uma região codificadora de seis resíduos de histidina, como mostrado na Figura 7. A obtenção da pCAL 3 pura, apresentada na Figura 8, foi possível somente após a realização de duas cromatografias de afinidade sequenciais do material proveniente do lisado de 1 litro de meio de cultura. Para a segunda purificação, o material eluído da resina na primeira foi aplicado na coluna HiTrap Desalting para a remoção do excesso de imidazol, que competiria com a proteína de interesse na complexação com a resina níquel.

É possível observar na Figura 8 que após a purificação da pCAL 3 já havia no meio CAL 3 e pró-peptídeo, antes mesmo do procedimento de autoativação em meio ácido.

Figura 8 - Análise em SDS-PAGE da indução e da purificação da pCAL 3. P – padrão de peso molecular; 1 – sobrenadante do lisado de células induzidas; 2 – material precipitado de células induzidas; 3 – pCAL 3 purificada; 4 – CAL 3 ativa.

Como descrito no item 3.7, a atividade da CAL 3 foi testada utilizando o substrato Z-FR-MCA. É possível observar na Figura 9 que a enzima obtida apresenta atividade frente o subtrato testado.

Figura 9 - Teste de atividade da CAL 3 produzida.

4.2 – Determinação estrutural dos subsítios da CAL 3

As regiões correspondentes aos subsítios do sítio ativo da CAL 3 foram estimadas de acordo com a descrição de Turk et al. (1998) para cisteína proteinases. Para uma estimativa mais fina, os resíduos de aminoácidos que compõe cada subsítio foram determinados através de sobreposição estrutural da CAL 3 e de catepsinas L cristalizadas com inibidores análogos de substratos, números de acesso 3OF8, 3OF9 e 1PPP (Fujishima et al., 1997; Shenoy e Sivaraman, 2011). Os subsítios analisados neste trabalho estão apresentados na Figura 10

Figura 10 - Estrutura dos subsítios S2, S1, S'1 e S'2 da CAL 3. A tríade catalítica da enzima está representada em bastões.

4.3- Titulação da CAL 3 com E-64

Na Figura 11, está apresentada a relação obtida entre a concentração de E-64 e a atividade remanescente da CAL 3. Observa-se que aproximadamente até a concentração de 10 nM de inibidor, a velocidade remanescente diminuiu linearmente a cada aumento da concentração de inibidor no meio. Após essa condição, as adições de inibidor não afetaram a velocidade remanescente. Para se estimar a

concentração de CAL 3 ativa na amostra, foram considerados os cinco pontos de menores concentrações de inibidor, com concentrações de inibidor variáveis de 0 a 10 nM. Foi aproximada uma reta que, ao ser extrapolada para a condição em que toda enzima presente estaria complexada com o inibidor, permitiu a estimativa da concentração de CAL 3 ativa contida na amostra, 11,96 nM.

Figura 11 - Curva de titulação enzimática da CAL 3 com EDTA.

A concentração de enzima presente nos ensaios foi utilizada na obtenção da constante catalítica, definida como $k_{cat} = \frac{V_M}{[E]}$.

4.4 - Caracterização cinética dos subsítios da CAL 3

Os ensaios cinéticos realizados com substratos de fluorescência apagada permitiram a obtenção dos parâmetros k_{cat} e K_M , que indicam, respectivamente, a recíproca do tempo com que o ciclo catalítico da enzima se processa na hidrólise de determinado substrato e recíproca da afinidade da enzima com o substrato em questão.

A função de um subsítio de uma enzima pode ser prevista utilizando esses parâmetros obtidos cineticamente e as equações apresentadas no item 3.10. A comparação dos parâmetros termodinâmicos obtidos ($\Delta G^\ddagger_T$ e ΔG_S) ao se utilizar uma série de peptídeos idênticos, a não ser por uma única posição ocupada por diferentes aminoácidos, permite inferir se as alterações de aminoácidos nesta posição do substrato afetam preferencialmente a estabilização do estado de transição ou a ligação da enzima com o substrato.

4.4.1 - Subsítio S1

Para análise do subsítio S1 da CAL 3, foram utilizados dezesseis substratos com a sequência Abz-KLXSSKQ-EDDnp, onde X representa os resíduos de aminoácido variáveis (Tabela 3). Os valores de K_M e k_{cat} obtidos para cada substrato estão apresentados na Tabela 5, assim como a eficiência catalítica associada à sua hidrólise (k_{cat}/K_M) e as respectivas ΔG_S e $\Delta G^\ddagger_T$ calculadas.

Tabela 5 - Parâmetros obtidos na caracterização de S1.

Aminoácido	K_M (μM)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_M	ΔG_S (kJ/mol)	$\Delta G_T^\ddagger$ (kJ/mol)
R	$0,26 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,02$	1,54	-38,2	38,4
W	$0,15 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,01$	1,25	-39,6	38,9
T	$0,19 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,02$	1,21	-39,0	39,0
H	$0,85 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,03$	1,04	-35,2	39,4
V	$0,28 \pm 0,02$	$0,282 \pm 0,008$	1,01	-38,0	39,4
K	$0,23 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$	0,87	-38,5	39,8
S	$0,30 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,02$	0,83	-37,8	39,9
Q	$1,02 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,03$	0,73	-34,8	40,3
M	$0,33 \pm 0,05$	$0,16 \pm 0,02$	0,49	-37,6	41,2
E	$1,5 \pm 0,1$	$0,43 \pm 0,01$	0,29	-33,8	42,6
N	$1,83 \pm 0,08$	$0,32 \pm 0,01$	0,18	-33,3	43,8

Substratos com a sequência Abz-KLXSSKQ-EDDnp, onde X representa resíduos de aminoácidos variáveis.

A análise dos fragmentos de peptídeos obtidos após a reação com a CAL 3 mostrou que todos os substratos apresentados na Tabela 5 foram hidrolisados apenas em P1. Os parâmetros cinéticos dos substratos contendo Leu, Pro, Arg, Gly e Ile em P1 não foram determinados, pois as reações se processavam muito lentamente, como indicou o monitoramento da variação da fluorescência do meio reacional em longos intervalos de tempo. No entanto, após incubação desses substratos por aproximadamente 20 horas, todos esses substratos, com exceção de Ile, foram parcialmente hidrolisados.

Dentre os substratos testados, o que contém o resíduo Arg em P1 é o melhor hidrolisado pela CAL 3. No entanto, não foi observada uma preferência marcante por determinado tipo de aminoácido nesta posição, pois a enzima hidrolisa também Thr e Trp, com cadeias laterais polar e hidrofóbica, respectivamente, com eficiências catalíticas comparáveis. O índice de hidrofobicidade deste subsítio, calculado utilizando a Equação [4], foi determinado como - 2,4, indicando que este apresenta características hidrofílicas.

A Figura 12 mostra a relação entre os valores de ΔG_S e $\Delta G_T^\ddagger$. A inclinação de 0,6 da reta obtida indica que o subsítio em questão está também envolvido na catálise, mas desempenha função majoritária de ligação com o substrato.

Figura 12 - Razão entre $\Delta G_T^\ddagger$ e ΔG_S obtida para cada substrato com variações em P1.

4.4.2 - Subsítio S2

Para análise do subsítio S2, foram utilizados dezenove substratos com a sequência Abz-KXRSSKQ-EDDnp, onde X representa os resíduos de aminoácido variáveis (Tabela 3). Os valores de K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M obtidos para cada substrato estão apresentados na Tabela 6, assim como as respectivas ΔG_S e $\Delta G_T^\ddagger$ calculadas.

Tabela 6 - Parâmetros obtidos na caracterização de S2.

Aminoácido	K_M (μM)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_M	ΔG_S (kJ/mol)	$\Delta G_T^\ddagger$ (kJ/mol)
L	$0,26 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,02$	1,54	-35	39,3
V	$1,02 \pm 0,08$	$1,14 \pm 0,05$	1,12	-34,8	39,2
I	$0,8 \pm 0,2$	$0,43 \pm 0,07$	0,5	-35,4	41
C(Bzl)	$3,2 \pm 0,2$	$0,50 \pm 0,02$	0,2	-31,9	44,1
Y	$3,9 \pm 0,2$	$0,534 \pm 0,019$	0,1	-31,4	44,5
A	$4,1 \pm 0,3$	$0,46 \pm 0,02$	0,1	-31,3	45
F	$6,0 \pm 0,4$	$0,57 \pm 0,03$	0,1	-30,3	45,4
M	$4,7 \pm 0,3$	$0,37 \pm 0,02$	0,1	-30,9	45,9
S	$6,4 \pm 0,9$	$0,4 \pm 0,05$	0,1	-30,1	46,4
P	$7,4 \pm 0,6$	$0,10 \pm 0,01$	0,1	-29,8	50,3
R *	$4,1 \pm 0,3$ *	$0,46 \pm 0,02$ *	0,2 *	-31,3 *	44,2 *

Substratos com a sequência Abz-KXRSSKQ-EDDnp, onde X representa resíduos de aminoácidos variáveis. * peptídeo hidrolisado em P1 e P2.

A análise dos fragmentos de peptídeos obtidos após a reação com a CAL 3 mostrou que todos os substratos apresentados na Tabela 6 foram hidrolisados apenas em P1, com exceção do substrato com Arg, que também foi hidrolisado em P2. Os parâmetros cinéticos dos substratos contendo Gly, Glu, His, Asn, Lys, Gln, Asp e Thr em P2 não foram determinados, pois as reações se processavam muito lentamente. Após incubação desses substratos por aproximadamente 20 horas, apenas Asp e Thr foram parcialmente hidrolisados.

A análise dos valores de eficiência catalítica obtidos mostra que a enzima cliva preferencialmente os substratos que contem Leu e Val em P2, aminoácidos de cadeia lateral hidrofóbica. Além disso, o índice de hidrofobicidade deste subsítio foi determinado como + 1,3, indicando que este apresenta características hidrofóbicas.

A Figura 13 mostra a relação entre os valores de ΔG_S e $\Delta G_T^\ddagger$. A inclinação de 1,5 da reta obtida indica que este subsítio está envolvido prioritariamente na catálise, estabilizando o estado de transição com mais energia do que estabiliza o complexo enzima-substrato.

Figura 13 - Razão entre $\Delta G^{\ddagger}_T$ e ΔG_S obtida para cada substrato com variações em P2.

4.4.3 - Subsítio S'2

Para análise do subsítio S'2, foram utilizados dez substratos com a sequência Abz-KLRSXKQ-EDDnp, onde X representa os resíduos de aminoácido variáveis (Tabela 3). Os valores de K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M obtidos para cada substrato estão apresentados na Tabela 7, assim como as respectivas ΔG_S e $\Delta G^{\ddagger}_T$ calculadas.

Tabela 7 - Parâmetros obtidos na caracterização de S'2.

Aminoácido	K_M (μM)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_M	ΔG_S (kJ/mol)	$\Delta G^\ddagger_T$ (kJ/mol)
V	$0,112 \pm 0,004$	$0,44 \pm 0,005$	3,94	-40,3	36,0
W	$0,31 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,05$	3,57	-37,8	36,2
Y	$0,38 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,03$	2,78	-37,3	36,9
A	$0,43 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,06$	2,61	-36,9	37,0
S	$0,26 \pm 0,0283$	$0,4 \pm 0,02$	1,6	-38,2	38,4
E	$0,66 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,03$	1,49	-35,9	38,4
H	$0,38 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,02$	1,48	-37,2	38,5
G	$0,42 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,03$	1,36	-37,0	38,6
P	$0,72 \pm 0,04$	$0,86 \pm 0,04$	1,2	-35,6	39,0
R	$0,44 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,04$	1,01	-36,9	39,5

Substratos com a sequência Abz-KLR SXKQ-EDDnp, onde X representa resíduos de aminoácidos variáveis.

A análise dos fragmentos de peptídeos obtidos após a reação com a CAL 3 mostrou que todos os substratos apresentados na Tabela 7 foram hidrolisados apenas em P1. Os substratos contendo os resíduos Val e Trp em P'2 foram os melhores hidrolisados pela enzima. Foi observada uma certa preferência por aminoácidos hidrofóbicos nesta posição do substrato, mas as eficiências catalíticas de todos os substratos ensaiados são da mesma ordem de grandeza. Sendo assim, não se observou uma preferência marcante deste subsítio por algum tipo de aminoácido.

O índice de hidrofobicidade deste subsítio foi determinado como + 0,4, indicando que este apresenta características hidrofóbicas, mas não tão marcantes como as estimadas para o subsítio S2.

A Figura 14 mostra a relação entre os valores de ΔG_S e $\Delta G^\ddagger_T$. A inclinação de 0,6 da reta obtida indica que este subsítio, assim como o S1, está envolvido na ligação com o substrato.

Figura 14 - Razão entre $\Delta G^\ddagger_T$ e ΔG_S obtida para cada substrato com variações em P'2.

4.4.4 - Subsítio S'1

Para análise do subsítio S'1, foram utilizados dezenove substratos com a sequência Abz-KLRXSKQ-EDDnp, onde X representa os resíduos de aminoácido variáveis (Tabela 3). Os valores de K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M obtidos para cada substrato estão apresentados na Tabela 8, assim como as respectivas ΔG_S e $\Delta G^\ddagger_T$ calculadas.

Tabela 8 - Parâmetros obtidos na caracterização de S'1.

Aminoácido	K_M (μ M)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_M	ΔG_S (kJ/mol)	$\Delta G_T^\ddagger$ (kJ/mol)
I	$0,33 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,04$	7,39	-38,6	34,4
A	$0,41 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,2$	6,6	-37,1	34,7
L	$0,25 \pm 0,02$	$1,53 \pm 0,07$	6,06	-38,3	34,9
W	$0,45 \pm 0,04$	$1,9 \pm 0,1$	4,2	-36,8	35,8
F	$0,22 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,02$	3,64	-38,6	36,2
V	$0,20 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,03$	3,59	-38,9	36,2
E	$0,61 \pm 0,04$	$2,0 \pm 0,1$	3,3	-36,1	36,5
T	$0,33 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,03$	2,71	-37,6	36,9
M	$0,33 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,04$	2,54	-37,6	37,1
N	$0,67 \pm 0,06$	$1,7 \pm 0,1$	2,5	-35,8	37,1
R	$0,47 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,04$	2,15	-36,7	37,5
H	$0,50 \pm 0,04$	$0,88 \pm 0,05$	1,76	-36,6	38,0
D	$1,13 \pm 0,08$	$1,8 \pm 0,1$	1,6	-34,5	38,3
G	$0,59 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,03$	1,57	-36,1	38,3
Q	$0,45 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,03$	1,27	-36,8	38,9
S	$0,93 \pm 0,07$	$1,01 \pm 0,04$	1,08	-35,0	39,3
K	$1,50 \pm 0,09$	$0,7 \pm 0,04$	0,5	-33,8	41,4
Y *	$4,4 \pm 0,2 *$	$0,44 \pm 0,02 *$	2,7 *	-31,1 *	45,2 *

Substratos com a sequência Abz-KLRXSKQ-EDDnp, onde X representa resíduos de aminoácidos variáveis. * peptídeo hidrolisado em P'1 e P'4.

A análise dos fragmentos de peptídeos obtidos após a reação com a CAL 3 mostrou que todos os substratos apresentados na Tabela 8 foram hidrolisados apenas em P1, com exceção do substrato com Tyr, que foi hidrolisado em P'1 e P'4. O substrato contendo Pro em P'1 não foi hidrolisado após incubação por 20 horas.

Os substratos contendo os resíduos Ile e Ala em P'1 foram os melhores hidrolisados pela enzima. Foi observada certa preferência por aminoácidos hidrofóbicos nesta posição do substrato, mas as eficiências catalíticas de todos os substratos ensaiados são da mesma ordem de grandeza, com exceção de Lys. Sendo assim, não se observou uma preferência marcante deste subsítio por algum tipo de aminoácido.

O índice de hidrofobicidade deste subsítio foi determinado como -0,4, indicando que este apresenta características hidrofílicas, mas não tão marcantes como as estimadas para o subsítio S1.

A Figura 15 mostra a relação entre os valores calculados de ΔG_S e $\Delta G_T^\ddagger$. A inclinação de 1,2 da reta obtida indica que este subsítio se liga ao estado de transição e ao substrato com energias similares, apresentando papel na catálise e na estabilização do substrato no sítio ativo.

Figura 15 - Razão entre $\Delta G_T^\ddagger$ e ΔG_S obtida para cada substrato com variações em P'1.

4.5 – Etapa cineticamente limitante no caminho da reação

A Figura 16 esquematiza o mecanismo da hidrólise de substratos por cisteína proteinases. Pode-se observar que ocorre a formação de duas espécies intermediárias tetraédricas, intercaladas pela formação de uma espécie acil-enzima. A formação do produto, ou a eficiência da catálise, depende da estabilização da carga negativa concentrada no oxigênio carbonílico do substrato (Menard et al., 1995).

Figura 16 - Mecanismo de catálise de uma cisteína proteinase. A estrutura da enzima está representada em "E", com destaque para os resíduos da cisteína catalítica e do resíduo de histidina, que atua como doador/aceptor de próton. "Nt" representa a porção amino-terminal do substrato e "Ct" representa a sua porção carboxi-terminal.

Com base no mecanismo da reação, seu passo limitante pode ser a etapa de acilação da enzima, promovida pelo ataque nucleofílico da cisteína catalítica, ou a etapa de desacilação, com liberação da porção N-terminal do substrato e regeneração da enzima. Ao se observar os valores de k_{cat} apresentados na Tabela 7 e na Tabela 8 nota-se que estes não são constantes para as variações de resíduos de aminoácidos em P'1 e P'2, indicando que essas variações no substrato influenciam na catálise da enzima. Como a porção C-terminal do substrato é liberada antes da etapa de desacilação da enzima, pode-se inferir que essa etapa não é a

limitante da reação. Dessa forma, os resultados cinéticos indicam que a etapa de acilação da enzima é o passo limitante na catálise. Além disso, a análise do papel do subsítio S'1 mostrou que este está envolvido prioritariamente na catálise, enquanto S'2 está envolvido na ligação com substrato, mas também tem alguma influência na catálise. Dessa forma, esses subsítios estão envolvidos na estabilização do primeiro intermediário tetraédrico formado.

Essas conclusões estão em concordância com simulações de dinâmica molecular do mecanismo de catálise da catepsina K, uma cisteína proteinase com características semelhantes às da catepsina L (Barrett et al., 2004; Ma et al., 2007).

4.6 - Obtenção do mutante pCAL 3 W187A

Para testar a hipótese de que o subsítio S'1 está envolvido tanto na catálise quanto na ligação com o substrato buscou-se criar uma enzima com alguma mutação nesse subsítio que apresentaria parâmetros cinéticos distintos dos já obtidos na caracterização da CAL 3 nativa.

Como discutido no item 4.5, a catálise de cisteína proteinases depende da estabilização de espécies intermediárias da reação. Parte dessa estabilização é promovida pela cavidade oxiânica através de ligações de hidrogênio bem definidas entre os intermediários da reação e a cadeia lateral de uma glutamina e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação peptídica de uma cisteína (Harel et al., 1996). Não é possível avaliar o efeito dessa última interação na estabilização do intermediário da reação, mas mutações no resíduo de glutamina referido afetam bastante a atividade de cisteína proteinases, diminuindo de 60 a 600 vezes a atividade da papaína

(Menard et al., 1995). Além desses dois resíduos, existe na cavidade oxiânica um resíduo de triptofano e um de histidina que podem contribuir para a estabilização do intermediário da reação (Fujishima et al., 1997; Menard et al., 1995; Shenoy e Sivaraman, 2011). A Figura 17 apresenta o subsítio S'1 predito para a CAL 3, assim como os resíduos de cisteína, glutamina, triptofano e histidina mencionados.

Figura 17 - Subsítio S'1 da CAL3. Estão destacados em preto os resíduos de aminoácido que compõe S'1. Os quatro resíduos de aminoácido rotulados pertencem à cavidade oxiânica.

Os resultados obtidos na caracterização do subsítio S'1 sugerem que este desempenha uma função importante na catálise da enzima. Dessa forma, foi realizada uma mutação para testar o papel do resíduo de triptofano presente em S'1 na catálise da enzima, substituindo-o por uma alanina, como indicado na Figura 18. Após a mutação, a relação de ΔG_S e $\Delta G_T^\ddagger$ deveria indicar que S'1 passou a estabilizar melhor o substrato que o estado de transição com a alteração introduzida no subsítio.

A indução em bactéria e a purificação em resina de níquel da pCAL 3 W187A estão apresentadas na Figura 19.

```

          10      20      30      40      50
CAL3      1      SSKPLAASVDWRSNAVSEVKDQGQCGSCWSFSTTGAVEGQLALQGRGLTS 50
pCAL3 W187A 1      SSKPLAASVDWRSNAVSEVKDQGQCGSCWSFSTTGAVEGQLALQGRGLTS 50
Clustal Consensus 1 ***** 50

          60      70      80      90     100
CAL3     51      LSEQNLIDCSSSYGNAGCDGGWMDSAFSYIHGYGIMSESAYPYEAQGDYC 100
pCAL3 W187A 51      LSEQNLIDCSSSYGNAGCDGGWMDSAFSYIHGYGIMSESAYPYEAQGDYC 100
Clustal Consensus 51 ***** 100

         110     120     130     140     150
CAL3    101      RFDSSQSVTTLSGYYDLPSGDENSLADAVGQAGPVAVAI DATDELQFYSG 150
pCAL3 W187A 101      RFDSSQSVTTLSGYYDLPSGDENSLADAVGQAGPVAVAI DATDELQFYSG 150
Clustal Consensus 101 ***** 150

         160     170     180     190     200
CAL3    151      GLFYDQTCNQSDLNHGVLVVGYGSDNGQDYWILKNSWGSWGSGYWRQV 200
pCAL3 W187A 151      GLFYDQTCNQSDLNHGVLVVGYGSDNGQDYWILKNSAGSGWGSGYWRQV 200
Clustal Consensus 151 ***** 199

          210
          ....|....|....|....
CAL3    201      RNYGNNGGIATAASYPAL 218
pCAL3 W187A 201      RNYGNNGGIATAASYPAL 218
Clustal Consensus 200 ***** 217

```

Figura 18 - Alinhamento da CAL 3 e do mutante pCAL3 W187A. Apenas a região correspondente à enzima mutante ativa está apresentada.

Figura 19 - Análise em SDS-PAGE da indução e da purificação da pCAL 3 W187A. P – padrão de peso molecular; 1 – células transformadas não induzidas; 2 – células transformadas induzidas com IPTG; 3 – pCAL 3 W187A purificada.

Da mesma forma realizada com a CAL 3, a atividade da pCAL 3 W187A foi testada utilizando o substrato Z-FR-MCA. Os resultados apresentados na Figura 20 indicam que a enzima não apresentou atividade nessas condições.

Figura 20 - Teste de atividade da pCAL 3 W187 produzida.

A explicação para a falta de atividade da enzima expressa está no fato do resíduo de triptofano mutado fazer parte do cluster aromático da enzima, como estudos mais recentes indicam. Experimentos mostraram que esse cluster é tão importante para a atividade das catepsinas L e B por atuar na estabilização da asparagina da tríade catalítica (Ljunggren et al., 2007; Redzynia et al., 2008). A Figura 21 mostra os resíduos da CAL 3 que pertencem a esse cluster aromático. Dois desses resíduos (em preto) pertencem também ao sítio S'1 da enzima.

Figura 21 - Resíduos pertencentes ao cluster aromático da CAL 3. Os resíduos em preto fazem parte do subsítio S'1. As linhas tracejadas indicam as distâncias em que se encontram os resíduos envolvidos na estabilização da asparagina da tríade catalítica da enzima.

4.7 - Relação estrutura-função dos subsítios da CAL 3

Os ensaios com substratos de fluorescência apagada mostraram que o substrato preferencialmente hidrolisado pela enzima é o que contem Arg em P1. No subsítio S1, há um resíduo de Asp que possivelmente atua estabilizando a carga positiva desse substrato. A presença desse resíduo de aminoácido no subsítio provavelmente justifica o fato do substrato com Glu em P1 ser um dos pior hidrolisados pela enzima, devido à repulsão entre as cadeias laterais negativas. Os

resultados cinéticos mostraram que a enzima é capaz de hidrolisar com alta eficiência catalítica os substratos com resíduos de aminoácido de cadeias laterais volumosas em P1. Essa característica pode ser explicada pela localização do subsítio na superfície na enzima, não apresentando restrições espaciais à acomodação de cadeias laterais de diferentes tamanhos.

Os resultados obtidos para S2 mostraram que a enzima apresenta alta eficiência catalítica na hidrólise de substratos que contem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em P2. É possível observar na Figura 10 que o subsítio S2 encontra-se no interior da estrutura da enzima, formando um bolsão composto por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, o que explica a preferência da enzima pela hidrólise desse tipo de substrato. Contudo, resíduos hidrofóbicos volumosos, como Phe, não foram hidrolisados com alta eficiência catalítica pela enzima devido à presença de um triptofano na entrada de S2, que dificulta a acomodação desse tipo de substrato no subsítio (Beton et al., 2012). A análise da função deste subsítio mostrou que este está envolvido na catálise. Dessa forma, o subsítio está envolvido na estabilização de intermediários da reação. A ligação com este subsítio pode ocorrer após a formação do estado de transição ou mesmo pode promover a formação do estado de transição através da interação, favorecendo a catálise.

Em S'1, apesar de não ter sido observada uma preferência marcante por algum tipo de aminoácido, os melhor hidrolisados são os de cadeia lateral hidrofóbica. Esse subsítio contém resíduos de triptofano e leucina, que devem contribuir na estabilização desses substratos. Além disso, esse subsítio é localizado na superfície da enzima, o que permite que moléculas do solvente atuem na estabilização da cadeia lateral de aminoácidos polares ou carregados.

Dentre os subsítios analisados, o que apresentou menor especificidade foi S'2, hidrolisando com eficiências catalíticas altas substratos com diferentes tipos de cadeia lateral em P'2. Assim como S1 e S'1, esse subsítio está localizado na superfície da enzima, o que pode facilitar a acomodação e estabilização dos diferentes aminoácidos.

Com o objetivo de avaliar a realidade física do conceito de hidrofobicidade de subsítios proposto por Lopes et al. (2006), que faz uma estimativa da hidrofobicidade dos subsítios de uma enzima a partir dos dados cinéticos da hidrólise de substratos com diferentes hidropaticidades que interagem com esse subsítio, a composição de aminoácidos determinada estruturalmente para subsítios da CAL 3 foi utilizada na estimativa da hidrofobicidade de cada subsítio utilizando os dados estruturais da enzima. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 22.

$H_{\text{cinético}}$	+1,3	-2,4	-0,4	+0,4
$H_{\text{estrutural}}$	+1,5	-0,5	-0,4	-2,5
	S2	S1	S'1	S'2
	CAL 3			

Figura 22 - Hidrofobicidades calculadas para os subsítios da CAL 3. $H_{\text{cinético}}$ foi determinado utilizando dados cinéticos e $H_{\text{estrutural}}$ foi determinado utilizando dados estruturais.

S2 apresentou caráter hidrofóbico nas duas formas de análise de hidrofobicidade, enquanto S1 e S'1 apresentaram caráter hidrofílico. S'2, por sua vez, apresentou caráter hidrofóbico na determinação cinética e caráter hidrofílico na determinação estrutural. No entanto, S'2 foi o subsítio com menor especificidade de substrato dentre os subsítios caracterizados. Os resultados indicam que a forma

proposta para a determinação da hidrofobicidade de subsítios a partir de dados cinéticos apresenta melhores resultados na caracterização de subsítios de especificidades mais restritas ou que estejam enterrados na estrutura da enzima, pois em subsítios localizados na superfície a interação com solvente ou mesmo a pouca restrição espacial podem facilitar a estabilização do substrato.

5 - CONCLUSÕES

A CAL 3 digestiva de *T. molitor* foi produzida em sistema heterólogo, purificada e autoativada em meio ácido.

Ensaio com substratos de fluorescência apagada mostraram que o subsítio S2 é o que apresenta maiores restrições de substrato, sendo bastante seletivo para resíduos hidrofóbicos em P2. Substratos que continham resíduos volumosos, como os aromáticos, foram mal hidrolisados pela enzima devido à presença de um resíduo de aminoácido volumoso na entrada do subsítio. Os resultados da análise do papel deste subsítio indicam que este está envolvido prioritariamente na catálise.

O subsítio S1 não apresentou preferência marcante por determinado tipo de substrato, hidrolisando com altas eficiências catalíticas substratos com diferentes cadeias laterais em P1. O papel do subsítio é a ligação com o substrato. O substrato preferencialmente hidrolisado é o que contém Arg nessa posição. Nesse subsítio, há um resíduo de Asp que possivelmente atua estabilizando a carga positiva desse substrato. O subsítio está localizado na superfície na enzima, o que pode facilitar a acomodação e estabilização de substratos com aminoácidos de cadeias laterais distintas.

O subsítio S'1 também não apresentou preferência marcante por nenhum tipo de aminoácido e, assim como S1, está localizado na superfície da enzima. Os substratos melhor hidrolisados são os de cadeia lateral hidrofóbica em P'1, possivelmente estabilizados por resíduos hidrofóbicos presentes no subsítio. Os demais substratos, com outros tipos de cadeia lateral, foram hidrolisados com eficiências catalíticas semelhantes possivelmente por estabilização por moléculas do solvente. A análise do papel deste subsítio indica que ele está envolvido na

estabilização do substrato e na catálise. Este último papel foi em princípio atribuído à presença de um resíduo da cavidade oxiânica da enzima nesse subsítio. A influência desse resíduo seria testada através de uma enzima com mutação nesse resíduo que chegou a ser produzida, mas não apresentou atividade. Uma análise mais cuidadosa mostrou que esse resíduo é importante para a atividade da enzima por compor seu cluster hidrofóbico, uma estrutura tão fundamental à atividade da enzima quanto sua tríade catalítica.

Dentre os subsítios caracterizados, o S'2 foi o que apresentou a menor restrição na composição de aminoácidos no substrato. Assim como S1, este subsítio está envolvido na ligação da enzima com o substrato. Os resultados cinéticos mostraram certa preferência por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em P'2, mas as eficiências catalíticas de todos os substratos ensaiados são comparáveis. Este subsítio também fica localizado na superfície da enzima, o que pode facilitar a estabilização desses diferentes aminoácidos.

Os dados cinéticos obtidos na caracterização de S'1 e S'2 permitiram estimar que o passo limitante da reação enzimática em questão é o de acilação, uma conclusão que está em concordância com simulações de dinâmica molecular do mecanismo de catálise da catepsina K.

A estrutura tridimensional da CAL 3 e os dados cinéticos obtidos neste trabalho permitiram a avaliação da realidade física do conceito de hidrofobicidade de subsítios. Esse conceito parece ser aplicável a subsítios que apresentem especificidades de substrato mais restritas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamson, M., Ritonja, A., Brown, M., Grubb, A., Machleidt, W., and Barrett, A. (1987). Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase-inhibitors human cystatin-c and chicken cystatin. *Journal of Biological Chemistry* 262, 9688–9694.
- Albery, W., and Knowles, J. (1977). Efficiency and evolution of enzyme catalysis. *Angewandte Chemie - International Edition in English* 16, 285–293.
- Barrett, A.J. (1992). Cellular proteolysis - an overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 674, 1–15.
- Barrett, A.J., Woessner, J.F., and Rawlings, N.D. (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Elsevier Science).
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis - The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62, 293–300.
- Beton, D., Guzzo, C.R., Ribeiro, A.F., Farah, C.S., and Terra, W.R. (2012). The 3D structure and function of digestive cathepsin L-like proteinases of *Tenebrio molitor* larval midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42, 655–664.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93–99.
- Carmona, A.K., Juliano, M.A., and Juliano, L. (2009). The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 81, 381–392.
- Cohen, F.E., Gregoret, L.M., Amiri, P., Aldape, K., Railey, J., and Mckerrow, J.H. (1991). Arresting tissue invasion of a parasite by protease inhibitors chosen with the aid of computer modeling. *Biochemistry* 30, 11221–11229.
- Cristofaletti, P., Ribeiro, A., and Terra, W. (2005). The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 883–901.
- Dadd, R.H. (1956). Proteolytic activity of the midgut in relation to feeding in the beetles *Tenebrio molitor* L and *Dystiscus marginalis* L. *Journal of Experimental Biology* 33, 311–324.
- Förster, T. (1948). Intermolecular energy migration and fluorescence. *Annals of Physics* 2.
- Fujishima, A., Imai, Y., Nomura, T., Fujisawa, Y., Yamamoto, Y., and Sugawara, T. (1997). The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. *Febs Letters* 407, 47–50.
- Fukal, L., and Kasafirek, E. (1988). N-succinyl-alanyl-methionyl-S-benzylcysteine-para-nitroanilide as a sensitive substrate for assaying activity of cysteine proteinases. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 16, 323–326.
- Gauthier, F., Moreau, T., Lalmanach, G., Brillardbourdet, M., Ferrerdimartino, M., and Juliano, L. (1993). A new, sensitive fluorogenic substrato for papain based on the sequence of the cystatin inhibitory site. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 306, 304–308.
- Gillot, C. (1995). *Entomology* (Plenum Press).

- Godfray, H.C.J. (2013). Mosquito ecology and control of malaria. *Journal of Animal Ecology* *82*, 15–25.
- Gooding, R. (1969). Studies on proteinases from some blood-sucking insects. *Proceedings of the Entomological Society of Ontario* *100*, 139.
- Harel, M., Quinn, D., Nair, H., Silman, I., and Sussman, J. (1996). The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *Journal of the American Chemical Society* *118*, 2340–2346.
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments - Study of protein and DNA interaction. *Nucleic Acids Research* *16*, 7351–7367.
- Hirata, I., Sedenho Cezari, M., Nakaie, C., Boschcov, P., Ito, A., Juliano, M., and Juliano, L. (1995). Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. *Letters in Peptide Science* *1*, 299–308.
- Irving, G.W., Fruton, J.S., and Bergmann, M. (1941). Kinetics of proteinase action application to specificity problems. *Journal of Biological Chemistry* *138*, 231–242.
- Kyte, J., and Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* *157*, 105–132.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–&.
- Leatherbarrow, R.J. (2001). GraFit (Horley, UK: Erithacus Software Ltd.).
- Ljunggren, A., Redzynia, I., Alvarez-Fernandez, M., Abrahamson, M., Mort, J.S., Krupa, J.C., Jaskolski, M., and Bujacz, G. (2007). Crystal Structure of the Parasite Protease Inhibitor Chagasin in Complex with a Host Target Cysteine Protease. *Journal of Molecular Biology* *371*, 137 – 153.
- Lopes, A., Juliano, M., Marana, S., Juliano, L., and Terra, W. (2006). Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* *36*, 130–140.
- Ma, S., Devi-Kesavan, L.S., and Gao, J. (2007). Molecular dynamics Simulations of the catalytic pathway of a cysteine protease: A combined QM/MM study of human cathepsin K. *Journal of the American Chemical Society* *129*, 13633–13645.
- Marana, S., Lopes, A., Juliano, L., Juliano, M., Ferreira, C., and Terra, W. (2002). Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *290*, 494–497.
- Menard, R., Plouffe, C., Laflamme, P., Vernet, T., Tessier, D., Thomas, D., and Storer, A. (1995). Modification of the electrostatic environment is tolerated in the oxyanion hole of the cysteine protease papain. *Biochemistry* *34*, 464–471.
- Narlikar, G., and Herschlag, D. (1998). Direct demonstration of the catalytic role of binding interactions in an enzymatic reaction. *Biochemistry* *37*, 9902–9911.

Neurath, H. (1999). Proteolytic enzymes, past and future. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10962–10963.

Oliveira, C.M., Auad, A.M., Mendes, S.M., and Frizzas, M.R. (2013). Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. *Journal of Applied Entomology* 137, 1–15.

Phillips, T.W., and Throne, J.E. (2010). Biorational Approaches to Managing Stored-Product Insects. In *Annual Review of Entomology*, pp. 375–397.

Ramos, C., Abreu, P., Nascimento, A., and Ho, P. (2004). A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 1103–1109.

Redzynia, I., Ljunggren, A., Abrahamson, M., Mort, J.S., Krupa, J.C., Jaskolski, M., and Bujacz, G. (2008). Displacement of the Occluding Loop by the Parasite Protein, Chagasin, Results in Efficient Inhibition of Human Cathepsin B. *Journal of Biological Chemistry* 283, 22815–22825.

Richards, O.W., and Davies, R.G. (1977). *Imms' General Textbook of Entomology* (Routledge, Chapman & Hall, Incorporated).

Sapsford, K.E., Berti, L., and Medintz, I.L. (2006). Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: Beyond traditional donor-acceptor combinations. *Angewandte Chemie - International Edition* 45, 4562–4588.

Schechter, I., and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27, 157–&.

Schrödinger, L. (2010). *The PyMOL Molecular Graphics System*.

Shenoy, R.T., and Sivaraman, J. (2011). Structural basis for reversible and irreversible inhibition of human cathepsin L by their respective dipeptidyl glyoxal and diazomethylketone inhibitors. *Journal of Structural Biology* 173, 14–19.

Terra, W., and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes - properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 109, 1–62.

Terra, W.R., and Cristofaletti, P.T. (1996). Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 113, 725–730.

Terra, W.R., and Ferreira, C. (2005). Biochemistry of Digestion. In *Comprehensive Molecular Insect Science.*, (Elsevier Oxford),.

Terra, W.R., and Ferreira, C. (2009). Fisiologia molecular e evolutiva do processo digestivo dos insetos. In *Bioecologia E Nutrição de Insetos: Base Para O Manejo Integrado de Pragas*, J.R.P. Parra, ed. (Brasília: Embrapa Informação Tecnológica), pp. 175–209.

Terra, W., Ferreira, C., and Bastos, F. (1985). Phylogenetic considerations of insect digestion - Disaccharidases and the spatial-organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry* 15, 443–449.

Turk, D., and Guncar, G. (2003). Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 59, 203–213.

Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477, 98–111.

Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., and Turk, B. (1998). Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biological Chemistry* 379, 137–147.

Turk, V., Turk, B., and Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO Journal* 20, 4629–4633.

Yamamoto, Y., Watabe, S., Kageyama, T., and Takahashi, S. (1999). Proregion of *Bombyx mori* cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42, 167–178.

Zimmerman, M., Ashe, B., Yurevich, E., and Patel, G. (1977). Sensitive assays for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates. *Analytical Biochemistry* 78, 47–51.

Apêndice I

Na figura abaixo estão apresentadas as mudanças de energia livre de Gibbs associadas à hidrólise de uma série de substratos compostos pela mesma sequência de aminoácidos, exceto pela cadeia lateral do aminoácido da posição variável.

$\Delta G_T^\ddagger$: energia livre total de ativação.

$\Delta G_{ES}^\ddagger$: energia de ativação dos passos de reação necessários para a formação e a quebra de ligações.

ΔG_S : energia de ligação do substrato. ΔG_R : contribuição da porção variável do oligopeptídeo na energia de ligação do substrato. ΔG_b : contribuição da porção compartilhada do oligopeptídeo na energia de ligação do substrato.

n : razão das energias de ligação da cadeia lateral variável a $ES^\ddagger$ e ES .

Nota-se que a energia de ligação do substrato é a soma das energias de ligação da parte compartilhada da estrutura (ΔG_b) e da cadeia lateral variável (ΔG_R). Além disso, a cadeia lateral variável do substrato pode interagir diferentemente com o subsítio nas condições $ES^\ddagger$ e ES , o que é corrigido com a introdução da variável n , um parâmetro que permite avaliar se a variação na cadeia lateral influencia a ligação do subsítio com o substrato ou com o estado de transição.

A obtenção da equação que relaciona o papel de um subsítio (n) com ΔG_S e $\Delta G_T^\ddagger$ está apresentada abaixo.

Do diagrama de energia livre apresentado

$$(1) \quad \Delta G_S = \Delta G_b + \Delta G_R$$

$$(2) \quad \Delta G_T^\ddagger = \Delta G_{ES}^\ddagger + n\Delta G_R - (-\Delta G_b)$$

Rearranjando (1)

$$\Delta G_b = \Delta G_S - \Delta G_R$$

Substituindo em (2)

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_{ES}^\ddagger + n\Delta G_R - (-\Delta G_S + \Delta G_R)$$

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_{ES}^\ddagger + n\Delta G_R + \Delta G_S - \Delta G_R$$

Rearranjando novamente (1)

$$\Delta G_R = \Delta G_S - \Delta G_b$$

Substituindo novamente em (2)

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_{ES}^\ddagger + n(\Delta G_S - \Delta G_b) + \Delta G_S - (\Delta G_S - \Delta G_b)$$

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_{ES}^\ddagger + n\Delta G_S - n\Delta G_b + \Delta G_S - \Delta G_S + \Delta G_b$$

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_{ES}^\ddagger + n\Delta G_S - n\Delta G_b + \Delta G_b$$

De modo que

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_{ES}^\ddagger + n\Delta G_S + \Delta G_b (1 - n)$$

Apêndice II

A figura abaixo mostra o esquema de uma reação em que há formação de um complexo enzima-substrato (ES), que pode se dissociar formando enzima (E) e substrato (S), ou pode gerar produto (P), liberando E.

A dissociação do complexo ES é regida pela constante de dissociação (K_s), apresentada no equilíbrio abaixo.

A energia livre da dissociação de ES é definida como $\Delta G = -RT \ln K_s$. Sendo assim, a energia livre de associação de E e S é $\Delta G = -RT \ln(1/K_s)$.

Assume-se que para o sistema em questão $k_3 \ll k_2$. Sendo assim, $K_s = K_M$. Então é possível se determinar a energia livre de associação de E e S pela equação $\Delta G = -RT \ln(1/K_M)$.

Apêndice III

A figura abaixo mostra o esquema de uma reação em que há formação de um complexo enzima-substrato (ES), que pode se dissociar formando enzima (E) e substrato (S), ou pode gerar produto (P), liberando E.

Assume-se que a velocidade de formação de P é dependente de k_3 (I) e [ES] e que as espécies S, E e ES encontram-se em condição de equilíbrio rápido (II).

$$(I) \quad d \frac{[P]}{dt} = k_3 [ES]$$

$$(II) \quad E + S \xrightleftharpoons{K^\ddagger} ES \quad \Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \rightarrow (1) K^\ddagger = \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right)$$

$$K^\ddagger = \frac{[ES]}{[E][S]} \rightarrow [ES] = K^\ddagger [E][S]$$

Combinando-se (I) e (II): $d \frac{[P]}{dt} = k_3 K^\ddagger [E][S]$

A constante de segunda ordem é

$$(2) \quad k = k_3 K^\ddagger \quad \text{então} \quad d \frac{[P]}{dt} = k [E][S]$$

Para a determinação de k_3 , assume-se que a velocidade da reação não pode exceder a frequência vibracional da ligação que está sendo quebrada. Sendo assim, a frequência de decomposição de ES máxima é igual à frequência da ligação que está sendo quebrada para essa decomposição. A frequência máxima pode ser expressa em função de k_B (constante de Boltzmann) e h (constante de Planck).

$$(3) \quad k_3 = v = k_B T / h$$

Combinando-se (1), (2) e (3)

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad \rightarrow \quad (4) \quad \Delta G^\ddagger = -RT \ln k + RT \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right)$$

Considerando-se a equação de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{[S]V_M}{K_M + [S]}$$

Numa condição em que $K_M \gg [S]$, o termo $K_M + [S]$ pode ser simplificado para

$$K_M$$

$$V_0 = \frac{[S]V_M}{K_M}$$

Sabe-se que $k_{cat} = V_M / [E]$, então

$$V_0 = \frac{[S][E]k_{cat}}{K_M}$$

k_{cat}/K_M é a constante de segunda ordem da reação

$$(5) \quad k = k_{cat} / K_M$$

Substituindo (4) em (5)

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln \frac{k_{cat}}{K_M} + RT \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right)$$

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Ticiane Fraga Damasceno

Local e data de nascimento: São Bernardo do Campo / SP, 17 de janeiro de 1989.

EDUCAÇÃO

Instituto Educacional Stagium, Diadema / SP, 2006.

Ensino Médio

Universidade de São Paulo, São Paulo / SP, 2011.

Bacharelado em Química

OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação Científica, Pró-Reitoria de Graduação da USP, 2008-2009.

Bolsista de Iniciação Científica, FAPESP, 2011.

Bolsista de Mestrado, CNPq, 2012-2014.

PUBLICAÇÕES

RESUMOS EM CONGRESSOS

DAMASCENO, T. F. ; Oliveira, J. R. ; Juliano, M. A. ; Terra, W. R. . Substrate Specificity and Subsites Role of a Recombinant Digestive Cathepsin L-like Proteinase of *Tenebrio molitor*. In: 38th FEBS Congress, 2013, Saint Petersburg (Russia). The FEBS Journal, 2013. v. 280. p. 98-98.

DAMASCENO, T. F. ; Oliveira, J. R. ; Juliano, M. A. ; Terra, W. R. . Analysis of Subsites Role and Specificity of a Recombinant Cathepsin L-like Proteinase of *Tenebrio molitor*. XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2013, Foz do Iguaçu (PR). CD-ROM of Abstracts, 2013. v. E-10.

DAMASCENO, T. F. ; Cristofolletti, P.T. ; Terra, W. R. . Aminopeptidase N of *Tenebrio molitor*. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu (PR). CD-ROM of Abstracts, 2012. v. E-10.

DAMASCENO, T. F. ; Agostinho, S. M. L. . Determinação da concentração micelar crítica de SDS em água a partir de medidas de condutividade: uma proposta de experimento para laboratório de graduação. XVIII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2010, São Paulo.