

MARIA HELENA NASSER BRUMANO

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESDOBRAMENTO DA β -TRIPSINA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

MARIA HELENA NASSER BRUMANO

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESDOBRAMENTO DA β -TRIPSINA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 02 de abril de 2002

Prof.^a Elizabeth Pacheco B. Fontes
(Conselheira)

Prof. Marcos Luis dos Mares-Guia

Prof. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Prof.^a Marli Lourdes de Oliveira

Prof.^a Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

À memória de minha mãe
Aos meus filhos João Pedro e Carolina Helena

AGRADECIMENTOS

Para realizar este trabalho, agradeço em especial:

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade.

Ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro.

À Prof^ª. Maria Goreti de Almeida Oliveira, que prontamente se dispôs a me orientar, e o fez com extrema sabedoria e simplicidade.

À Prof^ª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pelo incentivo e apoio durante a realização desse Curso.

Aos professores Marcos Luiz dos Mares-Guia e Marli Lourdes de Oliveira pela participação e valiosas sugestões.

Aos professores Edyr Rogana e Marcelo Matos Santoro, orientadores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por minha iniciação na área de estrutura de proteínas.

Ao colega e amigo Arno Roberto Gunther, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo incentivo e ajuda.

Ao Prof. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, pela utilização do espectrofluorímetro Edinburgh/Analytical Instruments e orientação nas medidas de fluorescência.

Ao Prof. Harold E. Swaisgood, do Departamento de Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSU), pela paciência, incentivo e orientação.

Ao Prof. Charles Chuck Hardin, do Departamento de Bioquímica da NCSU, pela utilização do equipamento de dicroísmo circular, Jasco J-600.

Ao Prof. Terrence G. Oas, do Departamento de Bioquímica da Universidade de Duke, Carolina do Norte, pela utilização do equipamento de dicroísmo circular, AVIV 62DS.

Ao grande amigo Dr. Qiwu Wang, pelos “primeiros passos” com a técnica de dicroísmo circular.

A Taís Cristina Bastos Soares, pelo incentivo e companheirismo.

Aos colegas do laboratório de Enzimologia do BIOAGRO: Christiano, Bárbara, Gal, Simone e Giordani.

BIOGRAFIA

MARIA HELENA NASSER BRUMANO, filha de Nelson Brumano e Helena Nasser Brumano, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 8 de novembro de 1963.

Em Janeiro de 1988, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa.

Em Outubro de 1991, finalizou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

No período de Janeiro de 1995 a Julho de 1999, trabalhou como Pesquisador Visitante no Laboratório de Química de Proteínas, do Departamento de Ciência de Alimentos, na Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSU), em Raleigh, EUA.

Em Fevereiro de 2000, iniciou o Doutorado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. Dobramento de proteínas	7
2.2. Modelos e rotas de dobramento de proteínas	11
2.3. Detecção e caracterização de intermediários no dobramento das proteínas	14
2.4. Domínios estruturais e o processo de dobramento	15
2.5. Estruturas residuais nos estados desdobrados das proteínas	17
2.6. A inativação precedendo ao desdobramento das enzimas	19
2.7. Serino proteases – Aspectos gerais	20
2.8. Métodos espectrais e sua utilização no estudo de mudanças conformacionais em proteínas	31
2.9. Métodos para se estimar a estrutura secundária de proteínas, a partir do espectro de DC no UV distante	32
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Proteína e reagentes químicos	37
4.2. Purificação e preparo da proteína	37
4.3. Determinação da concentração de tripsina	37
4.4. Experimentos de desnaturação térmica	38
4.4.1. Espectroscopia no UV	38
4.4.2. Espectroscopia com DC	38

4.4.3. Calorimetria	39
4.5. Experimentos de desnaturação química	39
4.6. Associação da β -tripsina com a sonda bis-ANS	40
4.7. Efeito do calor e de diferentes concentrações de uréia na estrutura secundária da β -tripsina	40
4.8. Espectros de dicroísmo circular na região do UV próximo	41
4.9. Avaliação da atividade enzimática da β -tripsina, em presença de uréia	41
4.10. Determinação dos parâmetros cinéticos, em diferentes concentrações de uréia	42
4.11. Análise dos dados	43
4.11.1. Desnaturação térmica	43
4.11.2. Determinação de ΔC_p	44
4.11.3. Calorimetria	44
4.11.4. Desnaturação com uréia	45
4.11.5. Estimativa da estrutura secundária a partir dos espectros de DC no UV distante	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Fracionamento da tripsina bovina comercial	46
5.2. Recromatografia da fração β -tripsina em coluna de SP-Sephadex	46
5.3. Desnaturação térmica da β -tripsina	49
5.4. Calorimetria	56
5.5. Estimativa da estrutura secundária da β -tripsina, a partir de DC no UV distante	56
5.6. Efeito do calor e de uréia na estrutura secundária da β -tripsina	59
5.7. Efeito do calor e de uréia na estrutura terciária da β -tripsina.....	64
5.8. Efeito de uréia sobre a emissão de fluorescência pela β -tripsina	67
5.9. Associação com bis-ANS	67
5.10. Mudanças na atividade e na estrutura terciária da β -tripsina em diferentes concentrações de uréia	71
6. DISCUSSÃO	76

6.1. Desnaturação térmica da β -tripsina	76
6.2. Desnaturação da β -tripsina por uréia, medida por fluorescência	79
6.3. Mudanças na atividade enzimática e na estrutura terciária da β -tripsina	79
6.4. Estimativa do conteúdo de estrutura secundária da β -tripsina em diferentes condições de desnaturação	83
7. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE ABREVIATURAS

UV : Ultravioleta

DC: Dicroísmo circular

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

FTIV: Infravermelho acoplado à transformada de Fourier

RMN: Ressonância magnética nuclear

ΔC_p : Mudança na capacidade calorífica de desnaturação

ΔH_{vH} : Entalpia de van't Hoff

ΔH_{cal} : Entalpia calorimétrica

ΔG_{H_2O} : Mudança na energia livre de desnaturação na ausência de desnaturante

$\Delta G_u(T)$: Mudança na energia livre de desnaturação à temperatura T

T_m : Temperatura de transição

ΔH_m : Entalpia de van't Hoff na T_m .

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

ANS: ácido 1-anilino-8-naftaleno sulfônico

NPGB: p-guanidinobenzoato de p'-nitrofenila

L-BApNA: N-benzoil-L-arginil p-nitroanilida

pNPA: p-nitrofenilacetato

GdnHCl : cloridrato de guanidina

RESUMO

BRUMANO, Maria Helena Nasser, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002. **Caracterização do processo de desdobramento da b-tripsina.**
Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Maurílio Alves Moreira.

O desdobramento no equilíbrio para a β -tripsina, induzido por desnaturação térmica, foi caracterizado termodinamicamente. O desdobramento foi acompanhado através de absorção no ultravioleta (UV) e espectroscopia de dicroísmo circular (DC) no UV próximo e distante. Além disso, experimentos utilizando a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizados. As curvas de transição térmica foram reversíveis mostrando um desdobramento altamente cooperativo, e os dados experimentais foram bem ajustados à um modelo de transição de dois-estados, para o desdobramento dessa proteína. O gráfico da fração desnaturada versus temperatura, calculado a partir das curvas de desnaturação térmica, em diferentes comprimentos de onda, mostra coincidência dessas curvas. Além disso, a razão entre a entalpia de desnaturação calorimétrica e a entalpia de van't Hoff, obtidas por DSC, é próxima à unidade, o que suporta o modelo de dois-estados. O espectro de DC da enzima nativa foi registrado na faixa espectral de 184 a 260 nm e utilizado para se estimar as porcentagens dos elementos da estrutura secundária, pelos métodos VARSCL e SELCON. A estimativa da estrutura secundária, em solução, correspondeu aos resultados de difração de raios-X. As mudanças na estrutura da β -tripsina, resultante de desnaturação por calor e por uréia foram monitoradas por meio de espectroscopia de DC no UV próximo e distante. A quantidade dos vários elementos de estrutura secundária foi estimada para essas mudanças espectrais, através dos espectros no UV distante, utilizando o método CCA ("Convex Constraint Algorithm"). De acordo com as

estimativas, os estados desdobrados para essa proteína, ou seja, a 70 °C e em uréia 2,6 M, apresentaram quantidades consideráveis de estrutura secundária regular. Os espectros de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano, registrados em diferentes concentrações de uréia, mostram a presença de um estado intermediário no equilíbrio, que apresenta grande afinidade pela sonda bis-ANS. Além disso, a ausência de contatos terciários e a presença de estrutura secundária para esse estado, verificados por meio de espectros de DC no UV próximo e distante, são consistentes com as características de um *molten globule*. As mudanças na atividade da β -tripsina foram observadas em concentrações de uréia nas quais não foram visualizadas nenhuma alteração espectroscópica da estrutura terciária da proteína. Os parâmetros cinéticos, k_{cat} e K_M , determinados na ausência e na presença de uréia, mostraram que o decréscimo na atividade da enzima, em baixas concentrações de uréia, foi provavelmente devido à formação do complexo EI, formado entre a β -tripsina e a uréia, um inibidor competitivo dessa enzima.

ABSTRACT

BRUMANO, Maria Helena Nasser, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2002.

Characterization of the unfolding mechanism of b-trypsin. Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Committee members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Maurílio Alves Moreira.

The unfolding equilibrium of β -trypsin induced by thermal denaturation was thermodynamically characterized. Thermal unfolding equilibrium were monitored using UV absorption and both far- and near-UV CD spectroscopy. In addition, experiments using differential scanning calorimetry (DSC), were performed. Thermal transition curves showed to be reversible and cooperative, and the data could be reasonably fitted using a two-state model for the unfolding of this protein. Plots of the fraction denatured, calculated from thermal denaturation curves at different wavelengths, versus temperature were coincident. In addition, the ratio of the enthalpy of denaturation obtained by scanning calorimetry to the van't Hoff enthalpy was close to one, which supports the two-state model. The dichroism circular (CD) spectrum of the native protein was taken over the wavelength range of 184- 260 nm, and the amount of various secondary structures were estimated using VARSLC and SELCON methods. The CD estimation of secondary structure, showed excellent agreement with X-ray results. The CD spectra of β -trypsin, as a function of temperature and urea, were monitored by far- and near-UV CD, and the relative proportions of secondary structures calculated by CCA method. According to CD estimation, although the secondary structure changed upon denaturation, its denatured state still has considerable amounts of ordered structure. The intrinsic fluorescence emission spectra of β -trypsin, at different urea concentration, showed an intermediate equilibrium state, with great affinity by bis-ANS. Besides, the absence of tertiary contacts and the presence of secondary structure for this state, are consistent with the molten globule characteristics. Changes on the activity of

β -trypsin were observed at urea concentrations in which tertiary structure changes were not detected. Kinetic parameters, k_{cat} and K_M , determined in the presence and absence of urea, showed that the decreases in enzyme activity, at low concentrations of urea, were probably due to a development of the enzyme-inhibitor complex between β -trypsin and urea, a competitive inhibitor of this enzyme.

1.INTRODUÇÃO

Entender como as proteínas se dobras em um único estado nativo é um dos problemas centrais na química de proteínas. A sequência de aminoácidos em uma proteína determina a sua estrutura tridimensional, porém cada sequência de aminoácidos não especifica apenas uma única conformação. Assim, pode-se questionar acerca da conformação que será atingida por uma determinada sequência de aminoácidos.

Para a maioria das proteínas, biologicamente ativas, a cadeia polipeptídica está organizada como uma estrutura tridimensional complexa e intimamente empacotada. A informação para a estrutura tridimensional deve estar contida na sequência de aminoácidos onde, sob condições fisiológicas, a conformação nativa é adotada espontaneamente.

Mudanças na sequência dos aminoácidos aconteceram durante a divergência evolucionária; mesmo assim, todas as proteínas variantes apresentam conformações muito similares, até mesmo quando a similaridade na sequência é baixa (Darby e Creighton, 1993). Proteínas com sequências primárias similares sempre adotam estruturas tridimensionais semelhantes; porém, muitas proteínas que diferem drasticamente em suas sequências de aminoácidos ainda adotam a mesma conformação. Isso mostra que a estrutura tridimensional de uma proteína parece ter sido mais conservada, durante a evolução, do que a estrutura primária. Também mostra que a maneira pela qual a sequência de aminoácidos especifica a estrutura de uma proteína é degenerada.

Essa redundância nas regras, relacionando sequência à conformação, tem levado cientistas de diversas áreas, envolvendo físico-química, física, biologia molecular, e mais recentemente a bioinformática, a tentar desvendar o que se tornou conhecido como “a segunda parte do código genético” (King, 1989). Além da conformação da proteína ser um determinante crítico de sua função biológica, a elucidação das regras que determinam a estrutura nativa pode ter implicações nas áreas de medicina, biotecnologia e farmácia (Dobson, 2000).

A recente descoberta de que várias enfermidades normalmente referidas como “doenças de *prion*” são causadas pelo acúmulo de uma proteína celular modificada, após a sua tradução, revela duas grandes descobertas: a existência de cepas *prions* transmissíveis, mostrando que a informação biológica pode estar presente em qualquer outra molécula diferente dos ácidos nucleicos, e, ainda, como uma mudança conformacional em uma proteína pode ser propagada, ressaltando a importância do dobramento da proteína para se entender as causas e a propagação da doença (Prusiner, 1998).

O processo do dobramento de uma proteína foi sempre descrito como uma sucessão hierárquica de eventos estruturais. Um modelo geral, mais aceito, consiste de uma fase precoce durante a qual interações locais, na cadeia polipeptídica, conduzem à formação de centros de nucleação. Assim, alguns segmentos de estruturas organizadas são formados e interagem para produzir estruturas novas e mais compactas que se fundem em domínios estruturais. Finalmente, os domínios se associam e interagem para gerar a proteína nativa (Kim e Baldwin, 1990).

Um domínio estrutural, por definição, representa uma região da estrutura da proteína onde a cadeia polipeptídica está dobrada de forma compacta e é mais ou menos independente do restante da cadeia. Utilizando-se estudos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) de proteínas, essas macromoléculas podem ser avaliadas sob o ponto de vista termodinâmico e estrutural. Nessa metodologia, cada domínio estrutural na molécula de uma proteína, composta de um ou mais domínios, pode corresponder a uma unidade cooperativa, dependendo das interações entre os domínios. No caso de proteínas monoméricas, com um só domínio estrutural, o monômero é a unidade cooperativa. Durante o processo de desnaturação térmica, cada domínio pode se desdobrar de maneira cooperativa e independente um do outro. No caso de domínios acoplados, eles podem se desdobrar como uma só unidade cooperativa. Dessa forma, o número de transições cooperativas durante o processo pode variar, dependendo das características estruturais da proteína (Privalov, 1982).

É conhecido que a desnaturação das proteínas através de mudanças de pH e de temperatura, e também pela ação de agentes desnaturantes, tais como uréia e cloridrato de guanidina, são estratégias experimentais para se entender os mecanismos moleculares por meio dos quais uma proteína atinge a sua estrutura nativa, para caracterizar os diferentes

estados conformacionais, e também para se estimar os parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo de desdobramento.

A essência de quase todos tratamentos termodinâmicos na desnaturação de proteínas supõe que o desdobramento é altamente cooperativo e pode ser tratado somente como um equilíbrio entre dois estados macroscópicos, o nativo e o desnaturado, com populações negligenciáveis dos estados intermediários. Contudo, para várias proteínas, ambos estudos de equilíbrio e cinética têm mostrado a existência de intermediários estáveis, alguns deles exibindo características de um estado de *molten globule* (MG). Além disso, as transições dobramento/desdobramento de proteínas com mais de um domínio estrutural são geralmente caracterizadas pela presença de várias transições cooperativas que representam o desdobramento independente de cada domínio.

A estrutura secundária das proteínas forma aglomerados de cadeias laterais hidrofóbicas que, por sua vez, formam o núcleo hidrofóbico das proteínas globulares. Normalmente, este núcleo hidrofóbico está bem protegido do solvente pelo rígido empacotamento das cadeias laterais ou seja, devido à rígida estrutura terciária. Esta característica resulta na diminuição da afinidade da estrutura nativa a sondas hidrofóbicas, tais como ANS. Porém, a afinidade do ANS pela molécula de proteína aumenta muito quando a rigidez da estrutura terciária é rompida, enquanto a estrutura secundária e sua compactação são retidas, ou seja, quando um estado intermediário MG é formado (Semisotnov et al., 1991). Neste estado, o núcleo hidrofóbico das proteínas se torna mais acessível ao solvente, e portanto ao ANS, do que o estado nativo.

De acuradas medidas no equilíbrio dobramento/desdobramento, um modelo de transição pode ser proposto e os parâmetros termodinâmicos associados ao processo, especificando a estabilidade da estrutura nativa, podem ser estimados. O sucesso nas análises termodinâmicas depende da proteína e das condições utilizadas. Características como tamanho, disponibilidade de dados para a estrutura tridimensional e reversibilidade no redobramento são importantes na escolha da proteína modelo. A β -tripsina bovina preenche esses requisitos. É uma proteína globular típica (223 resíduos de aminoácidos, 24 kDa) que tem sido bem caracterizada no estado sólido (Stroud et al., 1974; Bartunik et al., 1989). É uma enzima monomérica, estruturalmente composta por dois domínios, estabilizados por seis pontes dissulfeto, com seis folhas β antiparalelas em cada domínio

(Richardson, 1981). Além disso, o processo de purificação é bastante eficiente e produz grandes quantidades dessa proteína que; por sua vez, apresenta transições reversíveis induzidas por agentes desnaturantes, em pH ácido. Deste modo, a tripsina é um bom modelo a ser utilizado para avaliar as possíveis diferenças na estabilidade dos domínios, bem como verificar se estes constituem intermediários na rota de desdobramento para essa proteína. Apesar de dados cinéticos estarem disponíveis na literatura para esta típica serino protease, pouco é conhecido sobre a tripsina como uma entidade termodinâmica.

As primeiras investigações calorimétricas da desnaturação térmica da β -tripsina sugeriram uma transição simples entre os estados nativo e o desdobrado (Tishchenko e Gorodkov, 1979). Contudo, análises espectroscópicas do desdobramento térmico, no equilíbrio, sugeriram a ocorrência de uma transição sequencial (Zajicek et al., 1981). Estudos mais recentes de desnaturação, no equilíbrio, com tripsinogênio e com β -tripsina, mostraram que os dados experimentais se ajustam ao modelo de dois estados (Bulaj e Otlewski, 1995). Porém, a cinética do desdobramento mostrou que o mecanismo de desnaturação é mais complexo (Otlewski et al., 1996).

Existem poucos exemplos, na literatura, da ocorrência de intermediários do tipo MG em proteínas compostas quase que totalmente de folhas β . Devido a isso, sob o ponto de vista de Kumar et al. (1995), não se deve generalizar o conceito do MG como um intermediário universal durante o dobramento das proteínas. Na verdade, os estados de MG foram caracterizados a partir de proteínas com alto conteúdo de α -hélice. Dessa forma, a identificação de um estado de MG para β -tripsina, uma proteína com alto conteúdo de folhas β , pode contribuir como mais um exemplo para a presença desse estado desnaturado compacto, na rota do dobramento das proteínas globulares.

Existem evidências de intermediários do tipo MG em serino proteases. Hu et al. (1994) demonstraram a presença de um estado intermediário do tipo MG para a subtilisina E, formado na ausência da sequência N-terminal. Shindle e Inouye (1995) demonstraram a existência de um intermediário do tipo MG, na via de enovelamento da subtilisina, mediada por chaperones intramoleculares. A associação do tripsinogênio a chaperones da classe Hsp60, ao longo da via de secreção em células pancreáticas, também já foi reportada (Le Gall e Bendayan, 1996).

O efeito da pressão hidrostática no desdobramento da tripsina comercial foi estudado por espectroscopia de fluorescência (Ruan et al., 1997). Um estado estável e parcialmente desnaturado foi evidenciado, tanto a pH 3,0 ou 7,3, apresentando características de um *molten globule*.

Em nosso estudo, três métodos espectroscópicos foram empregados para seguir as transições reversíveis no equilíbrio para a β -tripsina bovina. Fluorescência foi usada para monitorar o estado da proteína durante a desnaturação com uréia, e para avaliar a associação da sonda bis-ANS à β -tripsina. Espectroscopia de DC, no UV próximo e distante, e espectroscopia no UV foram usados para seguir o processo de desnaturação da β -tripsina por calor. Além disso, experimentos utilizando DSC de alta sensibilidade foram realizados.

A técnica de dicroísmo circular possui a vantagem de ser aplicada a moléculas em solução, com extrema rapidez na aquisição dos espectros. Além disso, o espectro de DC no UV distante pode ser analisado para se estimar o conteúdo dos elementos de estrutura secundária, ou seja, hélices α , folhas β , voltas e outros, presentes na molécula da proteína (Johnson, 1990). Embora a estrutura secundária da β -tripsina tenha sido estimada através dos dados de difração de raios-X (Levitt e Greer, 1977; Kabsch e Sander, 1983) e também em solução, através de espectroscopia no infravermelho (Prestrelski et al., 1991), seu espectro de DC ainda não foi avaliado pelos programas disponíveis para se estimar as porcentagens de estrutura secundária de proteínas.

O espectro de dicroísmo circular é excepcionalmente sensível a mudanças na estrutura secundária e terciária de proteínas globulares. Deste modo, o DC pode também ser usado para seguir os efeitos de desnaturantes químicos, de diferentes valores de temperaturas e pH, e ainda de ligantes na conformação da proteína, a partir de seus espectros no UV próximo e distante. Como parte dos estudos de desdobramento com a β -tripsina, a técnica de DC foi escolhida para acessar os efeitos das mudanças na estrutura secundária e terciária dessa proteína, durante a desnaturação por calor e por uréia.

Apesar de os experimentos clássicos de Tanford terem mostrado que várias proteínas, em presença de GdnHCl 6 M, exibem propriedades hidrodinâmicas de *random coils*, este resultado tem sido mal interpretado no sentido de que o estado desnaturado é um *random coil*, sob todas as condições (Dill e Shortle, 1991). Atualmente, existem evidências

experimentais de que, sob a grande faixa de condições tipicamente utilizadas para desnaturar proteínas, os estados desnaturados apresentam persistentes aglomerados hidrofóbicos e considerável estrutura secundária residual (Dill et al., 1995; Smith et al., 1996). Neste trabalho, os espectros de dicroísmo circular foram também utilizados para avaliar a natureza dos estados desdobrados da β -tripsina, decorrentes da desnaturação térmica e química. Particularmente para os espectros no UV distante, o programa CCA (“Convex Constraint Algorithm”) foi utilizado para estimar o conteúdo de estrutura secundária presente nesses estados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dobramento de proteínas

O dobramento de uma proteína é considerado, por vários autores, como a segunda tradução da mensagem genética, completa a transferência de informação do DNA para o produto ativo do gen – a proteína.

Existem em torno de 100.000 proteínas no genoma humano e cerca de 10^{11} em todos os organismos. Para se tornarem biologicamente ativas, essas proteínas devem se dobrar em uma estrutura tridimensional estável. Apesar da grande diversidade de proteínas, o número de dobramentos é relativamente pequeno, menos do que 700 observados até o presente, enquanto os domínios das proteínas exibem somente 32 diferentes arquiteturas (Thornton et al., 1999). A natureza tem criado um verdadeiro complexo, através da combinação de um número pequeno de elementos simples, tais como os dois mais comuns elementos de estrutura secundária observados nas proteínas: as α -hélices e as fitas β .

A questão do mecanismo do dobramento das proteínas tem sido objeto de estudos pelos cientistas por muitas décadas; porém, significativo avanço se iniciou quando Anfinsen (1973) promoveu o redobramento da ribonuclease reduzida e desnaturada para a sua forma ativa. Ele postulou o princípio fundamental para o dobramento de proteínas em 1973: o dobramento de uma proteína é determinado pela sua sequência de aminoácidos. Porém, surgiram os questionamentos de que conformação dobrada será atingida por uma determinada sequência de aminoácidos, uma vez que cada sequência de aminoácidos não especifica uma única conformação e, de que maneira a cadeia polipeptídica atinge sua conformação dobrada.

O problema do dobramento da proteína pode ser dividido em duas partes. A primeira consiste em determinar que estrutura tridimensional particular é especificada por uma certa sequência de aminoácidos. A comparação de estruturas de proteínas homólogas mostra que existem regiões onde a estrutura nativa das cadeias polipeptídicas é muito

similar. Desse modo, pode-se prever a estrutura de uma proteína a partir de sua sequência de aminoácidos, usando a estrutura conhecida de uma proteína homóloga (Lesk e Chothia, 1986). Pode-se também designar uma sequência de aminoácidos para adotar uma estrutura tridimensional desejada (De Grado et al., 1999). A segunda parte do dobramento de uma proteína é a sequência de eventos, ou seja, a rota pela qual uma proteína atinge sua conformação nativa. Para uma cadeia polipeptídica contendo 100 aminoácidos, onde cada resíduo assume duas diferentes conformações, existiriam 10^{30} possíveis conformações que poderiam ser adotadas por essa cadeia polipeptídica. Se somente 10^{-11} segundos são requeridos para converter uma conformação em outra, uma pesquisa ao acaso de todas as conformações iria requerer 10^{11} anos. Um tempo irreal em um contexto biológico, onde o dobramento ocorre na ordem de segundos ou minutos. Isso é referido como o “paradoxo de Levinthal” e sugere a existência de diferentes rotas preferenciais que a cadeia polipeptídica poderia adotar para alcançar o estado nativo de mínima energia. Assim, a solução desse paradoxo auxiliaria na elucidação da rota, através da qual as conformações nativas podem ser preditas (Karplus, 1997).

Apesar das inúmeras tentativas para desvendar as principais regras do dobramento das proteínas estarem sendo estabelecidas por meio de experimentos *in vitro*, estes parecem ser bons modelos para se entender os mecanismos, através dos quais uma cadeia polipeptídica nascente alcança sua conformação nativa no meio ambiente celular. Além disso, muitas proteínas desnaturadas, até mesmo aquelas onde as pontes dissulfeto foram rompidas, são capazes de redobrar espontaneamente (Ellis e Hartl, 1999). Embora essa suposição tenha sido, a princípio, desafiada pela descoberta dos chaperones moleculares, com base na informação funcional e estrutural atualmente disponíveis sobre essas moléculas, tem sido claramente estabelecido que as principais regras do dobramento das proteínas, oriundas dos experimentos *in vitro*, são também válidas no meio ambiente celular.

Até o momento, o dobramento das proteínas é uma área de pesquisa extremamente ativa, envolvendo aspectos de biologia, química, bioquímica, informática e física. Os princípios fundamentais têm aplicações práticas na exploração dos recentes avanços da pesquisa genômica, no entendimento de várias patologias e nos projetos de novas proteínas com funções especiais (Dobson, 2000; Yon, 2001).

Considerando que o dobramento da proteína na célula é complexo, existe grande probabilidade de defeitos oriundos desse processo. De forma geral, mutações e alterações no meio ambiente podem desestabilizar termodinamicamente os estados nativos e intermediários, alterar a cinética do dobramento e também desviar as proteínas de suas rotas normais de dobramento. Além disso, prolongadas ou inapropriadas associações com chaperones moleculares ou com enzimas de dobramento (prolil isomerase e dissulfeto isomerase), formação de espécies agregadas e fibrilas amilóidicas, ou dobramento em um compartimento inapropriado podem acarretar em perda funcional da proteína e, deste modo, levar a uma conformação molecular alterada (Thomas et al., 1995). Dessa forma, é importante reconhecer que as proteínas no meio ambiente biológico podem existir em uma variedade de diferentes estados e que o estado de uma proteína, sob certas condições, depende de uma série complexa de fatores cinéticos e termodinâmicos. Isto é ilustrado em um esquema na Figura 1.

As doenças associadas a dobramentos incorretos de proteínas abrangem uma grande faixa de estados patológicos. São exemplos: a fibrose cística, a osteogenese imperfeita e o câncer (Baum et al., 1999; Dobson, 2000).

O grupo de doenças associadas ao distúrbio das proteínas, por permanecerem dobradas após produção normal e secreção, é coletivamente conhecido como amiloidoses. Este fato resulta em agregados com o aparecimento de fibrilas amilóidicas, causando as encefalopatias espongiiforme. Essa severa patologia inclui as doenças associadas à proteína *prion*, como a doença da vaca louca no gado e o mal de Creutzfeld-Jacob em humanos (Prusiner, 1997). O mal de Alzheimer, o diabetes do tipo II e a doença de Parkinson são também exemplos de doenças caracterizadas pela presença de depósitos fibrilares amilóides (Dobson, 2000). Apesar de um mecanismo detalhado para o dobramento não ser completamente conhecido, significativos avanços já foram alcançados, no sentido de melhor entender esse processo complexo, por meio de aproximações experimentais e teóricas.

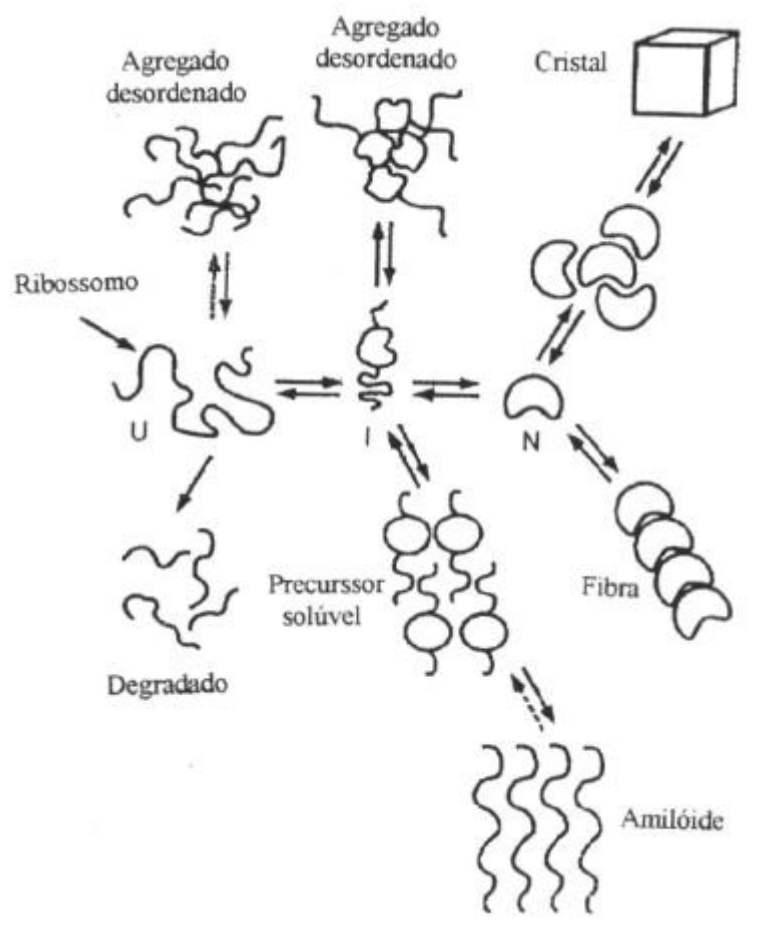


FIGURA 1. Representação esquemática de alguns dos estados acessíveis a uma cadeia polipeptídica, após a sua biossíntese. Em seu estado monomérico (U), a proteína se dobra através de um estado intermediário parcialmente estruturado (I) para um estado nativo globular (N) (Dobson e Karplus, 1999).

2.2 Modelos e rotas de dobramento das proteínas

Baseado nas considerações de como uma cadeia polipeptídica iria superar o “paradoxo de Levinthal”, diferentes modelos de dobramentos oriundos de considerações teóricas, simulações de dobramento ou observações experimentais têm sido propostos. Os estudos teóricos consideram o dobramento das proteínas como um processo estatístico, de tal forma que simulações utilizando uma variedade de funções potenciais são usadas para descrever as várias interações dentro da proteína. As equações de movimento de Newton são resolvidas para definir trajetórias dos diferentes átomos dentro do sistema e simulações estatísticas, utilizando métodos de Monte Carlo, também auxiliam na geração de todas as conformações possíveis para que uma cadeia polipeptídica alcance um modelo teórico tridimensional, bem como nos cálculos das energias para essa estrutura nativa (Dobson e Karplus, 1999)

No modelo hierárquico, as estruturas locais formam-se primeiro, de onde irão resultar as α -hélices e as folhas β , em um processo controlado pelos princípios básicos de formação de estrutura secundária (Kim e Baldwin, 1990; Baldwin e Rose, 1999). Isso é seguido por interações não locais, como, por exemplo, entre duas α -hélices que se agrupam para formar estruturas supersecundárias estáveis. O processo continua até que domínios completos se formam e a cadeia polipeptídica como um todo é dobrada, adquirindo uma conformação estável.

Em um outro modelo alternativo, o dobramento é iniciado por um colapso espontâneo, mediado por interações hidrofóbicas entre resíduos não polares, levando o polipeptídeo a um estado compacto; ou ainda, a formação de alguns segmentos de estruturas secundárias ocorre simultaneamente ao colapso hidrofóbico (Dill et al., 1995). Esse estado, resultante de um colapso hidrofóbico, pode apresentar um alto conteúdo de estrutura secundária similar ou não a esta estrutura na proteína nativa, ser compacto mas possuir um núcleo hidrofóbico parcialmente exposto ao solvente, além de possuir estrutura terciária instável, onde as cadeias laterais de aminoácidos apresentam grande mobilidade. O estado assim caracterizado é sempre referido como um *molten globule* (MG). A comunidade científica considera que o estado de MG representa, pelo menos, um

intermediário geral na rota do dobramento das proteínas (Ptitsyn 1995; Bai e Englander, 1996). Fink (1995) sugere que o MG está presente no processo de dobramento de todas proteínas com mais de um domínio estrutural.

Muitas proteínas provavelmente se dobram através de um processo que incorpora aspectos de ambos modelos. Ao invés de seguirem uma única rota de dobramento, uma população de moléculas pode seguir uma variedade de rotas convergindo para um mesmo destino, onde o número de diferentes espécies conformacionais, parcialmente dobradas, se reduz, à medida que o dobramento se completa. Essa nova visão do dobramento da proteína foi mostrada no modelo do funil de dobramento introduzido por Wolynes et al. (1995). O modelo, denominado “Superfície ou Paisagem Estatística de Energia”, descreve o comportamento cinético e termodinâmico da transformação de um conjunto de moléculas desdobradas para um estado nativo (Figura 2). Nesse funil, uma proteína navega com grande facilidade, através de uma complexa “paisagem” de energia, onde diferentes padrões de dobramento podem surgir, dependendo dos parâmetros energéticos e das condições empregadas. A velocidade de dobramento será reduzida pelas ondulações na paisagem de energia, que correspondem aos mínimos globais populacionados por intermediários parcialmente estáveis. De acordo com esse modelo, existem microrotas paralelas, onde cada cadeia polipeptídica segue sua própria rota. Caminhando à base do funil, o número de conformações que a proteína pode adotar é reduzido, bem como a sua entropia.

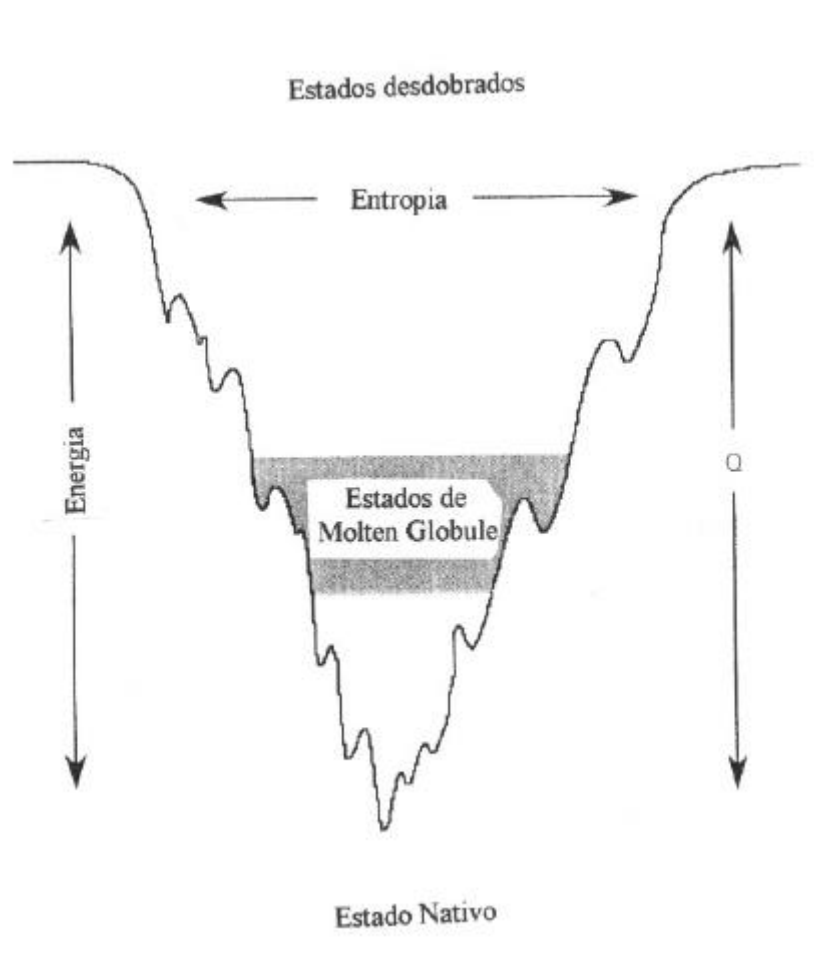


FIGURA 2. A termodinâmica do dobramento de uma proteína visualizada como um funil de energia livre. A largura do funil representa a entropia, e a profundidade, a energia. Q é a fração de contatos nativos indicado para cada coleção de estados (Wolynes et al., 1995).

Muitos resultados experimentais são consistentes com esse novo modelo. Já foi demonstrado que a lisozima e o citocromo *c* redobram de acordo com rotas paralelas alternativas (Segel et al., 1999). Espécies heterogêneas têm também sido detectadas durante o redobramento da fosfoglicerato cinase, algumas delas sendo espécies oligoméricas transitórias (Percorari et al., 1996). Essas espécies têm sido descritas no redobramento da estrutura nativa monomérica para outras proteínas (Silow et al., 1999). Da convergência dos estudos teóricos e experimentais, uma nova visão unificada dos processos de dobramento tem surgido e esse novo modelo é atualmente o mais aceito.

2.3 Detecção e caracterização de intermediários no dobramento das proteínas

A transição desdobraimento/redobraimento, sob condições de equilíbrio, tem sempre sido descrita como um processo entre dois estados, o nativo (N) e o desnaturado (D), no qual somente as espécies nativas e totalmente desdobradas estão presentes. Isso implica em um processo altamente cooperativo onde, sob o ponto de vista estatístico, os pesos da população de espécies intermediárias são negligenciáveis. Além disso, os intermediários são geralmente instáveis, e somente sob algumas condições experimentais, o equilíbrio é deslocado no sentido dessas espécies, tornando possível investigações de caráter estrutural e energético para os estados intermediários (Hayne e Freire, 1993).

A aproximação de um processo de dois estados para a transição desdobraimento/redobraimento é frequentemente válida, para pequenas proteínas, e tem se mostrado valiosa para estudar o comportamento de várias proteínas, quando expostas a condições de desnaturação, especialmente porque permite a aplicação de termodinâmica de equilíbrio para entender características básicas da reação (Pace, 1990). Tal aproximação também permite a determinação de ΔG_u , a energia livre de desnaturação, uma medida da estabilidade conformacional (ou termodinâmica) da proteína.

Existem dois testes, utilizando os dados de curvas de transições no equilíbrio, para averiguar se o processo de desdobraimento de uma proteína se aproxima de uma transição entre dois estados, ou seja, uma curva de transição sigmoidal simétrica e a coincidência de curvas obtidas com diferentes sondas estruturais. A não coincidência dessas curvas de

desnaturação sugere a presença de intermediários no processo de desnaturação (Jackson e Fersht, 1991).

Estudos cinéticos igualmente evidenciam os intermediários durante o desdobramento das proteínas, porém essas espécies também são pouco populacionadas para se obter informação estrutural. Dois maiores impedimentos para caracterização dessas espécies são a alta cooperatividade e a rapidez do processo de renaturação, especialmente no início dos eventos do dobramento da proteína. Para esse propósito, artifícios de mistura rápida, acoplados ao DC, e RMN utilizando troca rápida hidrogênio/deutério, associado a um sistema de mistura para marcação de espécies transitórias, têm-se mostrado bastante informativos na elucidação dos eventos precoces associados com a formação de estrutura secundária (King, 1989; Roder et al., 2000).

Técnicas de engenharia de proteína têm sido também empregadas, com sucesso, na estabilização dos estados intermediários, na elucidação do papel dos resíduos de aminoácidos no processo de dobramento e também na avaliação da estabilidade da proteína (Fersht, 1993).

2.4 Domínios estruturais e o processo de dobramento

Grandes proteínas são geralmente compostas de um certo número de unidades globulares compactas, denominadas de domínio, ligados por curtos segmentos da cadeia polipeptídica. Eles podem se comportar como unidades independentes, ou podem interagir estruturalmente de formas diferentes, durante os processos de dobramento e desdobramento da proteína.

Cada domínio normalmente inclui somente resíduos de aminoácidos que são consecutivos na cadeia polipeptídica, podendo sempre ser separados por clivagem proteolítica do segmento que os une. Domínios bem definidos são sempre considerados como unidades autônomas de dobramento, uma vez que tais estruturas normalmente se dobram independentemente umas das outras. Contudo, outros domínios não são estruturalmente independentes (Jaenicke, 1999).

Muitos dados experimentais têm mostrado que os domínios se comportam como unidades autônomas de dobramento; porém, a habilidade dos domínios, independentemente dobrados, de se associarem para formar uma proteína funcional tem sido observada somente em poucas proteínas, tais como, tioredoxina, elastase e metionil-t-RNA sintetase. Deste modo, parece que, para muitas proteínas, o dobramento correto dos domínios isolados não é suficiente para promover uma organização funcional. Além disso, as interações entre domínios são requeridas durante o processo de dobramento, para permitir os ajustes estruturais que irão resultar na molécula funcional (Yon, 1997).

Portanto, o dobramento de proteínas contendo vários domínios é mais complexo que aquele para as proteínas contendo um só domínio estrutural. A associação dos domínios retarda o processo de dobramento para essas proteínas, de tal forma que intermediários com um ou mais domínios dobrados, mas não pareados, se acumulam. Nessa forma, os domínios podem reconhecer seu par complementar em outra cadeia polipeptídica, conduzindo à agregação dessas formas. Ao contrário, quando a estabilidade de um domínio estrutural é dependente das interações com os outros domínios, o processo de dobramento quase assume as propriedades de um único processo cooperativo (Jaenicke, 1999).

Nas proteínas de multidomínios, cada domínio parece se dobrar individualmente através de um processo co-traducional, ou seja, enquanto a síntese do restante da cadeia polipeptídica ainda está sendo completada (Netzer e Hartl, 1998). Apesar desse fenômeno não estar totalmente elucidado, a co-tradução iria superar a lentidão do redobramento observado com essas proteínas *in vitro*, devido à formação de interações incorretas entre os domínios adjacentes (Ellis e Hartl, 1999).

Além dos estudos de redobramento entre os domínios isolados oriundos de clivagem proteolítica, aqueles tendo como base a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) contribuem com informações adicionais, de caráter estrutural e termodinâmico, aos estudos cristalográficos de proteínas. Essa técnica permite definir regiões da proteína que se comportam ou não como unidades cooperativas, durante o processo de desnaturação térmica. Para o caso de proteínas contendo um só domínio estrutural, essa estrutura corresponde a uma unidade cooperativa. No caso de proteínas de multidomínios, os diferentes domínios podem se comportar como uma única unidade cooperativa durante o desdobramento, dependendo das interações entre eles. Se dois ou mais domínios não são

estruturalmente dependentes, cada um deles pode se desdobrar como uma única entidade termodinâmica, e, nesse caso, o processo de desdobramento apresenta várias transições cooperativas (Privalov, 1982).

Além de evidenciar a presença de uma ou várias unidades cooperativas, que corresponderiam aos domínios estruturais da proteína, esta técnica permite detectar a presença de intermediários durante o processo de desdobramento e quantificar as propriedades termodinâmicas de cada unidade cooperativa.

2.5 Estruturas residuais nos estados desdobrados das proteínas

Os estados desnaturados das proteínas têm sido tradicionalmente assumidos como um conjunto de estruturas nas quais as preferências conformacionais são determinadas, de maneira geral, por restrições estéricas (Dobson et al., 1998). De considerações teóricas, existem evidências de que as conformações mais compactas dentro de um conjunto desnaturado podem apresentar algumas características de dobramento nativo, e ainda se percebe uma grande distribuição de diferentes conformações, algumas das quais são altamente estendidas, mas outras se apresentam extremamente compactas (Smith et al., 1996). O caso extremo do estado desdobrado de uma proteína é conhecido como um *random coil*.

A existência de estrutura no estado desnaturado auxilia tanto o entendimento dos eventos precoces do dobramento das proteínas quanto a avaliação da estabilidade de uma proteína, que é determinada pela diferença entre os estados dobrado e desdobrado. Tem sido postulado que tais estruturas residuais podem se assemelhar a intermediários do dobramento ou representam sítios de iniciação para o dobramento da proteína (Buck et al., 1994). Considerando que os eventos iniciais no processo de dobramento das proteínas consistem de um colapso hidrofóbico, acompanhado ou não pela formação de estruturas secundárias, as microestruturas residuais que persistem durante os processos de desnaturação em várias proteínas podem estar envolvidas no processo de dobramento, como centros de nucleação hidrofóbicos, onde participam regiões locais da cadeia polipeptídica (Garcia et al., 1995).

Para a β -lactoglobulina, Kuwajima et al. (1996) sugerem que a estrutura secundária residual, presente em GdnHCl 4,0 M, seria o local de iniciação do dobramento dessa proteína. A estrutura residual na α -Lactalbumina (α -LA), presente em uréia 10 M, foi atribuída a um núcleo hidrofóbico, capaz de fornecer um molde para a correta organização das partes remanescentes da estrutura, durante o processo de dobramento (Schulman et al., 1997).

Já as proteínas desnaturadas por elevação de temperatura frequentemente exibem evidências de resíduos estruturais na sua forma desnaturada, o que em alguns casos pode resultar em estados intermediários (Fink, 1995).

Em um modelo teórico para o desdobramento térmico de proteínas globulares, Muthusamy et al. (2000) observaram que, para a lisozima da clara de ovo, mais da metade dos resíduos em α -hélice são preservados a 75 °C, e não participam no desdobramento térmico. Os resultados dessas predições teóricas foram consistentes com os experimentos de Chistiakova et al. (1976), mostrando que a 80 °C, metade das estruturas em α -hélice foram também preservadas, através da análise de DC no UV distante. Outra conclusão do trabalho de Muthusamy et al. (2000) foi que o estado desdobrado por calor de oito proteínas globulares típicas, também analisadas, mostrou algum tipo de estrutura residual.

Hamada e Goto (1997) analisaram o espectro de DC no UV distante da β -lactoglobulina, em GdnHCl 5,2 M e concluíram que, nesse estado, a proteína ainda contém 10% de α -hélice e 15% de folhas β .

Fabian et al. (1993) monitoraram o desdobramento da ribonuclease T1 (RNase T1), por calor, através de espectroscopia no infravermelho, acoplada à transformada de Fourier (FTIV). A análise dos espectros revelou que, a 70 °C, essa proteína não apresenta estrutura secundária regular, porém, estruturas do tipo “loop” persistem nesse estado desdobrado. Por outro lado, a mesma técnica revelou que o espectro da concanavalina A, uma proteína com alto conteúdo de folhas β , a 80 °C, foi semelhante àquele da proteína nativa (Jackson e Mantsch, 1992).

Em um estudo utilizando-se espectroscopia de RMN e troca de hidrogênio amida, Buck et al. (1994) mostraram que a lisozima da clara de ovo, em uréia 8 M, contém pouca ou nenhuma estrutura secundária regular, porém, a estrutura da proteína, nesse estado, não se aproxima daquela de um *random coil*. Também, foi demonstrado através de RMN que o

inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) ainda contém interações específicas entre resíduos aromáticos, após a redução de suas pontes dissulfeto (Lumb e Kim, 1994). Por outro lado, a combinação de espectroscopia no FTIV e de RMN mostrou que o estado da RNase HI, desdobrado pelo uso de alta pressão, pode conter estrutura secundária residual (Yamasaki et al., 1998). O estado desnaturado por alta pressão, para a RNase HI, foi caracterizado como um MG, de acordo com os espectros de FTIV, e como um estado desnaturado compacto, exibindo desordem nas cadeias laterais e também presença de aglomerados hidrofóbicos, através da análise dos espectros de RMN em 2D.

2.6 A inativação precedendo ao desdobramento das enzimas

Evidências na literatura indicam que a inativação enzimática normalmente precede as mudanças na conformação molecular da proteína. De fato, tem sido demonstrado que as mudanças na atividade de fumarase ocorrem em concentrações de GdnHCl muito inferiores às aquelas necessárias ao desdobramento das estruturas secundária e terciária da proteína Kelly e Price (1991). De modo análogo, Arnold e Ulbrich-Hofmann (2000) demonstraram que temperaturas moderadas ou baixas concentrações de desnaturantes reduziram a atividade catalítica da RNase A, antes que métodos espectroscópicos indicassem o desdobramento da proteína. Assim, também tem sido demonstrado que o desdobramento da glutatona transferase B1-1 é um processo sequencial, onde inicialmente ocorre a dissociação da estrutura dimérica, resultando em um monômero inativo, seguido do desdobramento desses monômeros (Sacchetta et al. 1993).

Zhou et al. (1993) marcaram os grupos amino e tiol localizados próximo e na região do centro ativo da creatina cinase com o composto o-fitaldeído, para formar uma sonda fluorescente. Durante o desdobramento da proteína com GdnHCl, ocorreram, simultaneamente, inativação enzimática e exposição da sonda, em concentrações do desnaturante, bem menores que aquelas requeridas ao desdobramento total da molécula. Os autores concluíram que, em baixas concentrações do desnaturante, ocorreu um aumento na mobilidade do composto presente no sítio ativo, e que a inativação da enzima sugere que

esse sítio esteja localizado em uma região mais susceptível à perturbação por desnaturantes do que o resto da molécula.

Embora agentes desnaturantes, como uréia e GdnHCl, sejam capazes de promover o desdobramento de proteínas, esses desnaturantes podem aumentar a atividade catalítica de certas enzimas, quando utilizados em baixas concentrações. Exemplos de ativação incluem a fosfatase alcalina (Rao e Nagaraj, 1991), a desidrogenase láctica (Ma e Tsou, 1991; Fernandez-Velasco et al., 1992), desidrogenase málica (Hecht e Jaenicke, 1989), glicerol fosfato desidrogenase (Garza-Ramos et al., 1992), tubulina (Sackett et al., 1994) e outros. De maneira geral, os autores justificam seus resultados pela suposição de que baixas concentrações desses desnaturantes fornecem maior flexibilidade aos sítios ativos das enzimas, acarretando melhoria nos processos catalíticos.

Estudos de difração de raios-X mostram que a presença de um ligante induz mudanças conformacionais no centro ativo das enzimas, e ainda que estes estão normalmente situados em regiões, conectando dois domínios estruturais. Para várias enzimas incluindo a fosfoglicerato cinase, hexoquinase, citrato sintase e aspartato amino transferase, o movimento dos domínios como o de uma dobradiça tem sido descrito como um mecanismo fundamental para melhor posicionar o substrato, favorecendo a reação enzimática (Yon et al., 1990). Assim, parece provável que os centros ativos da maioria das enzimas estejam situados na região entre os domínios, que é mais flexível ou móvel, comparada à molécula como um todo, e, conseqüentemente, mais sensível a perturbações por agentes desnaturantes ou fatores físicos (Tsou, 1995).

2.7 Serino proteases – Aspectos gerais

As serino proteases são enzimas proteolíticas caracterizadas pela presença, em seu sítio ativo, de uma cadeia lateral de serina excepcionalmente reativa. São muito difundidas na natureza, compreendendo diversificadas funções. Duas famílias dessa classe de enzimas têm sido especialmente bem estudadas, a família da tripsina e da subtilisina. Apesar de serem homólogas, a conformação espacial das moléculas pertencentes a essas duas famílias, é diferente. Devido a isso, Lesk e Fordman (1996) propuseram que a

nomenclatura “serino protease” fosse utilizada exclusivamente para as moléculas pertencentes à família da tripsina.

A comparação entre as estruturas primárias de várias serino proteases revela a alta homologia de sequência (Figura 3) e a determinação da estrutura por raios-X dessas enzimas mostra que a semelhança no arranjo tridimensional é ainda maior (Hartley e Shotton, 1971; Birktoft e Blow, 1972; Stroud et al., 1974; Bode et al. 1983). Yamane et al. (1991) observaram alta homologia de sequência entre a tripsina bovina e a tripsina de bactérias do gênero *Streptomyces*, que se estende no nível de estrutura terciária, conforme demonstrado por meio de cristalografia de raios-X.

As sequências de tripsinas disponíveis em banco de dados foram coletadas e alinhadas por homologia de sequência e, posteriormente, por superposição das estruturas de raios-X das tripsinas: bovina, da bactéria *Streptomyces griseus* e do fungo *Fusarium oxysporum*. A árvore filogenética, construída de acordo com esse múltiplo alinhamento, é consistente com uma evolução divergente contínua da tripsina a partir de um ancestral comum para ambos, procariotos e eucariotos. Além disso, a comparação das estruturas cristalográficas revela uma grande conservação dos elementos de estrutura secundária. Os resíduos conservados estão associados às características funcionais básicas da proteína, ou seja, ativação do zimogênio, catálise e especificidade do substrato. Os resíduos do núcleo hidrofóbico da proteína e os sítios de ligação para o cálcio não são, de forma geral, muito conservados (Rypniewski et al., 1994).

A tripsina bovina é produzida pelas células exócrinas do pâncreas como um precursor inativo (tripsinogênio), o qual é constituído por uma cadeia polipeptídica de 229 resíduos de aminoácidos, interligada por seis pontes dissulfeto. A ativação do tripsinogênio ocorre "in vivo" no intestino por ação de uma enteropeptidase ou por moléculas de tripsina ativa (auto-catálise) através de proteólise limitada. Após a hidrólise da ligação peptídica Lys₆-Ile₇ e liberação do hexapeptídeo amino-terminal, Val-(Asp)₄-Lys, o tripsinogênio é transformado na forma ativa da enzima (Davie e Neurath, 1955).

```

10
    20      25      30      35      a      40      45
Qt: I V N G K E A V P G S W P W O V S L O D K . T G P H P C G G S L I N
Bt: I V G G Y T C G A N T V P Y O V S L N S . . . G Y H P C G G S L I N
Ca: I I G G R E C E K N S H P W O V A I Y H Y . . S S P O C G G V L V N
Pp: V V G G C V S I P H S W P W O I S L R Y R . Y R G H P C G G T L I S
Th: I V E G S D A E I G M S P W O V M L P R K S P O E L L C G A S L I S

    50      55      60 a      u      i      65      70
Qt: E N W V V T A A H C G V . . . . . T T S D V V V A G E F D Q
Bt: S O W V V S A A H C Y K . . . . . S G I Q V R L . G E D N I
Ca: P K W V L T A A H C K N . . . . . D N Y E V W L . G R H N L
Pp: P E W V L T A K H C L E . . . . . K S S S P S S Y K V I L G A H E E
Th: D R W V L T A A H C L L Y P P W D K N P T E N D L L V R I G K H S R

    75      a      80      85      90      95 a b y z      a      100
Qt: G S S S . E K I O K L K I A K V P K N S K Y N . . . S L . T I N N
Bt: N V V E . G N E O P I S A S K S I V H P S Y N . . . S N . T L N N
Ca: P R N K . N T A Q P F G V T A D P P H P G P N L S A D G K . D Y S H
Pp: Y H E G . M G V Q E I D V S K L P K E P S E A . . . . .
Th: T R Y E R N I E K I S M L E K I Y I H P R Y N . . . W R E N L D R

* 105      110      115      120      125a c      129a c
Qt: D I T L L K L S T A A S P S O T V S A V C L P S . . . A S D D . . .
Bt: D I M L I K L K S A A S L N S R V A S I S L P T . . . S C A . . .
Ca: D L M L L R L O S P A K I T E R A V K V L E L P T . . . O E P . . .
Pp: D I A L L K L S S P A V I T D K V I P A C L P T P N Y . . . V V A D
Th: D I A L M K L K K P V A F S D Y I H P V C L P D . . . R E T A A S L

130      135      140      145      a b 149a c      a150      155
Qt: P A A G T T C V T T G W G L T R Y T . . N A . . . N T P D R L O
Bt: S . A G T N C L I S G W G N T K S S . . G T . . . S Y P D V L K
Ca: E . L G S T C R A S G W G S I E P G P D D F . . . E P P D E I Q
Pp: R . . T A C Y I T G W G B T K G T . . . Y . . . G A G L . L K
Th: L O A G Y K G R V T G W G N L K E T . . W T A N V G K G Q P S V L O

    160      165      170      175      a b180      a185 a
Qt: Q A S L P L L S N T N C K K Y W G T K I K D A . . M I C A G . A S .
Bt: C L K A P I L S N S S C K S A Y P G Q I T S N . . M P C A G Y L O .
Ca: C V Q L T L L Q N T F C A D A H P D K V T E S . . M L C A G Y L P .
Pp: E A R L P V I E N K V C N R Y E Y L G G K V S P N E L C A G H L A .
Th: V V N L P I V E R P V C K D S T R I R I T D N . . M P C A G Y K P D

    d 188a 190      195      200      a b205      210
Qt: . . . G V . S S C M G D S G G P L V C K K N . . G A W T L V G I V S
Bt: . . . G G K D S C Q G D S G G P V V C S G K . . . . . L Q G I V S
Ca: . . . G G K D T C M G D S G G P L I C N G M . . . . . W Q G I T S
Pp: . . . G G I D S C O G D S G G P L V C P E K . . D K Y I L Q G I T S
Th: E G K R G . D A C E G D S G G P F V H K S P F N N R W Y Q M G I V S

215      220 a      225      230      235      240      245
Qt: W G S S T C S . T S T P G V Y A R V C A L V N W V O O T L A A N
Bt: W G S . G C A O K N K P G V Y T K V C N Y V S W I K O T I A S N
Ca: W G H T P C G S A N K P S I Y T K L I P Y L D W I D D T I T E N P
Pp: W G L . G C A L P H K P G V Y V R V S R P V T W I E E I M R R H
Th: W G E . G C D R D G K Y G F Y T H V P R L K K W I Q K V I D Q P G E

```

FIGURA 3. Estrutura primária da π -quimotripsina e β -tripsina bovinas, calicreína A de pâncreas de suínos e das cadeias polipeptídicas que contêm o sítio catalítico da plasmina suína (cadeia leve) e trombina humana (cadeia B ou pesada). Os resíduos de aminoácidos foram numerados em função da sequência do quimotripsinogênio (Hartley e Shotton, 1971). O alinhamento é baseado na homologia entre as estruturas tridimensionais (Birktoft e Blow, 1972; Bode e Schwager, 1975; Bode et al., 1983, 1989). A sequência da plasmina suína foi alinhada de modo a se obter a máxima homologia e considerando as semelhanças estruturais dos seguintes aminoácidos: D=E, K, R; G=A,V; A=V,L,I,M; F=T,W; S=T; Q=N; G=P (Greer, 1981).

Notação: Qt (quimotripsina), Bt (β -tripsina), Ca (Calicreína A), Pp (plasmina suína), Th (trombina humana). O ponto (.) foi utilizado para indicar as falhas no alinhamento relativo das cadeias.

A clivagem auto-catalítica da β -tripsina na ligação Lys₁₃₁-Ser₁₃₂ leva à formação da α -tripsina (Shoroeder e Shaw, 1968). Estudos de difração com raios-X revelaram que essa ligação peptídica está presente em um segmento da cadeia que se liga fracamente ao resto da molécula, denominado "loop" de autólise (Bode et al., 1976). Sakiyama e Kawata (1983) verificaram que, para a tripsina de *Streptomyces erythraceus*, o fenômeno de autólise dificilmente ocorria na faixa de pH entre 5 e 10. Este fato foi atribuído à ausência de Lys ou Arg no "loop" de autólise dessa enzima (Yamane et al., 1991).

A clivagem da α -tripsina na ligação Lys₁₇₆-Asp₁₇₇ leva à formação da pseudo-tripsina, ϕ -tripsina (Smith e Shaw, 1969). A β -tripsina é uma cadeia polipeptídica única, enquanto a α e a ϕ -tripsina possuem, respectivamente, duas e três cadeias polipeptídicas mantidas juntas por pontes dissulfeto.

Durante o processo de ativação do tripsinogênio, ocorre também a liberação de produtos mais degradados, inativos. A formação de tais produtos é fortemente influenciada pela presença de íons cálcio, que promove seletivamente a produção de β -tripsina (Abita et al., 1969; Prestrelski et al., 1991). Tanto a tripsina quanto o tripsinogênio apresentam sítios de ligação específicos para o íon cálcio. O sítio de maior afinidade está situado em um "loop" compreendendo os resíduos de aminoácidos de números 70 a 80 (Bode e Schwager, 1975). No tripsinogênio, existe um sítio adicional, de menor afinidade, para a ligação do cálcio próximo aos dois resíduos de ácido aspártico, que fazem parte do peptídeo de ativação (Abita et al., 1969).

Para temperaturas na faixa de 40 a 45 °C, e na presença de cálcio, a tripsina forma um complexo tripsina-cálcio, que possui maior atividade e estabilidade térmica quando comparada à tripsina livre desse íon (Siphos e Merckel, 1970). Gabel e Kashe (1973) observaram uma redução na velocidade de autólise da β -tripsina, à temperatura ambiente e em presença de cálcio 20 mM, comparada à autólise da proteína na ausência de cálcio. Na presença de íons cálcio 2,0 mM, a β -tripsina foi estabilizada frente à autólise em pH 8,0 e temperaturas de 15 e 20 °C (Dias e Rogana, 1986).

No nível estrutural, Bulaj e Otlewski (1995) verificaram que a molécula de tripsinogênio, quando complexada aos íons cálcio, ganha adicional estabilidade conformacional, na faixa de pH entre 5,5 e 8,3. Particularmente em pH 8,3, foi reportado

um aumento em 6,1 kcal/mol na estabilidade termodinâmica da proteína ligada ao cálcio, comparada à estabilidade da proteína livre do ligante. Porém, k_{cat} , K_M e k_{cat}/K_M não se alteram na presença deste íon. Dessa forma, os autores concluíram que as propriedades atividade catalítica/ligação do cálcio estão separadas, ou seja, uma grande estabilização na estrutura do tripsinogênio não é acompanhada por mudanças no processo de catálise.

A ativação do tripsinogênio, através do evento primário que é a hidrólise da ligação Lys₆-Ile₇, provoca uma alteração conformacional que confere à tripsina sua atividade catalítica e especificidade características. O resíduo de Ile₇ recém-formado movimenta-se para o interior da molécula e forma um par iônico entre seu grupamento α -amino e o grupo carboxilato do resíduo de Asp₁₈₂ (Stroud et al., 1974; Huber e Bode, 1978). Durante essa mudança conformacional, alguns segmentos da molécula, que eram flexíveis no tripsinogênio, tornam-se imobilizados na tripsina. Esses segmentos, denominados “domínio de ativação”, representam cerca de 15% da estrutura do zimogênio e compreende as sequências amino-terminal até Gly₁₀, e três segmentos em “loop” compreendendo os resíduos Gly₁₁₈-Pro₁₃₈, Gly₁₇₀-Gly₁₈₁, e Gly₂₀₀-Asn₂₀₇ (Brunger et al., 1987). Com essa ligação, há uma correta orientação do sítio de especificidade (bolso hidrofóbico) e da fenda oxianiónica da tripsina (Huber e Bode, 1978; Kossiakof et al., 1977).

De fato, Bulaj e Otlewski (1995) e Hedstrom et al. (1996) demonstraram um aumento em 3 kcal/mol na estabilidade conformacional da molécula de tripsina, decorrente da formação dessa nova interação iônica.

O sítio catalítico é constituído pelos resíduos de Ser₁₈₃, His₄₆ e Asp₉₀, que tomam parte diretamente do processo de catálise e são referidos como a “tríade catalítica” (Inagami, 1972). Esses resíduos encontram-se próximos na estrutura tridimensional da molécula da tripsina e de todas as serino proteases estudadas, mostrando sua importância para a eficiência da catálise enzimática (Kraut, 1977).

A “fenda oxianiónica” é um outro componente do sítio catalítico da tripsina. É formada pelos grupamentos -NH dos resíduos de Gly₁₈₁ e Ser₁₈₃. Durante a catálise enzimática, há uma interação desses resíduos, por pontes de hidrogênio, com o oxigênio aniônico do intermediário tetraédrico (Nagakawa e Umeyama, 1984).

A β -tripsina é constituída por uma cadeia polipeptídica única de 223 resíduos de aminoácidos, interligada por seis pontes dissulfeto. A sua estrutura secundária é

caracterizada pela predominância da cadeia estendida ou folhas β , e pouca estrutura α -hélice. A molécula apresenta um arranjo tridimensional globular, em forma elíptica, onde as fitas β estão organizadas de forma antiparalela, dispostas como se formassem dois cilindros ou barris, caracterizados pela presença de resíduos hidrofóbicos em seu interior (Figura 4). Cada barril constitui um domínio estrutural da molécula de tripsina.



FIGURA 4. A estrutura tridimensional da tripsina bovina. Os resíduos de aminoácidos foram numerados de acordo com a sequência do quimotripsinogênio.

A Figura 5 mostra as pontes de hidrogênio entre os átomos de carbono da cadeia principal da tripsina. As duas partes que compõem a estrutura da proteína foram descritas por Stroud e Dickerson (1974), e são bem visualizadas nesse esquema em zig-zag. Os resíduos de aminoácidos de números 17 a 122 constituem uma unidade estrutural que corresponde ao domínio N terminal da proteína e os resíduos de 122 a 245 constituem o domínio C terminal. Também aparecem duas estruturas em α -hélice, uma bem definida, compreendendo os resíduos 230 a 235, e a outra que não é muito uniforme, formada pelos resíduos 164 a 176. O íon de cálcio está representado em seu sítio de ligação na molécula da tripsina.

Apesar dos domínios apresentarem estruturas tridimensionais similares, não existe homologia na sequência de aminoácidos entre eles. Baseado no fato de que a estrutura tridimensional é mais conservada do que a sequência primária, foi sugerido que os membros da família da tripsina se desenvolveram por duplicação gênica de um único domínio ancestral dessas proteases (Neurath, 1984).

Um recente estudo, baseado na identificação de pequenas sequências repetidas em proteínas, forneceu forte evidência para duplicação em *tandem* do gen ancestral para essa família (Baptista et al., 1998). Os autores propuseram que a provável rota evolucionária para o desenvolvimento das tripsinas atuais envolveu uma extensiva duplicação intrínseca de um gen em *tandem*, presente em um pequeno fragmento de DNA contendo 15 a 18 nucleotídeos, correspondendo de 5 a 6 resíduos de aminoácidos. Assim, cada barril se desenvolveu através de extensiva duplicação de um pequeno segmento do gen, correspondendo a um fragmento de peptídeo de 5 a 6 aminoácidos, como mostrado na Figura 6.

O centro ativo da tripsina está situado em uma fenda entre os dois domínios. O domínio 1 contribui com dois dos resíduos da tríade catalítica, a His₅₇ e o Asp₁₀₂, enquanto a Ser₁₉₅ é parte do segundo domínio, como também visualizado na Figura 4. Os resíduos de His₅₇ e Ser₁₉₅ são parte das mesmas regiões em “loop” nos domínios 1 e 2, respectivamente; ou seja, a His₅₇ se situa entre um “loop” que conecta as fitas beta 3 e 4 (3-4) no domínio 1 e a Ser₁₉₅ se localiza no “loop” que conecta essas duas fitas, porém no domínio 2. O Asp₁₀₂ está dentro do “loop” (5-6) do domínio 1. O restante do centro ativo é formado por duas regiões em “loop” (3-4 e 5-6) do domínio 2 (Carter e Wells, 1988).

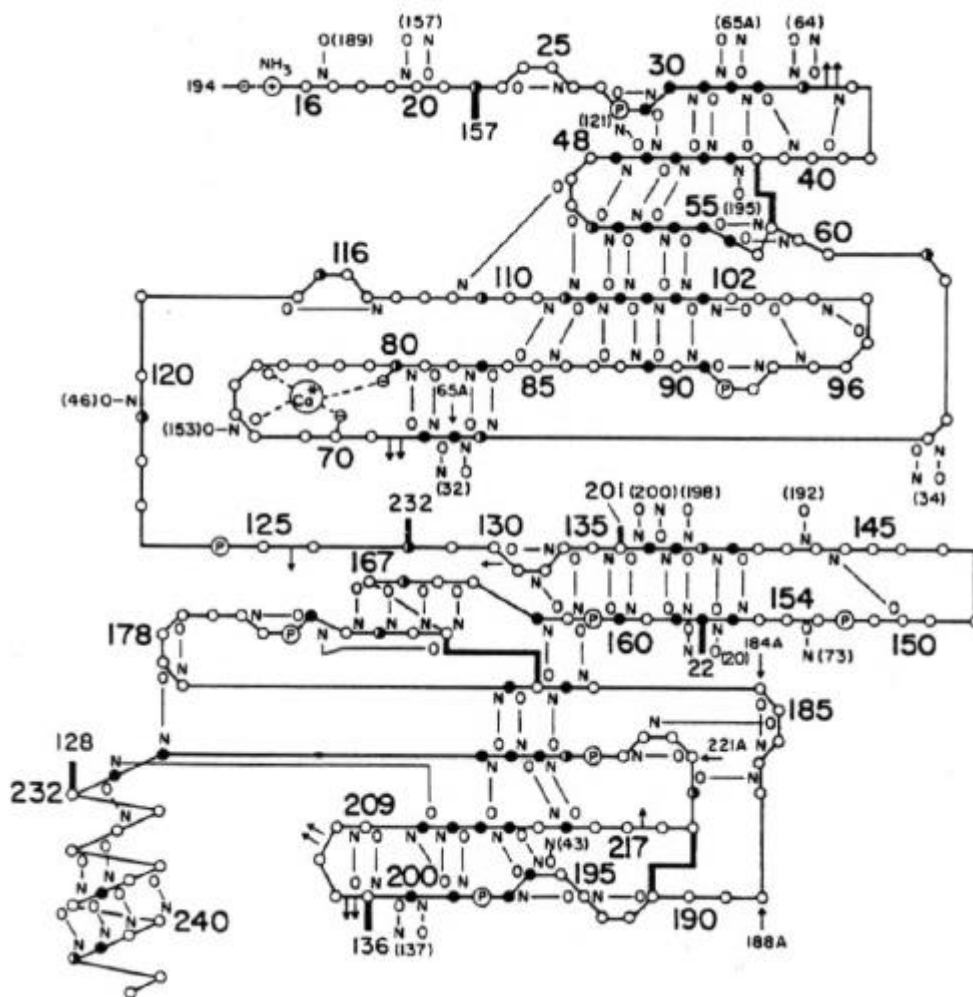


FIGURA 5. Diagrama esquemático dos domínios estruturais da β -tripsina bovina (Kossiakoff, 1982).

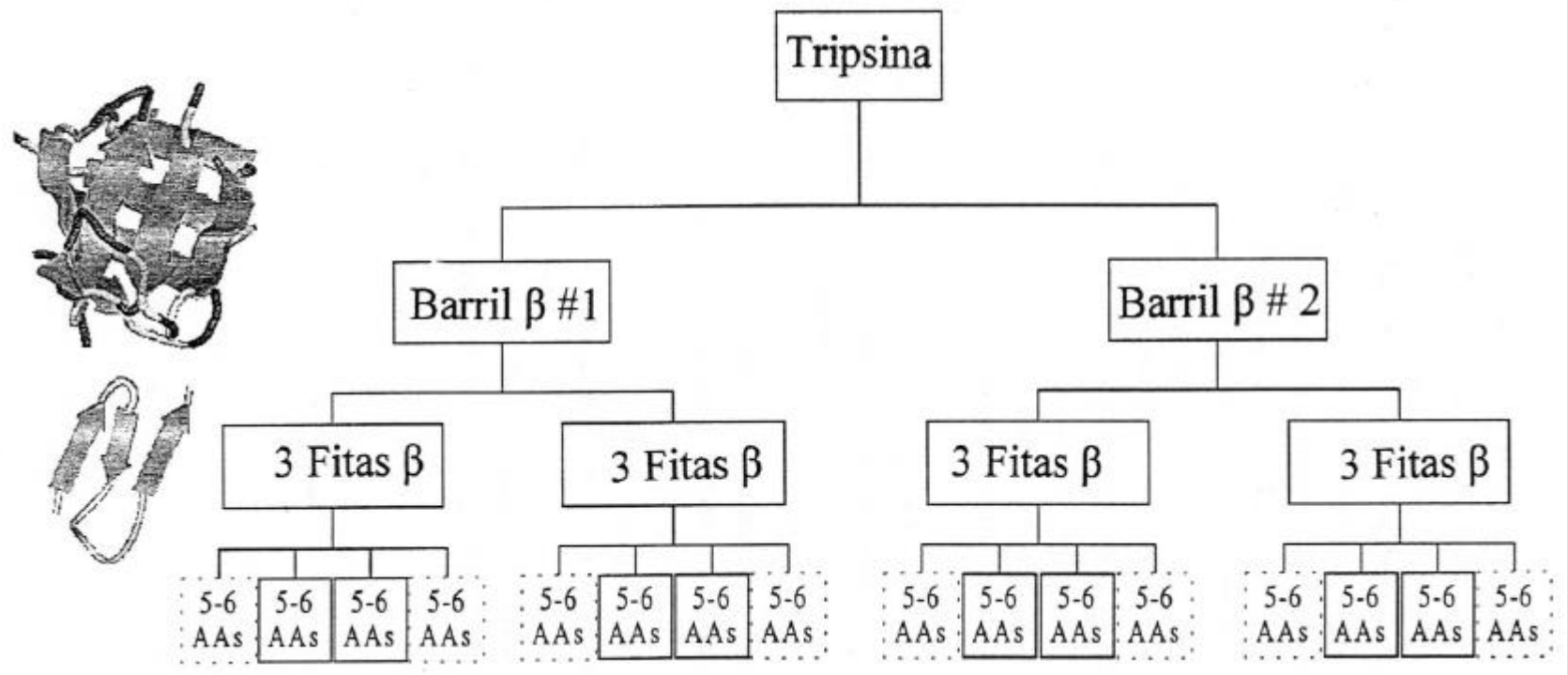


FIGURA 6. Uma representação esquemática da evolução de proteínas da família da tripsina. A estrutura 3D de uma proteína genérica pode ser decomposta em dois barris β . Cada barril é composto de dois segmentos contendo três fitas β . similares. Em um nível mais baixo de complexidade, cada segmento de três fitas β é composto de várias repetições em *tandem*, de 5 a 6 fragmentos de aminoácidos (Baptista et al., 1998).

Os primeiros estudos estruturais do tripsinogênio e da tripsina bovinos foram realizados por Lazdunski e Delaage (1965, 1967). Esses autores investigaram as desnaturações induzidas por mudanças de pH e temperatura, usando técnicas cinéticas, espectrofotométricas e espectropolarimétricas. Na desnaturação térmica em pH ácido, o processo foi totalmente reversível. Os valores das temperaturas de transição (T_m) diminuía à medida que o valor de pH reduzia. Para a tripsina em pH 2,98, a transição se processou somente entre dois estados, com T_m de aproximadamente 56 °C. Com relação ao cálcio, os estudos com dispersão rotatória mostraram que esse íon aumentou a organização das moléculas de tripsina.

Zajicek et al. (1981) acompanharam a desnaturação térmica da β -tripsina bovina por mudanças na absorção e na fluorescência dos cromóforos presentes na proteína. Os estudos foram realizados em pH 3,0, na presença de NaCl 0,1 M. As curvas de desnaturação reversíveis, obtidas pelas duas técnicas espectroscópicas, não foram coincidentes. Este fato levou os autores a concluir que o processo de transição da β -tripsina em pH 3,0 não é de dois estados. Experimentos com DSC revelaram que o processo de desnaturação térmica para a β -tripsina, em pH 2,8, é uma transição entre dois estados, apesar dessa proteína possuir dois domínios estruturais (Tishchenko e Gorodkov, 1979). Higaki e Light (1986) usaram experimentos de cinética de redobramento para propor que as cadeias polipeptídicas das serino proteases renaturam independentemente e que, em seguida, os domínios estruturais interagem para regenerar a molécula funcional.

Mais recentemente, Bulaj e Otlewski (1995) descreveram parâmetros termodinâmicos para a desnaturação térmica do tripsinogênio e da β -tripsina. Também alguns dados, mais limitados, foram publicados para a cinética de desdobramento da β -tripsina (Otlewski et al., 1996).

Um estado de “molten globule” para a β -tripsina foi induzido, durante o desdobramento dessa proteína, pelo uso de alta pressão hidrostática e temperatura de 0 °C (Ruan et al., 1997).

2.8 Métodos espectrais e sua utilização no estudo de mudanças conformacionais em proteínas

As proteínas absorvem luz e emitem radiação na faixa espectral do ultravioleta (UV). Durante a absorção, a energia da fonte de luz é usada para promover os elétrons de um estado básico a um estado excitado. Os elétrons que participam dos sistemas aromáticos deslocalizados, frequentemente absorvem luz na região do visível ou do UV próximo, e aqueles presentes na ligação amida peptídica absorvem o fóton na faixa do UV distante. Dessa forma, na molécula de uma proteína, a absorvância é causada pelos grupos peptídicos, pelos aminoácidos aromáticos e, em pequena contribuição, pelas pontes dissulfeto. Algumas proteínas que apresentam co-fatores ligados covalentemente, tais como as proteínas heme, absorvem luz na região do visível (Schmid, 1990).

A emissão de fluorescência origina dos aminoácidos aromáticos e é observada quando elétrons excitados reverterem do primeiro estado excitado para o estado básico. Quando um cromóforo é parte de uma estrutura assimétrica, ou quando ele está imobilizado dentro de um meio ambiente assimétrico, a luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda é absorvida com diferentes intensidades. Este fenômeno é chamado dicroísmo circular (DC).

Essas propriedades espectrais de uma molécula protéica dependem do ambiente molecular e da mobilidade dos cromóforos presentes na proteína. Mudanças na polaridade do microambiente dos resíduos de triptofano, presentes na molécula da proteína, podem ser verificadas pela fluorescência intrínseca desses resíduos, utilizando-se um determinado comprimento de onda para excitação desses cromóforos. O DC das cadeias laterais aromáticas, ou UV próximo, é sensível à precisa orientação desses resíduos em uma proteína nativa. Portanto, essa técnica detecta mudanças na mobilidade dos resíduos aromáticos, sendo uma boa sonda para a formação e perda da estrutura terciária da proteína.

Os polipeptídeos e as proteínas apresentam regiões onde os cromóforos peptídicos estão em arranjos altamente ordenados, tais como hélices alfa, folhas beta paralelas e antiparalelas e também vários tipos de voltas beta. Estes arranjos constituem os elementos de estrutura secundária das proteínas. Dependendo da orientação das ligações peptídicas nesses arranjos, as transições óticas da ligação amida podem ser quebradas em múltiplas

transições, os comprimentos de onda das transições podem ser deslocados e suas intensidades aumentadas ou diminuídas. Essas transições contribuem de maneira significativa para o espectro de DC na região do UV distante (Cantor e Schimmel, 1980). Como consequência, esta técnica é bastante sensível à estrutura secundária das proteínas, o que torna fácil monitorar as mudanças conformacionais de proteínas que resultam das alterações em temperatura, pH, força iônica, composições de solventes e interação com ligantes (Johnson, 1988).

Os métodos espectrais são de grande poder de informação nos estudos de transições estruturais das proteínas, pois levam em conta as propriedades espectrais mencionadas acima. O acompanhamento da desnaturação da proteína, através de DC no UV próximo, espectroscopia de absorção no UV e fluorescência, pode mostrar mudanças no microambiente dos resíduos aromáticos que refletem alterações da estrutura terciária e exposição de resíduos hidrofóbicos; enquanto o DC no UV distante reflete mudanças na estrutura secundária (Schmid, 1990).

2.9 Métodos para se estimar a estrutura secundária de proteínas, a partir do espectro de DC no UV distante

Existem diversos métodos de análise dos espectros de DC de proteínas, que podem estimar as porcentagens dos elementos de estrutura secundária. Estes métodos são empíricos e, em sua maioria, utilizam um grupo de proteínas de estrutura tridimensional conhecida, como referência.

Os programas VARSLC (Método de Seleção Variável), desenvolvido por Manavalan e Johnson (1987), e o SELCON (“Self-Consistent Method”) [Sreerama e Woody (1993)] se destacam por apresentarem boa acuracidade na estimativa da estrutura secundária para várias proteínas (Greenfield 1996).

No primeiro método, uma base de dados inicial, contendo as proteínas de referências, cujos espectros e estruturas secundárias são conhecidos, é selecionada. Alguns dos espectros das proteínas são eliminados, sistematicamente, para criar novas bases de dados com um número menor de padrões de referência. Os resultados obtidos, utilizando-se cada série, são então examinados, e aqueles que preenchem os critérios de seleção, para um

bom ajuste, são amostrados. De acordo com Greenfield (1996), o programa VARSLC fornece uma boa avaliação da conformação da proteína em solução. Sua maior desvantagem é que ele é recomendado para dados coletados até, no mínimo, 184 nm. Além disso, o programa é relativamente lento, uma vez que todas as combinações devem ser testadas individualmente.

Sreerama e Woody (1993) fizeram modificações no método da seleção variável (VARSLC), o que melhorou sua velocidade e confiabilidade. Assim, utilizando-se o programa SELCON, as proteínas da série de referência são arranjadas em ordem crescente dos valores, apresentando maior diferença no quadrado médio do resíduo do espectro de DC da proteína a ser analisada, e os espectros menos semelhantes ao espectro de interesse são sistematicamente removidos. Este procedimento aumenta a velocidade de se encontrar as melhores soluções. Além disso, o programa inclui o espectro de DC da proteína a ser analisada, na série de proteínas de referência, o que melhora a predição da estrutura secundária. Um valor arbitrário inicial é atribuído às porcentagens de estrutura secundária da proteína a ser analisada, com base nas porcentagens da proteína da base de referência com a qual a proteína desconhecida apresenta maior coeficiente de correlação. O programa desconvolui a série de referência a qual contém o espectro de DC de interesse, utilizando o método de desconvolução de valor singular. A estrutura secundária é, então, determinada e o resultado substitui os valores iniciais. O processo é repetido até que haja convergência para o valor arbitrário anterior.

Segundo Greenfield (1996), o método CCA (*Convex Constraint Algorithm*) [Perczel et al., 1991] não fornece boa estimativa para a estrutura secundária de proteínas desconhecidas; porém, é o mais adequado para se examinar o espectro de proteínas e polipeptídeos em função de temperatura e pH, e na ligação de uma molécula na estrutura da proteína.

Esse algoritmo desconvolui o conjunto de espectros de DC obtidos como uma função da temperatura ou de diferentes condições do solvente, em componentes básicos. Assim, o programa extrai dessa série de espectros os componentes puros, ou seja, um espectro para 100% de estruturas em α -hélices, outro para 100% em folhas β , e assim por diante, sem a necessidade de uma série de proteínas de referências. A porcentagem dos

componentes puros presentes em cada espectro, registrados em diferentes temperaturas e concentrações de desnaturantes, é também fornecida.

Para que o espectro seja analisado por qualquer método de estimativa de estrutura secundária, os dados de elipticidade devem ser convertidos em valores normalizados. A unidade mais comum utilizada nas medidas de dicroísmo circular de proteínas e peptídeos é a elipticidade molar média por resíduo:

$$[\Phi] = \Phi_{\text{obs}} \times M / d \times c \times N$$

onde, Φ_{obs} são os valores de elipticidade em graus, obtidos no espectropolarímetro, M é a massa molecular da proteína, N é o número de resíduos de aminoácidos, (d) é a espessura da cubeta em cm e (c), a concentração da proteína em (mg/mL).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o processo de desdobramento da β -tripsina, por meio de medidas no equilíbrio, visando à elucidação do mecanismo de transição da proteína do estado dobrado para o desdobrado.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Obter os parâmetros ΔH_{vH} e T_m associados ao processo de desnaturação, em pH 2,8, assim como em diferentes valores de pH na faixa ácida, com o propósito de determinar a variação da capacidade calorífica (ΔC_p) para esse processo e de estimar a estabilidade conformacional da proteína (ΔG_u).

3.2.2 Obter as entalpias calorimétrica (ΔH_{cal}) e de van't Hoff (ΔH_{vH}), com o intuito de avaliar o comportamento dos domínios estruturais da molécula da β -tripsina, durante o processo de desdobramento da proteína.

3.2.3 Obter espectros de fluorescência e de DC no UV próximo e distante, em presença de uréia, na faixa de concentração de zero a 5,0 M, com o propósito de avaliar o efeito desse desnaturante no desdobramento da β -tripsina.

3.2.4 Obter espectros de DC na região de 260-180 nm, visando estimar, quantitativamente, a porcentagem de estrutura secundária dessa proteína, em solução, utilizando-se os programas SELCON e VARSLC.

3.2.5 Obter espectros de DC na região do UV distante, visando estimar, quantitativamente, a porcentagem das mudanças nos elementos da estrutura secundária da β -tripsina, com o aumento da temperatura e em diferentes concentrações de uréia, utilizando-se o método CCA.

3.2.6 Efetuar medidas de atividade amidásica da β -tripsina em presença de uréia, e comparar as mudanças na atividade da enzima frente a mudanças na fluorescência intrínseca da proteína.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Proteína e reagentes químicos:

Tripsina bovina, uréia, NPGB e L-BApNA foram obtidos da *Sigma*; bis-ANS foi fornecido pelo Prof. Carlos Francisco Sampaio Bonafé. Todos os outros reagentes foram de qualidade analítica.

4.2 Purificação e preparo da proteína:

A β -tripsina foi purificada a partir da tripsina comercial bovina em uma coluna de SP-Sephadex C-50, de acordo com o procedimento descrito por Schroeder & Shaw (1968), modificado por Dias e Rogana (1986). A pureza da proteína foi determinada por SDS-PAGE em géis de 15%, preparados de acordo com Laemmli (1970). A concentração e diálise foram feitas utilizando-se concentradores Centriplus-10 da *Amicon*, a 4 °C. As amostras, assim obtidas, foram liofilizadas e mantidas a -80 °C.

4.3 Determinação da concentração de tripsina:

A concentração da proteína foi determinada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de $35.682 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 280 nm e a pH 3,0 (Villanueva & Herskovits, 1971), e padronizada através da titulação do centro ativo com NPGB, de acordo com Chase & Shaw (1967).

4.4 Experimentos de desnaturação térmica:

Em todos os experimentos de desnaturação térmica, a β -tripsina foi dializada contra o tampão glicina 50 mM, pH 2,8. A escolha desse tampão deve-se ao fato de o mesmo apresentar baixa entalpia de ionização.

4.4.1 Espectroscopia no UV: O desdobramento da proteína induzido por calor foi acompanhado pela mudança na absorvância a 286 nm, utilizando-se um espectrofotômetro *Gilford Response II*, equipado com um termoprograma para controle da temperatura nas cubetas. A célula de referência continha o tampão de diálise. As soluções de proteína foram aquecidas de 25 a 75 °C, em intervalos de 0,5 e 1 °C, o que resultou em uma taxa de aquecimento de 0,79 e 1,4 °C/min, respectivamente. A reversibilidade da desnaturação térmica foi confirmada, após resfriamento a 25 °C da solução da proteína, previamente aquecida, até 75 °C e subsequente reaquecimento. Para determinar a mudança na capacidade calorífica (ΔC_p), os experimentos de desnaturação térmica foram realizados nos valores de pH de 2,2; 2,5; 2,8; 3,0, 3,4; 3,6 e 4,0.

A mudança na absorvância foi também observada, utilizando-se um espectrofotômetro Cary 3 (*Varian*). A amostra foi mantida em uma cubeta fechada, dentro da qual uma sonda de temperatura foi inserida. A solução foi levemente agitada durante todo o experimento. Uma cubeta, contendo somente o tampão, foi colocada no compartimento como referência. Os dados foram coletados a uma taxa de aquecimento de 0,4 °C/min, com um tempo médio de 15 segundos em cada intervalo de temperatura.

4.4.2 Espectroscopia com DC: Os dados de dicroísmo circular foram coletados em um espectropolarímetro AVIV 62DS, equipado com um controlador de temperatura termoelétrico. Um termopar, com precisão de $\pm 0,2$ °C, foi inserido na cubeta da amostra para acompanhar diretamente a temperatura da solução de proteína. O desdobramento térmico da β -tripsina foi efetuado, aquecendo-se a amostra a uma taxa constante de calor (0,42 °C/min), e monitorando simultaneamente a elipticidade em comprimentos de onda de 205 e 275 nm. As amostras foram equilibradas por 30 segundos, a cada valor de temperatura, e as medidas foram tomadas em intervalos de 1 °C. As concentrações de proteína

utilizadas foram 12 e 42 μM , para os experimentos no DC distante e próximo, respectivamente. As cubetas empregadas apresentavam caminho ótico de 0,1 cm. Todas as soluções livres de proteína, ou seja, os solventes, não mostraram nenhuma mudança na elipticidade com o aumento da temperatura.

4.4.3 Calorimetria: A variação da capacidade calorífica específica aparente da solução de proteína foi determinada, utilizando-se dois diferentes calorímetros diferencial de varredura: MC-2 (*Microcal, Inc.*) e Nano-DSC 6100 (*CSC*). Para o MC-2, a concentração de proteína variou de 97 a 143 μM , e para o Nano-DSC, a concentração utilizada foi de 80 μM . A taxa de aquecimento foi de 1 K/min. Para obtenção da linha de base, as células calorimétricas da amostra e da referência foram preenchidas com o tampão de diálise. Após a obtenção da linha de base, o tampão de diálise foi removido da célula de amostra e substituído pela solução de proteína. Nova varredura foi efetuada após resfriamento da amostra, para demonstrar reversibilidade termodinâmica.

4.5 Experimentos de desnaturação química:

A transição estrutural do desdobramento da β -tripsina, em diferentes concentrações de uréia, foi monitorada pela mudança na fluorescência intrínseca da proteína, com um espectrofluorímetro de varredura da OPTD Inc. Os comprimentos de onda para a excitação foram 280 e 295 nm e para a emissão, 320 nm. As amostras de β -tripsina foram equilibradas, por 1 hora, em soluções de uréia na faixa de concentração de zero até 3,5 M. A concentração das amostras de β -tripsina, para os ensaios de fluorescência, foi de 1,7 μM , preparada em tampão glicina 50 mM, pH 2,8. Soluções estoque de uréia foram preparadas, filtradas através de membrana 0,45 μm e utilizadas por um período de até 12 horas, para evitar a liberação de íons cianato e amônio, que são capazes de modificar quimicamente os grupamentos amina das proteínas (Pace et al., 1990).

Apesar da uréia ser comercialmente disponível em alto grau de pureza, os valores de molaridade foram confirmados por medidas de índice de refração, em um refratômetro da *Bausch & Lomb*, a 27 °C, seguindo as relações fornecidas por Pace *et al.* (1990).

Os espectros de fluorescência da β -tripsina, em presença de diferentes concentrações de uréia, foram registrados na faixa de comprimento de onda de 300 a 400 nm, em intervalos de 1 nm. Para essas medidas, um espectrofluorímetro da *Edinburgh*/Analytical Instruments foi utilizado, com comprimento de onda de excitação fixado em 280 nm. A reversibilidade foi avaliada, tomando-se novamente o espectro da proteína, previamente incubada em uréia 5 M, após sucessivas diálises.

4.6 Associação da b-tripsina com a sonda bis-ANS:

Para testar a associação da sonda fluorescente bis-ANS com os possíveis intermediários do desdobraimento da β -tripsina, as soluções de proteína foram incubadas em diferentes concentrações de uréia, como descrito no item 4.5. Após incubação por 1 hora, foi acrescentado um volume fixo de uma solução estoque de bis-ANS 1 mM, e o espectro de fluorescência foi registrado imediatamente após a adição da sonda, na faixa de 300 a 500 nm, utilizando-se o espectrofluorímetro da *Edinburgh*/Analytical Instruments. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 360 nm. As concentrações finais de proteína e bis-ANS foram 1,58 μ M e 10,5 μ M, respectivamente.

Para verificar a intensidade de fluorescência do triptofano, na presença da sonda bis-ANS, utilizou-se um comprimento de onda de excitação de 280 nm e o espectro foi registrado de 300 a 650 nm.

4.7 Efeito do calor e de diferentes concentrações de uréia na estrutura secundária da b-tripsina:

Os espectros de DC no UV distante foram registrados na faixa de 184 a 260 nm, com uma velocidade de 20 nm/min, em intervalos de 0,2 nm. A concentração de proteína utilizada foi de 0,3 mg/mL, em tampão fosfato 10 mM, pH 2,8. As medidas foram feitas na faixa de temperatura de 25 a 75 °C, em intervalos de 5 °C, utilizando-se um espectropolarímetro Jasco J-600, previamente calibrado com ácido D-canforsulfônico. O equipamento foi adaptado a um banho maria que circulou uma cubeta com caminho ótico de 0,01 cm. Após

o banho maria atingir a temperatura desejada, um intervalo de tempo de 10 minutos foi permitido para o equilíbrio térmico.

Cada espectro térmico, representando a acumulação de três registros, foi corrigido pela subtração dos espectros registrados nas mesmas condições para o solvente, na ausência da proteína. A reversibilidade da desnaturação térmica foi avaliada por retornar a temperatura do banho maria para 25 °C, esperar 10 minutos e registrar novamente o espectro da solução da proteína que foi aquecida até 75 °C.

No caso dos espectros na presença de uréia, as soluções de proteína foram incubadas com as respectivas concentrações de uréia, na faixa de zero a 3,7 M, e equilibradas por 1 hora, antes da aquisição dos espectros. A concentração de proteína utilizada foi de 0,2 mg/mL, em cubeta de caminho ótico de 0,1 cm. Os espectros foram registrados na faixa de 190 a 240 nm, sendo que, em concentrações de uréia a partir de 1 M, essa faixa se estreitou para 200 a 240 nm, devido à alta absorção de uréia abaixo de 200 nm. Todos os espectros foram subtraídos dos respectivos brancos, ou seja, solvente na ausência de proteína.

4.8 Espectros de dicroísmo circular na região do UV próximo:

Espectros térmicos e espectros em diferentes concentrações de uréia foram também registrados na região de 250-300 nm, com o objetivo de acompanhar mudanças na estrutura terciária da β -tripsina, em solução. À exceção da faixa de comprimento de onda, as condições foram as mesmas estabelecidas para a região do DC no UV distante. A concentração de proteína utilizada foi de 0,2 ou 1 mg/mL e cubeta com caminho ótico de 1 cm.

4.9 Avaliação da atividade enzimática da β -tripsina, em presença de uréia:

A curva de desdobramento da β -tripsina, em diferentes concentrações de uréia, foi acompanhada pela determinação da atividade amidásica dessa enzima. A atividade foi realizada pelo método descrito por Erlanger et al. (1961), utilizando-se L-BApNA como substrato. A solução de uso do substrato foi preparada no momento de sua utilização, diluindo-se uma alíquota da solução estoque em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2, contendo

20 mM de CaCl_2 . A mistura de reação, na ausência de uréia, continha o substrato na concentração de 6×10^{-4} M. A essa mistura, adicionaram-se 10 μL da solução de β -tripsina, na concentração de $3,6 \times 10^{-6}$ M. Para os ensaios enzimáticos, na presença de uréia, foram preparadas várias misturas de reação, contendo o desnaturante nas concentrações de 0,1 a 2,5 M. A essas misturas, adicionaram-se 10 μL da solução de β -tripsina ($3,6 \times 10^{-6}$ M), previamente incubada, por 1 hora, na presença de uréia. Os ensaios de atividade foram realizados em intervalos de 0,1 M do agente desnaturante.

A hidrólise do substrato foi acompanhada pela formação do produto p-nitroanilina, por meio da medida da absorvância em 410 nm, em função do tempo. A velocidade inicial foi obtida utilizando-se o valor de $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, como coeficiente de extinção molar do produto.

4.10 Determinação dos parâmetros cinéticos em diferentes concentrações de uréia:

A determinação dos parâmetros cinéticos foi efetuada em quatro diferentes concentrações do substrato L-BApNA: $2,0 \times 10^{-4}$; 4×10^{-4} , 6×10^{-4} e 8×10^{-4} M e β -tripsina, na concentração de $3,9 \times 10^{-7}$ M. Inicialmente, os parâmetros foram determinados para a β -tripsina, na ausência do desnaturante. As concentrações de uréia utilizadas para as determinações foram zero; 0,5; 1,0 e 1,65 M. Os ensaios enzimáticos foram realizados seguindo a mesma metodologia descrita no item 4.9. Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio de regressão não-linear, através do programa Sigma Plot (*Jandel Scientific*).

4.11 Análise dos dados:

4.11.1 Desnaturação térmica: Os dados obtidos das medidas de UV e DC foram ajustados por regressão não-linear a uma equação para transição de dois estados (Cohen & Pielack, 1994):

$$y_{\text{obs}} = \frac{(y_n + m_n T) + (y_d + m_d T) \{ \exp[\Delta H_m / R(1/T_m - 1/T)] \}}{1 + \exp[\Delta H_m / R(1/T_m - 1/T)]} \quad [1]$$

Na equação [1], y_{obs} é o sinal detectado pelo equipamento, durante o processo da desnaturação, T é a temperatura em Kelvin, R é a constante dos gases, T_m é a temperatura de transição, e ΔH_m é a entalpia do desdobramento em T_m (entalpia de van't Hoff). Os parâmetros y_n e y_d referem-se aos interceptos em y das linhas de base para os estados nativo e desdobrado, respectivamente, enquanto m_n e m_d são as inclinações das linhas de base. Os dados foram ajustados para a equação [1] utilizando o programa Sigma Plot. Os ajustes das curvas foram avaliados pelo teste de χ^2 e o gráfico de resíduos representa a diferença entre os valores calculados e experimentais, para cada temperatura.

Para comparar as transições monitoradas pela absorvância no UV e aquelas observadas por DC no UV próximo e distante, cada curva de desdobramento foi normalizada para a fração aparente da forma desdobrada, f_u , utilizando-se a seguinte relação:

$$f_u = \frac{y - y_f}{y_u - y_f}, \quad [2]$$

onde y é o valor do parâmetro ótico que está sendo monitorado e y_f e y_u são os valores para o estado totalmente dobrado e totalmente desdobrado em cada temperatura, como determinado pela regressão linear dos primeiros ou últimos pontos da curva de desdobramento.

4.11.2 Determinação de ΔC_p : Diferentes valores de pH foram utilizados na obtenção de curvas de desdobraimento térmico (perturbação das curvas de desnaturação térmica), com o objetivo de se determinar a diferença na capacidade calorífica (ΔC_p). Os dados dos experimentos do desdobraimento térmico na faixa de pH entre 2,2 e 4,0 foram utilizados para construir um gráfico de ΔH_m (entalpia de van't Hoff) versus T_m . A inclinação deste gráfico (ΔC_p) foi determinada por ajuste linear de acordo com a equação:

$$\Delta H_m = \Delta C_p (T_m) + b \quad [3]$$

Parâmetros termodinâmicos (T_m e ΔH_m), obtidos das medidas espectroscópicas, foram utilizados para determinar a mudança na energia livre do desdobraimento na temperatura T , (ΔG_u), usando a equação de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G_u(T) = \Delta H_m(1 - T/T_m) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \quad [4]$$

4.11.3 Calorimetria: Os dados de DSC, obtidos com o equipamento MC-2, foram ajustados usando o programa Origin fornecido pela Microcal, Inc., e os dados do N-DSC foram analisados usando o programa CpCalc, fornecido pela CSC. Inicialmente, os dados foram subtraídos da linha de base do tampão e, dessa forma, convertidos para capacidade calorífica molar (MHC). O volume parcial específico da proteína, requerido para o cálculo da capacidade calorífica molar parcial, foi de 0,73 cm³/g. Subseqüentemente, uma linha de base linear-polinomial foi selecionada, gerando duas linhas que foram ajustadas às linhas de base pré e pós-transição. Este procedimento fornece uma estimativa da entalpia calorimétrica ΔH_{cal} , da entropia ΔS e da temperatura de transição T_m , para o processo de desdobraimento. Para a desconvolução dos dados de MHC, o modelo geral com uma transição foi selecionado. O ajuste continuou até que não houvesse melhoria no decréscimo do valor de χ^2 . Os valores para a entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) e para T_m foram obtidos a partir desta análise. O uso de um modelo geral com duas transições não melhorou o processo de ajuste.

4.11.4 Desnaturação com uréia: Assumindo uma transição de dois estados, a mudança na energia livre (ΔG_{H_2O}), na ausência de uréia, foi determinada ajustando-se as mudanças na intensidade de fluorescência (F) em diferentes concentrações de uréia, pela seguinte equação (Santoro & Bolen, 1988):

$$F = \frac{F_n + s_n[ureia] + (F_d + s_d[ureia]) \exp[-(\Delta G_{H_2O} + m[ureia]) / RT]}{1 + \exp[-(\Delta G_{H_2O} + m[ureia]) / RT]} \quad [5]$$

onde F_n e s_n são a inclinação e o intercepto da linha de base para o estado nativo, F_d e s_d são a inclinação e o intercepto da linha de base para o estado desdobrado e m é a inclinação da dependência linear da energia livre com uréia.

4.11.5 Estimativa da estrutura secundária a partir dos espectros de DC no UV distante: A estimativa da estrutura secundária da β -tripsina nativa, em solução, foi realizada a partir do espectro da proteína, registrado na faixa de 180 a 260 nm. A concentração de proteína foi de 0,3 mg/mL, preparada em tampão fosfato 10 mM, pH 2,8. Utilizou-se o programa VARSLC, também denominado método de desconvolução de valor singular com seleção variável (Manavalan e Johnson, 1987), e o programa SELCON (*self-consistent method*), desenvolvido por Sreerama e Woody (1993).

A estimativa das mudanças na estrutura secundária da β -tripsina, em diferentes condições de desnaturação, como descrito no item 4.7, foi obtida através do programa *Convex Constraint Algorithm* (CCA), elaborado por Perczel et al. (1991). Como o algoritmo CCA só distingue um componente quiral se ele representa pelo menos 50% de uma das curvas em uma série de dados (Perczel et al., 1992), para a desconvolução, foram incluídos os espectros de referência para hélice α , folhas β , voltas β e estruturas desordenadas, fornecidos por Brahms & Brahms (1980), como sugerido por Greenfield e DeGregori (1993).

5. RESULTADOS

5.1 Fracionamento da tripsina bovina comercial

A Figura 7 apresenta o perfil de eluição cromatográfico da preparação comercial de tripsina em resina de troca iônica SP-Sephadex C-50. O perfil observado corresponde àquele obtido por Schroeder e Shaw (1968) e Smith e Shaw (1969). De acordo com esses autores, o pico correspondente à β -tripsina é o último a ser eluído, antecedido imediatamente pela forma α . Foram obtidos rendimentos aproximados de 35% e 20%, respectivamente, para as frações α e β , em relação à massa de tripsina comercial aplicada à coluna. A homogeneidade da preparação obtida na coluna de SP-Sephadex foi avaliada através da titulação dos centros ativos da enzima e por SDS-PAGE (dado não mostrado). A titulação dos centros ativos, com NPGb, forneceu 88% de centros ativos funcionais.

5.2 Recromatografia da fração β -tripsina em coluna de SP-Sephadex

A recromatografia da fração β -tripsina, obtida na coluna de SP-Sephadex, apresentou o perfil mostrado na Figura 8. Esses resultados demonstram que, mesmo em presença do inibidor benzamidina, ocorreu autólise dessa fração, gerando pequenas porcentagens de outras formas de tripsina. De acordo com estes resultados, essa amostra de β -tripsina se mostra satisfatoriamente homogênea, após esta etapa.

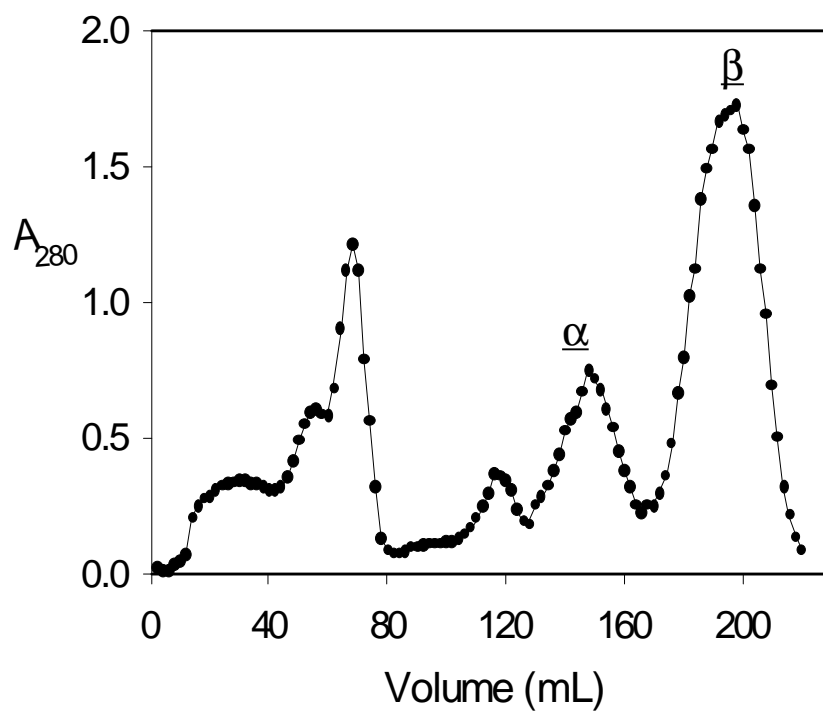


FIGURA 7. Cromatografia da tripsina comercial bovina em resina de troca iônica SP-Sephadex C-50.

Condições experimentais: Coluna de (110 cm x 2,0 cm) equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo benzamidina 1 mM, NaCl 0,1 M e CaCl₂ 20 mM, pH 7,1, a 4 °C. Amostra: 500 mg de tripsina preparada no mesmo tampão, e aplicada à coluna sob um fluxo de 0,13 mL/min.

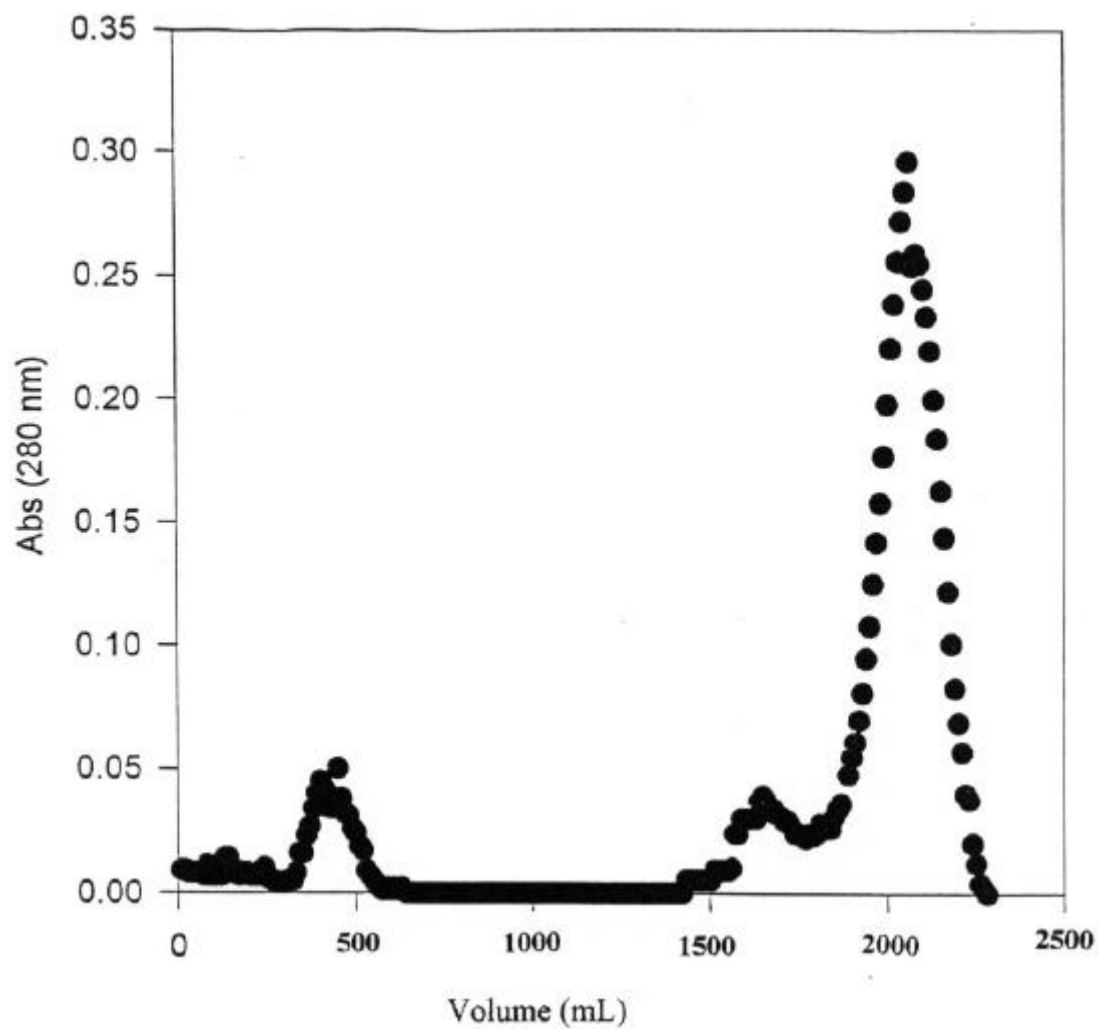


FIGURA 8. Recromatografia da fração β -tripsina, em coluna de troca iônica SP-Sephadex C-50.

Condições experimentais, como na Figura 7, exceto que o tampão de equilíbrio não continha NaCl, e foi utilizada uma coluna de dimensões 3,3 x 25 cm. Amostra: 25 mg de β -tripsina, aplicada à coluna sob um fluxo de 1 mL/min.

5.3 Desnaturação térmica da b-tripsina

A curva de desdobraimento térmico da β -tripsina, acompanhada pela leitura da absorvância no UV, está apresentada na Figura 9. A curva exibe três fases, ou seja, pré-transição, transição e pós-transição. O perfil observado é característico de uma transição cooperativa entre dois estados. A linha contínua, através dos pontos experimentais, representa a curva ajustada, de acordo com a equação [1]. Os resíduos do ajuste de dois estados, são mostrados na figura inserida e não mostram qualquer desvio sistemático em torno do zero, indicando que os dados são consistentes com a equação ajustada (Ramsay e Eftink, 1994).

A Figura 10 apresenta a curva de desdobraimento para a β -tripsina acompanhada através de DC a 275 nm. Esse comprimento de onda foi selecionado por fornecer uma maior diferença no sinal de DC, observado a partir dos espectros térmicos mostrados na Figura 16B. Semelhante à curva de desdobraimento, obtida por absorvância no UV, o gráfico de resíduos mostra que os dados experimentais se ajustam, de maneira adequada, ao modelo de transição em dois estados.

A desnaturação da β -tripsina, acompanhada pelo DC no UV distante, ou seja, a 205 nm, também apresenta uma curva simétrica (Figura 11). O gráfico dos resíduos mostra que essa curva de transição ajustou-se de maneira adequada ao modelo de dois estados. A Figura 12 apresenta a normalização dos dados das curvas de desdobraimento térmico, obtidas em diferentes comprimentos de onda. De acordo com esses resultados, pode-se concluir que as diferentes frações do estado desdobrado da proteína observadas por diferentes sondas estruturais, são sobreponíveis, em toda a faixa de temperatura utilizada, para promover o desdobraimento da proteína, em condições de equilíbrio.

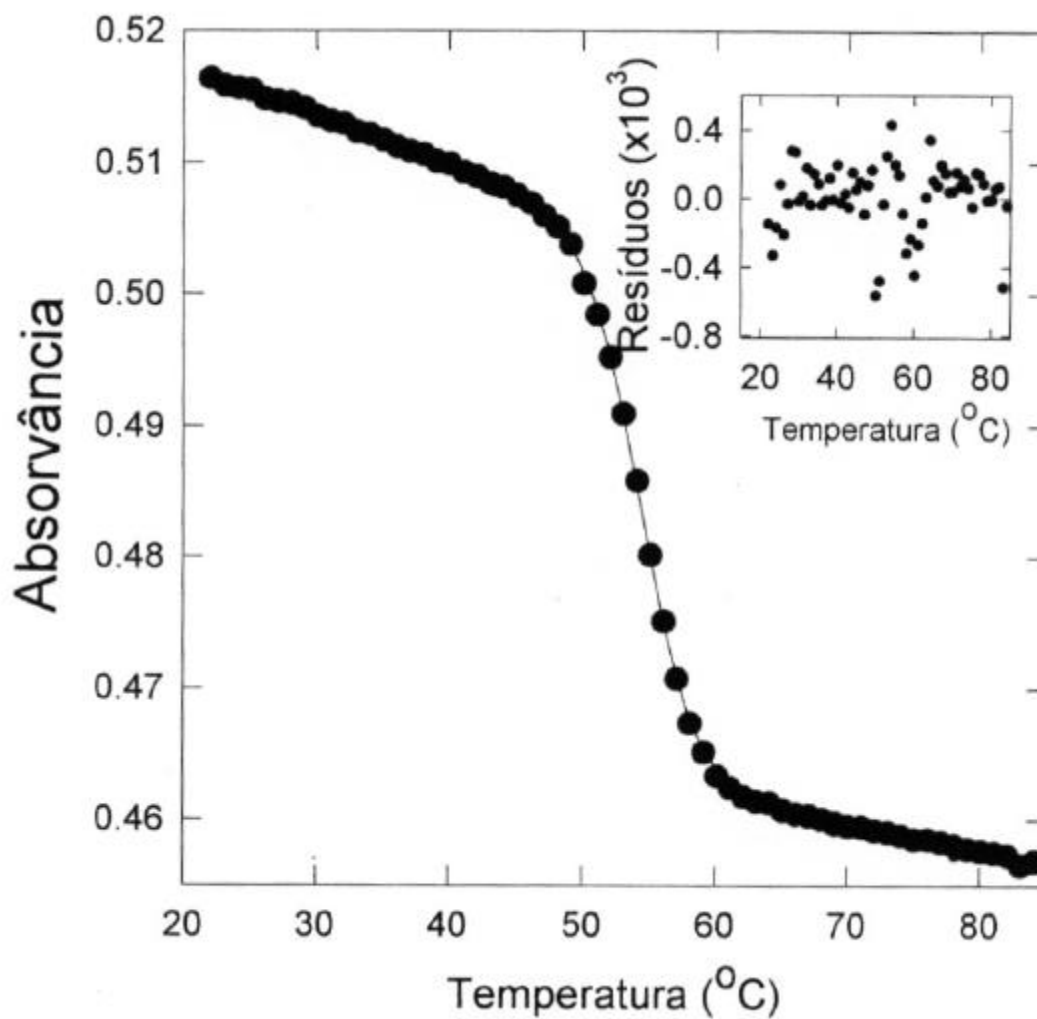


FIGURA 9. Curva de desdobraimento térmico para a β -tripsina, detectada por absorvância no UV.

Condições experimentais: A proteína na concentração de 1,0 mg/mL, foi preparada em tampão glicina 50 mM, pH 2,8. Os dados de absorvância em 286 nm foram ajustados a uma equação para um modelo de transição de dois-estados, de acordo com a equação [1]. A figura inserida mostra o gráfico de resíduos.

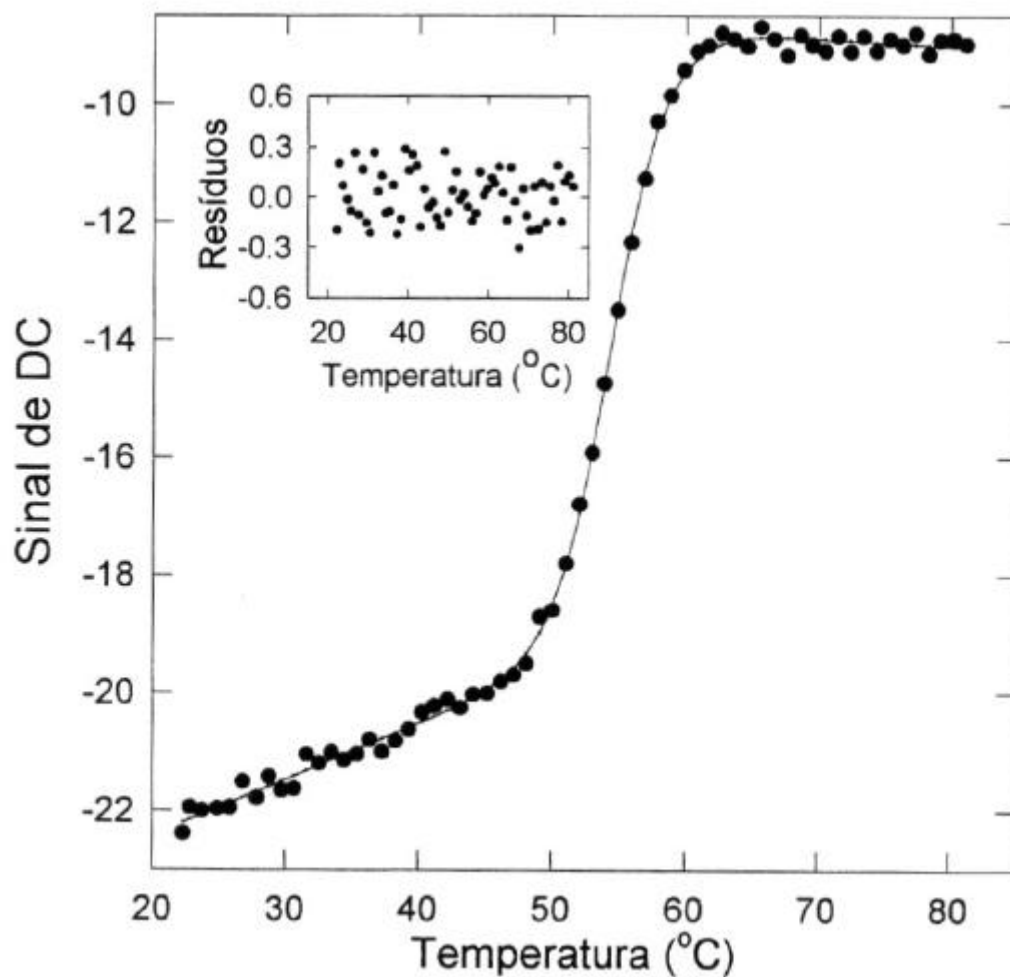


FIGURA 10. Curva de desdobramento térmico para a β -tripsina, detectada por dicroísmo circular no UV próximo.

Condições experimentais: A proteína na concentração de 42 μM , foi preparada como descrito na Figura 9. Os dados de DC em 275 nm foram ajustados a uma equação para um modelo de transição de dois-estados, de acordo com a equação [1]. A figura inserida mostra o gráfico de resíduos para esse ajuste.

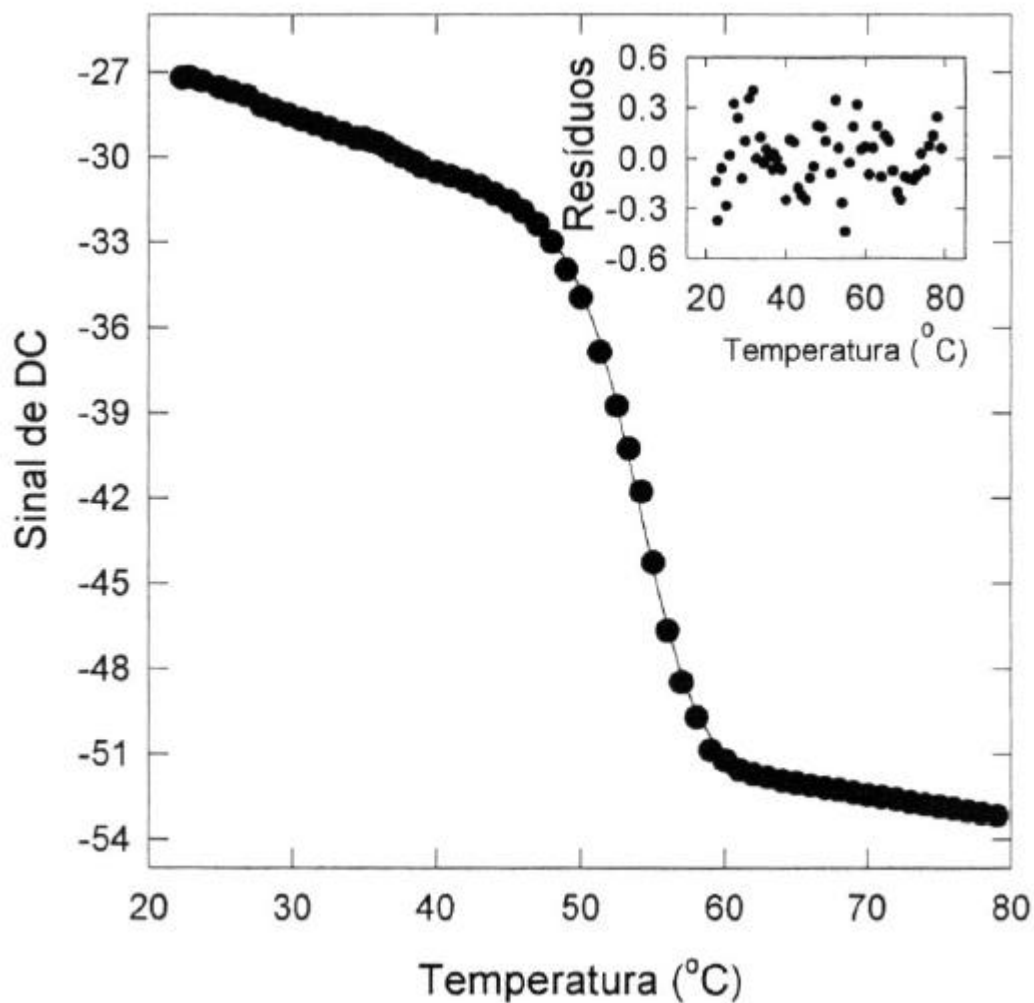


FIGURA 11. Curva de desdobramento térmico da β -tripsina, detectada por dicroísmo circular no UV distante.

Condições experimentais: A proteína na concentração de $10 \mu\text{M}$, preparada como descrito na Figura 9. Os dados de DC a 205 nm foram ajustados de acordo com a equação [1]. A figura inserida mostra o gráfico de resíduos do ajuste para um modelo de dois-estados.

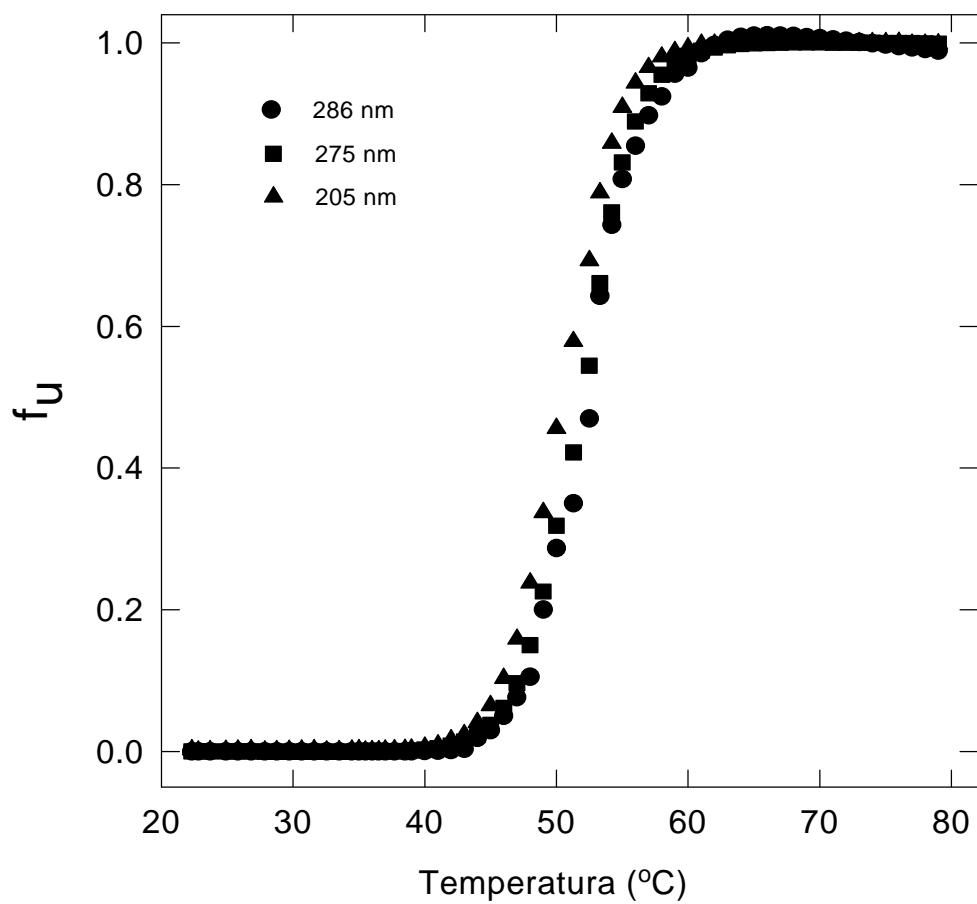


FIGURA 12. Fração de β -tripsina desnaturada, em função da temperatura, monitorada por leituras de absorvância no UV e DC no UV próximo e distante.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos, ΔH_m e T_m , obtidos através do ajuste das curvas de desnaturação térmica, são apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 apresenta os valores das entalpias de desnaturação (ΔH_m) e de T_m , obtidos em função do pH, e a variação desses parâmetros com a temperatura é mostrada na Figura 13. A inclinação desse gráfico fornece um valor para ΔC_p de $2,66 \pm 0,23$ kcal/(mol K), obtido através da equação [3]. A determinação da estabilidade termodinâmica da β -tripsina foi calculada através da equação [4]. Pode-se notar que, nessa equação, além do valor de ΔC_p , são necessários T_m e ΔH_m para o cálculo de ΔG_u . O valor de ΔG_u , a 27°C , foi $6,0 \pm 0,2$ kcal/mol.

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação térmica da b-tripsina, em pH 2,8

Método	ΔH_{cal} (kcal mol ⁻¹)	ΔH_{vH} (kcal mol ⁻¹)	T_m (°C)
DSC	108,6	108,4	54,22
CD	na ^a	$106,0 \pm 0,7$	$54,45 \pm 0,02$
UV	na ^a	$111,5 \pm 0,5$	$54,45 \pm 0,03$

^a Não aplicável

Tabela 2. Variação da entalpia de desnaturação da b-tripsina em função do pH.

pH	T_m (K)	ΔH_m (Kcal/mol)
2,2	318,9	103,0
2,5	322,3	108,0
2,8	327,4	120,5
3,0	330,6	130,0
3,4	335,5	143,5
3,6	337,2	152,0
4,0	339,5	156,0

O desvio padrão para T_m e ΔH_m foi de $\pm 0,02$ e $\pm 1,0$, respectivamente. Os valores de ΔH_m e T_m representam a média de três repetições.

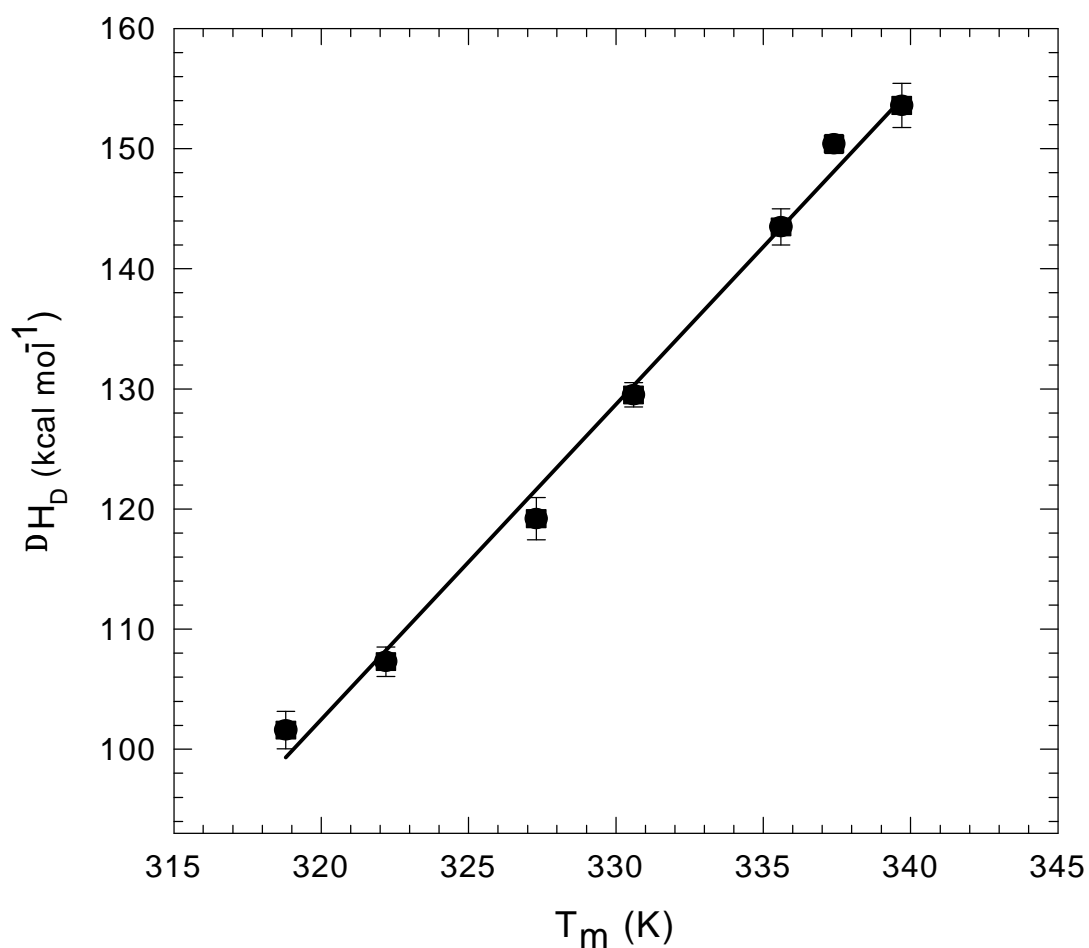


FIGURA 13. Dependência da entalpia de desnaturação, ΔH_D , com a temperatura para β -tripsina. Os dados representados são valores de ΔH_m e T_m , obtidos da desnaturação térmica acompanhada pelas mudanças na absorvância, em vários valores de pH. Os dados foram ajustados através de regressão linear e ΔC_p foi determinado a partir da inclinação da reta. As barras de erro ilustram os desvios padrão de três repetições.

5.4 Calorimetria

Como os resultados das análises, utilizando-se os dados do nano-DSC e de MC-2, foram similares, somente os resultados obtidos com o N-DSC são apresentados. Os dados da capacidade calorífica molar parcial para a β -tripsina são mostrados na Figura 14. Na Figura 14A, uma linha de base sigmóide, foi adicionada para o cálculo da entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}), da entropia (ΔS) e da temperatura de transição (T_m). Através dessa análise, foram obtidos os valores de 108,6 kcal/mol; 0,331 kcal/mol K e 54,5 °C, para ΔH_{cal} , ΔS e T_m , respectivamente. A curva pontilhada, mostrada na Figura 14B, representa o melhor ajuste da curva experimental (linha contínua) ao modelo teórico. Os valores da entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) e T_m , obtidos a partir do ajuste dos dados, assumindo um modelo de dois-estados, foram 108,4 kcal/mol e 54,22 °C, respectivamente.

5.5 Estimativa da estrutura secundária da b-tripsina, a partir de DC no UV distante.

O espectro de DC no UV distante, para a β -tripsina a 25 °C, está apresentado na Figura 15. O espectro apresenta uma banda negativa com um mínimo em torno de 205 nm, e uma banda positiva na faixa de 186 a 190 nm, característico da classe de proteínas toda- β , do tipo II (Manavalan & Johnson, 1983).

A Tabela 3 apresenta a comparação das estimativas da estrutura secundária para a β -tripsina, obtidas neste estudo, por estudos de difração de raios-X, e a partir do espectro obtido na região do Infravermelho (FTIV). Considerando a forma pela qual os três métodos atribuem uma definição estrutural para um dado elemento da estrutura secundária, os resultados são semelhantes. Foram também empregados dois algoritmos, que estimam a estrutura secundária de proteínas, a partir de suas estruturas primárias, baseados nos métodos GOR (Garnier, 1990), e SOMP (Geourjon & Deleage, 1994).

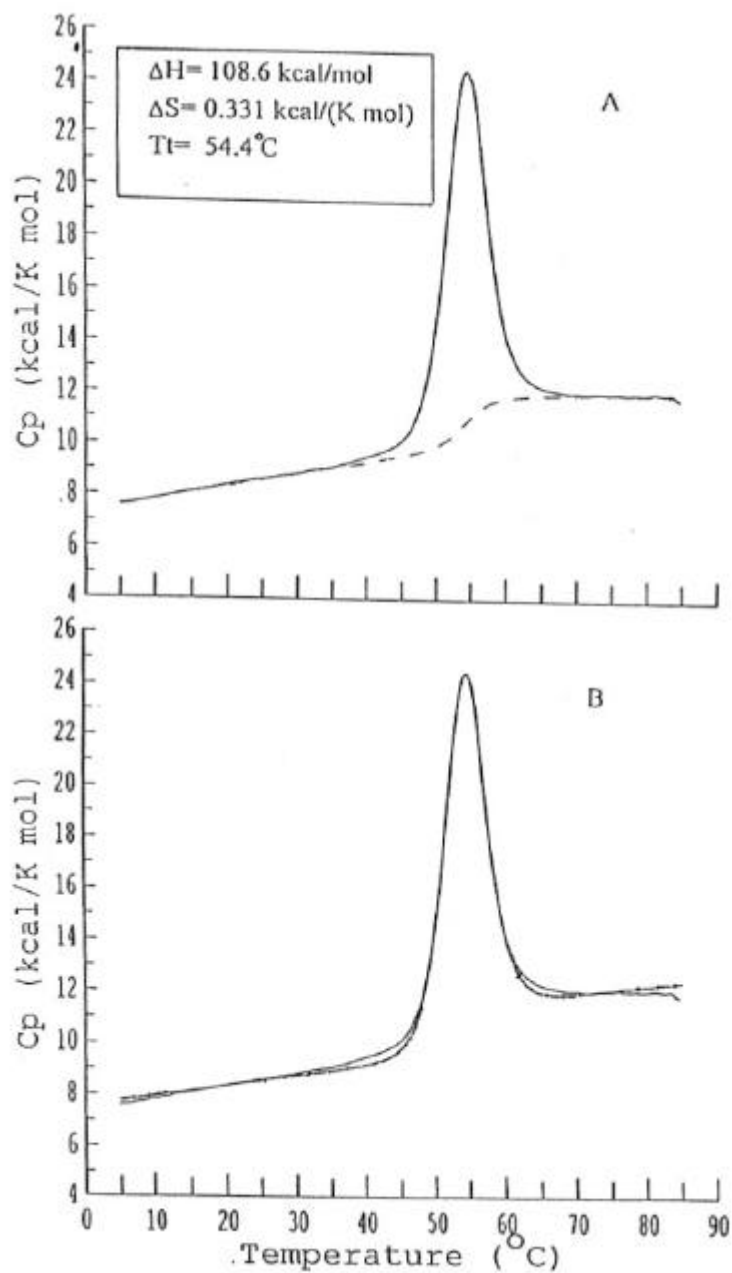


FIGURA 14. Capacidade calorífica molar parcial da β -tripsina.

(A) A linha tracejada representa a linha de base sigmoidal da transição, que foi usada na análise dos dados para obtenção de ΔH_{cal} , ΔS e T_m . (B) A desconvolução dos dados de MHC, de acordo com o modelo geral para uma transição, é mostrado. Os dados experimentais (linha contínua), e o melhor ajuste para uma função de dois estados (linha pontilhada), estão indicados. Concentração de β -tripsina: 1,91 mg/mL.

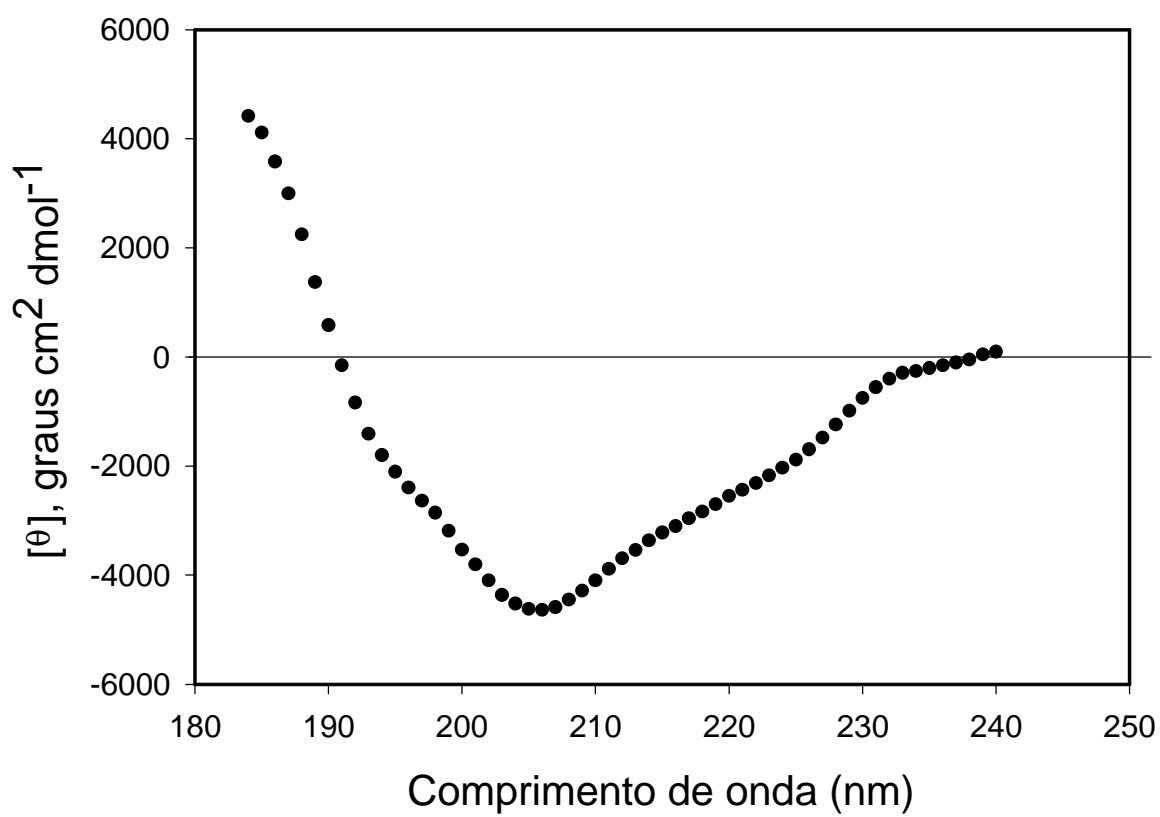


FIGURA 15. Espectro de DC no UV distante, para a β -tripsina.

Condições experimentais: O espectro foi medido, utilizando-se uma cubeta de 0,01 cm, contendo a proteína na concentração de 12,6 μM , em tampão glicina 10 mM, pH 2,8, a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Tabela 3. Estimativa da estrutura secundária da b-tripsina

Métodos	f_{α} (%)	f_{β} (%)	f_t (%)	f_{RC} (%)
Raios-X ^a	8	32	30	30
CD ^b	11	36,6	19	28,8
FTIR ^c	15	41	20	24
GOR ^d	11,21	39,46	nd	nd
SOMP ^e	8,5	32,7	14,8	38,7

^a de Kabsh & Sander, 1983; ^beste estudo, SELCON e VARSLC, erro: 1% para f_{α} e 2% para f_{β} ; ^cPrestrelski et al.,1991; ^d<http://bmb5gi11.leeds.ac.uk/bmb5dp/gor.html>; ^e<http://pbil.ibcp.fr/>; nd – não determinado; f_{α} , fração de hélice alfa; f_{β} , fração de folhas beta; f_t , fração de “turns”; f_{RC} : fração de estrutura desordenada ou random coil.

5.6 Efeito do calor e de uréia na estrutura secundária da b-tripsina.

O efeito do aumento da temperatura sobre a β -tripsina, monitorado por meio de seu espectro de DC, está apresentado na Figura 16. Ao se elevar a temperatura de 25 para 70 °C, o mínimo foi deslocado para 198 nm e o sinal do espectro tornou-se mais negativo. Essas condições podem refletir tanto a perda da estrutura em folhas beta como um aumento na estrutura desordenada, ou random coil. Além disso, houve diminuição da intensidade do sinal em 186 nm, à medida que se aumentou a temperatura, indicativo de redução da estrutura em folhas β . Outra observação foi o aumento na intensidade do sinal entre 210 e 220 nm, o que é característico de estruturas em α -hélice. Essas interpretações qualitativas foram posteriormente confirmadas ao se estimar as diferentes porcentagens dos elementos de estrutura secundária, para o conjunto de espectros em diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados na Figura 17 e na Tabela 4.

A Figura 18 mostra as mudanças no espectro de DC para a β -tripsina, em diferentes concentrações de uréia. Como observado para temperatura, o sinal do espectro também se torna negativo, quando se induz o desdobramento. Porém, no caso da presença de desnaturante químico, a elipticidade se reduz de maneira gradual até 2,0 M de uréia, tornando-se positiva na faixa de comprimento de onda entre 210 a 240 nm, quando se aumenta a concentração para uréia 2,6 M. Essas mudanças espectrais sugerem que a transição induzida por uréia procede-se em duas etapas e que, pelo menos, um estado intermediário, com intenso sinal dicróico em torno de 200 nm, acumula-se. O espectro em uréia 3,7 M também foi registrado; porém, devido à interferência desse desnaturante na

absorção, em comprimentos de onda inferiores a 200 nm, esse espectro não foi incluído na análise das estimativas da estrutura secundária pelo método CCA (Tabela 5).

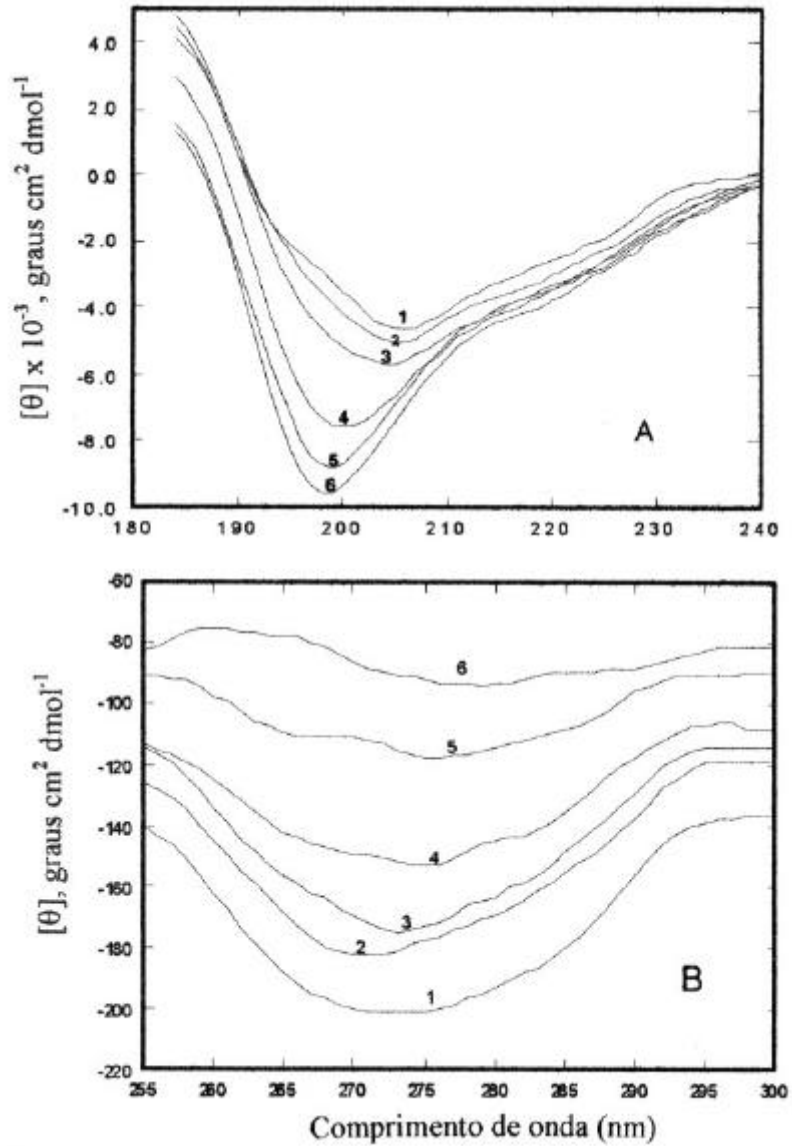


FIGURA 16. Espectros de DC para a β -tripsina em função da temperatura.

Condições experimentais: As condições foram as mesmas especificadas na Figura 15. Os espectros foram registrados em diferentes temperaturas. 1, 25; 2, 35; 3, 45; 4, 55; 5, 65 e 6, 75 °C. (A) UV distante; (B) UV próximo.

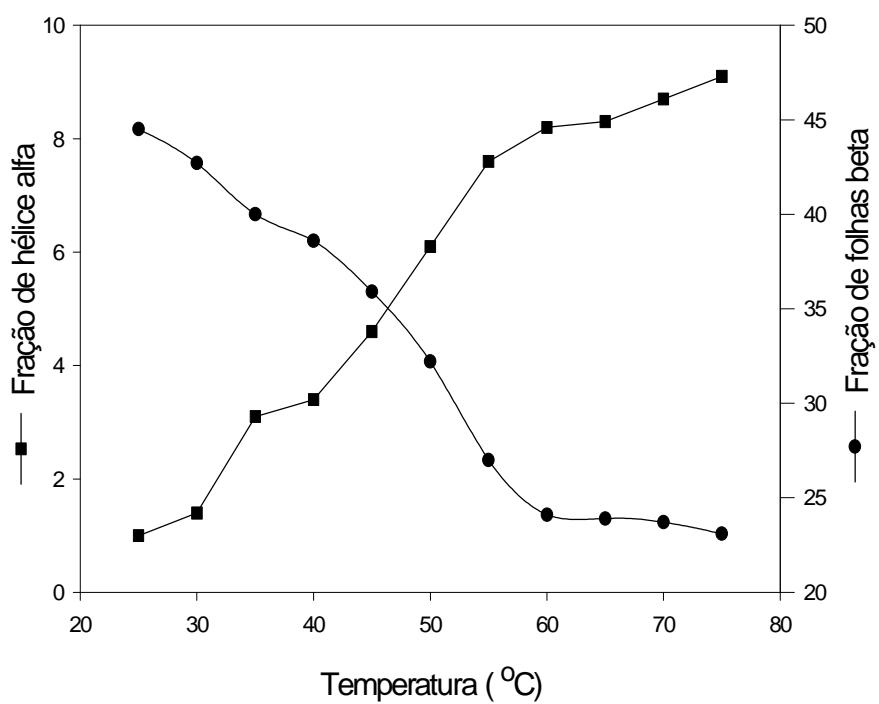


FIGURA 17. Mudanças na estrutura secundária da β -tripsina, avaliadas de acordo com o método CCA. Utilizou-se, para a análise, os dados adquiridos na faixa de comprimento de onda entre 186 a 260 nm. Folhas beta (●), hélice alfa (■).

Tabela 4. Mudanças na estrutura secundária da b-tripsina em diferentes temperaturas, de acordo com o método CCA

Temperatura (°C)	f_{α}	f_{β}	f_t	f_{RC}
25	1,0	44,5	4,2	50,4
35	3,1	40,0	5,9	51,0
45	4,6	35,9	6,9	52,6
55	7,6	27,0	8,6	56,9
65	8,3	23,9	10,3	57,6
75	9,1	23,1	11,2	56,6

Erros para f_{α} , f_{β} e f_{RC} estão na faixa de 2-3%

Tabela 5. Estimativa da estrutura secundária da b-tripsina, em função da concentração de uréia, de acordo com o método CCA.*

Uréia [M]	f_{α}	f_{β}	f_t	f_{RC}
0	6,0	44,7	6,7	44,0
1,0	8,8	35,8	9,0	46,3
1,5	9,6	32,7	7,8	50,0
2,0	7,4	33,8	5,7	51,7
2,6	0,2	33,5	5,8	56,7

*As análises incluíram os espectros registrados entre 200-240 nm

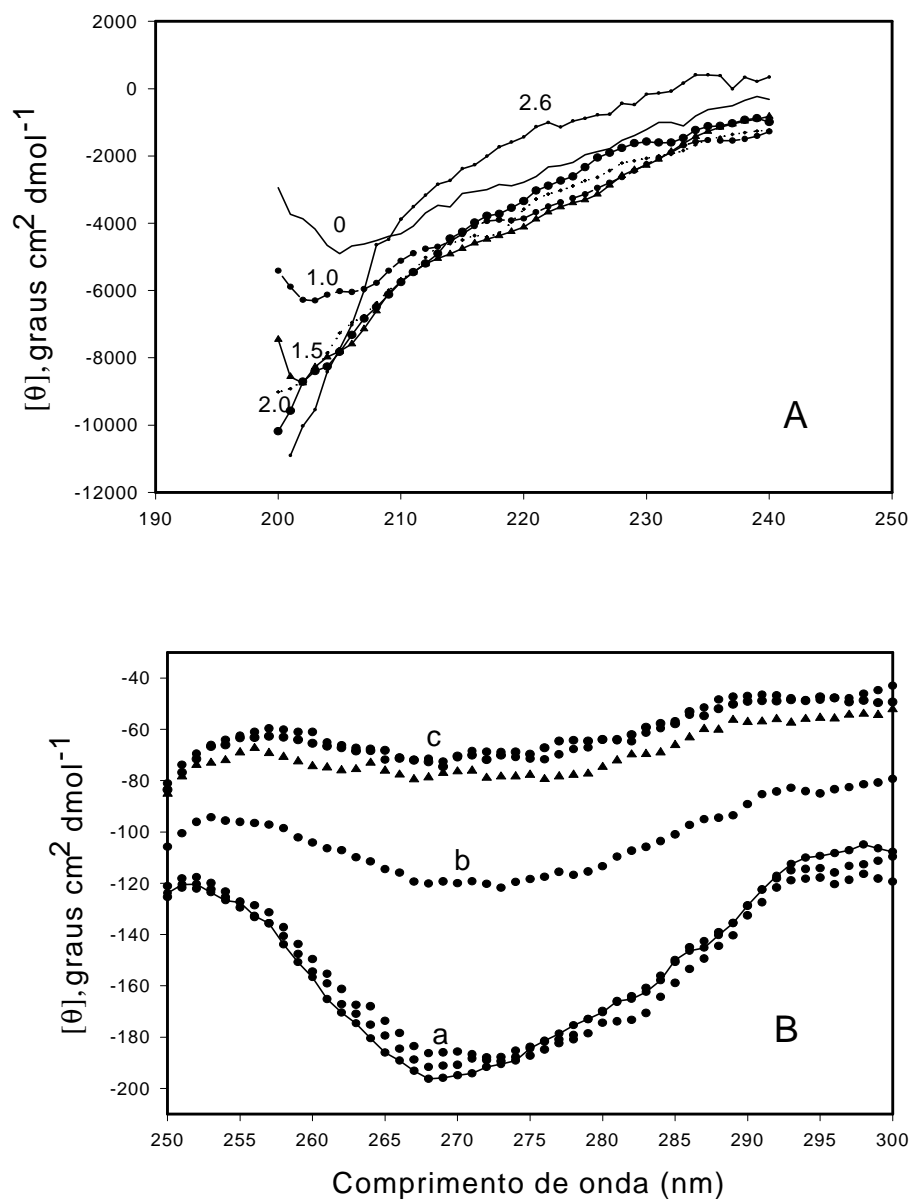


FIGURA 18. Espectros de DC para a β -tripsina, em presença de várias concentrações de uréia. As condições experimentais foram as mesmas especificadas na Figura 15. (A) UV distante: os números em cada curva representam a concentração molar de uréia. (B) UV próximo: Curvas a representam 0; 0,5 e 1,0 M de uréia; curva b representa 1,6 M de uréia e curvas c representam 2,0; 2,6 e 3,7 M de uréia.

A comparação qualitativa entre os espectros de DC, para os estados desdobrados por calor e por uréia, são mostrados na Figura 19.

Foi também examinado o desdobramento da β -tripsina, induzido por GdnHCl, através de espectros no DC, no UV distante (Figura 20). Devido à estreita faixa de comprimento de onda registrada para esses espectros, não foi possível realizar uma análise quantitativa precisa de seus percentuais de estrutura secundária. Contudo, o perfil do desdobramento, obtido através desses espectros, é qualitativamente similar àquele obtido em presença de uréia.

5.7 Efeito do calor e da uréia na estrutura terciária da b-tripsina.

O espectro de DC na região do UV próximo (Figura 16B) mostra um decréscimo gradual do sinal para a estrutura terciária da β -tripsina, devido ao aumento de temperatura. A banda positiva em torno de 275 nm é quase completamente perdida, a 75 °C, indicando a perda da maioria das interações terciárias, que conferem à proteína uma estrutura interior bastante rígida. A Figura 18B mostra, também, uma perda na elipticidade para o espectro de DC na região aromática, indicando um aumento na mobilidade das cadeias laterais de triptofano e tirosina presentes na β -tripsina, à medida que se aumenta a concentração de uréia.

O valor do sinal do espectro, em torno de $-80 \text{ deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$, tanto a 70 °C ou em uréia a 2,0; 2,6 e 3,7 M, indica que a extensão da perda dos contatos terciários, nesses dois estados, parece ter sido similar.

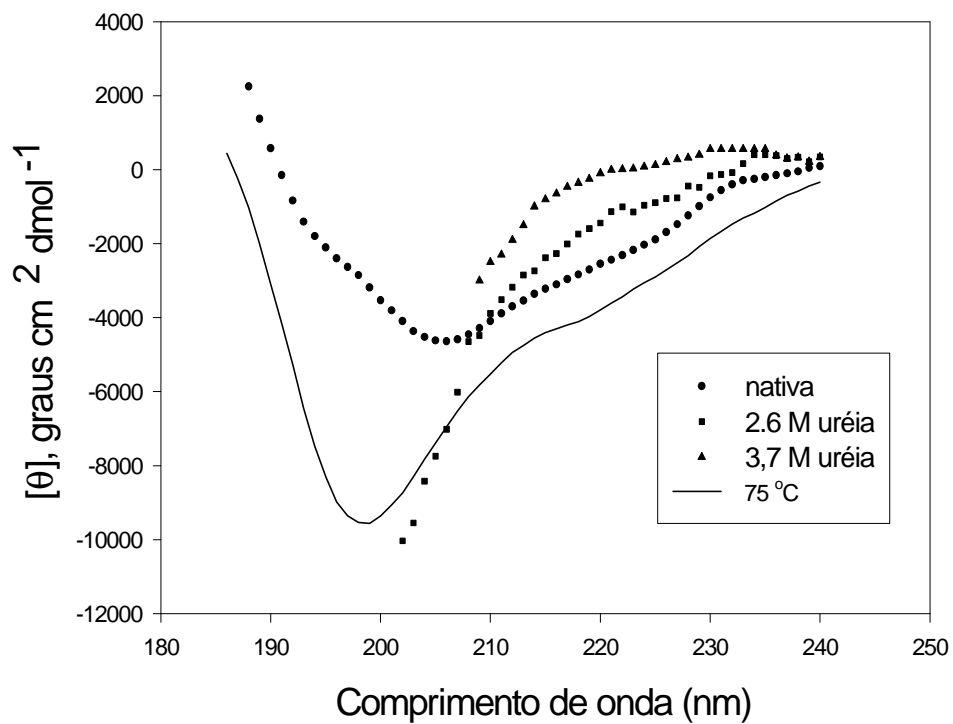


FIGURA 19. Espectros de DC no UV distante para a β -tripsina. As curvas foram obtidas das Figuras 16 e 18 para comparação dos perfis. (●) nativa; (—) 75 °C; (■) uréia 2,6 M; (▲) uréia 3,7 M.

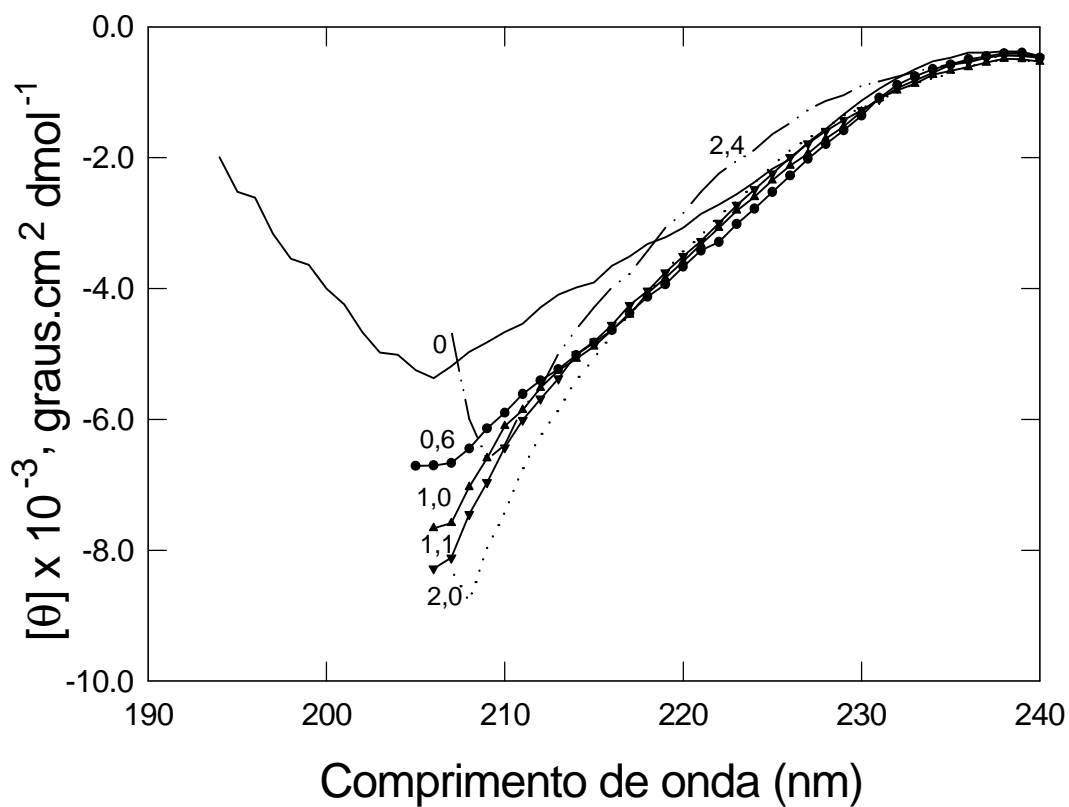


FIGURA 20. O espectro de DC no UV distante, para a β -tripsina, na presença de diferentes concentrações de GdnHCl. Os números indicam a molaridade do desnaturante. O espectro foi medido usando uma cubeta de 0,1 cm. A proteína, na concentração de $8,4 \mu\text{M}$, foi preparada em tampão fosfato pH 2,8.

5.8 Efeito de uréia sobre a emissão de fluorescência pela β -tripsina

O efeito de uréia no espectro de emissão de fluorescência da β -tripsina está apresentado na Figura 21. Em condições não desnaturantes, a emissão máxima foi a 332 nm, uma região típica para resíduos de triptofano, presentes em um meio relativamente hidrofóbico, nas proteínas globulares. Com uréia 2 M, ocorre um deslocamento da emissão máxima de 11 nm para a direita e um decréscimo na intensidade de fluorescência. Posterior aumento na concentração de desnaturante, ou seja, de 2,6 até 3,7 M de uréia, resultou em um deslocamento do máximo de mais 5 nm, indicando que em uréia 2 M, os resíduos de triptofano não estavam totalmente expostos ao solvente. Outra característica do espectro é um aumento na intensidade de fluorescência até uréia 1 M, sem deslocamento do pico máximo. Os espectros obtidos entre 1 e 2 M de uréia apresentam um ponto de isoemissão, em 350 nm, indicando que o desdobramento induzido por uréia é uma transição entre dois estados, nessa faixa de concentração.

A Figura 22 mostra a dependência da intensidade de fluorescência a 320 nm, com a concentração de uréia. A análise dessa curva de desnaturação, assumindo um mecanismo de dois-estados, forneceu uma estabilidade conformacional de $5,5 \pm 0,3$ kcal/mol, $m_{\text{urea}} = 3,19$ e um $c_{1/2} = 1,7$ M.

5.9 Associação com bis-ANS.

A Figura 23 apresenta o espectro de emissão de fluorescência da sonda bis-ANS, adicionada a soluções de β -tripsina, em presença de diferentes concentrações de uréia. O composto apresenta fraca emissão, na ausência da proteína, e sua emissão máxima ocorre em 530 nm. Porém, quando associado à proteína, ocorrem tanto um aumento na intensidade da fluorescência quanto um deslocamento na emissão máxima para 500 nm, indicando que a sonda se encontra em um ambiente hidrofóbico. Assim, observa-se que a proteína nativa se associa fortemente à sonda; contudo, a maior intensidade de fluorescência foi observada na presença de 2,0 M de uréia. Na presença de 5,5 M de uréia, a intensidade de

fluorescência de bis-ANS é reduzida, indicando perda da estrutura local no sítio de ligação à β -tripsina, ou aumento na distância entre o triptofano e a sonda fluorescente.

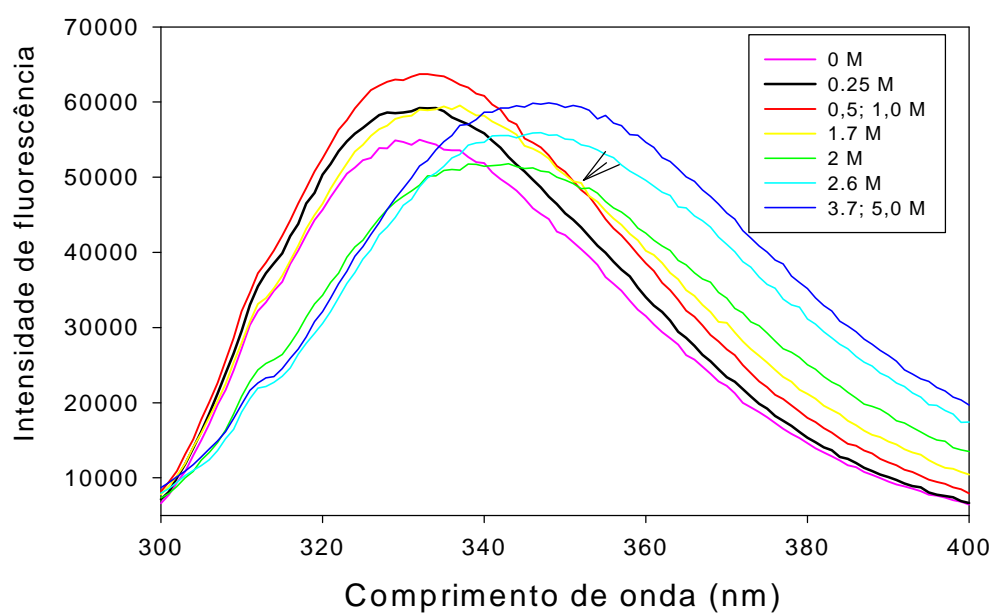


FIGURA 21. Espectro de emissão de fluorescência da β -tripsina.

Condições Experimentais: Os dados de emissão de fluorescência foram coletados entre 300 a 400 nm, em um comprimento de onda de excitação de 280 nm. As aberturas de fenda foram 0,4 nm para excitação e 1,5 nm para emissão. As concentrações de uréia estão inseridas na figura. A seta indica um ponto de isoemissão.

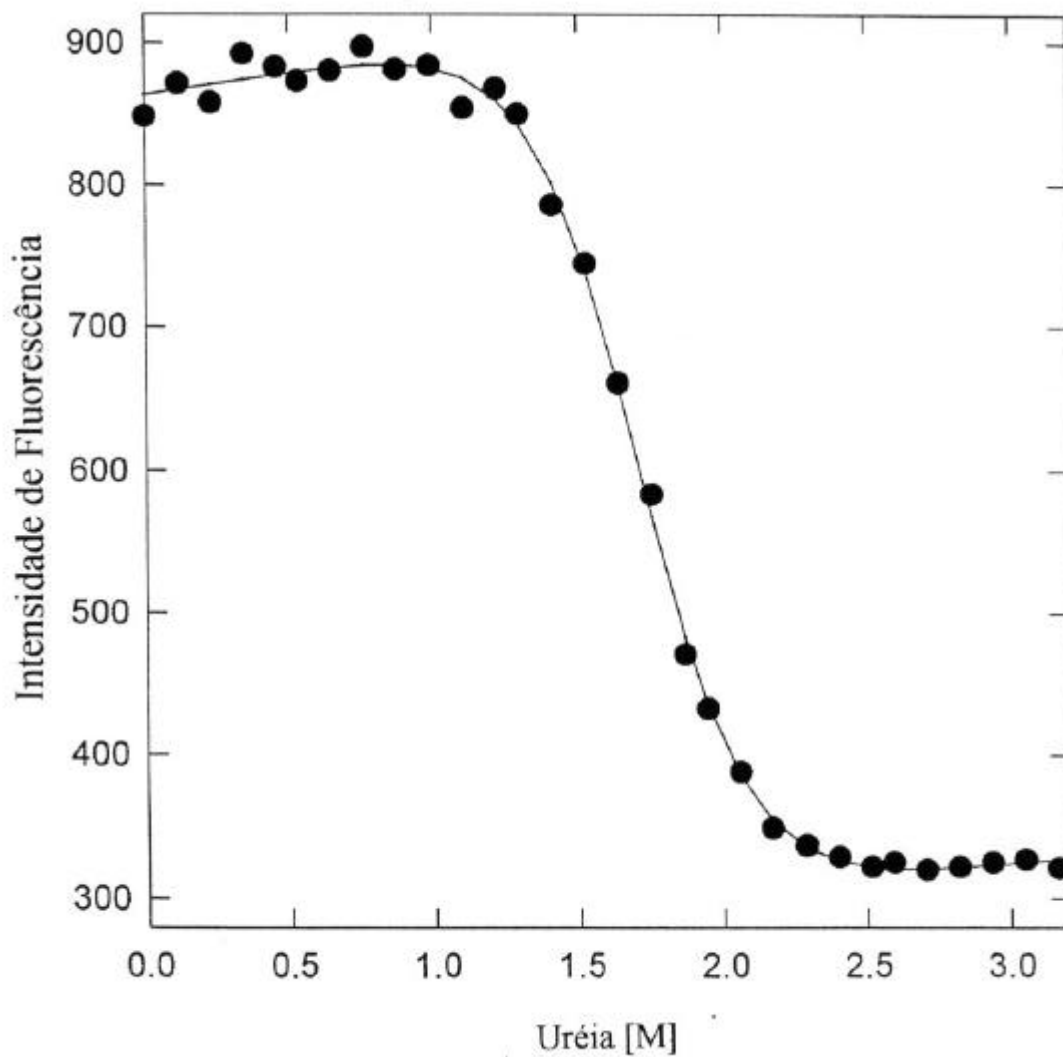


FIGURA 22. Curva de desdobramento para a β -tripsina, induzida por uréia, detectada através de fluorescência. Condições Experimentais: Os comprimentos de onda para a excitação e emissão foram 280 e 320 nm, respectivamente. A linha contínua através dos pontos é o melhor ajuste dos dados, assumindo uma transição reversível em apenas uma etapa.

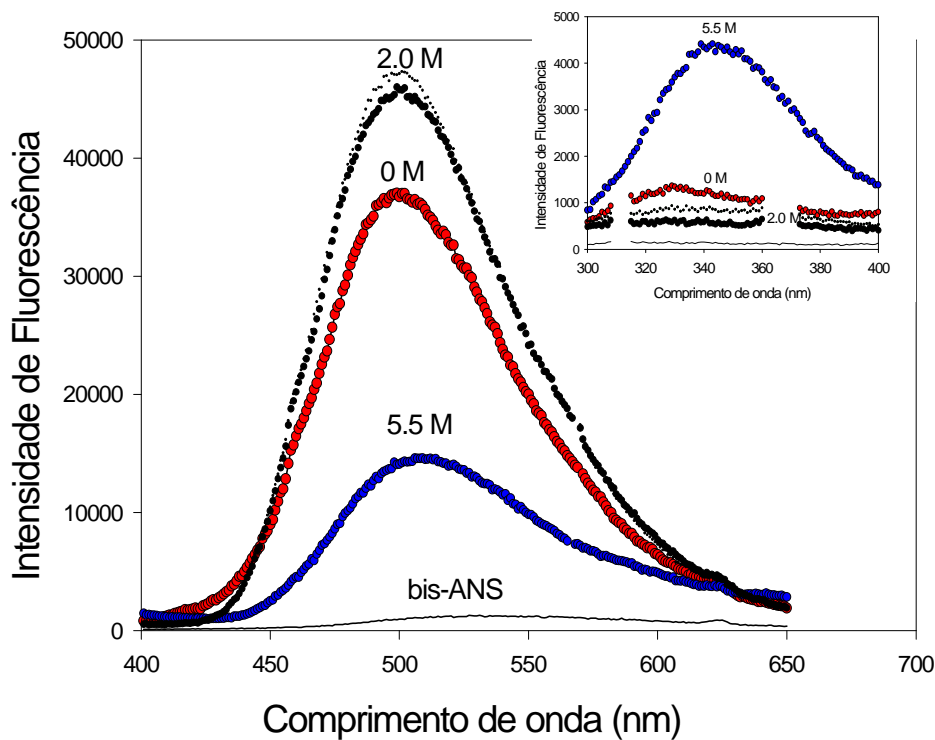


FIGURA 23. Associação de bis-ANS a β -tripsina, em presença de diferentes concentrações de uréia.

Condições Experimentais: As amostras foram incubadas por 30 minutos, em presença de uréia, antes da adição de bis-ANS. A excitação foi em 360 nm e os espectros foram registrados em intervalos de 1 nm. As bandas de excitação e emissão foram 0,4 e 1,0 nm, respectivamente. Figura inserida: Espectro de emissão de fluorescência da β -tripsina, na presença de bis-ANS, com excitação em 280 nm. As concentrações de uréia estão apresentadas sobre as curvas.

Para testar essa segunda possibilidade, o espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano foi registrado em presença da sonda bis-ANS, em presença e ausência de uréia. Os resultados são mostrados na Figura 23, inserida. Na ausência de uréia, a fluorescência do triptofano, quando excitado em 280 nm, é fraca; porém, em presença de uréia 5,5 M, pode-se perceber um aumento na emissão de sua fluorescência. Portanto, nessa concentração de uréia, não ocorre transferência de energia fluorescente dos resíduos de triptofano para o bis-ANS, muito provavelmente porque esses dois grupos se encontram distantes um do outro na molécula da β -tripsina, indicando assim que a proteína se encontra em um estado mais desdobrado.

5.10 Mudanças na atividade e na estrutura terciária da β -tripsina em diferentes concentrações de uréia.

A Figura 24 apresenta a curva de desdobramento da β -tripsina, acompanhada por emissão fluorescência em 320 nm, e também o perfil da atividade amidásica da enzima, na presença de diferentes concentrações de uréia. Como pode ser verificado, concentrações de uréia de até 1 M não causaram mudanças significativas na fluorescência; porém, entre 1 e 2 M de uréia, um decréscimo cooperativo foi observado. O perfil de atividade se mostrou diferente, ou seja, a perda na atividade enzimática da β -tripsina se inicia em uréia 0,2 M e a curva de inativação é caracterizada por um decréscimo monotônico.

A Figura 25 apresenta os gráficos de Lineweaver-Burk da hidrólise de β -tripsina sobre o L-BApNA, na ausência e na presença de 0,5; 1,0 e 1,65 M de uréia. Pode-se notar nesta figura, retas que se cruzam aproximadamente no mesmo ponto, na ordenada (E/v), indicando a natureza competitiva da inibição enzimática por uréia. A Tabela 6 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos da hidrólise do substrato pela β -tripsina, durante sua desnaturação em presença de uréia. Os valores de K_M e k_{cat} , determinados na ausência de uréia, estão de acordo com aqueles encontrados por Junqueira et al. (1992), que foram $2,59 \text{ s}^{-1}$ e $0,848 \text{ mM}$, para k_{cat} e K_M , respectivamente. O valor de K_M para L-BApNA, quando a enzima apresentava 75% de atividade, foi 1,75 vezes maior do que aquele da forma nativa, enquanto o valor de k_{cat} não se alterou. Contudo, a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) reduziu-se com o aumento da concentração de uréia. Esses resultados indicam que a queda na atividade da enzima, em baixas concentrações de uréia, acompanhada pelo aumento do

valor de K_M e redução de k_{cat}/K_M , provavelmente, foi devido à diminuição da afinidade da enzima pelo substrato e, conseqüentemente, sua eficiência catalítica.

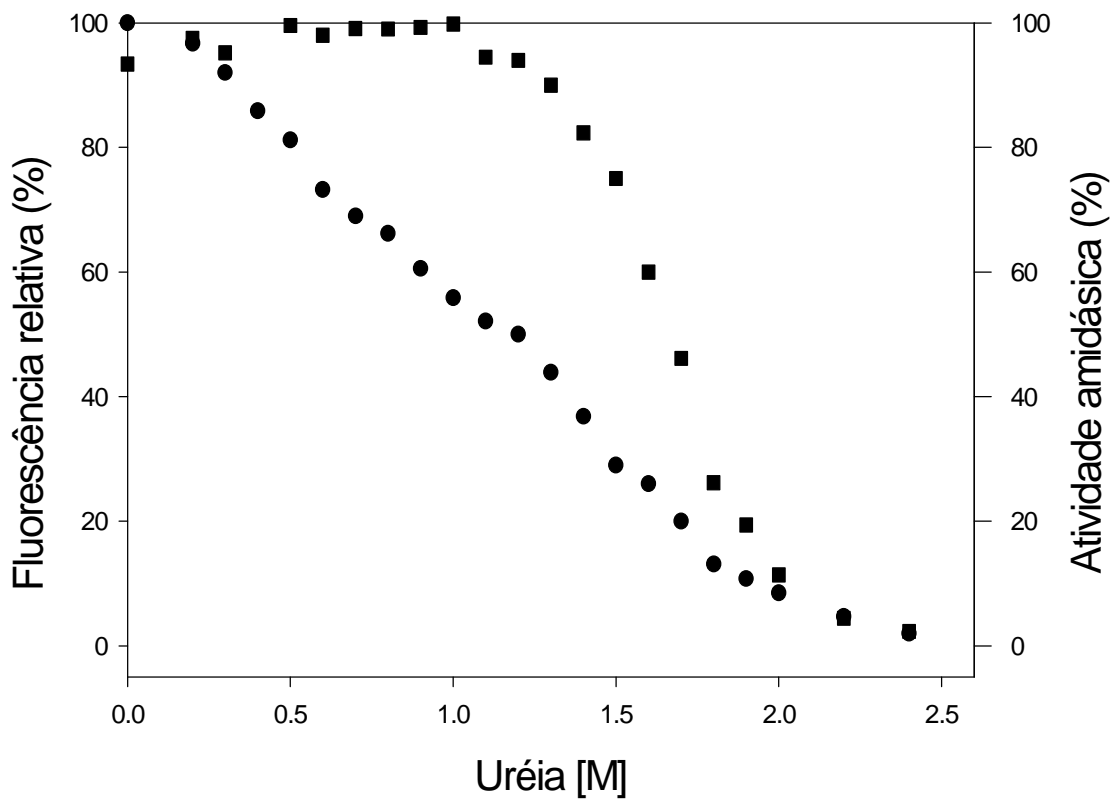


FIGURA 24. Perfil de fluorescência intrínseca e atividade enzimática da β -tripsina, como uma função da concentração de uréia. Os dados de fluorescência da Figura 22 foram normalizados e representados como fluorescência relativa. (■) representa fluorescência; (●), representa atividade enzimática.

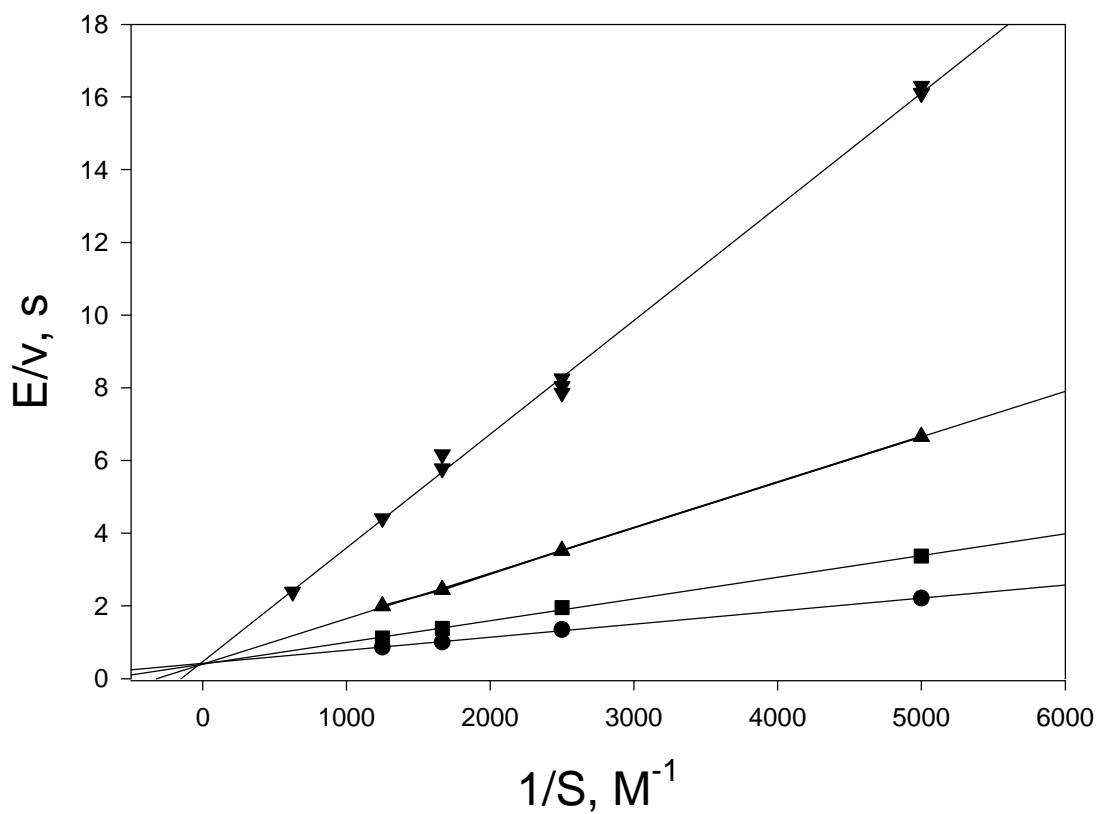


FIGURA 25. Gráfico de Lineweaver-Burk, para a hidrólise de L-BApNA, catalisada por β -tripsina, na presença de zero (●); 0,5 (■); 1,0 (▲) e 1,65 (▼) M de uréia. Condições experimentais: concentração de L-BApNA: 2 a 8 x 10⁻⁴ M. Concentração de β -tripsina 3,9 x 10⁻⁷ M.

Tabela 6. O efeito da uréia nos parâmetros cinéticos para a hidrólise de L-BApNA catalizada por b-tripsina

Uréia [M]	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	Atividade Residual
0,0	$2,40 \pm 0,16$	$0,85 \pm 0,08$	$2,82 \pm 0,26$	100
0,5	$2,53 \pm 0,32$	$1,49 \pm 0,22$	$1,70 \pm 0,33$	75
1,0	$2,50 \pm 0,24$	$3,10 \pm 0,34$	$0,81 \pm 0,12$	50
1,65	$2,11 \pm 0,73$	$6,60 \pm 2,40$	$0,32 \pm 0,16$	25

A reversibilidade estrutural do desdobramento por uréia foi verificada após diluir a solução de β -tripsina, incubada por 30 minutos em 5,5 M de uréia, e registro do espectro de fluorescência da solução de proteína diluída. Em termos funcionais, a reativação da enzima foi avaliada, após diluição, através de atividade amidásica com o substrato L-BApNA. As Figuras 26A e B mostram esses resultados.

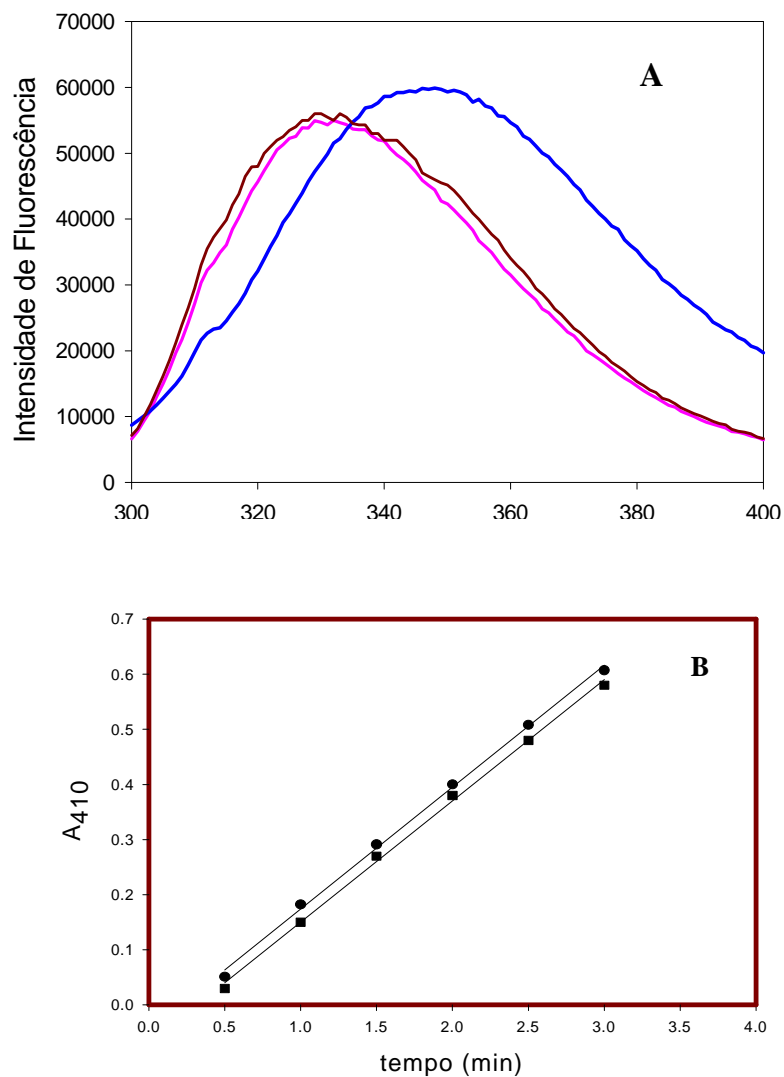


FIGURA 26. (A) Espectro de emissão de fluorescência da β -tripsina, registrado na ausência de uréia (rosa), em 5,5 M de uréia (azul) e, após diluição da proteína (verde), a partir de 5,5 M de uréia. (B) Curva de tempo de hidrólise de L-BApNA por β -tripsina, antes (●) e após (■) diluição da enzima, a partir de 5,5 M de uréia.

6. DISCUSSÃO

6.1 Desnaturação térmica da β -tripsina.

Existem dois testes para os dados de equilíbrio de desdobramento de uma proteína, que apontam para um comportamento de desnaturação de dois-estados: uma única curva de transição sigmoideal e a coincidência das curvas acompanhadas com diferentes sondas estruturais (Kim e Baldwin, 1990; Dill e Shortle, 1991).

Para a β -tripsina, em nossas condições experimentais, as curvas de desnaturação térmica (Figuras 9, 10 e 11) exibem uma única transição simétrica cooperativa, típica de um processo de desnaturação de dois estados. Os resíduos do ajuste de dois estados, exibidos nas figuras inseridas, distribuem-se de maneira aleatória em torno do zero, indicando que os dados são consistentes com a equação ajustada (Ramsay & Eftink, 1994).

A desnaturação térmica da β -tripsina foi acompanhada por absorvância no UV, DC no UV próximo e DC no UV distante. As duas primeiras técnicas se referem à estrutura terciária da proteína, enquanto que a terceira é uma medida da estrutura secundária. Assim, a exposição de grupos aromáticos do interior da proteína ao solvente, ou seja, uma mudança na polaridade dos aminoácidos, pode ser avaliada pela variação da absorção desses resíduos aromáticos na região do ultravioleta. O dicroísmo circular na região do UV próximo é uma medida da mobilidade das cadeias laterais dos aminoácidos no meio ambiente assimétrico da proteína dobrada. Dessa forma, é também um reflexo da desorganização da estrutura terciária da molécula de proteína, durante o seu desdobramento. O DC no UV distante, registrando as transições óticas dos elétrons que compõem a ligação amida ou peptídica, é uma sonda sensível das mudanças na estrutura secundária. O gráfico de f_u versus temperatura (Figura 12) mostra a superposição para essas diferentes sondas estruturais, monitoradas durante o desdobramento da molécula de β -tripsina. Isso indica que as mudanças nas estruturas terciária e secundária da proteína ocorreram simultaneamente,

satisfazendo assim o outro critério que caracteriza um processo de transição de dois estados.

Uma evidência adicional para o mecanismo de dois estados, provém de experimentos com DSC. Essa técnica mede a capacidade calorífica molar parcial de uma proteína, e permite a determinação da entalpia calorimétrica que, diferente da entalpia de van't Hoff, não requer nenhuma suposição quanto ao número de etapas envolvidas na transição de desdobraimento. Para pequenas proteínas, compostas de um domínio estrutural, cuja desnaturação é via um mecanismo de dois-estados, as entalpias calorimétrica e de van't Hoff são iguais e, portanto, a razão entre elas é próxima à unidade (Privalov, 1979).

Para proteínas compostas de mais de um domínio estrutural, podem ocorrer três situações: a razão $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ ser igual, maior ou menor do que a unidade. Se a razão for igual a um, indica que esses componentes se desdobram simultaneamente como uma só unidade cooperativa, ou ainda, que um monômero é a unidade cooperativa responsável pela transição conformacional. No caso da razão entre as entalpias ser maior que um, indica que um desacoplamento entre os monômeros pode ter ocorrido e que há mais de um mol de unidades cooperativas por mol de monômeros; e uma razão inferior a um indica que está ocorrendo dimerização, pois há menos de um mol de unidades cooperativas por mol de monômeros (Privalov, 1982).

Na Tabela 1, pode-se observar que a razão $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$, para o desdobraimento térmico da β -tripsina, em pH 2,8, é próxima à unidade, indicando que os domínios estruturais da molécula de β -tripsina se comportaram como uma só unidade cooperativa, no desdobraimento. Isto sugere que fortes interações entre os domínios são capazes de acoplar suas transições ou, ainda, que eles apresentam uma estabilidade térmica similar. Se um intermediário está presente durante o desdobraimento da β -tripsina, em nossas condições experimentais, ele não foi claramente detectável pelas medidas no equilíbrio.

Proteínas compostas de mais de um domínio estrutural, os quais se acoplam fortemente, de tal forma que se desdobram como uma única unidade cooperativa, já tem sido reportados (Hu & Stutervant, 1987; Timm et al., 1992; Szpikowska et al., 1994; Tendian et al., 1995 e Wallace et al., 1998).

O aumento na capacidade calorífica de uma solução de proteína (ΔC_p), durante a desnaturação, está associado às interações hidrofóbicas. Acredita-se que este aumento

representa a energia requerida para romper o arranjo das moléculas de água, que envolve regiões apolares expostas ao solvente, na desnaturação (Privalov, 1979). Como ΔH_m não depende diretamente do pH, mas é uma função linear de T_m , um perturbante, tal como o pH, pode ser usado para alterar T_m . Dessa forma, ΔC_p pode ser obtido através de um gráfico de ΔH_m versus T_m , medidos em diferentes valores de pH (Becktel e Schellman, 1987). O valor para ΔC_p da β -tripsina, de $2,6 \pm 0,23$ kcal/mol K, encontrado em nosso estudo, é similar àquele reportado por Bulaj e Otlewski (1995), usando métodos espectroscópicos ($2,64 \pm 0,3$ kcal/mol K), e também coincide com o valor encontrado por Spolar et al. (1992), calculado a partir da área superficial dos resíduos polares e não polares acessível à água, que foi de $2,6 \pm 0,2$ kcal/mol K.

Como mostrado na Tabela 1, valores similares para os parâmetros termodinâmicos foram obtidos das análises calorimétricas e dos dados espectroscópicos. Na T_m , a mudança na entalpia medida por calorimetria foi de 108,6 kcal/mol, comparada a um valor médio de 108,75 kcal/mol, obtido através de absorvância no UV e por DC. Contudo, esses valores são menores que aqueles reportados por Tishchenko e Gorodkov (1979) e por Bulaj e Otlewski (1995) para a faixa de valores de pH analisada, embora exista concordância para as temperaturas de transição. Esta diferença pode ser o resultado de uma menor força iônica utilizada naqueles experimentos. Por outro lado, há concordância entre os valores de ΔC_p , mostrando que este parâmetro foi independente da força iônica.

O valor encontrado para a estabilidade conformacional da β -tripsina, ΔG_u a 27 °C, de $6,0 \pm 0,2$ kcal/mol (item 5.3), está dentro da faixa de valores de ΔG_u , reportada para proteínas globulares. A partir de nossos valores de ΔH_m e T_m (Tabela 2), a pH 4,0, obtém-se o valor de 12 kcal/mol, para ΔG_u , utilizando-se a equação [4]. Bulaj e Otlewski (1995) reportaram a estabilidade conformacional para a β -tripsina, a pH 4,2, com ΔG_u igual a 14 kcal/mol. Considerando as diferenças de solvente, e dos métodos espectrofotométricos empregadas entre estes dois estudos, os valores encontrados para a estabilidade termodinâmica são aproximadamente similares.

6.2 Desnaturação da β -tripsina por uréia, medida por fluorescência.

A molécula de tripsina contém quatro resíduos de triptofano nas posições 51, 141, 215 e 237 (sistema de numeração do quimotripsinogênio bovino), e todos eles se encontram bastante escondidos na estrutura da proteína. Além disso, esses resíduos estão igualmente distribuídos entre os dois domínios estruturais. Estas observações indicam que as medidas fluorimétricas refletem mudanças globais na estrutura da proteína.

O espectro de emissão de fluorescência da β -tripsina registrado, utilizando-se diferentes concentrações de uréia, está apresentado na Figura 21. Em concentrações entre 0 e 1 M de uréia, observa-se um aumento na intensidade de fluorescência, sem mudanças no deslocamento do pico máximo. Mudanças na intensidade de fluorescência sem deslocamentos, indicam uma transição de desdobramento, que afeta, predominantemente, a intensidade máxima (Sackett al., 1994). Esse comportamento foi verificado para a glutaminil-tRNA sintetase de *E. coli* (Das et al., 1995).

Em uréia 2 M, houve uma redução na intensidade de fluorescência do espectro da β -tripsina, e um deslocamento intermediário da emissão máxima. Esses resultados indicam o aparecimento de um estado em que a área superficial hidrofóbica não está totalmente exposta ao solvente. Indica, ainda, que a molécula de β -tripsina adquire uma conformação, nessas condições, diferente do estado nativo e daquele totalmente desdobrado. Resultado similar foi encontrado para a tripsina comercial (Ruan et al., 1997) sob pressão de 6,5 kbar, a 0 °C. O espectro de fluorescência desse estado intermediário apresentou um deslocamento de 12 nm na fluorescência máxima e um decréscimo na intensidade de fluorescência, em relação ao estado nativo.

Algumas estruturas nativas apresentam maior afinidade a sondas hidrofóbicas, tais como ANS e bis-ANS, que outras. Isso se deve ao fato da presença, nessas proteínas, de sítios hidrofóbicos expostos ao solvente, por exemplo, centro ativo, sítios para ligação de substrato ou grupo heme (Semisotnov et al., 1991). Além disso, a afinidade do ANS para proteínas na conformação beta é mais forte que para proteínas na conformação alfa (Edwin e Jagannadham, 1998). Essas observações possivelmente justificam o grande aumento na intensidade de fluorescência da sonda bis-ANS, quando ligada à β -tripsina nativa (Figura 23).

A afinidade do ANS pela molécula de uma proteína aumenta muito quando a rigidez da estrutura terciária é rompida, enquanto a estrutura secundária e sua compactação são retidas, ou seja, quando um estado intermediário MG é formado. Neste estado, o núcleo hidrofóbico das proteínas se torna mais acessível ao solvente e, portanto, ao ANS, do que o estado nativo.

Através dos espectros de DC no UV próximo (Figura 18 B, curva c), pode-se notar que, na presença de uréia 2 M, os contatos terciários na molécula de β -tripsina foram quase totalmente perdidos. Ainda de acordo com a estimativa da estrutura secundária, nessa concentração do desnaturante (Tabela 5), a β -tripsina mostra grande percentual de elementos de estrutura secundária, enquanto que a maior intensidade da sonda bis-ANS foi também observada em 2 M de uréia. Essas observações identificam um estado intermediário para a β -tripsina, com características de um MG.

Intermediários parcialmente dobrados foram também observados no desdobramento do tripsinogênio, através de DC, espectro de diferença, exclusão molecular em HPLC e associação com a sonda ANS (Martins e Santoro, 1999). Para a tripsina, um estado de MG foi caracterizado na pressão de 6,5 kbar, a 0 °C, com grande afinidade pela sonda ANS (Ruan et al., 1997).

6.3 Mudanças na atividade enzimática e na estrutura terciária da β -tripsina.

Baixas concentrações de uréia causaram mudanças na atividade enzimática da β -tripsina, enquanto alterações significativas na estrutura terciária não foram observadas (Figura 24). Contudo, ocorreu um aumento na intensidade do espectro de fluorescência da β -tripsina, entre 0 e 0,5 M de uréia (Figura 21), o que pode estar associado a perturbações no meio ambiente dos resíduos aromáticos, Trp141 e 215, os quais se encontram próximos ao domínio de ativação da enzima. Um aumento na intensidade de fluorescência da ornitina sintase, em baixas concentrações de GdnHCl, foi também observado, e atribuído a mudanças conformacionais no centro ativo (Ruvinov et al., 1999).

O sítio de especificidade S1, na região do centro ativo, é uma cavidade parcialmente acessível ao solvente. Apesar de apresentar rigidez estrutural, a estabilidade do sítio S1 na enzima nativa é altamente dependente da integridade da estrutura adjacente, que é

composta por "loops" (Hedstrom et al., 1992). Assim, o aumento em K_M na presença de 0,5 M de uréia (Tabela 6) mostrou mudança na afinidade da tripsina pelo substrato L-BApNA, possivelmente devido a perturbações nos "loops", o que ocasiona a desestabilidade do sítio S1. Uma vez que o domínio de ativação posiciona corretamente o sítio S1, e que mudanças na fluorescência dos triptofanos próximos à região do centro ativo ocorreram, pode-se supor que, em baixas concentrações de uréia, foi observada uma alteração no domínio de ativação da molécula de tripsina, com conseqüente aumento em K_M , e diminuição da constante de especificidade, ocasionando a queda na atividade enzimática antes de grandes alterações na estrutura global da proteína.

Durante a inativação de uma enzima multimérica, a creatina cinase, em soluções diluídas de GdnHCl, uma grande flexibilidade do centro ativo foi observada, através de uma sonda fluorescente inserida nesse local, com concomitante queda na atividade enzimática (Zhou et al., 1993). A molécula de RNase A, inativada em baixas concentrações de GdnHCl, está parcialmente frouxa, especialmente na região do centro ativo, e, deste modo, em uma conformação mais susceptível ao ataque proteolítico, sem mudanças notáveis em sua estrutura terciária (Udgaonkar e Baldwin, 1990).

Sackett et al. (1994) e Tsou (1995) consideram que um padrão de desdobramento mais complexo para proteínas está relacionado à perda de atividade antes que mudanças nos parâmetros espectroscópicos possam ser demonstradas, e, ainda, que tal fato é característico de um processo sequencial de desdobramento.

Considerando que o tripsinogênio possui uma atividade de aproximadamente 3% da atividade da tripsina (Robinson et al., 1973), uma transição conformacional do tipo tripsina/tripsinogênio poderia ser detectada, antes de mudanças na estrutura terciária da proteína, somente se, em presença de baixas concentrações de uréia, a atividade residual da tripsina se reduzisse a valores próximos a 3%. No entanto, mesmo na presença de 1,65 M de uréia, onde metade da concentração de moléculas de tripsina se encontra desdobrada (Figura 24), essa enzima ainda apresenta atividade residual de 25%, o que significa que, ainda nessas condições, o domínio de ativação não sofreu desdobramento total. Assim, sob ponto de vista funcional, os resultados dessa investigação levam ao questionamento de que foi ou não demonstrado desdobramento local da região do centro ativo, antes de mudanças na estrutura terciária da proteína. Devido à isso, nós não podemos caracterizar o processo

de desdobramento da β -tripsina, por uréia, acompanhado através de fluorescência e medidas de atividade enzimática, como uma transição sequencial, em controvérsia às considerações de Sackett et al. (1994) e Tsou (1995). Assim, nossos resultados sugerem que, a queda na atividade seria decorrente de uma alteração conformacional do domínio de ativação, porém, sem incluir o desdobramento. No entanto, nossos resultados são consistentes com o ponto de vista de Tsou (1995), de que o centro ativo, situado entre os domínios estruturais, estaria mais susceptível ao efeito de desnaturantes do que o resto da molécula.

Além disso, já foi demonstrado por Mares-Guia (1968) que uréia é um inibidor competitivo da tripsina, em presença dos substratos D,L-BApNA e pNPA. Por se tratar de um inibidor competitivo, a queda na atividade possivelmente está associada ao aumento na concentração de uréia até 1 M, uma vez que a uréia compete com L-BApNA, pelo sítio de especificidade da enzima. Na concentração de 1,65 M de uréia, a grande queda na eficiência catalítica, pode estar associada à autólise da tripsina e/ou à perda da conformação do sítio ativo.

Sob o ponto de vista estrutural, pode-se considerar a desnaturação da β -tripsina por uréia envolvendo três etapas. A primeira etapa seria uma alteração conformacional na região do centro ativo, causada por concentrações de uréia de até 1 M, levando à perda de 50% na atividade catalítica da enzima (Tabela 6, Figura 24). A segunda etapa seria um equilíbrio entre esse estado parcialmente inativado e um estado de MG, identificado em 2 M de uréia. E uma terceira etapa, envolvendo esse estado de MG e um estado desdobrado em 5,5 M de uréia.

Em seus estudos de desnaturação, no equilíbrio, para o tripsinogênio e β -tripsina, Bulaj e Otlewski (1995) concluíram que um mecanismo de dois estados foi consistente com os dados experimentais. No caso do desdobramento da β -tripsina por calor, esses autores concluíram que o domínio de ativação é parte integral da unidade cooperativa. Contudo, a cinética de desdobramento, em presença de GdnHCl, para ambas proteínas, mostrou-se uma reação complexa (Otlewski et al., 1996). Particularmente para a β -tripsina, uma fase separada foi observada e postulada como sendo uma manifestação do desdobramento do domínio de ativação.

6.4 Estimativa do conteúdo de estrutura secundária da b-tripsina em diferentes condições de desnaturação.

A comparação entre os dados da Tabela 4 e 5 mostra que houve uma queda gradual de 21,4% na estrutura em folhas beta, entre zero e 70 °C; enquanto que uma queda de somente 11,2% para essa estrutura foi observada em 2,6 M de uréia, com relação à proteína na ausência desse desnaturante.

Quando se compara, por exemplo, os espectros entre 2 M de uréia e a 70 °C, observa-se que a maior intensidade no sinal de DC, para ambos os estados, em torno de 200 nm, é de aproximadamente $-10.000 \text{ graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$; no entanto, há diferença na porcentagem de decréscimo da estrutura em folhas beta, entre esses estados. Isto é devido, em parte, ao fato de não se utilizar a faixa espectral de 184 a 240 nm, para a análise da estrutura secundária da β -tripsina em presença de uréia, devido à forte absorção desse desnaturante, abaixo de 200 nm. De acordo com Johnson (1990), o conteúdo de informação para folhas beta é reduzido quando se analisa os dados truncados até 190 nm. Isto porque ainda existem duas bandas a serem consideradas, abaixo desse comprimento de onda, para essa estrutura. Porém, a confiabilidade dos resultados para o conteúdo de hélice alfa é grande, uma vez que essa estrutura secundária domina a região entre 200 a 240 nm. Contudo, os resultados das estimativas para o conteúdo de folhas beta ainda retratam uma queda desse elemento de estrutura secundária, com o aumento na concentração de uréia.

Foram também analisados os espectros em diferentes temperaturas, de 200-240 nm e de 207-240 nm, e os resultados foram comparados com aqueles de 184-240 nm. A estimativa para o espectro truncado até 200 nm forneceu queda de 16% para as folhas beta, enquanto aquele analisado até 207 nm apresentou queda de somente 6,7% para essa estrutura. A análise para os espectros em diferentes concentrações de uréia, na faixa de 207 a 240 nm, mostra queda de somente 3,0% para a estrutura beta. Esses resultados mostram que, de acordo com o método CCA, a β -tripsina desnaturada por calor apresenta menor conteúdo de folhas beta do que a proteína em presença de uréia 2,6 M, mesmo após correções para a faixa espectral utilizada na análise. Os resultados também mostram a importância de se adquirir os espectros até 184 nm, para a análise e interpretação do conteúdo de estrutura secundária, nas proteínas com alto conteúdo de folhas beta.

A estimativa do conteúdo de estrutura secundária para a β -lactoglobulina, uma proteína da classe toda beta do tipo I, através de seu espectro de DC no UV distante, revelou uma queda de 17% na estrutura em folhas beta, em presença de GdnHCl 4 M (Kuwajima et al., 1996), e de 40%, em GdnHCl 5,2 M (Hamada & Goto, 1997), com relação ao conteúdo dessa estrutura na ausência de GdnHCl. A discrepância entre esses decréscimos, excluindo a pequena diferença na concentração do desnaturante, pode ser devido ao fato de que no primeiro estudo, os espectros foram analisados entre 211 e 250 nm, enquanto que, no segundo, foi utilizada a faixa espectral entre 207 e 250 nm. Também, os espectros de referência para a estrutura em *random coil*, bem como os métodos de análise de estrutura secundária foram diferentes nos dois estudos. Kuwajima et al. (1996) sugerem que as fitas G e H, localizadas dentro da molécula da estrutura nativa da β -lactoglobulina retêm a estrutura beta, mesmo na presença de GdnHCl 4 M, e que esta estrutura secundária residual desempenha um papel no sítio de iniciação do dobramento da molécula. A persistência de estrutura em folhas beta, em altas concentrações de desnaturantes, é também conhecida para outras proteínas do tipo toda beta (Ropson & Frieden, 1992; Martensson et al., 1993; Svensson et al., 1995).

Existe a possibilidade de que as seis pontes dissulfeto presentes na estrutura desdobrada da β -tripsina estejam contribuindo para o alto grau de estrutura residual verificado em presença de uréia 2,6 M e a 70 °C. Apesar de haver essa possibilidade, já foi demonstrado que a α -lactalbumina forma um MG compacto, até mesmo na ausência de pontes dissulfeto (Redfield et al., 1999), e que a proporção de folhas beta na β -lactoglobulina reduzida e não reduzida não se altera, de forma significativa, na presença de GdnHCl 4 M (Kuwajima et al., 1996).

Wilson et al. (1996) mostraram, por meio de atividade ótica vibracional de Raman, que a lisozima da clara do ovo e a ribonuclease A bovina se desdobram quando da redução de todas as pontes dissulfeto, porém ambas proteínas apresentam estrutura secundária residual.

Wang et al. (1997) observaram que a redução de uma ponte dissulfeto na molécula de tripsina não teve efeito em sua estabilidade conformacional, medida através de desnaturação por uréia. Porém, o espectro de DC para essa nova forma da proteína é diferente da forma nativa. Os autores sugerem que essa diferença pode estar associada à

perda do cromóforo dissulfeto, porém não descartam uma perturbação na estrutura da enzima.

Durante o desdobramento da β -tripsina por calor, ocorreu um aumento significativo, de 8,1% para as hélices alfa, quando a proteína é aquecida até 75 °C, enquanto que, na presença de uréia 2,6 M, houve perda total desse elemento (Tabelas 4 e 5). Um aumento no conteúdo de hélice alfa foi verificado para o quimotripsinogênio desdobrado por calor, em pH ácido (Chalikian et al., 1997). Contudo, o conteúdo de folhas beta manteve-se inalterado. Esse estado, a 80 °C, foi caracterizado como um MG, de acordo com a interpretação dos espectros de DC no UV próximo e distante, e medidas de compressibilidade. Considerando as similaridades na estrutura tridimensional entre o quimotripsinogênio e a tripsina, principalmente no conteúdo dos elementos de estrutura secundária, esses resultados mostram que duas proteínas classificadas como toda beta do tipo II e com alta homologia no dobramento terciário, podem alcançar diferentes estados conformacionais, nas mesmas condições experimentais. Ao contrário, o quimotripsinogênio desdobrado frente a uréia 6 M, em pH ácido, apresenta um espectro de DC no UV distante, similar em forma e intensidade àquele da β -tripsina, em presença de uréia 2,6 M.

Os espectros de DC na região do UV próximo mostram que, em presença de uréia 2,6 M, a β -tripsina não apresenta contatos terciários (Figura 18B). Por meio dos espectros de fluorescência, pode-se também notar que, a partir de uréia 2,6 M, não há mais deslocamentos espectrais e, de acordo com esse critério, a proteína já se encontra totalmente desdobrada (Figura 21). No entanto, a intensidade de fluorescência da sonda bis-ANS em uréia 2,6 M é maior que aquela na ausência desse desnaturante, indicando que essa sonda se associa à molécula de β -tripsina, nessa condição. Além disso, somente em presença de uréia 5,5 M, ocorre a dissociação do bis-ANS da molécula da proteína, e é possível observar a fluorescência dos resíduos de triptofano, na presença dessa sonda (Figura 23). O espectro de DC no UV distante, em uréia 3,7 M (Figura 19), é diferente daquele em presença de uréia 2,6 M. Esses resultados indicam que a proteína, em presença de uréia 2,6 M, não se encontra totalmente desdobrada, justificam o alto conteúdo de estrutura secundária residual, do tipo folhas β , encontrados através da estimativa pelo método CCA, para essa concentração de desnaturante, e permite concluir que esse estado

pode também representar um estado desnaturado compacto, para a β -tripsina, com ausência de estrutura em α -hélice.

Em temperaturas acima de 70 °C, pode-se verificar que não mais ocorreu variação pronunciada no sinal de DC, na curva de transição, em 205 nm (Figura 11), indicando que a β -tripsina encontra-se em um estado desdobrado estável, com perda de sua estrutura secundária. No entanto, a estimativa da estrutura secundária, pelo método CCA indicou a existência de estrutura residual do tipo folhas beta, e ainda um aumento no conteúdo de α -hélice.

Para a β -lactoglobulina, em presença de GdnHCl 5,2 M, não se observou variação no sinal de DC, para a curva de transição em 222 nm, o que caracteriza perda em α -hélice. Contudo, de acordo com a estimativa da estrutura secundária, nessa concentração de desnaturante, a proteína ainda retém 10% dessa estrutura secundária (Hamada & Goto 1997).

Esses resultados indicam que, apesar da informação que se pode obter por meio das curvas de transição, uma avaliação sobre a natureza dos estados desdobrados só pode ser obtida através da informação contida nos espectros das proteínas, em diferentes condições de desnaturação.

Para entender a natureza da estrutura residual no estado de MG da α -lactalbumina, os efeitos de uréia no espectro de NMR foram comparados com o efeito desse desnaturante, monitorado por DC no UV distante, em 222 nm (Schulman et al., 1997). Os autores observaram que, mesmo na ausência de estrutura secundária regular, que ocorreu em 10 M de uréia, a cadeia polipeptídica ainda não estava completamente desdobrada, de acordo com os sinais de NMR. Esses resultados mostraram que uma região central (núcleo hidrofóbico) se mantém colapsada sob extremas condições de desnaturação, e sugerem que este núcleo fornece um molde para a correta organização das partes remanescentes da estrutura, no dobramento.

Assim, de acordo com nossos dados experimentais, os estados desdobrados da β -tripsina apresentaram as seguintes características:

O estado desdobrado por uréia:

- Ausência de estrutura terciária em torno dos resíduos aromáticos, verificado através de DC no UV próximo;
- Grande conteúdo de estrutura secundária do tipo folhas beta e ausência de hélices alfa;
- Associação à sonda bis-ANS;

O estado desdobrado por calor:

- Ausência de estrutura terciária em torno dos resíduos aromáticos;
- Grande conteúdo de estrutura do tipo folhas beta, porém, menor que no estado em 2,6 M de uréia, e presença de estrutura do tipo hélice alfa;
- Ausência de variação no sinal em 205 nm;
- Não temos dados de associação com bis-ANS, na temperatura de 75 °C.

Os resultados desse estudo não permitem conclusões a respeito do que representam os estados desdobrados encontrados para a β -tripsina, com relação ao processo de dobramento para essa proteína. Um estudo envolvendo a combinação de temperatura e uréia e, ainda, de alta pressão e uréia apresenta uma opção para verificar se essas estruturas secundárias residuais realmente existem e persistem na proteína desdobrada. O emprego de outras técnicas, como FTIV e RMN, também fornece outra alternativa para se avaliar a natureza da estrutura residual desses estados desdobrados. No entanto, esse trabalho permitiu explorar as potencialidades da técnica de DC, na avaliação dos estados conformacionais da β -tripsina, desdobrados por uréia e por calor.

7.CONCLUSÕES

A desnaturação térmica para a β -tripsina, medida em condições de equilíbrio, parece ser um processo de dois estados, em que somente os estados nativo e desdobrado são significativamente populacionados. A coincidência das curvas de transição térmica, detectadas através de técnicas espectroscópicas e obtidas em diferentes comprimentos de onda, indica que as mudanças conformacionais, que expõem cadeias laterais de aminoácidos para o solvente, também rompem a estrutura secundária da proteína. Além disso, a técnica de calorimetria diferencial de varredura, que mede diretamente a entalpia de transição (ΔH_{cal}), forneceu uma razão $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ próxima à unidade, indicando que a desnaturação térmica é bem representada por um modelo de dois estados.

A desnaturação da β -tripsina por uréia, monitorada através dos espectros de fluorescência, revelou a presença de um estado intermediário, em que os resíduos de triptofano não estavam totalmente expostos ao solvente. Esse estado, com grande afinidade pela sonda bis-ANS, apresentando um nível considerável de estrutura secundária e ausência de contatos terciários, foi caracterizado como um estado de MG.

Os espectros de DC no UV distante, para a β -tripsina, mostram que, durante o desdobramento por calor, ocorre um decréscimo contínuo nos valores da elipticidade, em toda a faixa espectral, enquanto que, na desnaturação por uréia, há descontinuidade nesse decréscimo, após 2 M de uréia, entre 210 e 240 nm, indicando que esse processo de transição é mais complexo. Esses resultados também corroboram com as avaliações dos espectros de fluorescência para mostrar que, diferente do desdobramento por calor, o processo de desnaturação da β -tripsina por uréia envolve a presença de estados intermediários.

Os espectros de DC no UV próximo e distante mostram grandes alterações conformacionais na estrutura da β -tripsina, durante a desnaturação por calor e por uréia. A

avaliação qualitativa dos espectros no UV distante mostra queda no conteúdo de folhas β , durante o desdobramento, e a análise quantitativa, utilizando-se o método CCA, confirma as alterações para esse elemento de estrutura secundária. Além disso, os espectros de DC no UV distante, em 70 °C e na presença de 2,6 M de uréia, mostram que esses estados são estruturalmente diferentes, e a análise quantitativa revela a presença de estrutura secundária residual, para esses estados desdobrados.

A inativação da β -tripsina ocorre antes do desdobramento global da estrutura dessa proteína, com o aumento das concentrações de uréia. A determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato L-BApNA, na ausência e na presença de uréia, mostra que a queda da atividade da β -tripsina, antes de alterações na estrutura terciária, foi devido a uma menor afinidade da enzima pelo substrato. O aumento no valor de K_M e queda na eficiência catalítica, podem ser explicados tanto por uma desestabilização do sítio de especificidade S1 quanto pela competição entre a uréia e o L-BApNA por este sítio.

A técnica de DC mostrou-se valiosa no monitoramento de mudanças na estrutura secundária e terciária da β -tripsina, uma proteína da classe toda beta, do tipo II. Os programas de estimativa de estrutura secundária, a partir dos espectros no UV distante, apresentaram bom desempenho na análise quantitativa dos principais elementos de estrutura secundária na proteína nativa, bem como para a proteína submetida aos efeitos do calor e da uréia. As limitações dessa técnica, na análise quantitativa da estrutura secundária, foram também discutidas.

A maioria dos estados de MG foram caracterizados utilizando-se proteínas com alto conteúdo de α -hélices. Portanto, esse trabalho mostra a identificação de um estado como MG durante o desdobramento, no equilíbrio, de uma proteína da classe toda- β .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abita, J.P.; Delaage, M.; Lazdunski, M.; Savrda, J. The mechanism of action of trypsinogen. The role of the four N-terminal aspartyl residues. *European Journal of Biochemistry* 8, 314-324, 1969.
- Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230, 1973.
- Arnold, U.; Ulbrich-Hofmann, R. Differences in the denaturation behavior of ribonuclease A induced by temperature and guanidine hydrochloride. *Journal of Protein Chemistry* 19, 345-352, 2000.
- Bai, Y.; Englander, W. Future directions in folding: The multi-state nature of protein structure. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 24, 145-151, 1996.
- Baldwin, R. L.; Rose, G. D. Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends in Biochemical Science* 24, 26-35, 1999.
- Baptista, A.; M., Johnson, P.H.; Hough, E.; Petersen, S. B. The origin of trypsin. Evidence for multiple gene duplications in trypsins. *Journal of Molecular Evolution* 47, 353-362, 1998.
- Bartunik, H.D.; Summers, L.J.; Bartsch, H.H. The crystal structure of bovine trypsin at 1,5 Å resolution in a crystal form with low molecular packing density. *Journal of Molecular Biology* 210, 813-828, 1989.

- Baum, J.; Brodsky, B. Folding of peptide models of collagen and misfolding in disease. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 122-130, 1999.
- Becktel, W.J.; Schellman, J.A. Protein stability curves. *Biopolymers* 26, 1859-1877, 1987.
- Birktoft, J.J.; Blow, D.M. Structure of crystalline α -chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology* 68, 187-240, 1972.
- Bode, W.; Schwager, P. The refined crystal structure of bovine β -trypsin at 1,8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *Journal of Molecular Biology* 98, 693-717, 1975.
- Bode, W.; Fehlhämmer, H.; Huber, R. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1,8 Å resolution. I. Data collection, application of patterson search techniques and preliminary structural interpretation. *Journal of Molecular Biology* 106, 325-335, 1976.
- Bode, W.; Chen, Z.; Bartels, K.; Kutzbach, C.; Schimdt-Kastner, G.; Bartunik, H. Refined 2 Å X-ray crystal structure of porcine pancreatic kallikrein A, a specific trypsin-like serine proteinase. *Journal of Molecular Biology* 164, 237-282, 1983.
- Bode, W.; Mayr, I.; Baumann, U.; Huber, R.; Stone, S.R.; Hofsteenge, J. The refined 1,9 Å crystal structure of human α -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Trp insertion segment. *EMBO Journal* 8, 3267-3475, 1989.
- Brahms S.; Brahms, J. Determination of protein secondary structure of proteins in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Journal of Molecular Biology*, v.138, 149-178, 1980.
- Brunger, A.T.; Huber, R.; Karplus, M. Trypsinogen-trypsin transition: a molecular dynamic study of induced conformational change in the activation domain. *Biochemistry* 27, 5153-5162, 1987.

- Buck, M.; Radford, S.E.; Dobson, C.M. Amide hydrogen exchange in a highly denatured state – hen white lysozyme in urea. *Journal of Molecular Biology* 237, 247-254, 1994.
- Bulaj G.; Otlewski J. Denaturation of free and complexed bovine trypsinogen with the calcium ion, dipeptide Ile-Val and basic pancreatic trypsinogen inhibitor (Kunitz). *Journal of Molecular Biology* 247, 701-716, 1995.
- Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function: Spectroscopic Analysis of Biopolymers*. New York, W.H. Freeman and Company, 1980, p.846.
- Carter, P.; Wells, J. A. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332, 564-568, 1988.
- Carver, J. A.; Guerreiro, N.; Nicholls, K.A.; Truscott, R.J.W. On the interaction of α -crystallin with unfolded proteins. *Biochemical and Biophysical Acta* 1252, 251- 1995.
- Chaffotte, A. F.; Cadieux, C.; Guillou, Y.; Goldberg, M.E. A possible folding initial intermediate: the C-terminal proteolytic domain of tryptophan synthase β -chain folds in less than 4 milliseconds into a condensed state with non-native-like secondary structure. *Biochemistry* 31, 4303-4308, 1992.
- Chalikian, T.V.; Volker, J.; Anafi, D.; Breslauer, K.J. The native and the heat-induced denatured states of α -chymotrypsinogen A: thermodynamic and spectroscopic studies *Journal of Molecular Biology* 274, 237-252, 1997.
- Chase, T.; Shaw, E. p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 29, 508-514, 1967.

- Chistiakova, L.A.; Kravchenko, N.A. ; Nikitin, S. Ia., Klabunovskii, E.I. Heat denaturation of egg white lysozyme investigated by circular dichroism. *Biofizika* 21, 975-979, 1976.
- Cohen, D.S.; Pielack, G.J. Stability of yeast iso-1-ferricytochrome c as a function of pH and temperature. *Protein Science* 3, 1253-1260, 1994.
- Darby, N.J.; Creighton, T.E. *Protein Structure* 1993. Oxford University Press, p. 99.
- Das, B. K.; Bhattacharyya, T.; Roy, S. Characterization of a urea induced molten globule intermediate state of glutaminyl-tRNA synthetase from E. Coli. *Biochemistry* 34, 5242-5247, 1995.
- Davie, E.W.; Neurath, H. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *The Journal of Biological Chemistry* 212, 515-529, 1955.
- Delaage, M.; Lazdunski, M. Différentes espèces moléculaires du trypsinogène et de la trypsine de boeuf. *Biochemical and Biophysical Acta* 105, 608-611, 1965.
- De Grado, W. F.; Summa, C.M.; Pavone, V.; Nistri, F.; Lombardi, A. De novo design and structural characterization of proteins and metalloproteins. *Annual Review of Biochemistry* 68, 779-819, 1999.
- Dias, C.L.F.; Rogana, E. Autolysis of β -trypsin at pH 3.0. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 19, 11-18, 1986.
- Dill, K. A . Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29, 7133-7155, 1990.
- Dill, K.A.; Shortle, D. Denatured states of proteins. *Annual Review in Biochemistry* 60, 795-825, 1991.

- Dill, K.A. ; Bromberg, S.; Yue, K.; Fiebig, K.M.; Yee, D.P.; Thomas, P.D.; Chan, H.S.
Principles of protein folding: a perspective from simple exact models. *Protein Science* 4,
561-602, 1995.
- Dobson, C. M.; Sali, A. ; Karplus, M. Protein folding: a perspective from theory and
experiment. *Angewandte Chemie, International Edition in English* 37, 868-893, 1998.
- Dobson, C. M.; Karplus, M. The fundamentals of protein folding: bringing together theory
and experiment. *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 92-101, 1999.
- Dobson, C. M. 2000 The nature and significance of protein foilding. In: Pain, R, ed.
Mechanisms of Protein Folding. Oxford, New York, pp 1-33.
- Edwin, F.; Jagannadham, M. V. Sequential unfolding of papain in molten globule state.
Biochemical and Biophysical Research Communications 252, 654-660, 1998.
- Ellis, R.J.; Hartl, F. U. Principles of protein folding in the cellular environment. *Current
Opinion in Structural Biology* 9, 102-110, 1999.
- Erlanger, B. F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. The preparation and properties of two new
chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-
278, 1961.
- Fabian, H.; Schultz, C.; Naumann, D.; Landt, O.; Han, U.; Saenger, W. Secondary structure
and temperature-induced unfolding and refolding of ribonuclease T1 in aqueous
solution. *Journal of Molecular Biology* 232, 967-981, 1993.
- Fersht, A. R. Protein folding and stability – the pathway of folding of barnase. *FEBS
Letters* 325, 5-8, 1993.

- Fink, A. Compact intermediate states in protein folding. *Annual Review of Biophysical and Biomedical Structure* 24, 495-522, 1995.
- Gabel, D.; Kasche, V. Autolysis of β -trypsin. Influence of calcium ions and heat. *Acta Chemical Scandinavica* 27, 1971-1981, 1973.
- Garcia, P.; Desmadril, M.; Minard, P.; Yon, J.M. Evidence for residual structure in the unfolded form of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 34, 397-404, 1995.
- Garnier J. Protein structure prediction. *Biochimie* 72, 513-524, 1990.
- Garza-Ramos, G.; Fernandez-Velasco, D.A.; Ramirez, L. Gomez-Puyou, A. Enzyme activation by denaturants in organic solvents systems with low water content. *European Journal of Biochemistry* 205, 509-517, 1992.
- Geourjon, D.; Deleage, L. SOMP: a self-optimized method for protein secondary structure. *Protein Engineering* 7, 157-164, 1994.
- Greenfield, N. J.; Degregori, S. E. Conformational intermediates in the folding of a coiled-coil model peptide of the N-terminus of tropomyosin and $\alpha\alpha$ -tropomyosin. *Protein Science* 2, 1263-1273, 1993.
- Greenfield, N.J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry* 235, 1-10, 1996.
- Greer, J. Comparative model-building of the mammalian serine proteases. *Journal of Molecular Biology* 153, 1027-1042, 1981.
- Guijarro, J.I.; Sunde, M.; Jones, J.A.; Campbell, I.D.; Dobson, C.M. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 95, 4224-4228, 1998.

- Hamada, D.; Goto, Y. The equilibrium intermediate of β -lactoglobulin with non-native α -helical structure. *Journal of Molecular Biology* 269, 479-487, 1997.
- Hartley, B.S.; Shotton, D.M., Pancreatic elastase. In: BOYER, P.D. (Ed.). *The Enzymes*, New York, Academic Press, 3, 323-373, 1971.
- Haynie, D.T.; Freire, E. Structural energetics of the molten globule state. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 16, 115-140, 1993.
- Hecht, K.; Jaenicke, R. Malate dehydrogenase from the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium marismortui*. *Biochemistry* 28, 4979-4985, 1989.
- Hedstrom, L.; Szilagyi, L.; Rutter, W. J. Converting trypsin to chymotrypsin: The role of surface loops. *Science* 255, 1249-1255, 1992.
- Hedstrom L.; Lin T.Y; Fast W. Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry* 35, 4515-4523, 1996.
- Higaki, J.N.; Light, A. Independent refolding of domains in the pancreatic serine proteinases. *The Journal of Molecular Biology* 261, 10606-10609, 1986.
- Honig, B. Protein folding: from Levinthal paradox to structure prediction. *Journal of Molecular Biology*, 293: 283-293, 1999.
- Hu, Z.; Zhu, X.; Jordan, F.; Inouye, M. A covalently trapped folding intermediate of subtilisin E: spontaneous dimerization of a prosubtilisin E Ser40Cys mutant in vivo and its autoprocesing in vitro. *Biochemistry* 33, 562-569, 1994.
- Huber, R.; Bode, W. Structural basis of the activation and action of trypsin. *Accounts of Chemical Research* 11, 114-122, 1978.

- Inagami, T. Trypsin. In: Funatsu, M.; Hiromi, K.; Imahori, K.; Narita, K. (Ed.). Protein Structure and Function, Tokyo, 1972, p. 1-83.
- Jaenicke, R. Stability and folding of domain proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 71, 155-241, 1999.
- Jackson, S.E.; Fersht, A. R. Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry*, 30, 10428-10435, 1991.
- Jackson, M.; Mantsch, H.H. Halogenated alcohols as solvents for proteins: FTIR spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1118, 139-143, 1992.
- Johnson, Jr. W.C. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 17, 145-166, 1988.
- Johnson, Jr W.C. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 7, 205-214, 1990.
- Jones, M.N.; Finn, A.; Waller, B.J. The activation of *Aspergillus niger* catalase by sodium n-dodecyl-sulphate. *Biochimica et Biophysica Acta* 913, 395-398, 1987.
- Junqueira, R.G.; Silva, E.; Mares-Guia, M. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25, 873-887, 1992.
- Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637, 1983.
- Karplus, M. The Levinthal paradox: yesterday and today. *Folding Design* 2, S69-76, 1997.

- Kelly, S. M.; Price, N.C. The unfolding and refolding of pig heart fumarase. *Biochemical Journal*. 271, 745-749, 1991.
- Kelly, J. W. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Current Opinion in Structural Biology* 6, 11-17, 1996.
- Kim, P.S.; Baldwin, R.L. Intermediates in protein folding reactions of small proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 59: 631-660, 1990
- King, J. Deciphering the rules of protein folding. *Chemical and Engineering News*, 10, 33-54, 1989.
- Kossiakof, A.A.; Chambers, J.L.; Kay, L.M.; Stroud, R.M. Structure of bovine trypsinogen at 1,9 Å resolution. *Biochemistry* 16, 654-664, 1977.
- Kossiakof, A.A. Protein dynamics investigated by the neutron diffraction-hydrogen exchange technique. *Nature* 296, 713-721, 1982.
- Kraut, J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry* 46, 331-358, 1977.
- Kumar, T.K.S.; Jayaraman, G.; Lee, C.-S.; Sivaraman, T.; Lin, W.-L.; Yu, C. Identification of 'molten globule'-like state in an all β -sheet protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207, 536-543, 1995.
- Kuwajima, K.; Yamaya, H.; Sugai, S. The burst-phase intermediate in the refolding of β -lactoglobulin studied by stopped-flow circular dichroism and absorption spectroscopy *Journal of Molecular Biology* 264, 806-822, 1996.
- Lazdunski, M.; Delaage, M. Sur la morphologie des trypsine de porc et de boeuf étude des dénaturations réversibles. *Biochemical and Biophysical Acta* 105, 541-561, 1965.

- Lazdunski, M.; Delaage, M. Étude structurale du trypsinogène et de la trypsine. Les diagrammes d'état. *Biochemical and Biophysical Acta* 140, 417-434, 1967.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- Le Gall, I.M.; Bendayan, M. Possible association of chaperonin 60 with secretory proteins in pancreatic acinar cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44, 743-749, 1996.
- Lesk, A.M.; Chothia, C. The use of sequence homologies to predict protein structure. *EMBO Journal* 5, 823-827, 1986.
- Lesk, A.M.; Fordham, W.D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *Journal of Molecular Biology* 258, 501-537, 1996.
- Levinthal, C. Are there pathways for protein folding? *Journal of Chemical Physics* 65, 44-45, 1968.
- Levitt, M.; Greer, J. Automatic identification of secondary structure in globular proteins. *Journal of Molecular Biology* 114, 181-293, 1977.
- Lumb, K.; Kim, P. Formation of a hydrophobic cluster in denatured bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Journal of Molecular Biology* 236, 412-420, 1994.
- Ma, Y.-Z.; Tsou, C. L. Comparison of the activity and conformational changes of lactate dehydrogenase H4 during denaturation by guanidinium chloride. *Biochemical Journal* 277, 207-211, 1991.

- Manavalan, P.; Johnson, W.C. Jr. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature* 305, 831-832, 1983.
- Manavalan, P.; Johnson, W.C. Jr. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry* 167, 76-85, 1987.
- Mares-Guia, M. Hydrophobic interactions in the trypsin active center. The sensitivity of the hydrophobic binding site to side chain modifications in competitive inhibitors of the amidinium type. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 127, 317-322, 1968.
- Martensson, L.G.; Jonsson, B.H.; Freskgard, P.O; Carlsson, U. Characterization of folding intermediates of human carbonic anhydrase II: probing substructure by chemical labeling of SH groups introduced by site-direct mutagenesis. *Biochemistry* 32, 244-231, 1993.
- Martin, J.; Langer, T.; Boteva, R.; Schramel, A.; Horwich, A.L.; Hartl, F.U. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of GroEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature* 352, 36-43 , 1991.
- Martins, N.F.; Santoro, M. Partially folded intermediates during trypsinogen denaturation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32, 673-682, 1999.
- Muthusamy, R.; Gromiha, M.M., Ponnuswamy, P.K. On the thermal unfolding character of globular proteins. *Journal of Protein Chemistry* 19, 1-8, 2000.
- Nagakawa, S.; Umeyama, H. Role of catalytic residues in the formation of a tetrahedral adduct in the acylation reaction of bovine β -trypsin. A molecular orbital study. *Journal of Molecular Biology* 179, 103-123, 1984.

- Netzer, W.J.; Hartl, F.U. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and independent mechanism. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 68-73, 1998.
- Neurath, H. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224, 350-357, 1984.
- Noland, B. W.; Dangott, L. J.; Baldwin, T. O. Folding, stability, and physical properties of the subunit of bacterial luciferase. *Biochemistry* 38, 16136-16145, 1999.
- Ohgushi, M.; Wada, A. Molten globule state: a compact form of protein with mobile side-chains. *FEBS Letters* 164: 21-24, 1983
- Otlewski J.; Sywula, I.; Kolasinski, M.; Krowarsch, D. Unfolding kinetic of bovine trypsinogen. *European Journal of Biochemistry* 225, 1- 7, 1996.
- Pace C.N.; Shirley B.; Thompson J. 1990. Measuring the conformational stability of a protein. In: Creighton, T.E., ed. *Protein Structure: A Practical Approach*. Oxford, UK:IRL Press. pp 311-330.
- Percorari, F.; Minardi, P.; Desmadril, M.; Yon, J.M. Occurrence of transient multimeric species during the refolding of a monomeric protein. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 5270-5276, 1996.
- Perczel, A.; Hollósi, M.; Tusnády, G.; Fasman, G.D. Convex constraint analysis: A natural deconvolution of circular dichroism curves of protein. *Protein Engineering* 4, 669-679, 1991.
- Perczel, A.; Park, K.; Fasman, G.D. Deconvolution of the circular dichroism spectra of proteins: The circular dichroism spectra of the antiparallel β -sheet in proteins. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 13, 57-69, 1992.

- Prestrelski, S. J.; Byler, M.D.; Liebman, M.N. Comparison of various molecular forms of bovine trypsin: correlation of infrared spectra with X-ray crystal structures. *Biochemistry* 30, 133-143, 1991.
- Privalov, P.L. Stability of proteins – small globular proteins. In: Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., ed. *Advances in Protein Chemistry*, 33, Academic Press, pp 167-241, 1979.
- Privalov, P. L. Stability of proteins – proteins which do not present a single cooperative system. In: Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., ed. *Advances in Protein Chemistry*, 35, Academic Press, pp 1-104, 1982.
- Privalov, P.L.; Gill, S.J. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. In: Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., ed. *Advances in Protein Chemistry*, 191-215, 1988.
- Prusiner, S.B. Prions. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA* 95, 13363-13383, 1998.
- Prusiner, S.B. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278, 245-251, 1997.
- Ptitsyn, O. B. Molten globule and protein folding. *Advances in Protein Chemistry* 83-102, 1995.
- Radford, S.E.; Dobson, C.M. From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding,. *Cell* 97, 291-304, 1999.
- Rajaraman, K.; Raman, B.; Rao, C.M. Molten-globule state of carbonic anhydrase binds to the chaperone-like α -crystallin. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 27595-27598 , 1996.

Ramsay, G.D.; Eftink, M.R. *Methods in Enzymology* 240, 615-645, 1994.

Randall, L.L.; Hardy, S.J. High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding. *Trends in Biochemical Sciences* 20, 65-73, 1995.

Rao, N.M.; Nagaraj, R. Anomalous stimulation of *E. coli* alkaline phosphatase activity by guanidinium chloride. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 5018-5024, 1991.

Redfield, C.; Schulman, B.A.; Milhollen, M.A.; Kim, P.; Dobson, C. α -lactalbumin forms a compact molten globule in the absence of disulfide bonds. *Nature Structural Biology* 6, 948-952, 1999.

Regan, L.; De Grado, W. F. Characterization of a helical protein from the first principles. *Science* 241,976-978, 1988.

Reyes, P.; Huennekens, F.M. Ion-dependent activation of dihydrofolate reductase from L1210 cells. *Biochemistry* 6, 3519-3527, 1967.

Richardson, J.S. The anatomy and taxonomy of protein structure. In: Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M. (Ed). *Advances in Protein Chemistry*, New York: Academic Press, 1981. 34, p.167-339.

Robinson, N.C.; Neurath, H.; Walsh, K.A. The relation of the alpha-amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation. *Biochemistry* 12, 420-426, 1973.

Ropson, I.J.; Frieden, C. Dynamic NMR spectral analysis and protein folding: Identification of a highly populated folding intermediate of rat intestinal fatty acid-binding protein by ^{19}F NMR. *Proceeding National Academic Science USA* 89, 7222-7226, 1992.

Roder, H.; Elove, G.A. ; Shastry, R.C. Early stages of protein folding. In: *Mechanisms of protein folding* Ed. By Pain, R., 2000. Oxford University Press, New York.

- Ruan K.; Lange R.; Bec N.; Balny C. A stable partly denatured state of trypsin induced by high hydrostatic pressure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239, 150-154, 1997.
- Ruvinov, V.; Seckler, R.; Bennett, M.J.; Sackett, D.L. N-(carboxyethyl)ornithine synthase denaturation and refolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 371, 115-123, 1999.
- Rypniewski, W.R.; Perrakis, A.; Vorgias, C.E.; Wilson, K. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. *Protein Engineering* 7, 57-64, 1994.
- Sacchetta, P.; Aceto, A.; Bucciarelli, T.; Dragani, B. Multiphasic denaturation of glutathione transferase B1-1 by guanidinium chloride – Role of the dimeric structure on the flexibility of the active site. *European Journal of Biochemistry* 215, 741-745, 1993.
- Sackett, D.L.; Bhattacharyya, B.; Wolff, J. Local unfolding and the stepwise loss of the functional properties of tubulin. *Biochemistry* 33, 12868-12878, 1994.
- Sakiyama, F.; Kawata, Y. NMR titration studies of histidine 57 and the [methylene-¹³C]PMS group in the phenylmethanesulfonyl (PMS) derivative of *Streptomyces erythraeus* trypsin. *Journal of Biochemistry* 94, 1661-1669, 1983.
- Santoro, M.M.; Bolen, D.W. Unfolding of free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethane sulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063-8068, 1988.
- Schmid, F.X. 1990 Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: Creighton, T.E., ed. *Protein Structure: A Practical Approach*. Oxford, UK: IRL Press. pp 311-330.

- Schroeder D.D.; Shaw E. Chromatography of trypsin and its derivatives. Characterization of a new active form of bovine trypsin. *The Journal of Biological Chemistry* 243, 2943-2949, 1968.
- Schulman, B. A.; Kim, P. S.; Dobson, C. M.; Redfield, C. A residue-specific NMR view of the non-cooperative unfolding of a molten globule. *Nature Structural Biology* 4, 630-634, 1997.
- Seckler, R.; Jaenicke, R. Protein folding and protein refolding. *FASEB Journal* 6, 2545-2552, 1992.
- Segel, D.J.; Eliezer, D.; Uversky, V.; Fink, A.L.; Hodgson, K.O.; Doniac, S. Transient dimer in the refolding kinetics of cytochrome c characterized by small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* 38, 15353-15359, 1999.
- Semisotnov, G.V.; Rodionova, N.A.; Razgulyaev, O.I.; Uversky, V.N.; Gripas, A.F.; Gilmanshin, R.I. Study of the molten globule intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* 31, 119-128, 1991.
- Shindle, U.; Inouye, M. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: characterization of the structural changes in pro-subtilisin E coincident with autoprocesing. *Journal of Molecular Biology* 252, 25-30, 1995.
- Shortle, D. Probing the determinant of protein folding and stability with amino acids substitutions. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 5315-5318, 1989.
- Smith, R.L.; Shaw, E. Pseudotrypsin. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 1630-1637, 1969.

- Smith, L.J.; Fiebig, K.M.; Schwalbe, H.; Dobson, C.M. The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins. *Folding and Design* 1, 95-115, 1996.
- Silow, M.; Tan, Y.J.; Fersht, A.R.; Oliveberg, M. Formation of short-lived protein aggregates directly from the coil in two-state folding. *Biochemistry* 38, 13006-13012, 1999.
- Siphos, T.; Merkel, J.R. Temperature dependence activation of trypsin by calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 31, 522-527, 1968.
- Spolar, R.S.; Livingstone, J.R.; Record, M.T. Jr. Use liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water. *Biochemistry* 31, 3947-3955, 1992.
- Sreerama, N.; Woody, R.W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Analytical Biochemistry* 209, 32-44, 1993.
- Stroud, R.M.; Kay, L.M.; Dickerson, R.E. The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 83, 185-208, 1974.
- Svensson, M., Jonasson, P.; Freskgard, P.O.; Jonsson, B.H.; Lindgren, M.; Carlsson, U. Mapping the folding intermediate of human carbonic anhydrase II. Probing substructure by chemical reactivity of engineered cysteine residues. *Biochemistry* 34, 8606-8620, 1995.
- Szpikowska, B.K.; Beechem, J.M.; Sherman, M.A.; Mas, M.T. Equilibrium unfolding of yeast phosphoglycerate kinase and its mutant lacking one or both native tryptophans: a circular dichroism and steady-state and time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 33, 2217-2225, 1994.

- Tendian, S.W.; Myszka, D.G.; Sweet, R.W.; Chaiken, I.M.; Brouillette, C.G. Interdomain communication of T-cell CD4 studied by absorbance and fluorescence difference spectroscopy measurements of urea-induced unfolding. *Biochemistry* 34, 6464-6474, 1995.
- Thomas, P. J.; Qu, B.; Pedersen, P.L. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends of Biochemical Science* 20, 456-459, 1995.
- Thornton, J. M.; Orengo, C.A.; Todd, A.E.; Pearl, F.M. Protein folds, functions and evolution. *Journal of Molecular Biology* 293, 333-342, 1999.
- Timm, D.E.; Vissavajhala, P.; Ross, A.H.; Neet, K.E. Spectroscopic and chemical studies of the interaction between nerve growth factor (NGF) and the extracellular domain of the low affinity NGF receptor. *Protein Science* 1, 1023-1031, 1992.
- Tishchenko V.M.; Gorodkov B.G. Calorimetric investigation of thermal unfolding of β -trypsin. *Biophysics* 24, 347-349, 1979.
- Tsou, C. Inactivation precedes overall molecular conformational changes during enzyme denaturation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1253, 151-162, 1995.
- Udgaonkar, J. B.; Baldwin, R.L. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA* 87, 8197-8201, 1990.
- Villanueva, G. B.; Herskovits, T.T. Exposure of the tyrosyl tryptophyl residues in trypsin and trypsinogen. *Biochemistry* 10, 3358-3365, 1971.
- Wallace, L.A.; Sluis-Cremer, N.; Dirr, H.W. Equilibrium and kinetic unfolding properties of dimeric human glutathione transferase A1-1. *Biochemistry* 37, 5320-5328, 1998.

- Wang E. C. W.; Hung S. H.; Cahoon M.; Hedstrom L. The role of the Cys191-Cys220 disulfide bond in trypsin: New targets for engineering substrate specificity. *Protein Engineering* 10, 405-411, 1997.
- Wilson, G.; Hecht, L.; Barron, L. D. Residual structure in unfolded proteins revealed by Raman Optical Activity. *Biochemistry* 35, 12518-12525, 1996.
- Wolynes, P.G.; Onuchic, J.N.; Thirumalai, D. Navigating the folding routes. *Science* 267, 1619-1620, 1995.
- Yamasaki, K.; Taniguchi, Y.; Takeda, N.; Nakano, K.; Yamasaki, T.; Kanaya, S.; Oobatake, M. Pressure-denatured state of Escherichia coli ribonuclease HI as monitored by Fourier Transform Infrared and NMR spectroscopy. *Biochemistry* 31, 18001-18009, 1998.
- Yamane, T.; Kobuke, M.; Tsutsui, H.; Toida, T.; Suzuki, A.; Ashida, T.; Kawata, Y.; Sakiyama, F. Crystal structure of Streptomyces erytraeus trypsin at 2,7 Å resolution. *Journal of Biochemistry* 110, 1991.
- Yon, J.M.; Desmadril, M.; Betton, J.M.; Minard, P.; Ballery, N.; Missiakas, D. Flexibility and folding of phosphoglycerate kinase. *Biochimie* 72, 417-429, 1990.
- Yon, J. M. Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 419-434, 2001.
- Yon, J.M. Protein folding: concepts and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 53, 557-567, 1997.
- Zajicek, J. L.; Carter, R. M.; Gliron, C. A. A spectroscopic analysis of the thermally induced folding-unfolding transition of β -trypsin. *Biophysical Journal* 35, 23-30, 1981.

Zhou, H.; Zhang, X.; Yong, Y.; Tsou, C. Conformational changes at the active site of creatine kinase at low concentrations of guanidinium chloride. *Biochemical Journal* 291, 103-107, 1993.