



Cátia Sofia Narciso da Silva

Licenciada em Química Aplicada

**Estudo da interação proteína-ligando em
proteases de serina para desenvolvimento de
inibidores da Uroquinase**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutora Teresa Sacadura Santos Silva
Investigadora Auxiliar FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Arguente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro
Vogais: Doutora Teresa Sacadura Santos Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2015



Cátia Sofia Narciso da Silva

Licenciada em Química Aplicada

**Estudo da interação proteína-ligando em
proteases de serina para desenvolvimento de
inibidores da Uroquinase**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutora Teresa Sacadura Santos Silva
Investigadora Auxiliar FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Arguente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro
Vogais: Doutora Teresa Sacadura Santos Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2015

“Estudo da interação proteína-ligando em proteases de serina para desenvolvimento de inibidores da Uroquinase”

Copyright Cátia Sofia Narciso da Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles que tornaram a realização deste projeto possível.

Agradeço primeiramente à professora Maria João Romão pela oportunidade de poder realizar a minha tese de mestrado no grupo de Cristalografia (XTAL) e também a todos os membros do grupo XTAL pelas condições de acolhimento proporcionadas, por toda a boa disposição e pela disponibilidade para partilhar dúvidas, problemas e tantas outras coisas.

Um agradecimento especial à minha orientadora Teresa Santos Silva, por me ter aceite como sua aluna para a realização desta tese, sempre com a sua simpatia e boa disposição. Agradeço ainda pela disponibilidade que sempre teve em me ajudar no que fosse necessário.

Sem dúvida que devo um profundo agradecimento ao Hugo, pela confiança depositada em mim, por toda a aprendizagem que me transmitiu ao longo de todo este ano, por toda a paciência que teve comigo para ouvir todas as minhas dúvidas (que por vezes chegavam a ser ridículas!) e os meus desesperos, por todo o apoio que me deu sempre que precisei, nunca me negando nada, mesmo quando chegava a pedir ajuda inúmeras vezes e ainda pela disponibilidade que sempre teve para comigo, não só no laboratório mas também por e-mail. Um sincero obrigado!

À Rita Oliveira e à Elisabeth Pires, as minhas companheiras de tese, pela amizade que foi crescendo dia após dia, pelo excelente trabalho de equipa, por todas as palavras reconfortantes que sempre me transmitiram, nunca me deixando ir abaixo, por todos os momentos divertidos que passámos juntas e por todos os menos bons em que não conseguíamos obter os tais esperados resultados. Com vocês tudo foi mais fácil, obrigada.

Por último, um enorme obrigado ao meu namorado, Gonçalo Lopes, pelo apoio que sempre me deu durante todo este ano de realização da tese, em que sempre acreditou em mim e sempre me mostrou que eu seria capaz. E ainda um especial agradecimento aos meus pais, por me terem tornado na pessoa que sou hoje, por todos os ensinamentos, por todo o amor e carinho e por me terem permitido chegar até onde cheguei.

Obrigada a todos!

Resumo

As proteases de serina constituem cerca de um terço das proteases e podem ser encontradas em vírus, bactérias e eucariotas. Possuem uma tríade catalítica no centro ativo para a sua atividade, composta pelos resíduos altamente conservados, Ser-195, His-57 e Asp-102. Receberam esta denominação por terem um mecanismo catalítico comum, caracterizado pela existência de um resíduo de serina no centro ativo, essencial para a atividade enzimática.

Em humanos, são responsáveis por funções essenciais, tais como a digestão, coagulação do sangue, a fibrinólise, o desenvolvimento, a fertilização, a apoptose e imunidade.

Uma família de inibidores que tem sido extensivamente estudada para estas proteases, mais especificamente para a uroquinase, consiste em derivados do ácido borónico. Estes podem ser inibidores muito potentes, dependendo da sua estrutura e normalmente ligam-se covalentemente à serina catalítica através do átomo de boro.

Este trabalho estudou a interação de duas enzimas desta família - tripsina bovina e trombina humana com esta família de inibidores. Um dos objetivos foi também sobre-expressar a uroquinase de forma heteróloga em *Pichia pastoris*, uma enzima da mesma família. Para a avaliação destas interações recorreu-se às técnicas de cristalografia de raios-X, eletroforese em gel de poliacrilamida e cinética enzimática.

De acordo com os dados obtidos nos ensaios cinéticos em que se utilizou o substrato BApNA, concluiu-se que a maior parte destes inibidores inibem a tripsina, sendo que aquele que inibe mais fortemente é o composto AB1 e o que inibe menos ou nada é o composto SR8.

Pela cristalografia de raios-X apenas foi possível obter dados de difração da tripsina com o composto AB11 e verificou-se que este interatua com o centro ativo da enzima, tendo sido assim possível determinar a estrutura do complexo enzima-inibidor. Os restantes compostos não se ligaram à proteína, mas em dois deles, no JS67 e no SR5 foi possível visualizar alguma densidade eletrónica de difícil interpretação no centro ativo.

No que diz respeito à trombina, não foi possível obter resultados tanto por cristalografia de raios-X como por ensaios cinéticos, dado que não se obtiveram cristais da proteína e não se visualizou interação com o composto JS62.

Por último, iniciaram-se os testes de sobre-expressão da uroquinase em *Pichia Pastoris*, não se tendo obtido resultados fiáveis.

Termos chave: Cinética enzimática; Cristalografia de Raios-X; Tripsina; Trombina; Uroquinase; *Pichia pastoris*; Inibidores de proteases

Abstract

Serine proteases constitute about one third of proteases and can be found in virus, bacteria and eukaryotes. They possess a catalytic triad at the active site for activity, composed of the highly conserved residues, Ser-195, His-57 and Asp-102. They received this denomination because they have a common catalytic mechanism characterized by the existence of a serine residue at the active site, essential for enzymatic activity.

In humans, they are responsible for essential functions, such as digestion, blood coagulation, fibrinolysis, development, fertilization, apoptosis and immunity.

A family of inhibitors that has been extensively studied for these proteases, specifically for urokinase, consists of boronic acid derivatives. These can be very potent inhibitors, depending on their structure usually by binding covalently to the catalytic serine through the boron atom.

This work studied the interaction of two enzymes of this family - bovine trypsin and human thrombin with this family of inhibitors. One goal was also overexpress urokinase heterologously in *Pichia pastoris*, an enzyme of the same family. For this study we used X-ray crystallography, polyacrylamide gel electrophoresis and enzyme kinetics.

According to the data obtained in the kinetic assays which used BApNA as a substrate, it was concluded that the majority of these inhibitors inhibit trypsin, being one that inhibits most strongly is the AB1 compound and which inhibits little or nothing is the compound SR8.

By X-ray crystallography it was found that only compound AB11 interacted with the active site of trypsin, has thus been possible to determine its structure. The remaining compounds did not bind to the protein, but in two of them, the JS67 and SR5 was possible to visualize some electronic density difficult to interpret in the active site.

Relative to thrombin, it has not been possible to obtain results by x-ray crystallography and by kinetic assays, since there are not obtained crystals of the protein and do not interact with the compound JS62.

Finally, optimized to overexpression of urokinase in *Pichia pastoris*, has not taken large conclusions.

Keywords: Enzymatic kinetics; X-ray crystallography; Trypsin; Thrombin; Urokinase; *Pichia pastoris*; Protease inhibitors

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo	V
<i>Abstract</i>	VII
Índice	IX
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XV
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	XVII
1. Introdução	1
1.1. Proteases de Serina	3
1.1.1. Mecanismo da reação	4
1.1.2. Inibidores de proteases	5
1.1.3. Tripsina	6
1.1.3.1. Descrição da estrutura	9
1.1.3.2. Inibidores da Tripsina	11
1.1.4. Trombina.....	12
1.1.4.1. “Cascata” de coagulação	12
1.1.4.2. Regulação da coagulação.....	13
1.1.4.3. Descrição da estrutura	15
1.1.4.4. Inibidores da trombina.....	18
1.1.5. Uroquinase	20
1.1.5.1. Sistema Fibrinolítico	20
1.1.5.2. Inibição do sistema fibrinolítico	21
1.1.5.3. Descrição da estrutura	22
1.2. Métodos de Caracterização.....	24
1.2.1. Cinética Enzimática	24
1.2.1.1. Equação de Michaelis-Menten.....	25
1.2.1.2. Inibição Enzimática	26
1.2.2. Cristalografia de Raios-X.....	27
1.2.2.1. Cristalização de proteínas.....	28
1.2.2.2. Experiência de difração de raios-X	31
1.2.2.3. Resolução da estrutura	33
1.2.2.4. Refinamento e validação da estrutura	34
2. Objetivos	35
3. Materiais e Métodos	39
3.1. Tripsina	41
3.1.1. Otimização de ensaios cinéticos	41
3.1.1.1. Ensaios cinéticos com o substrato BAEE (N-Benzoil-L-Arginina Etil Ester).....	41
3.1.1.2. Ensaios cinéticos com o substrato BApNA (N-benzoil-DL-arginina- <i>p</i> -nitroanilida) ..	42
3.1.1.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten	44
3.1.2. Ensaios de cristalização	44

3.1.3.	Recolha de dados e resolução da estrutura.....	46
3.1.4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	47
3.2.	Trombina.....	48
3.2.1.	Ensaio cinético	48
3.2.2.	Ensaio de cristalização	48
3.3.	Uroquinase	49
3.3.1.	<i>Pichia pastoris</i>	49
3.3.1.1.	Preparação de células competentes de <i>Pichia pastoris</i>	49
3.3.1.2.	Transformação de células competentes em <i>Pichia pastoris</i>	50
3.3.1.3.	Determinação do fenótipo dos transformantes positivos	51
3.3.1.4.	Avaliação da expressão em <i>Pichia pastoris</i>	51
3.3.1.5.	Análise dos tempos de indução da expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	52
3.3.1.6.	Sobre-expressão em <i>Pichia pastoris</i>	52
4.	Resultados e Discussão.....	53
4.1.	Tripsina.....	55
4.1.1.	Ensaio cinético	55
4.1.2.	Ensaio de cristalização	63
4.1.3.	Experiência de difração	65
4.1.4.	Resolução das estruturas.....	66
4.1.5.	Refinamento das estruturas	67
4.1.6.	Caracterização das estruturas.....	69
4.1.6.1.	Tripsina em complexo com AB11	69
4.1.6.2.	Tripsina em complexo com JS67	72
4.1.6.3.	Tripsina em complexo com SR5	72
4.1.7.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	72
4.2.	Trombina.....	75
4.2.1.	Ensaio cinético	75
4.3.	Uroquinase	76
4.3.1.	Preparação de células competentes de <i>Pichia pastoris</i>	77
4.3.2.	Transformação de células competentes em <i>Pichia pastoris</i>	77
4.3.3.	Avaliação da expressão em <i>Pichia pastoris</i>	78
5.	Conclusões e Perspetivas Futuras	83
6.	Bibliografia.....	87
7.	Anexos	95
7.1.	Sequência peptídica da tripsina de <i>Bos Taurus</i>	97
7.2.	Sequência peptídica da Trombina.....	97
7.3.	Sequência peptídica do domínio catalítico da uroquinase.....	97
7.4.	Vetor pPNIC706 com o gene da uroquinase (9791 bp)	98
7.5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)	98
7.6.	Meios de cultura utilizados nos processos de expressão da uroquinase	99

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação esquemática da reação geral das proteases: hidrólise catalítica de uma ligação peptídica.....	3
Figura 1.2 – Representação das diferentes classes de proteases.	3
Figura 1.3 - Estrutura tridimensional do centro ativo da tripsina, mostrando a tríade catalítica (Serina 195, Histidina 57 e Aspartato 102).	4
Figura 1.4 - Representação esquemática do mecanismo de reação de uma protease de serina.....	5
Figura 1.5 – Esquema do mecanismo de ligação de ácidos borônicos com o sítio catalítico de proteases de serina.	6
Figura 1.6 – Representação da clivagem na ligação peptídica dos resíduos de arginina e lisina pela tripsina.	7
Figura 1.7 – Esquema da produção de tripsina.....	8
Figura 1.8 – Conversão de tripsinogénio nas isoformas de tripsina.	8
Figura 1.9 - Representação da estrutura tridimensional da tripsina de <i>Bos taurus</i> (Código PDB: 1S0Q).	9
Figura 1.10 – Representação do centro ativo da tripsina e do <i>oxyanion hole</i>	10
Figura 1.11 – Representação esquemática do domínio de reconhecimento do substrato para as enzimas quimiotripsina (à esquerda), tripsina (no meio), e elastase (à direita).	11
Figura 1.12 – Representação da tripsina complexada ao inibidor aprotinina.	11
Figura 1.13 – Cascata de coagulação (via extrínseca, via intrínseca e via comum).	12
Figura 1.14 – Esquema representativo do mecanismo anticoagulante da proteína C ativada.....	13
Figura 1.15 – Representação esquemática da regulação da fibrinólise.	14
Figura 1.16 – Conversão do fibrinogénio em fibrina pela ação da trombina.....	15
Figura 1.17 – Representação da estrutura tridimensional da trombina (Código PDB: 3JZ1).	16
Figura 1.18 – Representação esquemática da superfície acessível ao solvente da molécula de trombina com a localização dos seus sítios e detalhe estrutural de um sítio de Na ⁺ típico.....	17
Figura 1.19 – Representação dos mapas de densidade eletrónica preenchidos na região de mudança estrutural mais significativa em torno da região de interação do Na ⁺	18
Figura 1.20 – Complexo ternário formado por antitrombina-heparina-trombina.....	19
Figura 1.21 – Representação da ligação da hirudina à trombina.	20
Figura 1.22 – Esquema do sistema fibrinolítico com conversão do plasminogénio em plasmina.	21
Figura 1.23 – Representação da estrutura tridimensional do domínio catalítico da uroquinase (Código PDB: 4FU9).	22
Figura 1.24 – Representação do centro ativo da uroquinase.	23
Figura 1.25 – Esquema de uma reação enzimática, com formação do complexo enzima-substrato e posterior formação da enzima livre e produto da reação.	24

Figura 1.26 – Representação gráfica de uma curva típica da cinética Michaelis-Menten, da qual podem ser determinados parâmetros Km e Vmax.....	25
Figura 1.27 – Representação de uma inibição competitiva.....	26
Figura 1.28 – Representação de uma inibição não-competitiva.....	27
Figura 1.29 – Representação de uma inibição incompetitiva.....	27
Figura 1.30 – Representação dos principais passos utilizados para a obtenção da estrutura tridimensional de uma proteína por cristalografia de raios-X.....	28
Figura 1.31 – Representação esquemática de uma célula unitária e respectivas constantes.....	29
Figura 1.32 – Representação esquemática da unidade assimétrica, da célula unitária e da rede cristalina.....	29
Figura 1.33 – Diagrama de fases da cristalização.....	29
Figura 1.34 – Representação dos dois métodos de difusão de vapor: gota suspensa (à esquerda) e gota assente (à direita).....	30
Figura 1.35 – Representação da recolha de dados de uma experiência de difração de raios-X.....	31
Figura 1.36 – Representação dos tipos de interferência que ocorrem, pela Lei de Bragg. Interferência construtiva (em cima) e interferência destrutiva (em baixo).....	32
Figura 3.1 – Esquema da reação da tripsina com o substrato BAEE.....	41
Figura 3.2 – Representação das estruturas dos compostos AB1, AB11, JS61, JS62, JS66, JS67, JS68, SR5, SR8 e SR9.....	44
Figura 4.1 – Esquema da reação da tripsina com o substrato BApNA.....	55
Figura 4.2 – Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do BApNA catalisado pela tripsina com uma concentração de 0,0005 mM e com diferentes concentrações de benzamidina.....	56
Figura 4.3 – Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição da tripsina com uma concentração de 0,0005 mM pela benzamidina na presença do substrato BApNA.....	57
Figura 4.4 – Gráficos de Michaelis-Menten para a hidrólise do BApNA catalisado pela tripsina com uma concentração de 0,0005 mM para os diferentes inibidores utilizados.....	59
Figura 4.5 – Gráficos de Lineweaver-Burk da inibição da tripsina com uma concentração de 0,0005 mM pelos diferentes inibidores utilizados, na presença do substrato BApNA.....	61
Figura 4.6 – Representação dos diferentes inibidores, tendo em conta a ordem do mais forte para o mais fraco.....	62
Figura 4.7 – Cristais de tripsina na presença dos compostos SR5 (A), JS67 (B) e AB11 (C), recorrendo ao método de <i>soaking</i>	63
Figura 4.8 – Cristais de tripsina incubados com os compostos JS66 (A), SR8 (B) e JS68 (C), no método de co-cristalização.....	64
Figura 4.9 – Estrutura cristalográfica do centro ativo do conjunto de dados da tripsina com o composto AB11 com um fator de ocupação de 0,65.....	70
Figura 4.10 – Estrutura cristalográfica do centro ativo do conjunto de dados da tripsina com o composto AB11 com um fator de ocupação de 0,35.....	70
Figura 4.11 – Gráfico de <i>Ramachandran</i> da estrutura refinada da tripsina com o composto AB11....	71

Figura 4.12 – Gel de SDS-PAGE 10% correspondente à digestão da tripsina com a BSA e o inibidor benzamidina, a diferentes tempos de incubação e temperaturas.	73
Figura 4.13 – Géis de SDS-PAGE 10% correspondente à digestão da tripsina com a BSA e os inibidores benzamidina, JS62, AB1 e AB11 a diferentes tempos de incubação.	73
Figura 4.14 – Gel de SDS-PAGE 10% correspondente à digestão da lisozima com a tripsina a diferentes concentrações de 0,5, 1 e 2 mg/mL e com diferentes volumes de 1 e 2 μ L.....	74
Figura 4.15 – Gel de SDS-PAGE 10% correspondente à digestão da hemoglobina com a tripsina a diferentes concentrações de 0,5, 1 mg/mL com diferentes tempos de incubação, 1 e 2 horas.....	74
Figura 4.16 – Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do BApNA catalisado pela trombina com uma concentração de 0,0015 mM e com diferentes concentrações de JS62.	76
Figura 4.17 – Crescimento de <i>Pichia pastoris</i> efetuado durante 16 horas a 30°C.	77
Figura 4.18 – Gel de agarose 0,8% correspondente à reação de linearização do vetor pPNIC706_uPA com a enzima de restrição Sall.	78
Figura 4.19 – Colónias obtidas após transformação de células competentes de <i>Pichia Pastoris</i> numa placa com meio YPDS e zeocina 100 μ g/mL.....	78
Figura 4.20 – Pré-inóculos realizados para cada uma das colónias transformantes.	79
Figura 4.21 – Géis de SDS-PAGE 10% correspondentes aos testes de expressão da uroquinase até um total de 42 horas de indução.	80
Figura 7.1 – Marcador de pesos moleculares da NZYTech.....	99

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Representação dos tampões utilizados no processo de otimização para o substrato BApNA e para a tripsina.....	42
Tabela 3.2 – Condições de cristalização testadas para a tripsina.....	45
Tabela 3.3 – Condições de cristalização testadas para a trombina.....	49
Tabela 4.1 – Representação das concentrações de BApNA, inibidores e tripsina utilizadas nos ensaios cinéticos.....	55
Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos obtidos da hidrólise do substrato BApNA pela tripsina na presença de benzamidina e comparação com os valores teóricos.....	57
Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos da hidrólise do substrato BApNA pela tripsina para os diferentes inibidores testados.....	61
Tabela 4.4 – Resumo das condições testadas e dos resultados obtidos da difração para a tripsina com os compostos AB11, JS67 e SR5, pelo método de <i>soaking</i>	64
Tabela 4.5 – Resumo das condições testadas e dos resultados obtidos da difração para a tripsina com os compostos JS66, JS68 e SR8, pelo método de co-cristalização.....	65
Tabela 4.6 – Estatísticas de recolha de dados para os vários cristais de tripsina.....	65
Tabela 4.7 – Valores de Z-score e LLG para as funções de rotação e translação obtidos utilizando o programa PHASER, para todos os conjuntos de dados de tripsina.....	67
Tabela 4.8 – Estatísticas de refinamento para os diferentes modelos da tripsina com os inibidores AB11, JS66, JS67, JS68, SR5 e SR8.....	68
Tabela 4.9 – RMSD de sobreposição estrutural das estruturas Trip_AB1, Trip_JS67 e Trip_SR5 com a estrutura nativa 1S0Q, relativamente a todos os átomos da cadeia principal da proteína.....	69
Tabela 4.10 – Estatísticas do refinamento final da tripsina com o composto AB11.....	71
Tabela 4.11 – Representação das concentrações de BApNA, inibidores e trombina utilizadas nos ensaios cinéticos.....	75
Tabela 4.12 – Representação dos diferentes tempos de indução e respetivas horas.....	79
Tabela 7.1 – Volumes das soluções utilizadas na realização dos géis de poliacrilamida.....	98
Tabela 7.2 – Meios de cultura utilizados no processo de preparação de células competentes e no processo de transformação.....	99
Tabela 7.3 – Soluções <i>stock</i> para a preparação dos meios utilizados.....	99
Tabela 7.4 – Soluções utilizadas nos processos de preparação de células competentes e transformação.....	100
Tabela 7.5 – Meios de cultura utilizados no processo de expressão da uroquinase.....	100

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

α 2-AP – α 2-antiplasmina

BAEE – N-Benzoil-L-Arginina Etil Éster (do inglês *N α -Benzoyl-L-arginine ethyl ester*)

BAPNA – N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (do inglês *N α -Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide*)

BMGY – *Buffered Complex Glycerol Medium*

BMMY – *Buffered Complex Methanol Medium*

BPTI – *Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor*

BSA – Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine serum albumin*)

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CCP4 – *Collaborative Computational Project Number 4*

COOT – *Crystallographic Object-Oriented Toolkit*

Da – Daltons

D.O. – Densidade ótica

DMSO – Dimetilsulfóxido

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EPCR – Recetor endotelial da proteína C (do inglês *Endothelial PC Receptor*)

ESRF – *European Synchrotron Radiation Facility*

FT – Fator tecidual

Hb – Hemoglobina (do inglês *Hemoglobin*)

HEPES – Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-etanossulfónico

HNF – Heparina não fracionada

IDTs – Inibidores diretos da trombina

K_i – Constante de inibição

K_m – Constante de Michaelis-Menten

LLG – *Log Likelihood Gain*

MAD – Dispersão Anómala Múltipla (do inglês *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*)

MD – Meio Mínimo Dextrose

MIR – Substituição Isomórfica Múltipla (do inglês *Multiple Isomorphous Replacement*)

MM – Meio Mínimo Metanol

MR – Substituição Molecular (do inglês *Molecular Replacement*)

PAI-1 – Inibidor do ativador de Plasminogénio 1

PAI-2 – Inibidor do Ativador do Plasminogénio 2

PAR-1 – *Proteinase-activated receptor 1*

PC – Proteína C

PDB – Protein Data Bank

PDF – Produto de degradação da fibrina

PEG – Polietilenoglicol

PEG-MME – Polietilenoglicol metil éster

PL – Fosfolípidos

PS – Proteína S

RMSD – Raiz Quadrada da Variância ou Desvio Padrão (do inglês *Root Mean Square Deviation*)

SAD – Dispersão Anómala Simples (do inglês *Single Wavelength Anomalous Dispersion*)

scu-PA – Uroquinase de cadeia simples

SDS-PAGE – Electroforese em Gel de Poliacrilamida e Dodecil-Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SIR – Substituição Isomórfica Simples (do inglês *single isomorphous replacement*)

SLS – Swiss Light Source

tcu-PA – Uroquinase de cadeia dupla

TM – Trombomodulina

tPA – Ativador de plasminogénio do tipo tecidual (do inglês *Tissue Plasminogen Activator*)

Trip_AB11 – Tripsina com o composto AB11

Trip_JS66 – Tripsina com o composto JS66

Trip_JS67 – Tripsina com o composto JS67

Trip_JS68 – Tripsina com o composto JS68

Trip_SR5 – Tripsina com o composto SR5

Trip_SR8 – Tripsina com o composto SR8

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

uPA – Ativador do plasminogénio do tipo uroquinase (do inglês *urokinase-type Plasminogen Activator*)

uPAR – Recetor do ativador de plasminogénio do tipo uroquinase (do inglês *urokinase-type Plasminogen Activator*)

V_{máx} – Velocidade máxima

YNB – *Yeast Nitrogen Base with ammonium sulfate and without amino acids*

YPD – *Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*

YPDS – *Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Medium*

1. Introdução

1.1. Proteases de Serina

Uma protease ou peptidase é uma enzima que catalisa a hidrólise (quebra de ligação covalente com participação de uma molécula de água) de ligações peptídicas de outras proteínas e fragmentos de proteínas levando à formação de grupos amina e carboxilo, originando pequenos péptidos e/ou aminoácidos livres.

As proteases encontram-se em todos os seres vivos e representam aproximadamente 2% do número total de proteínas presentes em todos os tipos de organismos. Há cerca de 500 genes humanos que codificam as peptidases e os seus homólogos. Muitas destas enzimas são de importância médica e são potenciais alvos de fármacos.^{1,3-4}

Na Figura 1.1 encontra-se esquematizada a reação global da hidrólise de uma ligação peptídica por adição de uma molécula de água.

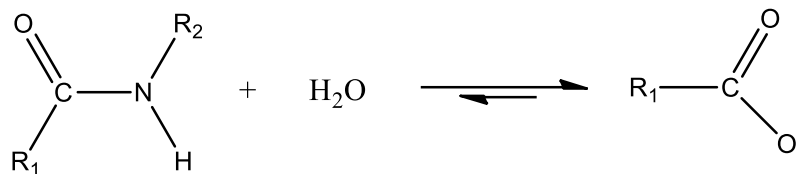


Figura 1.1 - Representação esquemática da reação geral das proteases: hidrólise catalítica de uma ligação peptídica.

As proteases compreendem dois grupos de enzimas: as endopeptidases (ou proteinases), que quebram ligações peptídicas no interior da cadeia proteica e as exopeptidases cuja ação está dirigida aos aminoácidos terminais da cadeia polipeptídica.

Relativamente à natureza química do sítio catalítico, as proteases podem ser classificadas principalmente como: serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartil-proteases e metalo-proteases, sendo que as primeiras a serem estudadas extensivamente foram as proteases de serina.^{2,5}

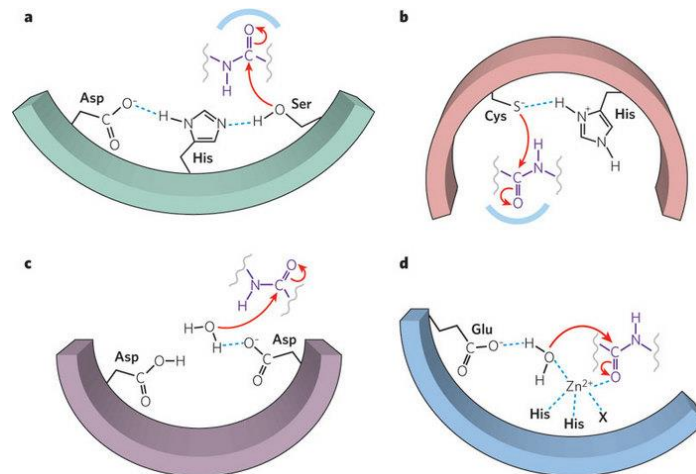


Figura 1.2 – Representação das diferentes classes de proteases. **a:** serino-proteases; **b:** cisteíno-proteases; **c:** aspartil-proteases; **d:** metalo-proteases. Adaptado de Erez, E., Fass, D., & Bibi, (2009).⁶

As proteases de serina são uma família diversificada de enzimas, que utilizam mecanismo enzimático semelhante. Têm um papel central na descoberta e no estudo de enzimas, dado que são particularmente fáceis de caracterizar.

Constituem cerca de um terço das proteases e podem ser encontradas em eucariotas, procariontes, bactérias e vírus. Desempenham um papel importante na regulação de muitos processos biologicamente relevantes tais como digestão, homeostasia, apoptose, fibrinólise, transdução de sinal, reprodução e sistema imunitário e estão também associadas a muitas doenças, incluindo cancro, artrite e enfisema. Receberam esta denominação por terem um mecanismo catalítico comum, caracterizado pela existência de um resíduo de serina no sítio ativo, essencial para a atividade enzimática. ⁷⁻⁸

Esta classe de enzimas é um importante alvo na química medicinal contemporânea uma vez que, muitas doenças estão relacionadas com uma má regulação do seu funcionamento. Deste modo, compostos que interagem especificamente com estas proteases podem ser úteis no tratamento de várias doenças.

As proteases de serina podem ser classificadas em cinco famílias distintas: a da quimiotripsina, da subtilisina, da serino carboxipeptidase II, do citomegalovírus humano e do componente proteolítico ClpP da protease ATP-dependente, sendo que as proteases da família da quimiotripsina (família S01) são as mais numerosas e possivelmente as mais estudadas. ⁵

A característica mais comum destas enzimas é a tríade catalítica constituída pelos resíduos Asp102, His57, Ser195 presentes no seu centro ativo (segundo a numeração da quimiotripsina e da tripsina). Entre os três resíduos, a serina atua como agente nucleófilo, tendo um papel muito importante na atividade catalítica, a histidina atua como base e o aspartato como nucleófilo. ^{1-2,9-12}

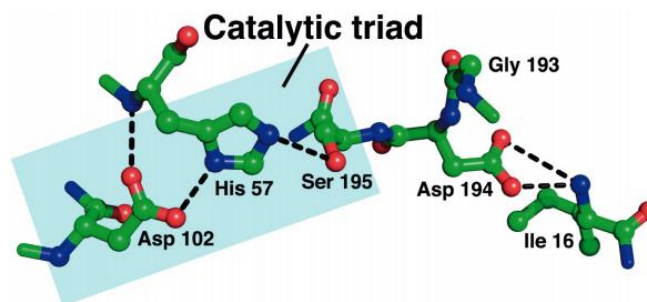


Figura 1.3 - Estrutura tridimensional do centro ativo da tripsina, mostrando a tríade catalítica (Serina 195, Histidina 57 e Aspartato 102). A tracejado estão representadas as ligações de hidrogénio entre as cadeias laterais deste resíduos.

1.1.1. Mecanismo da reação

A determinação da estrutura tridimensional da quimiotripsina, a primeira estrutura relatada por uma peptidase, permitiu uma perceção mais profunda sobre o modo de ação de proteases de serina.

Segundo o mecanismo reacional proposto, primeiramente ocorre o ataque nucleofílico da Ser195 do sítio ativo sobre o átomo de carbono do carbonilo do substrato, formando um intermediário tetraédrico, estabilizado pelos grupos amina dos resíduos que formam o *oxyanion hole*.

Seguidamente dá-se a decomposição do intermediário tetraédrico ao intermediário acil-enzima, pela catálise ácida da His57 do sítio ativo polarizada pelo Asp102, seguida da perda do produto amina e a sua substituição por uma molécula de água.

A His57 atua novamente como uma base tornando uma molécula de água num nucleófilo que ataca o carbono do carbonilo que está ligado à Ser195, enquanto um protão é removido pelo radical da His57, que atua como catalisador ácido, formando um novo intermediário tetraédrico. Esta estrutura quebra-se novamente, a His57 doa um protão à Ser195 ocorrendo a expulsão do ácido carboxílico.^{7,9}

12

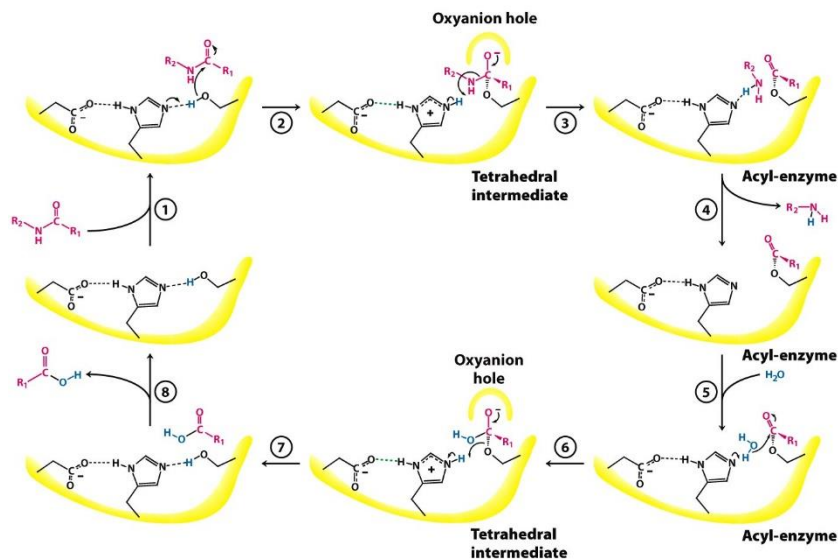


Figura 1.4 - Representação esquemática do mecanismo de reação de uma protease de serina. Adaptado de <http://oregonstate.edu/instruct/bb450/fall14/lecture/catalyticstrategiesoutline>.

1.1.2. Inibidores de proteases

As proteases desempenham muitas funções importantes no organismo. Contudo, algumas dessas funções podem ser prejudiciais sendo assim a sua atividade controlada. Ter o sangue coagulado da cabeça aos pés devido a um simples corte ou digerir o próprio pâncreas podem ser exemplos de uma proteólise não controlada.

O estudo da inibição enzimática por iões ou por moléculas específicas é importante para o esclarecimento do mecanismo de ação de enzimas e estes conhecimentos são utilizados para produzir inibidores seletivos e específicos, possibilitando a síntese de novos fármacos.¹³

Os inibidores de proteases mais comuns são proteínas que ocorrem naturalmente nos organismos vivos e são capazes de inibir e assim controlar a atividade dessas proteases. Os inibidores são primeiramente classificados de acordo com a classe mecanística das enzimas que eles inibem.

O modo de ação destes inibidores consiste em formar complexos com as enzimas proteolíticas, de maneira que se tornem inativas. A inibição de uma enzima proteolítica é competitiva e ocorre pela

ligação do sítio ativo da enzima à região reativa do inibidor (sítio reativo), exposto e mantido numa conformação similar àquela do substrato das enzimas alvo.^{7,14}

Existem pelo menos 18 diferentes famílias de inibidores proteases de serina reconhecidas até agora, mas somente 12 famílias possuem complexos cristalizados.

Uma classe de proteínas muito estudada que atuam como inibidores são as serpinas. Estes inibidores interagem com as proteases através do seu centro ativo e o complexo formado colapsa com a libertação de uma forma clivada de diferente estrutura e estabilidade.

As serpinas exibem atividade inibitória numa grande variedade de proteases de serina e são constituídas por dois domínios, um alfa e outro beta. Com a determinação da sua estrutura 3D verificou-se que estes inibidores possuem dois sítios de interação, sendo um deles responsável pelo reconhecimento da protease.^{15,16}

Uma outra família de inibidores de proteases de serina muito estudada são os chamados ácidos borónicos. Existem estudos que demonstraram uma forte inibição da quimiotripsina por derivados de ácidos borónicos contendo uma cadeia lateral aromática que é presumivelmente introduzida na cavidade de especificidade adjacente ao sítio catalítico da enzima, ligando-se à serina catalítica pelo átomo de boro, onde ocorrem ligações de hidrogénio entre um dos átomos de azoto da His57 e o protão de um dos grupos hidroxilo do inibidor.¹⁷⁻²¹

Em 1981, Matteson et al. demonstraram ainda mais o potencial de ácidos borónicos como inibidores de proteases de serina pela preparação do derivado de ácido borónico de N-acetil-fenilalanina.

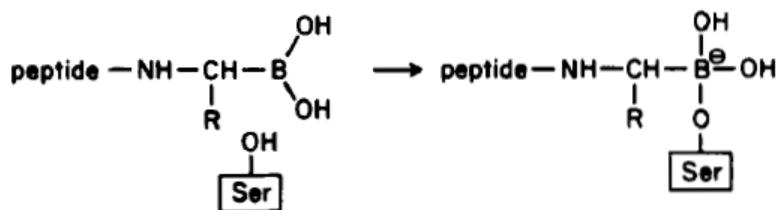


Figura 1.5 – Esquema do mecanismo de ligação de ácidos borónicos com o sítio catalítico de proteases de serina. Adaptado de Kettner, C.A., Shenvi (1984).¹⁷

A benzamidina é uma molécula modelo para os estudos de interações com proteases de serina, dado que apresenta algumas características estruturais similares aos aminoácidos arginina e lisina. Normalmente são utilizados derivados da benzamidina em estudos de afinidade de associações enzima-ligando e principalmente eficiência catalítica.²²⁻²⁴

1.1.3. Tripsina

A tripsina é uma protease de serina e é das mais bem estudadas e caracterizadas, sendo por isso uma das enzimas melhor compreendidas em termos estruturais, tendo em conta a sua especificidade e o seu mecanismo catalítico. Assim sendo, a tripsina é uma enzima muito utilizada

como modelo experimental para estudos de caracterização de outras proteases de serina.^{3,25} A sequência da tripsina encontra-se em anexo (Anexo 7.1).

A tripsina encontra-se presente no intestino delgado onde atua na degradação de proteínas clivando de forma específica a ligação peptídica entre aminoácidos de arginina e de lisina na extremidade carboxílica, exceto quando seguidos por uma prolina, os quais têm na sua constituição uma cadeia lateral longa e carregada positivamente. Para além deste substrato natural, a tripsina catalisa também a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo os aminoácidos arginina e lisina em substratos sintéticos tais como N-Benzoil-L-Arginina Etil Éster (BAEE) e N-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) originando compostos corados que são utilizados na determinação da sua atividade.²⁵⁻²⁷

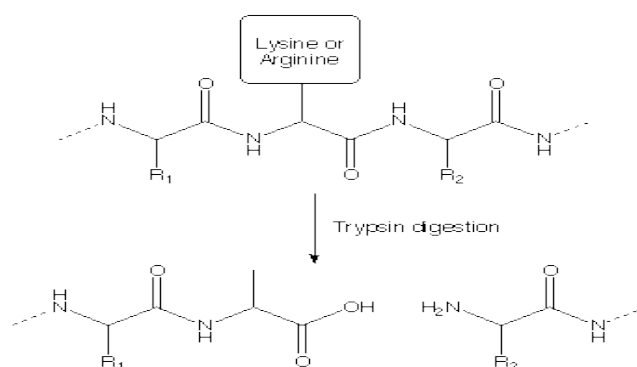


Figura 1.6 – Representação da clivagem na ligação peptídica dos resíduos de arginina e lisina pela tripsina.

É uma enzima digestiva que é produzida pelas células exócrinas do pâncreas como um precursor inativo (tripsinogénio) e é secretada através do ducto pancreático, no duodeno (a alça superior do intestino delgado).

Para além da digestão de proteínas ingeridas a tripsina é responsável pela ativação de outras enzimas digestivas envolvidas na degradação de outros nutrientes por clivagem de zimogénios dando origem às formas ativas num fenómeno em cascata. Como todas as enzimas digestivas de mamíferos é ativa à temperatura de 37°C. O seu pH ótimo situa-se entre 7 e 8 e é inativada para pH inferior a 4. A composição em aminoácidos de tripsina é conservada na maioria dos mamíferos. As tripsinas de porco, boi e rato são sequencialmente idênticas à humana em 78, 75 e 82 % respetivamente.²⁶

O seu centro ativo é constituído por um sítio aniónico, onde se ligam substratos e inibidores, carregados positivamente; um sítio hidrofóbico, adjacente ao sítio aniónico, onde também se ligam substratos e inibidores através das suas cadeias hidrocarbonadas e o sítio catalítico, característico por possuir a tríade catalítica Ser195, His57 e Asp102, seguindo a numeração da quimiotripsina, sendo esta utilizada como referência para comparar proteínas desta família.^{10,12,28}

Para que a tripsina não fique ativa no interior das células que a produzem (se tal acontecesse ela iria começar a degradar as proteínas vizinhas), é sintetizada sob a forma de tripsinogénio, que tem atividade proteolítica restrita. O tripsinogénio é o zimogénio da tripsina, ou seja, a sua forma inativa, caracterizado por possuir mais aminoácidos do que aqueles que a enzima necessita para ser funcional.

A ideia é que esses aminoácidos adicionais bloqueiem a atividade catalítica (por exemplo, impedindo o acesso do substrato ao centro ativo).²⁹⁻³¹

A ativação do tripsinogênio ocorre “in vivo” no intestino, onde após ser excretado para o duodeno, é convertido na forma ativa da tripsina (β -tripsina), por ação de uma enteroquinase, uma protease de serina segregada pela mucosa intestinal com especificidade muito semelhante à tripsina ou por moléculas de tripsina ativa (autocatálise), através de proteólise limitada. A expressão da tripsina é regulada desta forma de modo a evitar a degradação dos tecidos onde esta é produzida.³²⁻³⁴

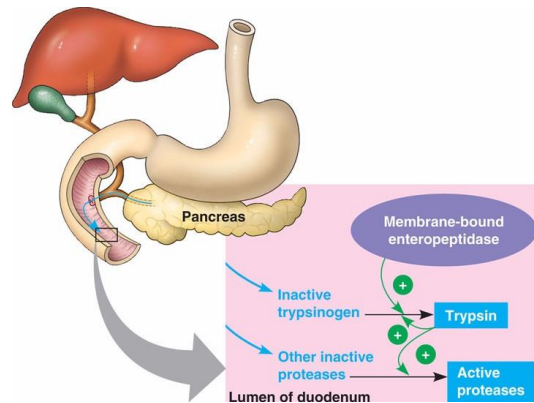


Figura 1.7 – Esquema da produção de tripsina.

A conversão do tripsinogênio na isoforma β -tripsina consiste na clivagem da ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos Lys15 e Ile16. A clivagem autocatalítica da β -tripsina na ligação entre os resíduos Lys131 e Ser132 leva à formação de uma segunda forma ativa da tripsina, conhecida como α -tripsina. A α -tripsina formada tem praticamente a mesma estrutura terciária da isoforma β -tripsina, mas apresenta menor percentagem de estruturas em folha beta e é constituída por duas cadeias polipeptídicas.³⁵

Seguidamente ocorre uma nova clivagem da α -tripsina na ligação entre os resíduos Lys176 e Asp177 resultando na ψ -tripsina, uma terceira isoforma da tripsina que é constituída por três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfureto.³⁶ Esta nova isoforma é menos específica que as restantes e possui pouca atividade amidásica relativamente a substratos sintéticos.

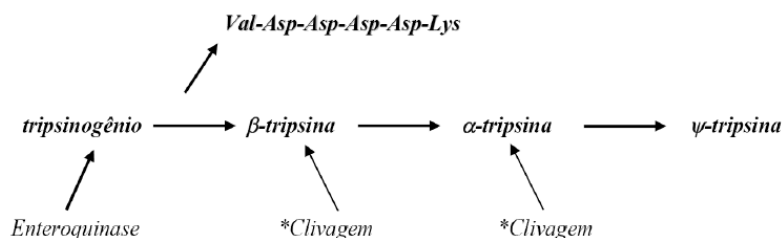


Figura 1.8 – Conversão de tripsinogênio nas isoformas de tripsina.

Atualmente são conhecidas quatro isoformas do tripsinogénio humano: tripsinogénio catiónico (tripsinogénio-1), tripsinogénio aniónico (tripsinogénio-2), mesotripsinogénio (tripsinogénio-3) e tripsinogénio cerebral (tripsinogénio IV).³⁷

O tripsinogénio 1 corresponde a cerca de 10% dos componentes proteicos do suco pancreático e é responsável pela degradação das proteínas digestivas.³⁸

O tripsinogénio 2 representa cerca de um terço ou metade do tripsinogénio total produzido pelo pâncreas. É produzido de modo similar ao tripsinogénio 1, mas possui eficiência catalítica cerca de duas vezes superior, o que faz com que ambos executem a digestão de outras proteínas no intestino delgado.³⁹

O tripsinogénio 3 é o de menor quantidade de entre os três encontrados no suco pancreático, representando 3 a 10% do tripsinogénio produzido e é conhecido pela sua resistência aos inibidores de tripsina. Acredita-se que desempenha um papel especial na degradação dos inibidores de tripsina.⁴⁰

O tripsinogénio IV foi originalmente identificado em neurónios e é considerado como sendo uma variante do mesotripsinogénio por “*splice*” alternativo. A diferença consiste no exão 1, no qual tem em falta uma sequência do péptido sinal. A sua função ainda não foi completamente esclarecida.⁴¹

1.1.3.1. Descrição da estrutura

A tripsina tem um peso molecular de 23,3 kDa e é constituída por uma cadeia polipeptídica de 223 resíduos de aminoácidos, interligada por seis pontes dissulfureto. A nível estrutural é uma proteína globular, onde as folhas β estão organizadas de forma antiparalela, dispostas como se formassem dois cilindros ou barris, estando o centro ativo localizado entre eles e caracterizados pela presença de resíduos hidrofóbicos no seu interior. Cada barril constitui um domínio estrutural da molécula de tripsina.^{9,28,31}

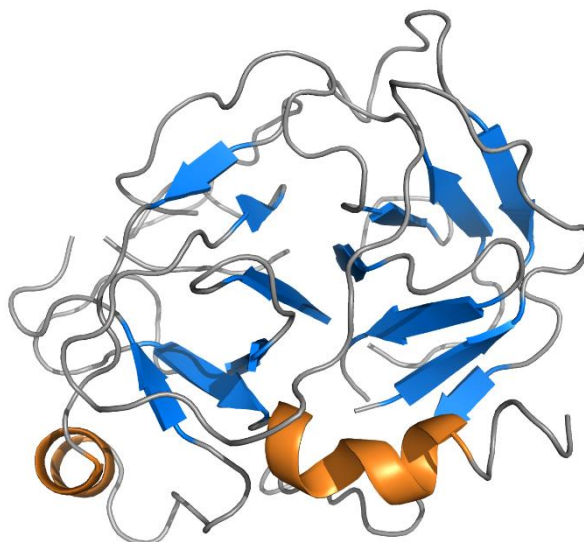


Figura 1.9 - Representação da estrutura tridimensional da tripsina de *Bos taurus* (Código PDB: 1S0Q). A laranja estão representados os motivos de hélice- α da sua estrutura secundária, a azul os motivos de folha- β e a cinzento os *loops*. Esta figura foi preparada utilizando o programa PyMOL.

O centro ativo da tripsina está situado entre os seus dois domínios, numa fenda onde se ligam os substratos. Um dos domínios tem na sua constituição dois dos resíduos da tríade catalítica, a His57 e o Asp102, enquanto a Ser195 faz parte do segundo domínio. Ambos os átomos de azoto da His57 formam ligações de hidrogénio, uma com a Ser195 e outro com o Asp102.^{1,10}

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.

O *oxyanion hole* é outro componente do domínio catalítico da tripsina. Encontra-se próximo da Ser195 e é formado pelos grupos amina dos resíduos da Gly193 e da Ser195 e tem como função a formação de um local positivamente carregado, que vai tornar estável o oxianião negativo do intermediário tetraédrico da reação.^{10,34,42,43}

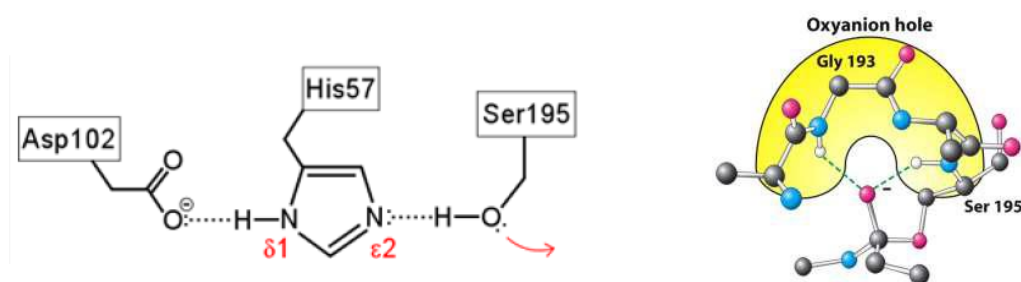


Figura 1.10 – Representação do centro ativo da tripsina e do *oxyanion hole*.

Próximo do centro ativo encontra-se o domínio de reconhecimento e ligação do substrato. O resíduo de maior importância no que diz respeito à ligação de substratos é o Asp189 sendo responsável pela captação e estabilização da lisina e da arginina, ambas carregadas positivamente, e pela especificidade da tripsina.

No que diz respeito à quimiotripsina, este resíduo é substituído por uma serina de modo a receber as cadeias mais volumosas dos aminoácidos aromáticos. No caso da elastase, as glicinas 216 e 226 são substituídas por uma treonina e uma valina respetivamente, que bloqueiam este local de ligação para aminoácidos com cadeias laterais longas.⁴³

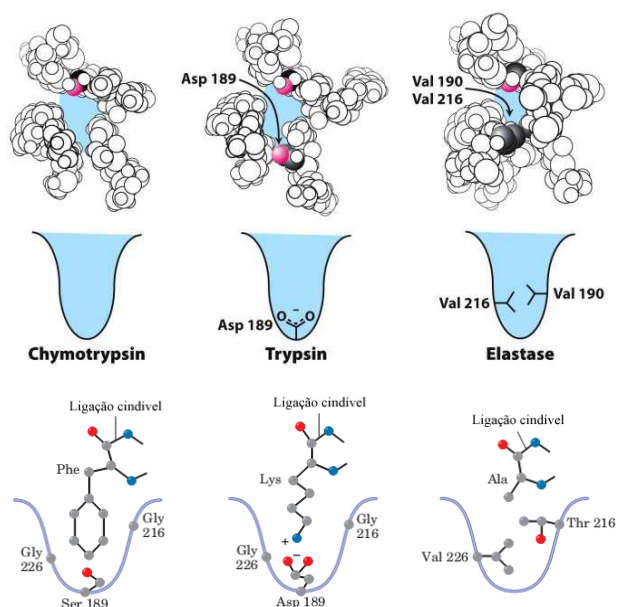


Figura 1.11 – Representação esquemática do domínio de reconhecimento do substrato para as enzimas quimiotripsina (à esquerda), tripsina (no meio), e elastase (à direita). Adaptado de Voet *et al.* (2008)⁴³

1.1.3.2. Inibidores da Tripsina

A expressão de inibidores da tripsina e os mecanismos das suas interações constituem um vasto campo de investigação, seja para se definirem os parâmetros que os regulam ou para aplicações na medicina e na biotecnologia.

Para a tripsina existem diversos inibidores conhecidos. Um exemplo muito estudado dentre os inibidores naturais estudados até hoje é um que é secretado pelo pâncreas, conhecido como inibidor básico pancreático da tripsina (BPTI, do inglês, *bovine pancreatic trypsin inhibitor*), ou inibidor de Kunitz, ou ainda comercialmente conhecido como aprotinina. Este inibidor liga-se à tripsina através de um elevado número de ligações de hidrogénio.^{44,45}

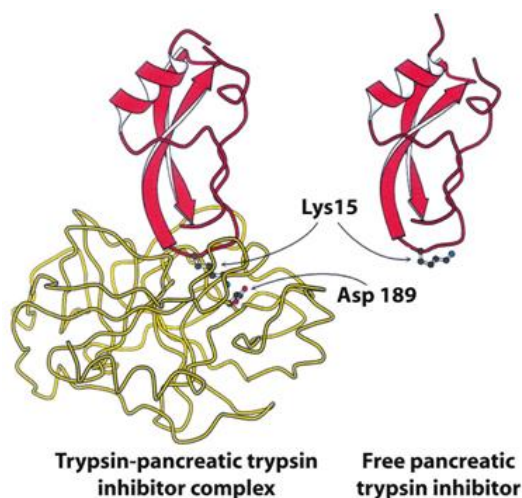


Figura 1.12 – Representação da tripsina complexada ao inibidor aprotinina.

1.1.4. Trombina

O sistema de coagulação sanguínea é bastante complexo e precisa ser muito bem regulado para manter a fluidez do sangue, alternando entre processos pró-coagulantes e anticoagulantes.

Para evitar a hemorragia temos o processo de coagulação. Este processo tem como objetivo principal a formação de fibrina, um produto insolúvel da clivagem do fibrinogênio (solúvel) pela trombina, através de interações entre proteases plasmáticas e os seus cofatores.

A trombina desempenha um papel importante neste processo, regulando-o.⁴⁶⁻⁴⁸

1.1.4.1. “Cascata” de coagulação

Em 1964, Macfarlane e Davie & Ratnoff, designaram por “cascata” de coagulação, o fenómeno de formação do trombo, denominada deste modo por se tratar de um sistema de reações proteolíticas sequenciais, onde uma protease ativa do plasma cliva um zimogénio convertendo-o numa enzima ativa e assim sucessivamente até à formação da rede de fibrina.

A cascata de coagulação foi dividida em duas vias distintas: a via intrínseca ou via ativada por contato e a via extrínseca ou via ativada pelo fator tecidual, que convergem para uma via “comum”, com a formação do fator Xa. Estas vias não ocorrem independentemente mas sabe-se que a via extrínseca é a principal responsável pela formação de fibrina e a via intrínseca é importante no crescimento e manutenção da coagulação.⁴⁷⁻⁴⁹

Para desencadear o processo de coagulação pela via extrínseca é necessário o fator tecidual (FT). Trata-se de uma glicoproteína integral da membrana que está fortemente associada aos fosfolipídios (PL).

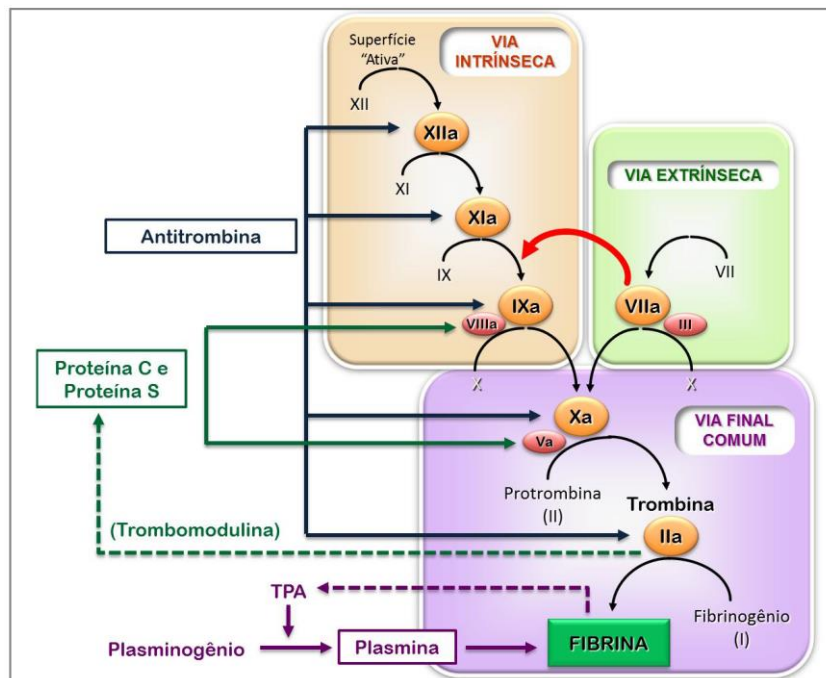


Figura 1.13 – Cascata de coagulação (via extrínseca, via intrínseca e via comum).

A divisão do sistema de coagulação em vias extrínseca e intrínseca, hoje em dia tornou-se inadequada para explicar a fisiologia, sendo usada apenas como mais didática, visto que essa divisão não ocorre no organismo, sendo que ambas vias interagem para formar fibrina.

Em 1990, ocorreram novas interpretações da cascata de coagulação, onde se reconheceu a trombina como a enzima chave, dado que é capaz de regular várias fases do processo e estimular a sua própria formação.^{47,48}

Apesar da forma mais didática de separação das vias houve uma nova visão deste processo em que se observam pontos de conexão entre elas.

Hoje em dia, o mecanismo aceita diz respeito à coagulação associada a três complexos enzimáticos pró-coagulantes. A coagulação inicia-se com a exposição do sangue a componentes normalmente ausentes no interior vascular.

1.1.4.2. Regulação da coagulação

As reações bioquímicas da coagulação do sangue devem ser estritamente reguladas, de modo a evitar a ativação excessiva do sistema, formação inadequada de fibrina e obstrução do vaso com formação de um coágulo. Para isso, existem mecanismos de regulação da coagulação. Os de maior importância são o da proteína C (PC) e o da fibrinólise.⁴⁶

Mecanismo de regulação pela proteína C:

A PC necessita ser ativada para executar o seu papel anticoagulante. Assim sendo, esta proteína liga-se ao seu recetor endotelial (EPCR - *Endothelial PC Receptor*). Por sua vez, a trombina liga-se ao seu recetor endotelial trombomodulina (TM) e sofre modificações que permitem uma interação com complexo PC – EPCR que desencadeiam a sua atividade. A PCa (Proteína C ativada) liga-se à proteína S (PS) e funciona como cofator inativando os fatores Va e VIIIa.^{46,50}

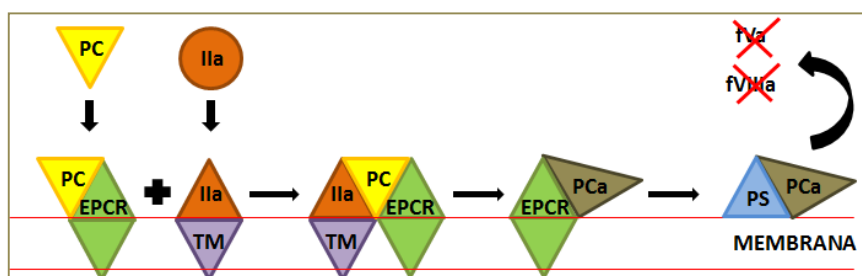


Figura 1.14 – Esquema representativo do mecanismo anticoagulante da proteína C ativada. Adaptado de Franco *et al.* 2001⁴⁷

Mecanismo de regulação da fibrinólise:

Outro método de regular a coagulação é pela fibrinólise. A degradação da fibrina é importante na medida em que evita o crescimento excessivo do coágulo, o que pode ocasionar a oclusão de vasos. No processo de degradação da fibrina atuam proteases de serina, como a plasmina, responsável pela

clivagem da fibrina. O plasminogénio converte-se em plasmina pela ação do ativador de plasminogénio do tipo uroquinase (u-PA) e do ativador de plasminogénio do tipo tecidual (t-PA). A plasmina cliva a fibrina gerando o produto de degradação da fibrina (PDF). O inibidor do ativador de plasminogénio - 1 (PAI-1) inibe t-PA e u-PA, sendo a α_2 -antiplasmina (α_2 -AP) o inibidor direto da plasmina.^{47,51,52}

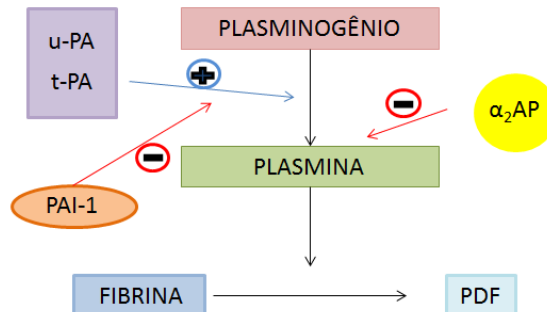


Figura 1.15 – Representação esquemática da regulação da fibrinólise. Adaptado de Franco *et al.* 2001.⁴⁷

A trombina é uma protease de serina homóloga à tripsina e à quimiotripsina e é aquela de maior destaque no sistema hemostático, interferindo com várias proteases que intervêm tanto na trombose como na fibrinólise.

Está no centro do processo de coagulação sanguínea, é gerada maioritariamente no penúltimo passo da via de coagulação sanguínea a partir da ativação da protrombina e é produzida no soro de vertebrados.

Além do seu papel importante na cascata de coagulação e o de clivar o fibrinogénio (solúvel) em monómeros de fibrina (insolúvel), a trombina regula a sua própria formação através da ativação do fator XI e cofatores V e VIII, que por sua vez, amplificam a formação de trombina e que no caso deste último promovem a ligação cruzada das moléculas de fibrina formando a rede de fibrina. A sua atividade é essencial para a estabilização do coágulo (por ativar o fator XIII) e para evitar a degradação do mesmo. Atua também na regulação de várias etapas da cascata com o objetivo de produzir mais trombina. Além da sua função como enzima-chave da cascata da coagulação, a trombina está também envolvida em eventos celulares como quimiotaxia, proliferação, renovação da matriz extracelular e libertação de citocinas.^{53,54}

A clivagem de uma ligação peptídica em cada uma das cadeias α (ligação Arg18–Gly) e β (ligação Arg16–Gly) do fibrinogénio pela trombina resulta na libertação de quatro fibrinopéptidos e dá origem a monómeros de fibrina com novas sequências N-terminais. As novas extremidades de cada monómero ligam-se ao monómero adjacente, levando à polimerização linear da fibrina num coágulo insolúvel. A sequência reconhecida pela trombina no fibrinogénio é Leu-Asp-Pro-Arg-Ser.^{55,56}

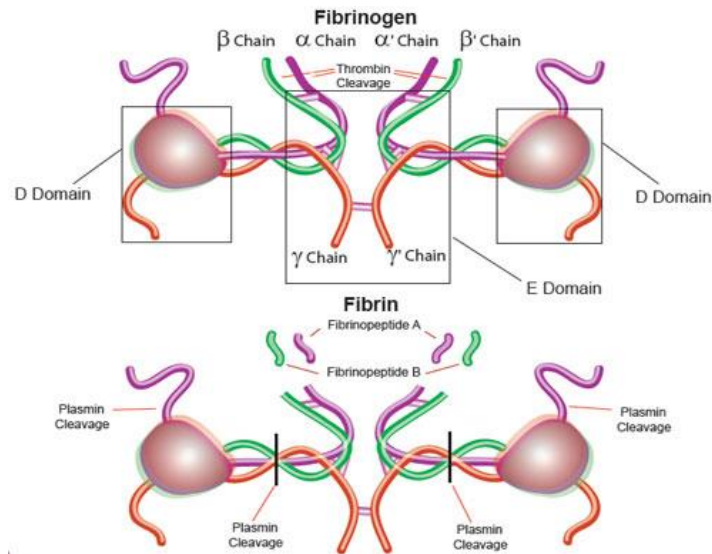


Figura 1.16 – Conversão do fibrinogénio em fibrina pela ação da trombina.

A trombina é muito mais específica em relação a sequências de aminoácidos do substrato, comparativamente à tripsina e à quimiotripsina. É caracterizada por clivar resíduos de arginina do substrato, mas ao contrário da tripsina, que também tem essa especificidade, a trombina cliva apenas alguns motivos de arginina, como Arg-Gly e Arg-Pro. Esta especificidade é fundamental para um controlo adequado da atividade hidrolítica da trombina no soro sanguíneo.⁵⁶

1.1.4.3. Descrição da estrutura

A trombina tem um peso molecular de 33,7kDa e é formada por duas cadeias polipeptídicas ligadas por uma ponte dissulfureto entre os resíduos Cys-1 da cadeia A e Cys-122 da cadeia B. A cadeia B é estabilizada por três pontes de dissulfureto: Cys-42-Cys-58, 168-Cys-Cys-182 e Cys-191-Cys-220.

A cadeia menor, designada por L (light) ou A, é composta por 36 resíduos e a cadeia maior, designada por H (heavy) ou B possui 259 resíduos, sendo que a primeira tem uma função estrutural enquanto a segunda tem função catalítica. O sítio ativo fica localizado na cadeia B e é caracterizado por uma cavidade no centro da molécula, tal como a tripsina.

Trata-se de uma molécula globular formada por dois barris beta com seis folhas, como as outras proteases de serina. Os resíduos da tríade catalítica encontram-se entre os dois barris.⁵⁶

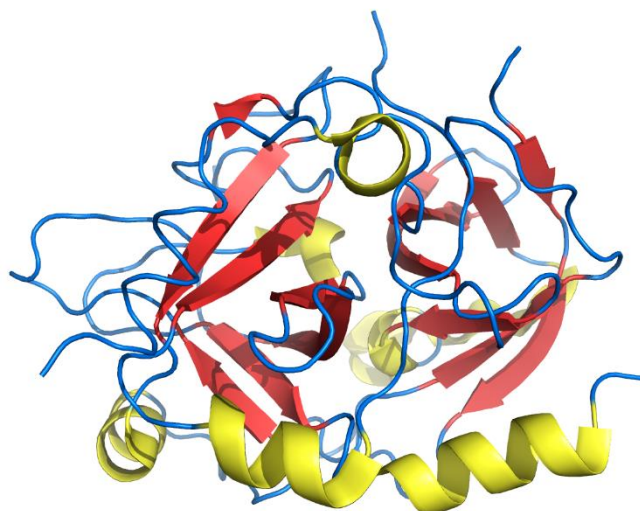


Figura 1.17 – Representação da estrutura tridimensional da trombina (Código PDB: 3JZ1). A amarelo estão representados os motivos de hélice- α da sua estrutura secundária, a vermelho os motivos de folha- β e a azul os *loops*. Esta figura foi preparada utilizando o programa PyMOL.

À medida que se foi conhecendo a estrutura da trombina, foi possível compreender melhor as suas propriedades funcionais. A estrutura cristalográfica da trombina mostrou que se trata de uma macromolécula de grande complexidade. Possui recetores de superfície (I e II) e um centro ativo, na profundidade, de difícil acesso, que funcionam como locais de ligação a várias substâncias.

A cavidade que forma o sítio catalítico é ladeada por dois *loops* também característicos do enovelamento da proteína. São eles o *loop-60* e o *loop- γ* . O primeiro tem caráter hidrofóbico e estrutura rígida e o segundo tem mais mobilidade e caráter hidrofílico.⁵⁷

O exossítio I, que é centrado no resíduo Lys70, contém a sequência de Arg67 até Glu80 da cadeia B, incluindo diversos resíduos carregados positivamente em condições fisiológicas, como o Arg35, Lys149, Lys81, Lys110, Lys109 e Lys36. Exerce uma função essencial na interação do fibrinogénio (substrato natural) com a trombina. Essa interação é principalmente eletrostática e permite que o complexo se forme de forma ideal para que os sítios de clivagem do fibrinogénio se encontrem no sítio ativo da enzima. O exossítio I também está envolvido na ligação da hirudina (inibidor derivado da sanguessuga *Hirudus medicinalis*), do recetor PAR-1, da fibrina, da trombomodulina, etc.

O exossítio II está localizado na região oposta à localização do exossítio I, também na cadeia B e está centrado nos resíduos Arg93, Lys236, Lys240, Arg101 e Arg233. É o local de interação de ligantes polianiónicos devido à numerosa presença de resíduos de cargas positivas. A heparina é o ligante mais conhecido desse exossítio.

Todas estas características estruturais únicas contribuem para a grande especificidade da enzima e permitem uma fina modulação da sua atividade.^{55,57}

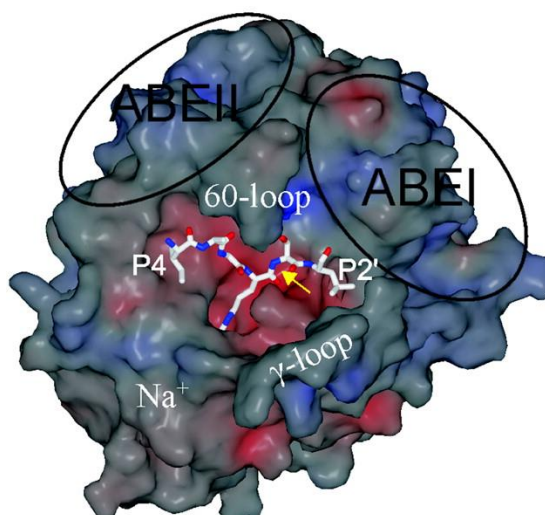


Figura 1.18 – Representação esquemática da superfície acessível ao solvente da molécula de trombina com a localização dos seus sítios e detalhe estrutural de um sítio de Na⁺ típico. Adaptado de Lane, *et al.*, 2005⁵⁷

O desenvolvimento de novos anticoagulantes diretos baseia-se no conhecimento destas ligações. A trombomodulina atua sobre os recetores de superfície I, inibindo a ligação da trombina ao fibrinogénio. Os fatores XI, XIII e a antitrombina III, fixam-se sobre os recetores de superfície II. Os fatores V, VIII e o cofator II da heparina, fixam-se tanto aos recetores I como aos recetores II.

A trombina tem função anticoagulante, regulando negativamente a sua produção através da ativação da proteína C, após a formação do complexo trombina-TM. Isto acontece devido à presença de duas formas distintas da molécula: uma forma “fast” pró-coagulante e uma forma “slow” anticoagulante. Estas formas estão em equilíbrio e a transição “fast” → “slow” é dependente da ligação do íon Na⁺ à trombina.

O sítio de ligação do Na⁺ à trombina fica localizado entre dois *loops* próximos do sítio catalítico. Esse catião funciona como um modulador alostérico da enzima. A ligação de Na⁺ converte a trombina de uma forma lenta (sem Na⁺) para uma forma rápida (ligada a Na⁺).⁵⁸

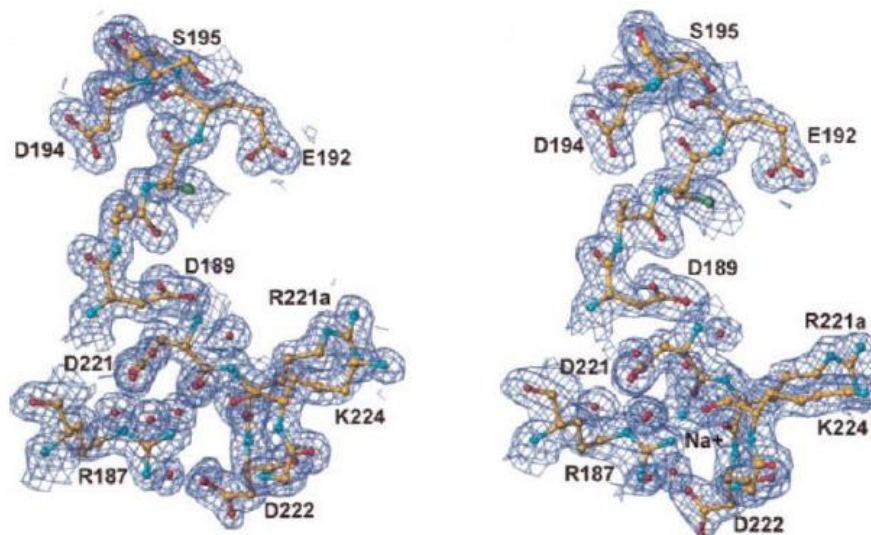


Figura 1.19 – Representação dos mapas de densidade eletrônica preenchidos na região de mudança estrutural mais significativa em torno da região de interação do Na⁺. A: Forma lenta (Código PDB: 1SHH); B: Forma rápida (Código PDB: 1SFQ). O íon Na⁺ está representado com uma esfera azul. Adaptado de Pineda *et al.* 2004.⁵⁸

A enzima ligada ao Na⁺, conseqüentemente a forma rápida, tem maior especificidade pelo fibrinogênio e fibrina e aumenta em mais de 20 vezes a clivagem do fibrinogênio. Já a forma lenta é mais específica para a Proteína C.

1.1.4.4. Inibidores da trombina

Considerando o papel fundamental da trombina na formação de coágulos, muitas estratégias para prevenção e tratamento de eventos tromboembólicos têm-se concentrado na inibição da trombina ou no bloqueio da sua atividade. Os inibidores da trombina são usualmente classificados como diretos ou indiretos.

Os inibidores diretos exercem o seu efeito anticoagulante através da ligação com o sítio catalítico da trombina, impedindo-a de promover a hidrólise dos seus substratos. Por sua vez, os inibidores indiretos não bloqueiam a ação do sítio catalítico da trombina, mas agem através de outros sítios, nomeadamente os seus exossítios. Um dos principais exemplos desta última classe envolve a heparina.

Relativamente aos inibidores indiretos, a heparina convencional (de alto peso molecular) tem sido desde há muitos anos o anticoagulante mais utilizado na prática clínica, na prevenção e tratamento da trombose. É um polissacárido obtido a partir de intestino de porco, com um peso molecular médio de 15kDa.⁵⁹

A inibição de trombina é maior quando é formado o complexo ternário antitrombina, trombina e heparina, onde a heparina é a responsável pela aproximação das duas moléculas. Sem a presença de heparina esta inibição acontece em ritmo 1000 vezes mais lento, aproximadamente. A heparina liga-se

à antitrombina de maneira específica e ativa a mesma através de modificação alostérica da estrutura, fornecendo um molde para que a antitrombina possa interagir com a trombina.^{59,60}

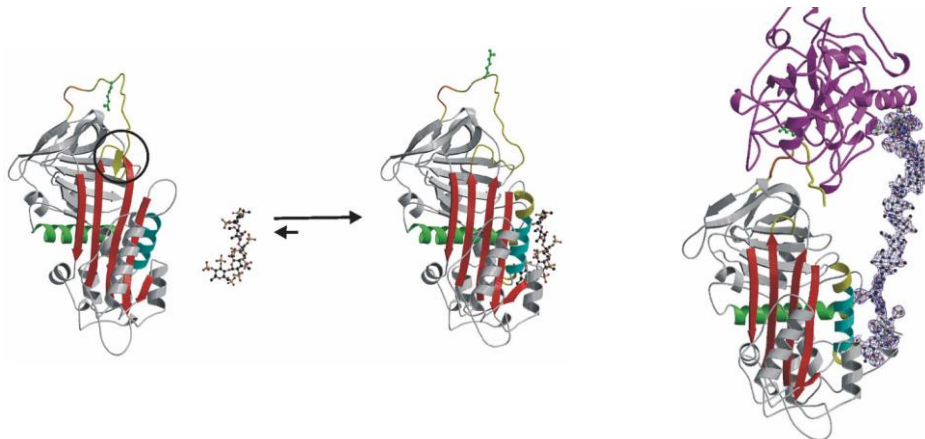


Figura 1.20 – Complexo ternário formado por antitrombina-heparina-trombina. **A)** Ligação da heparina à antitrombina. **B)** Representação da estrutura cristalográfica (Código PDB: 1NQ9) do complexo ternário, antitrombina (cinza), trombina (roxo) e heparina (envolvida pelo mapa de densidade eletrônica). Adaptado de Li, W. *et al* 2004.⁵⁹

No entanto, este inibidor apresenta diversas desvantagens: depende dos níveis séricos de antitrombina III, é uma mistura heterogênea de moléculas e o mais importante, inibe apenas a trombina próxima ao coágulo e não a ligada.

Devido a essas limitações, buscaram-se novas terapias antitrombóticas, estando, entre elas, os inibidores diretos da trombina, que apresentam vantagens teóricas, sendo objeto de vários estudos clínicos.

No que diz respeito aos inibidores diretos da trombina, estes são mais vantajosos dado que o seu modo de ação é independente da antitrombina, o que lhes permite inativar tanto a trombina livre, como a ligada à fibrina. Neste sentido, estes agentes diferem da heparina e dos seus derivados de baixo peso molecular, os quais necessitam da formação de complexos com antitrombina III, sendo assim fracos inibidores da trombina. Além disso, ao contrário da HNF, IDTs não se ligam às proteínas plasmáticas, resultando num efeito anticoagulante mais previsível.

A hirudina é um anticoagulante proveniente da glândula salivar da sanguessuga *Hirudo medicinalis* mas que atualmente pode ser obtida por tecnologia de DNA recombinante. É um péptido de 7kDa, com 65 aminoácidos e o seu mecanismo de ação consiste na ligação a dois sítios da trombina: a extremidade C-terminal liga-se ao sítio de reconhecimento do substrato, que seria o local de reconhecimento do fibrinogénio (exosítio I) enquanto a extremidade N-terminal liga-se ao sítio catalítico, inibindo a reação autocatalítica. Desta forma, a hirudina não só inibe a conversão do fibrinogénio em fibrina pela trombina, como também, previne a ativação do recetor da trombina.^{61,62}

A hirudina possui vantagens teóricas e práticas sobre a heparina, como inibição da ligação da trombina ao coágulo (a heparina não faz esta inibição, pois o sítio de ligação para o complexo heparina-antitrombina III não está acessível, quando a trombina está ligada ao coágulo). Além disso, a hirudina não necessita de cofator, não é inibida por plaquetas ativadas e causa uma anticoagulação mais estável que a heparina.⁶³

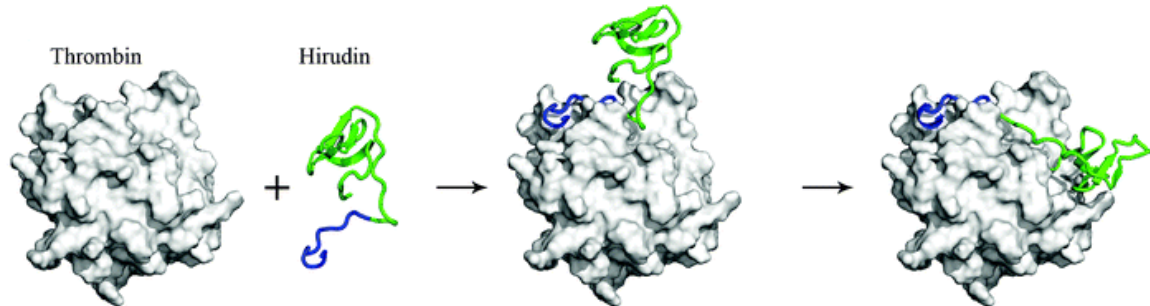


Figura 1.21 – Representação da ligação da hirudina à trombina.

1.1.5. Uroquinase

1.1.5.1. Sistema Fibrinolítico

A eliminação do coágulo sanguíneo é um passo essencial no processo de reparação tecidual.

A fibrinólise ou sistema fibrinolítico tem como principal função a remoção do coágulo, o que é feito através da degradação enzimática da fibrina, mediada pela plasmina e é um dos mecanismos endógenos que concorre para prevenir a trombose intravascular.

O sistema fibrinolítico é composto por diversas proteínas, essencialmente proteases de serina e inibidores, como a superfamília das serpinas, que regulam a produção de plasmina, uma enzima ativa, produzida a partir de uma pro-enzima inativa (plasminogénio), que tem por função degradar a fibrina e ativar metaloproteínas da matriz extracelular. A ativação do plasminogénio em plasmina é realizada pela hidrólise da ligação peptídica entre os aminoácidos Arg561-Val562. A plasmina é capaz de hidrolisar a fibrina e várias proteínas da coagulação plasmática, incluindo o fibrinogénio.^{47,64}

São conhecidos dois ativadores fisiológicos do plasminogénio: o ativador do plasminogénio do tipo tecidual (t-PA, "*tissue-type plasminogen activator*"), que é o mais importante e é libertado pelas células endoteliais e o ativador do plasminogénio do tipo uroquinase (u-PA, "*urokinase-type plasminogen activator*"), uma protease de serina que não interage com fibrina. Os dois ativadores têm alta especificidade de ligação com o seu substrato (plasminogénio) e promovem a hidrólise de uma única ligação peptídica (Arg560-Val561), que resulta na formação de uma protease de serina ativa, a plasmina.^{65,66}

As enzimas que ativam o plasminogênio são inibidas no sangue normal pelo inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1). O PAI-1 é produzido pelas células endoteliais e musculares lisas da parede vascular e tem como principal reservatório funcional as plaquetas.

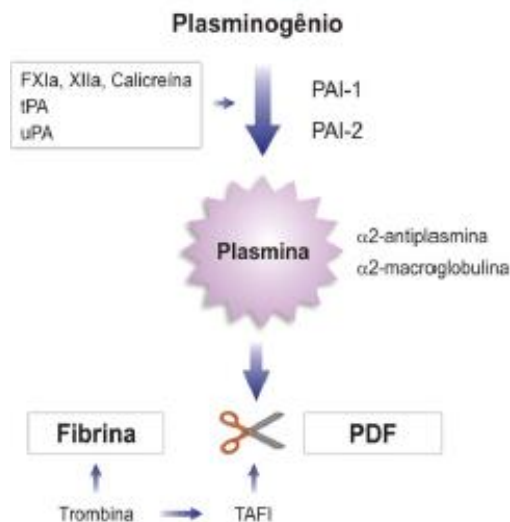


Figura 1.22 – Esquema do sistema fibrinolítico com conversão do plasminogênio em plasmina.

1.1.5.2. Inibição do sistema fibrinolítico

A inibição do sistema fibrinolítico ocorre em relação aos ativadores do plasminogênio mediante ação de inibidores específicos (PAIs, “*plasminogen activator inhibitors*”).

O Inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) é o inibidor com maior importância e o mais utilizado. Quando a taxa de PAI-1 é alta, a atividade fibrinolítica fica diminuída, o que aumenta o risco de trombose venosa e arterial.

O Inibidor do Ativador do Plasminogênio 2 (PAI-2) encontra-se originalmente na placenta e a sua ação ainda não está bem estabelecida.

Estes inibidores são responsáveis pela inibição do ativador de plasminogênio de uroquinase (uPA) e do ativador de plasminogênio tecidual (tPA), e formam ligações covalentes com os mesmos e inativam-nos irreversivelmente, o que resulta na supressão da fibrinólise devido à diminuição da atividade do plasminogênio. Esta é a maneira como a hemorragia por fibrinólise no organismo é impedida. Estes inibidores reagem com uPA, mas não com pro-uPA.⁶⁷⁻⁷¹

A uroquinase desempenha um papel importante na regulação de processos fisiológicos e patológicos.

A uroquinase, também conhecida por Ativador do Plasminogênio do tipo uroquinase (uPA, do inglês *urokinase-type Plasminogen Activator*), é uma enzima que em conjunto com o seu recetor (uPAR) promove a fibrinólise por catalisar a conversão do zimogênio plasminogênio em plasmina ativa, através da clivagem da ligação peptídica Arg561-Val562. Juntamente com Ativador do Plasminogênio do tipo tecidual (t-PA), a u-PA é um dos dois principais ativadores de plasminogénios endógenos.

É sintetizada no rim humano, tendo sido encontrada pela primeira vez na urina, mas é encontrada na maioria dos tecidos da maior parte dos vertebrados. Quando localizada na superfície externa da célula contribui para a remodelação do tecido e migração celular. A inibição da sua atividade impede a propagação do cancro.⁷²

Existem duas formas da uroquinase: a uroquinase de cadeia simples e a uroquinase de cadeia dupla.

1.1.5.3. Descrição da estrutura

A uroquinase de cadeia simples (scu-PA) é uma glicoproteína com múltiplos domínios, com uma massa molar de 54kDa, constituída por 411 resíduos e não tem atividade peptidase para substratos sintéticos. Portanto, esta forma de uroquinase foi durante muito tempo considerada como o precursor da enzima, ou pró-uroquinase.

No entanto, a pró-uroquinase pode converter o plasminogénio em plasmina por hidrólise da ligação peptídica Arg561-Val562. A plasmina, por sua vez, ativa a uroquinase porque cliva a ligação peptídica Lys158-Ile159 e converte-a em uroquinase de cadeia dupla. No plasma, o scu-PA é principalmente inativa. Porém, não se liga diretamente à fibrina, induz a ativação do plasminogénio na presença de fibrina, levando a uma relativa ativação do plasminogénio, específica à fibrina.^{71,74}

A uroquinase de cadeia dupla (tcu-PA) é uma protease de serina do tipo tripsina composta por duas cadeias polipeptídicas com massa molecular de 20 e 34kDa, respetivamente, ligadas por uma ponte de dissulfureto. Tem atividade de protease e a taxa de clivagem do plasminogénio pela uroquinase de cadeia dupla é 200 vezes mais elevada do que a taxa de clivagem pela forma de cadeia simples.

A estrutura da uroquinase possui três domínios: um domínio de ligação ao recetor do fator de crescimento epidérmico no N-terminal (aminoácidos 9-45), um domínio *kringle* central (aminoácidos 46-143) e um domínio catalítico de protease no C-terminal (aminoácidos 144-411).⁷³

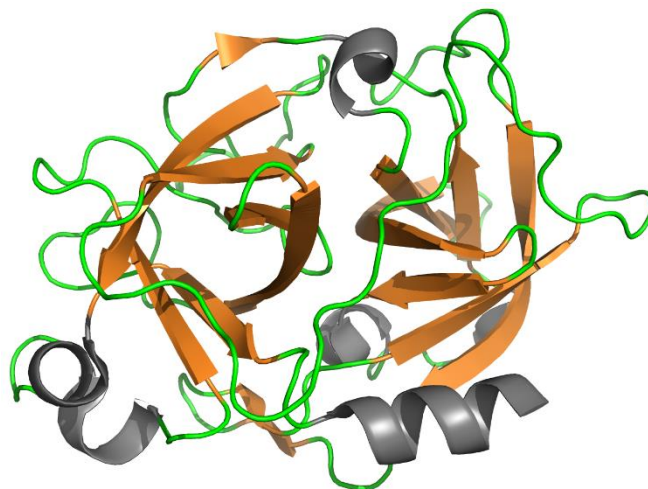


Figura 1.23 – Representação da estrutura tridimensional do domínio catalítico da uroquinase (Código PDB: 4FU9). A cinzento estão representados os motivos de hélice- α da sua estrutura secundária, a laranja os motivos de folha- β e a verde os *loops*. Esta figura foi preparada utilizando o programa PyMOL.

O N-terminal (cadeia A) contém o domínio *kringle* e o domínio de ligação ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGF). Este último é responsável pela ligação a u-PAR, enquanto o C-terminal (cadeia B) é composto por dois subdomínios formados por seis folhas beta dobradas de uma forma antiparalela e contém o sítio catalítico, mantendo deste modo a capacidade de ativar o plasminogénio também quando não está ligado ao recetor.

O domínio *kringle* de uroquinase contém uma sequência que interage com o inibidor específico de PAI-1.⁷⁴

O sítio ativo situa-se na interface entre os dois subdomínios e consiste na tríade catalítica com os resíduos His57, Asp102 e Ser195 (seguindo a nomenclatura da quimiotripsina).

A especificidade de ligação para substratos básicos é largamente determinada pelo resíduo Asp189. A estrutura cristalina do domínio catalítico da uPA mostra uma topologia do tipo tripsina, em que o Asp189 fica retido, o que confere ao local S1 uma afinidade para com resíduos de carga positiva, como a arginina e a lisina. Assim, a maioria dos inibidores de uPA sintéticos, produzidos até ao momento, têm uma característica estrutural comum que consiste numa porção aromática mono ou bi substituída. Contudo, existe uma limitação na escolha dos compostos viáveis dado que é necessário inibir a uPA sem afetar a atividade de outras proteases de serina do tipo tripsina, e, especialmente, o tPA e a plasmina, essenciais para os processos fibrinolíticos. O desenvolvimento de novos inibidores para a uPA engloba etapas como a caracterização estrutural de complexos enzima-inibidor e determinação de constantes cinéticas de inibição.⁷⁵

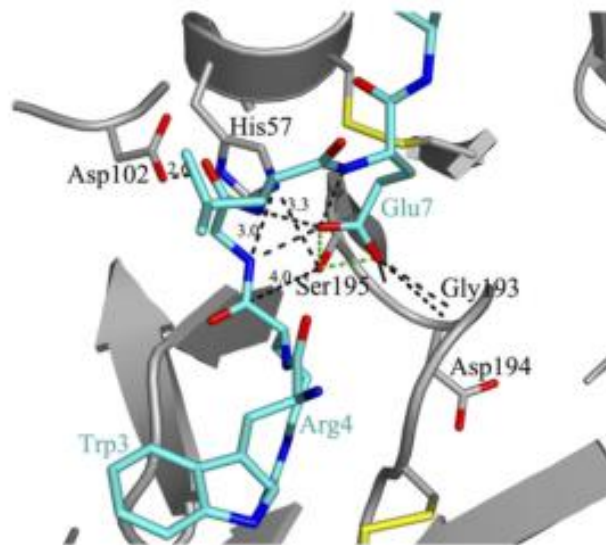


Figura 1.24 – Representação do centro ativo da uroquinase.

1.2. Métodos de Caracterização

1.2.1. Cinética Enzimática

As reações químicas envolvidas em processos biológicos são geralmente mediadas por enzimas, que desempenham a função de catalisadores. A cinética enzimática é a parte da enzimologia que é utilizada para medir e descrever matematicamente a velocidade das reações enzimáticas e calcular as constantes associadas e ainda descrever a atividade de uma enzima.

A velocidade de uma reação enzimática é, em geral, obtida pela medida da quantidade de produto formado ou pela quantidade de substrato consumido por unidade de tempo de reação.⁷⁶

Uma reação enzimática pode ser expressa pela seguinte equação:

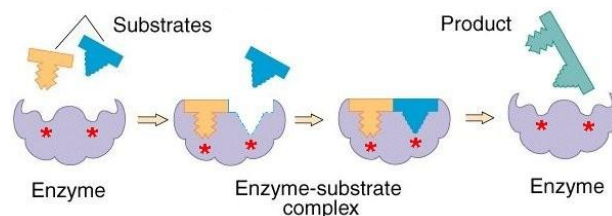


Figura 1.25 – Esquema de uma reação enzimática, com formação do complexo enzima-substrato e posterior formação da enzima livre e produto da reação.

A enzima liga-se ao substrato, formando o complexo enzima-substrato (ES), com uma menor energia de ativação do que o substrato sozinho, onde o substrato é convertido para a conformação de estado de transição. Ao se diminuir a energia de ativação, a velocidade da reação aumenta devido a um aumento de colisões efetivas e tudo isto leva à formação do produto reacional.

O estudo da atividade da enzima procura saber que tipo de reações pode catalisar, com que substratos pode interagir e como se modifica essa atividade (qualitativa e/ou quantitativamente) quando se fazem variar as condições dos ensaios. O valor de pH, a temperatura, o tempo de incubação, as concentrações dos substratos, de cofatores ou de outras substâncias (inibidores ou ativadores) são exemplos de fatores que podem ser alterados com o objetivo de se verificar como varia a atividade da enzima.^{76,77}

Relativamente à concentração de substrato, a altas concentrações de substrato, a enzima está saturada, isto é, os seus sítios ativos estão todos ocupados por moléculas de substrato ou produto. Assim, um aumento na concentração de substrato não afetará a taxa de reação porque todos os sítios ativos já estão ocupados.

1.2.1.1. Equação de Michaelis-Menten

A definição de complexo enzima-substrato é imprescindível para a compreensão das reações enzimáticas, tendo sido introduzida em 1913 por Michaelis e Menten. Estes investigadores criaram uma equação, que nos permite demonstrar como a velocidade de uma reação varia com a variação da concentração do substrato.

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Esta equação pode ser expressa graficamente e representa o efeito da concentração de substrato relativamente à velocidade inicial de uma reação enzimática, sendo conhecida como a equação de Michaelis-Menten.

Segundo esta equação, a enzima (E) associa-se ao substrato (S) originando uma espécie intermediária (ES), que funciona como precursor dos produtos da reação (P).

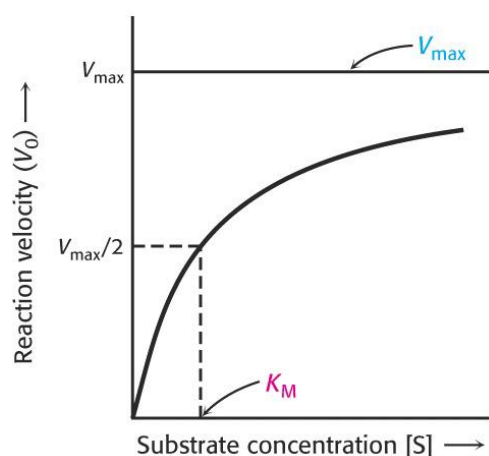


Figura 1.26 – Representação gráfica de uma curva típica da cinética Michaelis-Menten, da qual podem ser determinados parâmetros K_M e V_{\max} .

A constante de dissociação do equilíbrio envolvendo o complexo ES é conhecida como constante de Michaelis-Menten, K_M que corresponde à concentração de substrato para a qual a velocidade da reação corresponde a metade da velocidade máxima (V_{\max}), ou seja, representa a concentração de substrato à qual metade dos centros ativos da enzima se encontram ligados a moléculas de substrato.

O valor de K_M diminui com o aumento da afinidade da enzima pelo substrato e, deste modo, pode ser utilizado para medir essa afinidade. Esta constante depende da temperatura, pH e força iónica, entre outras condições reacionais, pelo que serve para caracterizar um sistema enzima-substrato em condições específicas e uma variação no seu valor é normalmente indicativo da presença de um inibidor ou ativador.

Outro dos parâmetros cinéticos que pode ser obtido através da equação é o valor de velocidade máxima da reação, $V_{m\acute{a}x}$, que está relacionado com a eficiência catalítica da enzima. Pode também ser calculado o número de turnover k_{cat} , sendo este igual a $V_{m\acute{a}x}/[enzima]_{total}$ e corresponde ao número de moléculas de substrato convertidas a produto por moléculas de enzima por unidade de tempo. A razão entre k_{cat} e K_M é definida como a eficiência catalítica e é demonstrativo da especificidade de uma enzima para um certo substrato, pois uma razão alta favorece a formação de produto.

A atividade catalítica é afetada por vários fatores, tais como: presença de inibidores, pH e temperatura. Estes fatores podem aumentar, diminuir ou até mesmo suprimir a velocidade da reação catalítica.⁷⁸

Neste trabalho, apenas vamos ter em conta a presença de inibidores.

1.2.1.2. Inibição Enzimática

A inibição da atividade enzimática constitui um importante mecanismo de regulação nos sistemas biológicos.

Os inibidores enzimáticos são compostos que ao se ligarem a uma enzima, podem diminuir a sua atividade, atuando como reguladores das vias metabólicas. A inibição enzimática pode ser *reversível*, que se caracteriza por uma rápida dissociação do complexo enzima-substrato e *irreversível*, que acontece quando o inibidor se liga fortemente à enzima e se dissocia muito lentamente.

Existem três tipos de inibição enzimática reversível:

- **Inibição Reversível Competitiva:** O inibidor é estruturalmente semelhante ao substrato e compete pelo sítio ativo com o mesmo, diminuindo por isso a afinidade da enzima pelo substrato (K_M aumenta), mas a $V_{m\acute{a}x}$ não se altera. Isto significa que é necessário uma maior quantidade de substrato para atingir a mesma $V_{m\acute{a}x}$. É possível reverter este tipo de inibição aumentando a concentração do substrato.

Este tipo de inibição depende das concentrações do substrato e do inibidor.

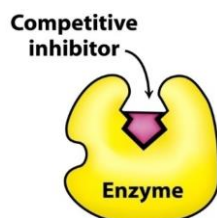


Figura 1.27 – Representação de uma inibição competitiva.

- **Inibição Reversível Não-Competitiva:** Neste tipo de inibição os inibidores fixam-se reversivelmente à enzima noutro local que não o centro ativo, não diminuindo a sua ação por adição de um excesso de substrato. O inibidor e o substrato podem estar simultaneamente ligados à enzima porque se ligam a sítios diferentes.

Um inibidor não competitivo atua como se retirasse a enzima ativa da solução, levando à diminuição da velocidade máxima, enquanto a afinidade não se altera.

Este tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor.

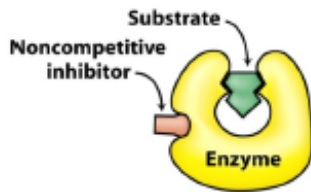


Figura 1.28 – Representação de uma inibição não-competitiva.

- Inibição Reversível Incompetitiva: Neste tipo de inibição, o inibidor liga-se ao complexo ES e não à enzima na forma livre. Neste caso, tanto o K_M como a $V_{máx}$ diminuem e afeta também a afinidade da enzima para o substrato.⁷⁹

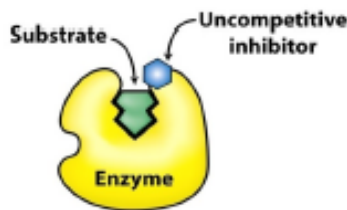


Figura 1.29 – Representação de uma inibição incompetitiva.

1.2.2. Cristalografia de Raios-X

O conhecimento da estrutura tridimensional das proteínas torna-se importante para a compreensão da sua função biológica.

A cristalografia de raios-X permite o estudo da estrutura tridimensional detalhada de macromoléculas biológicas, através da interpretação da difração de raios-X de monocristais. Utiliza-se este tipo de radiação, dado que tal radiação possui comprimento de onda da ordem das distâncias interatômicas (em torno de 1.5Å). Esta característica faz com que moléculas, quando agrupadas num cristal produzam difração e, a partir desta, se consiga determinar um modelo tridimensional para a molécula em estudo.^{80,81}

Esta técnica, contrariamente a outras técnicas utilizadas para determinar estruturas, como é o caso da Ressonância Magnética Nuclear e da Microscopia Eletrónica, tem a vantagem de não estar limitada ao tamanho das moléculas em estudo. Contudo, o sucesso desta técnica depende do desenvolvimento e da obtenção de bons cristais.

De modo a se conseguir obter a estrutura tridimensional de uma proteína é necessário passar por várias etapas, tais como a purificação de uma proteína, partindo da sua extração do organismo original ou de expressão recombinante, a cristalização, a experiência de difração de raios-X, determinação das fases das ondas difratadas, da construção de um modelo inicial da molécula, interpretação dos mapas de densidade eletrónica e por fim, refinamento do modelo e validação da estrutura (Figura 1.30).⁸²

O importante papel que a cristalografia tem assumido no estudo dos mais variados problemas biológicos provém da relação existente entre a estrutura e a função das proteínas.

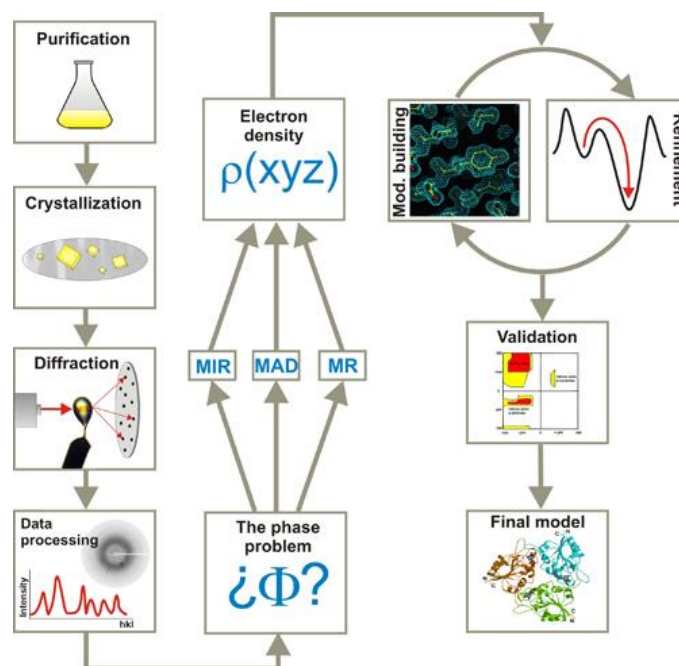


Figura 1.30 – Representação dos principais passos utilizados para a obtenção da estrutura tridimensional de uma proteína por cristalografia de raios-X. Adaptado de http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_07-en

1.2.2.1. Cristalização de proteínas

Um aspeto essencial da cristalografia de raios-X é a obtenção de cristais de alta qualidade, sendo por vezes considerado o passo mais difícil na resolução de uma estrutura cristalográfica. Um cristal é caracterizado por uma estrutura interna ordenada e periódica no espaço tridimensional, constituído por unidades idênticas simples que se repetem em toda a sua estrutura, designadas por células unitárias, levando à formação da chamada rede cristalina. Cada célula unitária é caracterizada por três vetores (a , b , c) e três ângulos (α , β , γ), como representado na Figura 1.31. Estes parâmetros são importantes dado que a sua variação origina diferentes sistemas cristalinos, isto é, diferentes organizações internas no cristal. Por outro lado, a célula unitária é composta por repetições da unidade assimétrica, que se caracteriza pela menor unidade, em que a partir de operações de simetria, permite originar a célula unitária, como representado na Figura 1.32.^{80,81,83-85}

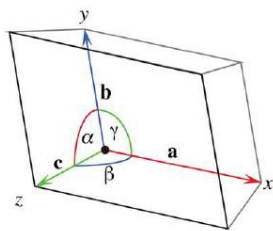


Figura 1.31 – Representação esquemática de uma célula unitária e respectivas constantes.

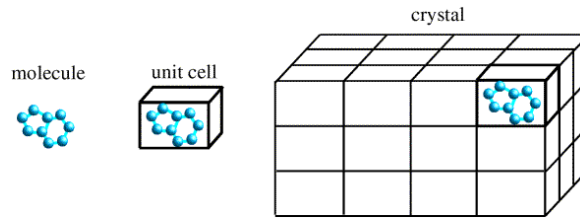


Figura 1.32 – Representação esquemática da unidade assimétrica, da célula unitária e da rede cristalina.

Os melhores cristais são puros, perfeitamente simétricos, reunindo moléculas numa estrutura tridimensional bem organizada. Podem ter diferentes formas, desde cubos perfeitos até agulhas alongadas.

De forma a induzir a cristalização de proteínas é necessário atingir um estado de solubilidade mínima de forma lenta, alcançando-se o grau de sobresaturação. É desejável atingir o ponto de saturação lentamente de modo a facilitar o ordenamento das moléculas na rede cristalina. Os cristais das macromoléculas biológicas devem ser mantidos num ambiente saturado de solvente, caso contrário, a desidratação conduzirá à quebra das ligações fracas (hidrofóbicas e de hidrogénio) e, conseqüente, à destruição dos cristais.^{80,81}

De fato, a análise do diagrama de fases da cristalização (Figura 1.33) revela a existência de duas grandes regiões: não saturada (onde não é possível ocorrer cristalização) e sobresaturada (onde se pode verificar cristalização). Por sua vez, esta última zona pode-se subdividir em três zonas de acordo com o crescente grau de sobresaturação: zona metaestável, zona lábil e zona precipitante.

Isto torna-se importante uma vez que a cristalização ocorre em duas etapas: nucleação e crescimento. A nucleação é o processo que origina a formação de pequenos *clusters* ou núcleos que, na etapa de crescimento, aumentam de volume dando origem ao cristal. No caso em que as condições de nucleação continuam, ocorre a formação de um elevado número de núcleos e conseqüentemente forma-se um precipitado amorfo e não cristalino.^{86,87}

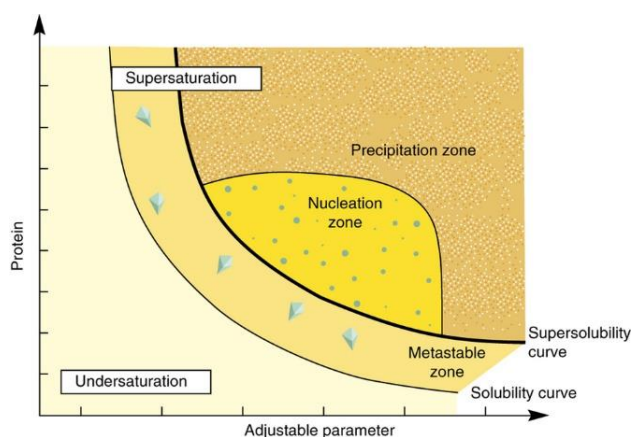


Figura 1.33 – Diagrama de fases da cristalização.

Geralmente, a cristalização de macromoléculas é alcançada através da mistura de uma solução de proteína com uma solução precipitante. Os agentes precipitantes podem ser sais, como o sulfato de amônio, levando à precipitação da proteína pelo processo de *salting out* ou compostos orgânicos, como o caso do polietilenoglicol (PEG), que interagem com os resíduos hidrofóbicos da proteína, levando por vezes à desnaturação da mesma (o que é de evitar).⁸⁰

Para os ensaios de cristalização podem utilizar-se várias técnicas, sendo a mais utilizada o método da difusão de vapor. Nesta técnica, uma gota contendo a proteína a ser cristalizada é equilibrada contra um reservatório que contém uma maior concentração de solução precipitante relativamente à da gota. O equilíbrio ocorre pela difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que se iguale a concentração de precipitante na gota e no reservatório. Posteriormente irá ocorrer uma diminuição do volume da gota e conseqüentemente um aumento da concentração da mesma, levando à sobressaturação da proteína e à sua cristalização.^{80,88,89}

A difusão de vapor tanto pode ser utilizada no método de gota suspensa (*hanging drop*) como no método de gota assente (*sitting drop*). No primeiro caso a gota é suspensa numa lamela acima do reservatório e no segundo a gota é colocada numa microponte, que é depositada dentro do reservatório (Figura 1.34).^{81,90}

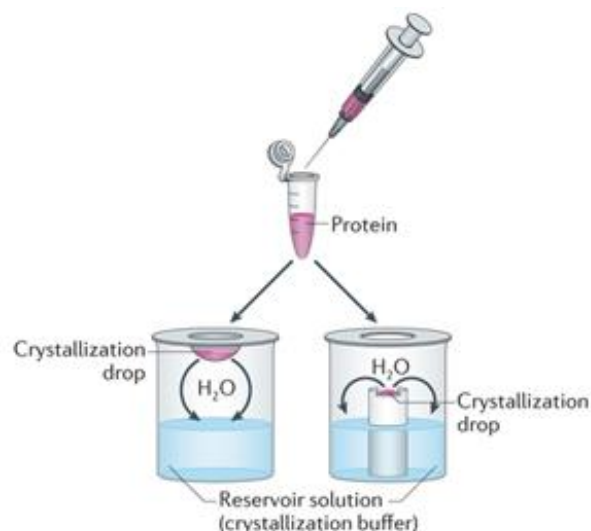


Figura 1.34 – Representação dos dois métodos de difusão de vapor: gota suspensa (à esquerda) e gota assente (à direita).

Existem inúmeras condições de cristalização que são variáveis de proteína para proteína, sendo determinadas através de ensaios de *screening*, em que se variam diversos fatores tais como as concentrações da proteína e dos agentes precipitantes, o pH e a temperatura.

Os estudos de complexos proteína-ligando têm como finalidade a obtenção de cristais do complexo e não somente da proteína. Para isso, existem dois métodos muito utilizados, tais como a co-cristalização, em que a proteína é colocada a incubar com o ligando durante um determinado período de tempo e posteriormente são realizados ensaios de cristalização e o *soaking*, em que o ligando é adicionado diretamente à gota onde se encontram os cristais de proteína.⁹¹

1.2.2.2. Experiência de difração de raios-X

O passo seguinte ao processo de cristalização consiste na difração dos raios-X. Os raios-X são um tipo de radiação eletromagnética que são difratados quando os elétrons transitam de um estado de maior energia para um de menor energia.

A experiência de difração consiste na incidência de um feixe de raios-X sobre o cristal, conforme representado na figura 1.35. A interferência das ondas difratadas pelos pontos individuais que constituem o cristal produz um padrão característico conhecido como padrão de difração. O padrão de difração de raios-X produzido por um monocristal contém informações a respeito do conteúdo e simetria da sua célula unitária e é através dele que se resolve a estrutura tridimensional da molécula cristalizada.^{84,85}

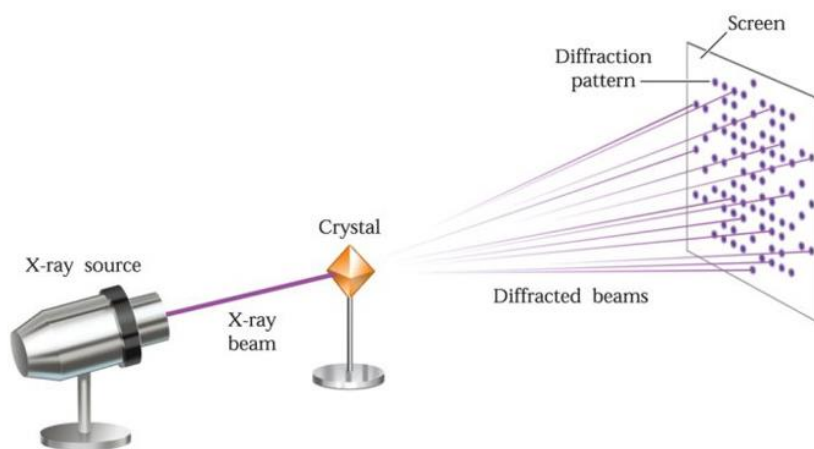


Figura 1.35 – Representação da recolha de dados de uma experiência de difração de raios-X.

Outra forma de gerar raios-X é no sincrotrão. Nesses grandes equipamentos, os elétrons são acelerados a grandes velocidades, próximas à da luz, por campos magnéticos, e ao serem desacelerados, produzem raios-X em vários comprimentos de onda.

É necessário o congelamento prévio dos cristais, com recurso a azoto líquido, de forma a minimizar os danos provocados pela incidência da radiação e ainda a necessidade de congelar os cristais na presença de agentes crio-protetores, uma vez que minimizam a dispersão dos raios-X pelas moléculas de água e impedem a formação de cristais de gelo na superfície do cristal de proteína.⁸⁵

As direções dos raios que são dispersos pelo cristal são caracterizadas por três coordenadas tridimensionais designadas por Índices de Miller (hkl), que estão associados às posições das reflexões obtidas a partir da difração e às suas intensidades (I_{hkl}). Cada reflexão diz respeito a uma onda difratada, caracterizada pelo seu comprimento de onda (λ), amplitude (F) e fase (φ), podendo interferir construtiva ou destrutivamente, isto é, podem-se somar ou anular. Contudo, pela Lei de Bragg, somente as ondas que interferem construtivamente, ou seja, que se encontram em fase, são detetadas no padrão de difração.⁸⁰

A Lei de Bragg é uma forma equivalente de interpretar o fenómeno de difração de raios-X por um cristal. Segundo a Lei de Bragg, para um espaço planar (d) e um ângulo incidente (θ), as ondas interferem construtivamente quando a diferença da distância percorrida é igual a um número inteiro do

comprimento de onda do feixe de raios-X. Contrariamente, se os raios-X incidirem no cristal com um ângulo θ diferente, a Lei de Bragg não se aplica, os raios difratados não estão em fase, interferindo destrutivamente e não se obtém uma reflexão, conforme representado na Figura 1.36.^{89,92}

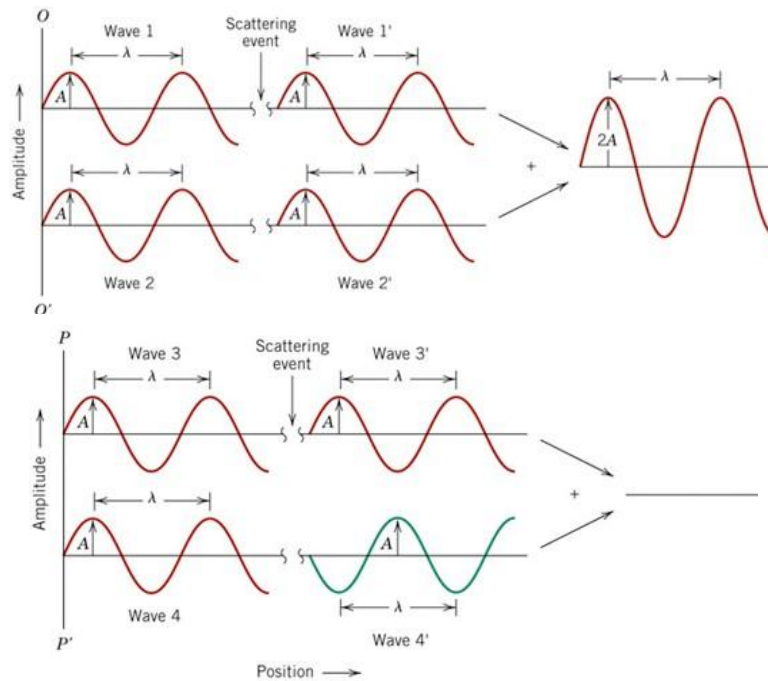


Figura 1.36 – Representação dos tipos de interferência que ocorrem, pela Lei de Bragg. Interferência construtiva (em cima) e interferência destrutiva (em baixo).

Matematicamente, as ondas difratadas (reflexões) são um exemplo de função periódica podendo ser descritas como uma série de Fourier a partir da equação dos fatores de estrutura (F_{hkl}), de modo a determinar o mapa de densidade eletrônica $\rho(x,y,z)$. Os fatores de estrutura determinam o modo como o cristal difrata os raios-X de acordo com a sua organização interna, isto é, de acordo com a posição dos átomos determinada pela densidade eletrônica. A densidade eletrônica descreve o posicionamento dos elétrons na célula unitária permitindo, como referido, a determinação das posições dos átomos (coordenadas no espaço real x,y,z).^{80,89}

Deste modo, pode-se descrever F_{hkl} através da seguinte fórmula, onde V é o volume da célula unitária.

$$F_{hkl} = \int_V \rho(x, y, z) e^{[2\pi i(hx + ky + lz)]} dV \quad (3)$$

Dado que a transformada de Fourier se trata de uma operação reversível, é possível descrever a densidade eletrônica em função dos fatores de estrutura através da seguinte fórmula, onde $|F_{hkl}|$ corresponde à amplitude e α'_{hkl} à fase do fator de estrutura ($\alpha' = \alpha/2\pi$).

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl}^{+\infty} |F(hkl)| \cdot e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\phi(hkl)]} \quad (4)$$

Amplitudes Phases?

A densidade eletrônica, tal como a fórmula sugere, pode ser calculada através do cálculo da amplitude de F_{hkl} e do ângulo da fase. No entanto, somente a primeira é determinada na experiência de difração, a partir das intensidades medidas, surgindo assim o conhecido Problema da Fase em Cristalografia.

1.2.2.3. Resolução da estrutura

A resolução da estrutura cristalográfica de uma determinada molécula consiste na determinação da função densidade eletrônica, que descreve a estrutura tridimensional da molécula no interior da célula unitária do cristal.

De modo a resolver o chamado Problema de Fase, existem diferentes métodos que permitem fazer uma estimativa aproximada das fases, nomeadamente a Substituição Isomórfica Múltipla (MIR), a Dispersão Anómala Múltipla (MAD), a Dispersão Anómala Simples (SAD) e a Substituição Molecular (MR). Os três primeiros requerem a presença de átomos pesados (com número atômico elevado) incorporados ao cristal de proteína e são utilizados quando não há estruturas homólogas.

O método de substituição isomórfica utiliza o fato dos átomos pesados contribuírem mais para o espalhamento quando comparados aos átomos que compõem uma proteína, como por exemplo C, O e N. Este fato permite a determinação das posições dos átomos pesados, a partir das quais é possível calcular as posições dos restantes átomos.

O método de dispersão anómala baseia-se na variação do espalhamento de átomos pesados em função do comprimento de onda, sendo que em SAD apenas se efetuam medições usando um tipo de comprimento de onda, e em MAD o comprimento de onda dos raios-X é ajustável.^{80,83,85}

No caso em que existem estruturas homólogas resolvidas, recorre-se ao método de Substituição Molecular, em que se utilizam as fases de um modelo conhecido de modo a se determinar as fases da proteína em estudo. Após a determinação das fases, é possível obter o mapa de densidade eletrônica inicial, utilizado para construir o modelo. A partir dessa densidade eletrônica é possível melhorar o modelo da proteína e as suas fases, a partir de variados refinamentos. Quanto maior for resolução mais precisa será a posição calculada dos átomos e mais correto será o modelo.⁸⁹

1.2.2.4. Refinamento e validação da estrutura

Normalmente, os modelos iniciais apresentam erros, e como tal recorre-se ao refinamento cristalográfico de modo a corrigir esses erros, de modo a ajustar o modelo construído à densidade eletrónica.

De modo a avaliar a qualidade do modelo construído, recorre-se a vários parâmetros, sendo o mais importante o fator R, que traduz a correlação entre os mapas de densidade eletrónica gerados antes e após o refinamento do modelo, de acordo com a seguinte fórmula:

$$R = \frac{\Sigma||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\Sigma|F_{obs}|} \quad (5)$$

O fator R deve ser o menor possível, de modo a minimizar a diferença entre os valores das amplitudes observadas e das amplitudes calculadas. Assim, quanto menor o seu valor, melhor se adequa o modelo aos dados experimentais.^{80,93}

Normalmente, valores inferiores a 0.2 indicam um bom refinamento da estrutura e consequentemente uma boa resolução. Contrariamente, valores superiores a 0.5 indicam uma estrutura aleatória.

Outro parâmetro utilizado para avaliar a qualidade do modelo é o fator R_{free} , que é calculado de forma semelhante ao fator R, com a diferença que utiliza um número de intensidades (cerca de 5% das reflexões) que são excluídas desde o início do refinamento. Este parâmetro não deve ser superior ao fator R em mais que 5%, caso contrário significa que algum parâmetro foi introduzido incorretamente. Caso haja dados incorretos no modelo, estes só levam à diminuição do fator R, mas não do R_{free} .^{80,93}

Enquanto os fatores R e R_{free} avaliam somente os erros globais do modelo, existem outros parâmetros que detetam erros locais, como é o caso do fator B, também designado por fator temperatura. O fator B representa a vibração de um dado átomo relativamente à sua posição, levando à determinação da mobilidade dos átomos e à deteção de erros no modelo, como referido anteriormente. No caso de um determinado átomo se encontrar numa posição incorreta, o seu fator B será mais elevado relativamente ao dos átomos que estão próximos de si.

Os fatores B devem ter valores superiores na superfície da proteína e em zonas mais móveis, valores inferiores no interior. Normalmente estão relacionados com outro parâmetro utilizado no refinamento e validação da estrutura designado por fator de ocupação. Este fator permite concluir acerca da fração de moléculas no cristal, na qual um determinado átomo se encontra naquela posição. No que diz respeito aos resíduos de proteína, deve ser sempre igual a 1, exceto em situações em que há conformações alternadas na cadeia lateral de um aminoácido.⁸⁰

Após o refinamento, recorre-se à validação onde é avaliada a qualidade do modelo e onde se podem identificar possíveis erros relativos à geometria das moléculas no modelo. Um parâmetro muito comum é o gráfico de *Ramachandran* que permite verificar se todos os aminoácidos apresentam ângulos conformacionais permitidos na sua cadeia principal.

Quando se considera que o modelo satisfaz estes parâmetros e explica bem os dados experimentais, o refinamento dá-se por concluído e é finalmente depositado no PDB.

2. Objetivos

Esta dissertação tem como principal objetivo estudar a interação de variados compostos fornecidos pelo colaborador Dr. John Spencer (University of Sussex, United Kingdom) com diferentes proteínas: tripsina, trombina e uroquinase. Embora os compostos sejam específicos para a uroquinase, é razoável fazer o estudo com a tripsina dado que ambas pertencem à mesma família de proteínas, designadas por proteases de serina e têm o centro ativo muito semelhante.

De modo a avaliar se ocorre ou não inibição das referidas proteínas por parte destes compostos, irá recorrer-se à determinação da cinética enzimática e, para caracterizar estruturalmente essa inibição, cristalografia de raios-X.

A maioria dos estudos realizados neste trabalho irão ser feitos com a tripsina, uma vez que esta proteína é muito utilizada como proteína modelo no que diz respeito à cristalografia de raios-X, pois é muito fácil de cristalizar e normalmente obtêm-se dados de alta resolução. Relativamente à uroquinase, não será possível avaliar a interação destes compostos com a mesma, dado que é necessário primeiramente expressá-la e só após os passos de purificação obter a proteína pura.

Assim, para a tripsina pretende-se caracterizar as interações com os compostos AB11, JS66, JS67, JS68, SR5 e SR8 por cristalografia de raios-X e através de ensaios cinéticos averiguar se os compostos a inibem. Nesta técnica irão utilizar-se os mesmos compostos anteriormente referidos e ainda adicionalmente os compostos AB1, Benzamidina, JS61, JS62 e SR9.

Relativamente à trombina, utilizar-se-á a cinética enzimática para avaliar se esta família de compostos também a inibe. Para isso, selecionou-se o composto JS62 para o estudo, dado que a quantidade de proteína disponível é muito limitada e como tal só é possível realizar um estudo com um dos compostos.

Por fim, no que diz respeito à uroquinase, tem-se como objetivo principal expressar o seu domínio catalítico em *Pichia pastoris*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Tripsina

3.1.1. Otimização de ensaios cinéticos

3.1.1.1. Ensaios cinéticos com o substrato BAEE (N-Benzoil-L-Arginina Etil Ester)

Numa primeira análise para a avaliação da atividade da tripsina, utilizou-se o substrato BAEE (N-Benzoil-L-Arginina Etil Ester), adquirido à Sigma.

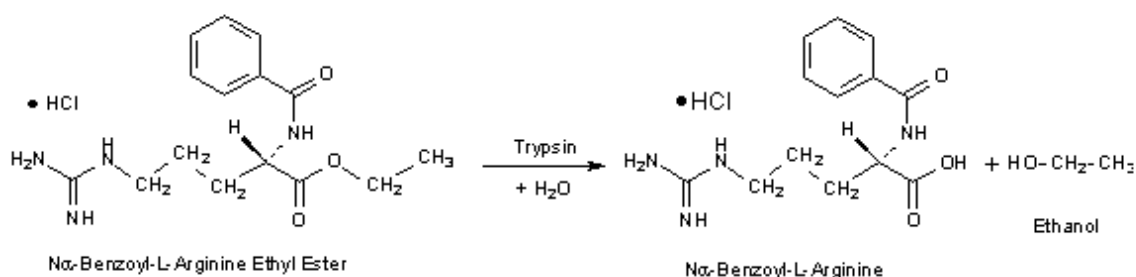


Figura 3.1 – Esquema da reação da tripsina com o substrato BAEE.

Antes de se começar por testar o efeito inibitório dos compostos relativamente à tripsina, foi necessário otimizar as condições utilizadas nos ensaios, nomeadamente as concentrações de substrato, de enzima e de inibidor.

Os ensaios foram realizados utilizando um espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, à temperatura ambiente (25°C), a um comprimento de onda de 253 nm, numa célula de quartzo da Hellma, com um percurso ótico de 1 cm.

Primeiramente utilizou-se uma concentração de tripsina de 0,2 mg/mL dissolvida em 1 mM de HCl e uma concentração de BAEE de 0,25 mM, dissolvido em 0,086 mg/mL de tampão fosfato de sódio a pH 7,6. Os ensaios foram realizados durante 20 minutos, após estabilização do substrato, conforme descrito no protocolo da Sigma-Aldrich.

De modo a otimizar os ensaios cinéticos foram feitas algumas alterações nomeadamente no que diz respeito ao tampão do substrato utilizado.

Foram realizados novos ensaios com o BAEE dissolvido em 50 mM de tampão Tris-HCl a pH 7,6, para uma concentração final de BAEE de 0,005 M.

Dado que não se obteve nenhum resultado com as condições acima descritas, foram feitas novas modificações ao protocolo, por forma a se obterem resultados. Assim, foi utilizada uma nova concentração de tripsina de 0,02 mg/mL dissolvida em 12,5 mM de bicarbonato de amónia e 2% de acetonitrilo.

Após otimização dos ensaios cinéticos com o BAEE, realizaram-se novos ensaios da tripsina na presença de benzamidina, adquirida à Sigma e de compostos derivados de ácidos borónicos. Estes compostos foram fornecidos pelo Dr. John Spencer (University of Sussex, United Kingdom) com quem temos uma colaboração. Os compostos utilizados foram o AB11 (C₉H₁₃BN₂O₂S), o JS67 (C₉H₉F₃N₂S)

e o SR5 (C₈H₁₀N₂S). Para todos os ensaios realizados na presença de inibidores utilizou-se um tempo de incubação de 2 horas.

3.1.1.2. Ensaios cinéticos com o substrato BApNA (N-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida)

Foram realizados novos ensaios cinéticos de modo a avaliar a atividade da tripsina, utilizando o BApNA (N-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida) como substrato, adquirido à Sigma. Este substrato é degradado pela ação da tripsina libertando o produto *p*-nitroanilida, que é detetável espectrofotometricamente a 410 nm.

A reação foi seguida num leitor de placas de 96 poços Molecular Devices Spectra Max 190 utilizando o software SoftMax Pro 6.4.

Começou por se determinar qual o melhor tampão a utilizar para dissolver tanto o substrato como a tripsina. Os tampões utilizados no processo de otimização tanto para o substrato BApNA como para a tripsina encontram-se representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Representação dos tampões utilizados no processo de otimização para o substrato BApNA e para a tripsina.

Tampões Testados	
BApNA	Tripsina
20% DMSO em água	50 mM Tris-HCl a pH 7,5 + 20 mM CaCl ₂
	12,5 mM de bicarbonato de amónia com 2% de acetonitrilo
50 mM Tris-HCl a pH 7,5 + 20 mM CaCl ₂	50mM de fostato de potássio a pH 7,98 1 mM de HCl

Após testarmos todos os tampões tanto para o substrato BApNA como para a tripsina, verificámos que aqueles em que se obtiveram melhores resultados foram com o BApNA dissolvido em 20% de DMSO e a tripsina dissolvida em 50 mM de Tris-HCl a pH 7,5 com 20 mM de CaCl₂.

Todas estas otimizações foram realizadas recorrendo a diversos protocolos de maneira a que pudéssemos escolher as melhores condições.⁹⁵⁻⁹⁹

Foram testadas várias concentrações de BApNA, sendo que após vários ensaios de otimização concluiu-se que as melhores concentrações de substrato foram 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 e 1,25 mM. Não foi possível testar concentrações superiores de BApNA por razões de solubilidade deste.

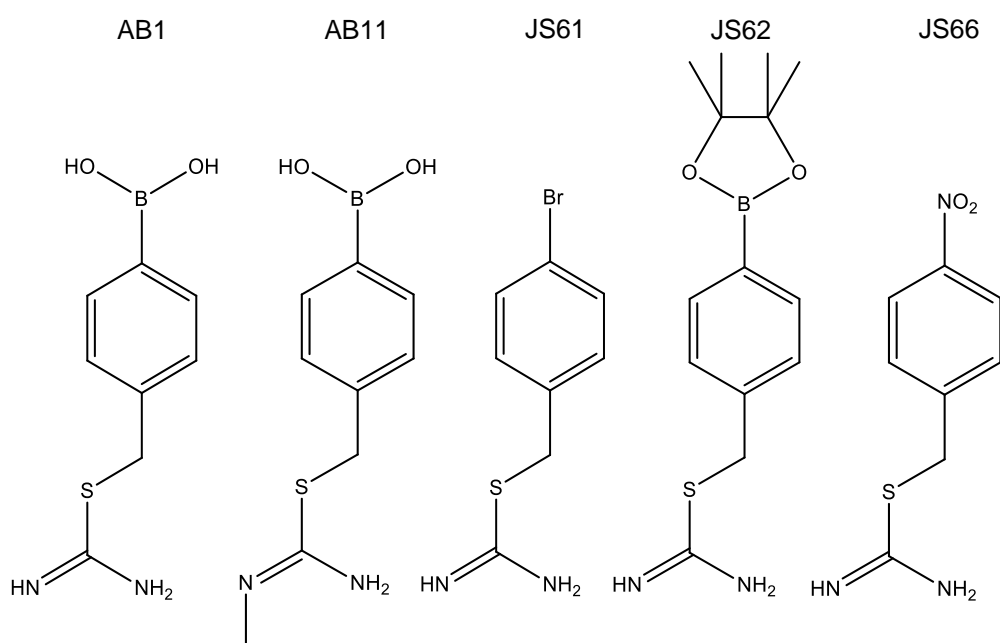
Primeiramente foram realizados vários ensaios onde se foi variando a concentração de substrato e a concentração de enzima ao mesmo tempo. Em ensaios posteriores verificou-se que o melhor seria variar a concentração de substrato e manter a concentração de enzima.

Também foi necessário realizar vários ensaios de modo a otimizar a concentração de tripsina a utilizar. Após várias tentativas, chegou-se à conclusão que a melhor concentração foi de 0,0005 mM.

Em cada poço da placa de 96 poços (Thermo Scientific) foram misturados volumes variáveis tanto de BApNA como de tampão 50 mM de Tris-HCl a pH 7.5 com 20 mM de CaCl₂, de maneira a termos concentrações de BApNA variáveis e um volume fixo de 20 µL de tripsina, para uma concentração final de 0,0005 mM, como referido anteriormente. As leituras foram realizadas a cada 30 segundos, a 410 nm, com agitação de 5 segundos no intervalo de cada leitura, durante 5 minutos antes da adição de tripsina, até que a absorvância estabilizasse e mais 5 minutos após a adição da tripsina, a uma temperatura constante de 37°C. O volume final na placa foi de 280 µL por poço ajustado com o tampão da tripsina. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

No que diz respeito aos ensaios cinéticos da tripsina com os diferentes inibidores, variaram-se os tempos de incubação, sendo que aqueles que apresentaram melhores resultados foi com o tempo de incubação de 30 minutos.

Para estes ensaios utilizou-se primeiramente a benzamidina, por forma a testar as condições e posteriormente os compostos AB11 (C₉H₁₃BN₂O₂S), AB1 (C₈H₁₁BN₂O₂S), JS62 (C₁₄H₂₁BN₂O₂S), SR5 (C₈H₁₀N₂S), JS66 (C₈H₉N₃O₂S), JS61 (C₈H₉BrN₂S), SR8 (C₉H₉N₃S), JS68 (C₁₀H₁₂N₂O₂S), JS67 (C₉H₉F₃N₂S) e SR9 (C₁₀H₁₁N₃S), também fornecidos pelo Dr. John Spencer (University of Sussex, United Kingdom). As suas estruturas encontram-se representadas na Figura 3.2.



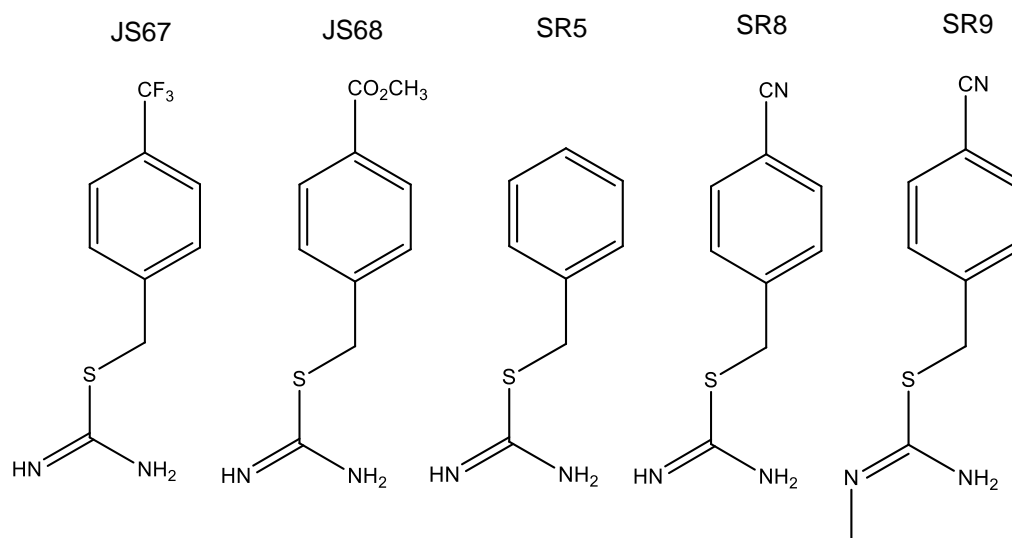


Figura 3.2 – Representação das estruturas dos compostos AB1, AB11, JS61, JS62, JS66, JS67, JS68, SR5, SR8 e SR9.

Também foram realizados inúmeros ensaios por forma a se otimizar as melhores concentrações de inibidores a utilizar. Após várias tentativas, escolheram-se as concentrações de inibidores de 0,05, 0,125, 0,250 e 0,5 mM, comparativamente à concentração de tripsina de 0,0005 mM, no poço.

3.1.1.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten

Os ensaios para obtenção das constantes de Michaelis-Menten (K_m) e das velocidades máximas (V_{max}) para cada inibidor foram realizados com a enzima purificada utilizando o mesmo protocolo descrito na secção 3.1.1.2. As velocidades iniciais para cada concentração foram determinadas a 410 nm para diferentes concentrações do produto da reação, em função do tempo, utilizando-se para os cálculos, o coeficiente de extinção molar específico de $8,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos por meio de regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 6.0 para o Windows.

3.1.2. Ensaios de cristalização

Primeiramente, os ensaios de cristalização foram realizados utilizando duas concentrações de tripsina de 30 e 60 mg/mL respetivamente, incubadas com benzamidina, que é um inibidor muito conhecido da tripsina e dissolvidas em 25 mM de HEPES a pH 7,5, 10 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2) e 10 mg/mL de benzamidina. Foram testadas várias condições de cristalização tais como as condições 4, 15, 16, 20, 28, 30 e 31 do *screen* de cristalização *Crystal Screen* HT da Hampton Research e uma

nova condição análoga à 15 (designada por 15A), com a diferença que em vez de 30% de PEG 8000 utilizou-se 25% (Tabela 3.2).

As cristalizações foram realizadas pela técnica de difusão de vapor, utilizando o método de gota suspensa, com caixas de cristalização de 24 poços (Linbro), em que se adicionou em cada poço 700 µL de solução precipitante e gotas de 2 µl de proteína e 2 µl de solução precipitante a uma temperatura de 20°C, variando a solução precipitante de acordo com o indicado na Tabela 3.2, a fim de verificar quais aquelas em que se obtinham melhores cristais. Pela observação das gotas selecionaram-se as condições 15, constituída por 0,2 M de sulfato de amónio ((NH₄)₂SO₄), 0,1 M de cacodilato de sódio tri-hidratado a pH 6,5 e 30% de PEG 8000, a condição 20 composta por 0,2 M de sulfato de amónio, 0,1 M de acetato de sódio tri-hidratado a pH 4,6 e 25% de PEG 4000 e por último a condição análoga à 15, sendo esta a condição que gera os melhores cristais, de modo a testar a cristalização da tripsina com vários compostos inibidores. A observação das gotas foi feita através de um microscópio ótico Zeiss AxioCam ER_c 5S.

Tabela 3.2 – Condições de cristalização testadas para a tripsina.

*O agente crio-protetor foi utilizado somente na solução crio-protetora, e não na solução precipitante.

Condição	Sal	Tampão	Precipitante	Crio-protetor *
4	-	0,1 M Tris-HCl pH=8,5	2 M Sulfato de amónio	Glicerol 15%
15	0,2 M Sulfato de amónio	0,1 M Cacodilato de sódio pH=6,5	30% PEG 8000	Glicerol 15%
16	-	0,1 M HEPES de sódio	1,5 M Sulfato de lítio	Glicerol 15%
20	0,2 M Sulfato de amónio	0,1 M Acetato de sódio pH=4,6	25% PEG 4000	Glicerol 15%
28	0,2 M Acetato de sódio	0,1 M Cacodilato de sódio pH= 6.5	30% PEG 8000	Glicerol 15%
30	0,2 M Sulfato de amónio	-	30% PEG 8000	Glicerol 15%
31	0,2 M Sulfato de amónio	-	30% PEG 4000	Glicerol 15%
15A	0,2 M Sulfato de amónio	0,1 M Cacodilato de sódio pH=6,5	25% PEG 8000	Glicerol 15%

Foram também realizados ensaios de cristalização da tripsina com determinados inibidores, sendo estes derivados de ácidos borónicos. Os compostos utilizados foram o AB11 (C₉H₁₃BN₂O₂S), o JS67 (C₉H₉F₃N₂S) e o SR5 (C₈H₁₀N₂S), fornecidos pelo Dr. John Spencer (University of Sussex, United Kingdom), como dito anteriormente.

Primeiramente foram realizados *soakings* da tripsina com os compostos mencionados acima, tanto para uma concentração de tripsina de 30 como de 60 mg/mL. No caso do AB11, utilizou-se uma concentração de 23,1 mg/mL, comparativamente à concentração de tripsina de 60 mg/mL. No que diz respeito ao composto JS67, foram realizados ensaios tanto para a concentração de tripsina de 30 mg/mL como também para 60 mg/mL, com concentração de composto de 12 e 24 mg/mL, respetivamente. Por fim, no caso do composto SR5, foram também efetuados ensaios de cristalização para as duas concentrações de tripsina, sendo que as concentrações de compostos foram de 9,36 e

18,72 mg/mL. Todas as soluções dos compostos foram dissolvidas em determinadas soluções precipitantes, tendo em conta aquelas em que se obtiveram melhores cristais. Às gotas de tripsina de interesse foram adicionados 2 µl de cada composto.

Após 24 horas do *soaking*, procedeu-se à transferência dos cristais obtidos com os compostos para uma solução crio-protetora, a fim de evitar a formação de gelo nos cristais, sendo esta solução composta pela mesma solução precipitante, mas com a adição de 15% de glicerol. Posteriormente os cristais foram congelados em azoto líquido.

Ao fim de aproximadamente 12 dias após o *soaking* foi realizado um novo congelamento dos cristais da tripsina com os compostos.

Dado que só os cristais com o composto AB11 difrataram procederam-se a novos ensaios de cristalização com os compostos SR5 e JS67. Estes novos ensaios foram semelhantes aos anteriores, mas as concentrações dos compostos foram alteradas, passando para metade. No caso do composto SR5 utilizaram-se concentrações de 4,65 e 9,3 mg/mL e no composto JS67 concentrações de 6 e 12 mg/mL.

O procedimento foi semelhante ao descrito acima, tendo sido os cristais congelados 2 H, 4 H e 3 dias após o *soaking*.

Um outro método de cristalização utilizado para observar a interação de proteínas com compostos é a co-cristalização. Assim sendo, realizaram-se outros novos ensaios com este método. Para estes novos ensaios utilizou-se uma solução precipitante composta por 0,2 M de sulfato de amónio, 0,1 M de cacodilato de sódio tri-hidratado a pH 6,5 e 25% de PEG 8000.

Para este método foram utilizados os compostos JS66, JS61, SR8, JS68, JS67 e SR9. A concentração de tripsina utilizada foi de 30 mg/mL, dissolvida em 25 mM de HEPES a pH 7,5 e 10 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂) e foi utilizado um rácio de tripsina/inibidor de 40. Os compostos foram colocados a incubar com a tripsina durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, procedeu-se ao congelamento em azoto líquido dos cristais que apresentaram melhores resultados.

3.1.3. Recolha de dados e resolução da estrutura

Os cristais foram analisados por radiação de Sincrotrão nas linhas ID29 e ID13-1 do ESRF (Grenoble, França) e na linha PX III do SLS.

Relativamente aos cristais que difrataram, como foi o caso do cristal com o composto AB11, foram utilizados diferentes programas informáticos. De modo a indexar os dados provenientes da difração do cristal, determinar o grupo espacial, as constantes da célula e as intensidades, recorreu-se ao programa XDS e posteriormente utilizou-se o programa AIMLESS, presente no conjunto de programas do CCP4, de modo a processar e escalar os dados. A fim de determinar quais as fases utilizou-se o programa PHASER, através do método de substituição molecular (MR) e para melhorar as fases recorreu-se ao programa DM e por fim utilizou-se o programa REFMAC5, para o refinamento do modelo, também pertencente ao pacote de programas do CCP4.

Utilizou-se o programa COOT, para visualização e melhoria do modelo molecular e por fim, para a realização das imagens utilizou-se o programa Pymol.

3.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise da interação da tripsina com os inibidores foi realizada também por eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) com gel de separação de 10% e gel de concentração de 4%, sendo as soluções preparadas como descrito no Anexo 7.5, Tabela 7.1.

Inicialmente começou-se por realizar a digestão da BSA com a tripsina, com diferentes tempos de incubação: 1, 4 e 16 H, a 37°C. Utilizou-se uma concentração de BSA de 15 µM e de tripsina de 0,6 µM, dissolvidas em 12,5 mM de bicarbonato de amónia e 2% de acetonitrilo. Relativamente à tripsina com os compostos benzamidina, JS62, AB1 e AB11, colocaram-se as amostras a incubar durante 30 minutos e 2 horas, respetivamente, a 37°C. A concentração de inibidor utilizada foi de 6 µM. No final de cada reação adicionou-se 10 µL de 30% de ácido acético, de modo a parar a reação.

De modo a otimizar qual a melhor temperatura de incubação deixou-se a tripsina a incubar com a benzamidina à temperatura ambiente, no gelo e a 37°C.

As amostras foram aplicadas diretamente no gel e foram preparadas por mistura com o tampão de amostra 6x concentrado, o qual contém SDS e β-mercaptoetanol, e foram posteriormente aquecidas durante 5 minutos a 100°C.

A corrida foi realizada durante aproximadamente 50 minutos, sob corrente de 200 mA e 200 V, utilizando-se uma solução de 0,2 M Tris-HCl a pH 8,8, no compartimento anódico e outra de 0,1 M Tricina, 0,1 M Tris-HCl e 0,1% SDS, no compartimento catódico.

Os géis foram corados para determinação do conteúdo proteico com uma solução de Azul de *Coomassie*, durante cerca de 25 minutos, e de seguida descorados com uma solução aquosa composta por 40% de metanol e 10% de ácido acético.

Testou-se também a digestão da lisozima com a tripsina, em que se utilizou uma concentração de lisozima de 50 mg/mL e concentrações de tripsina de 0,5, 1 e 2 mg/mL. Colocaram-se as amostras a incubar *overnight* a 37°C. O processo foi muito semelhante ao da tripsina com a BSA, com a diferença de que no gel de separação se utilizou 15% em vez de 10% e utilizou-se o corante 2x concentrado em vez de 6x. Ao se inserir as amostras no gel, adicionaram-se diferentes volumes: 1 e 2 µL, respetivamente.

Realizou-se ainda a digestão da hemoglobina com a tripsina, com uma concentração de hemoglobina de 60 mg/mL e de tripsina de 0,5 e 1 mg/mL. Colocaram-se as amostras a incubar durante 1 e 2 horas a 37°C. O restante processo foi análogo ao da digestão da tripsina com a BSA.

3.2. Trombina

3.2.1. Ensaios cinéticos

Os ensaios cinéticos da trombina, que foi adquirida à Sigma, foram realizados com o substrato BApNA, utilizado também nos ensaios com a tripsina. Dado que a quantidade de trombina disponível no laboratório era limitada, optou-se por escolher o inibidor que apresentava melhores resultados com a tripsina, sendo o escolhido o composto JS62.

Os ensaios foram realizados de modo análogo ao descrito na secção 3.1.1.2., em que se utilizaram concentrações finais de composto de 0,05, 0,125, 0,25 e 0,5 mM e uma concentração final de trombina de 0,0015 mM, ambos dissolvidos em tampão 50 mM de Tris-HCl a pH 7,5 e 20 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2). As concentrações de BApNA foram as mesmas que as utilizadas com a tripsina, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 e 1,25mM, respetivamente, dissolvido em 20% de DMSO.

A reação foi seguida num leitor de placas de 96 poços Molecular Devices Spectra Max 190 utilizando o software SoftMax Pro 6.4. Em cada poço foram misturados volumes variáveis tanto de BApNA como de tampão 50 mM Tris-HCl a pH 7,5 com 20 mM CaCl_2 , de maneira a termos concentrações de BApNA variáveis e um volume fixo de 20 μL de trombina com composto, para uma concentração final de 0,0015 mM, como referido anteriormente. No caso dos poços da trombina na ausência de inibidor, utilizou-se um volume de 3 μL de trombina.

As leituras foram realizadas a cada 30 segundos, a 410 nm, com agitação de 5 segundos no intervalo de cada leitura, durante 5 minutos antes da adição de trombina, até que o substrato estabilizasse e mais 5 minutos após a adição de trombina, a uma temperatura constante de 37°C. O volume final na placa foi de 280 μL por poço ajustado com o tampão da trombina. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.2.2. Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados utilizando uma concentração *stock* de trombina de 3,51 mg/mL, dissolvida em 50 mM de citrato de sódio a pH 6,5, 0,2 M de cloreto de sódio (NaCl) e 0,1% de PEG 8000, para uma concentração final de 0,07 mg/mL. Como descrito anteriormente, a quantidade de trombina disponível no laboratório era limitada e como tal utilizou-se somente um composto para verificar se ocorria alguma interação. Assim sendo, utilizou-se o composto AB1, com uma concentração de 0,6 mg/mL, o qual foi incubado com a trombina durante 30 minutos à temperatura ambiente, pelo método da co-cristalização.

Foram utilizadas várias soluções precipitantes, de forma a otimizar quais aquelas que originariam melhores cristais. Para isso, utilizou-se uma solução precipitante com tampão 0,1 M de Tris-HCl a pH 7,5, em que se variou a percentagem de PEG 2000 com MME com valores de 10, 15 e 20%. Uma outra solução precipitante utilizada é composta por 0,1 M de cacodilato de sódio tri-hidratado a pH 6,5 e com diferentes percentagens de PEG 8000, nomeadamente 15, 20 e 25%, respetivamente.

As cristalizações foram realizadas pela técnica de difusão de vapor, utilizando o método de gota suspensa, com caixas de cristalização de 24 poços (Linbro), em que se adicionou em cada poço 700 µL de solução precipitante e gotas de 1 µl de proteína com o composto e 1 µl de solução precipitante a uma temperatura de 20°C, variando a solução precipitante de acordo com o indicado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Condições de cristalização testadas para a trombina.

Tampão	Precipitante
0,1 M de Tris-HCl pH=7,5	10% PEG 2000 MME
0,1 M de Tris-HCl pH=7,5	15% PEG 2000 MME
0,1 M de Tris-HCl pH=7,5	20% PEG 2000 MME
0,1 M de Cacodilato de sódio pH=6,5	15% PEG 8000
0,1 M de Cacodilato de sódio pH=6,5	20% PEG 8000
0,1 M de Cacodilato de sódio pH=6,5	25% PEG 8000

3.3. Uroquinase

3.3.1. *Pichia pastoris*

O sistema de expressão de *Pichia pastoris* está a ser utilizado com sucesso para a produção de várias proteínas heterólogas recombinantes. Os recentes desenvolvimentos no que diz respeito ao sistema de expressão de *Pichia* tiveram um impacto não apenas sobre os níveis de expressão que podem ser alcançados, mas também no que diz respeito à bioatividade de várias proteínas heterólogas.

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, que é regulada pelo promotor induzível do gene que codifica para metanol álcool oxidase - a primeira enzima da via de metanol.

3.3.1.1. Preparação de células competentes de *Pichia pastoris*

Para a preparação das células competentes inoculou-se 10 mL de meio YPD com uma única célula de *Pichia* e colocou-se a incubar durante, aproximadamente, 16 horas a 30°C, 270 rpm. Posteriormente, monitorizou-se o crescimento através da leitura da densidade ótica (O.D.) num espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, a um comprimento de onda de 600 nm (O.D._{600nm}), até que apresentasse um valor entre 0,1-0,2. Para isso, inoculou-se 10 mL da cultura em 50 mL de meio YPD e de seguida deixou-se as bactérias crescerem na incubadora a 30°C, 270 rpm até que a OD_{600nm} atingisse um valor entre 0,6-1,0, que demorou aproximadamente 7 horas.

A leitura da densidade ótica é realizada a 600 nm porque os microrganismos podem conter inúmeras macromoléculas que absorvem a luz. Ao medir a densidade ótica das bactérias por dispersão de luz, o ideal é escolher um comprimento de onda onde a absorção é mínima e, para a maioria das culturas bacterianas, os comprimentos de onda em torno de 600 nm são uma boa alternativa.

Quando a O.D._{600nm} atingiu o valor de 0,85, transferiram-se as células para *falcons* de 50 mL estéreis e centrifugou-se durante 5 minutos a 500 xg, à temperatura ambiente. De seguida, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* de cada *falcon* em aproximadamente 25 mL de 10 mM de bicina-NaOH a pH 8,3, 3% (v/v) de etilenoglicol, 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 M de sorbitol.

Incubou-se a suspensão de células durante 5 minutos a 100 rpm a 30°C e de seguida centrifugou-se o *pellet* de cada *falcon* em 2,5 mL da solução anterior. Após este processo, as células tornaram-se competentes e prontas a serem transformadas. Por fim, fizeram-se alíquotas de 200 µL, em *ependorfs* estéreis de 1,5 mL e armazenou-se a -80°C, para que toda a composição das células permanecesse inalterada, preservando a sua competência e para que a sua viabilidade fosse mantida por tempo indefinido.

3.3.1.2. Transformação de células competentes em *Pichia pastoris*

A transformação de bactérias consiste na introdução de um vetor plasmídico, que contenha o gene de interesse em bactérias desprovidas de qualquer DNA desta natureza (bactérias competentes). O objetivo desta técnica consiste em obter milhares de cópias do vetor introduzido na bactéria e, assim, do gene de interesse.

O DNA foi obtido a partir da empresa Nzytech, que procedeu à síntese do fragmento e o inseriu no vetor pretendido (pNIC706), em que o mapa se encontra em anexo (Anexo 7.4).

Para se poder inserir o DNA plasmídico na levedura *Pichia pastoris* é necessário linearizá-lo. Para isso, digeriu-se o DNA com uma enzima de restrição, a Sal I, dado que direciona a integração do vetor para a região 5' do gene *HIS4* por recombinação homóloga. Primeiramente, colocou-se 6 µL de DNA a incubar com 3 µL da enzima de restrição durante aproximadamente 5 horas a 37°C. De seguida, procedeu-se à digestão do DNA com a enzima de restrição, adaptado do protocolo PCR-Clean Up da Nzytech.

Posteriormente, realizou-se um gel de 0,8% de agarose, de modo a se verificar se as bandas estavam no peso molecular certo da proteína.

Para a transformação das células competentes, descongelou-se uma das alíquotas de células competentes, colocou-se em gelo e de seguida, à chama, transferiu-se 50 µL dessas células competentes para um *ependorf* esterilizado de 2 mL e adicionou-se 50 µL do DNA linearizado e 1,4 mL de 40% de PEG e 200 mM de bicina a pH 8,3 e inverteu-se. Colocou-se a incubar a 30°C durante 1 hora, e foi-se invertendo a cada 15 minutos.

Após esse tempo, submeteram-se as células a um banho a 42°C durante 10 minutos, dividiu-se o volume de solução em dois *ependorfs* esterilizados de 2 mL e adicionou-se a cada um 1 mL de meio YPD. Colocou-se a incubar a 30°C por mais 1 hora.

De seguida, centrifugou-se durante 5 minutos a 3000 xg, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* de cada *ependorf* em 500 µL de 150 mM de cloreto de sódio (NaCl) e 10 mM de bicina a pH 8,3. Colocou-se tudo num só tubo. Centrifugou-se novamente durante 5 minutos a 3000 xg, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL da solução anterior. Por

fim, adicionaram-se os 100 µL a uma placa de YPDS com zeocina 100 µg/mL e deixou-se a incubar a 30°C durante 3 dias.

3.3.1.3. Determinação do fenótipo dos transformantes positivos

De modo a se determinar se o fenótipo das colónias positivas era Mut^s ou Mut^t repicaram-se as colónias para placas de MM (meio mínimo de metanol), contendo 1,34% de YNB, 4x10⁻⁵% de biotina e 0,5% de metanol e placas de MD (meio mínimo de dextrose), contendo 1,34% de YNB, 4x10⁻⁵% de biotina e 2% de dextrose, ambas contendo 100 µg/mL de zeocina. As placas foram mantidas a 30°C, durante aproximadamente 2 dias.

3.3.1.4. Avaliação da expressão em *Pichia pastoris*

Para se saber quais as condições ótimas de crescimento, selecionaram-se seis colónias transformantes, contendo o plasmídeo de interesse (pPNIC706+uPA) para os pré-inóculos em 25 mL de meio de cultura BMGY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potássio a pH 6,0, 1,34% de YNB (*yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids*), 4x10⁻⁵ de biotina e 1% de glicerol), em *erlenmeyers* de 250 mL e colocou-se a incubar numa incubadora 1s-971R da Lab Companion durante aproximadamente 16 horas, a 30°C, 250 rpm.

Posteriormente monitorizou-se o crescimento através da leitura da densidade ótica a 600 nm no espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201 até que atingisse um valor entre 2-6. Quando a O.D._{600nm} apresentou um valor próximo de 2, adicionou-se aproximadamente 100 mL de meio BMMY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potássio a pH 6,0, 1,34% de YNB, 4x10⁻⁵ de biotina e 0,5% de metanol) a cada pré-inóculo e adicionou-se também zeocina 100 µg/mL. De seguida, centrifugou-se durante 5 minutos a 3000 xg à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 20 mL de meio BMMY.

Posteriormente transferiu-se o volume de cada pré-inóculo para *erlenmeyers* de 1 L e para induzir a expressão, transferiu-se 1 mL da cultura para um *ependorf* de 1,5 mL, centrifugou-se na velocidade máxima durante 3 minutos à temperatura ambiente, sendo esse tempo considerado o T0 da expressão. Transferiu-se o sobrenadante para outro *ependorf* de 1,5 mL e guardaram-se os tubos a -80°C, passando primeiramente por azoto líquido. A indução da expressão foi realizada durante aproximadamente 120 horas. Durante esse período, a cada 24 horas foi adicionado metanol 100% para uma concentração final de 0,5%, para manter a indução dos transformantes.

De modo a se determinar a análise da secreção da proteína heteróloga, realizaram-se várias colheitas dos sobrenadantes e dos *pellet* das culturas nos intervalos de 5, 18, 28, 42, 52, 73, 100 e 120 horas, dos quais se centrifugou 1 mL e que foram posteriormente sujeitos a choque térmico com azoto líquido e guardados a -80°C para posteriores análises por SDS-PAGE.

3.3.1.5. Análise dos tempos de indução da expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

De modo a avaliar qual o melhor tempo de indução da expressão da uroquinase em *Pichia Pastoris*, foram realizados géis de poliacrilamida, com gel de separação de 10% e gel de concentração de 4%, sendo as soluções preparadas como descrito no Anexo 7.5, Tabela 7.1.

As amostras a utilizar foram as alíquotas de sobrenadante que se encontravam guardadas a -80°C, para cada colónia.

As amostras foram aplicadas diretamente no gel e foram preparadas por mistura com o tampão de amostra 6x concentrado, o qual contém SDS e β -mercaptoetanol, e foram posteriormente aquecidas durante 5 minutos a 100°C.

A corrida foi realizada durante aproximadamente 40 minutos, sob corrente de 200 mA e 200 V, utilizando-se uma solução de 0,2 M Tris-HCl a pH 8,8, no compartimento anódico e outra de 0,1 M Tricina, 0,1 M Tris-HCl e 0,1% SDS, no compartimento catódico.

Os géis foram corados para determinação do conteúdo proteico com uma solução de Azul de *Coomassie*, durante cerca de 25 minutos, e de seguida descorados com uma solução aquosa composta por 40% de metanol e 10% de ácido acético.

3.3.1.6. Sobre-expressão em *Pichia pastoris*

Determinadas as condições ótimas de sobre-expressão da uPA, realizou-se um crescimento em larga escala, de modo a obter quantidades de proteína adequadas ao desenvolvimento dos estudos subsequentes de caracterização.

Deste modo, seleccionou-se uma colónia transformante para o pré-inóculo em 25 mL de meio de cultura BMGY, e, posteriormente, colocou-se a incubar numa incubadora 1s-971R da Lab Companion, a 250 rpm a 30°C, durante aproximadamente 16 horas, até que atingisse um valor de O.D._{600nm} entre 2-6.

Quando a O.D._{600nm} apresentou um valor próximo de 5,5, adicionou-se aproximadamente 1 L de meio BMGY aos 25 mL de cultura e colocou-se novamente a incubar a 30°C, 250 rpm até que a O.D._{600nm} atingisse um valor entre 2-6, que demorou aproximadamente 20 horas, com um valor próximo de 5.

Seguidamente centrifugou-se a 3000 xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. De modo a induzir a expressão, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 1/5 do volume da cultura com meio BMMY. Transferiu-se a cultura para um *erlenmeyer* de 1 L e deixou-se a incubar a 30°C, 250 rpm, durante 4 dias. A cada 24 horas adicionou-se 100% metanol, a fim de termos uma concentração final de 0.5%. Após esse tempo, centrifugou-se a 3000 xg durante 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente descartou-se o sobrenadante e guardou-se o pellet a -80°C.

4. Resultados e Discussão

4.1. Tripsina

Realizaram-se diversos estudos tanto por cristalografia de raios-X como por cinética enzimática, a fim de estudar a interação da tripsina com vários inibidores específicos para a uroquinase, dado que esta proteína pertence à mesma família da uroquinase e é uma das proteínas muito estudadas em estudos cristalográficos.

4.1.1. Ensaios cinéticos

Um dos principais objetivos desta tese foi o desenvolvimento de um método para determinação da atividade enzimática da tripsina na ausência e na presença de inibidores derivados de ácidos borônicos. Tendo em conta as informações retiradas na literatura, um substrato muito utilizado para avaliar a atividade da tripsina é o BApNA (N-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida), que foi adquirido à Sigma, tendo sido esse o escolhido.⁹⁴⁻⁹⁸ A tripsina utilizada neste estudo foi a tripsina do pâncreas bovino da Panreac AppliChem.

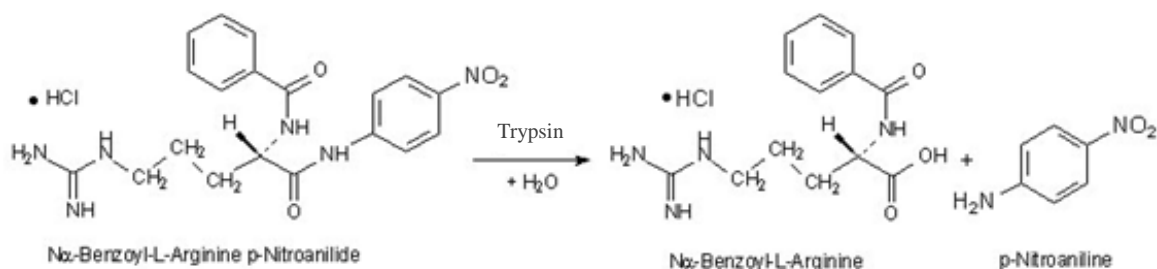


Figura 4.1 – Esquema da reação da tripsina com o substrato BApNA.

Realizaram-se vários ensaios de modo a ajustar tanto a concentração de BApNA como as concentrações de tripsina e de inibidores e ainda determinar qual o melhor tampão a utilizar em cada um. Assim sendo, após várias tentativas, selecionaram-se algumas concentrações e tampões, que se encontram representados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Representação das concentrações de BApNA, inibidores e tripsina utilizadas nos ensaios cinéticos.

[BApNA] (mM) em 20% DMSO	[Tripsina] (mM) em 50mM Tris-HCl + 20mM CaCl ₂	[Inibidor] (mM) em 50mM Tris-HCl + 20mM CaCl ₂
0,1	0,0005	-
0,25		0,05
0,5		0,125
0,75		0,25
1		0,5
1,25		-

Primeiramente a tripsina foi incubada com cada inibidor durante 30 minutos à temperatura ambiente e de seguida realizaram-se os ensaios cinéticos durante 5 minutos, de modo a que o substrato BApNA estabilizasse. Após esse período, adicionou-se a tripsina incubada com o inibidor e seguiu-se a reação a 410 nm durante 5 minutos, verificando-se um aumento da absorvância. A partir dos gráficos da concentração de produto de reação em função do tempo e do coeficiente de extinção molar específico do produto formado, *p*-nitroanilida, ($8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi possível calcular o declive de cada curva, correspondente à velocidade inicial, de forma a termos um gráfico da velocidade inicial em função da concentração de BApNA, conforme representado nas figuras seguintes.

Conforme referido na secção 3.1.1.2, todos os ensaios foram realizados em triplicado, sendo que os resultados obtidos são uma média das três repetições.

De modo a determinar a afinidade dos compostos para com a tripsina e identificar a sua capacidade de inibição, procedeu-se ao cálculo de determinados parâmetros cinéticos, tais como K_M , $V_{\text{máx}}$ e K_i , conforme se poderá observar mais à frente.

O primeiro inibidor a ser testado foi a benzamidina, dado que é um composto muito utilizado para o estudo da interação com a tripsina. Para tal, realizaram-se ensaios cinéticos a diferentes concentrações de substrato de modo a pudermos visualizar o gráfico de Michaelis-Menten para este inibidor.

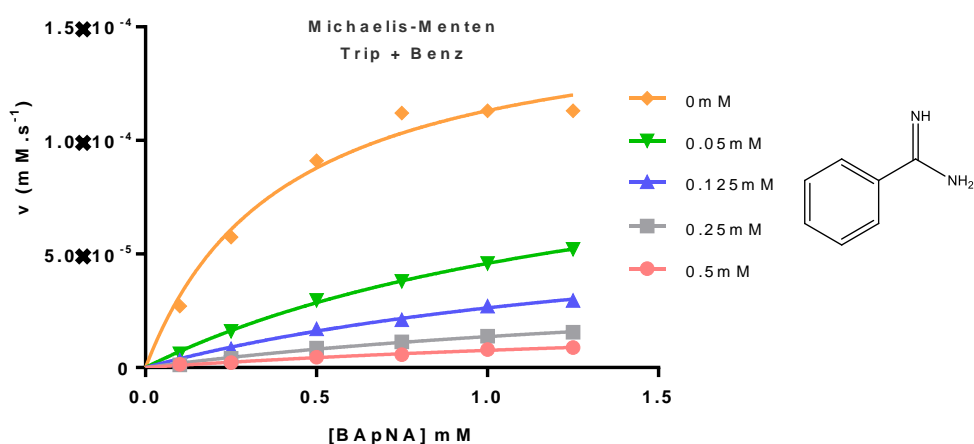


Figura 4.2 – Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do BApNA catalisado pela tripsina com uma concentração de 0,0005 mM e com diferentes concentrações de benzamidina. Os pontos são experimentais e as curvas foram calculadas por regressão não linear.

A equação de Michaelis-Menten representa o efeito da concentração de substrato relativamente à velocidade inicial de uma reação enzimática.

O gráfico da Figura 4.2 representa o efeito da inibição da tripsina pela benzamidina e permite avaliar a influência da adição da benzamidina na atividade da tripsina. Pela sua visualização verifica-se que a tripsina na presença da benzamidina segue uma cinética de Michaelis-Menten, sendo possível visualizar que, há medida que se aumenta a concentração de benzamidina, ocorre uma diminuição da velocidade inicial e consequentemente um decréscimo da atividade da tripsina, o que significa que quanto maior a concentração de benzamidina, maior será a inibição da tripsina. Relativamente às curvas, verifica-se que vão aumentando à medida que se aumenta a concentração de BApNA, que

corresponde à libertação do produto p-nitroanilida a 410 nm, consequente da hidrólise do BApNA sob a ação da tripsina.

A baixas concentrações, o BApNA que existe em solução é hidrolisado mais rapidamente do que a concentrações mais elevadas, levando a um aumento da velocidade até um valor máximo que de seguida se mantém constante. Este máximo atingido, corresponde à hidrólise da totalidade das moléculas de BApNA, sendo que a partir desse valor, a velocidade diminui.

Posteriormente, procedeu-se à linearização de Lineweaver-Burk, de modo a determinar qual o tipo de inibição que ocorreu e consequentemente, determinar os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$, K_M e K_i . Os resultados obtidos indicam tratar-se de uma inibição competitiva dado que as retas se cruzam no eixo das ordenadas. Foi necessário desprezar a linearização correspondente à concentração de 0,5 mM de benzamidina, dado que os resultados obtidos eram incoerentes, não sendo possível realizar a linearização.

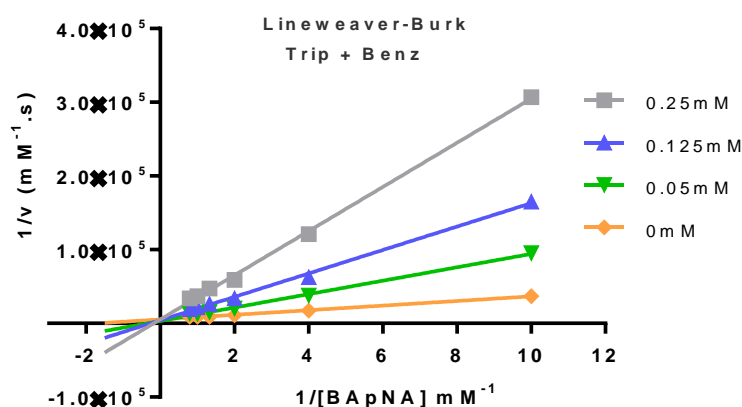


Figura 4.3 – Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição da tripsina com uma concentração de 0,0005 mM pela benzamidina na presença do substrato BApNA. As linhas foram calculadas por regressão linear. Os pontos são experimentais.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, recorreu-se ao programa GraphPad Prism 6.0. Os valores correspondentes aos parâmetros cinéticos determinados para a tripsina complexada à benzamidina, encontram-se representados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos obtidos da hidrólise do substrato BApNA pela tripsina na presença de benzamidina e comparação com os valores teóricos.

	K_M (mM)	V_{max} (mM.s ⁻¹)	K_i (mM)
Benzamidina	0,403 ± 0,04	1,587E-04 ± 5,78E-6	0,010 ± 7,89E-04
	0,757 ± 0,045 ^a	-	0,035 ^b

^a Nakata, Ishii 1972

^b Markwardt, Landmann, Walsmann 1968

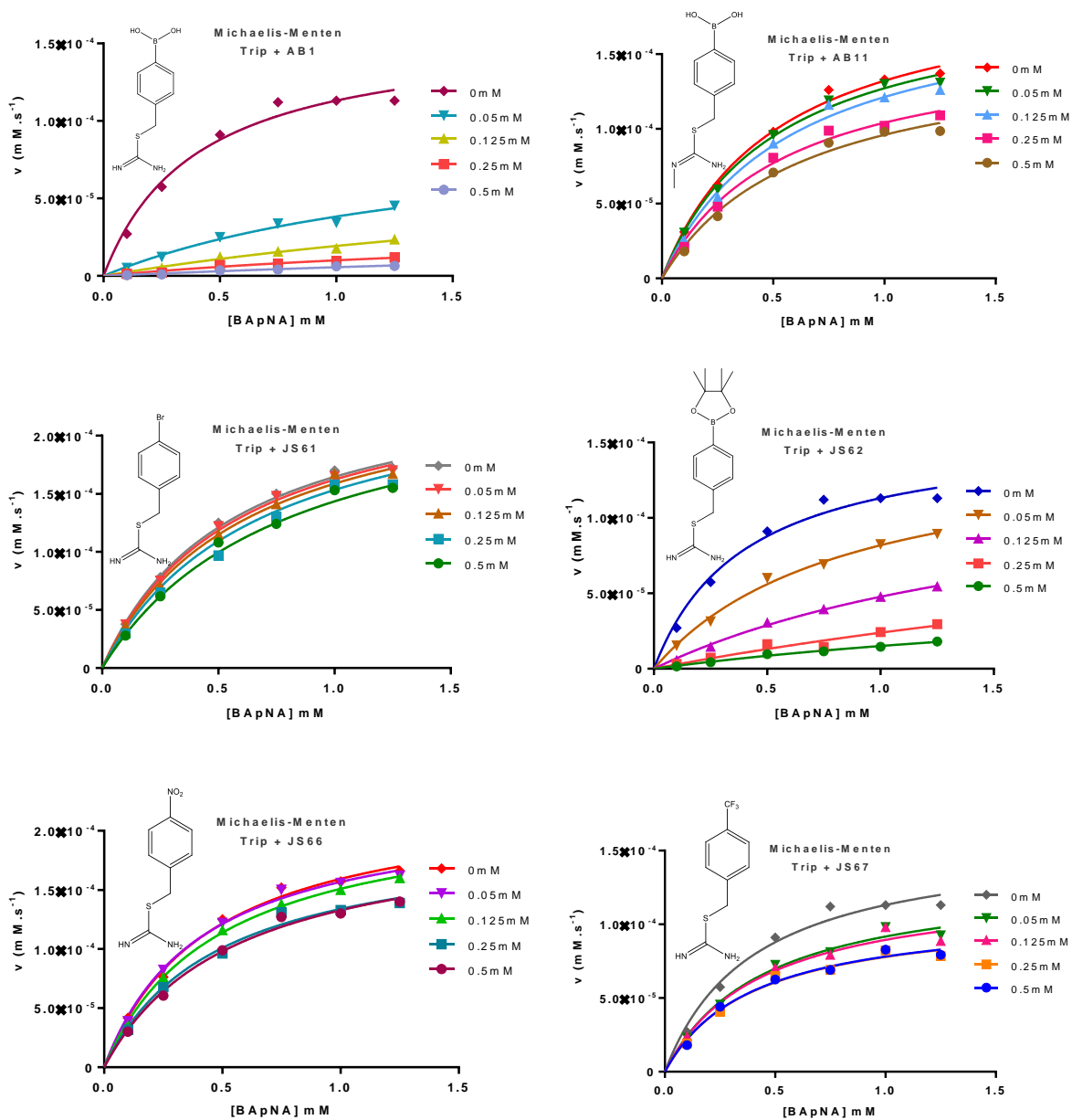
O valor de K_M obtido, na mesma ordem de grandeza que o reportado na literatura⁹⁹, é baixo, o que mostra que a tripsina tem bastante afinidade pelo substrato, pois quanto menor este valor, maior a adaptação do substrato ao centro ativo da tripsina. Relativamente ao valor de $V_{\text{máx}}$, que corresponde

à eficiência catalítica da tripsina, verifica-se que apresenta um valor muito baixo, o que corresponde a uma baixa eficiência catalítica.

A benzamidina é uma amida aromática sintética que, conforme descrito por outros autores, inibe de forma competitiva a tripsina. O valor de K_i obtido neste trabalho foi de 0,010mM, o que está de acordo com a literatura²², indicando que a benzamidina é um forte inibidor da tripsina.

As experiências com a benzamidina permitiram aferir o método experimental de determinação da atividade enzimática da tripsina e constantes de inibição de modo a poder ser aplicado para os compostos em estudo e cujo efeito de inibição da tripsina é ainda desconhecido.

Os gráficos de Michaelis-Menten para a inibição da tripsina pelos compostos AB1, AB11, JS61, JS62, JS66, JS67, JS68, SR5, SR8 e SR9 encontram-se representados na Figura 4.4.



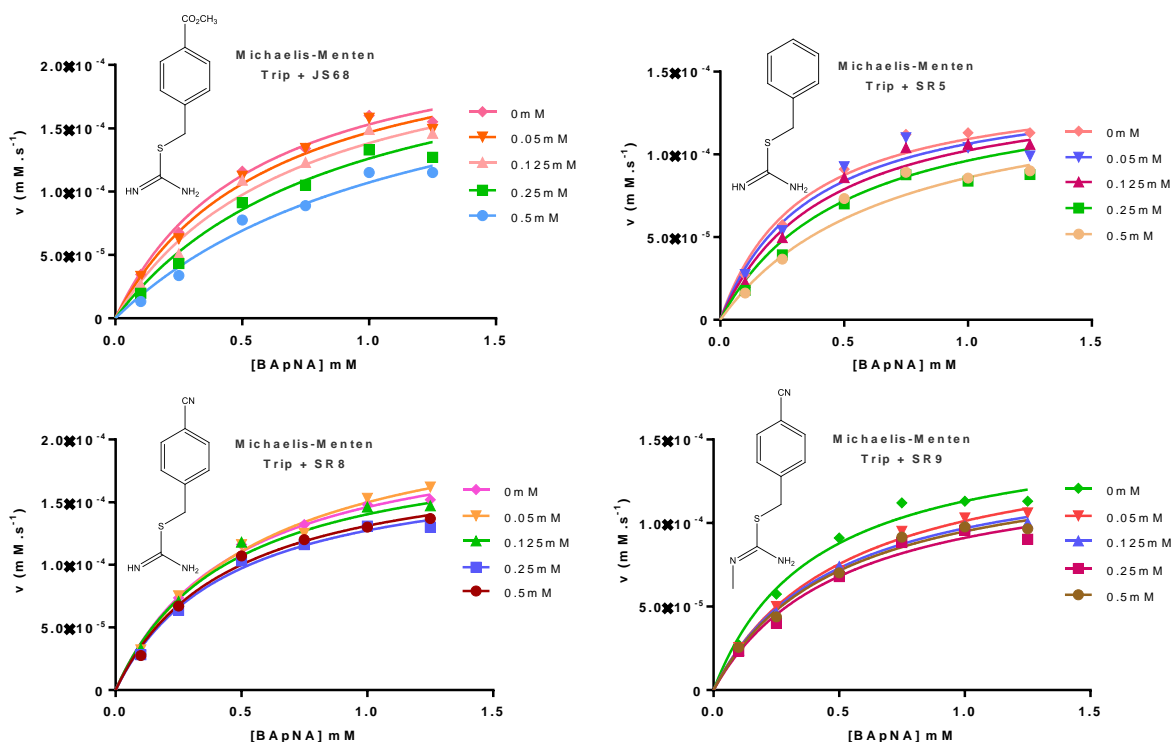


Figura 4.4 – Gráficos de Michaelis-Menten para a hidrólise do BApNA catalisado pela tripsina com uma concentração de 0,0005 mM para os diferentes inibidores utilizados. Os pontos são experimentais e as curvas foram calculadas por regressão não linear.

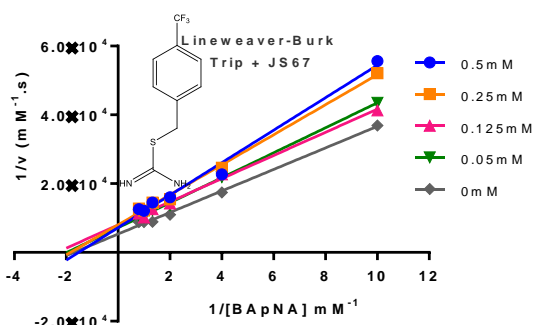
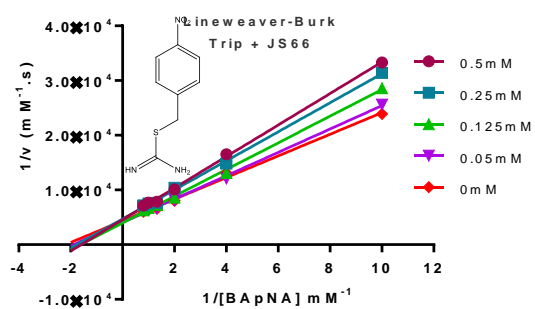
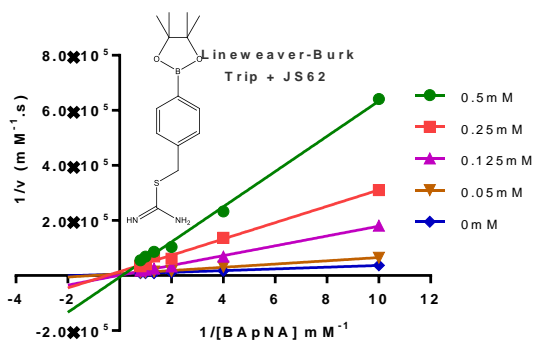
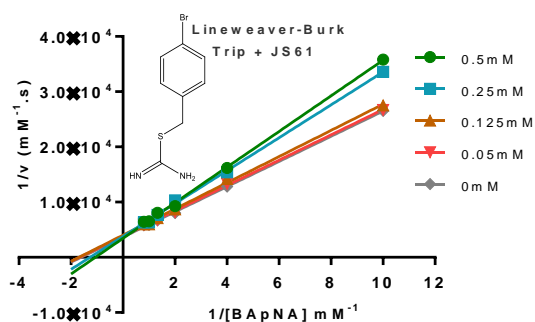
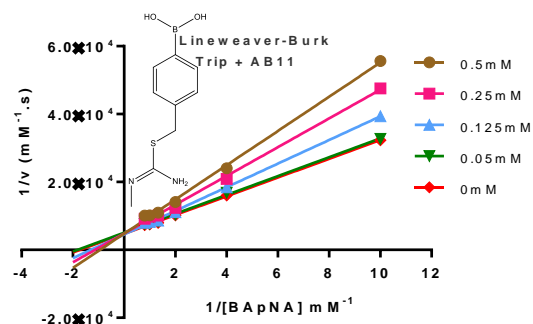
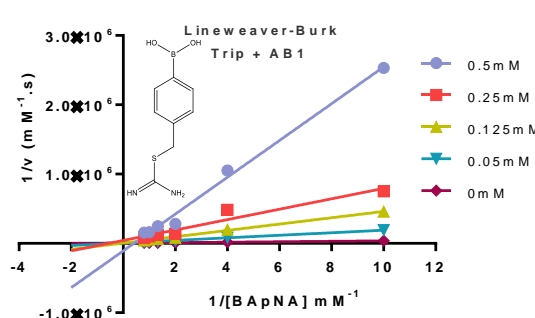
Para o caso dos compostos AB1, AB11, JS62, JS67 e JS68 é possível visualizar a influência da adição destes inibidores na atividade da tripsina. De modo análogo ao ensaio da tripsina com a benzamida, verifica-se que quanto maior a concentração de inibidor, menor a velocidade de reação, ou seja, menor será a atividade da tripsina e conseqüentemente maior será a inibição da tripsina por estes compostos. Nos restantes casos não é possível visualizar uma grande influência no que diz respeito à atividade da tripsina, dado que praticamente não se observa uma diminuição da velocidade de reação há medida que se aumenta a concentração de inibidor.

Comparando os resultados obtidos para cada inibidor, verifica-se que no que diz respeito ao gráfico da tripsina com o composto AB1, houve um maior decréscimo na velocidade de reação da tripsina sozinha em relação à tripsina com o inibidor do que com os restantes inibidores. No caso do composto JS62, assim como com os compostos AB11 e JS67, houve uma gradual diminuição da velocidade da reação da tripsina sozinha e quando complexada ao inibidor. Isto significa que é necessário uma maior concentração de composto JS62, AB11 e JS67 do que de AB1 para inibir a tripsina, ou seja, o composto AB1 inibe mais a tripsina do que os compostos JS62, AB11 e JS67. Isto pode ser comprovado a partir dos valores de K_i obtidos a partir da linearização das curvas obtidas (Tabela 4.3).

Relativamente aos compostos SR5 e JS68, é possível visualizar um ligeiro decréscimo na velocidade de reação à medida que se aumenta a sua concentração. Contudo, dado que o decréscimo não é significativo, não se podem retirar conclusões completamente fiáveis em termos de inibição, pois não se visualiza de maneira clara a variação da velocidade de reação relativamente às concentrações

de inibidor. O mesmo se verifica para os compostos JS61, JS66, SR8 e SR9, sendo nestes casos o decréscimo ainda menor.

As respetivas linearizações encontram-se representadas na Figura 4.5. A análise dos valores obtidos mostra que se trata de uma inibição competitiva em todos os compostos, dado que as linearizações se interseçam no eixo das ordenadas. Contudo, no caso dos compostos JS61, JS66, SR9, SR5 e SR8 não se pode inferir com grande certeza o tipo de inibição dado que não se sabe se ocorre ou não inibição.



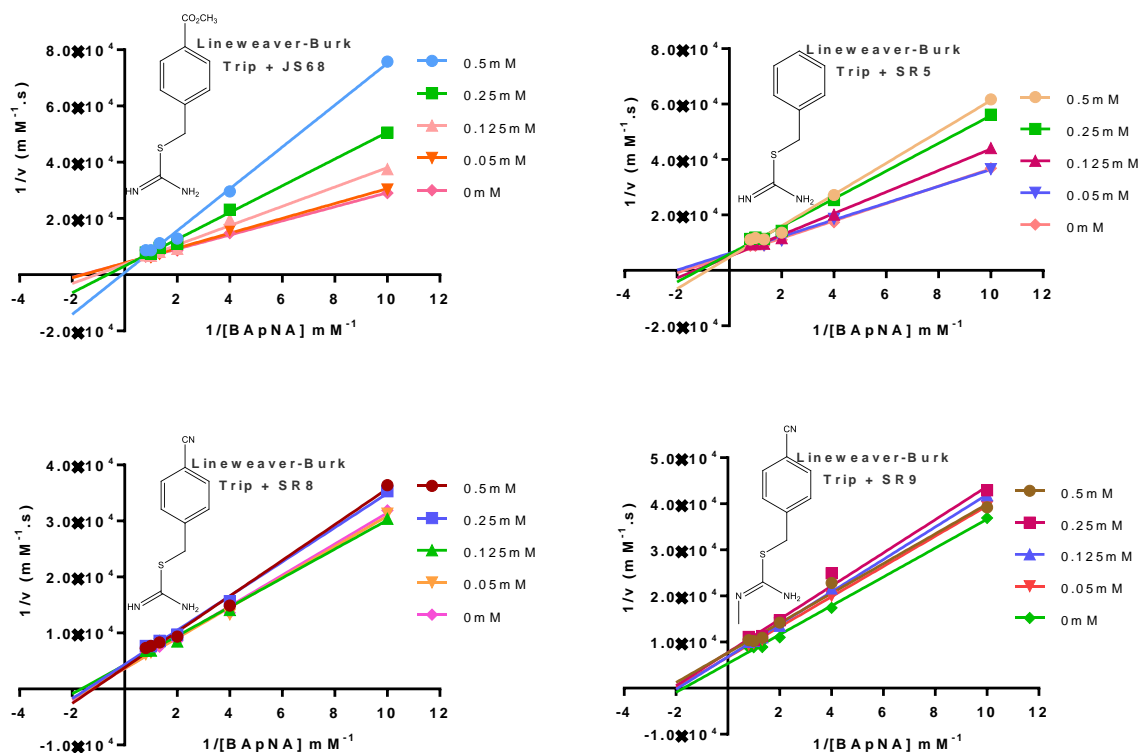


Figura 4.5 – Gráficos de Lineweaver-Burk da inibição da tripsina com uma concentração de 0,0005 mM pelos diferentes inibidores utilizados, na presença do substrato BApNA. As linhas foram calculadas por regressão linear. Os pontos são experimentais.

A partir de cálculos efetuados através de uma regressão linear, foi possível retirar os valores das constantes cinéticas e os correspondentes erros para os vários compostos em estudo, que se encontram representados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos da hidrólise do substrato BApNA pela tripsina para os diferentes inibidores testados.

	K_M	$V_{m\acute{a}x}$	K_i
Trip_Benz	$0,403 \pm 0,04$	$1,587E-04 \pm 5,78E-6$	$0,010 \pm 7,89E-04$
Trip_AB1	$0,400 \pm 0,04$	$1,583E-04 \pm 6,00E-6$	$0,007 \pm 6,14E-04$
Trip_AB11	$0,520 \pm 0,04$	$2,010E-04 \pm 6,82E-6$	$0,430 \pm 0,06$
Trip_JS61	$0,561 \pm 0,04$	$2,570E-04 \pm 7,78E-6$	$1,225 \pm 0,21$
Trip_JS62	$0,399 \pm 0,07$	$1,611E-04 \pm 1,03E-5$	$0,026 \pm 3,49E-03$
Trip_JS66	$0,394 \pm 0,03$	$2,191E-04 \pm 6,47E-6$	$0,702 \pm 0,11$
Trip_JS67	$0,330 \pm 0,06$	$1,339E-04 \pm 8,41E-6$	$0,364 \pm 0,10$
Trip_JS68	$0,555 \pm 0,07$	$2,379E-04 \pm 1,27E-5$	$0,417 \pm 0,06$
Trip_SR5	$0,332 \pm 0,06$	$1,455E-04 \pm 8,17E-6$	$0,460 \pm 0,12$
Trip_SR8	$0,428 \pm 0,04$	$2,064E-04 \pm 7,84E-6$	$1,345 \pm 0,40$
Trip_SR9	$0,415 \pm 0,06$	$1,481E-04 \pm 7,39E-6$	$0,985 \pm 0,32$

A partir da análise da tabela, verifica-se que os valores obtidos para o K_M , que traduz a afinidade da tripsina pelo substrato, no caso da tripsina com a benzamidina são semelhantes aos obtidos na

presença dos diferentes inibidores, o que significa que em termos de afinidade da tripsina pelo substrato tanto na presença de benzamidina como na dos restantes compostos, a afinidade é muito semelhante. Isto acontece dado que se trata da mesma enzima em estudo, a tripsina, e assim sendo, apesar de terem sido realizados ensaios diferentes, o esperado é que os valores sejam todos semelhantes entre si. O mesmo acontece para os valores de $V_{m\acute{a}x}$, que estão relacionados com a eficiência catalítica da tripsina, sendo todos semelhantes entre si. Assim, verifica-se que em todos os casos tanto a eficiência catalítica da tripsina como a afinidade da tripsina pelo substrato BApNA são idênticas nos diferentes inibidores testados.

Relativamente aos valores de K_i , sendo este o parâmetro de maior interesse para uma comparação entre os inibidores verifica-se que o inibidor que traduz uma maior inibição da tripsina é o AB1, dado que é aquele que apresenta um menor K_i . Contrariamente, aquele que corresponde a uma menor inibição da tripsina é o SR8.

No que diz respeito aos compostos AB11, JS67, JS68 e SR5 é possível visualizar que os valores de K_i são semelhantes, quer isto dizer que a inibição da tripsina por parte destes quatro inibidores é semelhante. Comparando com os outros inibidores anteriores, verifica-se também que inibem mais que os compostos SR8, JS66 e JS61 e menos que os compostos JS62, AB1 e benzamidina. Estes três últimos compostos, também apresentam valores de K_i semelhantes, o que significa que a inibem a tripsina de forma semelhante.

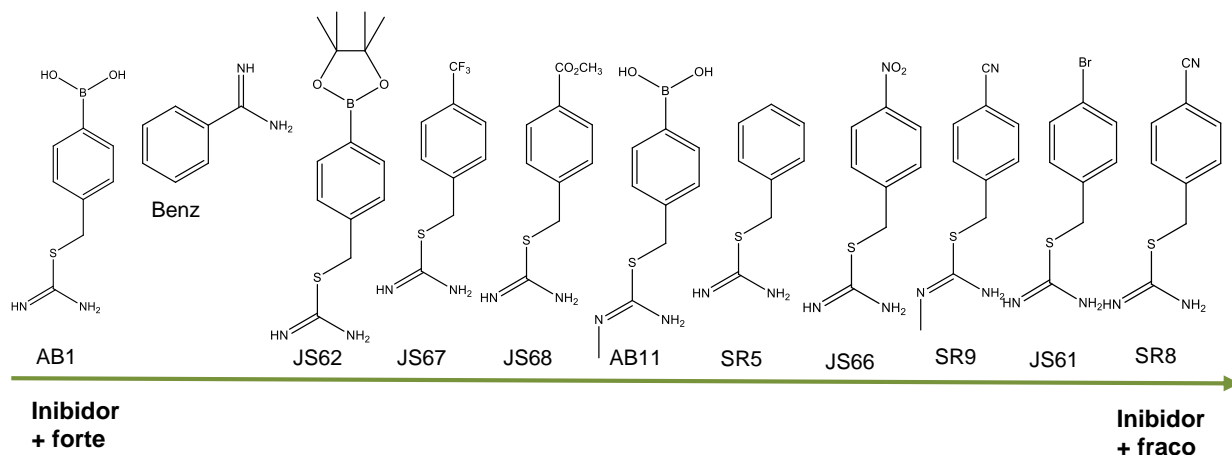


Figura 4.6 – Representação dos diferentes inibidores, tendo em conta a ordem do mais forte para o mais fraco.

Através deste estudo sistemático pode-se inferir quais as características mais importantes para esta classe de inibidores de modo a inibir a tripsina. O mesmo estudo deverá ser feito com as outras proteases de serina de interesse de modo a chegar a uma inibição eficaz e seletiva que potencie o desenvolvimento de novos fármacos.

Uma vez determinadas a constantes de inibição para cada um dos compostos passou-se à caracterização estrutural dos complexos enzima-inibidor de modo a compreender a forma de interação entre ambos. Para tal recorreu-se à cristalografia de raios-X.

4.1.2. Ensaios de cristalização

Inicialmente testaram-se várias condições da tripsina dissolvida em 25 mM de HEPES a pH 7,5, 10 mM de CaCl_2 e na presença de 10 mg/mL do inibidor benzamidina, a fim de verificar quais aquelas em que se obteriam melhores cristais. Após 24 horas, verificou-se que para a concentração de tripsina de 30 mg/mL obtiveram-se cristais nas condições 15, 20, 28, 30, 31 e 15A do *screen* de cristalização *Crystal Screen* HT da Hampton Research e para a concentração de 60 mg/mL nas condições 20, 30, 31 e 15A. Contudo, os cristais da condição 15A eram aqueles que apareciam em maior número e com melhor qualidade.

Posteriormente, realizaram-se novos ensaios de cristalização da tripsina sem benzamidina a 20°C através da técnica de difusão de vapor utilizando o método de gota suspensa (*hanging drop*), de modo a selecionar quais as condições mais favoráveis para a obtenção de cristais, na ausência de benzamidina. Assim sendo, após visualização dos cristais chegou-se à conclusão que as condições 15A e 20 tanto para as concentrações de tripsina de 30 e de 60 mg/mL e a condição 15 para a concentração de tripsina de 60 mg/mL eram as mais favoráveis para a obtenção de cristais, tendo sido essas selecionadas para os testes de cristalização da tripsina sem inibidor e tripsina inibida com os compostos AB11, SR5 e JS67. No que diz respeito à condição 15 apareceram cristais que apresentavam provavelmente duas formas da tripsina, uma mais alongada e fina e outra mais arredondada. Na condição 20 apareceram poucos cristais mas bem definidos. Por fim, na condição 15A apareceram cristais bem definidos e em grande número.

Realizou-se o *soaking* dos cristais de tripsina com os compostos AB11, SR5 e JS67, em que se adicionaram 2 μL dos mesmos diretamente nas gotas que continham os cristais para as condições descritas acima. No caso do composto AB11 utilizaram-se as condições 15 e 15A, no SR5 as condições 15A e 20 e por fim no JS67 a condição 20 (Tabela 4.4).

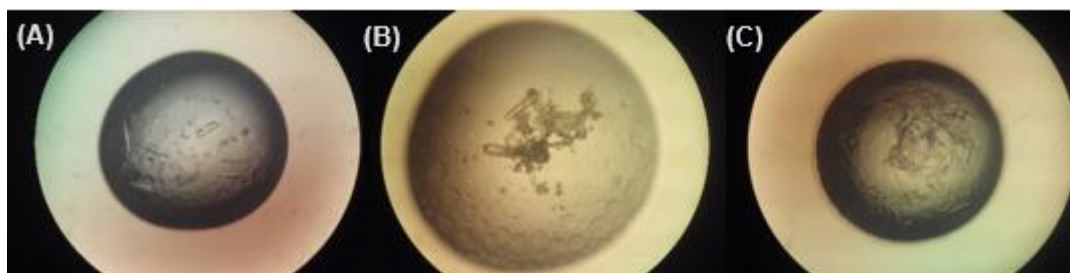


Figura 4.7 – Cristais de tripsina na presença dos compostos SR5 (A), JS67 (B) e AB11 (C), recorrendo ao método de *soaking*. Utilizou-se a condição de cristalização 20 no caso do JS67 e do SR5 e a condição 15A no caso do AB11.

Após 24 horas os cristais mantiveram-se inalterados. Dado que os compostos não têm cor tornou-se mais difícil prever se ocorreu ou não difusão do composto pelo cristal. Procedeu-se então ao congelamento em azoto líquido dos melhores cristais, sendo eles os da condição 20 para os compostos JS67 e SR5 e os da condição 15A para o composto AB11, utilizando uma solução crio-protetora com 15% de glicerol. Após 13 dias congelaram-se mais alguns cristais, a fim de se verificar qual o melhor

tempo para a difusão dos compostos pelos canais de solvente dos cristais e ligação ao centro ativo. É necessário a utilização de uma solução crio-protetora de modo a que não ocorra formação de gelo, pois dessa forma poderia interferir na visualização dos resultados de difração.

Relativamente aos compostos JS66, JS61, SR8, JS68, JS67 e SR9 utilizou-se o método de co-cristalização em vez de *soaking*, ou seja, deixaram-se os compostos a incubar com a tripsina durante 30 minutos à temperatura ambiente. Neste caso, utilizou-se a condição 15A (0,2 M de sulfato de amónio, 0,1 M de cacodilato de sódio tri-hidratado a pH 6,5 e 25% de PEG 8000) para todos os ensaios e uma concentração de tripsina de 30 mg/mL. Contudo, apenas se obtiveram cristais com os compostos JS66, JS68 e SR8, sendo que aqueles que apareceram em primeiro lugar foram com o composto JS68 (após 5 dias), depois com o SR8 (após 6 dias) e por fim com o JS66 (após 7 dias). Assim sendo, apenas os cristais destes compostos é que foram utilizados para a experiência de difração.

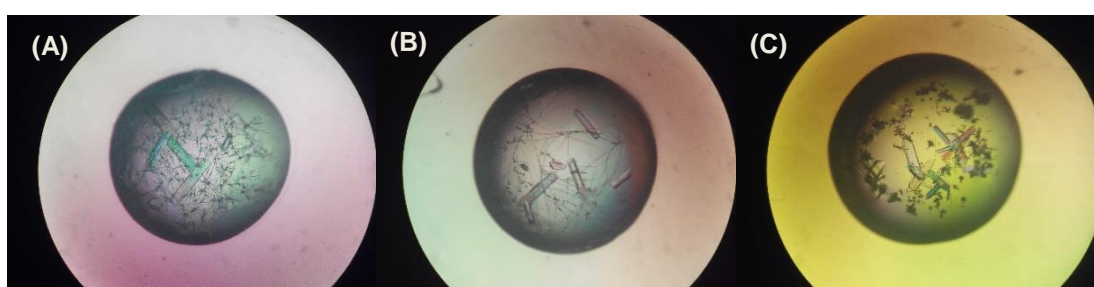


Figura 4.8 – Cristais de tripsina incubados com os compostos JS66 (A), SR8 (B) e JS68 (C), no método de co-cristalização. Utilizou-se a condição de cristalização 15A.

Posteriormente ao congelamento, os cristais foram medidos utilizando radiação de Sincrotrão nas linhas ID29 e ID23-1 do ESRF, Grenoble, em França e PX III do SLS (Tabela 4.4). Conforme se pode observar nas Tabela 4.4 e 4.5, todos os cristais de tripsina com os diferentes compostos difrataram, com diferentes resoluções.

Tabela 4.4 – Resumo das condições testadas e dos resultados obtidos da difração para a tripsina com os compostos AB11, JS67 e SR5, pelo método de *soaking*.

[Tripsina]	Composto	Condição de cristalização	Agente Crio-protetor	Linha de Sincrotrão	Resolução Máxima
60mg/mL	AB11	0,2M Sulfato de amónio, 0,1M Cacodilato de sódio a pH 6,5 e 25% PEG 8000	15% Glicerol	ID29 ESRF	1,07 Å
30mg/mL	JS67	0,2M Sulfato de amónio, 0,1M Acetato de sódio a pH 4,6 e 25% PEG 4000		PX III SLS	1,12 Å
	SR5			PX III SLS	1,12 Å

Tabela 4.5 – Resumo das condições testadas e dos resultados obtidos da difração para a tripsina com os compostos JS66, JS68 e SR8, pelo método de co-cristalização.

[Tripsina]	Composto	Condição de cristalização	Agente Crioprotetor	Linha de Sincrotrão	Resolução Máxima
30mg/mL	JS66	0,2M Sulfato de amônio, 0,1M	15% Glicerol	ID23-1 ESRF	1,09 Å
	JS68	Cacodilato de sódio a pH 6,5 e 25% PEG 8000		ID23-1 ESRF	0,98 Å
	SR8			ID23-1 ESRF	1,32 Å

4.1.3. Experiência de difração

Começou-se por selecionar os melhores conjuntos de dados para cada composto, ou seja, aqueles que tivessem uma mais alta resolução, e de seguida indexaram-se as imagens recolhidas dos cristais durante a difração, recorrendo ao programa XDS, em que se obtiveram os parâmetros que caracterizam a célula unitária, tais como as constantes a , b , c e os ângulos α , β , γ .

A partir da utilização do programa AIMLESS, presente no conjunto de programas cristalográfico CCP4, foi possível determinar qual o grupo espacial de cada cristal, verificando-se que todos eles pertencem ao sistema cristalino ortorrômbico e ao grupo espacial $P2_12_12_1$.

Posteriormente, ainda utilizando o programa AIMLESS, escalaram-se os dados e analisou-se a qualidade de cada cristal, a partir das estatísticas que se encontram na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Estatísticas de recolha de dados para os vários cristais de tripsina. Os valores entre parêntesis correspondem à última camada de resolução.

Cristal	Trip_AB11	Trip_JS66	Trip_JS67	Trip_JS68	Trip_SR5	Trip_SR8
Comprimento de onda (Å)	1,0	0,97	0,86	0,97	0,86	0,97
Grupo espacial	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Célula unitária (Å,°)	$a= 54,45$ $b= 58,50$ $c= 66,50$ $\alpha=\beta=\gamma=90$	$a= 54,38$ $b= 58,32$ $c= 66,68$ $\alpha=\beta=\gamma=90$	$a= 54,29$ $b= 58,06$ $c= 66,69$ $\alpha=\beta=\gamma=90$	$a= 54,35$ $b= 58,21$ $c= 66,87$ $\alpha=\beta=\gamma=90$	$a= 54,48$ $b= 58,29$ $c= 66,70$ $\alpha=\beta=\gamma=90$	$a= 54,24$ $b= 58,60$ $c= 67,14$ $\alpha=\beta=\gamma=90$
Limites de resolução (Å)	43,92-1,19 (1,21-1,19)	43,90-1,12 (1,14-1,12)	43,79-1,00 (1,02-1,00)	43,91-0,98 (1,00-0,98)	43,89-0,99 (1,01-0,99)	44,15-1,58 (1,61-1,58)
Nº reflexões observadas	293203 (11315)	648903 (30806)	717978 (26711)	684858 (32605)	738377 (23550)	186036 (8942)
Nº reflexões únicas	68345 (3268)	82157 (4028)	113474 (5352)	121833 (5969)	117956 (5230)	30004 (1457)
Completeness (%)	99,4 (96,3)	100 (100)	99,4 (95,6)	99,8 (99,8)	99,5 (90,2)	99,9 (99,9)
$I/\sigma(I)$ médio	8,0 (2,2)	11,3 (2,4)	23,9 (4,0)	18,5 (2,7)	19,9 (2,3)	15,3 (2,1)
R_{merge} (%)	9,8 (36,1)	10,0 (103,1)	3,4 (33,6)	4,2 (54,9)	4,0 (57,7)	7,5 (87,6)
Multiplicidade	4,3 (3,5)	7,9 (7,6)	6,3 (5,0)	5,6 (5,5)	6,3 (4,5)	6,2 (6,1)

Mosaicidade	0,03	0,20	0,09	0,06	0,12	0,34
Coeficiente de Mathews, V_M ($\text{\AA}^3/\text{Da}$)	2,22	2,22	2,21	2,22	2,23	2,24
Conteúdo de Solvente (%)	44,74	44,65	44,34	44,68	44,76	45,16

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum |I_k| - \langle I \rangle}{\sum |I_k|} \quad V_M = \frac{\text{Volume da célula unitária}}{\text{Massa da célula unitária}} \quad \text{Conteúdo de solvente} = \left(1 - \frac{1.23}{V_M}\right) \times 100$$

A partir da análise dos resultados representados na tabela, verifica-se que o valor de I/σ médio, que caracteriza o erro associado aos dados de difração e que por norma deve ser superior a 2 para a camada externa de resolução, apresenta valores bastante baixos para todos os cristais, talvez devido ao facto de termos altas resoluções (na maioria dos casos perto de 1Å). Quase todos os cristais apresentam uma relação entre o ruído e a intensidade à volta de 2, o que significa que temos pelo menos 2x mais intensidade que ruído e no caso do JS67 4x.

Relativamente ao valor do R_{merge} , que representa a relação entre as reflexões equivalentes e as intensidades, este não deve ser superior a 50%. Pela visualização da tabela, verifica-se que à exceção dos cristais do AB11 e do JS67, com valores de 41,3 e 37,5 respetivamente, na camada externa de resolução, todos os outros apresentam valores superiores a 50%, o que significa que os dados recolhidos não são tão bons quanto desejável, segundo este parâmetro. Ainda assim os dados foram considerados para resolução das estruturas.

Já os valores de *completeness*, que correspondem à percentagem de reflexões medidas relativamente ao número total de reflexões possíveis e que deve andar à volta dos 100%, são bastante elevados, sendo que o SR5 é aquele que apresenta um menor valor (90,2%).

No que diz respeito ao conteúdo de solvente, que para cristais de proteínas varia entre 30 a 70%, verifica-se que todos eles se encontram dentro desse intervalo (~44%).

Um outro parâmetro a ter em conta é a multiplicidade, que traduz o número de vezes que determinada reflexão foi medida, a partir do conhecimento do número total de reflexões e do número de reflexões únicas. Quanto mais elevado for este valor, maior a precisão do cálculo das intensidades. O cristal que apresentou uma mais alta multiplicidade foi o JS66.

Por último, temos a mosaicidade, que representa o grau de organização interna do cristal. Valores de mosaicidade pequenos (por norma menores que 1) indicam que os cristais estão bem ordenados e que conseqüentemente teremos uma boa difração dos mesmos, o que se pode verificar a partir dos resultados obtidos, sendo que os valores se encontram entre 0,03 e 0,34.

4.1.4. Resolução das estruturas

Após a medição das intensidades das reflexões, é necessário calcular o ângulo das fases das ondas difratadas. Contudo, não é possível a sua obtenção experimentalmente, ocorrendo assim o chamado Problema da Fase. Para tal, recorreu-se ao método de substituição molecular para a sua determinação, dado que a estrutura da proteína em estudo já é conhecida. Assim, utilizou-se o

programa PHASER, em que se utilizou a estrutura com o código 1S0Q, que se encontra depositada no PDB, como modelo. A escolha deste modelo deveu-se ao facto de ter uma boa resolução, o mesmo grupo espacial e apresentar apenas um ião cálcio como ligando, que anteriormente foi retirado do modelo assim como todas as moléculas de água.

De seguida, utilizando o programa PHASER, e a partir dos dados gerados no AIMLESS, calculou-se os ângulos de fase necessários para o cálculo dos fatores de estrutura. Para isso, utilizaram-se as funções de rotação e translação, de modo a encontrar uma molécula de proteína por unidade assimétrica.

Para a avaliação dos resultados gerados pelo PHASER, recorreu-se às estatísticas geradas na rotação e translação: o LLG e o *Z-score*, conforme representado na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Valores de *Z-score* e LLG para as funções de rotação e translação obtidos utilizando o programa PHASER, para todos os conjuntos de dados de tripsina.

Conjunto de dados	Trip_AB11	Trip_JS66	Trip_JS67	Trip_JS68	Trip_SR5	Trip_SR8
<i>LLG (rotação)</i>	130	138	127	123	140	139
<i>Z-score (rotação)</i>	5,3	5,5	5,4	5,5	5,6	5,5
<i>LLG (translação)</i>	6703	7161	6763	7038	6871	5252
<i>Z-score (translação)</i>	6,3	8,3	8,1	8,0	8,2	8,6

O valor do LLG determina o número de vezes que a solução encontrada é melhor que uma solução aleatória, sendo que quanto maior este valor, melhor será a solução. Valores próximos de 100 para a rotação e de 1000 para a translação correspondem a bons resultados. Pela visualização da tabela, verifica-se que tanto para os valores de LLG de rotação como de translação estão dentro dos limites, e assim sendo estamos perante uma boa resolução da estrutura.

No que diz respeito ao valor do *Z-score*, este atua como o valor do desvio-padrão da solução relativamente à média. Valores inferiores a 4 indicam que a solução é aleatória enquanto valores superiores a 8 determinam que a estrutura foi resolvida. Pela visualização da tabela, verifica-se que apesar dos valores serem superiores a 4, nem todos estão acima de 8, o que indica que apesar de a estrutura ter sido resolvida, não têm valores muito positivos.

4.1.5. Refinamento das estruturas

Para o processo de refinamento, recorreu-se ao programa REFMAC5, que realiza o refinamento da estrutura, de modo a ajustar o modelo em estudo à densidade eletrónica criada e a partir do mesmo foi possível determinar estatisticamente determinados parâmetros, que se encontram representados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Estatísticas de refinamento para os diferentes modelos da tripsina com os inibidores AB11, JS66, JS67, JS68, SR5 e SR8.

Conjunto de dados	Trip_AB11	Trip_JS66	Trip_JS67	Trip_JS68	Trip_SR5	Trip_SR8
Limites de resolução (Å)	43,92-1,19	43,90-1,12	43,79-1,00	43,91-0,98	43,89-1,00	44,15-1,58
Fator R (%)	14,36	16,79	15,99	15,32	16,33	17,36
Nº de reflexões	64822	77969	107706	115631	109116	28431
Fator R _{free} (%)	16,03	19,06	18,33	16,86	18,59	21,67
Nº de reflexões (R _{free})	3456	4113	5683	6114	5755	1519
Nº resíduos	223	223	223	223	223	223
Nº átomos	2132	2210	2265	2225	2326	2100
RMSD para o comprimento de ligação (Å)	0,026	0,026	0,027	0,028	0,027	0,020
RMSD para o ângulo de ligação (º)	2,25	2,35	2,83	2,87	2,64	1,93

Posteriormente, a partir dos ficheiros provenientes do refinamento efetuado, utilizou-se o programa COOT de modo a visualizar o mapa de densidade eletrónica ajustado e os resíduos que constituem o modelo. Através do mesmo é possível ajustar o modelo à densidade eletrónica e verificar se o composto em estudo se encontra ou não ligado ao centro ativo da tripsina. Assim sendo, foi possível visualizar densidade eletrónica relativamente ao composto AB11, alguma densidade eletrónica extra relativamente aos compostos, JS67 e SR5 e nenhuma densidade eletrónica extra no centro ativo com os compostos JS66, JS68 e SR8. Um fator provável para o fato de não haver densidade eletrónica com estes inibidores poderá ter sido a ineficácia da co-cristalização ou então o facto de o composto não se ligar à tripsina. Assim sendo, abandonou-se o processo de refinamento destas estruturas e continuou-se com as restantes.

Pela visualização da tabela, verifica-se que os valores referentes ao fator R e ao R_{free} de todas as estruturas estão dentro dos limites e que a diferença entre o fator R e o R_{free} não excede os 5%. Quer isto dizer que as estruturas foram bem resolvidas e refinadas.

Relativamente aos valores do RMSD, estes traduzem o desvio do modelo em relação a valores teóricos. No que diz respeito ao RMSD para o comprimento de ligação deve ser aproximadamente 0,02 Å, o que pela observação da tabela se verifica para o caso do composto SR8. Nos restantes casos, os valores encontram-se ligeiramente acima do valor ideal, indicando que o refinamento teve baixo rigor no que diz respeito às restrições geométricas. Já o RMSD para o ângulo de ligação deve ser menor que 3º, o que pela visualização dos resultados obtidos se verifica em todos os casos.

Em suma, pela avaliação das estatísticas do refinamento, é possível afirmar que o modelo em estudo explica os dados experimentais e como tal podemos proceder à caracterização das estruturas.

4.1.6. Caracterização das estruturas

A tripsina apresenta na sua estrutura secundária dois barris- β , conforme descrito anteriormente na secção 1.1.3.1. A Tabela 4.9 representa os valores de RMSD da sobreposição das estruturas da tripsina com os compostos AB11, JS67 e SR5 com a estrutura nativa.

Pela sua visualização, verifica-se que os valores de RMSD são baixos, mostrando assim que as estruturas são semelhantes à nativa. Assim sendo, pode-se inferir que não houve alterações conformacionais significativas na estrutura da proteína, mesmo com o composto ligado ao seu centro ativo.

Tabela 4.9 – RMSD de sobreposição estrutural das estruturas Trip_AB1, Trip_JS67 e Trip_SR5 com a estrutura nativa 1S0Q, relativamente a todos os átomos da cadeia principal da proteína.

Estruturas	Trip_AB11	Trip_JS67	Trip_SR5
RMSD (Å)	0,090	0,191	0,160

4.1.6.1. Tripsina em complexo com AB11

A partir da análise do centro ativo da estrutura da tripsina em complexo com o composto AB11 é possível visualizar densidade eletrónica relativa ao composto AB11 no centro ativo da tripsina. Contudo, após a inserção do composto na referida densidade eletrónica e posterior refinamento, observou-se uma densidade extra perto dos grupos hidroxilo ligados ao átomo de boro do composto. Este resultado leva-nos a questionar se a estrutura em questão está correta dado que a estrutura do composto não corresponde ao esperado. Contudo, isto pode ser consequência de uma reação que aconteceu entre a tripsina e outros compostos da solução de cristalização.

Verificou-se também uma densidade extraordinária, ainda que mínima, perto do anel aromático, tendo-se chegado à conclusão que se tratava de uma conformação alternada do composto. Assim sendo, adicionou-se uma outra conformação, em que o fator de ocupação para cada uma foi de 0,65 e 0,35, respetivamente. Deste modo, já foi possível justificar a densidade extra correspondente. As Figuras 4.9 e 4.10 representam as duas conformações possíveis do composto e o centro ativo da tripsina.

Antes da realização de um novo refinamento, onde se obtiveram as estatísticas representadas na Tabela 4.8, ajustou-se o modelo à densidade eletrónica e procedeu-se à análise das moléculas de águas existentes, removendo aquelas que se encontravam fora da densidade e adicionando outras que continham densidade, recorrendo para isso ao programa COOT. Durante este passo foi necessário ter em atenção os fatores de temperatura, também designados por fatores B. Estes tornam possível a determinação da vibração de um dado átomo no modelo e a deteção de erros no mesmo. Por noma, átomos que se encontram à superfície da proteína têm fatores B mais elevados assim como cadeias laterais longas que não interajam com outros resíduos, dado que geralmente possuem uma maior mobilidade. Verificou-se que no caso dos átomos do composto os valores são semelhantes entre si,

sendo os valores aproximados entre 8 e 12 Å². No caso da conformação alternada do composto, os valores também são semelhantes entre si, estando entre 7 e 15 Å². Os fatores B médios da estrutura encontram-se representados na Tabela 4.10.

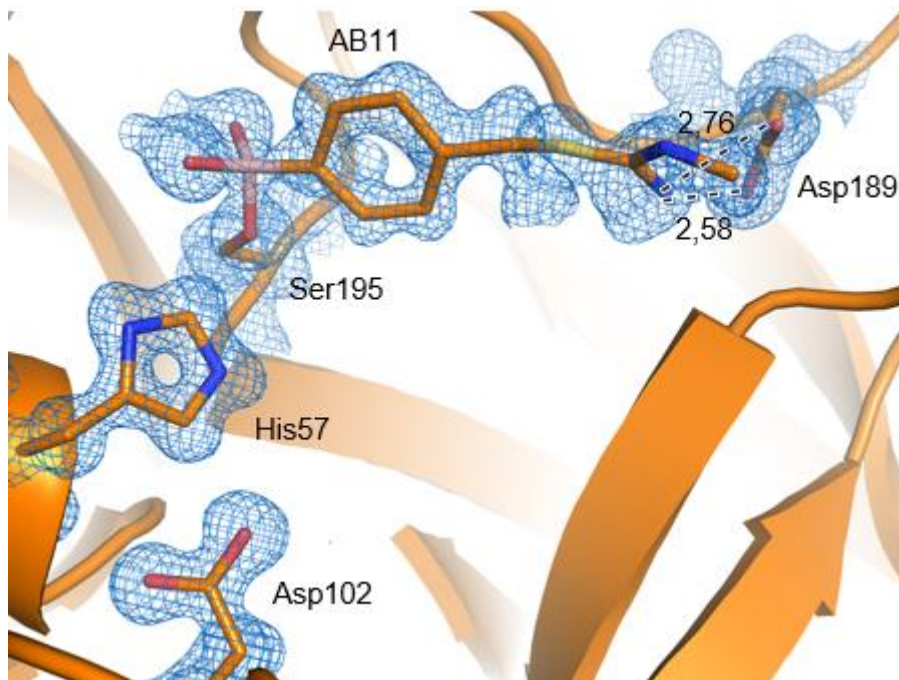


Figura 4.9 – Estrutura cristalográfica do centro ativo do conjunto de dados da tripsina com o composto AB11 com um fator de ocupação de 0,65. Todas as distâncias apresentadas estão em Å. Código de cores: Carbono – laranja; Azoto – azul; Oxigênio – vermelho; Enxofre – amarelo; Boro – rosa. Esta figura foi preparada utilizando o programa PyMOL.

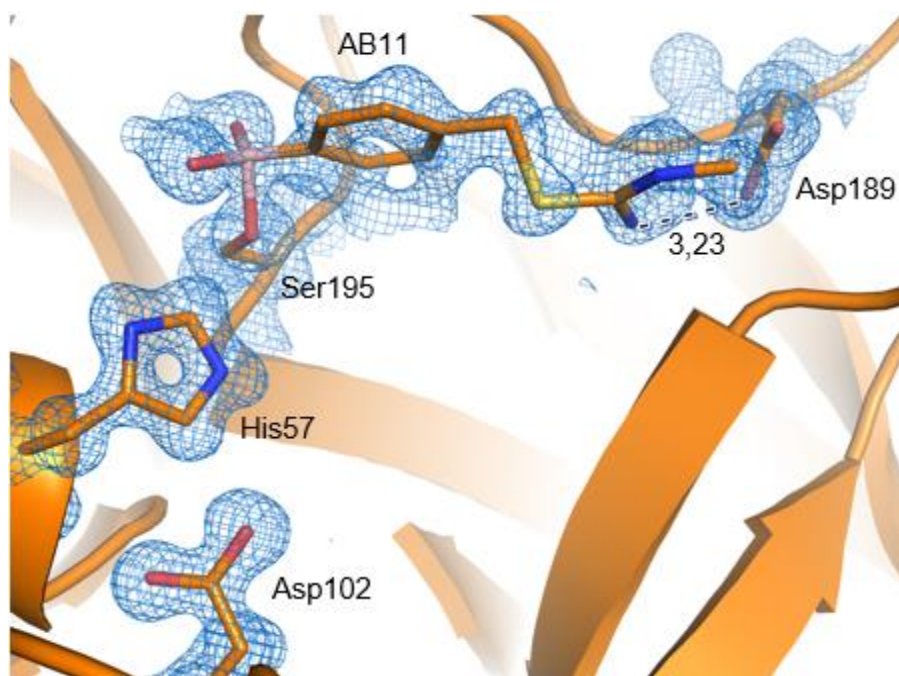


Figura 4.10 – Estrutura cristalográfica do centro ativo do conjunto de dados da tripsina com o composto AB11 com um fator de ocupação de 0,35. Todas as distâncias apresentadas estão em Å. Código de cores: Carbono – laranja; Azoto – azul; Oxigênio – vermelho; Enxofre – amarelo; Boro – rosa. Esta figura foi preparada utilizando o programa PyMOL.

Posteriormente procedeu-se à análise das interações entre a tripsina e o composto AB11. Verifica-se que este se encontra coordenado à serina catalítica pelo átomo de boro, a uma distância de 1,59 Å e de 1,80 Å, correspondentes às 2 conformações.

Relativamente aos oxigénios que se encontram ligados ao átomo de boro, estes fazem ligações de hidrogénio com o grupo amina da Gly193, correspondente ao *oxyanion hole*, e com uma água conservada, a uma distância de 2,81 e 2,59 Å, respetivamente. No caso da conformação alternada, as distâncias são de 2,65 e 2,60 Å, respetivamente.

No caso dos grupos amina relativos ao composto, um deles estabelece ligações de hidrogénio com os dois oxigénios do grupo carboxílico do Asp189, responsável pelo reconhecimento do local de corte da tripsina, com uma distância de 2,76 e 2,58 Å, respetivamente e com o grupo hidroxilo da Ser190 a uma distância de 3,18 Å. Relativamente à conformação alternada do composto, um dos grupos amina estabelece uma ligação de hidrogénio com um dos oxigénios do grupo carboxílico do Asp189 a uma distância de 3,23 Å, com uma água conservada a 2,83 Å e com o grupo hidroxilo da Ser190 a uma distância também de 2,83 Å.

O outro grupo amina do composto estabelece ligações de hidrogénio com o oxigénio do grupo carboxílico da cadeia principal da Gly219, a uma distância de 2,64 Å. O mesmo acontece na conformação alternada do composto, mas com uma distância de 3,05 Å.

Tabela 4.10 – Estatísticas do refinamento final da tripsina com o composto AB11.

Conjunto de dados	Trip_AB11
Fator B (Å²)	
-cadeia principal	7,5
-cadeia lateral	9,3
-Moléculas de água	21,7
Gráfico Ramachandran (%)	
-resíduos nas regiões mais favoráveis	97,2
-resíduos nas regiões permitidas	2,82
-resíduos nas regiões não permitidas	0

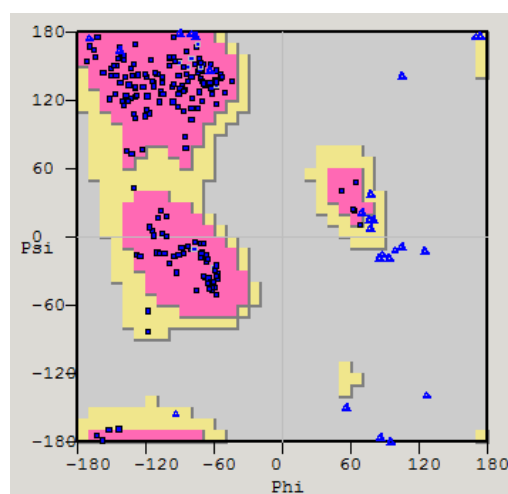


Figura 4.11 – Gráfico de *Ramachandran* da estrutura refinada da tripsina com o composto AB11.

Na Figura 4.11 encontra-se representado o gráfico de *Ramachandran*, onde se pode visualizar os ângulos de torção ψ em função de ϕ para cada aminoácido, sendo estes os ângulos de torção em torno da cadeia polipeptídica principal, que se devem encontrar nas regiões mais favoráveis.

A partir da análise da Tabela 4.10, verifica-se que a maior parte dos resíduos se encontra posicionado nas regiões mais favoráveis, com 97,2%.

Após o processo de validação, procedeu-se a novos refinamentos, de modo a verificar se cada aminoácido se encontrava na respetiva densidade eletrónica, para uma melhor qualidade do modelo.

4.1.6.2. Tripsina em complexo com JS67

Relativamente à estrutura da tripsina com o composto JS67, apesar de se verificar alguma densidade eletrónica no centro ativo da tripsina, esta não diz respeito ao composto JS67. Precedeu-se ao refinamento da estrutura para um melhor ajuste da densidade eletrónica e apenas foi possível modelar um ião sulfato próximo da serina catalítica, em que este interage com o *oxyanion hole*.

4.1.6.3. Tripsina em complexo com SR5

No que diz respeito à estrutura da tripsina com o composto SR5, verifica-se, que semelhante ao que acontece no caso da estrutura da tripsina com o composto JS67, também se observa alguma densidade eletrónica extra, em que uma delas diz respeito ao ião sulfato a interagir com o *oxyanion hole*. A densidade extra que se verifica no centro ativo pode corresponder provavelmente a produtos de degradação do composto.

4.1.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Uma outra técnica, rápida, simples e barata que poderia ser utilizada para visualizar se ocorreu ou não inibição da tripsina por parte dos compostos utilizados é o SDS-PAGE.

Nesta técnica a tripsina é misturada com um detergente aniónico (SDS), que se liga à mesma e a desnatura, o que faz com que a tripsina migre no gel de acordo com a sua massa molecular. Só é possível visualizar as bandas através da coloração com o corante azul de Coomassie.

Inicialmente começou-se por testar a digestão da tripsina com a BSA (*Bovine Serum Albumin*). Utilizou-se um gel de separação de 10% e um gel de concentração de 4%, de modo que as amostras atinjam o gel de separação linearmente.

Após várias tentativas de modo a testar quais as melhores condições experimentais, chegou-se à conclusão que o melhor tempo de incubação da tripsina com BSA e da tripsina com o inibidor e com a BSA foi de 4 horas à temperatura de 37°C. Utilizou-se uma concentração de BSA de 15 µM, de tripsina de 0,6 µM e de inibidor de 6 µM.

De forma a testar quais as melhores temperaturas de incubação da tripsina com os inibidores, utilizou-se como padrão a benzamidina, conforme representado na Figura 4.12.

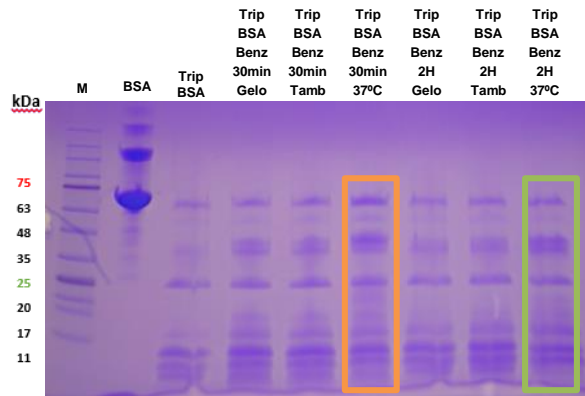


Figura 4.12 – Gel de SDS-PAGE 10% correspondente à digestão da tripsina com a BSA e o inibidor benzamidina, a diferentes tempos de incubação e temperaturas. **M** corresponde ao marcador de pesos moleculares da *NZYTech* descrito no Anexo 7.5.

Pela visualização do gel, verifica-se que os poços 6 e 9 são aqueles que apresentam uma maior intensidade das bandas, sendo esses os poços correspondentes à temperatura de incubação de 37°C. Assim, optou-se por utilizar nas incubações com os inibidores esta temperatura.

A hidrólise da BSA, lisozima de clara de ovo e hemoglobina bovina foram feitos em paralelo. Os inibidores utilizados foram a benzamidina, o JS62, o AB1 e o AB11. Os resultados obtidos para estes compostos encontram-se representados na Figura 4.13.

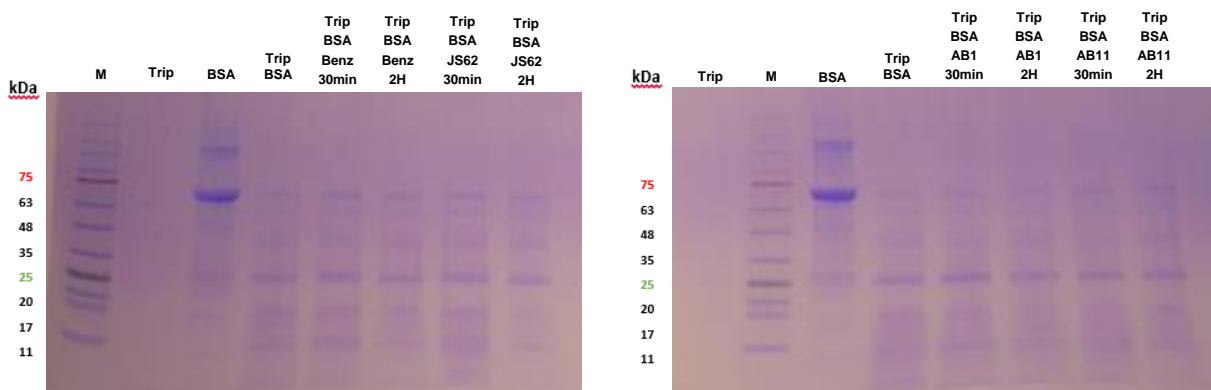


Figura 4.13 – Géis de SDS-PAGE 10% correspondente à digestão da tripsina com a BSA e os inibidores benzamidina, JS62, AB1 e AB11 a diferentes tempos de incubação. **M** corresponde ao marcador de pesos moleculares da *NZYTech* descrito no Anexo 7.5.

Pela visualização das figuras, verifica-se no poço 3 de ambas uma banda intensa correspondente à BSA, estando esta de acordo com o seu peso molecular (~ 66500 Da). No que diz respeito à tripsina sozinha, não se observa nenhuma banda, o que é normal dado que esta se encontra em concentrações muito baixas. Relativamente à tripsina com a BSA e à tripsina com a BSA e com os compostos é possível visualizar em todos os poços de ambas as figuras várias bandas de peso molecular inferior ao da BSA. Nos diferentes tempos de incubação, de 30 minutos e 2H respetivamente, não se verifica nenhuma alteração significativa nas bandas e o mesmo acontece para a tripsina com os diferentes compostos. Em todos eles verifica-se uma degradação da BSA, o que indica que ocorreu proteólise e que os compostos não inibiram a tripsina. Quer isto dizer que a tripsina está ativa. Assim

sendo, para avaliar a inibição da tripsina por estes compostos, este método torna-se inconclusivo, sendo por isso necessário realizar testes adicionais com outros métodos.

Relativamente à digestão da tripsina com a lisozima (Figura 4.14) utilizou-se uma concentração de lisozima de 50 mg/mL e concentrações de tripsina de 0,5, 1 e 2 mg/mL, respetivamente. Utilizou-se um gel de separação de 15% e um gel de concentração de 4% dado que a lisozima tem um baixo peso molecular (~14400 Da).

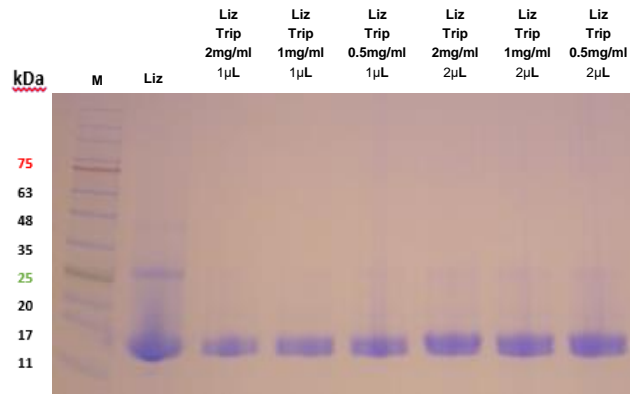


Figura 4.14 – Gel de SDS-PAGE 15% correspondente à digestão da lisozima com a tripsina a diferentes concentrações de 0,5, 1 e 2 mg/mL e com diferentes volumes de 1 e 2 µL. **M** corresponde ao marcador de pesos moleculares da NZYTech descrito no Anexo 7.5.

Pela visualização da figura, não se verificam alterações significativas no que diz respeito à lisozima com a tripsina com diferentes concentrações.

Por fim, no que diz respeito à digestão da tripsina com a hemoglobina (Figura 4.15) utilizou-se uma concentração de hemoglobina de 60 mg/mL e de tripsina de 0,5 e 1 mg/mL, respetivamente. O restante processo foi análogo ao da digestão da tripsina com a BSA.

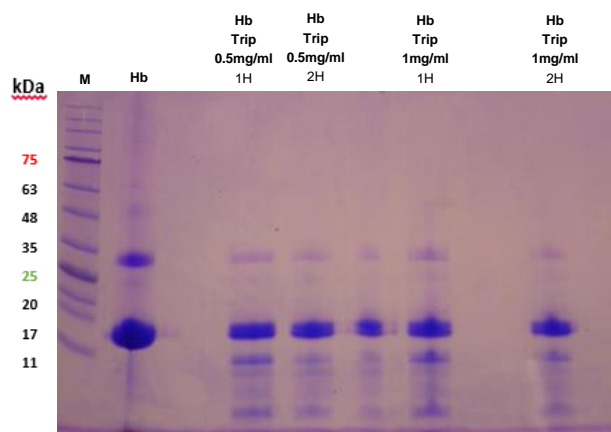


Figura 4.15 – Gel de SDS-PAGE 10% correspondente à digestão da hemoglobina com a tripsina a diferentes concentrações de 0,5, 1 mg/mL com diferentes tempos de incubação, 1 e 2 horas. **M** corresponde ao marcador de pesos moleculares da NZYTech descrito no Anexo 7.5.

Na figura, no poço corresponde à hemoglobina sozinha, é possível visualizar duas bandas, em que nenhuma delas se encontra no sítio correspondente ao seu peso molecular (~64500 Da). Isto deve-se ao fato da hemoglobina ser uma proteína tetramérica, ou seja, constituída por duas cadeias alfa e

duas cadeias beta, o que significa que cada uma tem um peso molecular de aproximadamente 16000 Da. Assim, ao observarmos o poço 1 podemos verificar que a banda mais intensa se encontra à volta desse peso molecular.

No entanto, verifica-se uma degradação a partir do peso molecular de um dos monómeros da hemoglobina, o que indica que ocorreu proteólise.

Desta forma chega-se à conclusão que este método não é o ideal para ser utilizado como teste preliminar de inibição da tripsina, como inicialmente pensado.

4.2. Trombina

4.2.1. Ensaio cinéticos

De modo análogo ao que foi feito com a tripsina, realizaram-se ensaios cinéticos da trombina com o composto JS62, e para isso utilizou-se o substrato BApNA, de modo a avaliar de que modo este composto inibia a trombina. Utilizou-se este composto dado que já se tinha conhecimento que o mesmo inibia a tripsina e dado que a trombina existente no laboratório era limitada.

O procedimento foi semelhante ao descrito nos ensaios cinéticos com a tripsina. A diferença corresponde à concentração de enzima utilizada. As condições utilizadas para os ensaios encontram-se representadas na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Representação das concentrações de BApNA, inibidores e trombina utilizadas nos ensaios cinéticos.

[BApNA] (mM) em 20% DMSO	[Tripsina] (mM) em 50mM Tris-HCl + 20mM CaCl ₂	[Inibidor] (mM) em 50mM Tris-HCl + 20mM CaCl ₂
0,1	0,0015	-
0,25		0,05
0,5		0,125
0,75		0,25
1		0,5
1,25		-

Conforme referido anteriormente na secção 4.1.1, a equação de Michaelis-Menten traduz a relação entre a concentração de substrato e a velocidade inicial de uma determinada reação.

A partir do gráfico da Figura 4.16, referente ao efeito da trombina pelo composto JS62, verifica-se um ligeiro decréscimo da velocidade à medida que se aumenta a concentração do JS62, o que pode ser um indício de que o mesmo inibe a trombina, ou seja, que houve uma diminuição da sua atividade. Uma outra hipótese será o fato de termos uma inibição relativamente ao substrato. Contudo, os resultados apresentados não são significativos, dado que determinados pontos encontram-se fora do esperado e como tal não é possível retirar conclusões fidedignas. Assim, não foi possível calcular os

parâmetros cinéticos correspondentes, pois os dados obtidos não são bons o suficiente para o seu cálculo.

De modo a podermos calcular os parâmetros cinéticos, será necessário realizar novos ensaios cinéticos e testar novas condições, tais como alterar o tampão da solução, concentração de enzima ou de inibidor.

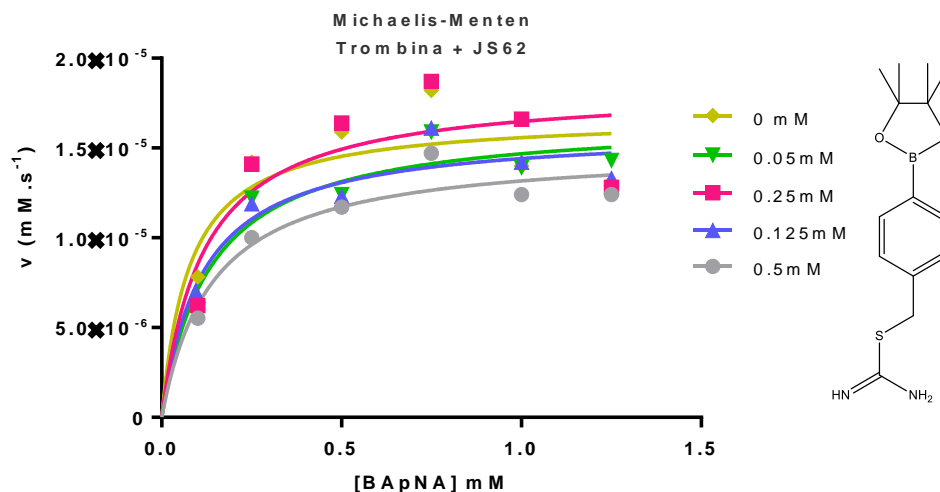


Figura 4.16 – Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do BApNA catalisado pela trombina com uma concentração de 0,0015 mM e com diferentes concentrações de JS62. Os pontos são experimentais.

4.3. Uroquinase

Com o objetivo de produzir e caracterizar a uroquinase, recorreu-se à expressão heteróloga. Para tal selecionou-se como sistema a levedura *Pichia pastoris* e o vetor pPNIC706 (Anexo 7.4), o qual foi utilizado para introduzir o DNA que codifica estas enzimas na levedura. Este vetor confere resistência à canamicina e à zeocina e tem origem de replicação em *E.coli* e o promotor em *Pichia*, tornando assim possível fazer a clonagem em *E.coli* e a expressão em *Pichia*.

Para a expressão da uroquinase, somente expressámos o seu domínio catalítico, dado que por norma só o domínio catalítico é cristalizado. Um outro fator é o fato de que os inibidores em estudo inibem o centro ativo do domínio catalítico, não sendo relevante expressar os outros domínios.

Conforme se pode verificar no anexo 7.4, relativo ao vetor pPNIC706, fez-se uma mutação na asparagina 145 para uma alanina. Isto aconteceu dado que é um sítio de glicosilação e como estamos a expressar em *Pichia* e não em células humanas ou de animais não queremos que haja glicosilação inespecífica pela *Pichia* (dado que não tem a mesma maquinaria celular que as células animais).

A *Pichia pastoris* é uma levedura anaeróbia facultativa e metilotrófica, ou seja, capaz de metabolizar o metanol como única fonte de carbono. Tem como vantagens a baixa secreção de proteínas endógenas, que permite que as proteínas heterólogas secretadas constituam a maior parte da fração proteica do meio, facilitando a sua purificação, e o fato de ser de fácil manipulação.

Assim, um sistema de expressão baseado neste microrganismo unicelular, fácil de manipular e cultivar, é indicado para a expressão heteróloga de proteínas eucariotas e, geralmente, obtêm-se níveis de expressão destas mais elevados, quando comparados com *E.coli*.

4.3.1. Preparação de células competentes de *Pichia pastoris*

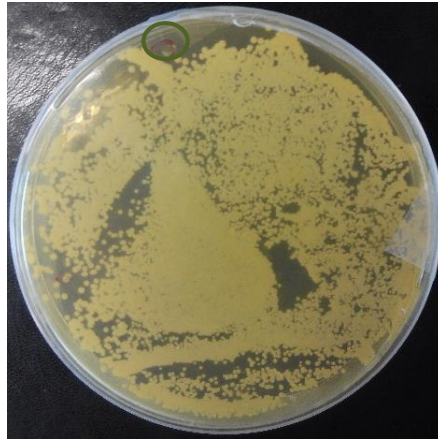


Figura 4.17 – Crescimento de *Pichia pastoris* efetuado durante 16 horas a 30°C. A placa foi feita com meio YPD e adicionou-se 50 µL do vetor pPNIC706_uPA. A colónia selecionada para a preparação das células competentes encontra-se assinalada a cinzento.

Fez-se um crescimento em meio YPD, de modo a se obter uma colónia isolada com o objetivo de preparar células competentes. A partir da análise da figura 4.17, verifica-se que se obtiveram inúmeras colónias características da levedura *Pichia pastoris*. De modo a selecionar uma colónia para a preparação das células competentes, optou-se por uma colónia isolada, que está representada com um círculo verde. Fez-se um pré-inóculo com esta colónia em 10 mL de meio YPD e deixou-se a incubar durante aproximadamente 16 horas, a 30°C, com uma agitação de 270 rpm. No final de todo o protocolo de preparação de células competentes, procedeu-se à transformação. Foi realizada uma transformação heat shock, dado que facilita a entrada do DNA nas células, pois ao aumentarmos a temperatura os poros da membrana dilatam e o DNA entra mais facilmente.

4.3.2. Transformação de células competentes em *Pichia pastoris*

De modo a inserir o nosso vetor plasmídico na levedura *Pichia pastoris* foi necessário primeiramente linearizá-lo. Para isso, utilizou-se uma enzima de restrição, a Sall. Realizou-se o procedimento adaptado ao protocolo PCR-Clean Up da NZytech, de modo a remover as enzimas de restrição e isolar o DNA linearizado e de seguida fez-se um gel de agarose 0,8% (Figura 4.18) de maneira a podermos visualizar o fragmento de DNA linearizado.

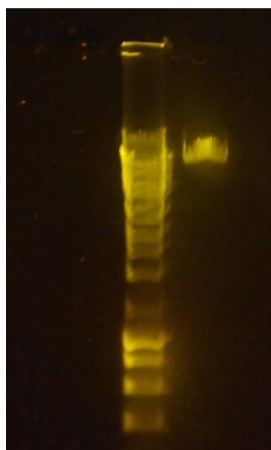


Figura 4.18 – Gel de agarose 0,8% correspondente à reação de linearização do vetor pPNIC706_uPA com a enzima de restrição Sall. O primeiro poço corresponde ao Marcador e o segundo ao DNA linearizado.

Pela análise do gel representado na Figura 4.18, verifica-se que uma banda correspondente ao peso molecular da uroquinase. Assim podemos prosseguir para a transformação.

No final do processo de transformação das células competentes, plaqueou-se 100 μ L numa placa contendo meio YPDS e zeocina 100 μ g/mL e incubou-se a 30°C com o objetivo de obtermos transformantes positivos com a resistência conferida pelo vetor. Este procedimento demorou aproximadamente 3 dias. As colónias que apareceram encontram-se representadas na Figura 4.19.

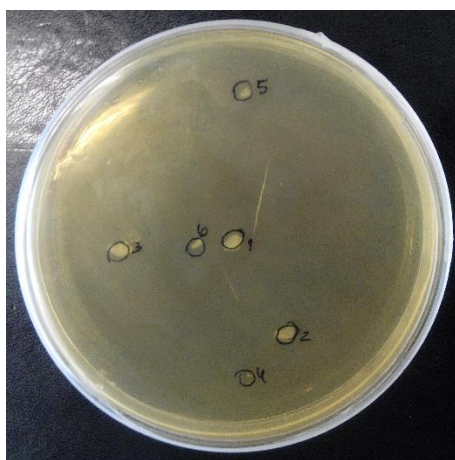


Figura 4.19 – Colónias obtidas após transformação de células competentes de *Pichia Pastoris* numa placa com meio YPDS e zeocina 100 μ g/mL. Os números apresentados dizem respeito à numeração das colónias: 1 a 6, sendo seis o número total de colónias.

4.3.3. Avaliação da expressão em *Pichia pastoris*

De modo a determinar quais as condições ótimas de crescimento, selecionaram-se seis colónias transformantes que contêm o plasmídeo de interesse. Para isso, realizou-se um pré-inóculo para cada uma contendo meio BMGY e colocaram-se a incubar a 30°C, 250 rpm, durante aproximadamente 16 horas.

Posteriormente, após a leitura da O.D. a 600 nm e da adição de meio BMMY e zeocina 100 µg/mL, transferiu-se o volume de cada pré-inóculo para *erlenmeyers* de 1 L.

A partir da análise da figura verifica-se que só constam cinco *erlenmeyers*, quando na realidade tínhamos seis colónias. Isto aconteceu dado que a colónia denominada como 4 não deu nenhum resultado, ou seja, não houve crescimento, sendo por isso descartada.

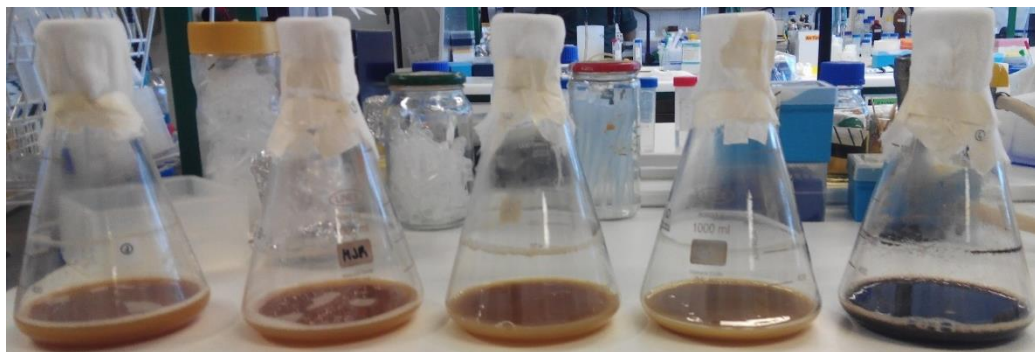


Figura 4.20 – Pré-inóculos realizados para cada uma das colónias transformantes.

Foram recolhidas alíquotas com diferentes tempos de indução com o objetivo de selecionar qual aquele que iria obter um melhor nível de expressão. Todas as alíquotas foram guardadas a -80°C.

Durante a indução, a cada 24 horas foi adicionado metanol 100% para uma concentração final de 0,5%, para manter a indução dos transformantes. Os testes de indução da expressão foram realizados durante aproximadamente 120 horas, conforme se pode visualizar da Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Representação dos diferentes tempos de indução e respetivas horas.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Tempo (horas)	0	5	18	28	42	52	73	100	120

As alíquotas recolhidas foram analisadas utilizando géis de SDS-PAGE, com cada um dos tempos de indução para cada colónia. Os géis referentes a estes testes de expressão encontram-se na Figura 4.21. Em todos os géis as alíquotas de cada colónia utilizadas correspondem somente ao sobrenadante.

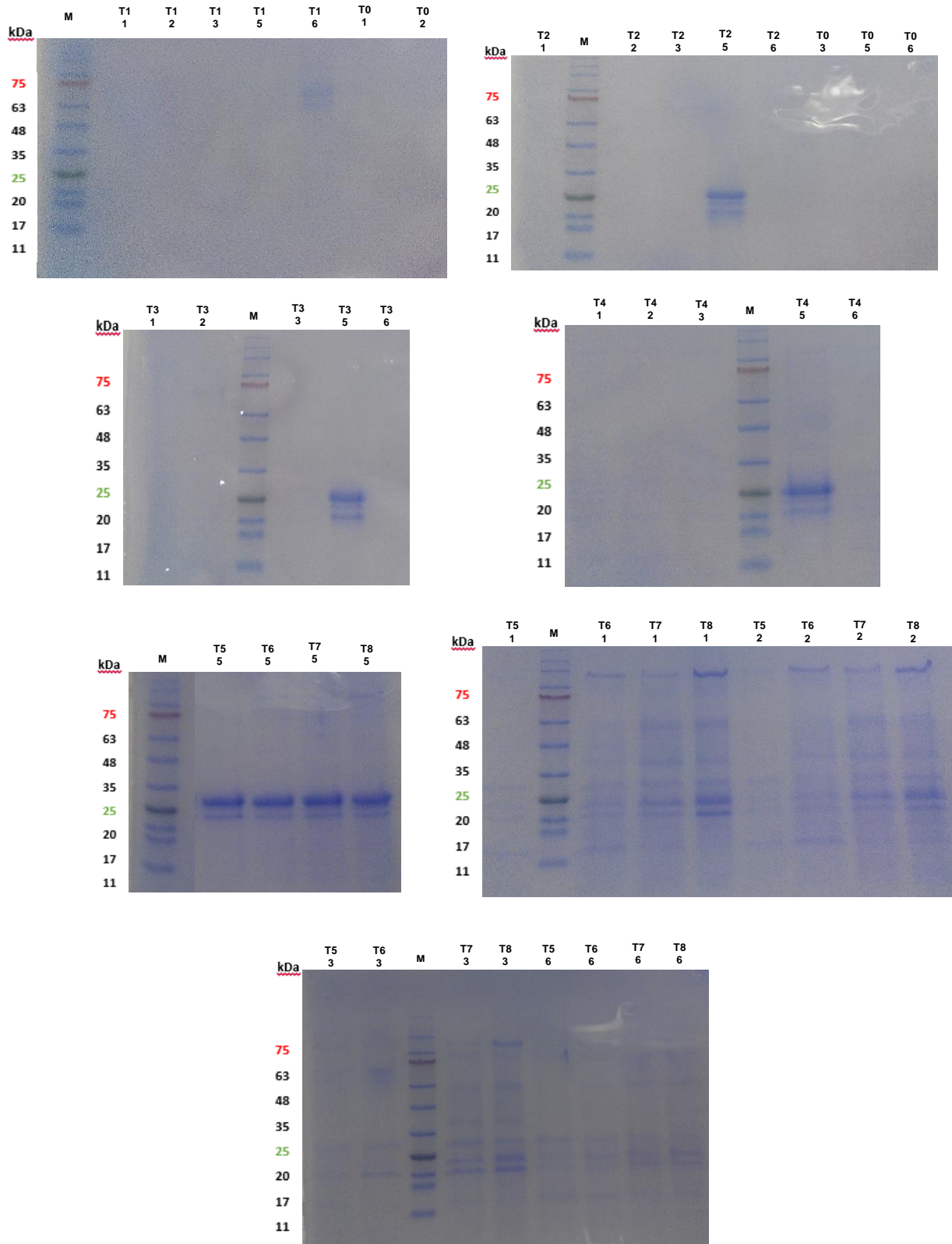


Figura 4.21 – Géis de SDS-PAGE 10% correspondentes aos testes de expressão da uroquinase até um total de 42 horas de indução. Condições: 200 mA, 200 V, 40 minutos.

Pela análise dos géis da Figura 4.21, que representam os diferentes tempos de indução até um total de 120 horas de indução para cada colónia, verifica-se que até ao T4 não houve aparecimento de

bandas características de expressão nos diferentes tempos de incubação à exceção das colónias 5 e 6. No que diz respeito à colónia 5, é possível visualizar uma banda nos tempos de T2 a T8, a aproximadamente 25 kDa, correspondente ao peso molecular do domínio catalítico da uroquinase. Verifica-se que há uma maior expressão entre os tempos T5 e T8, dado que as bandas têm uma maior intensidade nesse tempo de indução. Assim sendo, é possível fazer a indução da uroquinase até às 28 horas, dado que não se observam alterações significativas nas restantes horas.

Relativamente à colónia 6, verifica-se uma ligeira banda em T1, a aproximadamente 75 kDa, correspondente provavelmente a uma contaminação ou a alguma proteína endógena de *Pichia* que foi secretada.

No que diz respeito às restantes géis, não se observou indução nas restantes colónias, não se podendo tirar conclusões.

Por fim, o objetivo de expressão do domínio catalítico da uroquinase em células de levedura foi alcançado e para termos a nossa proteína pura, o próximo passo a seguir é a purificação através da técnica de cromatografia e posterior quantificação da proteína por diferentes métodos bioquímicos.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Durante a elaboração desta dissertação foi possível estudar a interação de variados compostos derivados do ácido borónico com a proteína tripsina através da técnica de cristalografia de raios-X e de cinética enzimática.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar cineticamente e estruturalmente inibidores da uroquinase e de que forma interagem com a proteína. A uroquinase é uma proteína pertencente à família das protéases de serina, tendo como principal função a ativação da plasmina. Uma vez que a sua desregulação envolve diversas doenças, tais como cancro, é essencial o desenvolvimento de potenciais fármacos que inibam a atividade desta proteína. Numa fase inicial recorreu-se a tripsina, uma proteína da mesma família e com o centro ativo semelhante ao da uroquinase. Assim sendo, através da técnica de cristalografia de raios-X cristalizámos a tripsina em quantidades suficientes, de modo a se puder estudar a sua interação com variados compostos, a partir da resolução e análise de estruturas de alta resolução.

No que diz respeito à cristalografia de raios-X, analisando os resultados obtidos para os seis compostos testados com a tripsina, é possível verificar que o *soaking* do composto AB11 com a tripsina foi o único bem-sucedido, dado que é possível identificar densidade eletrónica no centro ativo da tripsina relativa ao composto. A partir da resolução da estrutura e da construção do modelo molecular, é possível compreender de que maneira o composto interage com a proteína, nomeadamente no que diz respeito aos tipos de ligação estabelecida entre os mesmos e local de ligação. A partir da estrutura obtida verifica-se que o composto se liga à serina catalítica (Ser195) da tripsina através do átomo de boro, estabelecendo pontes de hidrogénio entre o aspartato 189 e o grupo amina terminal. Neste caso observaram-se duas conformações referentes ao composto. Verifica-se também que os oxigénios que se encontram ligados ao átomo de boro fazem ligações de hidrogénio com o grupo amina da Gly193, correspondente ao *oxyanion hole*.

Relativamente aos compostos JS66, JS68 e SR8 não houve ligação dos mesmos à proteína, nem foi possível visualizar densidade eletrónica.

Já no caso dos compostos JS67 e SR5, embora não se tenham ligado à tripsina, foi possível visualizar alguma densidade eletrónica no centro ativo que, apesar de não ter a forma dos compostos, pode corresponder a produtos de degradação dos compostos.

Do ponto de vista farmacológico, os resultados obtidos são positivos, dado que embora só se tenha conseguido obter uma estrutura da tripsina com um dos compostos, as experiências efectuadas abrem portas para, futuramente, conseguir obter estruturas com os restantes compostos,

No estudo realizado com a tripsina, além da técnica de cristalografia de raios-X, empregou-se ainda a técnica de cinética enzimática. Com esta técnica realizou-se o estudo dos compostos AB1, AB11, benzamidina, JS61, JS62, JS66, JS67, JS68, SR5, SR8 e SR9 com a tripsina, de modo a verificar se os mesmos a inibam. Pelos resultados obtidos chegou-se à conclusão que a maioria inibe a enzima de forma competitiva, sendo que o composto AB1 foi aquele que apresentou inibição mais forte. Contrariamente, o composto SR8 foi aquele que menos inibiu a tripsina, levando-nos a questionar se de fato houve ou não inibição. Todos estes resultados foram comprovados pela visualização dos gráficos correspondentes à cinética de Michaelis-Menten e correspondentes parâmetros cinéticos, nomeadamente o valor de K_i , sendo esse o parâmetro de maior interesse. De modo análogo às

experiências realizadas para a tripsina com os compostos, pretende-se seguir o mesmo método para a uroquinase, a fim de verificar se realmente ocorre inibição da uroquinase, uma vez que os compostos utilizados neste estudo são inibidores específicos da uroquinase.

Um outro objetivo deste trabalho era cristalizar a trombina e posteriormente realizar um estudo com determinados compostos por cristalografia de raios-X. Contudo, o estudo não foi possível de realizar, dado que não houve crescimento de cristais de trombina, apesar das várias condições de cristalização testadas. Tentou-se fazer um estudo cinético com o composto JS62, dado que já tínhamos informação *à priori* que este composto interagiu com a tripsina, mas não foram obtidos resultados relevantes, não sendo possível retirar conclusões. Como tal, é necessário proceder com mais ensaios cinéticos e persistir na otimização das condições de cristalização, de modo a criar novos e melhores cristais, que sejam bons o suficiente para se conseguir obter uma estrutura de alta resolução e consequentemente um mapa de densidade eletrônica, para que futuramente seja possível avaliar a interação destes compostos com a trombina.

Por último, relativamente à uroquinase, realizou-se a clonagem e alguns testes de expressão do seu domínio catalítico no sistema de expressão *Pichia Pastoris*. Foi possível obter células competentes e realizar a respetiva transformação para posteriormente avaliar a expressão. Após o processo de transformação obtiveram-se seis colónias isoladas. Posteriormente, foi possível otimizar o processo de indução da expressão, tendo-se concluído após os resultados obtidos que o tempo de indução da expressão pode ir até às 28 horas, no que diz respeito à colónia 5, tendo sido essa onde se obtiveram maiores níveis de expressão. Contudo, os resultados obtidos devem ser repetidos de forma a corroborar estas observações. Ter-se-á de fazer mais otimizações da expressão e futuramente conseguir purificar a uroquinase, a fim de conseguirmos obter cristais da mesma, para pudermos realizar o estudo com os variados compostos.

Em suma, embora não tenha sido possível alcançar todos os objetivos inicialmente propostos, a execução desta dissertação permitiu a obtenção de novos dados cristalográficos relativos às interações dos compostos, nomeadamente o AB11 com a tripsina, sendo assim uma mais-valia. Espera-se ainda que estes novos dados obtidos sejam um indício de futuramente conseguirmos obter resultados estruturais para os diferentes compostos. Adicionalmente, este trabalho demonstrou que cristalografia de raios-X e a cinética enzimática são ferramentas adequadas para o estudo de interação entre a tripsina e compostos derivados de ácidos borónicos, indicando que o procedimento adotado poderá ser estendido a outras proteínas da mesma família (uroquinase e trombina).

6. Bibliografia

1. Barrett, A. J., Classification of peptidases. *Methods in Enzymology* **1994**, *244*, 1-15.
2. Barrett, A. J.; Rawlings, N. D.; O'Brien, E. A., The MEROPS Database as a peptidase information system. *Journal of Structural Biology* **2001**, *134*, 95-102.
3. Berg, J. M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L., *Biochemistry*, **2002**, *5th Ed.* W. H. Freeman and Company. Seção 9.1, Proteases: Facilitating a Difficult Reaction.
4. Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the IUBMB, *Academic Press*, **1992**, San Diego.
5. Kraut, J., Serine-proteases - structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry*, **1977**, *46*, 331-358.
6. Frez, E.; Fass, D.; Bibi, E., How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane, *Nature* **2009**, *459*, 371-378.
7. Perona, J. J.; Craik, C. S., Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci* **1995**, *4*(3), 337–360.
8. Rao, M. B.; Tanksale, A.P.; Ghatge, M.S., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1998**, *62*, 597-635.
9. Di Cera, E., Serine Proteases. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 510–515.
10. Hedstrom, L., Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501–4524.
11. Jeremy, M. B.; John. L T.; S. Lubert, *Biochemistry* **2002**, *5th ed.* New York: W H Freeman.
12. Polgár, L., The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2005**, *62*, 2161–2172.
13. Macedo, A.; Venâncio, A.; Malcata, F., *Biocologia dos Alimentos*. Lidel Edições Técnicas-Ltda **2003**, 429-472.
14. Neurath, H., Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci* **1989**, *14*, 268-71.
15. Carrell, R.; Travis, J., alpha1-Antitrypsin and the serpins: Variation and countervariation. *Trends Biochem Sci* **1985**, *10*, 20-24.
16. Laskowski, M. Jr.; I. Kato, Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* **1980**, *49*, 593-626.
17. Kettner, C. A.; Shenvi, A. B., Inhibition of the serine proteases leukocyte elastase, pancreatic elastase, cathepsin G, and chymotrypsin by peptide boronic acids. *J. Biol. Chem* **1984**, *259*, 15106–15114.
18. Matthews, D. A.; Alden, R. A.; Birktoft, J. J.; Freer, S. T.; Kraut, J., X-ray Crystallographic Study of Boronic Acid Adducts with Subtilisin BPN' (Novo) *J. Biol. Chem* **1975**, *250*, 7120-7126.
19. Barber, C. G.; Dickinson, R. P.; Horne, V. A., Selective urokinase-type plasminogen activator (uPA) inhibitors. Part 1: 2-Pyridinylguanidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 181–184.
20. Barber, C. G.; Dickinson, R. P., Selective urokinase-type plasminogen activator (uPA) inhibitors. Part 2: (3-Substituted-5-halo-2-pyridinyl)guanidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 185–187.

21. Barber, C. G.; Dickinson, R. P.; Fish, P. V., Selective urokinase-type plasminogen activator (uPA) inhibitors. Part 3: 1-Isoquinolinyguanidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 3227–3230.
22. Markwardt F.; Landmann, H.; Walsmann, P., Comparative Studies on the Inhibition of Trypsin, Plasmin, and Thrombin by Derivatives of Benzylamine and Benzamidine. *European J. Biochem* **1968**, *6*, 502-506.
23. Penha-Silva, N., O Efeito de Substituintes sobre a Formação de Complexos entre a β -tripsina Bovina e *para*-Derivados do íão Benzamidínio: um Estudo Termodinâmico. *DSc Thesis* **1989**.
24. Talhout, R.; Engberts, J. B. F. N., Thermodynamic analysis of binding of p-substituted benzamidines to trypsin. *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268*, 1554-1560.
25. Huber, R.; Bode, W., Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 114–122.
26. Neurath, H.; Walsh, K. A., Role of proteolytic enzymes in biological regulation (A review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1976**, *73*, 3825-3832.
27. Evin, L. B.; Vásquez, J. R.; Craik, C. S., Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *Proc Natl Acad Sci* **1990**, *87*, 6659–6663.
28. Chen, J. M.; Ferec, C., Genes, cloned cDNAs, and proteins of human trypsinogens and pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutations. *Pancreas* **2000**, *21*, 57–62.
29. Bode, W.; Fehhammer, 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* **1976**, *106*, 325–35.
30. Davie, E. W.; Neurath, H., Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *The Journal of Biological. Chemistry* **1955**, *212*, 515-529.
31. Neurath, H.; Dreyer, W. J., Mechanism of activation of trypsinogen and chymotrypsinogen. *Discuss. Faraday Soc.* **1955**, *20*, 32–43.
32. Robinson, N. C.; Neurath, H.; Walsh, K. A., The relation of the α -amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation, *Biochemistry* **1973**, *12*, 420-426.
33. Bode, W.; Schawager, P., The single calcium-binding site of crystallin bovin beta-trypsin. *FEBS Letters* **1975**, *56*, 139–143, 1975.
34. Hirota, M.; Ohmuraya, M.; Baba, H., The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. *Journal of Gastroenterology* **2006**, *41*, 832–836.
35. 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* **1968**, *243*, 2943–2949.
36. Smith, R. L.; Shaw, E., Pseudotrypsin. A modified bovine trypsin produced by limited autodigestion. *The Journal of Biological Chemistry* **1969**, *244*, 4704–4712.
37. Rinderknecht, H.; Renner, I.G.; Carmack, C., Trypsinogen variants in pancreatic juice of healthy volunteers, chronic alcoholics, and patients with pancreatitis and cancer of the pancreas. *Gut* **1979**, *20*, 886–891.
38. Keller, P. J.; Allan, B. J., The Protein Composition of Human Pancreatic Juice. *Journal of Biological Chemistry* **1967**, *242*, 281-287.

39. Voytek, P.; Erland C.; Gjessing, E.C., Studies of an Anionic Trypsinogen and Its Active Enzyme from Porcine Pancreas. *Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 508–516.
40. Kukor, Z.; Tóth, M.; Sahin-Tóth, M., Human anionic trypsinogen: Properties of autocatalytic activation and degradation and implications in pancreatic diseases. *European Journal of Biochemistry*, **2003**, *270*, 2047–2058.
41. Kikuchi, N.; Nagata, K.; Shin, M.; Mitsushima, K.; Teraoka, H.; Yoshida, N., Site-directed mutagenesis of human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Journal of Biochemistry* **1989**, *106*, 1059–1063.
42. Gaboriaud, C.; Serre L. *et al.*, Crystal Structure of Human Trypsin 1: Unexpected Phosphorylation of Tyr151. *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 995–1010.
43. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W., Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level. 3^a Ed. (John Wiley & Sons, Inc.). Seção 11.5, Serine Proteases **2008**, 347–360.
44. Kunitz, M.; Northrop, J. H., Isolation from Beef Pancreas of Crystalline Trypsinogen, Trypsin, a Trypsin Inhibitor, and an Inhibitor-Trypsin Compound. *J Gen Physiol* **1936**, *19*, 991-1007.
45. Bode, W.; Huber, R., Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* **1992**, *204*, 433-51.
46. Esmon, C. T., Regulation of blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 349-360.
47. Franco, R. F., Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina* **2001**, *34*, 229-237.
48. Davie, E. W.; Fujikawa, K.; Kisiel, W., The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10363-10370.
49. Jenny, N. S.; Mann, K. G., Coagulation cascade: an overview. *Thrombosis and Hemorrhage* **1998**, 2^o ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
50. Rezaie, A. R., Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, *17*, 2059–2069, 2010.
51. Dobrovolsky, A. B.; Titaeva, E. V., The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Moscow)* **2002**, *67*, 99-108.
52. Rijken D. C.; Sakharov D. V., Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. *Thromb Res.* **2001**, *103* Suppl 1:S41-9.
53. Solomons, T. W. G., Organic chemistry. **2011**, 10^o Ed.
54. Van de Locht, A.; Bode, W.; Huber, R.; Le Bonniec, B. F.; Stone, S. R.; Esmon, C. T.; Stubbs, M. T., The thrombin E192-BPTI Complex Reveals Gross Structural Rearrangements: Implications for the interaction with Antithrombin and Thrombomodulin. *EMBO J.* **1997**, *16*, 2977-2984.
55. Di Cera, E., Thrombin interactions. *Chest* **2003**, *124*, Suppl, p. 11S–7S.
56. Stubbs, M. T.; Bode, W., The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 23-28.
57. Lane, D. A.; Philippou, H.; Huntington, J. A., Directing thrombin. *Blood* **2005**, *106*, 2605–2612.
58. Pineda, A. O., Molecular Dissection of Na⁺ Binding to Thrombin. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 31842–31853.

59. Li, W. *et al.*, Structure of the antithrombin–thrombin–heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nature Structural & Molecular Biology* **2004**, *11*, 857–862.
60. Huntington, J. A., Shape-shifting serpins--advantages of a mobile mechanism. *Trends in Biochemical Sciences* **2006**, *31*, 427–435.
61. Rydel, T. J.; Ravichandran, K. G.; Tulinsky, A.; Bode, W.; Huber, R.; Roitsch, C.; Fenton, J. W., The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin. *Science* **1990**, *249*, 277-80.
62. Rydel, T. J.; Tulinsky, A.; Bode, W.; Huber, R., Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *J Mol Biol* **1991**, *221*, 583-601.
63. Weitz J.; Crowther M., Direct thrombin inhibitors. *Thromb Res.* **2002**, *106*, V275-84.
64. Medved, L.; Nieuwenhuizen, W., Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb. Haemost.* **2003**, *89*, 409-419.
65. Redlitz, A., Plow EF. Receptors for plasminogen and t-PA: an update. *Baillieres Clin Haematol.* **1995**, *8*, 313-27.
66. Marx, P. F., Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Curr Med Chem.* **2004**, *11*, 2335-48.
67. Vaughan, D. E., Angiotensin, fibrinolysis and vascular homeostasis. *Am J Cardiol.* **2001**, *87*, suppl 18C-24C.
68. Wu, K. K.; Thiagarajan, P., Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu. Rev. Med.* **1996**, *47*, 315–31.
69. Collen, D., The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost.* **1999**, *82*, 259-70.
70. Hajjar, K. A.; Jacovina, A. T.; Chacko, J., An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem.* **1994**, *269*, 21191-7.
71. Bajzar, L., Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and na antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, *20*, 2511-2518.
72. Katz, B. A.; Mackman, R.; Luong, C.; Radika, K.; Martelli, A.; Sprengeler, P. A.; Wang, J.; Chan, H.; Wong, L., Structural Basis for selectivity of a small molecule, S1-Binding, Submicromolar Inhibitor of Urokinase-Type Plasminogen Activator. *Chem Biol.* **2000**, *7*, 299-312.
73. Samama, M.; Castel, M.; Matsuo, O.; Hoylaerts, M.; Lijen H. R., Comparative-study of the activity of high and low-molecular weight urokinase in the presence of fibrin. *Tromb. Haemost. Stutgard* **1982**, *47*, 36-40.
74. Sulimov, E. V. *et al.*, Application of Molecular Modeling to Urokinase Inhibitors Development. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 625176.

75. Fahey, E. M.; Chaudhuri, J. B.; Binding, P., Refolding of low molecular weight urokinase plasminogen activator by dilution and size exclusion chromatography – a comparative study. *Sci. Technol.* **2000**, *35*, 1743-1760.
76. Voet, D.; Voet, J. G., Biochemistry. *John Wiley & Sons Inc.* **1995**, *2th Ed.*
77. Holme, D. J.; Peck, H., Analytical Biochemistry. *Longman Scientific & Technical* **1983**, *8*, 363-400.
78. Rogers, A.; Gibon, Y., Plant Metabolic Networks. *Springer* **2009**, 71-103.
79. Pereira, A. S., Enzimas: Cinética enzimática- inibição e efeito do pH. *Bioquímica Geral*, *Capítulo 8*.
80. Rhodes, G., Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models. *Academic Press* **2006**.
81. Rupp, B., Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology. *Garland Science* **2009**, *Chapter 3*.
82. Pusey, M. L. *et al.*, Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. *Progress in biophysics and molecular biology* **2005**, *88*, 359–86.
83. Giacovazzo, C., Fundamentals of crystallography. *International Union of Crystallography* **1992**, Oxford University Press.
84. Blow, D., Outline of Crystallography for Biologists **2002**, Oxford University Press.
85. Rupp, B., Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology. *Garland Science* **2009**, *Chapter 5*.
86. Hodzhaoglu, F.; Kurniawan, F.; Mirsky, V.; Nanev, C., Gold nanoparticles induce protein crystallization. *Cryst. Res. Technol* **2008**, *593*, 588–593.
87. Weber, P. C., Overview of protein crystallization methods. In *Macromolecular Crystallography Part A*. *Academic Press* **1997**, 13–22.
88. Glusker, J. P., Crystal structure analysis for chemists and biologists. New York: VCH, **1994**.
89. Romão, M. J., Cristalografia de Proteínas: metodologias e aplicações em Bioquímica. *Boletim de Biotecnologia* **1996**, *53*, 18-36.
90. Chayen, N. E.; Saridakis, E., Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods* **2008**, *5*, 147–153.

91. Hassell, A. M. *et al.*, Crystallization of protein–ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2007**, *63*, 72–79.
92. Alves, V. D. *et al.*, Methods in Enzymology. *Elsevier Inc.* **2012**, *510*, Chapter 21.
93. Wlodawer, A.; Minor, W.; Dauter, Z.; Jaskolski, M., Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS Journal* **2008**, *275*, 1–21.
94. Bosnic, O. M.; Gopcevic, K. R.; Vrvic, M. M.; Karadzic, I. M., Inhibition of trypsin by heparin and dalteparin, a low molecular weight heparin. *J. Serb. Chem. Soc.* **2009**, *74*, 379–388.
95. Yanez, F. J. C.; Aguilar, R. P.; Carreno, F. G.; Toro, M. A. N, Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **2005**, Part B *140*, 91–98.
96. Filho, J. T. S.; Oliveira, M. G. A.; Donzele, J. L.; Gomide, A. T. M.; Menin, E., Atividade de Tripsina em Quimo de Três Espécies Neotropicais de Peixes Teleostei de Água Doce. *Rev. bras. Zootec* **2000**, *29*, 2172-2180.
97. Erlanger, B. F.; Vratsanos, S. M.; Wassermann, N. H.; Cooper, A. G., Phenothiazine-N-carbonyl Chloride, A Specific Inactivator of Chymotrypsin. *Biochem. J.* **1970**, *118*, 421-425.
98. Josephraj Kumar, A.; Chakrabarty, R.; Thomas, G., Occurrence of trypsin-like protease in cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **2005**, *42*, 243-245.
99. Nakata, H.; Ishii, S., Substrate Activation of trypsin and acetyltrypsin caused by α -N-Benzoyl-L-arginine p-nitroanilide, *J.Biochem* **1972**, *72*, 281-290.

7. Anexos

7.1. Sequência peptídica da tripsina de *Bos Taurus*

IVGGYTCGANTVPYQVSLNSGYHFCGGSLINSQWVVSAAHCYKSGIQVRLGEDNINVVEGNEQFISASKSIVHPS
YNSNTLNNDIMLIKLSAASLNSRVASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTKSSGTSYPDVLKCLKAPILSDSSCKS
AYPGQITSNMFCAGYLEGGKDCSQGDSGGPVVCSGKLGIVSWGSGCAQKNKPGVYTKVCNYVSWIKQTIASN

7.2. Sequência peptídica da Trombina

Cadeia A

TFGSGEADCGLRPLFEKKSLEDKTERELLESYIDGR

Cadeia B

IVEGSDAEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAHCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGKHSRTRYERNI
EKISMLEKIYIHPRYNWRENDRDIALMKLKKPVAFSDYIHPVCLPDRETAASLLQAGYKGRVTGWGPLKETWTA
NVGKGQPSVLQVVNLPIVERPVCKDSTRIRITDNMFCAGYKPDGKRGDACEGDSGGPFVMKSPFNRRWYQMGIV
SWGEGCDRDGKYGFYTHVFRLLKWIQKVIDQFGE

7.3. Sequência peptídica do domínio catalítico da uroquinase

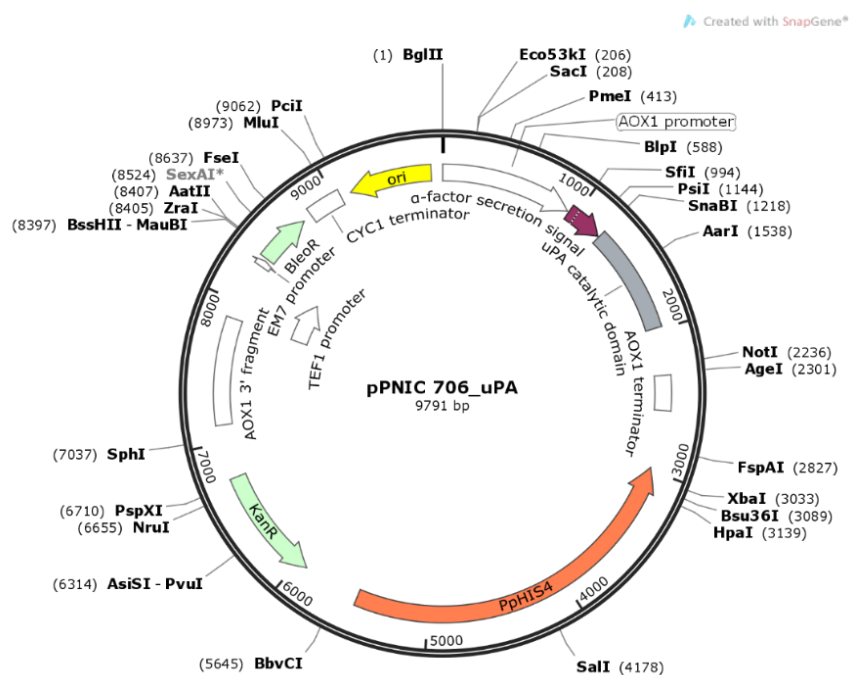
MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLFPFSNSTNNGLLFINT
TIIASIAAKEEGVSLKREAEAIIIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTVYCGGSLISPCWVISATHC
FIDYPKKEDIIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSR
TIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKEASTDYLYPEQLKMTVVKLI SHRECQPHYYGSEVTTKMLC
AADPQWKT DSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHSHTKEENGL
AL-

■ Fator de secreção α

■ uPA-N145A

- Stop

7.4. Vetor pPNIC706 com o gene da uroquinase (9791 bp)



7.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

Tabela 7.1 – Volumes das soluções utilizadas na realização dos géis de poliacrilamida. Os volumes referidos correspondem à realização de 1 gel.

Solução	Separating Gel 10%	Stacking Gel 4%
Água (mL)	1,75	1,95
3 M Tris-HCl/SDS, pH 8,45 (mL)	2,5	0,775
30% acrilamida (mL)	2,5	0,4
Glicerol (mL)	0,75	-
30% APS (µL)	7	7
TEMED (µL)	7	7

O marcador de pesos moleculares utilizado para as várias análises electroforéticas deste trabalho foi o *NZYColour Protein Marker II*, marcador da *NZYTEch*.

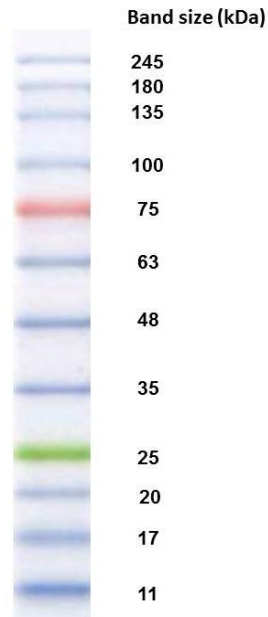


Figura 7.1 – Marcador de pesos moleculares da NZYTech.

7.6. Meios de cultura utilizados nos processos de expressão da uroquinase

Tabela 7.2 – Meios de cultura utilizados no processo de preparação de células competentes e no processo de transformação. Os volumes representados correspondem a 1 L de cada meio.

Composição/Reagente	YPD	YPD
Peptona (g)	20	
Extrato de levedura (g)	10	
Dextrose (g)	100 mL 10X D	
Sorbitol (g)	-	182,2
Zeocina 100 mg/mL (mL)	-	1
Agar (g)	-	20

Tabela 7.3 – Soluções *stock* para a preparação dos meios utilizados. Os volumes apresentados correspondem a 1 L de cada solução.

Composição/Reagente	10x YNB (13,4%)	500x Biotina (0,02%)	10x D (20%)
YNB (sem a.a.) (g)	13,4	-	-
Biotina (mg)	-	20	-
Dextrose (g)	-	-	200

Tabela 7.4 – Soluções utilizadas nos processos de preparação de células competentes e transformação.

Solução I – 10 mM Bicina-NaOH a pH 8,3, 3% (v/v) de etilenoglicol, 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 M Sorbitol
Solução II – 40% polietilenoglicol (PEG) e 200 mM Bicina a pH 8,3
Solução III – 150 mM NaCl e 10 mM Bicina a pH 8,3

Tabela 7.5 – Meios de cultura utilizados no processo de expressão da uroquinase. Os volumes representados correspondem a 1 L de cada meio.

Composição/Reagente	MM	MD	BMMY	BMGY
Peptona (g)	-		20	
Extrato de levedura (g)	-		10	
1 M Fosfato de potássio pH 6,0 (mL)	-		100	
10X YNB (mL)		100		
500 X B (mL)		2		
10X M (mL)	100	-	100	-
10X GY (mL)	-	-	-	100
10X D (mL)	-	100		-