



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2005

**Helena Sofia Nunes
Capela**

**Determinação de parâmetros cinéticos da cardosina
A em presença de ureia**



**Helena Sofia Nunes
Capela**

**Determinação de parâmetros cinéticos da cardosina
A em presença de ureia**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares Avançados, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Isabel Queirós de Macedo, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Euclides Manuel Vieira Pires
Professor Associado da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Doutora Isabel Queirós Macedo
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero expressar os meus profundos agradecimentos a todos quantos de forma mais ou menos directa me ajudaram a levar este projecto adiante: Aos departamentos de Química e Biologia da Universidade de Aveiro e ao Centro de Neurociências da Faculdade de Medicina de Coimbra pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Doutora Isabel Queirós Macedo, pela orientação científica e paciência.

Ao Doutor Francisco Amado, coordenador do Mestrado em Métodos Biomoleculares Avançados, pelos seus conselhos e amizade.

À Cristina Sarmento e Cláudia Oliveira do Departamento de Biologia pelo tempo e trabalho despendidos na purificação da enzima, paciência, compreensão, disponibilidade, conselhos científicos e bibliografia disponibilizada.

À Doutora Sandra Macedo, Doutora Paula Veríssimo e Dr. Pedro Castanheira do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra por toda a disponibilidade, conselhos científicos, material disponibilizado, amizade e incentivo.

Ao Doutor António Barros pela ajuda científica.

Às “meninas” – Cláudia Tavares, Susana Cardoso e Dora Santos - pela amizade, alegria e apoio.

A todos os colegas do laboratório de Química Alimentar pela amizade e boa disposição.

Ao Rui Vitorino, Sofia Guedes, Ana Reis, Cláudia Campos e Henrique pela amizade e apoio.

Ao George, Susana, Rucas, Pedro e Paula.

À Xanda e ao Shasha.

Aos meus pais.

resumo

A *Cynara cardunculus* L. é tradicionalmente usada em Portugal na produção dos queijos Serra, Azeitão e Serpa. A capacidade que apresenta para coagular o leite deve-se à presença de três hidrolases da classe das proteinases aspárticas, cardosina A, B e Ao, sendo a primeira a mais abundante, melhor caracterizada e sobre a qual incide este trabalho. A cardosina A pode apresentar-se como uma alternativa à tripsina na digestão de proteínas hidrófobas, no entanto, estas proteínas são pouco solúveis em meio aquoso pelo que o primeiro passo deve ser aumentar a sua solubilidade. A ureia funciona como agente solubilizante das proteínas ao aumentar a sua solubilidade em solução, mas, dependendo da concentração usada, é também um agente desnaturante. O objectivo deste trabalho consiste em estudar a influência da ureia na cardosina A, através da determinação de parâmetros cinéticos da enzima.

A cardosina A foi extraída da planta do cardo através de extracção ácida, seguida de purificação em dois passos, cromatografia de exclusão molecular e de troca iónica.

A determinação dos parâmetros cinéticos da cardosina A realizou-se por espectrofotometria de Ultra Violeta a 300 nm usando como substrato um octapéptido sintético, Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu, que contém um grupo cromóforo. A concentração de ureia variou entre 0,0 e 3,0 M e as constantes cinéticas foram calculadas segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden, sendo o primeiro o método mais popular, e o último, segundo diferentes autores, o que melhores estimativas faz das constantes. Verificou-se que em presença de ureia, as constantes de Michaelis-Menten (K_m), catalítica (K_{cat}) e de eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) aumentam. A titulação dos locais activos da cardosina A revelou que a concentração de enzima activa diminui consideravelmente com a concentração de ureia, verificando-se que a 2,5 M e a 3,0 M apenas 5,0 e 2,7% da enzima, respectivamente, permanece activa. Os dados obtidos da titulação em conjunto com as constantes cinéticas determinadas indicam que até 3,0 M ureia, apesar de ocorrer desnaturação de uma fracção importante da cardosina A, a enzima que continua activa apresenta uma maior eficiência catalítica. Estes dados são indicativos de modificações na conformação nativa do local activo da enzima e estruturas adjacentes importantes para a catálise, modificações estas que, até 3,0 M ureia, contribuem para um aumento efectivo do desempenho catalítico da enzima.

abstract

In Portugal, *Cynara cardunculus* L. is commonly used in the cheese industry. "Serra", "Azeitão" and "Serpa", cheese makers utilize this plant as the main source of milk clotting enzymes. *Cynara cardunculus* ability to induce milk clotting is due to the activity of three types of aspartic proteases: cardosin A, B and A₀. This dissertation focuses on the study of cardosin A, the most abundant and best characterized protease of the three. Cardosin A may be a good alternative to trypsin in digestion of hydrophobic proteins. However these proteins have low solubility in aqueous solutions and require a solubilizing agent, such as urea. Urea increases the protein solubility but, depending on its concentration, it is also a denaturant and therefore can render cardosin A inactive. The goal of this work is to determine the influence of urea on cardosin A kinetic parameters.

Cardosin A was purified from *Cynara* pistils through a 3-step protocol: acidic extraction followed by exclusion chromatography and ionic exchange chromatography.

Cardosin A's kinetic parameters in the absence/presence of urea were studied by UV spectrophotometry at 300nm, using the chromogenic synthetic octapeptide Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu. The urea concentration tested varied from 0,4 e 3,0 M and the kinetic constants were calculated according to the methods described by Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf and Eisenthal-Cornish-Bowden. Lineweaver-Burk's method is the most commonly used in the literature but Eisenthal-Cornish-Bowden's method is, according to various sources, the most accurate. We determined that cardosin A's Michaelis-Menten (K_m), catalytic (K_{cat}) and catalytic efficiency (K_{cat}/K_m) constants increase with urea concentration. The titration of cardosin A's active sites revealed that incubation with progressively higher concentrations of urea leads to a reduction in the concentration of active enzyme; for instance, at 3,0 M of urea, only 2.7% of cardosin A remains active. Interestingly, the kinetic parameters indicate that up to 3,0 M urea, the proportion of cardosin A that remains active has as higher catalytic efficiency. Taken together, the data presented in this study suggest that urea induces modifications in the conformation of cardosin A's active site and in adjacent structures also involved in the catalysis and that these modifications are responsible for the increased catalytic efficiency of the enzyme.

ÍNDICE

Índice	
Índice de tabelas	
Índice de figuras	
Abreviaturas	
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 PROTEASES- CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
1.1.1 PROTEINASES ASPÁRTICAS	10
1.1.1.1 Proteinases aspárticas de plantas	11
1.1.1.2 Mecanismo catalítico	13
1.2 CARDOSINAS- PROTEINASES ASPÁRTICAS DE <i>CYNARA CARDUNCULUS</i> L.	16
1.2.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA E INTERESSE	16
1.2.2 LOCALIZAÇÃO E FUNÇÃO BIOLÓGICA	18
1.2.3 ESPECIFICIDADE DAS CARDOSINAS	18
1.3 CARDOSINA A (EC 3.4.23)	20
1.3.1 ESTRUTURA PRIMÁRIA DA CARDOSINA A	21
1.3.2 ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCÍARIA DA CARDOSINA A	24
1.3.2.1 Cardosina A desnaturada	27
1.4 SUBSTRATO	29
1.4.1 COMPLEMENTARIDADE SUBSTRATO-LOCAL ACTIVO	29
1.4.2 ESCOLHA DO SUBSTRATO PARA DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS DA CARDOSINA A	30
1.4.2.1 Peptídeo Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO ₂)-Ala-Leu (SS1)	32
1.5 ESTUDOS CINÉTICOS	34
1.5.1 CINÉTICA ENZIMÁTICA – CONSIDERAÇÕES GERAIS	34
1.5.1.1 Significado de K_M	36
1.5.1.2 Significado de k_{cat}	36
1.5.1.3 Significado de k_{cat}/K_M	36
1.5.2 MÉTODOS PARA CALCULAR K_M E V_{MAX}	37
1.5.2.1 Lineweaver-Burk	37
1.5.2.2 Eadie-Hofstee	38
1.5.2.3 Hanes-Woolf	39

1.5.2.4 Eiseenthal-Cornish-Bowden	40
1.5.3 TITULAÇÃO DOS LOCAIS ACTIVOS COM PEPSTATINA A	42
1.6 AGENTES DESNATURANTES.....	44
1.6.1 UREIA - MECANISMO DE ACÇÃO.....	45
1.7 OBJECTIVOS.....	47
2 MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 EXTRACÇÃO.....	51
2.2 PURIFICAÇÃO	51
2.2.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	51
2.2.1.1 Cromatografia de exclusão molecular	52
2.2.1.2 Cromatografia de troca iónica.....	52
2.3 ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	54
2.3.1 SDS-PAGE.....	54
2.3.2 REVELAÇÃO	56
2.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS.....	57
2.4.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	57
2.4.2 SOLUÇÕES USADAS NOS ENSAIOS CINÉTICOS	58
2.4.3 QUANTIFICAÇÃO DA CARDOSINA A TOTAL- MÉTODO DO BCA	59
2.4.4 QUANTIFICAÇÃO DA CARDOSINA A ACTIVA	60
2.4.4.1 Titulação cardosina A.....	61
2.4.4.2 Titulação da cardosina A em Ureia	61
2.4.5 DETERMINAÇÃO DE K_M E V_{MAX}	62
2.4.5.1 Cardosina A.....	62
2.4.5.2 Cardosina A em Ureia	62
3 RESULTADOS	63
3.1 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	65
3.1.1 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR.....	65
3.1.2 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÓNICA	66
3.1.3 SDS-PAGE.....	67
3.1.4 CONCLUSÕES	67
3.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS.....	68

3.2.1 CARDOSINA A.....	68
3.2.1.1 Determinação da concentração inicial de enzima a usar	68
3.2.1.2 Determinação de K_M e V_{max}	71
3.2.2 CARDOSINA A EM UREIA	72
3.2.2.1 Determinação de K_M e V_{max}	72
3.2.3 QUANTIFICAÇÃO DA CARDOSINA A.....	77
3.2.3.1 Método do BCA.....	77
3.2.3.2 Titulação com pepstatina A	77
3.2.3.2.1 Titulação na ausência de Ureia	78
3.2.3.2.2 Titulação em Ureia	81
3.2.4 DETERMINAÇÃO DE K_{CAT} E K_{CAT}/K_M	83
4 DISCUSSÃO.....	87
4.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	89
4.2 CARDOSINA A	90
4.3 TITULAÇÃO DOS LOCAIS ACTIVOS.....	95
4.4 INTERPRETAÇÃO DOS VALORES DAS CONSTANTES CINÉTICAS.....	97
4.4.1 K_M	97
4.4.2 K_{CAT} E K_{CAT}/K_M	101
4.4.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS SEGUNDO OS TRÊS MÉTODOS DE LINEARIZAÇÃO.....	107
4.5 CONCLUSÃO.....	110
4.6 TRABALHO FUTURO.....	112
5 BIBLIOGRAFIA	113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Exemplos de proteinases das diferentes classes conhecidas.....	10
Tabela 1.2 Estrutura secundária da cardosina A nativa [pH 5,0, 25°C]e desnaturada [pH 5,0, 85°C] determinada por difractoísmo circular.	28
Tabela 1.3 Especificidade da cardosina A.	30
Tabela 1.4 Constantes cinéticas da cardosina A relativas à hidrólise de três peptídeos sintéticos..	31
Tabela 1.5 Constantes cinéticas da cardosina A relativas à hidrólise de ? -La e ?-Lg.....	31
Tabela 2.1 Gradiente usado na eluição das cardosinas Ao, A e B na <i>HiLoad Q Sepharose® Phast Flow</i> no sistema AKTA-FPLC da <i>Amersham Pharmacia Biotech</i>	53
Tabela 2.2 Titulação dos locais activos da cardosina A.....	61
Tabela 2.3 Concentração de substrato e volume de enzima usados na determinação de K_M e V_{max} da cardosina A em soluções de ureia.	62
Tabela 3.1 Valores de K_M e V_{max} segundo o método de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden.	71
Tabela 3.2 Valores de K_M segundo o método de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden para a cardosina A na presença de diferentes concentrações de ureia.....	76
Tabela 3.3 Valores de V_{max} segundo o método de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden para a cardosina A na presença de diferentes concentrações de ureia.....	76
Tabela 3.4 Valores de actividade (? A300/min) da cardosina A vs. concentração de pepstatina A.	78
Tabela 3.5 Valores de actividade (? A300/min) da cardosina A vs. concentração de pepstatina A.	79
Tabela 3.6 Titulação da cardosina A com pepstatina A.	80
Tabela 3.7 Concentração de cardosina A activa em diferentes concentrações de ureia.....	82
Tabela 3.8 Valores de K_M , k_{cat} e eficiência catalítica da cardosina A para diferentes concentrações de ureia, obtidos através do método de linearização de Lineweaver-Burk.....	83
Tabela 3.9 Valores de K_M , k_{cat} e eficiência catalítica da cardosina A para diferentes concentrações de ureia, obtidos através do método de linearização de Hanes-Woolf.....	84
Tabela 3.10 Valores de K_M , k_{cat} e eficiência catalítica da cardosina A obtidos através do método de linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden.	84
Tabela 3.11 Valores de K_M , k_{cat} e eficiência catalítica da cardosina A sem titulação dos locais activos.....	85
Tabela 4.1 Concentração e percentagem relativa de cardosina A activa em função da concentração de ureia.	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Mecanismo catalítico das proteinases aspárticas proposto por Veerapandian <i>et al</i> (1992).....	13
Figura 1.2 Mecanismo catalítico das proteinases aspárticas proposto por Andreeva e Rumsh (2001).....	14
Figura 1.3 Representação esquemática da cardosina A.....	20
Figura 1.4 Estrutura da procardosina A com o pró-segmento e domínio <i>PSI</i> , e estrutura da cardosina A madura.....	21
Figura 1.5 Sequência deduzida da cardosina A.....	23
Figura 1.6 Representação esquemática da cardosina A.....	24
Figura 1.7 Nomenclatura dos sub-locais de ligação de Schechter e Berger (1967).....	25
Figura 1.8 Representação esquemática dos sub-locais de ligação da cardosina A tendo como substrato um fragmento da k-caseína.....	26
Figura 1.9 Espectro de absorção do substrato Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO ₂)-Ala-Leu (SS1).....	33
Figura 1.10 Curva de Henri-Michaelis-Menten.....	35
Figura 1.11 Gráfico ilustrativo da linearização de Lineweaver- Burk.....	37
Figura 1.12 Gráfico ilustrativo da linearização de Eadie-Hofstee.....	38
Figura 1.13 Gráfico ilustrativo da linearização de Hanes-Woolf.....	39
Figura 1.14 Gráfico ilustrativo da linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden.....	40
Figura 1.15 Estrutura química da pepstatina A, inibidor das proteinases aspárticas.....	42
Figura 1.16 Visualização pormenorizada de uma molécula de inibidor no local activo da cardosina A.....	43
Figura 2.1 Determinação da concentração de enzima activa por titulação com pepstatina A.....	60
Figura 3.1 Cromatografia de exclusão molecular em HiLoad Superdex® 75 26/60 prep grade.....	65
Figura 3.2 Cromatografia de troca aniónica em HiLoad Q Sepharose Phast Flow.....	66
Figura 3.3 Gel de SDS-PAGE (corado com coomassie R 350) das fracções recolhidas durante a purificação das cardosinas.....	67
Figura 3.4 Hidrólise do substrato SS1 na presença da cardosina A, a 37°C.....	68
Figura 3.5 Hidrólise do substrato SS1 na presença da cardosina A, a 37°C.....	69
Figura 3.6 Curva de Henri-Michaelis-Menten da cardosina A.....	69
Figura 3.7 Hidrólise do substrato SS1 na presença da cardosina A, a 37°C.....	70
Figura 3.8 Curva de Henri-Michaelis-Menten da cardosina A.....	71
Figura 3.9 Curvas de Henri-Michaelis-Menten da cardosina A na presença de ureia.....	75
Figura 3.10 Curva de calibração segundo o método do BCA utilizando como padrão a albumina de soro bovino.....	77
Figura 3.11 Actividade da cardosina A em função da concentração de pepstatina A.....	79
Figura 3.12 Actividade da cardosina A em função da concentração de pepstatina A.....	80
Figura 4.1 Representação gráfica da molécula de cardosina A.....	91
Figura 4.2 Visualização da fenda catalítica da cardosina A (programa <i>Setor</i>).....	93
Figura 4.3 Percentagem de cardosina A activa <i>vs.</i> concentração de ureia.....	96
Figura 4.4 Variação de K_M <i>vs.</i> concentração de ureia.....	98
Figura 4.5 Variação de k_{cat} da cardosina A em função da concentração de ureia.....	102
Figura 4.6 Variação de k_{cat}/K_M da cardosina A em função da concentração de ureia.....	104
Figura 4.7 Valores de K_M segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden.....	107
Figura 4.8 Valores de k_{cat} segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden.....	108
Figura 4.9 Valores de k_{cat}/K_M segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden.....	109

Abreviaturas

BCA	Ácido bicinconínico
HSA	Albumina de soro humana
PA	Proteinase aspártica
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PSI	Inserto específico de plantas
RGD	Sequência de adesão celular
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sódio - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$
SS1	Substrato sintético - Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO ₂)-Ala-Leu
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametil etilenodiamina - $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Tris	2-Amino 2-hidroximetil 1,3-propanodiol - $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$
UV	Ultra-Violeta

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROTEASES - CONSIDERAÇÕES GERAIS

As enzimas são proteínas capazes de diminuir a energia de activação de reacções químicas biológicas, aumentando a sua velocidade. Actuam em moléculas específicas conhecidas por substrato, de modo a produzir produtos de reacção específicos, regenerando-se totalmente no final da reacção. Algumas enzimas são capazes de acelerar a velocidade de uma reacção num factor de 10^{12} relativamente à reacção não catalisada. Este incrível aumento da velocidade da reacção aliado à elevada especificidade relativamente ao substrato, resulta da justaposição de grupos reactivos no interior da enzima (local activo) e grupos da molécula alvo. Os grupos quimicamente reactivos de uma enzima são aminoácidos e seus derivados; o arranjo destes dentro do local activo define a hidrofobicidade, estereoquímica e carácter electrostático do mesmo. Estas propriedades definem que moléculas ou regiões de uma molécula podem ligar-se ao centro activo da enzima e o seu conhecimento permite o desenho e síntese de novos substratos e inibidores.

A classificação das proteases referida neste texto é a recomendada pelo Comité de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) (www.chem.qmul.ac.uk/IUBMB).

As enzimas proteolíticas catalisam a clivagem das ligações peptídicas nas proteínas ou peptídeos. As proteases, ou peptidases, pertencem à classe das hidrolases (EC 3) e à sub-classe das hidrolases peptídicas (EC 3.4). Podem ser divididas em dois grandes sub-grupos, as exopeptidases (E.C.3.4.11-19) que hidrolisam ligações peptídicas no terminal amínico ou carboxílico removendo apenas um aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo e as endopeptidases ou proteinases (E.C.3.4.21-25) que clivam ligações peptídicas no interior da cadeia peptídica.

As proteinases são classificadas com base na estrutura do seu local activo e respectivo mecanismo catalítico. De acordo com esta classificação, o NC-IUBMB divide as proteinases em seis classes: proteinases aspárticas, cisteínicas, metaloproteinases, serínicas, treonínicas, e de “mecanismo catalítico desconhecido”. Esta última classe não contém qualquer proteína de momento, uma vez que as aí existentes foram reclassificadas e transferidas para outras classes após identificação do mecanismo catalítico.

Na tabela 1.1 são apresentados alguns exemplos de proteinases das diferentes classes conhecidas.

Tabela 1.1 Exemplos de proteinases das diferentes classes conhecidas.

Classe	Enzima	Origem
Serínicas (EC 3.4.21)	Tripsina	Pancreas
	Quimotripsina	Pancreas
	kallikrein	Saliva
Cisteínicas (EC 3.4.22)	Papaína	<i>Papaya latex</i>
	Ananaína	Ananas comosus
Aspárticas (EC 3.4.23)	Cardosina A	<i>Cynara cardunculus</i> L.
	Cardosina B	<i>Cynara cardunculus</i> L.
	Catepsina D	Fígado
	HIV proteinase	HIV
	Quimosina	Suco gástrico
	Pepsina	Suco gástrico
Metaloproteinases (EC 3.4.24)	Renina	Plasma e rim
	Gelatinase A	Matriz extracelular
Treonínicas (EC 3.4.25)	Gelatinase B	Matriz extracelular
	Endopeptidase complexa do proteosoma	<i>Thermoplasma acidophilum</i>

1.1.2 Proteinases aspárticas

As proteinases aspárticas (PAs) (EC 3.4.23) são caracterizadas pela presença de dois resíduos de ácido aspártico no local activo, na forma de duas sequências conservadas Asp-Thr-Gly (DTG). São caracterizadas pela perda de função catalítica após o tratamento com pepstatina A (Umezawa *et al.*, 1970), diazoacetilnorleucinato de metilo (DAN) ou com 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano (EPNP) e apresentam actividade máxima a pH ácido.

As PAs têm uma estrutura bilobal e a fenda do local activo é uma longa cavidade que se estende cerca de 30Å através da interface entre os dois lobos da molécula. Nota-se uma *quasi* simetria conformacional relativa aos dois resíduos de ácido aspártico, simetria esta que se alarga a toda a molécula e que resulta do enrolamento idêntico das duas metades da molécula. Devido a esta característica foi sugerido que os genes das proteinases aspárticas resultam da duplicação e fusão de um gene ancestral.

Estas proteinases constituem um grupo de enzimas que partilham bastantes semelhanças em termos de sequência, estrutura tridimensional e mecanismo catalítico (Tang e Wong, 1987; Davies, 1990; Dunn, 1992). Estão largamente distribuídas na natureza e têm papel vital nos sistemas biológicos: são essenciais na regulação da pressão arterial actuando ao nível do sistema renina-angiotensina, na degradação proteica actuando no aparelho digestivo -pepsina e quimosina. A catepsina D é uma endopeptidase lisossómica crucial na degradação proteica intracelular e que pode estar envolvida na libertação de peptídeos β -amilóides do precursor amilóide, na doença de Alzheimer (Ladror *et al.*, 1994; Beyer e Dunn, 1998). São precursores do processamento proteico, tendo-se descoberto que a única enzima envolvida na replicação e mutação dos retrovirus HIV-1 e HIV-2 é uma proteinase aspártica (Oldziej e Ciarkowski, 1996).

A base de dados MEROPS (merops.sanger.ac.uk) criada por Rawlings e Barrett (1999) agrupa as PAs em catorze famílias distintas. No entanto, se se considerar a presença das duas tríades catalíticas Asp-Thr (Ser)-Gly essencial na classificação da classe, apenas 9 famílias são reconhecidas. Destas, as mais representativas são A1 (pepsina), com 282 membros e A2 (proteases retrovirais) com 93 membros (Dunn, 2002). A maioria das PAs de plantas pertencem à família A1.

1.1.2.1 Proteinases aspárticas de plantas

Apenas um número restrito de PAs de plantas foram isoladas e parcialmente caracterizadas: sorgo (Macedo *et al.*, 1999), arroz (Asakura *et al.*, 1995), trigo (Belozersky *et al.*, 1989; Timmerman *et al.*, 1993), cevada (Sarkkinen *et al.*, 1992; Zhang e Jones, 1999), e cardo (Faro *et al.*, 1987; Veríssimo *et al.*, 1996). As PAs estão presentes nas sementes, folhas e flores de muitas espécies (Mutlu e Gal, 1999), muitas delas sendo acumuladas em vacúolos de armazenamento (Rodrigo *et al.*, 1991; Ramalho-Santos *et al.*, 1997). Pouco é sabido da sua função biológica (Simões e Faro, 2004), mas foi sugerido que poderão estar envolvidas na hidrólise de proteínas de reserva e no armazenamento e hidrólise de proteínas extracelulares. Por exemplo, pensa-se que as PAs presentes nos ascídios das plantas carnívoras estão envolvidas na digestão dos insectos capturados (Rodrigo *et al.*, 1989). Nas sementes do milho

as proteinases aspárticas estão associadas à hidrólise de proteínas de reserva (Belozersky *et al.*, 1989).

As PAs de plantas partilham uma característica comum e única, apresentando um segmento interno de cerca de 100-102 aminoácidos designado “*plant specific insert*” (*PSI*) que não tem analogia com proteinases aspárticas de outros organismos. Este segmento está presente apenas na forma imatura da enzima sendo parcial ou totalmente removido durante o processamento proteolítico que conduz à activação da enzima (Tang e Wong, 1987; Veríssimo *et al.*, 1996; Ramalho-Santos *et al.*, 1998; Asakura *et al.*, 2000).

Outra característica específica das PAs de plantas é a mutação existente na tríada catalítica do domínio C-terminal, em que a treonina é substituída por serina. Assim sendo, a sequência DTG situa-se no domínio N-terminal e a sequência DSG no C-terminal, enquanto nos restantes eucariotas as duas tríadas são iguais (DTG) (Marciniszyn *et al.*, 1977; Dunn *et al.*, 1986; Tang & Wong, 1987; Davies, 1990; Kay e Dunn, 1992).

1.1.2.2 Mecanismo catalítico

O centro catalítico das proteinases aspárticas é constituído, como referido, por dois resíduos de ácido aspártico nas posições 32 e 215 (numeração da pepsina) localizados no interior da fenda catalítica. Na figura 1.1 mostra-se o mecanismo catalítico das proteinases aspárticas segundo Veerapandian *et al.*, (1992) e James *et al.*, (1992).

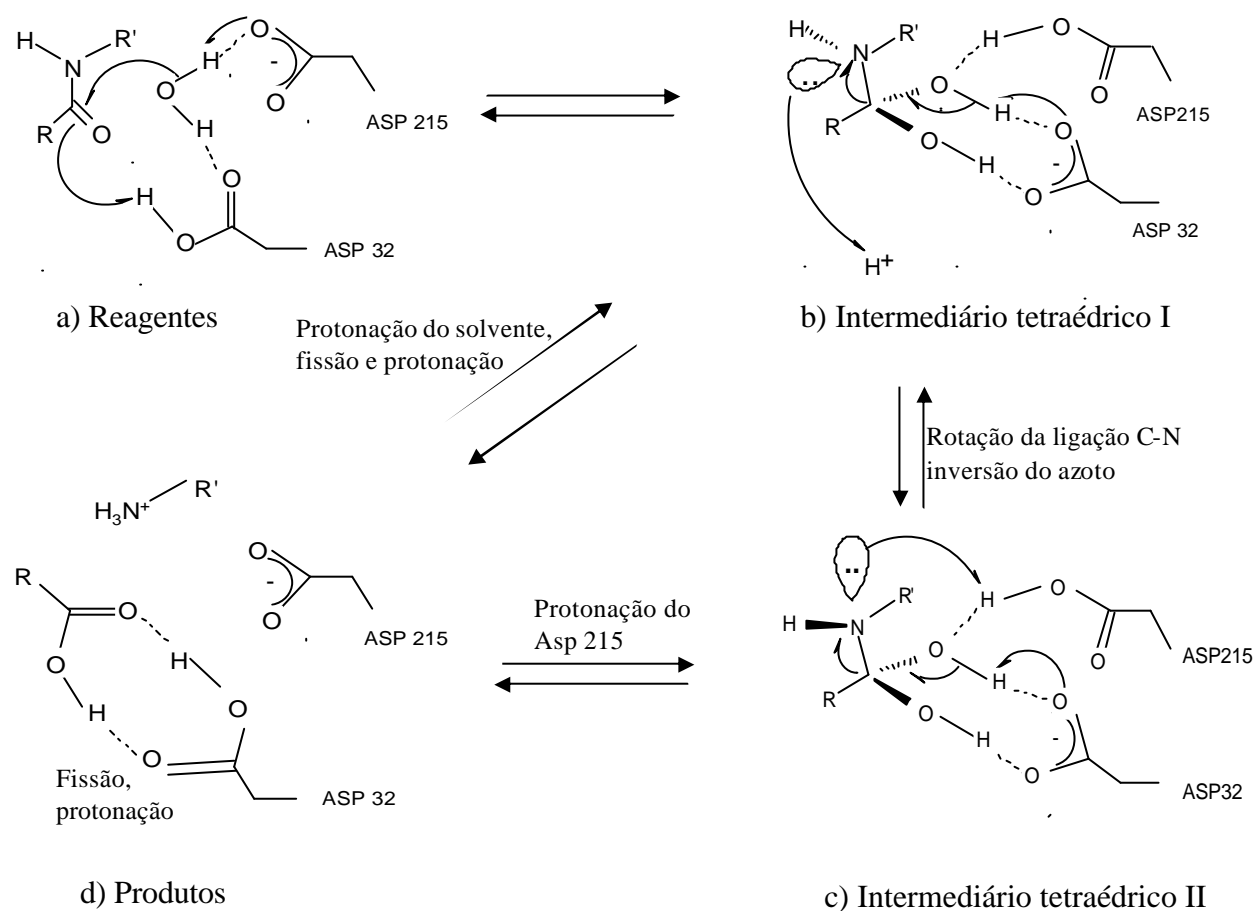


Figura 1.1 Mecanismo catalítico das proteinases aspárticas proposto por Veerapandian *et al* (1992).

O mecanismo é baseado na análise cristalográfica do inibidor hidratado 2,2-difluorestatona complexado com endotiapepsina. Adaptado de Beveridge e Heywood, 1993.

Os autores propuseram que o Asp₂₁₅ actua como base removendo o protão da molécula de água, enquanto o Asp₃₂ doa um protão ao oxigénio do grupo carbonilo da ligação peptídica susceptível. No intermediário tetraédrico resultante, o Asp₂₁₅ está ligado por uma ligação de hidrogénio ao oxigénio da água, enquanto o hidrogénio ligado covalentemente a esse oxigénio

apresenta uma ligação de hidrogénio com o oxigénio do Asp₃₂. A transferência do protão do Asp₂₁₅ ao azoto da ligação peptídica susceptível é acompanhada por uma inversão da configuração em torno do átomo de azoto. Em consequência desta rotação a ligação C-N é quebrada originando os produtos. O produto carbonílico mantém a ligação por ponte de hidrogénio ao Asp₃₂ enquanto o Asp₂₁₅ está ionizado e apto para nova catálise.

Andreeva e Rumsh (2001) analisaram a estrutura de 82 enzimas e complexos enzima-inibidor e descobriram uma segunda molécula de água (W2) no local activo, a qual está localizada entre os resíduos Tyr₇₅, Asn₃₇ e Ser₃₅ (fig. 1.2).

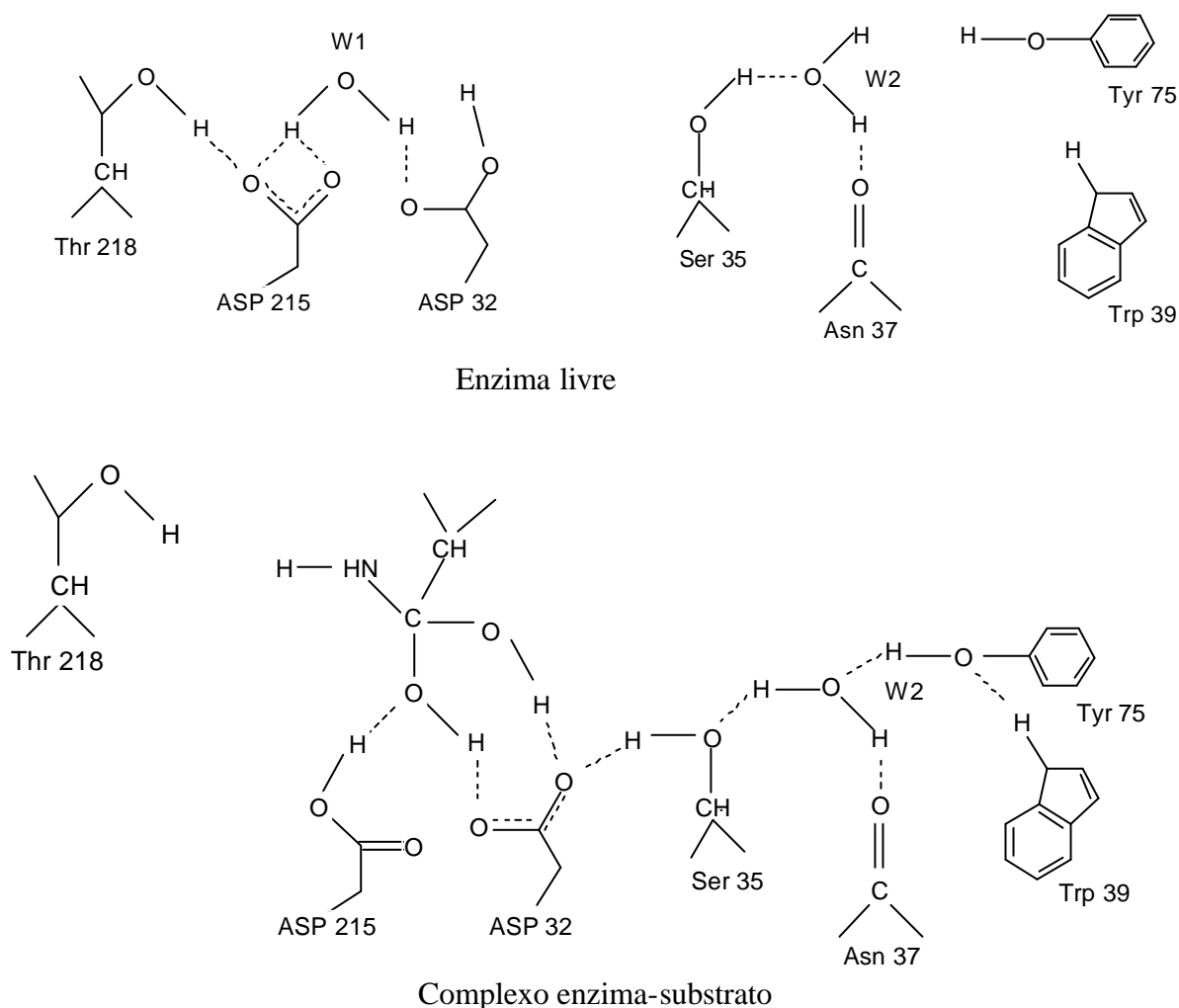


Figura 1.2 Mecanismo catalítico das proteinases aspárticas proposto por Andreeva e Rumsh (2001).

No mecanismo proposto por estes autores, W2 estabelece uma ligação de hidrogénio com o oxigénio do grupo carbonilo do Asn₃₇ e com o OH da Ser₃₅. Durante a ligação ao substrato, o OH da Ser₃₅ sofre rotação de modo estabelecer uma ligação de hidrogénio com o oxigénio exterior do Asp₃₂ e a molécula W2 forma uma ligação de hidrogénio com o OH da Tyr₇₅. Estes eventos ocorrem enquanto o ‘*flap*’ situado acima da fenda catalítica se fecha sobre o substrato ligado. O novo hidrogénio ligado ao Asp₃₂ facilita que este ceda um protão ao grupo carbonilo da ligação peptídica susceptível, originando um intermediário idêntico ao identificado por Veerapandian *et al.*, (1992) e James *et al.*, (1992). Durante a ligação do substrato à enzima a ligação de hidrogénio existente entre Thr₂₁₈ e Asp₂₁₅ é quebrada. Nos últimos passos da catálise, o hidrogénio retirado à primeira água catalítica (W1) pelo Asp₂₁₅ é transferido para o azoto da ligação peptídica, o que aumenta a electroafinidade deste átomo, o qual por sua vez vai captar electrões do oxigénio do grupo carbonilo. O reposicionamento da Ser₃₅ leva à quebra da ligação de hidrogénio estabelecida com o Asp₃₂, o que origina o aumento da basicidade do oxigénio exterior do Asp, fazendo com que este capte de novo o protão que havia doado ao oxigénio carbonílico, libertando electrões para restabelecer o grupo carbonilo. Isto quer dizer que o produto carboxílico da reacção deixa o centro catalítico levando consigo um protão do Asp₃₂. O restabelecimento de uma ligação ponte de hidrogénio entre o Thr₂₁₈ e o Asp₂₁₅ e a ligação de uma nova molécula W1 completa o ciclo catalítico.

1.2 CARDOSINAS- PROTEINASES ASPÁRTICAS DE *CYNARA CARDUNCULUS* L.

1.2.1 Perspectiva histórica e interesse

As cardosinas são endopeptidases aspárticas presentes nos pistilos maduros da flor da *Cynara cardunculus* L. (família das Asteraceae), e a sua denominação deve-se ao nome português desta planta - cardo. A sua localização é maioritariamente mediterrânica e muito semelhante à distribuição da Oliveira. O cardo é uma planta selvagem, que cresce em locais secos e rochosos, mas também pode ser cultivada.

A actividade coagulante dos pistilos de *Cynara cardunculus* L. sobre o leite tem vindo a ser explorada no fabrico de queijo em Portugal desde a Era Romana (Frazão *et al.*, 1999). O cardo é tradicionalmente usado no fabrico de vários tipos de queijo muito apreciados, como sejam Serra, Azeitão e Serpa.

Além do cardo, vários agentes têm a capacidade de coagular o leite. A coagulação pode ser conseguida por:

- ? acidificação por ácidos minerais ou orgânicos;
- ? enzimas proteolíticas de origem animal – coalho (mistura de quimosina com pepsina)- segregado no estômago de ruminantes jovens;
- ? enzimas proteolíticas de origem vegetal – papaína, bromélica, etc;
- ? acidificação por fermentação láctea a partir enzimas proteolíticas de origem microbiana (bactérias e fungos);

Os queijos obtidos a partir do cardo têm características organolépticas diferentes de outros queijos, obtidos a partir do mesmo leite, mas com agentes coagulantes diferentes.

Além do cardo outras espécies da família Asteraceae têm a capacidade de coagular o leite, no entanto, espécies como *Centaurea calcitrapa* (Domingos *et al.*, 2000), *Sylibum marianum* (Fevereiro *et al.*, 1986) e *Onopordum turcicum* (Tamer, 1993) mostraram uma actividade coagulante muito inferior às espécies do género *Cynara*.

Em 1987, Faro *et al.*, demonstraram que a actividade coagulante do extracto aquoso dos pistilos de *Cynara cardunculus* L. se devia à presença de uma proteinase aspártica, mas estudos posteriores revelaram a existência de duas enzimas que foram denominadas cardosina A, a mais abundante, e cardosina B, a menos abundante (Veríssimo *et al.*, 1996). Estas duas enzimas

constituem cerca de 60% do conteúdo proteico nos pistilos maduros e são o primeiro exemplo de abundância de proteinases nas plantas superiores.

Veríssimo *et al.*, (1996) distinguiram a cardosina A da cardosina B através da mobilidade relativa em géis de SDS-PAGE. Enquanto a cardosina A migra como duas cadeias de massa molecular aparente de 15 e 31 kDa, a cardosina B aparece com massas moleculares aparentes de 14 e 34 kDa. Verificaram existirem diferenças na sequência dos resíduos de aminoácidos pelo que concluíram serem produto de genes distintos. Ambas são glicosiladas, activas a pH entre 2 e 7, apresentando um pH óptimo a 4.7.

Posteriormente foi separada por cromatografia de troca iónica e parcialmente caracterizada uma terceira enzima, que pela sua semelhança em termos de massas aparentes com a cardosina A se denominou cardosina A₀ (Veríssimo, 1996).

Mais recentemente Lopes (2003) caracterizou parcialmente por electroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massa, 4 fracções de cardosina A₀ que denominou 1P, 2P, 3P e 4P.

1.2.2 Localização e função biológica

Ramalho-Santos *et al.* (1997) verificaram que a expressão de ambas as cardosinas se restringe aos pistilos, o órgão sexual feminino da flor. O pistilo (ou gineceu) pode ser dividido em três partes: estigma, estilete e ovário; as cardosinas são maioritariamente expressas no estigma e estilete da *C. Cardunculus* L. Verificam-se os mais elevados níveis de expressão das cardosinas no estado maduro e de senescência da planta do cardo (Ramalho-Santos *et al.*, 1997).

Enquanto a cardosina A se acumula nos vacúolos de armazenamento proteico das células periféricas do estigma e nos vacúolos das células da epiderme do estilete, a cardosina B é uma proteína extracelular que se encontra na matriz extracelular do tecido de transmissão o que sugere que as cardosinas desempenham papéis distintos na planta (Faro *et al.*, 1998). Pensa-se que devido à sua localização, as cardosinas estão envolvidas na interação pólen-pistilo que ocorre durante a reprodução sexual da planta e no fenómeno de senescência da flor (Faro *et al.*, 1998). A grande acumulação da cardosina A nas células periféricas do estigma sugere um eventual envolvimento na defesa contra agentes patogénicos e/ou insectos.

1.2.3 Especificidade das cardosinas

Estudos iniciais demonstraram que a actividade coagulante do cardo sobre o leite era devida à clivagem da ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da k-caseína (Faro *et al.*, 1992; Macedo *et al.*, 1993), ligação também clivada por outras enzimas coagulantes do leite. Em estudos posteriores (Macedo *et al.*, 1996) determinou-se a degradação sofrida pela caseína κ _{s1} e κ -caseína pelo cardo. A caseína κ _{s1} [pH 6,2, 30°C] é degradada pela mistura de cardosinas de uma forma sequencial, começando na ligação mais susceptível Phe₂₃-Phe₂₄ e avançando, por ordem de clivagem, para Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, Tyr₁₆₆-Val₁₆₇, Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆ e Phe₁₅₃-Tyr₁₅₄. Na hidrólise da κ -caseína [pH 6,2, 30°C], a ligação peptídica Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ é a mais susceptível à hidrólise, seguida das ligações Leu₁₆₅-Ser₁₆₆, e Leu₁₂₇-Thr₁₂₈.

Os estudos de especificidade da cardosina A sobre a cadeia κ da insulina oxidada [pH 3,1, 37°C] (Veríssimo *et al.*, 1995) revelaram que a proteína sofre clivagem nas ligações Leu₁₅-Tyr₁₆, Leu₁₇-Val₁₈ e Phe₂₅-Tyr₂₆. Na caseína κ _{s1} [pH 6,2, 30°C] as ligações clivadas são Phe₂₃-

Phe₂₄, Phe₁₅₃-Tyr₁₅₄, Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆, Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ e Phe₁₅₃-Tyr₁₅₄ (Ramalho-Santos *et al.*, 1996). Simões (1998) obteve como único local de clivagem da k-caseína a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ [pH 6,2, 30°C]. A especificidade da cardosina A na hidrólise da κ -caseína (Simões, 1998) revelou ser igual à determinada para a mistura das duas cardosinas (Macedo *et al.*, 1996).

A cardosina A mostrou ainda possuir actividade colagenolítica sobre o colagénio humano tipo I. Duarte (2001) identificou um local de clivagem correspondente à ligação Phe₄₆₄-Gln₄₆₅, no interior das hélices de colagénio.

Os estudos de especificidade da cardosina B sobre a κ _{s1}-caseína [pH 6,2, 30°C] mostraram clivagem nas ligações Phe₂₃-Phe₂₄, Phe₁₅₀-Arg₁₅₁, Phe₁₅₃-Tyr₁₅₄ e Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ (Ramalho-Santos *et al.*, 1996). Na cadeia κ da insulina oxidada, a clivagem ocorre em seis ligações peptídicas: Glu₁₃-Ala₁₄, Ala₁₄-Leu₁₅, Leu₁₅-Tyr₁₆, Leu₁₇-Val₁₈, Phe₂₄-Phe₂₅ e Phe₂₅-Tyr₂₆ (Veríssimo *et al.*, 1995). A cardosina B revela maior actividade proteolítica que a cardosina A e menor especificidade (Ramalho-Santos *et al.*, 1996).

Em termos de especificidade e parâmetros cinéticos [pH 4,7, 37°C] a cardosina A é similar à quimosina, enquanto a cardosina B é similar à pepsina (Veríssimo *et al.*, 1995).

De realçar que tanto a cardosina A como a cardosina B, clivam essencialmente ligações peptídicas entre aminoácidos com cadeias laterais hidrófobas, característica das proteinases aspárticas em geral.

Estudos de hidrólise da caseína total e da cadeia β da insulina oxidada revelaram diferenças de actividade entre a cardosina A e as fracções 1P, 2P, 3P e 4P da cardosina A₀, apresentando a fracção 3P maior actividade que as restantes.

Os resultados da hidrólise da cadeia β da insulina oxidada indicam que todas as fracções da cardosina A₀ apresentam a mesma especificidade e idêntica à especificidade apresentada pela cardosina A. Os resultados de comparação da velocidade de hidrólise das ligações Leu₁₅-Tyr₁₆ e Phe₂₅-Tyr₂₆ da cadeia β da insulina oxidada permitiram verificar diferenças de selectividade entre as fracções 1P, 2P, 3P e 4P da cardosina A₀ e entre estas e a cardosina A (Lopes, 2003).

1.3 CARDOSINA A (EC 3.4.23)

A sequência de aminoácidos da cardosina foi parcialmente obtida por sequenciação N-terminal (Veríssimo *et al.*, 1996) e mais tarde completamente determinada por clonagem e caracterização do cDNA (Faro *et al.*, 1999). Em 1998 (Bento *et al.*, 1998) foram dados os primeiros passos no sentido de cristalizar a cardosina A e caracterizar a sua estrutura por cristalografia de raios X e estudos posteriores do mesmo grupo de investigadores permitiram um melhor conhecimento da estrutura da enzima (Frazão *et al.*, 1999). A figura 1.3 mostra uma representação esquemática da cardosina A.

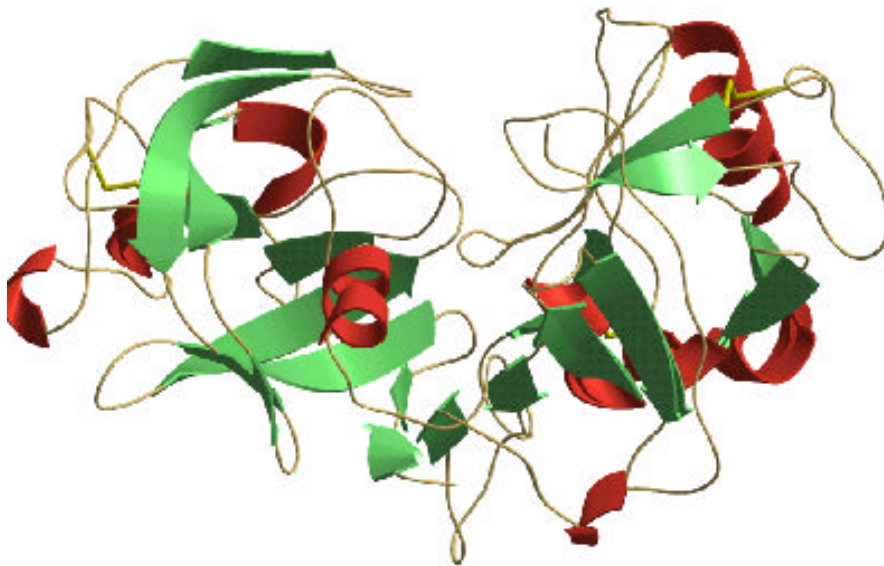


Figura 1.3 Representação esquemática da cardosina A

A verde estão representadas as folhas β , a vermelho as hélices α e a castanho a estrutura desordenada da cardosina A. *Figura amavelmente cedida por Sandra Macedo (Centro de Neurociências, Universidade de Coimbra).*

1.3.1 Estrutura primária da cardosina A

A numeração da cardosina A seguida neste texto será a correspondente à pepsina (Sielicki *et al.*, 1990).

As proteinases aspárticas, como a maior parte das proteases, são sintetizadas como zimogénios inactivos que, após processamento proteolítico, se transformam em enzima activa (Tang & Wong, 1987).

A análise da sequência de cDNA da cardosina A revela que esta é sintetizada como uma única cadeia peptídica denominada procardosina A. Esta cadeia contém o pró-segmento no terminal amínico e o domínio *PSI* que separa a cadeia 31 kDa da cadeia 15 kDa. Este domínio e o pró-segmento estão presentes na cardosina A na sua forma imatura (procardosina A), e não na cardosina A activa. O processamento proteolítico da enzima (ou activação) inclui a clivagem de ligações peptídicas internas dando origem ao aparecimento das duas cadeias (Ramalho-Santos *et al.*, 1998), como se representa na figura 1.4.



Figura 1.4 Estrutura da procardosina A com o pró-segmento e domínio *PSI*, e estrutura da cardosina A madura.

Adaptado de Ramalho-Santos et al., 1998.

Os resultados obtidos indicam que o domínio *PSI* é completamente removido, e com elevada precisão, durante a maturação da enzima, uma vez que os locais de clivagem se situam exactamente entre a cadeia 31 kDa e o domínio *PSI* e entre este e a cadeia de 15 kDa. A clivagem parece ocorrer na ordem referida (Ramalho-Santos *et al.*, 1998, Frazão *et al.*, 1999) e o processamento da cardosina A está completo quando o pró-segmento é removido (Ramalho-Santos *et al.*, 1998). Estes autores indicam ainda que a remoção do *PSI* ocorre no vacúolo, onde a proteína é armazenada.

Egas *et al* (2000) demonstraram que o *PSI* da cardosina A é um potente indutor da destruição vesicular. Os resultados descritos suportam a ideia que os precursores das PAs de plantas são moléculas bifuncionais contendo um domínio “destabilizador de membrana” a par com o seu domínio de protease. Assim, os autores sugerem que o *PSI* pode apresentar um papel importante em mecanismos defensivos contra agentes patogénicos e/ou como indutor de morte celular.

A estrutura cristalográfica da cardosina A inclui 2 moléculas independentes e glicosiladas da enzima, cada uma delas composta por 2 cadeias polipeptídicas, com um total de 326 aminoácidos (239 na cadeia maior e 87 na cadeia menor). Os dois resíduos de ácido aspártico do domínio catalítico estão localizados na cadeia de maior peso molecular em Asp₃₂-Thr-Gly (N-terminal) e Asp₂₁₅-Ser-Gly (C-terminal). A cardosina A apresenta uma molécula de água que se liga por pontes de hidrogénio aos dois grupos carbonilo dos aspartatos catalíticos e está envolvida na catálise, por isso se denomina água catalítica (Frazão *et al.*, 1999).

A cardosina A contém uma sequência de aminoácidos única entre as PAs de plantas. Esta sequência, Arg-Gly-Asp (RGD), denominada sequência de adesão celular, está localizada na base da molécula, em oposição ao local activo, projectando-se para o exterior da superfície molecular. Está aparentemente envolvida na interacção da proteinase com uma proteína do pólen de 100 kDa, reconhecida como possível receptor da cardosina A. A interacção entre estas duas proteínas medeia o mecanismo proteolítico da interacção pólen-pistilo (Frazão *et al.*, 1999).

Em cada molécula de cardosina A há 19 unidades de monossacarídeos distribuídas em dois locais de glicosilação, um em cada subunidade ou cadeia polipeptídica. As unidades de monossacarídeos situam-se na superfície da molécula, nas posições 67 e 257, e afastadas do local activo (Frazão *et al.*, 1999). Pensa-se que a glicosilação não tem um papel preponderante na actividade e especificidade da cardosina A embora, devido à sua posição espacial, possa ser importante na estabilização conformacional da molécula.

São identificadas 3 pontes dissulfureto na cardosina A madura, duas na cadeia maior (Cys₄₅-Cys₅₀ e Cys₂₀₆-Cys₂₁₀) e uma na cadeia menor (Cys₂₄₉-Cys₂₈₂). As pontes dissulfureto não ocorrem entre as duas cadeias polipeptídicas; estas mantêm-se unidas por fortes interacções não covalentes – interacções hidrófobas e ligações ponte de hidrogénio (Frazão *et al.*, 1999).

Na figura 1.5 mostra-se a sequência de aminoácidos da cardosina A, obtida por caracterização do cDNA.

M G T S I K A N V L A L F L F Y L L S P T V F S V S D D G L I R
 I G L K K R K V D R I D Q L R G R R A L M E G N A R K D F
 G F R G T V R D S G S A V V A L T N D R D T S Y F G E I G I
 G T P P Q K F T V I F D T G S S V L W V P S S K C I N S K A
 C R A H S M Y E S S D S S T Y K E N G G T F G A I I Y G T G
 S I T G F F S Q D S V T I G D L V V K E Q D F I E A T D E A
 D N V F L H R L F D G I L G L S F Q T I S V P V W Y N M L N
 Q G L V K E R R F S F W L N R N V D E E E G G E L V F G G
 L D P N H F R G D H T Y V P V T Y Q Y Y W Q F G I G D V L
 I G D K S T G F C A P G G C Q A F A D S G T S L L S G P T A
 I V T Q I N H A I G A N G V M N Q Q C K T V V S R Y G R D
I I E M L R S K I Q P D K I C S H M K L C T F D G A R D V S
S I I E S V V D K N N D K S S G G I H D E M C T F C E M A V
V W M Q N E I K Q S E T E D N I I N Y A N E L C E H L S T S
 S E E L Q V D C N T L S S M P N V S F T I G G K K F G L T P
 E Q Y I L K V G K G E A T Q C I S G F T A M D A T L L G P L
 W I L G D V F M R P Y H T V F D Y G N L L V G F A E A A

Figura 1.5 Sequência deduzida da cardosina A.

Os pré e pró-segmentos estão indicados a azul, o domínio PSI a negro sublinhado, os prováveis locais de N-glicosilação estão indicados a rosa e as duas tríades catalíticas a vermelho. A tirosina 75 está assinalada a cor-de-laranja e a sequência de adesão celular a verde. *Faro et al., 1999.*

1.3.2 Estrutura secundária e terciária da cardosina A

(Frazão *et al.*, 1999) concluíram que a estrutura secundária da cardosina A segue a topologia de enrolamento da pepsina [Davies, 1990]. É essencialmente formada pela repetição do padrão de 4 cadeias β anti-paralelas, e uma hélice α , as quais são repetidas duas vezes em cada domínio. A estrutura secundária da cardosina A revela a presença de 10% de hélices α , 35% de cadeias β e 30% de “ β -turn” (Frazão *et al.*, 1999)?

O conhecimento detalhado da estrutura tridimensional de algumas proteinases, aliado à sua homologia em termos estruturais, possibilitou o desenvolvimento de estudos de modelação, que prevêem a estrutura tridimensional de novas proteinases aspárticas, sobrepondo a sua sequência de aminoácidos nas estruturas cristalográficas já existentes. A estrutura da cardosina A foi determinada usando como modelo a estrutura da catepsina D humana (fig. 1.6).

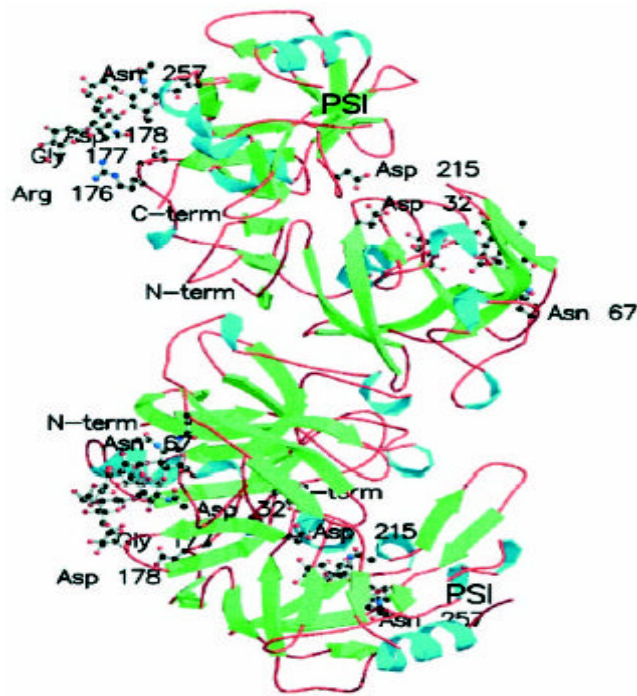


Figura 1.6 Representação esquemática da cardosina A.

A representação inclui 2 moléculas independentes. Os resíduos Asn_{67} e Asn_{257} são os locais de glicosilação, a sequência de adesão celular (RGD) é constituída pelos aminoácidos Arg_{176} , Gly_{177} e Asp_{178} . Os aspartatos catalíticos ocupam as posições 32 e 215. Frazão *et al.*, 1999.

Cada molécula de cardosina A apresenta a estrutura típica das proteinases aspárticas, isto é, uma estrutura bilobal com os dois domínios separados por uma larga fenda, no fundo da qual se situa o domínio catalítico, capaz de acomodar um substrato com 7 ou 8 resíduos distribuídos de ambos os lados dos dois aspartatos catalíticos (Tang *et al.*, 1978; Szecsi, 1992), e por vários sub-locais de ligação (S_4 - S'_3) [nomenclatura de Schechter e Berger (1967)] de modo a possibilitar a clivagem do substrato entre os dois aminoácidos hidrófobos que ocupam os locais S_1 - S'_1 (Powers, 1977) (fig. 1.7). A eficiência catalítica das enzimas é altamente influenciada pela existência de uma especificidade secundária a nível dos sub-locais (Fruton, 1970; Hofmann, 1982; Dunn *et al.*, 1986).

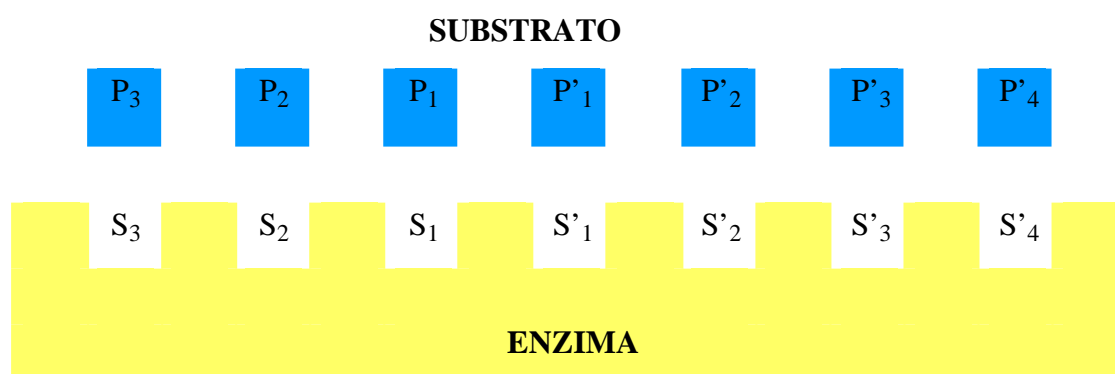


Figura 1.7 Nomenclatura dos sub-locais de ligação de Schechter e Berger (1967).

Os resíduos do substrato péptico são denominados P_1 - P_n do lado N-terminal na ligação susceptível e P'_1 - P'_n no lado C-terminal da mesma ligação. A ligação susceptível situa-se entre os resíduos P_1 - P'_1 . Os sub-locais correspondentes da enzima onde estes resíduos emparelham denominam-se respectivamente S_1 - S_n e S'_1 - S'_n . *Adaptado de Copeland, 2000.*

A identificação dos resíduos que estão envolvidos na especificidade de uma determinada PA para um dado substrato é necessária no sentido de compreender o que determina essa mesma especificidade em cada novo membro da família. O substrato fisiológico da cardosina A ainda não foi definitivamente estabelecido. Com vista à identificação dos resíduos envolvidos na ligação ao substrato é necessário obter um complexo de transição cardosina A-substrato, que ainda não foi conseguido, nem com um inibidor específico. De qualquer modo, os sub-locais de ligação da enzima podem ser identificados por analogia com outras PAs, cujas estruturas enzima-inibidor já foram determinadas. A estrutura de um inibidor complexado com a renina (Dhanaraj, 1992) foi adaptado à cardosina A. Este foi o primeiro guia para modelar um fragmento de k-caseína, correspondente aos resíduos 102-108, que contém a ligação Phe₁₀₅-

Met₁₀₆ clivada na proteólise do leite (Frazão *et al.*, 1999). Definiram-se como resíduos pertencentes aos sub-locais de ligação da enzima os que se encontram a uma distância máxima de 4,0 Å dos resíduos do substrato que flanqueiam a ligação susceptível Phe₁₀₅-Met₁₀₆; correspondem a 127 contactos atómicos que incluem provavelmente 5 ligações de hidrogénio, e envolvem exclusivamente átomos da cadeia principal (Frazão *et al.*, 1999) (fig. 1.8).

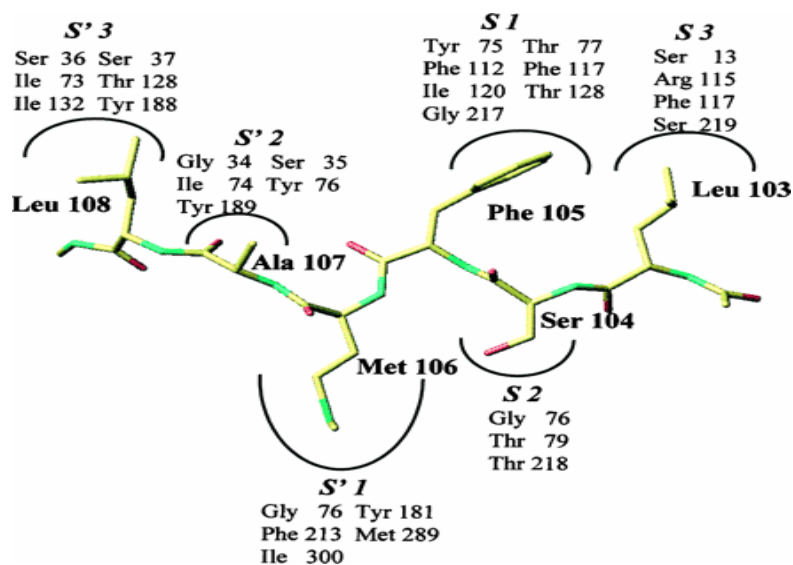


Figura 1.8 Representação esquemática dos sub-locais de ligação da cardosina A tendo como substrato um fragmento da k-caseína.

A ligação peptídica susceptível é Phe₁₀₅-Met₁₀₆, por onde se inicia a precipitação do leite na manufactura do queijo. Todos os sub-locais estão a uma distância igual ou inferior a 4 Å dos resíduos que flanqueiam a ligação susceptível Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Frazão *et al.*, 1999.

As diferenças de actividade e especificidade apresentadas pelas diferentes cardosinas em particular e pelas proteinases aspárticas em geral serão provavelmente devidas à presença de diferentes resíduos nos sub-locais de ligação, isto apesar da grande homologia em termos de estrutura primária, terciária e mecanismo catalítico. Será do mesmo modo devido a esta especificidade secundária alargada, que as proteinases aspárticas se encontram disseminadas pelos mais variados organismos e apresentam uma vasta gama de funções.

A cardosina A apresenta três regiões em forma de *loop* mais expostas ao solvente. Por cima da fenda catalítica situa-se um "loop" em forma de aba ou chapéu designada "flap" onde se encontra a Tyr₇₅, cujo anel aromático está orientado para o interior da fenda catalítica e que

segundo o mecanismo proposto por Andreeva e Rumsh (2001) contribui para a catálise. No programa de visualização de estruturas *Setor* (Evans, 1993) aplicado à cardosina A verifica-se que este “*flap*” é uma das zonas de maior flexibilidade da molécula de cardosina A.

1.3.2.1 Cardosina A desnaturada

Pina, D. G. *et al.* (2003) compararam as alterações na estrutura secundária e terciária da cardosina A nativa [pH 5,0, 25°C] e desnaturada [pH 5,0, 85°C] por espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular.

A espectroscopia de fluorescência da cardosina A nativa revela que parte dos resíduos de triptofano estão localizados nas regiões mais apolares, embora também existam resíduos de triptofano em contacto com moléculas de água que rodeiam a proteína. A 85°C a cardosina A encontra-se desnaturada, e verifica-se uma deslocação dos resíduos do interior da proteína para a superfície da mesma, embora parte dos resíduos de triptofano se mantenham no interior da estrutura proteica.

Os estudos por dicroísmo circular da estrutura secundária da cardosina A nativa revelam que a proteína é rica em estruturas α (tabela 1.2). Nas determinações efectuadas a 85°C, verificam-se alterações profundas no espectro que indicam mudança na estrutura secundária da proteína. O tratamento térmico leva ao desaparecimento quase completo das estruturas “ α turn” e ao crescimento da estrutura desordenada, enquanto o conteúdo em estruturas hélice α e cadeia- β se mantém inalterado. O número de segmentos α -helicoidais e o seu comprimento médio é o mesmo na cardosina A nativa e desnaturada. O número de segmentos cadeia- β na cardosina A desnaturada está reduzido em 6 unidades, com um aumento no seu comprimento médio de cerca de dois resíduos.

Tabela 1.2 Estrutura secundária da cardosina A nativa [pH 5,0, 25°C] e desnaturada [pH 5,0, 85°C] determinada por dicroísmo circular.

Adaptado de Pina et al., 2003.

Proteína	Segmentos da estrutura secundária %				Segmentos ? helicoidais		Segmentos cadeias ?	
	?-hélice	Cadeia ?	“??turn”	Desordenada	N?	L?	N?	L?
Nativa	7,0	42,9	20,2	29,9	4	5,1	25	5,8
Desnaturada	6,8	44,2	1,0	48,0	4	4,8	19	7,6

Os autores verificaram que a desnaturação térmica da cardosina não é acompanhada pela dissociação do dímero nas duas cadeias que o constituem. Esta constatação é anómala para proteínas multiméricas e os autores acreditam que, apesar de ocorrer a desnaturação da cardosina, alguns elementos estruturais responsáveis pela interacção entre as duas cadeias se mantêm. Deste modo uma parte considerável das estruturas secundária e terciária da cardosina A persistem após a desnaturação térmica, o que confirma a ideia de que a enzima não experimenta desenrolamento completo após desnaturação.

1.4 SUBSTRATO

1.4.1 Complementaridade substrato–local activo

A ligação de uma proteína a outra molécula (denominada ligando ou substrato) para formar um complexo, deve resultar numa estabilização efectiva do sistema relativamente à proteína e ao ligando livres; doutro modo a combinação proteína-ligando não será termodinamicamente favorável (Copeland, 2000). As ligações estabelecidas entre a enzima e o substrato poderão ser ligações de hidrogénio, de *van der Waals*, interacções hidrófobas, electrostáticas, etc.

O local activo de uma enzima é normalmente reduzido quando comparado com o volume total da enzima e está localizado no interior de uma fenda, o que favorece a exclusão do solvente quando o substrato se liga à enzima. A especificidade da ligação enzima-substrato depende do arranjo atómico bem definido do local activo que de algum modo complementa a estrutura da molécula de substrato (Copeland, 2000). Em termos de complementaridade química, os resíduos polares alinham-se com os resíduos polares que os neutralizam e os resíduos apolares com os apolares (Fersht, 1999). A complementaridade enzima-substrato pode ser também estereoquímica, de configuração espacial, de dimensão, etc.

O primeiro passo na catálise enzimática é a formação do complexo enzima-substrato, também conhecido por complexo de Henri-Michaelis-Menten, seguido pela formação de um complexo de transição enzima-substrato, até à formação do complexo enzima-produto e finalmente a dissociação deste complexo (Copeland, 2000). Sabe-se hoje que mais importante que a afinidade entre a enzima e o substrato (teoria da chave e da fechadura), é a complementaridade existente no complexo de transição enzima-substrato. Para que essa complementaridade exista, o local activo da enzima pode sofrer alterações de modo a interagir o melhor possível com a molécula de substrato (Copeland, 2000). O mesmo é dizer que o local activo após “receber” o substrato, se reorganiza em termos espaciais de modo a formar um complexo altamente ajustado. Por seu lado o substrato vai adaptar-se ao local activo adoptando a conformação mais distendida da sua cadeia peptídica (Dunn, 2000).

1.4.2 Escolha do substrato para determinação das constantes cinéticas da cardosina A

A tabela 1.3 apresenta de forma sistematizada a especificidade da cardosina A em vários substratos estudados.

Tabela 1.3 Especificidade da cardosina A.

Ligações peptídicas susceptíveis à degradação pela cardosina A nos diferentes substratos. Nos casos em que a cardosina A cliva mais do que uma ligação, os pares são apresentados por ordem decrescente de preferência. (1) Ramalho-Santos *et al.*, 1996; (2) Simões, 1998; (3) Veríssimo *et al.*, 1995; (4) Duarte, 2001; (5) Veríssimo *et al.*, 1996.

Substrato	Ligação peptídica clivada
? _{s1} -caseína ⁽¹⁾	Phe ₂₃ -Phe ₂₄ , Trp ₁₆₄ -Tyr ₁₆₅ , Tyr ₁₆₆ -Val ₁₆₇ , Tyr ₁₆₅ -Tyr ₁₆₆ e Phe ₁₅₃ -Tyr ₁₅₄
?-caseína ⁽²⁾	Leu ₁₉₂ -Tyr ₁₉₃ , Leu ₁₆₅ -Ser ₁₆₆ , e Leu ₁₂₇ -Thr ₁₂₈
k-caseína ⁽²⁾	Phe ₁₀₅ -Met ₁₀₆
Cadeia ? da insulina oxidada ⁽³⁾	Leu ₁₅ -Tyr ₁₆ , Leu ₁₇ -Val ₁₈ e Phe ₂₅ -Tyr ₂₆
Colagénio ⁽⁴⁾	Phe ₄₆₄ -Gln ₄₆₅
Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO ₂)-Ala-Leu ⁽⁵⁾	Phe-Phe(NO ₂)
Leu-Ser-Phe(NO ₂)-Ahx-Ala-Leu-OMe ⁽⁵⁾	Phe(NO ₂)-Ahx
Leu-Ser-Phe(NO ₂)-Nle-Ala-Leu-OMe ⁽³⁾	Phe(NO ₂)-Nle

Da análise da tabela anterior verifica-se que todas as ligações clivadas pela cardosina A são constituídas por aminoácidos com cadeias laterais hidrófobas ou, quando muito, cadeias laterais polares sem carga eléctrica, como é o caso da Ser, Thr e Gln.

Em 1995* e 1996** Veríssimo *et al.* determinaram os valores das constantes cinéticas da cardosina A a 37°C em tampão aquoso de acetato de sódio 50 mM, 4% DMSO, 0,2 M NaCl, pH 4,7 (tabela 1.4). Nas determinações usaram três substratos, Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-Ala-Leu-OMe*, SS1 (Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu)** e Leu-Ser-Phe(NO₂)-Ahx-Ala-Leu-OMe (Ahx, ácido 2 aminohexanóico)**.

Tabela 1.4 Constantes cinéticas da cardosina A relativas à hidrólise de três peptídeos sintéticos.

Os K_M foram determinados segundo o método de linearização de Lineweaver-Burk. *Adaptado de Veríssimo et al., 1995* e 1996**.*

Substrato	K_M /mM	k_{cat} /s ⁻¹	k_{cat}/K_M /mM ⁻¹ s ⁻¹
Leu-Ser-Phe(NO ₂)-Nle-Ala-Leu-OMe*	1,08	23,6	21,87
Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO ₂)-Ala-Leu (SS1)**	0,108?0,086	55,63?6,12	515,09? 56,7
Leu-Ser-Phe(NO ₂)-Ahx-Ala-Leu-OMe**	0,64?0,02	13,7?1,6	21,3?1,27

Verifica-se que a cardosina A apresenta maior afinidade para o substrato SS1 do que para os outros substratos. Verifica-se também que a constante de catálise (k_{cat}) e a constante de eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) são muito mais elevadas para o substrato SS1.

Num trabalho mais recente, Barros e Malcata (2002) determinaram as constantes cinéticas da cardosina A usando como substrato as proteínas do soro de leite, α -lactoalbumina (α -La) e β -lactoglobulina (β -Lg) – tabela 1.5.

Tabela 1.5 Constantes cinéticas da cardosina A relativas à hidrólise de α -La e β -Lg.

Substrato	T (°C)	pH	K_M /mM	k_{cat} /s ⁻¹	k_{cat}/K_M /mM ⁻¹ s ⁻¹
α -La	55	5,2	0,039	0,1	2,6
α -La	55	6,0	0,0080	0,0060	0,75
β -Lg	55	5,2	0,31	0,0020	0,0060
β -Lg	55	6,0	0,73	0,0000	0,0000

A cardosina A hidrolisa a α -La mais rápida e extensamente do que a β -Lg. O valor de K_M obtido para a α -La é bastante menor do que o obtido para a β -Lg, sugerindo uma maior afinidade da cardosina A para a α -La.

Os autores estudaram ainda a influência do pH nos valores de K_M e verificaram que a pH 6,0 a afinidade da cardosina A para a α -La é mais elevada do que a pH 5,2. Já com a β -Lg o comportamento é inverso, a pH 5,2 o K_M é menor do que a pH 6,0. Verifica-se que tanto a actividade como a eficiência catalítica são máximas para a α -La a pH 5,2.

Comparando os trabalhos de Veríssimo *et al.* (1995, 1996) e Barros e Malcata (2002) constata-se que a maior afinidade se verifica para a ?-La, logo seguida do peptídeo sintético SS1. Quanto à actividade e eficiência catalítica, a enzima é claramente mais activa em presença de qualquer um dos substratos sintéticos do que nas proteínas do soro, destacando-se o peptídeo SS1. Nesta comparação ressalva-se o facto da temperatura e pH usados por Barros e Malcata serem distintos dos usados por Veríssimo *et al.* (1995, 1996).

1.4.2.1 Peptídeo Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu (SS1)

A estrutura tridimensional das proteínas pode sofrer modificações na presença de diversos agentes desnaturantes ou solventes orgânicos e as proteínas ao servirem de substrato, podem adquirir uma nova conformação, diferente da nativa, expondo novas ligações peptídicas susceptíveis à clivagem enzimática. Isto origina interpretações erróneas, já que se pode concluir que a proteinase na presença de agentes desnaturantes ou solventes orgânicos apresenta maior actividade do que na ausência daqueles. Quando se pretende estudar a actividade de determinada enzima na presença dos agentes referidos, o substrato deverá ser uma molécula relativamente pequena e idealmente sem estrutura terciária ou secundária para que as modificações detectadas possam ser reportadas única e exclusivamente à enzima em estudo. Por outro lado deve ser suficientemente longo para ocupar cada um dos sub-locais da fenda catalítica e permitir o ajuste da ligação a clivar P₁-P'₁, aos sub-locais S₁-S'₁ (Dunn *et al.*; 1986).

Nos primeiros estudos de especificidade da pepsina foram preparados substratos sintéticos com dois ou três peptídeos para efectuar os estudos cinéticos (Sachdev e Fruton, 1969). No entanto, estudos estruturais da maior parte das endopeptidases revelaram que a fenda do local activo é relativamente alongada e capaz de interagir e alojar substratos com múltiplos resíduos. Quando se aumenta um substrato de dois para cinco resíduos (P₃ a P'₂), o valor de k_{cat} aumenta algumas centenas de vezes, para a mesma enzima (Hofmann *et al.*, 1988). Assim, o substrato que apresenta o número ideal de resíduos para um dado local activo, alcança a melhor combinação de ligação e catálise, permitindo os mais elevados valores para a constante de eficiência catalítica (Dunn, 2000).

Face à especificidade da cardosina A e aos resultados de actividade dos trabalhos de Veríssimo *et al.* (1995, 1996) e Barros e Malcata (2002), decidiu-se utilizar o peptídeo sintético SS1 como substrato no presente estudo. Este substrato, com oito resíduos (P₅-P'₃), vai ocupar os sub-locais S₅-S'₃ do local activo da cardosina A. Os resíduos localizados em P₁, P'₂ e P'₃ são iguais aos do fragmento de k-caseína (Leu₁₀₃-Ser₁₀₄-Phe₁₀₅-Met₁₀₆-Ala₁₀₇-Leu₁₀₈) estudado por Frazão *et al.* (1999) e os resíduos P'₁, P₂ e P₃ são da mesma natureza química dos da proteína. A semelhança entre os dois substratos e o facto da cardosina A só clivar a ligação Met₁₀₅-Phe₁₀₆ da k-caseína indica que o único local de clivagem no substrato SS1 será a ligação Phe-Phe. Os trabalhos de Dunn *et al.* (1986) e Fusek *et al.* (1990) confirmam este facto: os produtos da hidrólise do peptídeo Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Arg-Leu por várias proteinases aspárticas são invariavelmente o pentapeptídeo Lys-Pro-Ala-Glu-Phe e o tripeptídeo Phe(NO₂)-Arg-Leu (Dunn *et al.*, 1986), enquanto os produtos de hidrólise da termopsina, uma proteinase aspártica, sobre o substrato SS1 são o pentapeptídeo Lys-Pro-Ala-Glu-Phe e o tripeptídeo Phe(NO₂)-Ala-Leu, não existindo locais adicionais de hidrólise (Fusek *et al.*, 1990).

O tripeptídeo Phe(NO₂)-Ala-Leu resultante da degradação do SS1 pela cardosina A é detectado espectrofotometricamente a 300 nm como uma diminuição da densidade óptica da solução, permitindo determinar a velocidade da reacção através do produto formado (fig. 1.9). O valor da variação do coeficiente de extinção molar usado para o SS1 é 1480 M⁻¹cm⁻¹ (Veríssimo *et al.*, 1996).

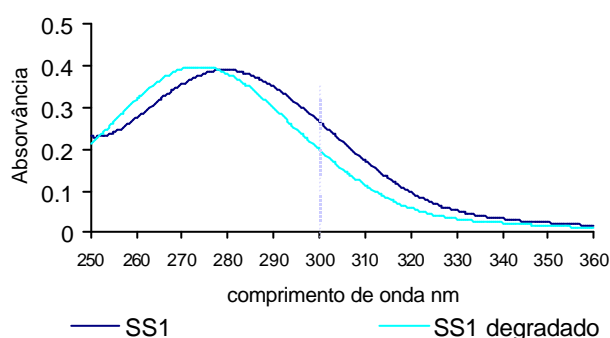


Figura 1.9 Espectro de absorção do substrato Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu (SS1).

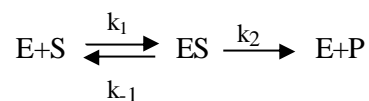
Espectro de absorção de SS1, antes — e após — ser degradado pela cardosina A. As soluções usadas para traçar os espectros foram respectivamente 20 % de substrato (3 mg/mL) em 1 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM, 0,2 M NaCl, 4% (DMSO), pH 4,5 e 20 % de cardosina A (0,236 mg/mL), 20 % de substrato em 1 mL de solução tampão após reacção a 37 °C, durante 10 minutos (10 minutos é o tempo ao fim do qual o substrato está totalmente degradado nas condições descritas, como se pode ver na figura 3.4 da secção 3.2.1.1). A linha tracejada vertical mostra o deslocamento dos valores de absorvância a 300 nm do substrato antes e após degradação pela enzima.

1.5 ESTUDOS CINÉTICOS

1.5.1 Cinética enzimática – considerações gerais

A caracterização cinética de uma enzima baseia-se na velocidade da reacção, afinidade para o substrato e eficiência catalítica da enzima em determinado meio, temperatura e pH.

Em 1913, L. Michaelis e M. L. Menten, na continuação do trabalho de Victor Henri, propuseram o seguinte mecanismo para a catálise enzimática.



Para que a reacção catalítica ocorra, enzima (E) e substrato (S) devem formar o complexo enzima-substrato (ES), também denominado complexo Henri-Michaelis-Menten. Este passo da reacção é rápido e reversível, não ocorrendo qualquer tipo de alteração química nas moléculas; enzima e substrato estão ligados por interacções não covalentes. A constante de dissociação deste complexo é $K_s = k_{-1}/k_1$

Após a formação do complexo ES, várias reacções intermédias poderão ocorrer até à libertação do produto (P) e da enzima para nova catálise. A constante de velocidade k_2 ou k_{cat} representa a velocidade global desta(s) reacção(ões).

Após a adição da enzima a um excesso de substrato, há um período inicial, bastante curto, conhecido por estado pré-estacionário, durante o qual a concentração do complexo ES aumenta. À medida que a concentração de ES aumenta começa também a libertar-se enzima livre e produto, até que se atinge um ponto em que a velocidade de formação do complexo ES (k_1/k_{-1}) é igual à velocidade de formação de produto e enzima livre (k_2). A esta fase da reacção em que a concentração do complexo ES é constante e em que a velocidade da reacção varia muito pouco com o tempo, denomina-se estado estacionário. É durante esta fase que a velocidade das reacções enzimáticas é normalmente medida. Assume-se que a velocidade que se mede é a velocidade inicial de formação de produto de modo que não se verifica significativa acumulação deste. Assume-se também que o consumo de substrato no decorrer da experiência é

negligenciável uma vez que as medições da velocidade inicial são realizadas num curto espaço de tempo e o substrato está em largo excesso (Fersht, 1999).

Experimentalmente verifica-se que a velocidade de reacção é proporcional à concentração de enzima. Quando esta é constante, a velocidade segue uma cinética de saturação no que diz respeito à concentração de substrato. Assim, para concentrações de substrato ($[S]$) baixas, a velocidade inicial (v_0) aumenta de forma linear com $[S]$, seguindo uma cinética de primeira ordem. Para $[S]$ elevadas, a velocidade inicial segue uma cinética de ordem zero, independente de $[S]$ e denomina-se V_{\max} (fig. 1.10). Na região intermédia a velocidade apresenta uma relação curvilínea com $[S]$.

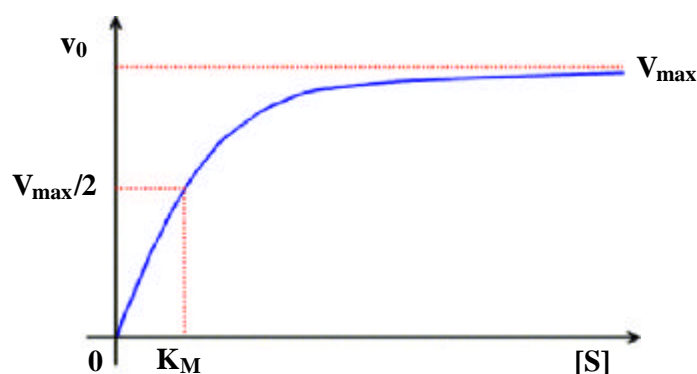


Figura 1.10 Curva de Henri-Michaelis-Menten.

A relação entre v_0 e $[S]$ é matematicamente traduzida pela equação de Henri-Michaelis-Menten

$$v_0 = \frac{[E]_0 [S] k_{cat}}{K_M + [S]}$$

onde v_0 é a velocidade inicial, $[E]_0$ a concentração inicial de enzima, k_{cat} a constante de velocidade de formação de $P+E$, ou seja, k_2 , $[S]$ a concentração de substrato e K_M a constante de Henri-Michaelis-Menten.

Como $V_{\max} = k_{cat} [E]_0$

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

1.5.1.1 Significado de K_M

De acordo com a equação de Henri-Michaelis-Menten, quando K_M iguala a concentração de substrato,

$$v_0 = 1/2 V_{\max}$$

O K_M pode também ser definido como a concentração de substrato para a qual metade dos locais activos está ocupada em condições de estado estacionário.

Embora $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ não seja equivalente a $K_s = k_{-1}/k_1$, na maioria das condições pode ser usado como medida relativa da afinidade da ligação enzima-substrato. Quanto mais baixo o valor de K_M mais forte será a ligação. O valor de K_M varia de enzima para enzima, e para uma mesma enzima, com diferentes substratos e condições do meio (pH, temperatura, etc) (Copeland, 2000).

1.5.1.2 Significado de k_{cat}

O k_{cat} ou constante catalítica é a constante de velocidade de 1ª ordem relativa à conversão de ES em E+P. O k_{cat} representa o número máximo de moles de substrato convertidas em produto por mole de local activo e por unidade de tempo. A unidade internacional de k_{cat} é s^{-1} .

1.5.1.3 Significado de k_{cat}/K_M

O quociente k_{cat}/K_M define a eficiência catalítica de uma determinada enzima. É usado para comparar eficiências de diferentes enzimas ou de uma determinada enzima em diferentes substratos, meios reaccionais ou condições. Este quociente é também a melhor medida da especificidade de uma enzima para determinado substrato. A unidade internacional de k_{cat}/K_M é $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

O conhecimento do valor de K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M permite caracterizar a enzima quanto à sua afinidade para o substrato, rapidez da reacção, e eficiência catalítica, respectivamente.

1.5.2 Métodos para calcular K_M e V_{max}

Vários autores desenvolveram métodos matemáticos com vista à fácil determinação de K_M e V_{max} . Dos quatro métodos discutidos a seguir, três recorrem à transformação da equação de Henri-Michaelis-Menten numa função linear. O objectivo de todos eles é possibilitar a análise gráfica dos dados, calcular facilmente as constantes cinéticas e detectar desvios ao comportamento ideal.

1.5.2.1 Lineweaver-Burk

O método mais comum e popular de linearização dos dados cinéticos é o de Lineweaver-Burk, que consiste na conversão da equação de Henri-Michaelis-Menten no seu inverso:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

A equação anterior define uma recta cujo declive é K_M/V_{max} e ordenada na origem $1/V_{max}$, (fig. 1.11).

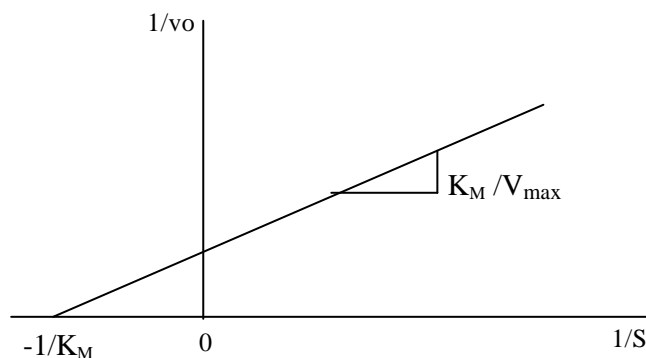


Figura 1.11 Gráfico ilustrativo da linearização de Lineweaver- Burk .

Pequenos erros experimentais nas medições de velocidade inicial (v_0) são amplificados pela transformação dos valores no seu recíproco e esta desvantagem acentua-se nas concentrações baixas de substrato. Neste tipo de gráficos os valores mais baixos de concentração de substrato correspondem aos valores mais elevados do inverso e estes dados são os que mais pesam na análise. Assim, o método comprime os dados correspondentes a concentrações elevadas de substrato numa pequena região do gráfico e enfatiza os dados relativos a concentrações baixas de substrato. Os erros experimentais, mesmo que sejam pequenos, são amplificados resultando em estimativas pobres do valor de K_M e V_{max} . Este método não deve ser usado em publicações (Henderson, 1992).

1.5.2.2 Eadie-Hofstee

Se se multiplicar ambos os membros da equação Henri-Michaelis-Menten por $K_M + [S]$, obtém-se

$$v_0 (K_M + [S]) = V_{max} [S]$$

Ao dividir a equação resultante por $[S]$, obtém-se

$v_0 = V_{max} - K_M \frac{v_0}{[S]}$, cujo declive é $-K_M$ e ordenada na origem V_{max} , (fig. 1.12).

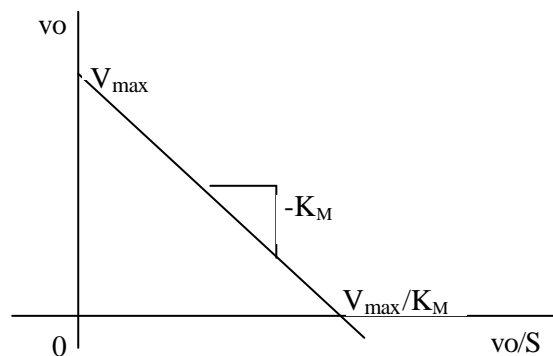


Figura 1.12 Gráfico ilustrativo da linearização de Eadie-Hofstee.

A variável dependente v_0 está nos dois eixos; assim, um erro em v_0 origina um erro em $v_0/[S]$, causando uma distorção angular das barras de erro, que se acentua com o decréscimo da concentração de substrato. Este método não deve ser usado em publicações (Henderson, 1992).

1.5.2.3 Hanes-Woolf

Ao multiplicar ambos os membros da equação de Lineweaver–Burk por $[S]$, obtém-se

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}}$$

que corresponde à equação da recta cujo declive é $1/V_{\max}$ e ordenada na origem K_M/V_{\max} (fig. 1.13).

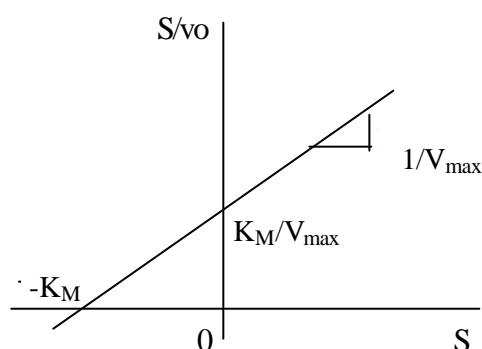


Figura 1.13 Gráfico ilustrativo da linearização de Hanes-Woolf.

Este método é preferido relativamente aos dois anteriores uma vez que nem recorre ao cálculo do recíproco da concentração do substrato, nem a variável dependente (v_0) está nos dois eixos. No entanto, pequenos erros experimentais na medição de v_0 são amplificados pela transformação matemática no seu recíproco. A distorção das barras de erro é menor que nos métodos anteriores, mas Henderson (1992) desaconselha a sua apresentação em publicações.

1.5.2.4 Eisenthal-Cornish-Bowden

O método de Eisenthal e Cornish-Bowden (1974) é considerado o mais credível em termos estatísticos e o que melhores estimativas faz de K_M e V_{max} (Henderson, 1992, Copeland, 2000, Cornish-Bowden e Eisenthal, 1974). Num estudo alargado de comparação de sete métodos de cálculo de K_M e V_{max} , Atkins e Nimmo (1975) concluíram igualmente ser o método de eleição. Contrariamente aos métodos anteriores, não recorre ao cálculo do recíproco, representando v_0 em função do simétrico de $[S]$ (fig. 1.14). O método usa critérios não paramétricos para calcular K_M e V_{max} .

Cada par de dados (v_0 e $-[S]$) é unido por uma recta que é prolongada para além da intersecção no eixo dos y, isto é, para a zona dos parâmetros K_M e V_{max} (1º Quadrante). Resultam vários pontos de intersecção dos pares de dados dos quais se calcula a mediana após projecção em y e x. O valor da mediana em x corresponde a K_M enquanto que o valor da mediana em y corresponde a V_{max} .

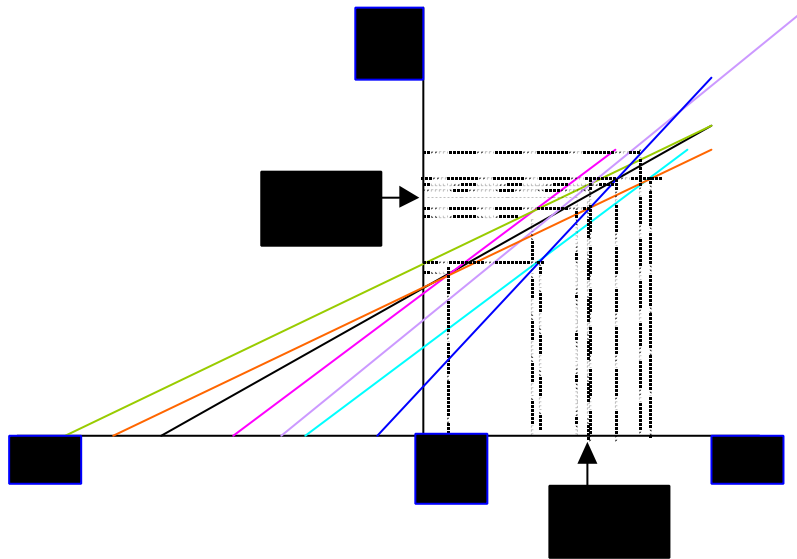


Figura 1.14 Gráfico ilustrativo da linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden.

O método tem as vantagens de ser menos sensível a pontos aberrantes, todos os dados têm o mesmo peso na análise e é um método directo, que não introduz erro matemático pelo recurso ao cálculo do recíproco das variáveis. Como desvantagem apenas se assinala o facto de ser graficamente difícil determinar a mediana, especialmente quando há um grande número de leituras e/ou quando as intersecções estão próximas umas das outras. No entanto, os programas

computacionais ultrapassam facilmente o inconveniente e com a colaboração do Doutor António Barros (Departamento Química, Universidade de Aveiro), que desenvolveu um programa informático do método, foi possível o cálculo de todas as intersecções e os respectivos valores das medianas.

No presente trabalho, os resultados são tratados simultaneamente pelos métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden. A apresentação dos resultados segundo Lineweaver-Burk permite a comparação com outros trabalhos uma vez que continua a ser encontrado em muitas publicações. Excluiu-se a apresentação dos resultados pelo método de Eadie-Hofstee porque para além de não ser um método vulgarmente usado, apresenta um erro associado elevado.

1.5.3 Titulação dos locais activos com pepstatina A

A determinação da concentração de proteína total não distingue entre moléculas de enzima activa e desnaturada. A titulação dos locais activos com um inibidor específico permite determinar a concentração de enzima realmente activa. A manipulação de amostras enzimáticas durante os processos de extracção, purificação e armazenamento pode conduzir a perda parcial de actividade; os solventes usados durante estes processos, a temperatura, a adição de agentes desnaturantes, etc. também podem contribuir para esta perda. Assim as constantes k_{cat} e k_{cat}/K_M apresentarão valores mais rigorosos se forem determinadas usando a concentração de enzima activa, caso contrário virão afectadas de erro por defeito, uma vez que o valor de concentração de enzima total é superior ao valor de enzima activa.

A pepstatina A (fig. 1.15), um pentapeptídeo isolado de culturas de *Streptomyces*, é um inibidor específico, competitivo e reversível das endopeptidases aspárticas, que se liga firmemente às enzimas alvo.

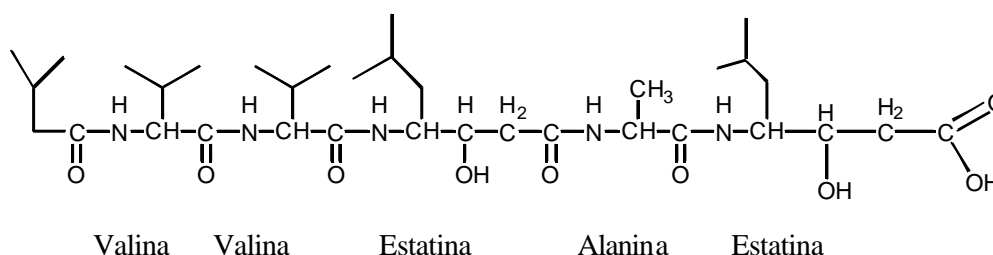


Figura 1.15 Estrutura química da pepstatina A, inibidor das proteinases aspárticas.

Bott *et al.* (1982) e James *et al.* (1982) após a observação das estruturas de fragmentos de pepstatina A ligados aos locais activos de duas enzimas, a rizopuspepsina e a penicilopepsina mostraram que o grupo hidroxilo da estatina $[(CH_3)_2CH-CH_2-CH(NH_2)-CH(OH)-CH_2-COOH]$ situada no interior da molécula se encontra entre os dois oxigénios dos dois resíduos aspárticos 32 e 215, substituindo a água existente na enzima nativa.

Na figura 1.16 está representada uma molécula de cardosina A com uma molécula de inibidor no seu local activo.

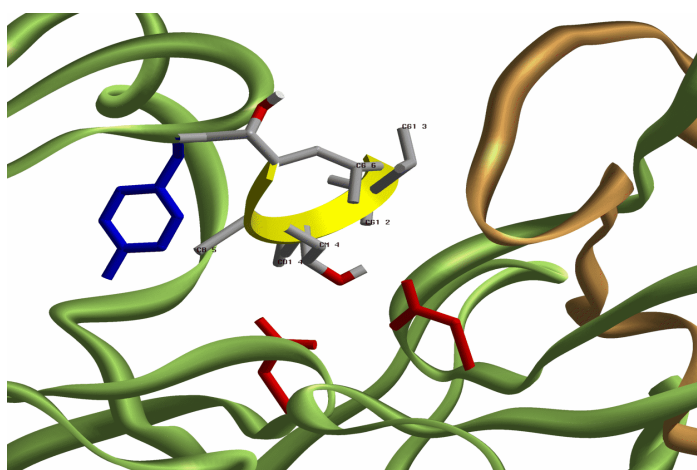
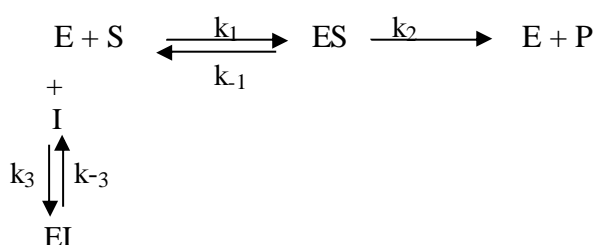


Figura 1.16 Visualização pormenorizada de uma molécula de inibidor no local activo da cardosina A.

Visualização dos dois aspartatos catalíticos (vermelho), da tirosina 75 situada por cima da fenda catalítica (azul escuro) e de uma molécula de pepstatina A, no interior da fenda catalítica. Na figura vê-se o grupo hidroxilo da estatina entre os oxigénios dos dois aspartatos catalíticos Bott *et al.* (1982) e James *et al.*(1982). *Figura amavelmente cedida por Sandra Macedo (Centro de Neurociências, Universidade de Coimbra).*

O mecanismo de inibição deste tipo de inibidores é o seguinte



Os inibidores competitivos ligam-se exclusivamente à enzima livre e não ao complexo ES. Inibidor e substrato competem pela enzima, pelo que esta forma um complexo com o inibidor ou com o substrato, nunca com os dois simultaneamente.

Frequentemente o inibidor actua ligando-se ao centro activo da enzima competindo desta forma com o substrato, é o exemplo do sistema pepstatina A/cardosina A. Neste caso, o inibidor partilha semelhanças estruturais com o substrato; no entanto, este não é o único mecanismo pelo qual o inibidor competitivo pode actuar. Ele pode ligar-se à proteína num local distinto do centro activo e induzir alteração na conformação da enzima, alteração esta que impede o normal acesso do substrato ao centro activo.

1.6 AGENTES DESNATURANTES

A estrutura terciária das enzimas é normalmente globular. A enzima adota a conformação mais estável através de interações não covalentes como ligações iónicas, de *van der Waals*, ligações de hidrogénio e hidrófobas. A estabilidade conformacional pode ser também alcançada através da formação de ligações covalentes de dissulfureto. As enzimas podem ser constituídas por mais do que uma cadeia polipeptídica que se mantêm unidas através de interações não covalentes e em alguns casos através de pontes dissulfureto.

O enrolamento de uma cadeia polipeptídica pode originar um número infinito de conformações. Ao estado enrolado da proteína que ocorre naturalmente e que melhor facilita a sua actividade biológica denomina-se conformação nativa e normalmente corresponde à conformação mais estável. Nesta conformação, a maior parte das enzimas apresentam os resíduos hidrófobos dirigidos para o interior, enquanto os resíduos polares e os carregados estão expostos ao solvente.

Muitas proteínas, especialmente as mais pequenas, após serem desnaturadas podem enrolar espontaneamente, desde que sejam restabelecidas condições fisiológicas favoráveis. Já as proteínas maiores têm tendência para agregar e precipitar, estando o processo de renaturação dificultado ou mesmo impossibilitado.

Termodinamicamente as proteínas no estado desnaturado têm uma liberdade conformacional relativamente elevada apresentando-se como uma estrutura pouco rígida. A probabilidade de movimentos de rotação em torno das ligações simples, aproximação de grupos que no estado nativo estariam afastados, ou vice-versa, está bastante aumentada. À medida que uma proteína desenrola a liberdade conformacional aumenta, aumentando também a entropia, o que tem de ser contrabalançado por uma perda de entalpia, para que em termos de energia livre de Gibbs, o estado desenrolado seja favorecido (Fersht, 1999).

Alguns reagentes e condições podem causar o desenrolamento da cadeia polipeptídica por ruptura das ligações não covalentes que mantêm a estrutura terciária e secundária da enzima, afectando a estabilidade da mesma. Denominam-se agentes desnaturantes e conhecem-se a ureia, a guanidina, o pH, a temperatura e a alta pressão.

1.6.1 Ureia - mecanismo de acção

O mecanismo de acção da ureia $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$ como agente desnaturante ainda não é completamente conhecido (Tobi *et al.*, 2003). Tal como a água, a ureia tem a capacidade de formar ligações de hidrogénio. A ureia pode romper sequencialmente as interacções entre os resíduos à superfície da proteína e a água, as ligações de hidrogénio no interior da proteína e estabelecer ela própria ligações de hidrogénio com a proteína ou enzima. Nesta perspectiva a desnaturação tem um mecanismo de acção de fora para dentro, a ureia liga-se em primeiro lugar aos resíduos da cadeia principal directamente expostos ao solvente (Robinson e Jencks, 1965; Makhadatze e Privalov, 1992). Na presença de ureia, a solubilidade das cadeias laterais hidrófobas aumenta e o estado desenrolado da proteína deverá ser termodinamicamente mais estável. Por outro lado, a variação da concentração de ureia pode criar diferentes intermediários termodinamicamente estáveis, cuja caracterização é importante para delinear o mecanismo de (des)enrolamento das enzimas.

Wallqvist *et al.* (1998) estudaram o efeito da ureia 6,0 M na interacção entre solutos, utilizando sistemas modulares bastante simples. Baseados nestas simulações observaram que:

- a) A ureia é solúvel em água, portanto não favorece a separação de fases nem reduz o efeito hidrófobo. Compete com a água para os locais de ligação ocupados por esta o que explica a elevada concentração de ureia (normalmente superior a 4,0 M) necessária para desnaturar completamente as proteínas.
- b) A medição de um parâmetro denominado “*Potencial mean force*” (*PMF*) sugere que a ureia aumenta as interacções hidrófobas, o que está de acordo com o aumento de solubilidade das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos em soluções aquosas de ureia (Nozaki & Tanford, 1963; Robinson & Jencks, 1965; Makhadatze & Privalov, 1992).
- c) Baseado em estudos computacionais das interacções de partículas carregadas em soluções aquosas de ureia, o modelo de desnaturação proposto baseia-se na ruptura do contacto entre a superfície carregada e o solvente.

A análise dos resultados de simulação de Tirado-Rives *et al.* (1997) sugere que o factor chave na desnaturação é a interacção da ureia com os grupos polares. Por outro lado Caflisch e

Karplus (1999) baseados em estudos de interacção entre moléculas de água e moléculas de ureia na primeira camada de hidratação da barnase, concluem que tanto a hidrofobicidade como as interacções polares são essenciais no processo de desnaturação pela ureia. A mais valia destes estudos é o facto de utilizarem moléculas com estruturas secundárias e terciárias.

Mais recentemente Tobi *et al.* (2003) realizaram estudos de simulação com um dipeptídeo de valina bloqueada. Com as devidas ressalvas, estes investigadores não encontraram evidências para mudanças nas interacções hidrófobas e sugerem que, devido à semelhança entre a molécula de

ureia e a cadeia principal dos aminoácidos, possa ocorrer um ajuste mais eficaz das ligações de hidrogénio entre a ureia e a cadeia principal da proteína, do que entre a água e a proteína. Deste modo, o mecanismo de desnaturação será electrostático e portanto são as variações nas forças electrostáticas e as ligações de hidrogénio que mais influenciam o equilíbrio conformacional.

1.7 OBJECTIVOS

A estrutura primária de uma proteína pode ser determinada através da digestão da cadeia polipeptídica com uma enzima proteolítica, seguida da separação dos fragmentos obtidos por cromatografia de fase reversa e sequenciação dos mesmos. Uma das enzimas proteolíticas mais utilizadas é a tripsina. Esta enzima cliva as ligações peptídicas em C-terminal dos resíduos arginina e lisina, aminoácidos carregados positivamente. No caso de proteínas muito hidrófobas, estes aminoácidos estão presentes em pequeno número e a digestão da proteína pela tripsina está dificultada.

A cardosina A é uma proteinase aspártica presente nos pistilos de *Cynara cardunculus L.*, uma planta da família das Asteraceae e é utilizada em Portugal, como agente coagulante do leite na manufactura tradicional dos queijos da Serra, Serpa e Azeitão. A cardosina A, cliva essencialmente ligações peptídicas entre aminoácidos com cadeias laterais hidrófobas e polares sem carga eléctrica, apresentando uma especificidade muito distinta da apresentada pela tripsina. Considerando a diferença de especificidade, a cardosina A pode apresentar-se como uma boa alternativa à tripsina no caso de proteínas cuja constituição seja essencialmente aminoácidos apolares ou hidrófobos. No entanto, uma das características destas proteínas é o facto de apresentarem alguns problemas de solubilidade em meio aquoso, sendo necessário adicionar um solvente que as torne mais solúveis. A ureia é um bom agente solubilizante, podendo no entanto induzir alterações conformacionais com aumento ou perda parcial/total da actividade enzimática, dependendo da concentração de ureia usada. Assim, ao adicionar uma enzima à proteína solubilizada em ureia, a eficácia da digestão pode ser comprometida.

No sentido de clarificar a influência da ureia na capacidade catalítica da cardosina A, vão ser efectuadas experiências que permitam determinar parâmetros cinéticos da enzima em presença de diferentes concentrações de ureia, por espectrofotometria de UV. O substrato usado neste estudos será o octapéptido sintético [Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu], que é degradado pela cardosina A por clivagem da ligação Phe-Phe. O tripeptídeo resultante é detectável espectrofotometricamente a 300 nm como uma diminuição da densidade óptica da solução.

Assim, os objectivos deste trabalho são:

- ? determinação da concentração de cardosina A activa antes e após adição de diferentes concentrações de ureia, por titulação dos locais activos da enzima com pepstatina A, inibidor específico das proteinases aspárticas.
- ? determinação dos valores de K_M e V_{max} da cardosina A na ausência e em presença de ureia.
- ? determinação de k_{cat} e k_{cat}/K_M da cardosina A na ausência e em presença de ureia.
- ? relacionar, da forma mais sustentada possível, o efeito da ureia nas constantes catalíticas com alterações conformacionais na molécula de cardosina A, nomeadamente no local activo e estruturas adjacentes que possam estar envolvidas na catálise.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXTRACÇÃO

A cardosina A foi obtida a partir dos pistilos de uma planta selvagem conhecida por cardo- *Cynara cardunculus* L. Após a colheita e identificação, efectuada pela Dra. Rosa Pinho do Herbanário do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, os pistilos foram de imediato congelados a -20°C .

Dois grama de pistilos congelados foram macerados num almofariz na presença de 12 mL de tampão citrato de sódio (*Fluka*) 100 mM, pH 3,5 e de seguida centrifugados a 14000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente decantado e filtrado por membrana 0,2 μm .

2.2 PURIFICAÇÃO

Os métodos de purificação da cardosina A são os descritos por Sarmiento (2002).

No primeiro passo da purificação o extracto é aplicado numa coluna de exclusão molecular *HiLoad Superdex® 75 26/60 prep grade*. De seguida a fracção de interesse é aplicada numa coluna de troca aniónica, a *HiLoad Q Sepharose Phast Flow 16/10*.

2.2.1 Métodos cromatográficos

As cromatografias necessárias à purificação da cardosina A foram realizadas a média pressão usando para o efeito o sistema da ÄKTA FPLC (*Amersham Pharmacia Biotech*) que inclui uma bomba P-920, e um detector UPC-900. O detector mede a absorvência a um comprimento de onda fixo (280 ou 254 nm) assim como a condutividade da amostra que elui da coluna. O programa UNICORN (*Amersham Pharmacia Biotech*) controla todo o sistema.

Todas as soluções usadas em FPLC foram previamente filtradas por membrana 0,2 μm e desgasificadas com corrente de Hélio. As medições de absorvência foram realizadas em contínuo e a 280 nm. As cromatografias foram realizadas à temperatura ambiente.

2.2.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica separativa que explora as diferenças de tamanho ou massa molecular da amostra a separar. A fase estacionária é constituída por uma matriz de porosidade definida no seio do solvente, que funciona como fase móvel. O gel usado na fase estacionária actua como crivo molecular e as proteínas eluem da coluna por ordem decrescente do seu tamanho ou massa molecular.

A coluna usada na cromatografia de exclusão molecular foi a *HiLoad Superdex® 75 26/60 prep grade* da *Amersham Pharmacia Biotech*. A escolha desta coluna justifica-se por várias razões: fracciona proteínas entre 3000 e 70000 Da, comporta um volume de amostra relativamente elevado- até 13 mL- e as suas partículas constituintes são extremamente pequenas o que permite o uso de caudais relativamente elevados, compatíveis com FPLC.

A coluna foi equilibrada com 25 mM Tris/HCl (*Riedel-de Haën*) pH 7,6 e a eluição foi feita com a mesma solução tampão. O fluxo aplicado foi de 4,00 mL/min tanto na aplicação da amostra como na eluição (Sarmiento, 2002).

2.2.1.2 Cromatografia de troca iónica

A cromatografia de troca iónica permite a separação das proteínas com base na sua carga. A fase estacionária é constituída por uma matriz derivatizada a qual pode estar carregada positiva ou negativamente. A esta matriz estão ligados, através de interacções electrostáticas, iões de baixo peso molecular de carga contrária à da matriz chamados contra-iões (normalmente Na⁺ ou Cl⁻). As proteínas ligam-se por interacções electrostáticas à matriz, deslocando os contra-iões a ela ligados. As matrizes com carga positiva destinam-se à adsorção de proteínas carregadas negativamente, e são usadas na cromatografia de troca aniónica. A eluição pode ser promovida através da adição de sal, normalmente NaCl em que um dos iões funciona como contra-ião: o aumento da concentração dos contra-iões relativamente à concentração de proteína leva a que esta se dissocie da matriz e seja substituída pelos contra-iões Na⁺ ou Cl⁻, consoante se trate de cromatografia de troca catiónica ou aniónica (Roe, 1989).

A cromatografia de troca aniónica foi realizada numa coluna *HiLoad Q Sepharose® Phast Flow* 16/10 da *Amersham Pharmacia Biotech* em FPLC. A matriz de Sepharose possui uma estabilidade química e física excelentes e a rigidez das suas partículas permite o uso de caudais elevados, compatível com FPLC.

A coluna foi equilibrada com 25 mM Tris/HCl (*Riedel-de Haën*) pH 7,6, 0,2 M NaCl (*Panreac*) e a lavagem foi efectuada com o mesmo tampão. A eluição foi conseguida por aumento da força iónica do eluente usando o gradiente linear de NaCl (0,2 M a 1 M) em 76 minutos. Os fluxos aplicados foram de 3,00 mL por minuto (Sarmiento, 2002). A tabela 2.1 mostra o gradiente usado.

Tabela 2.1 Gradiente usado na eluição das cardosinas A₀, A e B na *HiLoad Q Sepharose® Phast Flow* no sistema AKTA-FPLC da *Amersham Pharmacia Biotech*.

Tempo (min)	NaCl 1 M, Tris 25 mM pH 7,6 (%)
0	20
1	Injecção amostra
19	20
36	29
70	50
76	100
90	100
96	20

A fracção correspondente à cardosina A elui a aproximadamente 0,3 M NaCl com um tempo de retenção de 50 min. Após a recolha da fracção correspondente à cardosina A, foram retirados alguns μ L para quantificação da proteína e electroforese em gel de poliacrilamida. O restante foi dividido em alíquotas de 100 μ L, congelado em azoto líquido e guardado a -80°C para utilização posterior.

2.3 ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Os métodos electroforéticos são largamente utilizados na análise de proteínas para determinar a pureza de uma determinada amostra, peso molecular e/ou carga.

As proteínas em solução, a pH diferente do seu ponto isoeléctrico (pI), possuem grupos carregados e sob a influência de um campo eléctrico externo, migram em direcção ao cátodo ou ao ânodo, de acordo com a sua carga (Dunn, 1989).

Os géis de poliacrilamida são formados pela polimerização de monómeros de acrilamida com N,N'-metil-bisacrilamida, da qual resulta uma matriz tridimensional porosa. A polimerização do gel é iniciada com a adição de persulfato de amónio e catalizada por um captador de radicais livres- N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED).

2.3.1 SDS-PAGE

O detergente aniónico duodecil sulfato de sódio [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$] (SDS) forma com a proteína complexos de carga negativa, mascarando a sua carga intrínseca. A ligação do SDS à proteína permite que o número de cargas do complexo seja proporcional à massa molecular da proteína (Smith, 1994). A interacção do SDS com as proteínas, rompe todas as ligações não covalentes, fazendo com que as proteínas adquiram todas a mesma forma. Assim, a separação electroforética fica dependente somente do raio molecular, o qual se pode considerar proporcional à massa molecular da proteína, e portanto a separação dá-se como resultado do efeito de crivo exercido pela matriz do gel.

Em SDS-PAGE, os géis de 15%, normalmente usados, permitem uma separação de proteínas com massas moleculares compreendidas entre 10 e 100 kDa (Wilson e Walker, 2000).

Foi adoptada uma metodologia do sistema descontínuo SDS-PAGE, descrito por Laemmli (1970), usando-se um sistema descontínuo no que diz respeito à percentagem de acrilamida, à composição iónica e ao pH dos géis de concentração e de separação. O efeito

será a concentração das proteínas numa banda estreita antes da sua separação. A concentração óptima de acrilamida do gel de separação foi escolhida tendo em conta os pesos moleculares das amostras a analisar (15%) (Makowski *et al.*, 1997).

No sistema Mini Protean II da BioRad, prepararam-se géis de acrilamida 15% (*Sigma*) e bis-acrilamida 0,4% (*Sigma*) em Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS (*Riedel-de Haën*) 0,1% (m/v). A polimerização foi iniciada com a adição de TEMED (*Sigma*) 42,5 mM e de persulfato de amónio (*Biorad*) 0,05% (m/v). O gel concentrador também conhecido por “stacking gel” foi preparado de modo a que as concentrações finais fossem as seguintes: acrilamida 4% e bis-acrilamida 0,4% em Tris/ HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amónio 0,05% (m/v) e TEMED 42,5 mM.

As amostras foram diluídas na proporção 1:1 com solução desnaturante constituída por Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (m/v), glicerol (*J.M. Vaz Pereira*) 10% (m/v), azul de bromofenol (*Merk*) 0,01% (m/v) e aquecidas a 100°C durante 5 minutos.

A separação electroforética pelo sistema *BioRad* decorreu a 150 V (fonte *BioRad Power-Pac 300*) em solução Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3 e SDS 0,1%, até à saída do azul de bromofenol.

A mobilidade electroforética das proteínas das amostras em estudo foi comparada com a mobilidade de proteínas de massa molecular conhecida – “Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis” da *Amersham Pharmacia Biotech*. Os padrões presentes são os seguintes: fosforilase b (97000 Da), albumina de soro (66000 Da), ovalbumina (45000 Da), anidrase carbónica (30000 Da), inibidor da tripsina (20100 Da), ? –lactalbumina (14400 Da).

2.3.2 Revelação

A revelação das proteínas separadas em electroforese em sistema Mini Protean II foi efectuada com Azul de Coomassie. Este corante detecta quantidades de proteína de cerca 1 µg por banda.

Coloração com Azul de Coomassie - A coloração dos géis de SDS-PAGE foi feita com Azul de Coomassie R350 (*Amersham Pharmacia Biotec*) 0,1% (m/v) em metanol (*Fluka*) 30% (v/v), ácido acético (*Merk*) 10% (v/v). Os géis foram incubados durante 20 minutos, à temperatura ambiente, e sob agitação. Para a descoloração dos géis, usa-se uma solução com a mesma composição da solução de coloração, à excepção do corante. A descoloração decorre até remoção do “*background*”, substituindo-se a solução descorante por água.

Após revelação dos géis de electroforese, estes foram digitalizados num densitometro *FX-710 (Bio-Rad)*. Os géis foram analisados, usando o programa *Quantity 1 (Bio-Rad)*.

2.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

Os ensaios para determinação das constantes cinéticas foram realizados num espectrofotómetro de UV-VIS Varian® Cary E1; o programa usado para aquisição e tratamento de dados foi o Cary WinUV (kinetics application). Nos ensaios foi usado o octapeptídeo sintético, Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu (*Pepsyn, Ltd*) também conhecido por SS1 (Dunn *et al.*, 1986; Fusek *et al.*, 1990; Payie *et al.*, 2000). As leituras efectuaram-se em contínuo a 300 nm, a 37°C e sob agitação magnética.

2.4.1 Condições experimentais

Na determinação experimental do K_M e V_{max} é necessário estabelecer as condições a que se realizam os ensaios. Uma vez estabelecidas, estas condições são constantes e comuns a todos os ensaios como é o caso do pH, temperatura, homogeneização, substrato e tempo de ensaio. As concentrações de enzima, substrato e inibidor vão estar dependentes da concentração de ureia e poderão sofrer ajustes.

Os ensaios foram realizados a pH 4,5 uma vez que a cardosina A apresenta estabilidade e actividade proteolítica máximas entre pH 4,5 e 5 (Veríssimo *et al.*, 1996, Sarmiento, 2002).

A temperatura escolhida para a determinação das constantes cinéticas foi 37°C, uma vez que permite a comparação com trabalhos já efectuados, quer com a cardosina A (Veríssimo *et al.*, 1996) quer com outras enzimas como a pepsina e a termopsina (Fusek *et al.*, 1990).

Todos os ensaios decorrem sob agitação magnética. É sabido que a ureia aumenta a viscosidade das soluções a que é adicionada, tanto mais quanto maior for a sua concentração. Para garantir uma eficaz homogeneização ao longo de todo o ensaio usou-se um espectrofotómetro com placa de agitação magnética incorporada.

O SS1, substrato escolhido para a realização dos ensaios cinéticos permite a comparação com trabalhos já realizados (Veríssimo *et al.*, 1996 e Fusek *et al.*, 1990). O valor de velocidade inicial em mmol de substrato degradado por minuto foi calculado

usando para valor da variação do coeficiente de extinção molar $1480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Veríssimo *et al.*, 1996; Sarmiento, 2002).

O tempo de duração dos ensaios foi de 3 minutos, tempo este já usado em trabalhos existentes com estes mesmos substrato e enzima (Veríssimo *et al.*, 1996 e Sarmiento, 2002).

Teoricamente, a gama de concentrações de **Substrato** a usar deve ser $0,1 K_M$ a $10 K_M$. No entanto Copeland (2000) refere que a $[S]$ deve proporcionar velocidades 20 a 80% da V_{\max} , isto corresponde a $[S]$ entre $0,25$ e $5 K_M$. Whitaker (1994) refere que a $[S]$ entre $0,3$ e $3,0 K_M$ se obtém bons resultados.

Para que as velocidades medidas sejam realmente velocidades iniciais, e portanto se verifique o estado estacionário, a concentração de enzima deve ser muito inferior à concentração de substrato. A concentração de enzima a usar por ensaio na ausência e na presença de ureia deve ser determinada de modo a que se obtenham velocidades iniciais mensuráveis e reproduzíveis para baixas concentrações de substrato e no tempo de ensaio definido.

2.4.2 Soluções usadas nos ensaios cinéticos

A concentração da solução de substrato Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu (SS1) é $3,0 \text{ mg/mL}$ em água destilada. A solução foi dividida em alíquotas e congelada a -20°C .

A concentração da solução stock de pepstatina A (*Sigma*) é 50 nM em metanol, e a solução foi armazenada a -20°C .

A solução stock de cardosina A foi a eluída na cromatografia de troca aniónica em tampão Tris/HCl 25 mM , $0,3 \text{ M NaCl}$, pH $7,6$. A solução foi dividida em alíquotas e congelada a -80°C . Em cada dia de trabalho foi usada uma nova alíquota de enzima, a qual foi diluída num factor de 25, sendo a concentração da solução de trabalho da cardosina A $9,4 \text{ ?g/mL}$.

A solução tampão usada para a determinação das constantes cinéticas na ausência de ureia é ácido acético/ acetato de sódio (*Riedel-de Haën*) 50 mM , $0,2 \text{ M NaCl}$, 4% dimetilsulfóxido (DMSO) (*Riedel-de Haën*), pH $4,5$ ajustado com HCl.

A solução tampão usada para a determinação das constantes cinéticas na presença de ureia é ácido acético/ acetato de sódio 50 mM, 0,2 M NaCl, 4% DMSO, e 0,4, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ou 3,0 M ureia (*Sigma*), pH 4,5 ajustado com HCl.

2.4.3 Quantificação da cardosina A total- Método do BCA

A concentração de cardosina A foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985) da *Pierce* e usando a fracção V da albumina de soro bovina (BSA) como padrão (*Sigma*).

O método do BCA consiste na redução do ião cúprico (Cu^{2+}) a ião cuproso (Cu^+), em presença de proteínas e em meio alcalino – reacção do biureto. O ião cuproso combina-se com duas moléculas de ácido bicinonínico, dando origem a um complexo solúvel de cor púrpura intensa. Este composto apresenta uma absorvência máxima a 562 nm que varia linearmente com a concentração de proteína numa gama de 20 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Smith *et al.*, 1985).

A cor púrpura que se desenvolve é resultado da estrutura macromolecular das proteínas, do número de ligações peptídicas e da presença de quatro aminoácidos – cisteína, cistina, triptofano e tirosina (Wiechelman *et al.*, 1988). Por norma, a determinação da concentração em proteína é reportada a padrões de proteínas comuns como é o caso da albumina de soro bovina (BSA).

As amostras de cardosina A e a solução padrão de BSA foram diluídas em solução tampão 25 mM Tris/HCl, 0,2 M NaCl pH 7,6 até um volume final de 50 μL , ao qual se adicionou 1 mL de reagente BCA. Após a incubação deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente. A leitura de absorvência das amostras foi efectuada a 562 nm no intervalo de 10 minutos, como recomendado pelo fabricante. Os ensaios realizaram-se em triplicado.

2.4.4 Quantificação da cardosina A activa

A determinação da concentração de enzima activa consiste na titulação da cardosina A com o inibidor pepstatina A. Após a incubação da enzima com o inibidor, é adicionado o substrato e a solução colocada no espectrofotómetro para registo contínuo das absorvências.

Num gráfico ilustrativo da actividade da enzima *vs.* concentração de pepstatina A, verifica-se um decréscimo linear da actividade da enzima com o aumento da concentração de inibidor. À medida que a concentração deste aumenta, a linearidade deixa de se verificar até que se atinge um limite mínimo de actividade, estabelecendo-se o equilíbrio entre enzima e inibidor (Copeland, 2000).

A pepstatina A liga-se à enzima alvo com uma constante de dissociação tal, que nas condições de ensaio a inibição ocorre a concentrações idênticas de enzima e inibidor. A quantidade de inibidor necessário para obter 100% de inibição é igual à quantidade de enzima activa presente na amostra.

A concentração de enzima activa é determinada traçando a recta que define a parte inicial e linear da curva de titulação e extrapolando ao eixo dos x. O valor da abcissa na origem equivale à concentração de inibidor que inactiva toda a enzima, e que por sua vez, corresponde à concentração de enzima activa no ensaio. A figura 2.2 mostra uma curva de titulação típica.

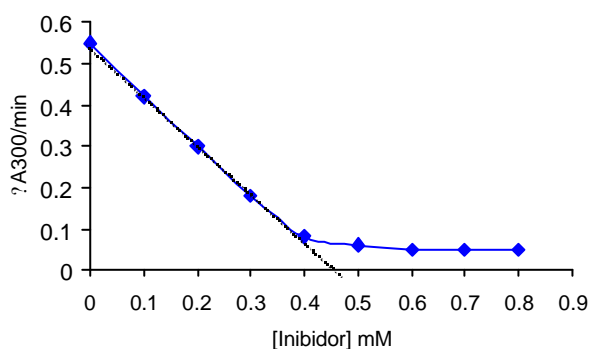


Figura 2.1 Determinação da concentração de enzima activa por titulação com pepstatina A.

A concentração de enzima activa é igual à concentração de inibidor obtida pela extrapolação ao eixo dos x, da zona linear da curva de titulação.

2.4.4.1 Titulação cardosina A

Após incubação de 30 μ L de solução trabalho de enzima (9,4 μ g/mL) com a solução tampão durante 15 minutos a 37°C, adicionou-se pepstatina A e deixou-se incubar mais 5 minutos a 37°C, tempo ao fim do qual se adicionaram 20 μ L do substrato SS1. O volume final de solução foi 1 mL. A solução foi de imediato homogeneizada e iniciado o registo das absorvências vs. tempo, durante 3 minutos. As concentrações de pepstatina A utilizadas foram 0,00, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,8, 5,0 e 7,5 nM.

2.4.4.2 Titulação da cardosina A em Ureia

A enzima (9,4 μ g/mL) foi incubada com 1 mL da solução tampão contendo 0,4, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 M ureia, durante 15 minutos a 37°C. Após a adição de pepstatina A, deixou-se incubar mais 5 minutos à mesma temperatura e adicionou-se o substrato (15 μ L). A solução foi de imediato homogeneizada e iniciado o registo das absorvências vs. tempo durante 3 minutos. Fez-se um ensaio controlo, sem pepstatina A, para todas as concentrações de ureia. A tabela 2.2 resume, para cada concentração de ureia, o volume de enzima e as concentrações finais de inibidor usadas para a determinação da concentração de enzima activa.

Tabela 2.2 Titulação dos locais activos da cardosina A.

Volume inicial de enzima (9,4 μ g/mL) e concentrações finais de pepstatina A, para cada concentração de ureia.

[Ureia] (M)	Vol Enzima (μ L)	[Pepstatina A] (nM)
0,4	30	0,24, 0,47, 0,71, 0,93, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8
1,0	30	0,24, 0,47, 0,7, 0,93, 1,2, 1,4 e 1,8
1,5	50	0,23, 0,46, 0,69, 0,92, 1,2 e 1,4
2,0	100	0,22, 0,44, 0,66, 0,88, 1,1, 1,3, 1,7 e 2,2
2,5	120	0,044, 0,087, 0,13, 0,17, 0,22, 0,26, 0,34 e 0,42
3,0	200	0,020, 0,061, 0,12, 0,16, 0,24, 0,31 e 0,38

2.4.5 Determinação de K_M e V_{max}

2.4.5.1 Cardosina A

Após incubação de 20 μ L de solução de enzima (9,4 μ g/mL) com 1 mL de solução tampão durante 15 minutos a 37°C, foi adicionado o substrato, a solução rapidamente homogeneizada com agitação e de imediato se iniciou o registo contínuo das absorvências durante 3 minutos. As concentrações de substrato foram 0,017, 0,034, 0,051, 0,067, 0,10, 0,13, 0,16, 0,19, 0,25, 0,31 e 0,37 mM.

2.4.5.2 Cardosina A em Ureia

Incubou-se a cardosina A (9,4 μ g/mL) durante 15 minutos a 37°C com 1 mL de solução tampão contendo 0,4, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 M ureia. Após a incubação foi adicionado o substrato, a solução rapidamente homogeneizada com agitação e de imediato se iniciou o registo contínuo das absorvências durante 3 minutos.

A tabela 2.3 resume, para cada concentração de ureia, o volume de enzima e as concentrações finais de substrato usadas para a determinação dos valores de K_M e V_{max} .

Tabela 2.3 Concentração de substrato e volume de enzima usados na determinação de K_M e V_{max} da cardosina A em soluções de ureia.

[Ureia] (M)	Vol Enzima (μ L)	[Substrato] (mM)
0,40	20	0,017, 0,034, 0,051, 0,067, 0,10, 0,13, 0,16, 0,19, 0,25, 0,31, 0,37
1,0	20	0,017, 0,034, 0,051, 0,067, 0,10, 0,13, 0,19, 0,25, 0,31, 0,37
1,5	30	0,017, 0,034, 0,050, 0,066, 0,10, 0,13, 0,19, 0,25, 0,31, 0,36, 0,44
2,0	40	0,017, 0,033, 0,050, 0,066, 0,13, 0,19, 0,25, 0,31, 0,36, 0,44
2,5	40	0,017, 0,033, 0,066, 0,098, 0,13, 0,16, 0,19, 0,25, 0,31, 0,36, 0,44
3,0	70	0,016, 0,032, 0,048, 0,064, 0,095, 0,13, 0,18, 0,24, 0,30, 0,35, 0,43, 0,55

3 RESULTADOS

3.1 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

Os métodos de extracção e purificação foram descritos em 2.1 e 2.2 de Material e Métodos.

3.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

Após a extracção acídica, iniciou-se a purificação da cardosina A. O extracto (9 mL) foi aplicado numa coluna cromatográfica de exclusão molecular HiLoad Superdex® 75 26/60 prep grade da *Amersham Pharmacia Biotech*, tal como descrito em 2.2.1.1. A fig. 3.1 mostra o cromatograma obtido.

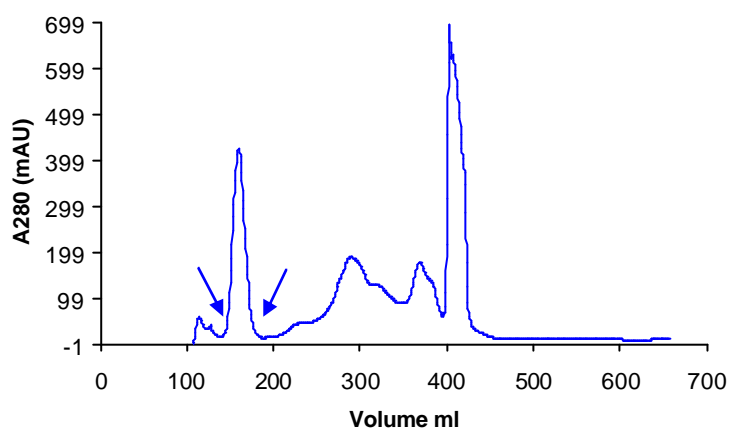


Figura 3.1 Cromatografia de exclusão molecular em HiLoad Superdex® 75 26/60 prep grade.

Perfil cromatográfico (a 280 nm) de 9 mL de extracto acídico de 2 g de pistilos frescos de *Cynara cardunculus* L. O extracto foi aplicado na coluna equilibrada com 25 mM Tris/HCl pH 7,6. A eluição foi feita com o mesmo tampão a 4,00 mL/minuto. As leituras de absorvência fizeram-se em contínuo e a fracção com actividade enzimática, indicada pelas setas, contém as três cardosinas (A₀, A e B).

3.1.2 Cromatografia de troca iónica

Após a cromatografia de exclusão molecular, submeteu-se a fracção recolhida (assinalada pelas setas na fig. 3.1) que contém a mistura de cardosinas a uma cromatografia de troca aniónica, com o objectivo de separar as cardosina A₀, A, e B. A coluna usada foi HiLoad Q Sepharose Phast Flow 16/10 da *Amersham Pharmacia Biotech* em FPLC tal como descrito em 2.2.1.2. A figura 3.2 mostra o cromatograma obtido.

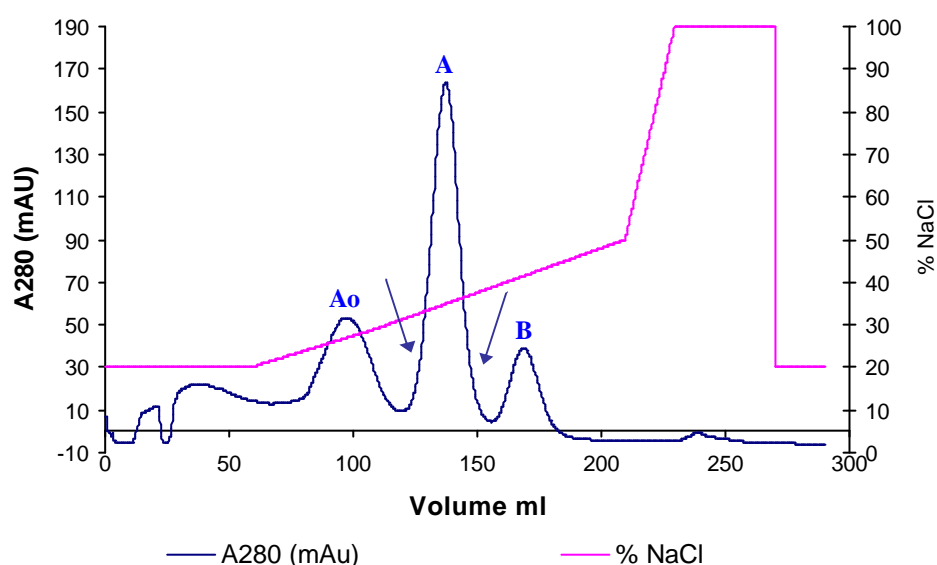


Figura 3.2 Cromatografia de troca aniónica em HiLoad Q Sepharose Phast Flow.

Perfil cromatográfico da fracção recolhida na cromatografia de exclusão molecular (35 mL) e aplicada na coluna de troca aniónica equilibrada com 25 mM Tris/HCl pH 7,6, 0,2 M NaCl. A coluna foi lavada com o mesmo tampão até a absorbência regressar à linha de base e a eluição fez-se com gradiente linear de NaCl (0,2 a 1 M) no mesmo tampão. O fluxo aplicado foi 3,00 mL/minuto.

As letras A, A₀ e B representam respectivamente as fracções correspondentes à cardosina A, A₀ e B e as setas indicam a fracção recolhida correspondente à cardosina A.

3.1.3 SDS-PAGE

A figura 3.3 representa o perfil electroforético obtido com as fracções recolhidas ao longo dos diferentes passos de purificação. Foram aplicadas amostras do extracto inicial, fracção recolhida após a cromatografia de exclusão molecular e as fracções correspondentes aos três picos eluídos da cromatografia de troca aniónica.

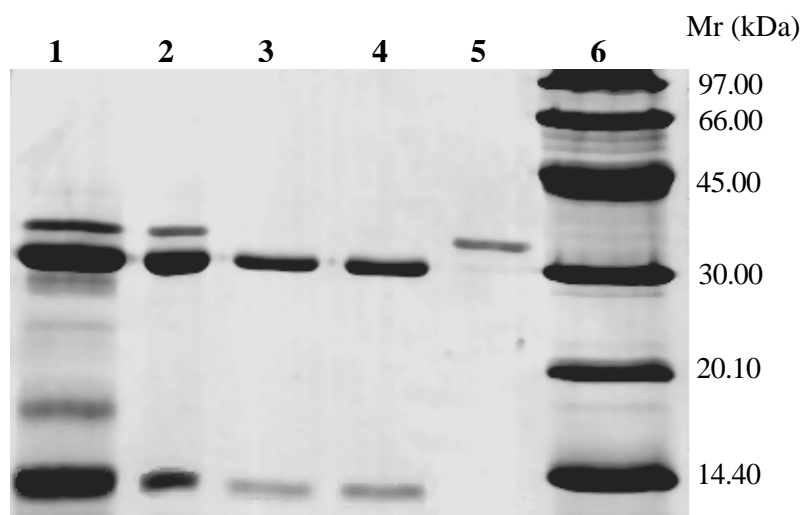


Figura 3.3 Gel de SDS-PAGE (corado com coomassie R 350) das fracções recolhidas durante a purificação das cardosinas.

1- extracto ácido; **2-** eluato da cromatografia de exclusão molecular; **3-** cardosina Ao, **4-** cardosina A, **5** cardosina B; **6-** padrão de pesos moleculares (Low Molecular Weight da *Amersham Pharmacia Biotech*).

3.1.4 Conclusões

A mistura resultante de extracção acídica de 2 g de pistilos frescos foi aplicada numa coluna HiLoad Superdex® 75 26/60 prep grade. Verificou-se que as cardosinas eluem num único pico a um volume de eluição entre 147 e 175 mL. Esta fracção foi aplicada numa coluna de troca aniónica HiLoad Q Sepharose Phast Flow. O perfil de eluição das cardosinas da coluna Q Sepharose mostrou três picos independentes e relativamente bem separados. A análise do perfil em SDS-PAGE revelou que o grau de purificação da cardosina A é elevado.

3.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS

3.2.1 Cardosina A

3.2.1.1 Determinação da concentração inicial de enzima a usar

Realizaram-se testes preliminares relativos à actividade da cardosina A vs. tempo, com o objectivo de determinar a concentração inicial de enzima a usar para determinação de K_M . A figura 3.4 mostra a variação da absorvência em função do tempo para 15 μ L de enzima eluída da cromatografia de troca iónica (0,236 mg/mL) e 20 μ L de substrato 3,0 mg/mL.

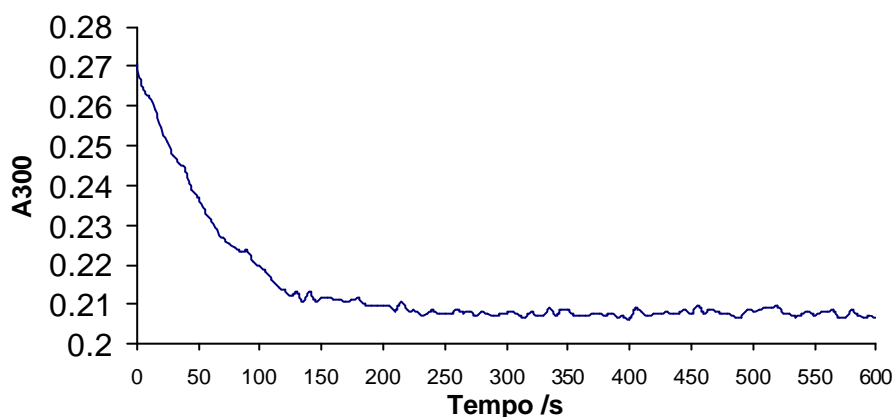


Figura 3.4 Hidrólise do substrato SS1 na presença da cardosina A, a 37°C.

15 μ L de enzima (0,236 mg/mL) foram incubados, com 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, 0,2 M NaCl, 4% DMSO durante 15 min a 37°C tempo ao fim do qual são adicionados 20 μ L de substrato 3,0 mg/mL. O ensaio decorreu durante 10 minutos.

A análise da figura anterior permite verificar que a reacção catalítica foi muito rápida, apenas se mediram velocidades iniciais nos primeiros 60 a 70 segundos e concluiu-se que a concentração de substrato não esteve em excesso relativamente à concentração de enzima durante o tempo de ensaio.

Procedeu-se à diluição da enzima num factor de 25 com solução tampão Tris/HCl 25 mM, 0,2 M NaCl, pH 7,6 e realizou-se novo ensaio de actividade da cardosina A. A figura 3.5 mostra a variação da absorvência em função do tempo para 10 μ L da solução de enzima 9,4 μ g/mL e 20 μ L de substrato.

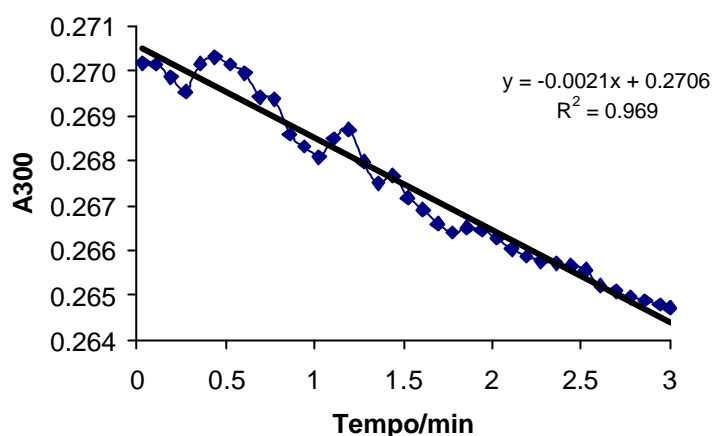


Figura 3.5 Hidrólise do substrato SS1 na presença da cardosina A, a 37°C.

10 μ L de enzima (9,4 μ g/mL) foram incubados, com 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, 0,2 M NaCl, 4% DMSO durante 15 min a 37°C tempo ao fim do qual foram adicionados 20 μ L de substrato. O ensaio decorreu durante 3 minutos. A actividade foi $0,0021 \pm 0,000059$.

Verificou-se que no tempo de ensaio a velocidade da reacção se manteve constante. A concentração da solução de trabalho da cardosina A passou a ser 9,4 μ g/mL e fez-se uma primeira determinação de K_M usando 10 μ L de enzima por ensaio. O gráfico da figura 3.6 mostra a curva de Henri-Michaelis-Menten para a cardosina A nas referidas condições.

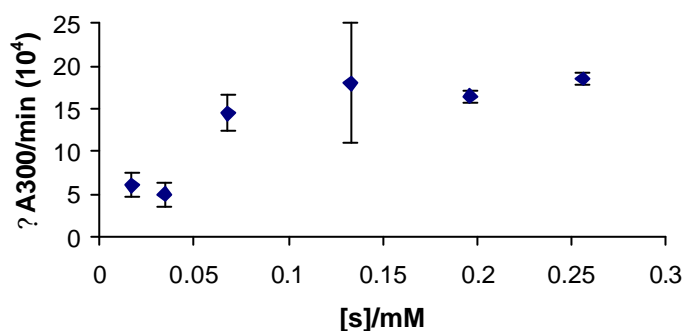


Figura 3.6 Curva de Henri-Michaelis-Menten da cardosina A.

Após incubação de 10 μ L de enzima (9,4 μ g/mL) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, 0,2 M NaCl, 4% DMSO, durante 15 minutos a 37°C, adicionou-se o substrato, homogeneizou-se rapidamente a solução e iniciaram-se as leituras de absorvência durante 3 minutos. As concentrações de substrato foram 0,017, 0,034, 0,068, 0,13, 0,20, 0,26 mM. Após linearização pelo método de Lineweaver-Burk o valor de K_M foi $0,086 \pm 0,025$ mM.

O valor de K_M calculado através do método de linearização de Lineweaver-Burk, $0,086 \pm 0,025$ mM, não difere significativamente do valor determinado por Veríssimo *et al.* (1996), 0,108 mM, no entanto, o erro associado ao cálculo da constante é elevado e aproximadamente de 30%.

Com o objectivo de diminuir o erro associado ao cálculo de K_M , a quantidade inicial de enzima foi aumentada para 20 μ L de solução de trabalho (9,4 μ g/mL) e repetiu-se o ensaio de actividade da cardosina A (fig. 3.7).

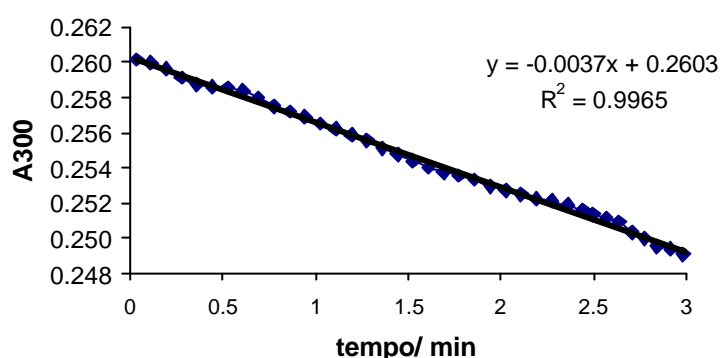


Figura 3.7 Hidrólise do substrato SS1 na presença da cardosina A, a 37°C.

20 μ L de enzima (9,4 μ g/mL) foram incubados, com 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, 0,2 M NaCl, 4% DMSO durante 15 min a 37°C tempo ao fim do qual foram adicionados 20 μ L de substrato. O ensaio decorreu durante 3 minutos. A actividade foi $0,0037 \pm 0,000033$.

Verificou-se que ao duplicar o volume inicial de enzima a actividade aumentou quase na mesma proporção, e manteve-se constante ao longo do tempo de ensaio. Procedeu-se então à determinação do K_M da cardosina A realizando todos os ensaios com 20 μ L de enzima 9,4 μ g/mL.

3.2.1.2 Determinação de K_M e V_{max}

A figura 3.8 mostra a curva de Henri-Michaelis-Menten para a cardosina A.

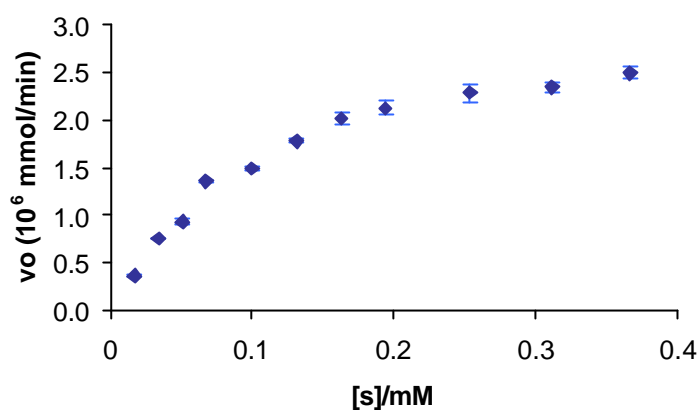


Figura 3.8 Curva de Henri-Michaelis-Menten da cardosina A.

Após incubação de 20 μ L de enzima (9,4? g/mL) em tampão acetato de sódio 50 mM, 0,2 M NaCl, 4% DMSO, pH 4,5 durante 15 minutos a 37°C, adicionou-se o substrato, homogeneizou-se rapidamente a solução e iniciaram-se as leituras de A300 vs. tempo. As concentrações de substrato foram 0,017, 0,034, 0,051, 0,067, 0,10, 0,13, 0,16, 0,19, 0,25, 0,31 e 0,37 mM. O valor de velocidade inicial em mmol de substrato por minuto foi calculado usando para coeficiente de extinção molar o valor 1480 M⁻¹ cm⁻¹.

A determinação de K_M e V_{max} da cardosina A foi efectuada pelos métodos de linearização Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden. Os erros associados ao cálculo de K_M e V_{max} pelos métodos de linearização de Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf usaram o valor tabelado 1.96 do t de Student e uma probabilidade de erro de 5%. Os erros associados ao cálculo das constantes pelo método de Eisenthal-Cornish-Bowden são dados sob a forma de intervalo de variação, uma vez que se trata de erros não paramétricos. Apresentam-se os resultados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Valores de K_M e V_{max} segundo o método de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden.

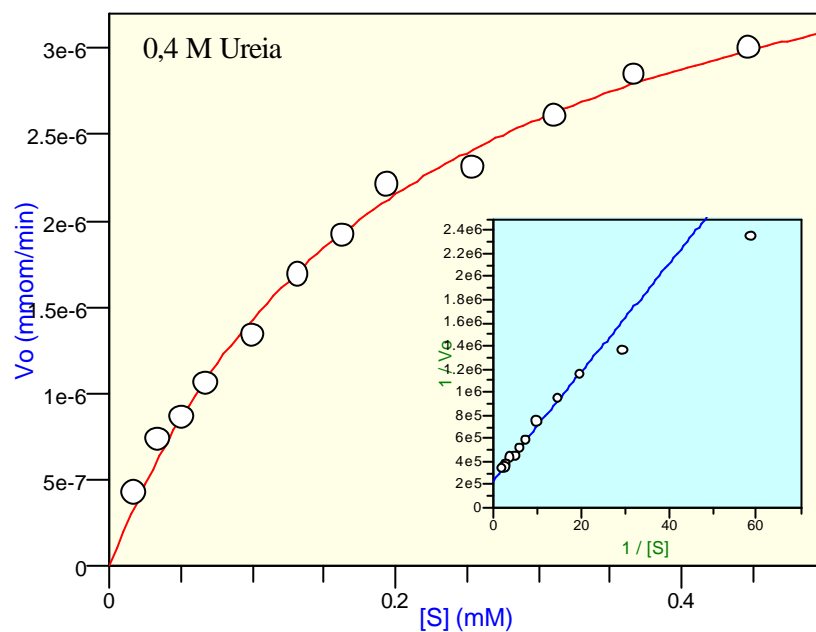
	Lineweaver-Burk	Hanes-Woolf	Eisenthal-Cornish-Bowden
K_M /mM	0,12 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,12 [0,09, 0,15]
V_{max} /10 ⁻⁶ mmolmin ⁻¹	3,2 \pm 0,1	3,3 \pm 0,2	3,3 [3,1, 3,7]

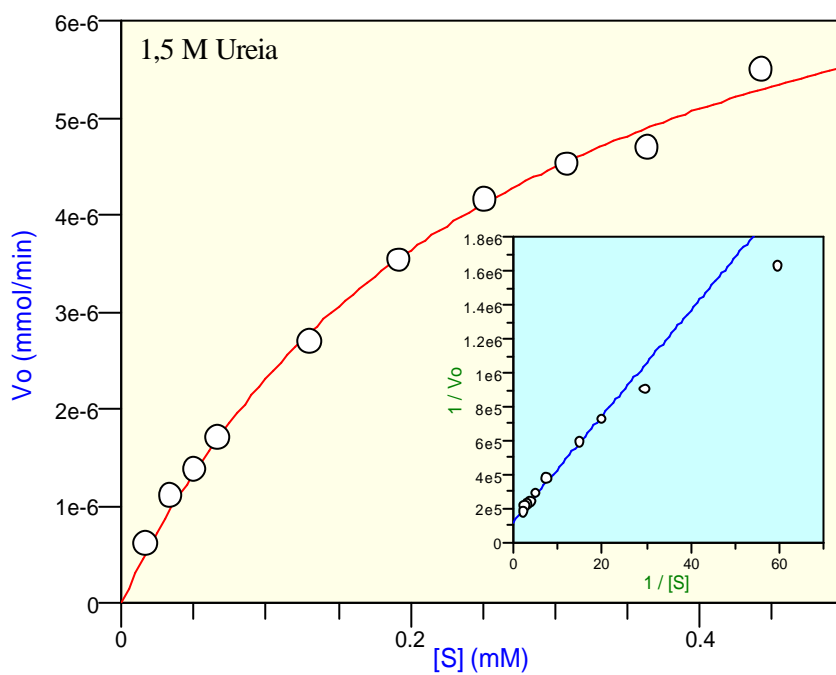
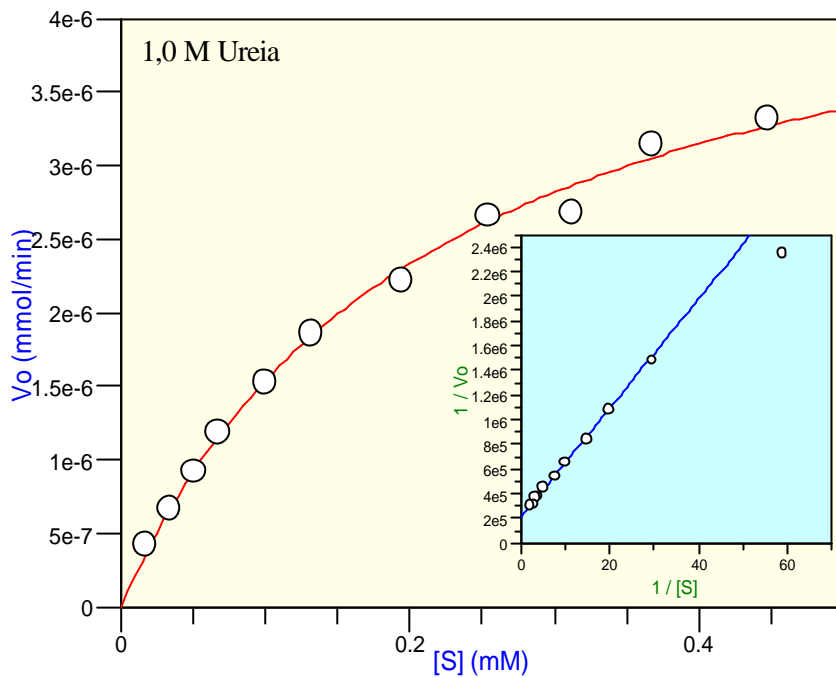
3.2.2 Cardosina A em Ureia

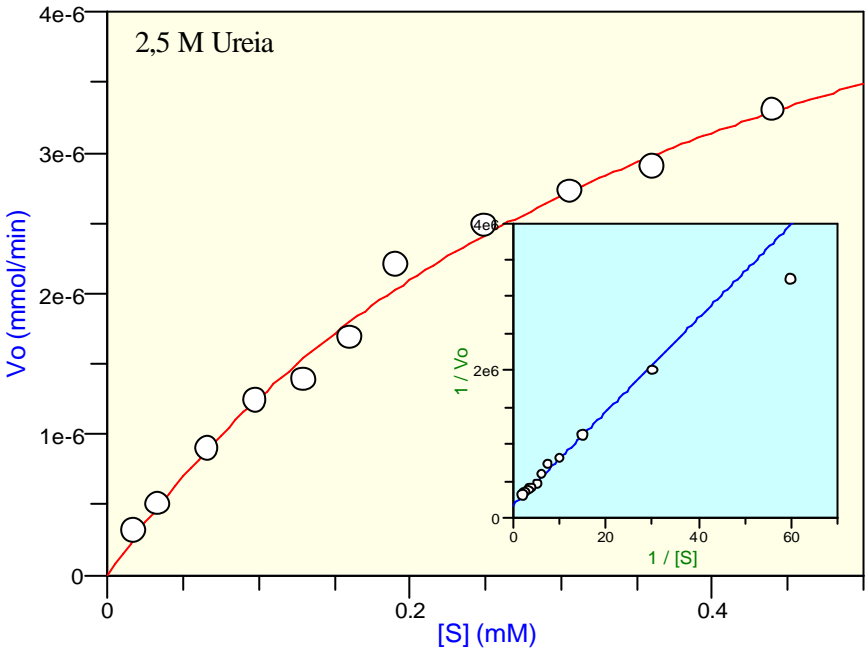
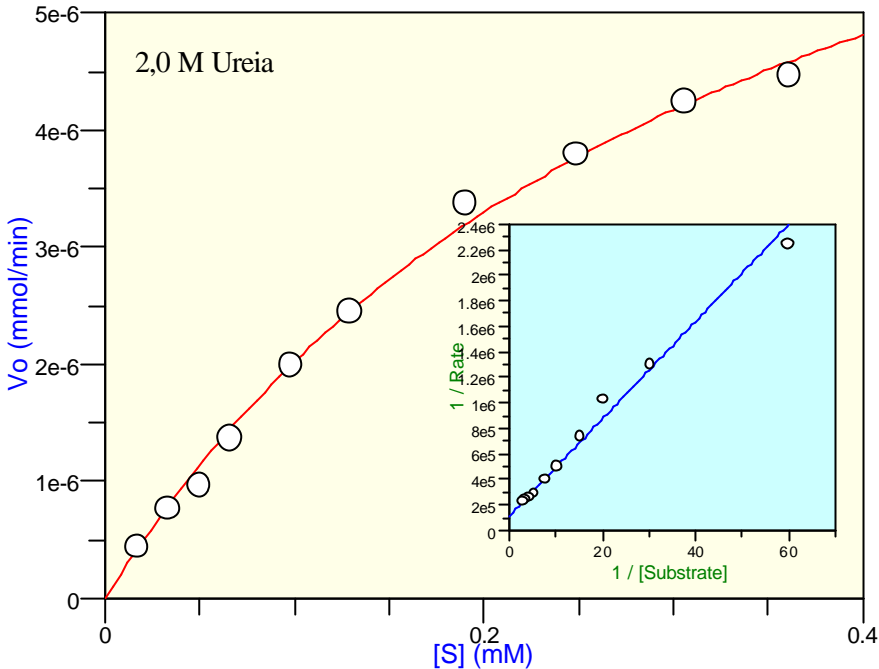
3.2.2.1 Determinação de K_M e V_{max}

Para cada concentração de ureia foi necessário determinar a quantidade inicial de enzima da solução de trabalho (9,24 μ g/mL) a usar nos ensaios, procedendo-se aos testes preliminares descritos na secção 3.2.1.1. A tabela 2.2 da secção 2.4.4.2 de Material e Métodos apresenta o volume inicial de solução enzima para cada concentração de ureia, assim como a concentração de substrato.

A figura 3.9 apresenta as curvas de Henri-Michaelis-Menten relativas às várias concentrações de ureia, assim como as rectas resultantes da linearização de Lineweaver-Burk. O programa GraFit 4® permitiu o tratamento dos dados e o cálculo de K_M e V_{max} segundo o método anterior.







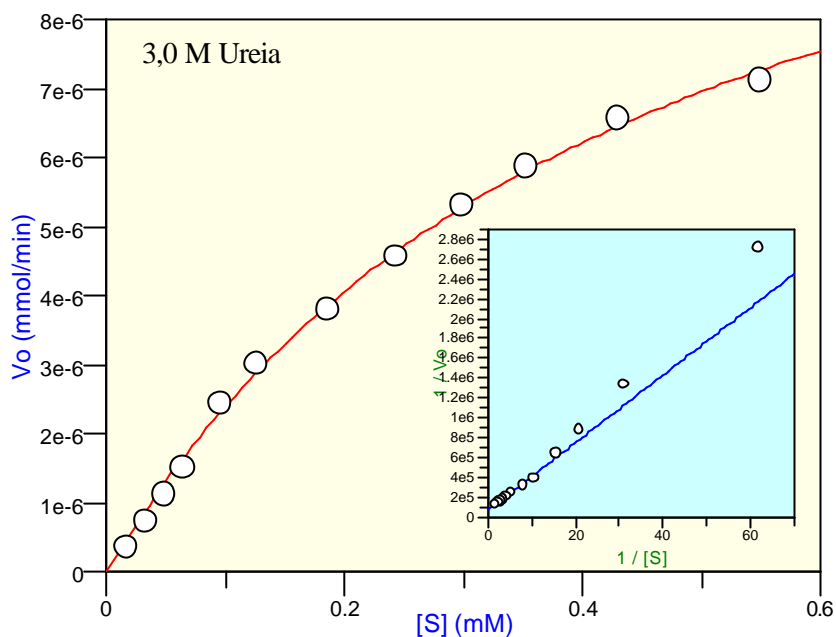


Figura 3.9 Curvas de Henri-Michaelis-Menten da cardosina A na presença de ureia.

A determinação de K_M foi realizada com solução tampão acetato de sódio 50 mM, 0,2 M NaCl, 4% DMSO, contendo 0,4, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 M de ureia. O pH final de todas as soluções foi ajustado a 4,5. Para cada concentração de ureia, a enzima foi incubada durante 15 minutos a 37°C com 1 mL de solução tampão. Após incubação procedeu-se de imediato à adição do substrato, homogeneização e registo contínuo das absorvências durante 3 minutos. O valor de velocidade inicial em mmol de substrato por minuto é calculado usando para coeficiente de extinção molar o valor $1480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

São apresentados nas tabelas 3.2 e 3.3 os valores de K_M e V_{\max} , respectivamente, da cardosina A na presença de diferentes concentrações de ureia. Os valores são calculados segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden. O cálculo do erro associado à linearização de Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf foi efectuado com o valor tabelado 1.96 do t de Student com uma probabilidade de erro de 5%. Os erros referentes à linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden são dados sob a forma de intervalo de variação.

Tabela 3.2 Valores de K_M segundo o método de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden para a cardosina A na presença de diferentes concentrações de ureia.

[Ureia] / M	Lineweaver-Burk K_M /mM	Hanes-Woolf K_M /mM	Eisenthal-Cornish K_M /mM
0,0	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 [0,09, 0,15]
0,4	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,19 [0,13, 0,23]
1,0	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 [0,16, 0,23]
1,5	0,27 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,21 [0,17, 0,27]
2,0	0,34 ± 0,04	0,36 ± 0,05	0,34 [0,25, 0,46]
2,5	0,40 ± 0,05	0,36 ± 0,05	0,32 [0,21, 0,48]
3,0	0,45 ± 0,03	0,58 ± 0,10	0,47 [0,26, 0,69]

Tabela 3.3 Valores de V_{max} segundo o método de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden para a cardosina A na presença de diferentes concentrações de ureia.

[Ureia] / M	Lineweaver-Burk $V_{max} / 10^{-6} \text{mmolmin}^{-1}$	Hanes-Woolf $V_{max} / 10^{-6} \text{mmolmin}^{-1}$	Eisenthal-Cornish $V_{max} / 10^{-6} \text{mmolmin}^{-1}$
0,0	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,3 [3,1, 3,7]
0,4	4,4 ± 0,2	4,2 ± 0,4	4,2 [3,5, 4,6]
1,0	4,8 ± 0,2	4,7 ± 0,4	4,6 [4,1, 5,0]
1,5	8,5 ± 0,4	7,9 ± 0,8	7,6 [6,6, 8,8]
2,0	8,9 ± 0,6	9,2 ± 1,4	8,9 [7,2, 10,8]
2,5	6,3 ± 0,5	5,9 ± 0,9	5,6 [4,4, 6,9]
3,0	13 ± 0,6	15 ± 2,6	13 [10,2, 16,9]

3.2.3 Quantificação da cardosina A

3.2.3.1 Método do BCA

A concentração da cardosina A foi determinada pelo método do BCA da *Pierce*®, cujo fundamento foi descrito em 2.4.3. Na figura 3.10 é apresentada a curva de calibração utilizando como padrão a albumina de soro bovino.

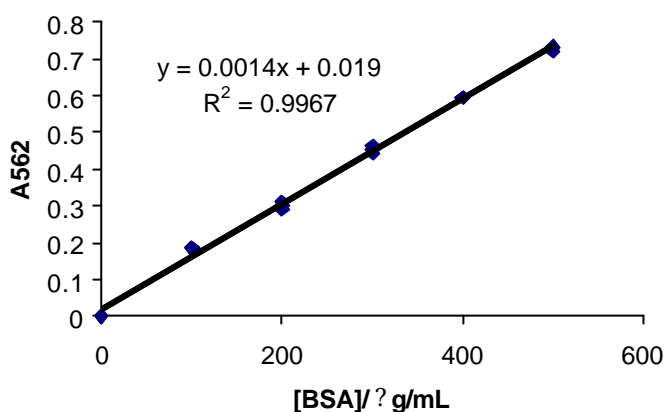


Figura 3.10 Curva de calibração segundo o método do BCA utilizando como padrão a albumina de soro bovino.

As amostras de cardosina A e a solução padrão de BSA foram diluídas em solução tampão 25 mM Tris/HCl, 0,2 M NaCl pH 7,6 até um volume final de 50 μ L, ao qual se adicionou 1 mL de reagente BCA. Após a incubação deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente. A leitura de absorvência das amostras foi efectuada a 562 nm no intervalo de 10 minutos, como recomendado pelo fabricante. Os ensaios realizaram-se em triplicado. As soluções padrão contêm 0,0, 100,0, 200,0, 300,0, 400,0 e 500,0 μ g/mL de BSA.

O valor de cardosina A determinado foi 0,236 mg/mL ou $6,2 \times 10^{-6}$ M.

3.2.3.2 Titulação com pepstatina A

O tratamento com ureia conduz a perda de enzima activa, pelo que, para que seja lícito comparar os parâmetros cinéticos entre enzima tratada e não tratada com agente desnaturante e estes traduzam o mais possível o efeito da ureia no comportamento da cardosina A, é conveniente determinar com rigor a concentração de enzima activa.

3.2.3.2.1 Titulação na ausência de Ureia

30 μ L da solução de trabalho de cardosina (9,4 μ g/mL) A foram titulados com pepstatina A, tal como descrito em 2.4.4.1. Os resultados de actividade (μ A300/min) da cardosina A em função da concentração de pepstatina A mostram-se na tabela 3.4.

Tabela 3.4 Valores de actividade (μ A300/min) da cardosina A vs. concentração de pepstatina A.

Após incubação de 30 μ L de enzima 9,4 μ g/mL com 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, 0,2 M NaCl, 4% DMSO durante 15 minutos a 37°C, adicionou-se pepstatina A 5 μ M e deixou-se incubar 5 minutos a 37°C, tempo ao fim do qual se adicionaram 20 μ L de substrato SS1. A solução foi de imediato homogeneizada e iniciadas as leituras de absorvência vs. tempo, durante 3 minutos, observando-se as condições de temperatura e agitação.

[pepst. A]/ nM	μ A300/min ⁻¹
0	0,0055
12	0,0002
24	0,0008
48	0,0002
72	0,0000
96	0,0000

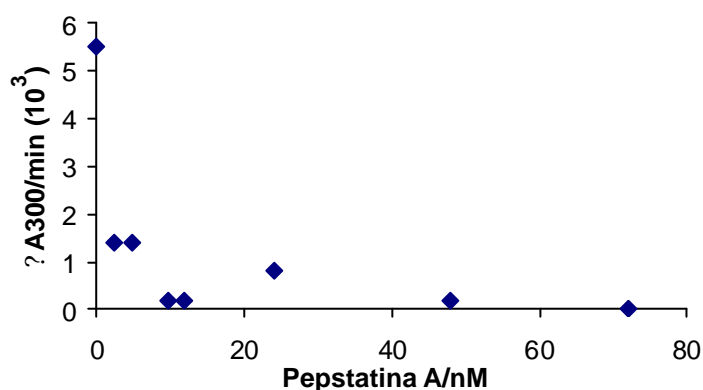
Verificou-se que a concentração de pepstatina A nos ensaios foi demasiado elevada conduzindo rapidamente à total inibição da enzima, não permitindo calcular o número de locais activos de cardosina A. Das duas alternativas possíveis para ultrapassar o problema, aumentar a concentração inicial de enzima ou diminuir a concentração de inibidor, optou-se por esta última. Testaram-se então concentrações mais baixas de pepstatina A, usando a mesma concentração inicial de cardosina A (tabela 3.5).

Tabela 3.5 Valores de actividade ($\Delta A_{300}/\text{min}$) da cardosina A vs. concentração de pepstatina A.

Após incubação de 30 μL de enzima (9,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, 0,2 M NaCl, 4% DMSO durante 15 minutos a 37°C, adicionou-se pepstatina A 5 μM e deixou-se incubar 5 minutos a 37°C, tempo ao fim do qual se adicionaram 20 μL de substrato. A solução foi de imediato homogeneizada e iniciadas as leituras de absorvência vs. tempo.

[pepst. A]/ nM	$\Delta A_{300}/\text{min}^{-1}$
0	0,0055
2,4	0,0014
4,8	0,0014
9,6	0,0002
12	0,0002
24	0,0008
48	0,0002

Os dados da tabela anterior são apresentados no gráfico da figura 3.11.

**Figura 3.11** Actividade da cardosina A em função da concentração de pepstatina A.

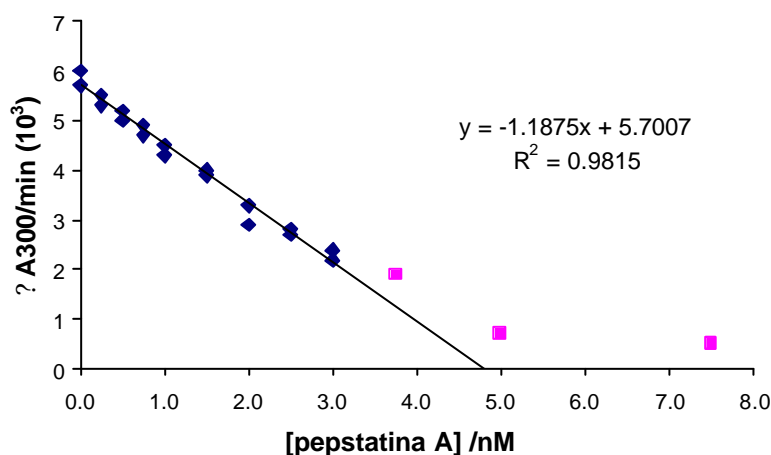
Verificou-se que a concentração de pepstatina A continuou elevada e procedeu-se a nova diluição. A concentração da solução stock de pepstatina A passou a ser 50 nM e as concentrações finais nos ensaios variaram de 0 a 7,5 nM. Os resultados de actividade da cardosina A vs. concentração de pepstatina A estão na tabela 3.6.

Tabela 3.6 Titulação da cardosina A com pepstatina A.

Após incubação de 30 μ L de enzima (9,4 μ g/mL) com a solução tampão acetato de sódio 50 mM, 0,2 M NaCl, 4% DMSO, pH 4,5 durante 15 minutos a 37°C, adicionou-se pepstatina A e deixou-se incubar mais 5 minutos a 37°C, tempo ao fim do qual se adicionaram 20 μ L de substrato. O volume final de solução é 1 mL. A solução foi de imediato homogeneizada e iniciado o registo das absorvências vs. tempo, durante 3 minutos. O cálculo do erro foi efectuado com o valor tabelado 1.96 do t de Student e uma probabilidade de erro de 5 %.

[pepst. A]/nM	μ A300/min	
	1º ensaio	2º ensaio
0,00	0,0057 \pm 0,0002	0,0060 \pm 0,0002
0,25	0,0055 \pm 0,0002	0,0053 \pm 0,0002
0,50	0,0050 \pm 0,0002	0,0052 \pm 0,0002
0,75	0,0047 \pm 0,0003	0,0049 \pm 0,0002
1,00	0,0045 \pm 0,0002	0,0043 \pm 0,0001
1,50	0,0039 \pm 0,0002	0,0040 \pm 0,0002
2,00	0,0033 \pm 0,0003	0,0029 \pm 0,0001
2,50	0,0027 \pm 0,0004	0,0028 \pm 0,0002
3,00	0,0022 \pm 0,0003	0,0024 \pm 0,0003
3,75	0,0019 \pm 0,0002	
5,00	0,00071 \pm 0,00002	0,00070 \pm 0,00002
7,50	0,00052 \pm 0,00003	0,00052 \pm 0,00002

A figura 3.12 é a representação gráfica da tabela anterior.

**Figura 3.12** Actividade da cardosina A em função da concentração de pepstatina A

Os pontos assinalados a cor-de-rosa, pelo facto de não pertencerem à zona linear da curva de titulação, não são usados para traçar a recta e calcular a concentração de pepstatina A. A concentração de inibidor que titula a enzima activa presente na amostra é 4,75 nM, o que equivale a 4,75 nM de cardosina A activa, ou seja 0,006 mg/mL, usando para valor de massa molar da cardosina A 38 kDa, determinado por espectrometria de massa (Lopes, 2003).

A concentração de cardosina A activa na solução é 6,02 μ g/mL, e a determinada pelo método do BCA é 9,4 μ g/mL. A percentagem de cardosina A activa relativamente à cardosina A total é 64%.

3.2.3.2.2 Titulação em Ureia

O procedimento usado nesta secção é o descrito para a titulação da cardosina A (nas secções 2.4.4.2 e 3.2.3.2.1). Verificou-se que para concentrações crescentes de ureia a actividade da cardosina A rapidamente decrescia em presença de inibidor o que nos levou a redesenhar o protocolo experimental original. Assim foi necessário aumentar a concentração inicial de enzima e/ou diminuir a concentração de pepstatina de modo a obter dados coerentes e conclusivos (tabela 2.3, secção 2.4.5.2).

Na tabela 3.7 apresentam-se as concentrações de cardosina A activa em mg/mL vs. concentração de ureia.

Tabela 3.7 Concentração de cardosina A activa em diferentes concentrações de ureia.

Após incubação da enzima (solução mãe - 9.4 μ g/mL) com a solução tampão acetato de sódio 50 mM, 0,2 M NaCl, 4% DMSO, pH 4,5 durante 15 minutos a 37°C, adicionou-se pepstatina A e deixou-se incubar mais 5 minutos a 37°C, tempo ao fim do qual se adicionaram 20 μ L de substrato. A solução foi de imediato homogeneizada e iniciado o registo das absorvências vs. tempo, durante 3 minutos.

[Ureia] /M	[E]/10 ⁻⁴ mg/mL
0,0	60 \pm 5
0,4	26 \pm 2
1,0	24 \pm 2
1,5	11 \pm 1
2,0	11 \pm 1
2,5	3,0 \pm 0,2
3,0	1,6 \pm 0,2

Com efeito, e como se esperava, verifica-se que a concentração de enzima activa vai diminuindo com concentrações crescentes de ureia.

Os ensaios de determinação de K_M e titulação dos locais activos devem ser realizados a concentração constante de enzima. No entanto, no trabalho em curso, os ensaios foram realizados a volume constante de solução tampão, o que implicou o aumento de volume final da solução de ensaio à medida que a concentração de substrato/inibidor aumentou e em consequência diminuição da concentração de enzima. Apesar do procedimento, pensamos que o erro introduzido não influencia as conclusões uma vez que, como foi sistemático, não retira validade à comparação de resultados. Contudo, para minimizar o erro o mais possível, procedeu-se à correcção matemática de v_0 (velocidade inicial) com normalização da concentração de enzima determinando a velocidade inicial em cada ensaio para uma determinada concentração final de enzima, constante.

3.2.4 Determinação de k_{cat} e k_{cat}/K_M

O k_{cat} e a constante de eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) são determinados conforme descrito anteriormente. O $k_{cat} = V_{max} / [E]_0$ onde $[E]_0$ é a concentração de enzima activa determinada na titulação com inibidor, para cada concentração de ureia.

A tabela 3.8 mostra os valores das constantes cinéticas obtidas a partir do método de linearização de Lineweaver-Burk, a tabela 3.9 a partir do método de Hanes-Woolf e a tabela 3.10 a partir do método de Eisenthal-Cornish-Bowden para as diferentes concentrações de ureia.

Tabela 3.8 Valores de K_M , k_{cat} e eficiência catalítica da cardosina A para diferentes concentrações de ureia, obtidos através do método de linearização de Lineweaver-Burk.

[Ureia]/ M	K_M / mM	$V_{max}/10^{-6}$ mmolmin ⁻¹	$k_{cat}/10^2$ s ⁻¹	$k_{cat}/K_M/10^2$ s ⁻¹ mM ⁻¹
0,0	0,12 ± 0,01	3,2 ± 0,1	0,17 ± 0,01	1,4 ± 0,1
0,4	0,20 ± 0,02	4,4 ± 0,2	0,54 ± 0,02	2,7 ± 0,3
1,0	0,21 ± 0,02	4,8 ± 0,2	0,65 ± 0,03	3,1 ± 0,3
1,5	0,27 ± 0,03	8,5 ± 0,4	1,6 ± 0,08	6,0 ± 0,7
2,0	0,34 ± 0,04	8,9 ± 0,6	1,3 ± 0,09	3,7 ± 0,4
2,5	0,40 ± 0,05	6,3 ± 0,5	3,3 ± 0,26	8,2 ± 1,0
3,0	0,45 ± 0,03	13 ± 1	7,3 ± 0,34	16 ± 1

Tabela 3.9 Valores de K_M , k_{cat} e eficiência catalítica da cardosina A para diferentes concentrações de ureia, obtidos através do método de linearização de Hanes-Woolf.

[Ureia]/ M	K_M / mM	$V_{max}/10^{-6}$ mmolmin ⁻¹	$k_{cat}/10^2$ s ⁻¹	$k_{cat}/K_M/10^2$ s ⁻¹ mM ⁻¹
0,0	0,12 ± 0,01	3,3 ± 0,2	0,18 ± 0,01	1,5 ± 0,1
0,4	0,18 ± 0,02	4,2 ± 0,4	0,51 ± 0,04	2,8 ± 0,3
1,0	0,20 ± 0,02	4,7 ± 0,4	0,63 ± 0,05	3,2 ± 0,3
1,5	0,23 ± 0,02	7,9 ± 0,8	1,5 ± 0,2	6,6 ± 0,3
2,0	0,36 ± 0,05	9,2 ± 1,4	1,3 ± 0,2	3,6 ± 0,5
2,5	0,36 ± 0,05	5,9 ± 0,9	3,0 ± 0,4	8,5 ± 1,3
3,0	0,58 ± 0,10	15 ± 3	8,6 ± 1,5	15 ± 3

Tabela 3.10 Valores de K_M , k_{cat} e eficiência catalítica da cardosina A obtidos através do método de linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden.

[Ureia]/ M	K_M / mM	$V_{max}/10^{-6}$ mmolmin ⁻¹	$k_{cat}/10^2$ s ⁻¹	$k_{cat}/K_M/10^2$ s ⁻¹ mM ⁻¹
0,0	0,12 [0,09, 0,15]	3,3 [3,1, 3,7]	0,18 [0,16, 0,19]	1,5 [1,1, 1,9]
0,4	0,19 [0,13, 0,23]	4,2 [3,5, 4,6]	0,51 [0,43, 0,56]	2,7 [2,3, 2,9]
1,0	0,20 [0,16, 0,23]	4,6 [4,1, 5,0]	0,62 [0,55, 0,67]	3,1 [2,7, 3,3]
1,5	0,21 [0,17, 0,27]	7,6 [6,6, 8,8]	1,4 [1,2, 1,7]	6,9 [5,9, 8,3]
2,0	0,34 [0,25, 0,46]	8,9 [7,2, 10,8]	1,3 [1,0, 1,5]	3,7 [2,8, 5,1]
2,5	0,32 [0,21, 0,48]	5,6 [4,4, 6,9]	2,9 [2,3, 3,6]	9,2 [7,3, 11,4]
3,0	0,47 [0,26, 0,69]	13 [10,2, 16,9]	7,5 [5,7, 9,4]	16 [12, 20]

A tabela 3.11 mostra o valor das constantes catalíticas sem recorrer à titulação da cardosina A. A concentração total de cardosina A é 9,24 μ g/mL de acordo com o descrito na secção 2.4.4 e 3.2.1 e as constantes são calculadas pelo método de linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden.

Tabela 3.11 Valores de K_M , k_{cat} e eficiência catalítica da cardosina A sem titulação dos locais activos.

A concentração de cardosina usada nos cálculos foi a determinada pelo método do BCA como descrito em 2.4.3. As constantes são calculadas segundo o método de linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden.

[Ureia]/ M	K_M mM	$V_{max}/10^{-6}$ mmolmin ⁻¹	$k_{cat}/10^2$ s ⁻¹	$k_{cat}/K_M/10^2$ s ⁻¹ mM ⁻¹
0,0	0,12 [0,09, 0,15]	3,3 [3,1, 3,7]	0,11 [0,10, 0,12]	0,95
0,4	0,19 [0,13, 0,23]	4,2 [3,5, 4,6]	0,14 [0,12, 0,15]	0,75
1,0	0,20 [0,16, 0,23]	4,6 [4,1, 5,0]	0,15 [0,14, 0,17]	0,78
1,5	0,21 [0,17, 0,27]	7,6 [6,6, 8,8]	0,17 [0,15, 0,20]	0,82
2,0	0,34 [0,25, 0,46]	8,9 [7,2, 10,8]	0,15 [0,12, 0,18]	0,44
2,5	0,32 [0,21, 0,48]	5,6 [4,4, 6,9]	0,10 [0,07, 0,12]	0,30
3,0	0,47 [0,26, 0,69]	13 [10,2, 16,9]	0,13 [0,10, 0,16]	0,28

4 DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em condições nativas de enrolamento, a estabilidade proteica deve-se a pequenas diferenças energéticas entre um largo conjunto de factores em oposição, que favorecem a estrutura enrolada em detrimento da estrutura desenrolada. A natureza e magnitude da contribuição individual das interacções dependem do solvente em que a enzima se encontra e do seu efeito na estabilidade da cadeia polipeptídica desenrolada (Jourdan, 2001).

As proteínas podem perder a sua conformação tridimensional nativa com alteração do ambiente químico e/ou físico que as rodeia. As causas mais comuns de desnaturação são o aquecimento, a adição de desnaturantes químicos como a ureia e a guanidina, alteração do pH ou aplicação de pressões elevadas. Muitas proteínas, especialmente as mais pequenas, são fácil e espontaneamente renaturadas desde que sejam colocadas em condições que favoreçam o enrolamento. A desnaturação das proteínas maiores ou multiméricas por norma é irreversível, uma vez que têm tendência a agregar e precipitar após as condições que favorecem o enrolamento serem restabelecidas (Fersht, 1999).

A desnaturação da proteína envolve a ruptura das interacções intra-moleculares não covalentes, sejam elas hidrófobas, iónicas ou pontes de hidrogénio, e o estabelecimento de ligações com o solvente que a rodeia. No estado nativo, a maioria das cadeias laterais hidrófobas dos aminoácidos estão protegidas da água uma vez que têm tendência a dirigir-se para o interior da molécula. Em contrapartida, no estado desnaturado estas cadeias estão muito mais expostas ao solvente, apresentando-se a proteína com uma estrutura mais aberta. Os desnaturantes químicos como a ureia solubilizam toda a proteína, desde a cadeia principal até às cadeias laterais. Uma vez que na presença de ureia toda a estrutura da proteína está muito mais exposta ao solvente, o estado desnaturado ou desenrolado é estabilizado por este composto (Fersht, 1999).

4.2 CARDOSINA A

Os estudos efectuados até à data com a cardosina A não permitiram conhecer substrato e inibidor fisiológicos da enzima. Os sub-locais de ligação da cardosina A foram definidos usando como substrato um fragmento da k-caseína (Frazão *et al.*, 1999), adaptando a estrutura de um inibidor complexado com a renina à cardosina A. No entanto, os sub-locais e em consequência a especificidade secundária, poderão ser distintos para outros substratos dependendo do tamanho destes e da sequência e natureza dos aminoácidos. O substrato SS1, tal como referido em 1.4.2.1, é muito semelhante ao fragmento de k-caseína usado por Frazão *et al.* (1999). Apesar de SS1 ser mais extenso em dois resíduos (P_4 e P_5), o segmento comum aos dois substratos (P_3 - P'_3), apresenta os mesmos resíduos ou resíduos com as mesmas características químicas. Deste modo, os sub-locais de ligação da cardosina A quando o substrato é o peptídeo SS1 não deverão ser muito distintos dos determinados para a k-caseína, pelo menos no segmento P_3 - P'_3 , o que possibilita algumas considerações.

O conhecimento detalhado da estrutura tridimensional da catepsina D humana e a sua homologia em termos estruturais com a cardosina A, possibilitou o desenvolvimento de estudos de modelação. Assim, a estrutura da cardosina A foi determinada usando como modelo a estrutura da catepsina D humana (Frazão *et al.*, 1999).

O programa de visualização de estruturas *Setor* (Evans, 1993) aplicado à cardosina A facultado por Sandra Macedo (Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra), permite visualizar a enzima de uma forma tridimensional e observá-la segundo ângulos distintos. Verifica-se a existência de zonas de diferente flexibilidade (fig. 4.1), que corresponderão a zonas com susceptibilidade distinta quando a enzima é sujeita a mudanças químicas ou físicas no ambiente que a rodeia. As zonas de maior flexibilidade deverão ser mais vulneráveis a agentes desnaturantes, quer pela sua maior exposição- todas as estruturas flexíveis na molécula ou estão situadas no exterior ou são zonas terminais das cadeias peptídicas, e conseqüentemente com liberdade conformacional aumentada- quer pela sua própria natureza (tipo de aminoácidos que as constitui e respectiva sequência).



Figura 4.1 Representação gráfica da molécula de cardosina A.

As zonas de diferente flexibilidade estão assinaladas a cores diferentes, desde o azul intenso que corresponde a zonas em que a flexibilidade é baixa, passando pelo amarelo e acabando no vermelho que assinala as zonas de maior flexibilidade. As setas verdes indicam o local activo. *Figura cedida por Sandra Macedo (IBILI, Coimbra)*

As zonas ou segmentos de maior flexibilidade correspondem a “*loops*”, localizados no exterior da molécula. São elas por ordem de numeração da molécula:

1. α -hélice entre os resíduos 45 e 51;
2. α -hélice entre os resíduos 108 e 111;
3. “*loop*” localizado entre os resíduos 74 e 80, onde se localiza a Tyr₇₅;
4. “*loop*” localizado entre os resíduos 278 e 280;
5. “*loop*” localizado entre os resíduos 150 e 160;
6. zona N-terminal da cadeia maior;

A observação da enzima no plano apresentado na figura 4.1 dá ideia que os segmentos que podem influenciar a capacidade catalítica da cardosina A devido ao seu posicionamento e distância ao local activo, são as assinaladas com os números 2, 3 e 4. No entanto, da observação da estrutura segundo planos distintos, é-nos sugerido que:

? A α -hélice (segmento 2) situada entre os resíduos 108 a 111 é uma estrutura com dimensão pequena mas como está perto do “*flap*” poderia ao movimentar-se impelir este segmento a aproximar-se da fenda catalítica. Analisando a orientação da α -hélice esta hipótese é pouco provável, uma vez que aparentemente terá tendência a movimentar-se precisamente na direcção oposta ao “*flap*”, sem influenciar a sua posição.

? O “*flap*” ou aba (segmento 3) localizado no “*loop*” que abrange os resíduos 74 a 80, situado sobre a fenda catalítica e que inclui a Tyr₇₅, apresenta uma flexibilidade elevada, sendo a porção da enzima com maior flexibilidade segundo o programa *Setor*. Na zona interna do “*flap*” as interacções com o resto da molécula são hidrófobas e em condições nativas este segmento pode movimentar-se afastando ou aproximando-se do centro activo. Após a adição de ureia, a ruptura das ligações de hidrogénio intramoleculares dos segmentos adjacentes ao “*flap*” pode conduzir ao aumento de flexibilidade desta estrutura permitindo aumentar a amplitude e rapidez dos seus movimentos e em consequência aumentar periodicamente a abertura da fenda catalítica e o posicionamento da própria Tyr₇₅. O anel aromático da tirosina está orientado para o interior da fenda catalítica, sugerindo um papel importante na catálise. São vários e nem sempre concordantes os estudos que abordam o papel da Tyr₇₅. Segundo Tanaka *et al.* (1998) a Tyr₇₅ não está envolvida na ligação do substrato à enzima, mas pode ser essencial no correcto posicionamento necessário à catálise. No entanto esta hipótese está em desacordo com a proposta de Tang e Koelsch (1995) para os quais a presença e orientação da Tyr₇₅ desempenha um papel importante na “captura” do substrato pela enzima e consequente ligação do substrato. Ao contrário dos estudos anteriores, Andreeva e Rumsh (2001) sugerem que a Tyr₇₅ participa activamente na catálise ao formar uma ligação de hidrogénio com a segunda molécula de água catalítica (W2) o que ocorre quando o “*flap*” situado acima da fenda catalítica se fecha sobre o substrato ligado. De qualquer modo, é por todos

aceite que devido ao posicionamento e orientação, a Tyr₇₅ é essencial para que a catálise ocorra.

¶ O “loop” (segmento 4) que se situa frente à aba referida anteriormente devido à sua localização poderia considerar-se importante para a catálise, nomeadamente para o k_{cat} e k_{cat}/K_M . No entanto verifica-se que além de estar a uma distância relativamente elevada tanto do “flap” como do centro catalítico, o seu posicionamento é desfavorável uma vez que está virado para o exterior da molécula. Em princípio a sua localização não é passível de apresentar efeitos directos na acessibilidade ao local activo.

As restantes zonas em que se detecta flexibilidade elevada, não deverão apresentar influência na catálise. A sua localização é afastada do centro activo da enzima, e a sua extensão e orientação relativamente à fenda catalítica não possibilita que influenciem a sua conformação.

Ainda pela aplicação do programa *Setor* à estrutura da cardosina A (fig. 4.2) é possível verificar algumas interacções químicas existentes no interior da fenda catalítica.

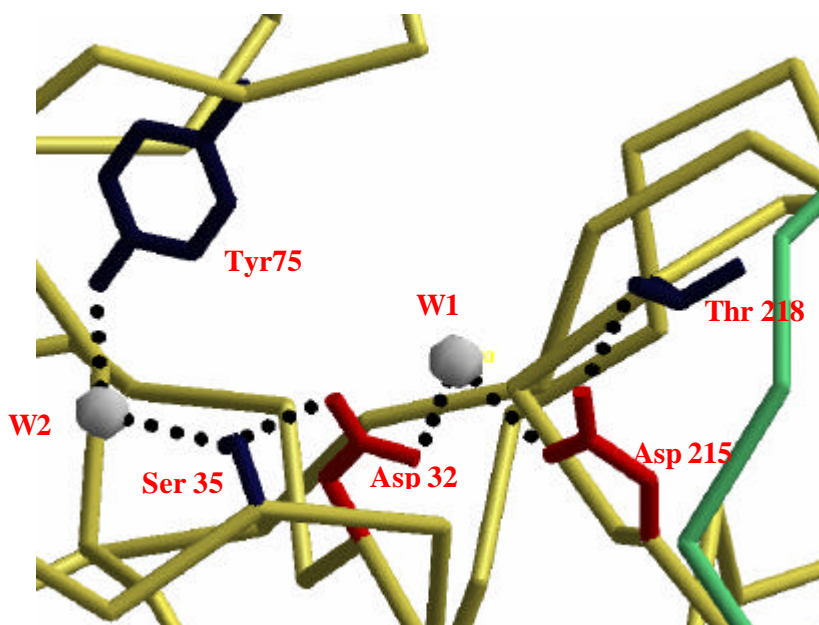


Figura 4.2 Visualização da fenda catalítica da cardosina A (programa *Setor*).

Nesta imagem são visíveis as ligações de hidrogénio existentes no interior da fenda catalítica.

Estas interações coincidem com as descritas no mecanismo catalítico proposto por Andreeva e Rumsh (2001) em relativos às proteinases aspárticas:

? O Asp₂₁₅ estabelece ligações de hidrogénio com a cadeia lateral da Thr₂₁₈ e com a cadeia principal da Gly₂₁₇ (não visível).

? O Asp₃₂ estabelece ligações de hidrogénio com a cadeia lateral da Ser₃₅ e com a cadeia principal da Gly₃₄ (não visível). Os aminoácidos Gly₃₄, Ser₃₅, Gly₂₁₇, Thr₂₁₈, pertencem aos sub-locais de ligação definidos por Frazão *et al.* (1999) usando como substrato o fragmento da K-caseína (resíduos 102-108).

? A molécula de água catalítica (W1) estabelece ligação de hidrogénio com os dois aspartatos catalíticos.

? A segunda molécula de água catalítica (W2) estabelece ligação de hidrogénio com a Tyr₇₅ e a Ser₃₅.

4.3 TITULAÇÃO DOS LOCAIS ACTIVOS

Na determinação das constantes cinéticas k_{cat} e k_{cat}/K_M a concentração de cardosina A foi determinada após titulação dos locais activos com pepstatina A para cada concentração de ureia (0,0 a 3,0 M). Os valores determinados devem corresponder à concentração de cardosina A activa, e conseqüentemente a valores das constantes cinéticas o mais aproximados possível dos valores reais. A tabela 4.1 mostra para cada concentração de ureia, a concentração e a percentagem relativa de enzima activa.

Tabela 4.1 Concentração e percentagem relativa de cardosina A activa em função da concentração de ureia.

[Ureia]/ M	[E]/10 ⁻⁴ mg/mL	Enzima activa (%)
0,0	60	100
0,4	26	43
1,0	24	39
1,5	11	18
2,0	11	18
2,5	3,0	5,0
3,0	1,6	2,7

Verifica-se que à medida que a concentração de ureia aumenta, a concentração de enzima activa diminui, o que está de acordo com as expectativas, uma vez que a ureia altera a conformação e conduz à desnaturação da enzima. Os valores de concentração de cardosina A activa obtidos limitaram a determinação de parâmetros cinéticos acima de 3,0 M ureia.

A variação da percentagem relativa de enzima activa em relação à concentração de ureia dá-se por patamares e não de forma linear (fig. 4.3).

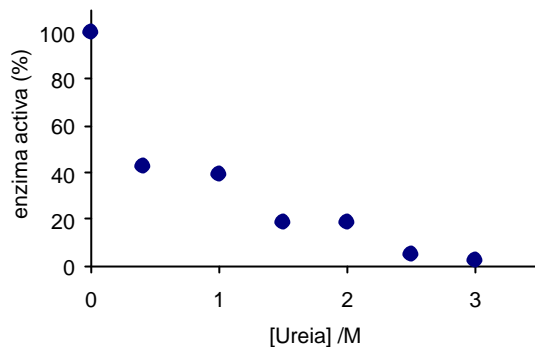


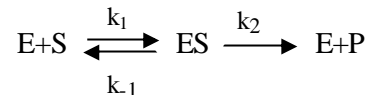
Figura 4.3 Percentagem de cardosina A activa vs. concentração de ureia.

Face aos resultados, é possível que a cardosina A apresente intervalos de tolerância a diferentes concentrações de ureia nos quais a sua estabilidade não sofre alteração significativa. Esta variação é sugestiva da existência de estados intermédios distintos durante o processo de desnaturação.

4.4 INTERPRETAÇÃO DOS VALORES DAS CONSTANTES CINÉTICAS

4.4.1 K_M

A constante K_M é, na maioria das condições, usada como medida relativa da afinidade da ligação enzima-substrato, embora $K_M = (k_{-1}+k_2)/k_1$ não seja equivalente a $K_s = k_{-1}/k_1$. Na equação



considera-se apenas o equilíbrio $E+S \rightleftharpoons ES$. Quanto mais baixo o valor de K_M mais forte será a ligação.

Segundo Yancey e Somero (1980) e Rajagopalan *et al.* (1961) a ureia aumenta o K_M da maior parte das enzimas. Assim acontece com a ribonuclease A (Arnold e Ulbrich-Hofmann, 2000) que em presença de ureia 1,0 M aumenta o seu K_M num factor de 2 relativamente à enzima na ausência de ureia. Também o K_M da NADH oxidase (Zoldak *et al.*, 2003) aumenta gradualmente até 2 M ureia.

No entanto o K_M pode não sofrer alteração em presença de ureia como acontece com a fosfatase alcalina da placenta humana cujo K_M não varia de modo significativo até ureia 8,0 M. Segundo os autores do trabalho (Hung e Chang, 2001) este facto é indicador de conformação rígida no local activo. A contrariar a maior parte dos trabalhos, o K_M da aldose redutase diminui em presença de soluções 1 M ureia (Burg *et al.*, 1999).

A figura 4.4 mostra a variação de K_M da cardosina A entre 0,0 e 3,0 M ureia.

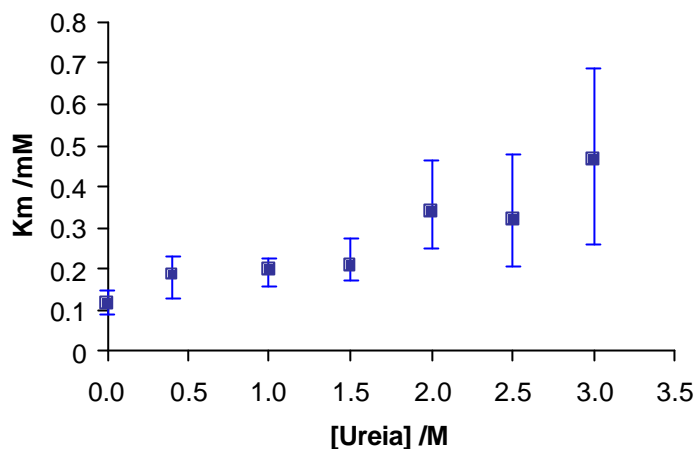


Figura 4.4 Variação de K_M vs. concentração de ureia.

O gráfico mostra a variação de K_M em função da concentração de ureia. Os K_M foram determinados segundo o método de linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden. Os desvios assinalados representam o intervalo de variação.

Os valores de K_M [pH 4,5, 37°C] na ausência de ureia, $0,12 \pm 0,01$ mM ou 0,12 [0,09, 0,15] mM, segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk e Eisenthal-Cornish-Bowden, respectivamente, não diferem do obtido por Veríssimo *et al.* (1996), $0,108 \pm 0,086$ mM [pH 4,7, 37°C], à excepção do erro que foi substancialmente inferior.

A pepsina e a termopsina (Fusek *et al.*, 1990), nas mesmas condições de temperatura [37°C] e na ausência de ureia, apresentam maior afinidade para o substrato SS1 do que a cardosina A, já que os valores de K_M são, respectivamente, $3,3 \times 10^{-2}$ mM e $5,3 \times 10^{-2}$ mM.

A análise da figura 4.4 mostra que os valores de K_M calculados pelo método de Eisenthal-Cornish-Bowden aumentam com a concentração de ureia. Verifica-se apenas uma pequena inversão nesta tendência a 2,5 M ureia mas que, além de não ser pronunciada, é imediatamente revertida a 3,0 M ureia. Este aumento dá-se em “patamares” relativamente bem definidos, com as alterações de maior amplitude a ocorrer entre 0,0–0,4 M, 1,5–2,0 M e 2,5–3,0 M ureia (factor 1,6, 1,6, 1,4, respectivamente). Dado que afinidade enzima-substrato varia na relação inversa de K_M , os resultados sugerem que a afinidade diminui com a concentração de ureia, igualmente de forma não linear.

O aumento de K_M sugere flexibilidade conformacional no local activo; as hipóteses que propomos de alteração da conformação da molécula de cardosina A e em particular na fenda catalítica são:

? Se a molécula no seu todo apresenta maior solubilidade em ureia, algumas ligações de hidrogénio intramoleculares foram substituídas por ligações de hidrogénio intermoleculares com a ureia. A conformação da enzima e, inclusive, do local activo é alterada podendo a estrutura apresentar-se mais “aberta” com consequente aumento da distância das ligações intramoleculares não covalentes. Ora, como já se referiu em 1.3.2 definem-se como resíduos pertencentes aos sub-locais de ligação da enzima os que se encontram a uma distância máxima de 4,0 Å dos resíduos do substrato que flanqueiam a ligação a clivar. A diminuição da afinidade enzima-substrato pode ser consequência da diminuição do número de sub-locais activos a estabelecerem ligação com o substrato, quer por aumento da distância, quer por os resíduos passarem a estabelecer ligações com a ureia em detrimento do substrato. Adicionalmente também os resíduos de substrato poderão estabelecer ligações de hidrogénio com a ureia.

? Segundo Tanaka *et al.* (1998) a Tyr₇₅ pode ser essencial no correcto posicionamento do substrato necessário à catálise. A ser válida esta hipótese, e quando se considera a cardosina A em ureia, o grupo OH da tirosina pode estabelecer ligação de hidrogénio com a ureia e a contribuição da tirosina pode ser perturbada. Por outro lado, o aumento da amplitude de movimentos do “flap” pode também comprometer esta possível função da tirosina.

? Propusemos anteriormente que em ureia os movimentos oscilatórios do “flap” são eventualmente mais rápidos. Devido a esta circunstância o ajuste entre substrato e aspartatos catalíticos e/ou sub-locais poderá ser menos elegante resultando uma diminuição da afinidade enzima-substrato.

Os valores de K_M obtidos experimentalmente aumentam com a concentração de ureia; no entanto, acima de 2,0 M ureia e especialmente no método de linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden apresentam intervalos de variação bastante amplos, que em alguns casos tornam os valores de K_M sobreponíveis. Se nos reportarmos exclusivamente à

linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden, o aumento de K_M poderá ser estatisticamente pouco significativo, apenas se podendo referir que se verifica tendência para que K_M aumente até ureia 3,0 M, no entanto conclusões definitivas necessitariam de uma abordagem estatística mais exaustiva. Consideramos por isso, e uma vez que o valor da mediana aumenta, que há aumento efectivo de K_M .

A escolha do substrato resultou dos estudos de especificidade da cardosina A e da comparação de K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M da enzima nativa obtidos com diversos substratos em trabalhos anteriormente realizados (secção 1.4.2). No entanto, com a adição de ureia e o aumento de K_M decorrente, no decurso dos ensaios surgiram algumas limitações relacionadas com a concentração de substrato e a absorvência medida. Whitaker (1994) refere que nas determinações cinéticas para uma gama entre 0,3 a 3,0 K_M de concentração de substrato se obtêm bons resultados. Segundo Sadler (1983), para um espectrofotómetro de duplo feixe, o intervalo de absorvência óptimo não é fácil de deduzir, mas parece cobrir a zona de 0,4 a 1,4, uma vez que quanto mais as soluções absorvem maior é o ruído de fundo gerado pelo fotomultiplicador, e menor a precisão nas medições. Na determinação de K_M , especialmente acima de 2,0 M ureia, concentrações elevadas de substrato originaram absorvências elevadas, ultrapassando em muito o limite superior admissível do espectrofotómetro. O limite superior de concentração de substrato indicado pelos referidos autores não foi respeitado, sendo por exemplo a relação concentração de substrato/ K_M 1,2 a 3,0 M ureia. Verifica-se assim que as determinações de K_M que apresentam maior desvio padrão e/ou intervalo de variação são exactamente aquelas em que o quociente referido foi inferior ao recomendado.

4.4.2 k_{cat} e k_{cat}/K_M

O k_{cat} ou constante catalítica é a constante de velocidade de 1ª ordem relativa à conversão de ES em E+P. O k_{cat} representa o número máximo de moles de substrato convertidas em produto por mole de local activo e por unidade de tempo. O k_{cat}/K_M representa a eficiência catalítica da enzima.

A variação de k_{cat} e k_{cat}/K_M em presença de ureia é distinta consoante a enzima em estudo, e para uma mesma enzima está dependente da concentração de ureia. Para concentrações baixas do agente desnaturante poderá constatar-se diminuição, manutenção ou mesmo aumento das constantes, no entanto, devido ao mecanismo intrínseco do desnaturante, acima de uma determinada concentração (dependente da enzima) o valor das constantes tenderá para zero.

O k_{cat} da fosfatase alcalina da placenta humana (Hung e Chang, 2001) diminui com o aumento da concentração de ureia (0,0 a 8,0 M) assim como k_{cat}/K_M . O k_{cat} da ribonuclease A (Arnold e Ulbrich-Hofmann, 2000) em presença de ureia 1,0 M não sofre alteração, e k_{cat}/K_M diminui. Na NADH oxidase (Zoldak *et al.* 2003) k_{cat} aumenta até 2,0 M ureia e k_{cat}/K_M não sofre alteração; para concentrações acima de 2,0 M ureia k_{cat} diminui até ser praticamente nulo a 6,0 M ureia, diminuindo também k_{cat}/K_M .

As constantes podem ser calculadas usando o valor de concentração de proteína total, no entanto, essa determinação é incorrecta pois assume-se que 100% da enzima está activa. No entanto, apresentamos a seguir os resultados obtidos com e sem titulação dos locais activos, de modo a permitir comparar resultados.

O gráfico da figura 4.5 mostra a variação de k_{cat} em função da concentração de ureia.

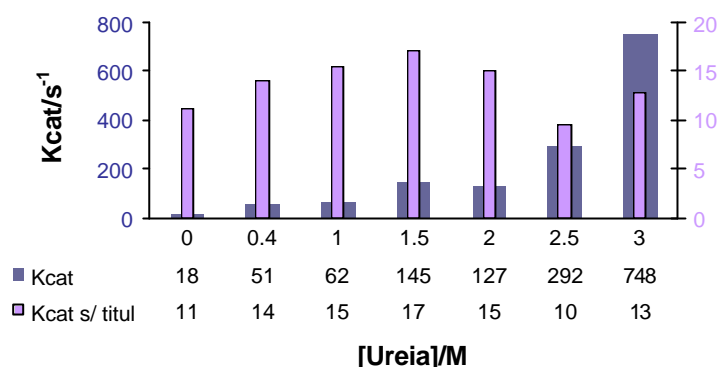


Figura 4.5 Variação de k_{cat} da cardosina A em função da concentração de ureia.

O gráfico mostra a variação de k_{cat} em função da concentração de ureia, usando a concentração de cardosina A titulada ■ e não titulada □. O cálculo das constantes utiliza o método de linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden.

Os valores de k_{cat} determinados para a cardosina A no estado nativo, $17,1 \text{ s}^{-1}$ ou $18 [16, 19] \text{ s}^{-1}$ segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk e Eisenthal-Cornish-Bowden, respectivamente, são diferentes (embora da mesma ordem de grandeza) das obtidas por Veríssimo *et al.* (1996) - $55,63 \text{ s}^{-1}$.

Na ausência de ureia o k_{cat} da termopsina (Fusek *et al.*, 1990) é muito semelhante à cardosina A, $14,3 \text{ s}^{-1}$, mas a pepsina apresenta um valor muito superior, 207 s^{-1} .

Faro (1991) estudou a influência da ureia na fracção recolhida da cromatografia de exclusão molecular de extracto de *Cynara cardunculus* L, onde estão presentes as cardosinas A, A₀ e B e usou como substrato o hexapéptido Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-Ala-Leu-OMe. O autor verificou que a actividade da fracção aumentou em presença de 1,0 M ureia relativamente à enzima na ausência do desnaturante, a 2,0 M ureia a actividade igualou a da fracção a 0,0 M e continuou a decrescer com o aumento da concentração de ureia.

Na determinação de k_{cat} com titulação dos locais activos, os valores aumentam até 3,0 M ureia, sofrendo apenas uma pequena inversão a 2,0 M, imediatamente revertida para concentrações mais altas de ureia. A concentrações 2,5 e 3,0 M de desnaturante verifica-se um incremento significativo dos valores de k_{cat} , de respectivamente 16,2 e 41,5 relativamente à enzima na ausência de ureia, embora a extensão deste incremento se possa dever ao valor reduzido (tendente para zero) da concentração de enzima activa. Por esta razão os valores de k_{cat} para concentrações de ureia superiores a 2,5 M poderão estar afectados de um erro por excesso, erro este tanto maior quanto menor a concentração de enzima activa. Por esta razão não foram determinadas constantes cinéticas para valores superiores a 3,0 M ureia.

Os valores de k_{cat} calculados sem titulação da enzima activa, não apresentam uma variação significativa entre si, sendo os valores mínimo e máximo, respectivamente 10 s^{-1} e 17 s^{-1} . Considerando estes valores, concluir-se-ia que até 3,0 M ureia a variação de k_{cat} é pouco expressiva e os valores apenas ligeiramente mais elevados do que na ausência de ureia.

Comparando os dois tipos de determinação verifica-se que a discrepância entre os valores de k_{cat} da enzima titulada e não titulada se vai agudizando à medida que a concentração de ureia aumenta o que se justifica pela diminuição da concentração de enzima activa. Na ausência de ureia o k_{cat} da enzima titulada é 1,6 vezes superior ao da enzima não titulada, já que apenas cerca de 64% da enzima está activa, enquanto que a 2,5 M e a 3,0 M ureia o quociente ascende a 29 e 57, respectivamente.

De igual modo, apresenta-se na figura 4.6 a comparação dos valores das constantes de eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) da cardosina A em função da concentração de ureia.

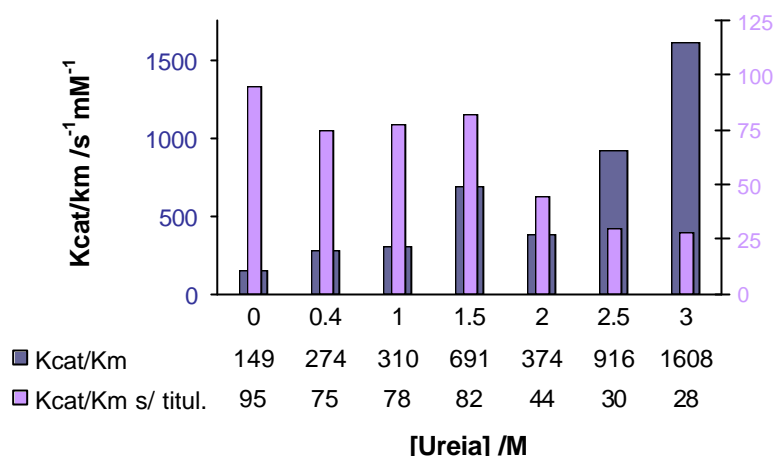


Figura 4.6 Variação de k_{cat}/K_M da cardosina A em função da concentração de ureia

O gráfico mostra a variação de k_{cat}/K_M em função da concentração de ureia, usando a concentração de cardosina A titulada ■ e não titulada □. O cálculo das constantes utiliza o método de linearização de Eisenthal-Cornish-Bowden.

Os valores de k_{cat}/K_M obtidos para a cardosina A, $140 \cdot 10 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $150 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, segundo Lineweaver-Burk e Eisenthal-Cornish-Bowden, respectivamente, são diferentes (embora da mesma ordem de grandeza) dos obtidos por Veríssimo *et al.* (1996), $515,09 \cdot 56,7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Os valores de k_{cat}/K_M da pepsina e termopsina (Fusek *et al.*, 1990) na ausência de ureia, $1,6 \cdot 10^{-4}$ e $3,7 \cdot 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, são muito inferiores aos da cardosina A.

Uma vez que a ureia afecta mais extensamente o valor de k_{cat} do que de K_M , a constante de eficiência catalítica é determinada quase exclusivamente por k_{cat} e graficamente, o perfil de variação da eficiência catalítica da cardosina A activa (fig. 4.6) é semelhante ao de k_{cat} (fig. 4.5). A 2,0 M ureia há um decréscimo para aproximadamente metade do valor observado a 1,5 M, logo seguido de recuperação para concentrações mais elevadas de ureia. Deste modo, verifica-se que a eficiência catalítica da enzima é favorecida pela presença de ureia, no intervalo de concentrações estudadas.

Se se considerarem as constantes de eficiência catalítica não recorrendo à titulação, verifica-se que a enzima vai perdendo a capacidade de catálise à medida que a

concentração de ureia aumenta. A 2,5 M e 3,0 M ureia a enzima perde 68,4% e 70,5% da sua capacidade de catálise, respectivamente.

Comparando os dois tipos de determinação verifica-se que tal como em k_{cat} , a discrepância entre os valores de eficiência catalítica da enzima titulada e não titulada se vai agravando à medida que a concentração de ureia aumenta, sendo as diferenças verificadas em k_{cat} e k_{cat}/K_M quase sobreponíveis pelas razões já referidas.

O valor crescente de k_{cat} com aumento da concentração de ureia, apesar da concentração de enzima activa diminuir, sugere que a transformação do complexo ES em enzima livre e produto está facilitada. O aumento de k_{cat} sobrepõe-se ao aumento de K_M , levando a que a eficiência catalítica da enzima seja superior em ureia do que na ausência desta. O aumento de k_{cat} e k_{cat}/K_M no intervalo de concentrações de ureia estudadas pode dever-se a um conjunto de factores distintos:

? Como já se referiu, em presença de ureia a amplitude da oscilação do “*flap*” estará aumentada podendo resultar num aumento da abertura de acesso à fenda catalítica, o que facilita o acesso da molécula de substrato ao centro activo e/ou a libertação do produto resultante.

? O eventual aumento da rapidez de oscilação do “*flap*” pode originar um aumento na intensidade dos “choques” entre o substrato e os aspartatos catalíticos.

? Segundo Tang e Koelsch (1995) a Tyr₇₅ pode ter um papel importante na captura do substrato. Assim, quando o “*flap*” se afasta do local activo expondo a Tyr ao solvente esta supostamente estará mais apta para captar moléculas de substrato.

? Andreeva e Rumsh (2001) sugerem um papel activo da Tyr₇₅ na catálise ao estabelecer uma ligação de hidrogénio com a segunda molécula de água catalítica. Deste modo, com a maior aproximação do “*flap*” (o que ocorre ciclicamente) à fenda catalítica contendo o substrato, a catálise é acelerada.

? A eficiência catalítica das enzimas é altamente influenciada pela existência de uma especificidade secundária a nível dos sub-locais. O eventual aumento da distância dos sub-locais de ligação da enzima aos resíduos do substrato que flanqueiam a ligação a clivar, referida em 4.4.1, pode não ser extensiva a todos, e aqueles mais directamente implicados na catálise (Gly₂₁₇, Gly₃₄, Tyr₇₅, Trp₃₉, Thr₂₁₈, Asn₃₇, Ser₃₅) podem manter a mesma

distância ou até posicionarem-se de forma mais favorável à catálise. Pode ainda eventualmente estabelecer-se uma nova especificidade a nível secundário.

? Os aspartatos do local activo ao estarem localizados no fundo da fenda catalítica são à partida resíduos relativamente bem protegidos. No entanto alterações conformacionais no local activo podem induzir uma pequena variação na distância entre os aspartatos catalíticos, variação esta que beneficia a actividade catalítica.

? A força de ligação dos hidrogénios ao azoto da ureia é menor que a força de ligação dos hidrogénios ao oxigénio da água. Supondo que a molécula água (W2) pode ser substituída por ureia, os hidrogénios vão ser mais fortemente atraídos pela Ser₃₅ e pelo Asn₃₇, e a rotação do hidrogénio da Ser₃₅ para estabelecer ligação com o oxigénio do Asp₃₂ estará facilitada. O protão ligado ao Asp₃₂ facilita que este ceda um protão ao grupo carbonilo da ligação peptídica susceptível resultando uma maior eficácia na degradação do substrato.

? Poderá haver, por razões que desconhecemos, destabilização do complexo enzima-produto originando a libertação rápida do produto.

Os valores das constantes cinéticas determinadas neste trabalho poderiam ser distintas das obtidas, se o tempo de incubação da cardosina em agente desnaturante fosse diferente. González-Jiménez e Cortijo (2002) induziram a desnaturação da albumina de soro humana com ureia e concluíram que 30 minutos foi o tempo suficiente para atingir o equilíbrio conformacional. Ao estudarem a glucose oxidase, Akhtar *et al.* (2002) concluíram que uma hora de incubação em ureia era suficiente para atingir o equilíbrio, e que entre uma e doze horas de incubação não ocorriam alterações nem na actividade enzimática nem nos parâmetros estruturais (determinados por espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular). A fosfatase alcalina da placenta humana necessita de 24h de incubação em ureia para que as alterações na actividade enzimática atinjam o equilíbrio (Hung e Chang, 2001). No presente trabalho não foi determinado o tempo ao fim do qual se estabelece o equilíbrio entre a enzima e agente desnaturante, pelo que os resultados apenas tem validade para o tempo de incubação usado -15 minutos.

4.4.3 Comparação dos resultados obtidos segundo os três métodos de linearização

Como referido na secção 1.5.2 os diferentes métodos de linearização com vista à obtenção das constantes cinéticas apresentam vantagens e limitações. Os métodos de linearização que recorrem ao cálculo do recíproco das variáveis são matematicamente menos exactos do que os métodos directos. O método de Lineweaver-Burk ($1/v_0$ vs. $1/[S]$) ao comprimir os dados correspondentes a concentrações elevadas de substrato numa pequena região do gráfico e enfatizar os dados relativos a concentrações baixas de substrato amplifica os erros experimentais. Este método exige um número elevado de leituras a concentrações baixas de substrato de modo a minimizar o erro que lhe está associado. O método de Hanes-Woolf ($[S]/v_0$ vs. $[S]$) é preferido relativamente ao anterior já que não apresenta a desvantagem de recorrer ao cálculo do recíproco da concentração de substrato; o erro que lhe está associado é menor que no método anterior. Para diversos autores, o método mais credível e exacto é o de Eisenthal-Cornish-Bowden já que é um método directo (que não recorre ao cálculo do recíproco das variáveis) e todas as leituras têm o mesmo peso na análise.

A comparação dos valores de K_M , assim como dos respectivos desvios padrão ou intervalos de variação, obtidos através dos métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden apresenta-se na figura 4.7.

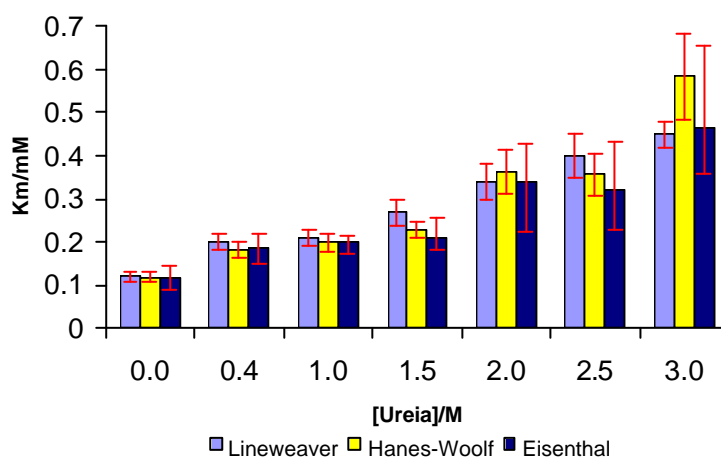


Figura 4.7 Valores de K_M segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden.

As barras de erro indicam os desvios padrão (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf) e intervalos de variação (Eisenthal-Cornish-Bowden).

As diferenças de K_M segundo os vários métodos são pequenas até 1,0 M ureia, verificando-se de genericamente um agravamento a partir de 1,5 M ureia. Os valores de K_M determinados pelo método de Eissenthal-Cornish-Bowden são na maioria dos casos inferiores aos obtidos pelos outros métodos, e os intervalos de variação, maiores neste método do que os desvios padrão em Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf parecem evidenciar um pouco as diferenças, principalmente acima de 2,0 M ureia.

A variação de k_{cat} e k_{cat}/K_M com a ureia seguem o mesmo perfil de comportamento nos três métodos de linearização verificando-se apenas a 3,0 M ureia uma maior discrepância nos valores das constantes como se pode verificar na fig. 4.8 e 4.9.

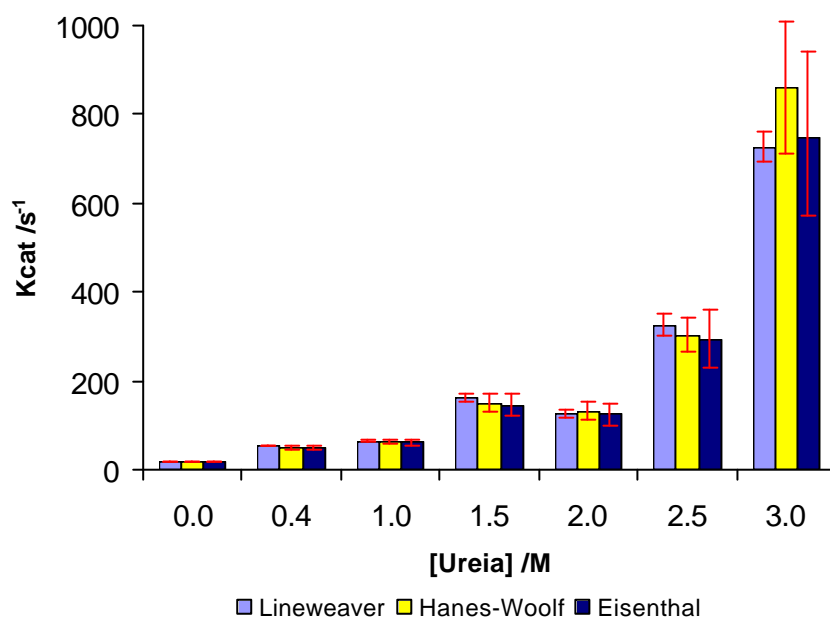


Figura 4.8 Valores de k_{cat} segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eissenthal-Cornish-Bowden.

As barras de erro indicam os desvios padrão (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf) e intervalos de variação (Eissenthal-Cornish-Bowden).

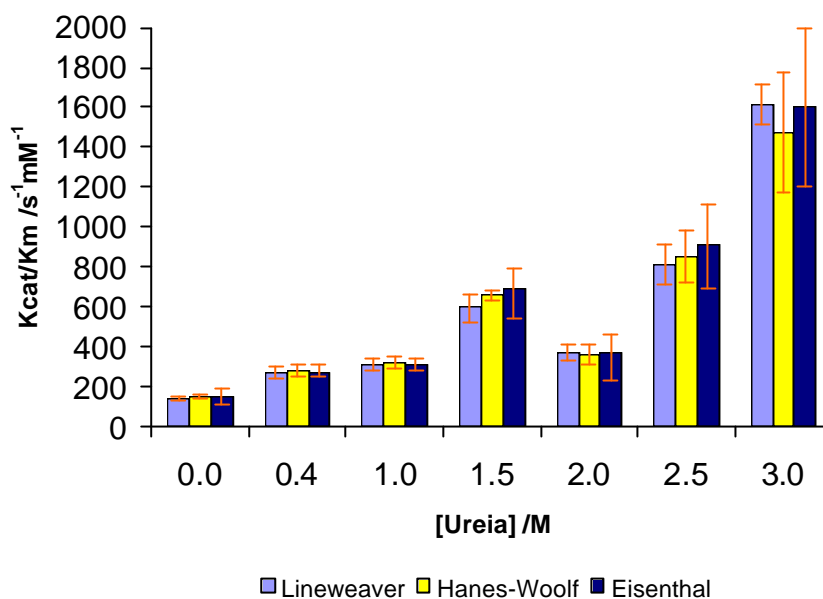


Figura 4.9 Valores de k_{cat}/K_M segundo os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eisenthal-Cornish-Bowden.

As barras de erro indicam os desvios padrão (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf) e intervalos de variação (Eisenthal-Cornish-Bowden).

Tal como em K_M , verifica-se que os intervalos de variação de k_{cat} e k_{cat}/K_M no método de Eisenthal-Cornish-Bowden são de um modo geral superiores aos desvios padrão verificados nos outros dois métodos e na generalidade englobam-nos. O método revela-se menos preciso que os outros dois, especialmente para as concentrações de ureia mais elevadas, dada a amplitude dos desvios relativamente à mediana. Este facto é com certeza consequência da não observância do quociente recomendado $[S]/K_M$, exactamente para as concentrações de ureia referidas. Sendo este o método que melhores estimativas faz das constantes cinéticas e em que todos os dados têm o mesmo peso, será eventualmente também aquele que mais evidencia as deficiências do método usado, quer a nível do procedimento quer das condições experimentais seleccionadas.

4.5 CONCLUSÃO

A cardosina A cliva ligações peptídicas hidrófobas, e apresenta-se como potencial alternativa à tripsina na digestão de proteínas com características hidrófobas em que esta não se revela eficaz. No entanto como as proteínas hidrófobas são pouco solúveis em meio aquoso, necessitam de um composto que aumente a sua solubilidade. A ureia funciona como agente solubilizante de proteínas, sendo no entanto também responsável pela sua desnaturação parcial ou total, dependendo da concentração usada. Ao adicionar a enzima proteolítica a uma proteína solubilizada em ureia, pode haver alteração da actividade daquela e a digestão não ser eficaz. Se por um lado se pretende usar uma concentração de ureia que solubilize a proteína, por outro há que ter em atenção o seu efeito na enzima.

O trabalho realizado visou verificar em que medida a cardosina A é afectada pela ureia, usando o substrato sintético Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu. As concentrações de ureia testadas variaram entre 0,4 e 3,0 M.

O K_M da cardosina A aumenta em presença de ureia e com o aumento da concentração desta o que indica diminuição da afinidade da enzima para o substrato. Esta diminuição pode ser devida ao decréscimo do número de sub-locais activos a estabelecerem ligação com o substrato, diminuição da contribuição da Tyr₇₅ no correcto posicionamento do substrato ou ainda a um ajuste menos elegante entre substrato e a fenda catalítica (sub-locais e aspartatos catalíticos).

A concentração de enzima activa diminui de modo abrupto em presença de ureia. Verifica-se que a 0,4 M ureia 50% da enzima permanece activa e a 3,0 M ureia apenas 2,7% face à enzima na ausência de ureia.

Os valores de k_{cat} e k_{cat}/K_M da cardosina A aumentam em presença de ureia e com o aumento da concentração desta. O aumento dos valores destas constantes poderá ser consequência do aumento na abertura de acesso à fenda catalítica, o que facilita o acesso da molécula de substrato ao centro activo e/ou a libertação do produto resultante, do aparecimento de diferente especificidade a nível secundário, da destabilização do

complexo enzima-produto ou da conjugação de factores relacionados com o mecanismo catalítico propriamente dito. A enzima torna-se efectivamente mais activa.

Do trabalho realizado é possível concluir que :

- ? Embora parte da cardosina A perca actividade em presença de ureia, globalmente a enzima vê a sua capacidade de catálise aumentada em soluções até 3,0 M ureia.
- ? A molécula de cardosina A sofre alterações conformacionais em presença de ureia, alterações estas que se estendem ao local activo da enzima e estruturas adjacentes importantes na catálise que se traduzem na alteração dos parâmetros cinéticos da enzima.
- ? A cardosina A pode actuar como enzima proteolítica em proteínas que se solubilizem até 3,0 M ureia desde que constituam substrato específico da enzima.

4.6 TRABALHO FUTURO

A espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular são técnicas que fornecem informações diferentes e complementares, permitindo estudos mais exaustivos do efeito dos agentes desnaturantes na estrutura secundária e terciária da cardosina A. A conjugação das várias técnicas permitiria com certeza perceber mais profundamente a extensão da influência da ureia na cardosina A.

O tempo de digestão proteica em solução com tripsina varia segundo os laboratórios entre 45 a 60 minutos. O tempo usado no presente trabalho (15 minutos) é bastante inferior pelo que será de interesse alargar os estudos a tempos superiores de incubação da cardosina A em ureia, uma vez que a conformação da enzima e a sua eficiência catalítica poderão ser significativamente diferentes.

O substrato SS1 revelou ser um dos mais indicados na determinação dos parâmetros cinéticos da cardosina A nativa. No entanto com a adição do agente desnaturante e o aumento de K_M decorrente, verifica-se que o substrato apresenta limitações que se repercutem na precisão dos resultados quando se fazem medições de absorvência nos extremos superiores dos intervalos de concentração de substrato recomendados. Pensamos ser útil realizar testes a comprimentos de onda em que o substrato apresente uma absorvência mais baixa ou mesmo ponderar o uso de outros substratos para determinação de parâmetros cinéticos da cardosina A, ou de outras enzimas com especificidade semelhante, quando em presença de agentes desnaturantes.

São ainda necessários estudos que permitam a descoberta do substrato fisiológico da cardosina A assim como o conhecimento mais detalhado do local activo da enzima e dos sub-locais de ligação. O conjunto destes dados permitiria com certeza compreender melhor as alterações conformacionais que ocorrem na enzima quando esta é sujeita à acção da ureia ou outros agentes desnaturantes e correlaciona-las de forma mais consolidada com as alterações nos parâmetros cinéticos.

5 BIBLIOGRAFIA

- Akhtar, Md.S., Ahmad, A., Bhakuni, V.** 2002. Guanidinium chloride- and urea-induced unfolding of the dimeric enzyme Glucose Oxidase. *Biochemistry*. 41:3819-3827.
- Andreeva, N.S., Rumsh, L.D.** 2001. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes *Protein Sci*. 10:2439-2450.
- Arnold, U., Ulbrich-Hofmann, R.** 2000. Differences in the denaturation behavior of ribonuclease A induced by temperature and guanidine hydrochloride. *J. Protein Chemistry*. 19: 345-351.
- Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K., Arai, S.** 1995. Rice aspartic proteinase, oryzasin, expressed during seed ripening and germination, has a gene organization distinct from those of animal and microbial aspartic proteinases. *Eur J Biochem*. 232(1):77-83.
- Asakura, T., Matsumoto, I., Funaki, J., Arai, S., Abe, K.** 2000. The plant aspartic proteinase –specific polypeptide insert is not directly related to the activity of oryzasin 1. *Eur. J. Biochem*. 267:5115-5122.
- Atkins, G.L., Nimmo, I.A.** 1975. A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem. J.*, 149:775-777.
- Barros, R.M., Malcata, F.X.** 2002. Modeling the kinetics of whey protein hydrolyses brought about by enzymes from *Cynara cardunculus*. *J. Agric. Food Chem*. 50:4347-4356.
- Belozersky, M., Sarbakanova, S., Dunaevsky, Y.** 1989. Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action of gliadin. *Planta*. 117:321-326.
- Bento, I., Frazao, C., Coelho, R., Wilson, K., Dauter, Z., Carrondo, M.A.** 1998. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the plant aspartic proteinase cardosin A. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr*. 54:991-993.
- Beveridge, A.J., Heywood, G.C.** 1993. A quantum mechanical study of the active site of aspartic proteinases. *Biochemistry*. 32(13):3325-3333.
- Beyer, B., Dunn, B.** 1998. Prime region subsite specificity characterization of human cathepsin D: the dominant role of position 128. *Protein Science*. 7:88-95. Cambridge University Press. USA.
- Bott, R., Subramanian, E., Davies, D.** 1982. 3-dimensional structure of the complex of the rhizopus-chinensis carboxyl proteinase and pepstatin at 2.5-Å resolution. *Biochemistry*. 21:6956-6962.
- Burg, M.B., Peters, E.M., Bohren, K.M., Gabbay, K.H.** 1999. Factors affecting counteraction by methylamines of urea effects on aldose reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 96:6517-6522.
- Caffisch, A., Karplus, M.** 1999. Structural details of urea binding to barnase: a molecular dynamics analysis. *Structure*. 7:477-488.

Copeland, R.A. 2000. Enzymes, a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. 2ed. edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Cornish-Bowden, A., Eisenthal, R. 1974. Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. *Biochem. J.* 139:721-730.

Davies, D.R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev. Biophys. Chem.* 19:189-215. Review

Dhanaraj, V., Dealwis, C.G., Frazão, C., Badasso, M., Sibanda, B.L., Tickle, I.J., Cooper, J.B., Driessen, H.P., Newman, M., Aguilar, C., Wood, S.P., Blundell, T.L., Hobart, P.M., Geoghegan, K.F., Ammirati, M.J., Danley, D.E., O'Connor, B.A., Hoover, D.J. 1992. X-Ray analyses of peptide-inhibitor complexes define the structural basis of specificity for human and mouse renins. *Nature.* 357: 466-472.

Domingos, A., Cardoso, P.C., Xue, Z.T., Clemente, A., Brodelius, P.E., Pais, M.S. 2000. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *Eur. J. Biochem.* 267(23):6824-6831.

Duarte, A. 2001. Utilização de uma enzima vegetal na prevenção de fibroses e aderências. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro.

Dunn, B.M., Jimenez, M., Parten, B.F., Valler, M.J., Rolph, C.E., Kay, J. 1986. A systematic series of synthetic chromophoric substrates for aspartic proteinases. *Biochem. J.* 237(3):899-906.

Dunn, B.M. 1992. Structure and function of the aspartic proteinases. (Dunn, B., ed.) Plenum Press, New York.

Dunn, B.M., Hung, S.-H. 2000. The two sides of enzyme-substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477:231-240.

Dunn, B.M. 2002. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem. Rev.* 102:4431-4458.

Dunn, M.J. 1989. Electrophoretic Analysis Methods. In Protein purification methods: a practical approach. Harris, E.L.V. & Angal, S. ed.

Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R.M., Pires, E., de Lima, M.C., Faro, C. 2000. The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *J. Biol. Chem.* 275:38190-38196.

Eisenthal, R., Cornish-Bowden, A 1974. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem. J.* 139:715-720.

Evans, S. 1993. Setor: Hardware lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules. *J. Mol. Graphics.* 11:134-138.

Faro, C., Alface, J., Pires, E.V. 1987. Purification of a protease from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *Cienc. Biol.* 12(5A):201.

- Faro, C.** 1991. Purificação e caracterização Físico-Química de protease de *Cynara cardunculus* L. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.
- Faro, C., Moir, A., Pires, E.V.** 1992. Specificity of a milk clotting enzyme extracted from the thistle *Cynara cardunculus* L.: action on oxidised insulin and κ-casein. *Biotechnol. Lett.* 14(9):841-846.
- Faro, C., Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Pissarra, J., Frazão, C., Costa, J., Lin, X.L., Tang, J., Pires, E.V.** 1998. Structural and functional aspects of cardosins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 436:423-433. Review
- Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simões, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X., Tang, J., Pires, E.V.** 1999. Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *J. Biol. Chem.* 274(40):28724-28729.
- Fersht, A.** 1999. Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. WH Freeman, ed. USA.
- Fevereiro, P., Cabral, J., Fonseca, M., Pais, M.** 1986. Callus and cell suspension culture of *Silybum marianum*. Biosynthesis of proteins with clotting activity. *Biotechnol. Lett.* 8:19-24.
- Frazão, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C.M., Veríssimo, P., Faro, C., Pires, E.V., Cooper, J., Carrondo, M.A.** 1999. Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *J. Biol. Chem.* 274(39):27694-27701.
- Fruton, J.S.** 1970. The specificity and mechanism of pepsin action. *Adv Enzymol.* 33:401-443.
- Fusek, M., Lin, X.L., Tang, J.** 1990. Enzymic properties of thermopsin. *J. Biol. Chem.* 265(3):1496-1501.
- Gonzalez-Jimenez, J., Cortijo, M.** 2002. Urea-induced denaturation of human serum albumin labeled with acrylodan. *J. Protein Chem.* 21(2):75-79.
- Henderson, P.** 1992. Statistical analysis of enzyme kinetic data *In* Enzyme assays: A Practical Approach. Eisenthal R. & Danson M.J. ed.
- Hofmann, T., Hodges, R.S.** 1982. A new chromogenic substrate for penicillopepsin. *Biochem. J.* 203:603-610.
- Hofmann, T., Allen, B., Bendiner, M., Blum, M., Cunningham, A.** 1988. The effect of secondary substrate binding in penicillopepsin, the contributions of subsites S2' and S3 to k_{cat} . *Biochemistry.* 27:1140-1147.
- Hung, H.-C., Chang, G.-G.** 2001. Multiple unfolding intermediates of human placental alkaline phosphatase in equilibrium urea denaturation. *Biophysical Journal.* 81:3456-3471.

James, M.N.G., Sielecki, A.R., Salituro, F., Rich, D.H., Hofmann, T. 1982. Conformational flexibility in the active-sites of aspartyl proteinases revealed by a pepstatin fragment binding to penicillopepsin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:6137-6141.

James, M.N.G., Sielecki, A.R., Hayakawa, K., Gelb, M.H. 1992. Crystallographic analysis of transition state mimics bound to penicillopepsin: difluorostatine- and difluorostatone-containing peptides. *Biochem.* 31:3872-86.

Jourdan, M., Searle, M.S. 2001. Insights into the stability of native and partially folded states of Ubiquitin: Effects of cosolvents and denaturants on the thermodynamics of protein folding. *Biochemistry.* 40:10317-10325.

Kay, J., Dunn, B.M. 1992. Substrate specificity and inhibitors of aspartic proteinases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 210:23-30. Review.

Ladror, U., Snyder, S., Wang, G., Holzman, T., Krafft, G. 1994. Cleavage at the amino and carboxyl termini of alzheimer's amyloid-beta by cathepsin D. *J. Biol. Chem.* 269:18422-18428.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Lopes, H.J. 2003. Caracterização de uma proteinase aspártica de *Cynara cardunculus* L. por electroforese em gel e espectrometria de massa. Tese de mestrado. Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal.

Macedo, I., Faro, C., Pires, E.V. 1993. Specificity and Kinetics of the Milk-Clotting Enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus* L) toward Bovine k-Casein. *J. Agric. Food Chem.* 41:1537-1540.

Macedo, I., Faro, C., Pires, E.V. 1996. Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine κ -s1-casein and β -casein and comparison with chymosin. *J. Agric. Food Chem.* 44:42-47.

Macedo, I.Q., Marques, P., Delgadillo, I. 1999. Pepstatin-sensitive proteolytic activity of sorghum seeds. *Biotechnol. Tech.* 13:817-820.

Makhatadze, G.I., Privalov, P.L. 1992. Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *J. Mol. Biol.* 226(2):491-505.

Makowski, G.S., Ramsby, M.L. 1997. Protein molecular mass determination by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. in: Protein structure. A practical approach. Creighton T.E., Ed.

Marciniszyn, J.Jr., Hartsuck, J.A., Tang, J. 1977. Pepstatin inhibition mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 95:199-210.

Mutlu, A., Gal, S. 1999. Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiol. Plant.* 105:569-576.

- NC-IUBMB. Enzyme Nomenclature. Recommendations. Peptidase Nomenclature. 2000
- Nozaki, Y., Tanford, C.** 1963. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. *J. Biol. Chem.* 238:4074-4081.
- Oldziej, S., Ciarkowski, J.** 1996. Mechanism of action of aspartic proteinases: applications of transition-state analogue theory. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 10:583-588.
- Payie, K.G., Weadge, J.T., Tanaka, T., Yada, R.Y.** 2000. Purification, N-terminal sequencing and partial characterization of a novel aspartic proteinase from the leaves of *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Biotechnology Letters.* 22:1515-1520.
- Pina, D.G., Oliveira, C.S., Sarmiento, A.C., Barros, M., Pires, E.V., Zhadan, G.G., Villar, E., Gavilanes, F., Shnyrov, V.L.** 2003. Thermostability of cardosin A from *Cynara cardunculus* L. *Thermochimica Acta.* 71218:1-12.
- Powers, J.C., Harley, A.D., Myers, D.V.** 1977. Subsite specificity of porcine pepsin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 95:141-157.
- Rajagopalan, K.V., Fridovich, I., Handler, P.** 1961. Competitive inhibition of enzyme activity by urea. *J. Biol. Chem.* 236:1059-1065.
- Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C., Pires, E.V.** 1996. Action on bovine alpha s1-casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochim. Biophys. Acta.* 1297:83-89.
- Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Pires, E.V., Faro, C.** 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta.* 203:204-212.
- Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Cortes, L., Samyn, B., Van Beeumen, J., Pires, E.V., Faro, C.** 1998. Identification and proteolytic processing of procardosin A. *Eur. J. Biochem.* 255:133-138.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J.** 1999. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 27:325-331.
- Robinson, D.W., Jencks, W.P.** 1965. The effect of compounds of the urea-guanidinium class on the activity coefficient of acetyltetraglycine ethylester and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 87:2462-2470.
- Rodrigo, I., Vera, P., Conejero, V.** 1989. Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37kDa aspartyl endoproteinase. *Eur. J. Biochem.* 184:663-669.
- Rodrigo, I., Vera, P., Van Loon, C., Conejero, V.** 1991. Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 95:616-622.
- Roe, S.** 1989. Separation based on structure. In Protein purification methods: a practical approach. Harris, E.L.V. & Angal, S. ed.

Sachdev, G.P., Fruton, J.S. 1969. Pyridil esters of peptides as synthetic substrates of pepsin. *Biochemistry*. 8:4231-4238.

Sadler, M.L. 1983. Métodos instrumentais para análise de soluções: Análise quantitativa. Fundação Caloust Gulbenkian, Lisboa.

Sarkkinen, P., Kalkkinen, N., Tilgmann, C., Siuro, J., Kervinen, J., Mikola, L. 1992. Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian lysosomal cathepsin D. *Planta*. 186:317-323.

Sarmento, C. 2002. A cardosina A, uma proteinase aspártica vegetal como modelo para estudos de comportamento em solventes orgânicos. Da biocatálise à química de proteínas. Tese de doutoramento. Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal.

Schechter, I., Berger, A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27:157-162.

Sielicki, A.R., Fedorov, A.A., Boodhoo, A., Andreeva, N.S., James, M.N. 1990. Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 214:143-170.

Simões, I. 1998. Caracterização molecular da acção das cardosinas A e B sobre caseínas α - e κ -bovinas. Tese de mestrado. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

Simões, I., Faro, C. 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* 271:2067-2075.

Smith, J. 1994. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins *In* Methods in Molecular Biology. Vol. 32. Basic protein and peptide protocols. Walker, J.M. ed.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.

Szecsí, P.B. 1992. The aspartic proteases. *Scand. J. Clin. Invest. Suppl.* 210:5-22. Review.

Tamer, I. 1993. Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnol. Lett.* 15:427-432.

Tanaka, T., Teo, K.S., Lamb, K.M., Harris, L.J., Yada, R.Y. 1998. Effect of replacement of the conserved Tyr 75 on the catalytic properties of porcine Pepsin A. *Protein Pept. Lett.* 5:19-26.

Tang, J., James, M., Hsu, I., Jenkins, J., Blundell, T. 1978. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature*. 271:618-621.

Tang, J., Wong, R.N. 1987. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J. Cell Biochem.* 33:53-63.

- Tang, J., Koelsch, G.** 1995. A possible function of the flaps of aspartic proteases- the capture of substrate side-chains determines the specificity of cleavage positions. *Protein Pept. Lett.* 2:257-265.
- Timmerman, F., Voudouristsoukala, M., Belitz, H.D.** 1993. Aspartic proteinases in wheat-Flour. 1. Characterization. *Z. Lebensm.Unters. Forsch.* 196:5-11.
- Tirado-Rives, J., Orozco, M., Jorgensen, W.L.** 1997. Molecular dynamics simulations of the unfolding of barnase in water and 8 M aqueous urea. *Biochemistry.* 36:7313-7329.
- Tobi, D., Elber, R., Thirumalai, D.** 2003. The dominant interaction between peptide and urea is electrostatic in nature: A molecular dynamics simulation study. *Biopolymers.* 68:359-69.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matzusaku, M., Hamada, H., Takeuchi, T.** 1970. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *J. Antibiot.* 23:259-262.
- Veerapandian, B., Cooper, J., Sali, A., Blundell, T., Rosati, R., Dominy, B., Damon, D., Hoover, D.** 1992. Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral "intermediate" of aspartic proteinases. *Protein Sci.* 1(3):322-328.
- Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C., Pires, E.V.** 1995. The vegetable rennet of *Cynara Cardunculus* L. Contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnol. Lett.* 17:621-626.
- Veríssimo, P.** 1996. Cardosina A e cardosina B: proteases aspárticas de *Cynara cardunculus* L. Purificação, caracterização e sequência parcial de aminoácidos. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.
- Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A.J., Lin, Y., Tang, J., Pires, E.V.** 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *Eur. J. Biochem.* 235:762-768.
- Wallqvist, A., Covell, D.G., Thirumalai, D.** 1998. Hydrophobic interactions in aqueous urea solutions with implication for the mechanism of protein denaturation. *J. Am. Chem. Soc.* 120:427-428.
- Whitaker, J.R.** 1994. Principles of enzymology for the food sciences. 2^d edition. Marcel Dekker (ed.).
- Wiechelman, K., Braun, R., Fitzpatrick, J.** 1988. Investigation of the bicinchocinic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175:231-237.
- Wilson, K., Walker, J.** 2000. Principle and Techniques of Practical Biochemistry. 5th Edition. University Press, Cambridge. UK.
- Yancey, P.H., Somero, G.N.** 1980. Methylamine osmoregulatory solutes of elasmobranch fishes counteract urea inhibition of enzymes. *J. Exp. Zool.* 212:205-213.

Zhang, N, Jones, B.L. 1999. Polymorphism of aspartic proteinases in resting and germinating barley seeds. *Cereal Chem.* 76:134-138.

Zoldak, G., Sut'ák, R., Antalík, M., Sprinzl, M., Sedlák, E. 2003. Role of conformational flexibility for enzymatic activity in NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 270:4887-4897.