

Fernanda Canduri

**Purificação e Caracterização da Cathepsina
D, Uma Protease Aspártica Lisossomal
de Fígado Porcino**



*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE EDUCAÇÃO
CURSO DE PEDAGOGIA
DIPLOMA
NOME DO ALUNO
Nº DE INSCRIÇÃO
DATA DE EMISSÃO
LUGAR DE EMISSÃO

1910000806





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

Fernanda Canduri

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CATEPSINA D,
UMA PROTEASE ASPÁRTICA LISOSSOMAL DE FÍGADO
PORCINO**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Física, Área de Concentração em Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.



806/98

ORIENTADOR: PROF. DR. R. K. ARNI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RICHARD J. WARD

São José do Rio Preto - SP

1998



Agradecimentos

Ao Professor Doutor R. K. Arni, pela orientação e confiança depositada em mim.

Ao Professor Doutor Richard J. Ward, pela co-orientação deste trabalho, pelo uso de seu laboratório e equipamentos.

Ao Professor Doutor Walter F. Azevedo Jr., pelo apoio e amizade durante a realização de parte deste trabalho.

A todo o corpo docente do Departamento de Física, pelos ensinamentos transmitidos e pelo ambiente harmonioso.

Aos meus colegas de pós-graduação pelo companheirismo durante todo o tempo: Adriana, Alexandre (Mac), Alexandre Guerzoni, Alexandre Teso, André, Benatti, Bernadete, Cecília, Dulcinéia, Fábio, Fátima, Flávio, Giovanni, Gláucia, Jennifer, João Ricardo, Leandra, Milton, Murilo, Norma, Ocimar, Osmar, Raquel, Renato, Sandra, Selma e Uderlei.

Meu muito obrigada, mais uma vez, aos amigos André, Fábio, Fátima, Gláucia e Raquel pela amizade, carinho, compreensão, cumplicidade e por toda a ajuda.

Às estagiárias Alessandra B. Trovó e Mariângela T. Ruiz, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Arthur e Roberto, pela harmoniosa convivência.

Aos funcionários Ilva, Paulo Salinas, Antonio Barbosa, Aparecida Mansur, Toninha e D. Zezé pela assessoria necessária à realização deste trabalho.

À Professora Doutora Roseli A. S. Gomes e ao pessoal do Departamento de Bioquímica e Biofísica da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro de Uberaba/MG, Geraldo, Livia e Isabel, pela valiosa colaboração na execução deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, por colaborar com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Eloi Feitosa do Departamento de Física, pelo uso do espectrofotômetro durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Laerte Miola do Departamneto de Química, pelo uso do espectrofluorímetro durante a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste trabalho.

Aos meus pais Antonio e Ana e aos meus irmãos Marcelo e Marco, pelo amor, compreensão, incentivo e dedicação durante todo tempo.

ÍNDICE

I. Resumo	01
II. Summary	03
III. Introdução	05
III.1. Proteases	05
III.2. Síntese de Catepsina D	07
III.2.1. Retículo Endoplasmático Rugoso	07
III.2.2. O Complexo de Golgi	08
III.2.3. Os Lisossomos	10
III.3. Catepsinas	11
III.4. Características da Catepsina D	12
III.4.1. Procatepsina D	12
III.4.2. Estrutura e composição de aminoácidos	13
III.4.3. Atividade Catalítica da Catepsina D	15
III.4.3.1. Considerações Gerais	15
III.4.3.2. O Sítio Ativo	16
III.5. Mecanismo de Ação das Proteases Aspárticas	18
IV. Objetivos	21
V. Materiais e Métodos	22
V.1. Purificação da Catepsina D	22
V.1.1. Homogeneização do Tecido	22
V.1.2. Precipitação Ácida	23
V.1.3. Cromatografia de Afinidade	23
V.1.3.1. Princípio	23
V.1.3.2. A Matriz	24
V.1.3.3. O Ligante	26
V.1.3.4. Cromatografia de Afinidade Pepstatina A- Agarose	26
V.1.3.5. Cromatografia de Afinidade Affi-Gel Blue	27
V.1.4. Cromatografia de Filtração em Gel	28
IV.1.4.1. Princípio	28
IV.1.4.2. Cromatografia de Filtração em Gel Superdex 10/75	28



V.2. Estocagem da Proteína	29
V.3. Dosagem da Proteína	29
V.4. Eletroforese	30
V.4.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	30
IV.4.1.1. Princípio	30
V.4.2. Dodecilsulfato de sódio (SDS)	31
V.4.3. Eletroforese SDS-PAGE a 12%	32
V.5. Focalização Isoelétrica	33
V.6. Determinação do Ponto Isoelétrico	34
V.7. Espectroscopia	35
V.7.1. Espectros de Absorção	35
V.7.2. Espectros nas regiões visível (Vis) e ultravioleta (UV)	36
V.7.3. Estrutura Macromolecular e Absorção	37
V.8. Determinação da Atividade Proteolítica	38
V.8.1. Determinação da Atividade Proteolítica através de Espectroscopia Óptica	38
V.8.2. Determinação da Atividade Proteolítica através de Espectroscopia de Fluorescência	40
V.9. Cristalização da Catepsina D	41
V.9.1. Princípio	41
V.10. Métodos Computacionais	43
VI. Resultados	44
VI.1. Purificação da Catepsina D	44
VI.1.1. Homogeneização do Tecido	44
VI.1.2. Precipitação Ácida	44
VI.1.3. Cromatografia de Afinidade Pepstatina A-Agarose	44
VI.1.4. Cromatografia de Afinidade Affi-Gel Blue	44
VI.1.5. Cromatografia de Filtração em Gel	45
VI.2. Caracterização da Catepsina D	46
VI.2.1. Eletroforese	46
VI.2.2. Determinação do Ponto Isoelétrico	47
VI.2.3. Dosagem da Proteína	50
VI.2.4. Atividade Proteolítica da Catepsina D	51
VI.3. Cristalização	57



VI.4. Comparação entre proteases aspárticas	58
VII. Discussão	65
VIII. Conclusões	72
IX. Referências Bibliográficas	74
<i>Curriculum Vitae</i>	84
Lista de Publicações	86
Anexos	87



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Rota de síntese e encapsulamento da catepsina D.	10
Figura 2: Representação dos elementos da estrutura secundária da catepsina D complexada com a pepstatina A.	14
Figura 3: Complexo pepstatina A-catepsina D humana.	17
Figura 4: (a) Fórmula estrutural do inibidor pepstatina A; (b) fórmula estrutural do aminoácido estatina (Sta).	18
Figura 5: Figura representativa da ligação específica entre Oδ1 e Oδ2 dos ácidos aspárticos 33 e 231 da catepsina D e a hidroxila da estatina central do inibidor pepstatina A.	18
Figura 6: Mecanismo de ação das proteases aspárticas.	20
Figura 7: Ligação do brometo de cianogênio às hidroxilas da matriz de agarose, e a reação da agarose ativada com os grupos amino livres da proteína.	25
Figura 8: Reação do 2-mercaptoetanol à região de pontes de dissulfeto da proteína.	32
Figura 9: Esquema de um gel de poliacrilamida usado para a determinação do pI.	34
Figura 10: Fórmula molecular do substrato sintético fluorescente contendo dois resíduos de aminoácidos.	40
Figura 11: Fórmula molecular do substrato sintético fluorescente contendo oito resíduos de aminoácidos.	40
Figura 12: Cromatograma obtido a partir da eluição da coluna de cromatografia de afinidade Pepstatina A-Agarose.	45
Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.	47
Figura 14: Gel de focalização isoeletrica 7,5%.	48
Figura 15: Representação de como foi feita a medida da banda do gel e como foi conseguido o valor do pI da proteína.	48
Figura 16: Gráfico dos valores de pH ao longo do gradiente do gel.	49



	Pág.
Figura 17: Curva padrão de albumina, realizado à 650 nm pelo método de Lowry et al., (1951).	50
Figura 18: Perfil de atividade da catepsina D em diferentes valores de pH (2,0 a 8,0).	51
Figura 19: Atividade catalítica da catepsina D sobre a hemoglobina na ausência e na presença de pepstatina A, a diferentes concentrações.	52
Figura 20: Cinética enzimática da catepsina D em diferentes concentrações do substrato fluorescente.	54
Figura 21: Gráfico de Michaelis-Menten obtido a partir das cinéticas mostradas na figura 20.	56
Figura 22: Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para a catepsina D de fígado porcino.	56
Figura 23: Fotografia dos cristais de catepsina D.	57
Figura 24: Alinhamento das sequências primárias das proteases aspáticas.	61
Figura 25: Sobreposições das estruturas cristalográficas da catepsina D com outros membros da família protease aspática.	64
Figura 26: Alguns substratos da catepsina D indicando locais de hidrólise da ligação peptídica.	65
Figura 27: Árvore filogenética gerada por comparação das sequências de aminoácidos deduzidas dentre as proteases aspáticas.	70
Figura 28: Representação esquemática da evolução das proteases aspáticas.	71

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Distribuição das famílias de enzimas proteolíticas	06
Tabela 2: Algumas enzimas lisossomais e seus respectivos substratos naturais.	11
Tabela 3: Sistemas biológicos em que a cromatografia de afinidade pode ser empregada.	24
Tabela 4: Procedimento usado na determinação da concentração da proteína.	30
Tabela 5: Procedimento usado na determinação da atividade proteolítica.	39
Tabela 6: Valores obtidos através da medida do gel de poliacrilamida a 7,5%.	49
Tabela 7: Dados comparativos sobre o número de posições idênticas e conservadas entre a catepsina D e outros membros.	59
Tabela 8: Valores obtidos nas sobreposições da catepsina D com as outras proteases aspárticas.	60
Tabela 9: Composição de aminoácidos da catepsina D de três espécies.	68



LISTA DE ABREVIações

EDTA: ácido etilenodinitrilotetracético

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoreto

SDS: dodecilsulfato de sódio

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

APS: persulfato de amônio

Abz: ácido benzóico

pNa: *p*-nitroanilida

Eddnp: etilenodiaminodinitrofenol

FPLC: Flow Performance Liquid Chromatography

TEMED: N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina

TCA: Ácido tricloroacético

Bisacrilamida: N, N'- metileno bis-acrilamida

PEG: polietileno glicol

TRIS: Tris(hidroximetil) aminometano



I. Resumo

Vários processos, normais e patológicos, estão associados com o aumento da atividade lisossomal. A catepsina D é uma protease aspártica envolvida na progressão do câncer de mama. Lisossomos de células tumorais possuem altos níveis de catepsina D. Ela é utilizada para o diagnóstico laboratorial da doença.

A família das proteases aspárticas compreende, dentre outras, pepsina, renina, quimosina, penicilopepsina do fungo *Penicillium janthinellum*, protease do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), catepsina D e catepsina E.

É a principal enzima dos lisossomos de células de muitos tecidos de mamíferos. Está presente no fígado, baço, rim, mucosa gástrica, placenta, cérebro e pele. Distingue-se dos outros membros da família por dois fatores característicos: é predominantemente encontrada na forma de duas cadeias polipeptídicas, uma leve de 15 kDa e outra pesada de 30 kDa, bem como a existência de duas cadeias de carboidratos ligadas aos resíduos Asn70 e Asn 198.

Os carboidratos são importantes no tráfego intracelular, já que a enzima é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, e transferida ao Complexo de Golgi (CG). Na face cis do CG, através dos resíduos de asparagina glicosilados, a enzima recebe um receptor de manose 6-fosfato, o qual é reconhecido pela enzima N-acetilglucosamino fosfotransferase, que faz o transporte até as vesículas lisossomais.

Uma característica comum entre os membros da família é a conformação estrutural do sítio ativo, onde dois resíduos de ácido aspártico (Asp33 e Asp231,



na catepsina D) são essenciais para a hidrólise do substrato. Um potente inibidor de protease aspártica é a pepstatina A.

A especificidade se faz a partir de diferenças nas alças existentes nas proximidades do sítio catalítico das proteases aspárticas. A catepsina D hidrolisa ligações peptídicas que possuam aminoácidos hidrofóbicos, principalmente Trp, Phe e Leu. Sua atividade ótima é em valores de pH variando entre 2 e 3, agindo somente no interior dos lisossomos.

A catepsina D foi extraída de fígado porcino através de cromatografia de afinidade e caracterizada através de métodos bioquímicos. A origem, a comparação estrutural e o mecanismo de ação das proteases aspárticas foram apresentados.



II. Summary

The aspartic protease family comprises, among others, pepsin, renin, chymosin, penicillopepsin (*Penicillium janthinellum*), HIV protease and cathepsin E.

Various pathological processes are associated with an increase in lysosomal activity. Tumor cell lysosomes contain high concentrations of cathepsin D. It is an aspartic protease involved in breast cancer metastases, which has been used in the diagnosis of the disease.

Cathepsin D is the leading lysosomal enzyme in liver, spleen, kidney, gastric mucous, placenta, brain and skin, and is synthesized in the rough endoplasmic reticulum. After transfer to the Golgi Complex, the protein is phosphorylated (N-linked mannose-6-phosphate) and cleaved, to form two chains, a light chain of 15 kDa and a heavy chain of 30 kDa. Phosphorylation serves as a recognition signal for N-acetylglucosamine phosphotransferase which is responsible for the transport of cathepsin D to the lysosomal vesicle. Cathepsin D hydrolyses the peptide bond on the N-terminal side of hydrophobic amino acids, principally Trp, Phe and Leu. Two aspartic acid residues (Asp33 and Asp231, in cathepsin D) are essential for the hydrolysis of the substrate and are structurally conserved in all the members of this family. The pH optimum for activity is between 2 and 3, which is the pH encountered in the endosomal medium. Pepstatin A, a peptide of 7 amino acids, with two unusual amino acids (isovaleryl (Iva) and statine (Sta)) is a naturally occurring potent aspartic protease inhibitor.



Cathepsin D has been extracted from liver porcine through affinity chromatography and characterized by biochemistry methods.

The origin, structural comparison and catalytic mechanism of aspartic protease has been presented.



III. Introdução

III.1. Proteases

As enzimas proteolíticas são importantes ferramentas na análise sequencial de proteínas e na identificação e isolamento de domínios de outros complexos protéicos multifuncionais (Walsh, 1986). Inversamente, o isolamento de proteínas nativas de tecidos biológicos requer a inativação seletiva de outras proteases por inibidores específicos. Esta medida conceitualmente simples pode ser uma tarefa trabalhosa, se a natureza, estabilidade e especificidade das proteases contaminantes não forem conhecidas.

Com o advento da biologia molecular, uma nova dimensão tem sido adicionada ao estudo de proteases, por clonagem e sequenciamento dos DNAs correspondentes. Esta informação tem contribuído significativamente para o entendimento de domínios organizacionais, funcionais e evolutivos de outras proteases reguladoras complexas.

As proteases foram classificadas baseando-se em sua função e especificidade. Um sistema mais atual está baseado na comparação dos sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional. Quatro classes de mecanismos são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica, e entre estas classes, seis famílias de proteases (Tab. 1). Cada família tem uma característica comum de resíduos de aminoácidos funcionais arranjados numa configuração específica, formando o sítio ativo. Os membros de cada família, provavelmente, são descendentes de uma proteína ancestral por evolução



divergente. Entre elas estão as serino-proteases I e II, cisteíno-proteases, proteases aspárticas e as metaloproteases I e II.

Tabela 1: Distribuição das famílias de enzimas proteolíticas.

Família	Proteases Representativas	Resíduos de aminoácidos característicos do centro ativo*
Serino-Proteases I	Quimotripsina Tripsina Trombina Elastase Calicreína pancreática	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷
Serino-Proteases II	Subtilisina	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Cisteíno-Proteases	Papaina Actinidina Catapsinas B e H	Cys ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asp ¹⁵⁸
Proteases Aspárticas	Penicilopepsina Proteases ácidas Renina Catapsina D e E	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metaloproteases I	Carboxipeptidase A bovina	Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁸
Metaloproteases II	Termolisina	Zn, Glu ¹⁴³ , His ²³¹

* O número de resíduos correspondem à sequência de aminoácidos das enzimas listadas em negrito na coluna 2.

As proteases aspárticas incluem a penicilopepsina do fungo *Penicillium janthinelum*, a pepsina, a renina, a quimosina, a gastricsina, a catepsina D e a catepsina E de mamíferos, certas proteases de fungos (*Rhizopus chineses* e *Endothia parasitica*) e a protease do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana). A característica dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo são os ácidos aspárticos 33 e 213 (numeração baseada na sequência da penicilopepsina). A

atividade enzimática ótima é em pH variando de 2 a 3, onde um ácido aspártico está ionizado, e o outro não ionizado.

A catepsina D, membro da família das proteases aspárticas, é a principal enzima dos lisossomos de células de muitos tecidos animais (Shewale et al., 1985). Está presente no fígado, baço, rim, mucosa gástrica, placenta e cérebro de mamíferos. Seu peso molecular é 45kDa, composta por duas cadeias polipeptídicas. A pepstatina A, um heptapeptídeo, é um potente inibidor desta protease aspártica (Beynon & Bond, 1989).

III.2. Síntese de Catepsina D:

III.2.1. Retículo Endoplasmático Rugoso

A catepsina D é sintetizada em polissomos associados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). O primeiro sinal para que a síntese ocorra reside em sua própria sequência inicial, e em uma partícula chamada Partícula de Reconhecimento do Sinal (PRS), que é constituída de 6 polipeptídeos com predominância de aminoácidos hidrofóbicos e uma molécula de RNA 7S.

A PRS se associa ao ribossomo e é capaz de reconhecer a sequência sinal de aminoácidos com características hidrofóbicas. Este reconhecimento implica no impedimento da alongação da cadeia, o que só é possível quando este ribossomo, junto com a PRS, interage com a membrana do retículo. A este nível existem 2 receptores para o ribossomo, chamados riboforinas I e II, e um receptor para a PRS. Este último tem a capacidade de desativar a ação inibidora da PRS para o crescimento da cadeia polipeptídica. Segue-se uma interação entre a sequência inicial hidrofóbica e componentes lipofílicos da membrana, o que vai permitir o

crescimento da cadeia em direção às cisternas do retículo. Conforme prossegue o crescimento da cadeia polipeptídica, ocorre a ação de outro componente da membrana, que fica voltado para o interior do retículo: a peptidase do sinal. Esta enzima rompe a sequência sinal e impede que a proteína ligada seja lançada no citoplasma, mas sim no interior do retículo endoplasmático (Vidal & Mello, 1987).

A proteína é transferida para o Complexo de Golgi através das vesículas de transição.

III.2.2. O Complexo de Golgi:

O Complexo de Golgi (CG) é formado por cisternas que possuem duas faces, onde a cisterna mais próxima ao RER é denominada *cis* ou face de formação (externa ou proximal), e a face oposta é denominada *trans* ou face de maturação (interna ou distal). A glicosilação da catepsina D ocorre a nível da face *cis* do Golgi. Embora seja sintetizada no ribossomo do RER, a forma final funcional exige modificações adicionais, ou seja, a adição de oligossacarídeos.

A catepsina D possui dois resíduos de asparagina (70 e 199), sendo um em cada cadeia, os quais são essenciais na glicosilação. A enzima reconhece e liga, com alta afinidade, a um determinante de proteína, comum nas hidrolases lisossomais, que fosforila especificamente a asparagina ligada aos oligossacarídeos de manose (Reitman & Kornfeld, 1981; Lang et al., 1984). Este determinante serve como ponto de reconhecimento para ligação da fosfotransferase (N-acetilglucosamino-fosfotransferase), a primeira enzima da biossíntese de resíduos de manose 6-fosfato da catepsina D, e responsável pela transferência da proteína aos lisossomos (Metcalf & Fusek, 1993), já que o ataque do fosfato à posição 6



dos resíduos de manose sobre os grupos de carboidratos da enzima é essencial para engatilhar o transporte dessas moléculas aos lisossomos (Hasilik & Neufeld, 1980). Os resíduos de manose 6-fosfato estão localizados sobre a superfície da molécula. Receptores de manose 6-fosfato estão localizados na porção *cis* do Complexo de Golgi (Metcalf & Fusek, 1993).

Sendo assim, a fosforilação envolve o reconhecimento de ambos açúcares e determinantes de proteínas pela enzima fosfotransferase (Baranski et al., 1990; 1991), que distingue enzimas lisossômicas a partir de numerosas outras glicoproteínas que passam pela porção *cis* do CG. Os receptores mediam a liberação das hidrolases para o compartimento endossomal, onde elas são descarregadas e subsequentemente empacotadas dentro dos lisossomos (Reitman & Kornfeld, 1981; Lang et al., 1984).

O CG forma vesículas lisossômicas a partir das extremidades dilatadas das cisternas da face *cis*, e acumula enzimas dentro deles. A figura 1 mostra um esquema da rota realizada pela catepsina D, desde o RER até os lisossomos (Voet & Voet, 1995).

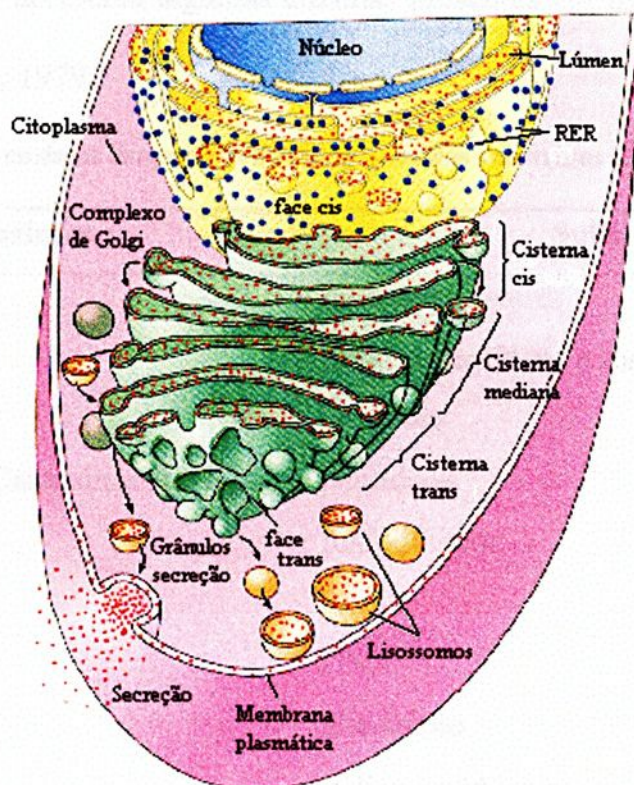


Figura 1: Rota de síntese e encapsulamento da catepsina D. Os pontos azuis representam os ribossomos e os pontos vermelhos representam as proteínas sintetizadas (Voet & Voet, 1995).

III.2.3. Os Lisossomos:

Os lisossomos são organelas revestidas por uma membrana lipoprotéica de 75 Å de espessura. Seu nome é devido às suas propriedades líticas. Possui cerca de 50 enzimas hidrolíticas e todas apresentam atividade ótima em pH ácido, sendo capazes de digerir a maioria dos substratos orgânicos naturais, tanto endógenos, quanto exógenos. A membrana possui bombas de prótons que asseguram a manutenção de um pH ácido no interior da organela. As lipoproteínas da membrana não são digeridas pelas hidrolases do próprio lisossomo, devido à sua conformação da face interna da membrana, mas uma alteração pode torná-la digerível. Conforme o tipo celular e o organismo considerado, haverá um equipamento enzimático específico no lisossomo (Vidal & Mello, 1987).

A tabela 2 apresenta algumas enzimas presentes em lisossomos (Berkaloff et al., 1978; Karp, 1979).

Tabela 2: Algumas enzimas lisossomais e seus respectivos substratos naturais.

Enzimas	Substratos
Fosfatase ácida	fosfomonoésteres
Fosfatase alcalina	oligonucleotídeos e fosfodiésteres
Catepsinas A e C	proteínas
Endopeptidases (Catepsinas B e D)	peptídeos
Fosfolipases	fosfolipídeos
RNases	RNA
DNases	DNA
α -glicosidase	glicogênio
β -glucuronidase	Polissacarídeos e glicosaminoglicanas ácidas (AGAG)

III.3. Catepsinas:

A presença de catepsina D é normalmente detectada em extratos de tecidos em condições de pH ácido, pela degradação de hemoglobina. A enzima foi estudada pela primeira vez por Anson (1939), o qual deu o nome de “catepsina”. A descoberta de muitas enzimas, agindo sobre substratos sintéticos, em preparações cruas de catepsinas (Fruton & Bergmann, 1939) levou ao reconhecimento de catepsinas A, B e C (Tallan et al., 1952), além das catepsinas E, H e L (Barret, 1977), mas ainda estava obscura a natureza da enzima que hidrolisava hemoglobina em condições de pH ácido, até que Press et al., (1960) demonstraram a independência da catepsina D, uma enzima que não age sobre substratos de baixa massa molecular como as outras catepsinas. Quantitativamente, a catepsina D é uma das maiores endopeptidases presentes em lisossomos de tecidos animais



(Barret, 1970), além da catepsina B. Juntamente com outras exopeptidases, tais como as catepsinas A, C, E, H e L, estas proteases podem coletivamente clivar muitas proteínas em pequenos peptídeos e aminoácidos (Barret, 1977).

A catepsina B, uma cisteíno-protease lisossomal envolvida na degradação de proteínas intracelulares (Barret, 1981), é sintetizada como uma proenzima N-glicosilada, como a catepsina D. É processada e ativada para uma única cadeia com 29 kDa (Nishimura & Kato, 1987), já no interior lisossomal. Este processamento é completamente bloqueado pela pepstatina, um forte inibidor de protease aspártica (Nishimura et al., 1988). Sugeriu-se então que a procatepsina B devia ser processada por uma protease aspártica, o que foi confirmado quando se realizou experimentos onde não haviam concentrações de catepsinas D e B, mas somente a proenzima. Foi observado a ausência de processamento do propeptídeo. Concluiu-se que a catepsina D é responsável pela ativação da procatepsina B no lisossomo. A biossíntese é muito similar ao da catepsina D, já que são proteases constituintes de um mesmo compartimento celular, o lisossomo.

III.4. Características da Catepsina D:

III.4.1. Procatepsina D

Como as outras proteases aspárticas, a catepsina D é sintetizada como uma proenzima, a qual é proteoliticamente convertida na forma ativa. A conversão (ou ativação) envolve a remoção da região amino terminal da proteína, de aproximadamente 42 aminoácidos, conhecida como propeptídeo (Conner & Richo, 1992). Sua clivagem ocorre em até três ligações diferentes, a qual é seguida por um reparo, realizada pela aminopeptidase, deixando-a com Val42 como resíduo N



terminal (Richo & Conner, 1994). A procatepsina D é rapidamente processada dentro da célula, tornando-se cataliticamente ativa (Hasilik & Neufeld, 1980; Erickson et al., 1981; Conner et al., 1987). Este rápido processo proteolítico intracelular torna o seu isolamento difícil, dificultando a análise da ativação e da estrutura (Conner & Richo, 1992). Grandes quantidades de procatepsina D são secretadas por tumores de mama humano (Rochefort et al., 1987).

O propeptídeo deve participar do processo de reconhecimento lisossomal independente de receptores de manose 6-fosfato (McIntyre & Erickson, 1991; Rijnbout et al., 1991a, 1991b). A forma ativa não é capaz de fazer esta ligação. Sendo assim, o propeptídeo não só bloqueia a atividade proteolítica da enzima, mas também media a sua ligação à membrana. Esta interação pode estar envolvida na liberação da proteína nas vesículas acídicas pré-lisossomais (McIntyre & Erickson, 1991).

III.4.2. Estrutura e composição de aminoácidos

A catepsina D contém três regiões distintas, as quais são típicas das proteases aspárticas: um domínio N-terminal, um domínio C-terminal, e um interdomínio composto por β -folhas antiparalelas do terminal N. Na região de ligação dos dois domínios, N-terminal e C-terminal, cada um contribui com um ácido aspártico para o estabelecimento do sítio ativo (figura 2) (Baldwin et al., 1993).



análoga (Dunaway) et al., 1972). A Phe24 é conservada nas trocas asparticas,

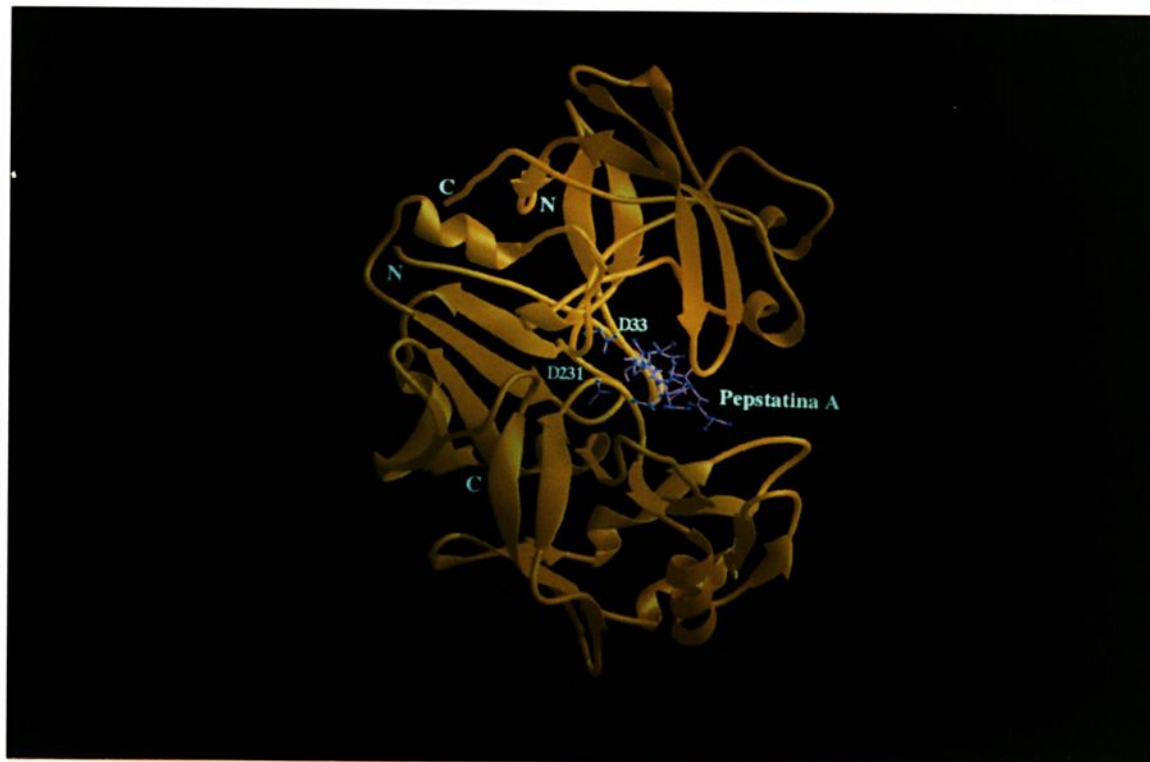


Figura 2: Representação dos elementos da estrutura secundária da catepsina D complexada com a pepstatina A, feita no programa RIBBONS 2,0, usando as coordenadas obtidas no Protein Data Bank (PDB) para a catepsina D humana. A existência de dois domínios pode ser observada, e a razão de 2N e 2C terminais é devido às duas cadeias polipeptídicas.

Muitas características estruturais distinguem a catepsina D dos outros membros da família. A clivagem e excisão de um “loop” externo entre os resíduos 98 e 106 no domínio N resulta na associação não covalente das cadeias leve e pesada (Barret, 1977). Mapas de densidade eletrônica da catepsina D mostram os carbonos α da cadeia leve (Gly1 a Gln97), e a densidade contínua da cadeia pesada se estende a partir da Gly106 para o resíduo C-terminal (Ala346) (Baldwin et al., 1993).

Existem três resíduos de prolina na sequência de aminoácidos da catepsina D. Estes resíduos estão localizados dentro de um segmento rico em prolina, e três deles consiste dos resíduos 312, 313 e 314. A renina humana possui uma estrutura

análoga (Dhanaraj et al., 1992). A Pro24 é conservada nas proteases aspárticas, exceto em penicilopepsina, a qual exibe uma deleção nesta região.

III.4.3. Atividade Catalítica da Catepsina D

III.4.3.1. Considerações Gerais

A proteólise enzimática sempre despertou a atenção de fisiologistas e bioquímicos interessados no processo de digestão protéica de organismos, uni e pluricelulares. As proteases digestivas, tanto de secreções pancreáticas, quanto gástricas, são as enzimas melhor caracterizadas, e muito do conhecimento atual sobre estruturas protéicas e funções de enzimas deriva de estudos destas proteases. Investigações cinéticas, de especificidade e inibição, juntamente com análises detalhadas da sequência de aminoácidos das proteínas e estrutura tridimensional determinada por cristalografia de difração de raios X, levam à identificação dos seus componentes e da geometria de seus sítios ativos, e assim, o mecanismo de ação destas proteases digestivas podem ser deduzidos. Têm-se dado atenção às proteases reguladoras numa grande variedade de processos fisiológicos (Fusek, 1992).

A catepsina D está envolvida também em processos patológicos como o câncer de mama. Estudos imunohistoquímicos, sobre a localização da expressão de catepsina D em tumores, mostraram que a presença de altos níveis desta enzima, especificamente em células tumorais, são maiores do que os valores normais. É considerada, portanto, um bom marcador para prognóstico (Rocheft, 1990).

Investigações sobre a relação especificidade-função da catepsina D e a comparação com outras catepsinas e outras proteases aspárticas podem dar



algumas informações sobre a função e regulação desta enzima. O estudo da catepsina D facilita também, o entendimento de processos proteolíticos no lisossomo (Imoto et al., 1987; Sly & Fisher, 1982).

III.4.3.2. O sítio ativo

O sítio catalítico da catepsina D é semelhante aos de todas as proteases aspárticas. Consiste primariamente de dois resíduos de ácido aspárticos, sendo um em cada domínio. Suas cadeias laterais estão localizadas numa cavidade central (centro catalítico) (Andreeva et al., 1984; Bott et al., 1982). Há uma molécula de água equidistante das carboxilas dos ácido aspárticos (James & Silecki, 1983; Pearl & Blundell, 1984). Esta deve ter uma nucleofilicidade aumentada no ataque ao átomo de carbono do grupo carbonil da ligação peptídica a ser hidrolisada (Pearl, 1985). Alternativamente, os grupos aspartil devem servir para polarizar a carbonila do substrato (James et al., 1985).

O substrato ligado especificamente à cavidade catalítica se estende por toda a largura da molécula da enzima e a cavidade é capaz de acomodar as cadeias laterais de oito resíduos de aminoácidos do substrato, igualmente distribuídos pelos dois lados dos aspartil catalíticos. Nenhuma ligação covalente estável no intermediário acil ou amido está presente durante a catálise (Dunn & Fink, 1984; Hofmann & Fink, 1984). Devido a razões conformacionais, nenhuma carboxila do sítio ativo pode servir diretamente como um nucleófilo na hidrólise da ligação peptídica, já que é um agente nucleofílico fraco (Tang & Wong, 1987). É provável que exista um mecanismo capaz de produzir 2 átomos tetraedrais nas posições carboxi e amido, a partir da quebra da ligação, no estado de transição. Isto é



suportado pela estrutura do estado de transição da estatina do inibidor (Marciniszyn et al., 1976; Marshall, 1976; Rich et al., 1985). Sua hidroxila, mostrada na figura 4, ocupa a posição de uma molécula de água, que interage com os dois ácidos aspárticos do sítio ativo da catepsina D (figura 5) (Baldwin *et al.*, 1993).

A figura 3 mostra a estrutura do inibidor pepstatina, realizando a interação específica com o centro ativo da catepsina D. As várias ligações de hidrogênio são importantes para estabilizar o complexo. As ligações são realizadas entre átomos da cadeia principal do inibidor e átomos da cadeia principal e lateral da enzima. (Baldwin et al., 1993).

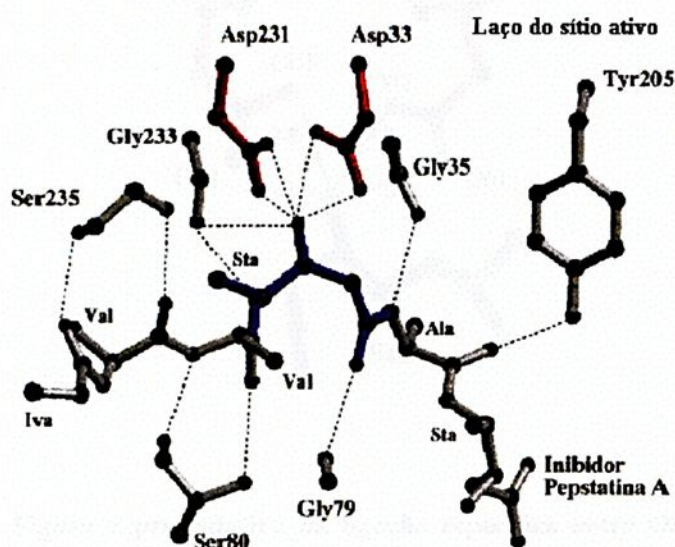
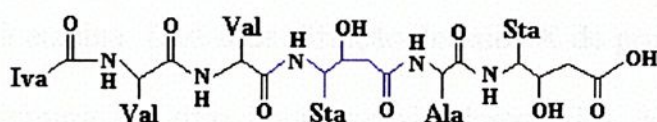


Figura 3: Complexo pepstatina A-catepsina D humana. As linhas pontilhadas mostram as ligações de hidrogênio existentes e que estabilizam o complexo (Baldwin et al., 1993). Os dois ácidos aspárticos do centro ativo da catepsina D estão em vermelho, e a estatina central da pepstatina A está em azul.

(a)



(b)

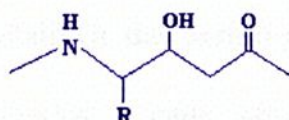


Figura 4: (a) Fórmula estrutural do inibidor pepstatina A; (b) fórmula estrutural do aminoácido estatina (Sta), no qual, sua hidroxila é chave para a ligação aos Asp33 e Asp231 da catepsina D.

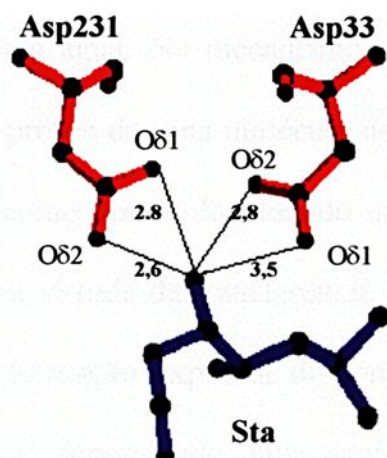


Figura 5: Figura representativa da ligação específica entre Oδ1 e Oδ2 dos ácidos aspárticos 33 e 231 da catepsina D (em vermelho) e o grupo hidroxil da estatina central do inibidor pepstatina A (em azul). As distâncias entre as ligações de hidrogênio são dadas em Å. A figura foi construída no programa RIBBONS (Carson, 1991).

III.5. Mecanismo de Ação das Proteases Aspárticas

Um dado crucial que suporta o modelo ácido-base é a dependência do pH para a atividade proteolítica. Enzimologistas sugerem que a carboxila do aspartato

funcione alternativamente como um ácido ou uma base. Este modelo requer que a carboxila de um dos aspartatos seja protonada e a outra seja desprotonada, quando o substrato se liga à enzima. Dados de difração de raios X de proteases aspárticas mostram que a estrutura do sítio ativo, na vizinhança dos dois aspartatos, é altamente simétrico (Fig. 5). Os dois aspartatos parecem agir como uma díade catalítica (análogo à tríade catalítica das serino-proteases). A díade de prótons devem ser covalentemente ligados a cada aspartato na enzima livre ou no complexo enzima-substrato (Garrett & Grisham, 1995).

O mecanismo de ação está representado na figura 6. O substrato ligado é seguido por um passo no qual dois prótons facilitam o ataque nucleofílico sobre a carbonila do substrato, pela água. No mecanismo mostrado, o Asp33 age como uma base, recebendo um próton de uma molécula de água presente no sítio ativo, enquanto o Asp231 age como um ácido, doando um próton para o oxigênio da carbonila do peptídeo. Em virtude da transferência destes dois prótons, o ataque nucleofílico ocorre sem formação explícita do íon hidróxido no sítio ativo. O intermediário resultante é denominado uma amida diidratada. O estado de protonação dos dois resíduos aspartato estão agora opostos àqueles na enzima livre (Garrett & Grisham, 1995).



A quebra da amida diidratada ocorre por um mecanismo similar à sua formação. A carboxila ionizada do Asp33 age como uma base para receber um próton a partir de uma hidroxila da amida diidratada, no qual a carboxila protonada do Asp231 simultaneamente age como um ácido para doar um próton ao átomo de nitrogênio de um dos produtos (peptídeos) (Fig. 6) (Garrett & Grisham, 1995).

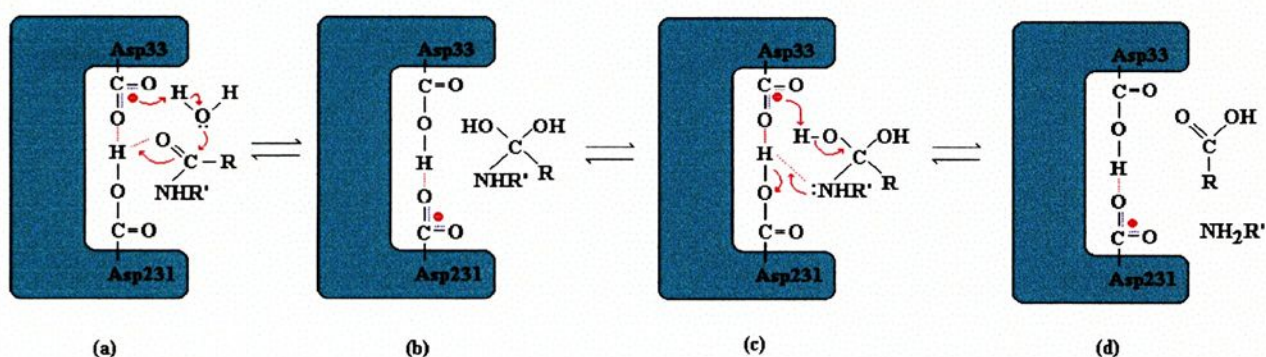


Figura 6: Mecanismo de ação das proteases aspárticas. (a) e (b) 2 prótons facilitam o ataque nucleofílico da água sobre a carbonila. (c) e (d) o Asp 33 recebe um próton a partir de uma das hidroxilas da amina diidratada, e o outro aspartato (Asp 231) doa um próton ao nitrogênio da amina hidrolisada (Garrett & Grisham, 1995).

IV. Objetivos

A obtenção de um protocolo eficiente para a purificação da catepsina D de fígado porcino, para então purificá-la, caracterizá-la e cristalizá-la.

A realização de comparações da sequência primária da catepsina D porcina com a catepsina D humana e com outras proteases aspárticas foi uma das metas, além da comparação estrutural, através de sobreposições, a fim de verificar diferenças estruturais específicas entre os membros da família das proteases aspárticas.



V. Materiais e Métodos

V. 1. Purificação da Catepsina D

O isolamento e purificação da catepsina D foram realizados segundo os métodos de Bieber et al. (1992), Barret, (1977) e Baldwin et al. (1993), utilizando fígado porcino. Cerca de 500g de fígado, inicialmente mantidos a -20°C foram descongelados e submetidos à homogeneização.

Após várias tentativas e refinamentos, o seguinte protocolo foi usado com bons resultados.

V.1.1. Homogeneização do tecido:

Esta etapa foi realizada a 4°C , na câmara fria. Foram utilizados 500ml de tampão A (50mM tampão acetato, 150mM NaCl, 5mM EDTA (inibidor de serino-proteases), 0,2mM PMSF (inibidor de metaloproteases) e 1% de TRITON X100, pH 4,6) que foi adicionado a 500g de fígado cortado em cubos. A mistura foi homogeneizada em liquidificador.

A solução foi filtrada em gaze para a separação de gorduras e debris, e centrifugada a 12.000rpm (20.000g) por 45 minutos a 4°C , na centrífuga Sorvall RC 5B Plus utilizando rotor Sorvall GSA.

O precipitado foi descartado e o sobrenadante submetido à precipitação ácida.



V.1.2. Precipitação Ácida:

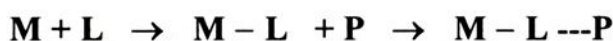
O pH do sobrenadante foi ajustado para 3,5, com ácido acético glacial e sob agitação constante, por 60 minutos, a 4°C. Após este tempo, a solução continha grande quantidade de precipitado. Foi então submetida a uma segunda centrifugação a 20.000rpm (30.000g), por 60 minutos a 4°C, desta vez utilizando o rotor SS-34.

O precipitado continha alta concentração de proteínas, principalmente hemoglobina. Este foi descartado e o sobrenadante, amarelo límpido aplicado à coluna de cromatografia de afinidade pepstatina A-agarose, após verificação do pH, que se manteve em 3,5.

V.1.3. Cromatografia de Afinidade:

V.1.3.1. Princípio:

Uma característica notável de muitas proteínas é a sua capacidade para ligar moléculas específicas. Esta propriedade pode ser usada para separar tais proteínas por cromatografia de afinidade. Nesta técnica uma molécula conhecida como ligante (L) é covalentemente ligada por uma matriz (M) inerte e porosa (Voet & Voet, 1995). É importante que o ligante imobilizado conserve sua ligação específica pela molécula da proteína (P), e que seletivamente, a desligue de maneira que a matriz continue ativa depois de eluída.



A proteína é então, obtida de forma altamente pura quando liberada da matriz cromatográfica, por mudanças das condições de eluição.

O grande avanço da cromatografia de afinidade é a sua habilidade para explorar as propriedades bioquímicas únicas da proteína, melhor do que as pequenas diferenças observadas nas propriedades físicoquímicas das mesmas, utilizadas por outros métodos cromatográficos.

Alguns sistemas biológicos os quais a cromatografia de afinidade é mais frequentemente usada, são listados na tabela 3.

Tabela 3: Sistemas biológicos em que a cromatografia de afinidade pode ser empregada.

Substâncias a serem ligadas	Componentes usados como ligantes
Enzima	Substrato análogo, inibidor, cofator
Anticorpo	Antígeno, vírus, célula
Ácido nucléico	Sequência de base complementar, histonas, ácido nucléico polimerase, proteína ligante
Célula	Proteína específica de superfície de célula, lectina

V.1.3.2. A Matriz:

A matriz deve ser quimicamente inerte, ter alta porosidade e grande número de grupos funcionais capazes de formar ligações covalentes com ligantes. Dos poucos materiais avaliados que atendem a estes critérios, a agarose, que possui numerosos grupos hidroxil livres, é o mais largamente usado. Se o ligante tem um primeiro grupo amino que não é ideal para se ligar à proteína, o ligante pode ser



covalentemente ligado à agarose, num segundo passo do processo em que ele reage com brometo de cianogênio, formando um estado ativado (figura 7). Mas muitas proteínas são incapazes de ligar o brometo de cianogênio, devido à interferência estéril com a matriz de agarose. Este problema é solucionado pelo ataque de um grupo espacial flexível ao ligante (Voet & Voet, 1995).

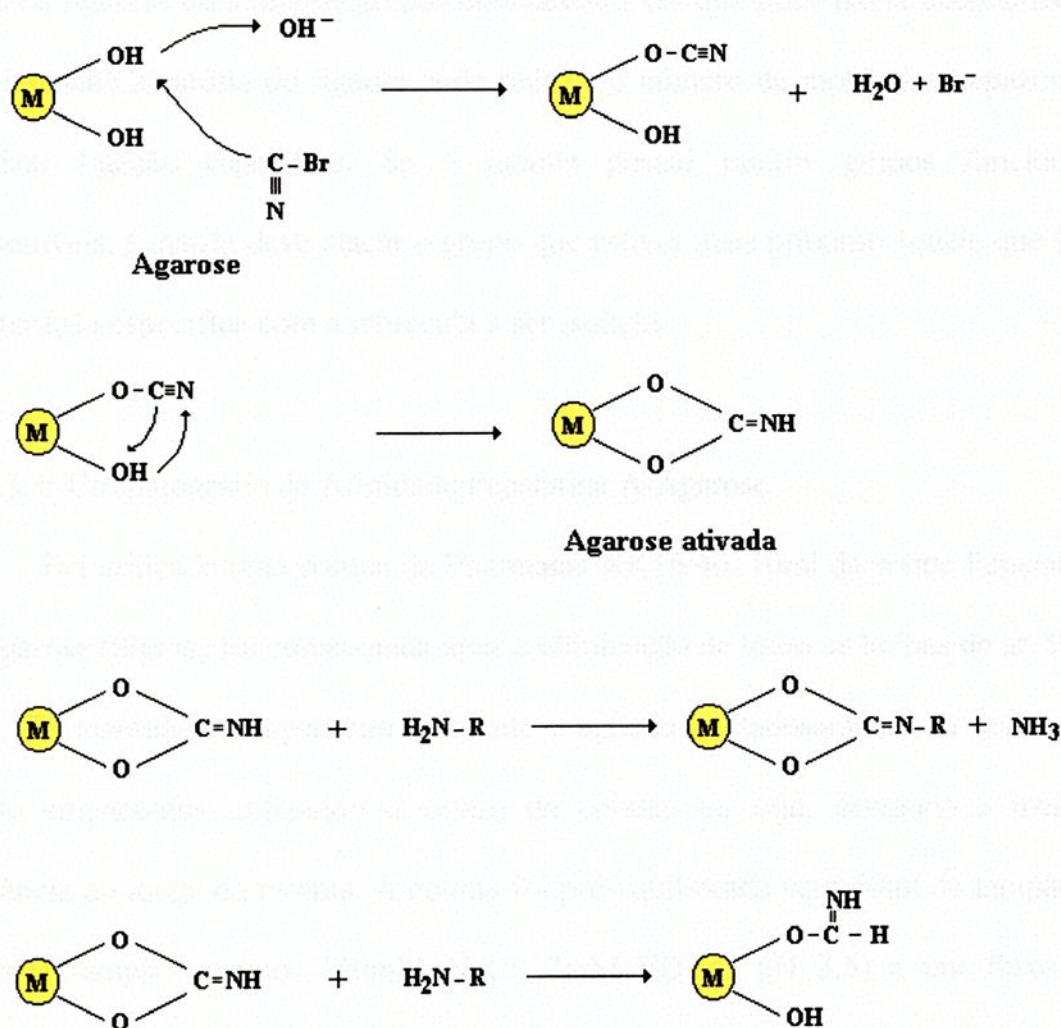


Figura 7: Ligação do brometo de cianogênio aos grupos hidroxil da matriz de agarose (M), e a reação da agarose ativada com os grupos amino livres da proteína.

V.1.3.3. O Ligante:

A seleção de um ligante é influenciado por dois fatores. Primeiro, ele deve exibir uma ligação específica e reversível pela proteína a ser purificada. Segundo, deve ter grupos quimicamente modificados, os quais permitem serem atacados pela matriz sem destruir a sua capacidade de ligação.

É importante considerar a região do ligante a ser atacado pela matriz. No caso de ligantes com muitos grupos equivalentes em que pode haver acoplamento, a orientação aleatória do ligante pode reduzir o número de moléculas capazes de realizar ligação específica. Se o ligante possui muitos grupos funcionais disponíveis, a matriz deve atacar o grupo que estiver mais próximo àquele que fará a interação específica com a molécula a ser isolada.

V.1.3.4. Cromatografia de Afinidade Pepstatina A-Agarose

Foi utilizado uma coluna da Pharmacia XK16/40. 10ml da resina Pepstatina A-agarose (Sigma) foi empacotada após a eliminação de todas as bolhas de ar. Para isto, foi mantida à temperatura ambiente e agitada cuidadosamente. A resina foi então empacotada utilizando o centro da coluna, ou seja, deixando a mesma distância ao longo da mesma. A coluna foi pré-equilibrada com 50ml de tampão B (50mM tampão acetato, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH 3,5) a um fluxo de 0,5ml/min., em bomba peristáltica (Pharmacia).

Um volume de 300ml da solução contendo a enzima foi aplicada à coluna a um fluxo de 0,2ml/min., a 4°C. A solução eluente não deve conter catepsina D, já que esta se complexou ao seu inibidor específico ligado à resina. Depois que toda amostra passou pela coluna, esta foi lavada com cerca de 100ml de tampão B,



mantendo um fluxo de 0,2ml/min. em bomba peristáltica, a 4°C. Este passo garante a eliminação de proteínas que possam estar ligadas à resina, mesmo que inespecificamente.

Tornamos a lavá-la com tampão C (50mM Acetato, 300mM NaCl, 2mM EDTA, pH 3,5). Este passo foi monitorado pelo FPLC, a um fluxo de 1ml/min., a 280nm e Abs 1,0. A linha de base foi estabelecida. Este parâmetro nos permite saber se a coluna possui ainda algum contaminante. O tampão C, por ter o dobro da concentração de sal (300mM), permite que contaminantes sejam eliminados devido à maior concentração de íons no meio.

A fase seguinte foi a eluição da coluna. Foi usado tampão D (50mM tampão Tris, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8,5) que, por ter pH alcalino, faz com que a proteína se desligue do seu inibidor específico presente na resina. Sendo a enzima acídica, em meio com baixa concentração de prótons, há repulsão de cargas.

A proteína foi obtida após 10 minutos de fluxo reverso (1ml/min.) de tampão D, e o pico de absorção obtido à uma Abs 1,0.

V.1.3.5. Cromatografia de Afinidade Affi-Gel Blue:

Foi realizada uma cromatografia de afinidade utilizando a resina Affi-Gel Blue (Bio Rad). Esta resina é específica para albumina. Devido à fonte de catepsina D ser um órgão muito complexo, foi considerado que, provavelmente, haveria albumina na amostra eluente. Utilizou-se 30ml de amostra de catepsina D (toda a amostra eluída da coluna de afinidade pepstatina A-agarose), num fluxo de 25ml/minuto, Abs 0,5 e velocidade do registrador de 0,2mm/minuto. Foi utilizada uma coluna de 1x11cm (8ml) da Pharmacia. Esta foi montada utilizando-se 4ml de



resina e equilibrada com 50ml de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 (nas mesmas condições citadas acima).

A coluna foi limpa utilizando-se 20ml de uma solução de uréia 6M para retirar a albumina.

V.1.4. Cromatografia de Filtração em Gel

V.1.4.1. Princípio:

Em cromatografia de filtração em gel, a qual é também chamada cromatografia de exclusão por tamanho ou peneiramento molecular, as moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho ou forma. A fase estacionária desta técnica consiste matriz de material hidratado e esponjoso contendo poros que se emparelham em espaços relativamente estreitos de dimensões moleculares. Se uma solução aquosa contendo moléculas de vários tamanhos é passada através desta coluna, moléculas maiores deverão passar através dos poros maiores ou serem excluídas com o volume do solvente que percola a matriz do gel. Estas moléculas maiores, entretanto, atravessam a coluna mais rapidamente do que moléculas que passarão pelos poros. Ou seja, moléculas menores são retidas pela matriz e eluídas mais tardiamente (Voet & Voet, 1995).

V.1.4.2. Cromatografia de Filtração em Gel

Além das etapas anteriores de purificação, foi realizada uma etapa de filtração em gel usando resina Superdex 10/75 (Pharmacia), a qual nos permite a separação por diferença de peso molecular, de possíveis contaminantes de nossa amostra de catepsina D. O experimento foi feito a um fluxo de 1ml/minuto e Abs



0,02 a 280nm, usando-se 0,5ml de amostra de catepsina D a 0,7mg/ml, realizado pelo FPLC (Pharmacia).

V.2. Estocagem da Proteína

A amostra de catepsina D foi estocada a -20°C em tampão 50mM citrato de sódio pH 5,5.

V.3. Dosagem de Proteína

A determinação da concentração de catepsina D foi feita pelo método de Lowry et al., (1951).

Para a realização do experimento foram usados 200 µl da amostra de proteína e 2 ml de solução de trabalho (Na_2CO_3 a 2% em NaOH 1,5M, tartarato de sódio e potássio a 2% e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,64%). A mistura foi agitada e mantida em repouso por 10 minutos, a 25°C. Após este tempo, foram adicionados 400 µl de reativo de Folin-Ciocalteau diluído em água destilada na proporção de 1:2. A mistura foi agitada cuidadosamente e mantida em repouso por mais 15 minutos, a 25°C. A seguir, fez-se a leitura da absorbância a 650 nm em Espectrofotômetro U-2001 (Hitachi), utilizando uma curva padrão de albumina bovina obtida nas mesmas condições do ensaio. Para cada medida foi feita um controle (branco) (Tab.4).



Tabela 4: Procedimento usado na determinação da concentração da proteína.

	Amostra	Padrão	Branco
Amostra	200 µl	-	-
Solução salina	-	-	200 µl
Padrões	-	200 µl	-
Solução de trabalho	2 ml	2 ml	2 ml
Reagente de Folin	400 µl	400 µl	400 µl

Para a confecção da curva padrão foi usado um estoque de albumina bovina 1 mg/ml. Fizemos 5 diluições com solução salina 0,1 M, de maneira que no final do experimento, obteve-se 3,84, 7,69, 15,3, 23,0 e 38,4 µg/ml de proteína.

V.4. Eletroforese:

V.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE):

V.4.1.1. Princípio:

A maioria dos polímeros de interesse biológico são carregados. As proteínas são polianfóteros, possuem cargas positivas e negativas.

Esse caráter polieletrólito tem influência considerável sobre o comportamento das proteínas em solução. O fato de moléculas poderem, algumas vezes diferir quanto à carga, tem sido largamente empregado em métodos baseados na carga da proteína. A distribuição de cargas numa molécula pode ser assimétrica, tendo sido utilizada para orientar macromoléculas em campos elétricos, que

oferecem um certo grau de orientação. Sendo assim, se a molécula possuir uma carga líquida, migrará no campo (Van Holde, 1971).

V.4.2. Dodecil sulfato de sódio (SDS):

SDS é um detergente muito usado em preparações bioquímicas. Depois de desnaturada (por aquecimento), a proteína se liga completamente ao SDS (em média, uma molécula de SDS para cada dois aminoácidos), evitando que ela volte a se renaturar. Ele confere um grande número de cargas negativas à proteína.

São moléculas anfipáticas que atuam como fortes agentes desnaturantes de proteínas, por perturbar a sua estrutura. Podem se associar a um resíduo não-polar de uma proteína, interferindo nas interações hidrofóbicas responsáveis pela estrutura nativa da molécula.

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS separa proteínas em ordem de sua massa molecular, devido ao efeito de filtração em gel: moléculas menores migram mais e as maiores, migram menos.

A massa molecular das proteínas é determinada com uma precisão de 5-10%, através de SDS-PAGE. A mobilidade relativa de proteínas sobre tais géis varia linearmente com o logaritmo de sua massa molecular. Esta é determinada, eletroforeticamente, junto com proteínas denominadas marcadores, as quais possuem massa molecular conhecida. Dessa maneira, é possível se chegar ao valor correspondente à massa molecular da proteína de interesse (Van Holde, 1971).

O tratamento de proteínas com mais de uma cadeia polipeptídica com SDS desfaz as interações não-covalentes entre estas subunidades, e assim, um gel SDS-PAGE revela a massa molecular das subunidades, e não da proteína intacta, a



menos que estas subunidades sejam ligadas por pontes de dissulfeto. Neste caso, será necessário o uso de outro agente desnaturante: o 2-mercaptoetanol, que é usualmente adicionado ao gel SDS-PAGE, o qual faz a redução destas ligações (figura 8), já que o SDS não é capaz de fazê-lo (Voet & Voet, 1995).

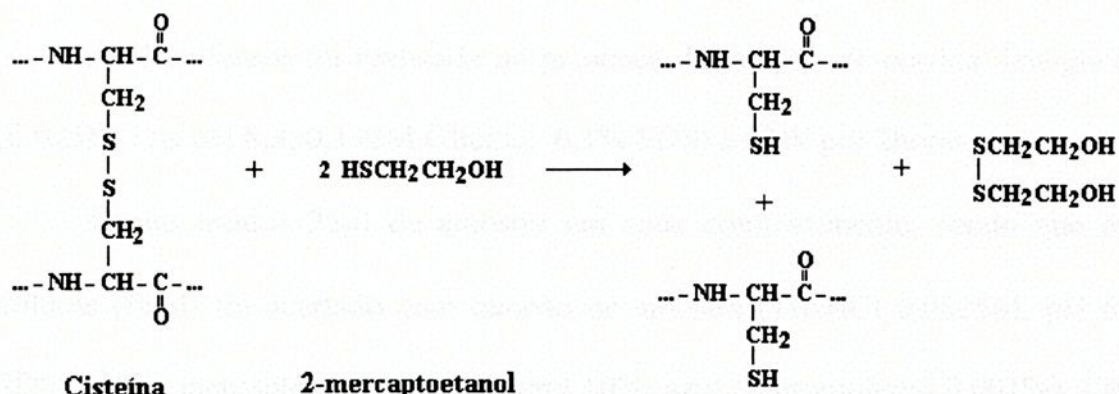


Figura 8: Reação do 2-mercaptoetanol à região de pontes de dissulfeto da proteína.

V.4.3. Eletroforese SDS-PAGE a 12%

O gel foi feito segundo o método de Laemmli (1970). Foi usado o kit para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida da Bio Rad.

Usamos as seguintes concentrações dos géis:

Gel de Corrida: Bisacrilamida 12%

Tampão do gel de corrida (Tris-HCl 0,375M, pH 8,8; SDS 0,1%)

APS 0,05%

TEMED 0,464M

Gel de Empilhamento: Bisacrilamida 10%

Tampão do gel de estacamento (Tris-HCl 0,303M, pH6,8;

SDS 0,1%)

APS 0,2%

TEMED 0,162M

A eletroforese foi realizada na presença de tampão de corrida Tris-glicina (0,025M Tris pH 8,3; 0,192M Glicina; 0,1% SDS) a 60W por 2 horas.

Foram usados 25 μ l de amostra em cada compartimento, sendo que este volume (final) foi acertado com tampão de amostra (TrisHCl 0,0625M, pH 6,8; SDS 2-10%; mercaptoetanol 5%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,001%). Estas foram aquecidas a 90°C por 10 minutos.

Para visualização das bandas do gel foi usado a coloração por nitrato de prata.

V.5. Focalização Isoelétrica

A focalização isoeletrica não desnaturante foi realizada segundo o método de Righetti et al. (1990).

Para a confecção do gel foram utilizados 7,5% de Bisacrilamida e 1,6% de anfólito pH3,0 – 10,0 (Sigma).

As bandas do gel foram visualizadas após coloração por nitrato de prata.

A corrida durou 3 horas à 170V, à 4°C. Foram feitas duplicatas.



V.6. Determinação do Ponto Isoelétrico

O método usado para a determinação do pI está descrito a seguir (Smarra, 1997):

Foram utilizados para a aplicação das amostras, apenas a metade das canaletas do gel. 50% do gel foi usado para a determinação do ponto isoelétrico, através da leitura do pH ao longo do gel. Foi usado o mesmo anfólito citado acima (pH variando de 3,0 a 10,0) (Pharmalyte – Sigma). O gel foi seccionado em tiras intercaladas de $\sim 1,0 \times 2,0$ cm (Fig. 9), de modo que o pH do gel pôde ser determinado a cada 0,5 cm. As tiras foram colocadas em tubos contendo 2 ml de água Milli Q, para a extração dos anfólitos do gel, e após 3 horas de descanso foi feita a leitura do pH das soluções, em medidor de pH Tec-2 (Tecnal).

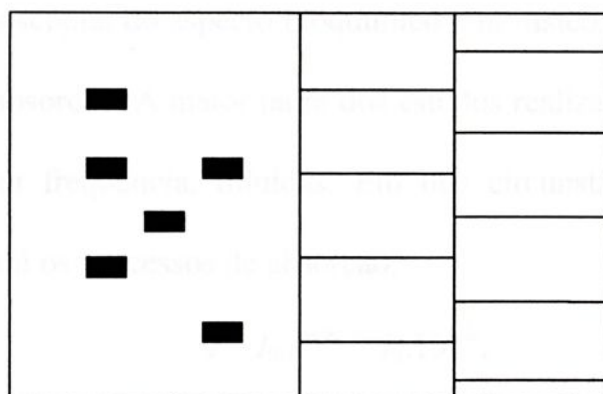


Figura 9: Esquema de um gel de poliacrilamida usado para a determinação do pI. O gel é dividido ao meio. A parte esquerda representa o lado onde as amostras foram aplicadas e o direito representa o lado em que foi usado para a leitura do pH. Este lado é recortado de maneira que permita a leitura de pedaços intercalados, como mostrado no modelo.

O pI da catepsina D foi determinado pela distância da banda obtida e plotada em um gráfico, em que o eixo Y representa o ponto isoelétrico, e o eixo X representa as medidas do gel (a cada 0,5 cm).

V.7. Espectrofotometria

V.7.1. Espectros de Absorção

Os processos de absorção exigem alguns conceitos de mecânica quântica. Basicamente, há duas maneiras pelas quais isso difere do quadro clássico:

a) A exigência segundo a qual a energia disponível para a absorção deve se relacionar com a frequência da radiação (ν) pela lei de Planck:

$$E = h \cdot \nu$$

onde E é a energia e h a constante de Planck. Não há equivalente para isso na física clássica; impõe à radiação um aspecto corpuscular.

b) O reconhecimento do fato segundo o qual os átomos e moléculas só podem existir a determinados níveis de energia (Van Holde, 1971).

A espectroscopia, do aspecto bioquímico e biofísico, significa a observação de espectros de absorção. A maior parte dos estudos realiza-se em soluções, sendo essas, com muita frequência, diluídas. Em tais circunstâncias, a lei de Beer-Lambert governará os processos de absorção,

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot l \cdot c} = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l c},$$

onde I_0 é a intensidade da radiação incidente e I a intensidade da radiação transmitida através de uma célula de 1 cm de espessura, contendo uma solução de concentração c moles/litro. A quantidade ϵ é o coeficiente de extinção, em unidades de litro por mol por centímetro, especificado para uma espécie química e comprimento de onda (λ). Frequentemente, os dados são apresentados em transmissão percentual ($I / I_0 \times 100$), ou em absorbância [$A = \log (I_0 / I)$]. Esta última é particularmente conveniente, pois $A = \epsilon \cdot l \cdot c$.



Algumas vezes o coeficiente de extinção é dado em outras unidades, como por exemplo,

$$A = E_{1\text{ cm}}^{\%} l.C,$$

onde a concentração C é dado em gramas por 100 ml de solução. Esse caso é útil quando a massa molecular do soluto é desconhecida (Van Holde, 1971).

A medição dos espectros de absorção exige o uso de luz monocromática de comprimento de onda (λ) conhecido e que possa se medir o decréscimo em intensidade que ocorre quando a luz passa através de uma espessura conhecida de solução. Geralmente as medições são feitas por meios eletrônicos, utilizando fotocélulas ou tubos fotomultiplicadores. Um espectrofotômetro consiste de uma fonte que produz uma larga faixa de radiação; o comprimento de onda necessário é selecionado por um prisma ou selecionador monocromático de grade. O feixe se parte e as duas partes atravessam, respectivamente, a célula de amostra e a célula de referência contendo apenas solvente. As intensidades são medidas por tubos fotomultiplicadores e a diferença entre os logaritmos das intensidades da amostra e da referência é registrada. Em muitos desses instrumentos, a escala de comprimento de onda é explorada automaticamente, sendo A registrada como uma função de λ num registrador sincronizado (Van Holde, 1971).

V.7.2. Espectros nas regiões visível (VIS) e ultravioleta (UV)

As transmissões na região visível do espectro são transições eletrônicas de energia relativamente baixa. Há dois tipos principais de estruturas biológicas que têm níveis de energia com espaçamentos nessa faixa: (1) compostos contendo



certos íons metálicos e (2) grandes estruturas aromáticas. O primeiro tipo inclui algumas metaloproteínas e o segundo, estruturas conjugadas, tais como a vitamina A. As hemoproteínas devem a maior parte de sua intensa absorção na região visível mais aos grupos hêmicos conjugados ao íon metálico.

Na região do espectro próxima ao UV (200 a 400 nm), muitos compostos biológicos exibem faixas de absorção fortes e úteis. Elas frequentemente, estão associadas a pequenos sistemas conjugados aneliformes, tanto aromáticos quanto heterocíclicos, enquanto os grandes sistemas conjugados absorvem na região visível. Portanto, os aminoácidos, tirosina, fenilalanina e triptofano absorvem mais intensamente nessa região. A maior parte da absorção de proteínas na região de 280 nm resulta da presença desses resíduos (Van Holde, 1971).

V.7.3. Estrutura macromolecular e absorção

Quando uma estrutura secundária definida é estabelecida numa macromolécula, certas mudanças são comumente observadas no espectro. Sendo assim, há distinção entre as macromoléculas e seus monômeros. Em muitos casos, têm sido usadas como ferramentas de diagnóstico para detectar e acompanhar as alterações configuracionais.

Quando uma proteína é hidrolisada em seus aminoácidos constituintes, o espectro dos produtos é diferente do espectro da proteína intacta. Alterações semelhantes são observadas quando a proteína é desnaturada. Isto sugere que o ambiente dos resíduos absorventes deve ser diferente na molécula de proteína nativa, em relação aos aminoácidos em contato livre com o solvente (Van Holde, 1971).



V.8. Determinação da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica da catepsina D de fígado porcino foi realizado através de métodos de espectroscopia óptica e de fluorescência, usando dois substratos distintos. Os ensaios enzimáticos foram realizados usando-se como substrato, respectivamente, a hemoglobina bovina desnaturada (gentilmente cedida pela Profa. Dra. Roseli A. S. Gomes da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro - Uberaba/MG), devido à afinidade da catepsina D por aminoácidos hidrofóbicos, localizados geralmente no interior da proteína nativa, e dois peptídeos sintéticos que possuem um componente fluorogênico, o ácido benzóico, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luis Juliano da Escola Paulista de Medicina e pela Profa. Dra. Roseli A. S. Gomes).

V.8.1. Determinação da Atividade Proteolítica através de Espectroscopia Óptica:

A atividade da catepsina D foi determinada segundo o método de Anson, (1937), para verificação da faixa de pH ótimo da catepsina D e para observação do comportamento da catepsina D na presença de concentrações crescentes de inibidor pepstatina A.

Primeiramente, realizou-se o experimento numa ampla faixa de valores de pH (2,0 – 8,0), considerando intervalos de 0,5. Para isso, foram utilizados 3 soluções tampões distintas: Glicina-HCl 0,2 M (pH 2,0); Citrato-Fosfato de sódio dibásico 0,2 M (pH 2,5 – 7,0); Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5 – 8,0).

Em cada tubo eppendorf, foram adicionados, a 250 µl de tampão, 250 µl (3,33%) de hemoglobina bovina a 8% (diluída em água destilada) e 100 µl (7,5



$\mu\text{g/ml}$) de catepsina D ($45\mu\text{g/ml}$) (Tab.5). Cada mistura foi agitada cuidadosamente e incubada a 37°C , por 30 minutos. Ao final da incubação, foi acrescentado 1 ml de TCA a 3% a cada tubo, e submetido a um agitador tipo vortex. Os tubos foram mantidos a -20°C por 5 minutos e centrifugados a 10000 rpm ($16000g$) por 5 minutos, a 25°C .

Foram usados 500 μl do sobrenadante, o que foi transferido para um tubo de ensaio e adicionado 1 ml de NaOH 0,5 M para neutralizar a solução e 200 μl do reativo de Folin-Ciocalteau diluído 1:2 em água destilada. A solução foi cuidadosamente agitada e mantida em repouso por 15 minutos a 25°C . Fêz-se a leitura das absorbâncias a 650 nm em Espectrofotômetro U-2001 (Hitachi).

O mesmo experimento foi realizado fixando-se o valor do pH com tampão formiato de sódio 0,1 M, pH3,0, na presença e ausência do inibidor pepstatina A ($50\mu\text{g/ml}$). Foram utilizados as concentrações de 2,0, 3,84, 7,14 e $9,45\mu\text{g/ml}$ de pepstatina A e $6,42\mu\text{g/ml}$ de catepsina D ($45\mu\text{g/ml}$) para um volume final de 600 μl da mistura de reação.

Tabela 5: Procedimento usado na determinação da atividade proteolítica.

	Amostra	Branco
Tampão	250 μl	250 μl + 100 μl
Hemoglobina bovina	250 μl	250 μl
Amostra de proteína	100 μl	-

V.8.2. Determinação da atividade proteolítica através de Espectroscopia de Fluorescência:

Um dos substratos usados contém uma molécula de ácido benzóico numa extremidade e do lado oposto a *p*-nitroanilida (*p*Na), um supressor de fluorescência. Entre eles, há somente dois aminoácidos, uma fenilalanina (Phe) e uma arginina (Arg) (Fig. 10).

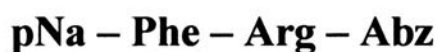


Figura 10: Fórmula molecular do substrato sintético fluorescente.

O outro substrato sintético usado também possui uma molécula de ácido benzóico em uma das extremidades. Na outra extremidade possui uma molécula de Eddnp. O Eddnp é um supressor do ácido benzóico, apagando por ressonância, a sua fluorescência natural através de um mecanismo de colisão intramolecular (Yaron et al., 1979). Contém 8 resíduos de aminoácidos e, entre eles, duas fenilalaninas consecutivas (aminoácido de característica hidrofóbica) (Fig. 11).



Figura 11: Fórmula molecular do substrato sintético com o componente fluorogênico e duas fenilalaninas (Phe) consecutivas.

Portanto, os substratos por si só não emitem fluorescência, mas somente quando da ação da protease sobre a ligação peptídica. A hidrólise faz com que o grupo fluorogênico fique livre do Eddnp.

O aparelho usado no experimento foi o Espectrofotômetro de Fluorescência F-4500 Hitachi. O comprimento de onda de emissão usado foi 420 nm e o comprimento de onda de excitação, 320 nm. Foi usado um estoque de substrato a 1mg/ml e um estoque de catepsina D a 1 μ M. As concentrações de substrato utilizadas nos ensaios foram 0,61; 1,02; 2,04; 4,08; 6,12; 8,16; 10,2; 12,2; 16,32; 20,4; 24,48 e 28,56 μ M e de enzima foi 10 nM para um volume final de 2 ml de tampão citrato de sódio 50mM, pH 3,0.

Os ensaios foram feitos em duplicatas.

V.9. Cristalização da catepsina D

V.9.1. Princípio:

Para a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína por técnicas de difração de raios X, é imprescindível a obtenção de monocristais de tamanho apropriado para a coleta de dados.

Como o número de variáveis envolvidas no processo de cristalização é grande, como concentração de sal, temperatura, pH, agentes precipitantes e aditivos, encontrar as condições ideais de cristalização de uma proteína pode levar dias, meses ou até anos (Blundell & Johnson, 1976).

Para cristalizar uma proteína em um determinado solvente, é necessário levá-la lentamente a um estado de supersaturação. Neste estado, a solução de proteína alcança a zona de nucleação, onde se formam os núcleos (primeiros agregados ordenados de proteína). Com a diminuição da solubilidade da proteína,



estes núcleos atingem a zona metaestável, onde ocorrerá o crescimento do cristal (Ducruix & Giegé, 1992).

Foi proposto por Carter & Carter, (1979) um conjunto de soluções denominadas Fatorial, nas quais se considera a interação entre diferentes variáveis, derivadas de condições conhecidas de cristalização de diversas proteínas.

Há quatro métodos que são utilizados para a cristalização de proteínas:

1. Diálise; 2. Interface de Difusão Livre; 3. “Batch” e 4. Difusão de Vapor. Este último método é dividido em três sistemas distintos: “hanging drop”, “sitting drop” e “sandwich drop”.

O método utilizado neste trabalho foi o Difusão de Vapor, sistema “hanging drop”. Este método consiste de uma pequena gota da amostra de proteína (1 μ l) misturada com solução de cristalização (1 μ l), suspensa em uma lamínula siliconizada que é colocada em equilíbrio de vapor com um grande reservatório (1ml) com solução de cristalização. Mudanças de vapor ocorrem entre o reservatório e a gota, até que o equilíbrio entre as soluções seja alcançado (Blundell & Johnson, 1976). Os reservatórios são distribuídos em placas de cristalização e vedados com graxa e lamínulas.

A difusão de vapor entre o reservatório e a gota ocorre devido à diferença de concentração, já que na gota acrescenta-se uma proporção de 1:1 de amostra de proteína e solução de cristalização. Estas trocas ocorrem até que o equilíbrio seja alcançado, podendo ou não ter a formação de cristais.



Uma amostra de catepsina D 12 mg/ml, obtida a partir das etapas de purificação (cromatografias de afinidade e filtração em gel), foi submetida a 53 soluções precipitantes para cristalização (Anexo I) (Jancarik & Kim, 1991).

V.10. Métodos Computacionais

A comparação das estruturas cristalográficas foi feita no programa computacional WHATIF 4.9 (Vriend, 1990), sendo as coordenadas das proteínas obtidas no Protein Data Bank (PDB - Brookhaven National Laboratory) (Bernstein et al., 1977). Este banco de dados contém as coordenadas da catepsina D humana, da renina humana, quimosina bovina, pepsina humana, penicilopepsina (*Penicillium janthinellum*) e protease do HIV, as quais foram usadas para o estudo comparativo.

Foi usado o programa RIBBONS 2.0 (Carson, 1991) para a montagem da estrutura cristalográfica da catepsina D humana, e os alinhamentos das sequências primárias foram feitas no ClustalW Multiple Sequence Aligment do SWISSPROT (Protein Sequence Database).



VI. Resultados

VI.1. Purificação da Catepsina D

VI.1.1. Homogeneização do tecido:

O uso de 500g de fígado porcino resultou em 850ml de tecido homogeneizado e filtrado. Após a primeira centrifugação a 20000g por 45 minutos, foram obtidos 500ml de sobrenadante, o qual foi submetido a precipitação ácida.

VI.1.2. Precipitação Ácida:

A solução a ser submetida a precipitação ácida inicialmente tinha aspecto líquido e cor vermelha. A precipitação utilizando ácido acético para abaixar o pH e precipitar outras proteínas, resultou em uma solução densa e de cor marrom. Isto nos sugere a grande concentração de hemoglobina que fazia parte da solução e que foi eliminada nesta etapa da extração, devido à segunda centrifugação a 30.000g por 60 minutos. Após esta centrifugação, 320ml de solução de aspecto límpido e de cor amarela escura, foram obtidos.

VI.1.3. Cromatografia de Afinidade Pepstatina A-Agarose:

A cromatografia de afinidade nos rendeu bons resultados. Pela eluição da coluna, acompanhada pelo cromatograma obtido, foi possível observar o pico de absorção da catepsina D (figura 12).

VI.1.4. Cromatografia de Afinidade Affi-Gel Blue:

Este passo de nossa purificação foi bastante interessante. Foi realmente detectada a presença de albumina na amostra. A catepsina D foi eluída logo após a



sua aplicação, à 280 nm e Abs 0,5, e o restante (contaminantes - albumina) foi eluído 2 minutos após o início da aplicação de uréia 6M, à Abs 0,1.

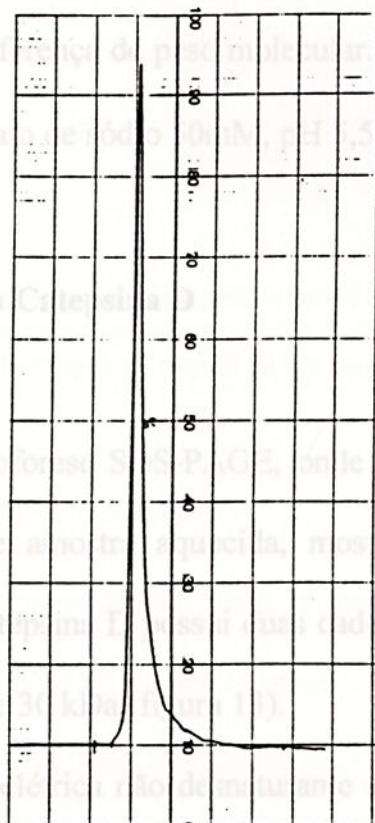


Figura 12: Cromatograma obtido a partir da eluição da coluna de cromatografia de afinidade Pepstatina A-Agarose. Absorbância: 1,0; Fluxo: 1ml/minuto; 0,5mm/minuto. Pico de absorção da catepsina D.

VI.1.5. Cromatografia de Filtração em Gel

Uma dificuldade encontrada no decorrer do trabalho foi o modo de estocagem da catepsina D, já que ela é autocatalítica. Uma maneira encontrada para solucionar tal problema foi mantê-la em tampão citrato de sódio 50mM, pH 5,5, a -20°C. Neste valor de pH a catepsina D ainda tem atividade catalítica, mas esta é muito baixa.

Uma outra maneira encontrada para solucionar o problema de proteínas já estocadas, foi a realização de uma filtração em gel. Esta etapa foi interessante,

pois foi possível recuperar as amostras de catepsina D que já continham produtos da degradação, os quais estavam agindo como contaminantes.

Nesta etapa separou-se a alíquota de proteína íntegra da proteína degradada, a partir da diferença de peso molecular. A amostra de catepsina D foi estocada em tampão citrato de sódio 50mM, pH 5,5, a -20°C.

VI.2. Caracterização da Catepsina D

VI.2.1. Eletroforese

Pelo gel de eletroforese SDS-PAGE, onde foi usado mercaptoetanol para desnaturar a proteína e amostra aquecida, mostram duas bandas da proteína desnaturada, já que a catepsina D possui duas cadeias polipeptídicas, uma leve de 15 kDa e outra pesada de 30 kDa (figura 13).

A focalização isoeletrica não desnaturante separou as proteínas a partir de seu ponto isoeletrico (figura 14). Pode-se verificar a existência de apenas uma banda, o que mostrou a pureza da enzima.

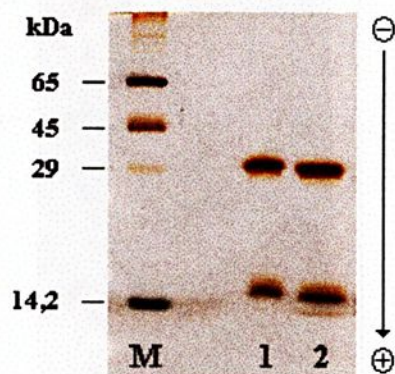


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% com β -mercaptoetanol corado com nitrato de prata. M: marcador; 1 e 2- catepsina D após os passos de purificação.

VI.2.2. Determinação do ponto isoelétrico

O experimento foi realizado para a confirmação do valor do ponto isoelétrico (pI) da catepsina D de fígado porcino. A tabela 6 mostra os valores de pH a cada 0,5 cm do gel (obtidos através do gradiente de pH, que variou de 3,0 a 10,0).

Para a obtenção do valor do pI da catepsina D fez-se a medida da distância da banda de proteína no gel. A figura 15 mostra como esta medida foi feita. A figura 16 mostra o gráfico obtido a partir da tabela 6.

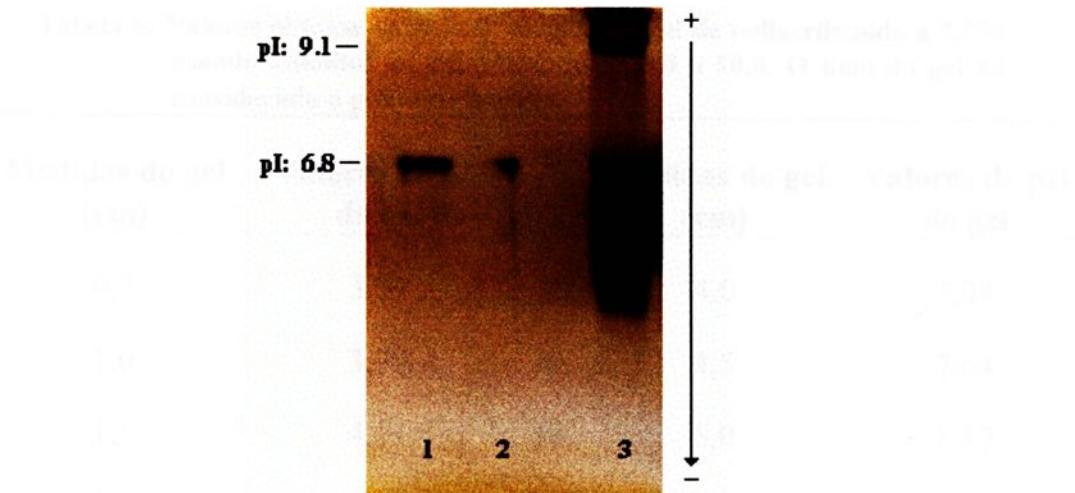


Figura 14: Gel de focalização isoeletrica 7,5%. 1 e 2 - Amostra de catepsina D; 3 - Amostra de piratoxina I, a qual foi usada como marcador.

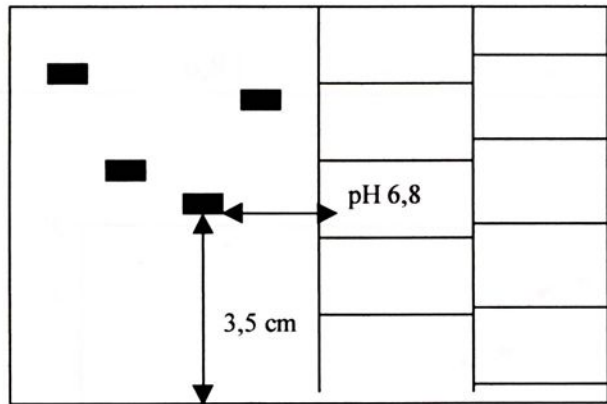


Figura 15: Representação de como foi feita a medida da banda do gel e como foi conseguido o valor do pI da proteína.

Tabela 6: Valores obtidos através da medida do gel de poliacrilamida a 7,5% usando anfólitos de pH variando de 3,0 a 10,0. O final do gel foi considerado o ponto de partida.

	Medidas do gel (cm)	Valores de pH do gel		Medidas do gel (cm)	Valores de pH do gel
1	0,5	3,37	8	4,0	7,34
2	1,0	3,59	9	4,5	7,64
3	1,5	4,11	10	5,0	8,17
4	2,0	4,94	11	5,5	8,31
5	2,5	5,58	12	6,0	9,12
6	3,0	6,40	13	6,5	9,26
7	3,5	6,88	-	-	-

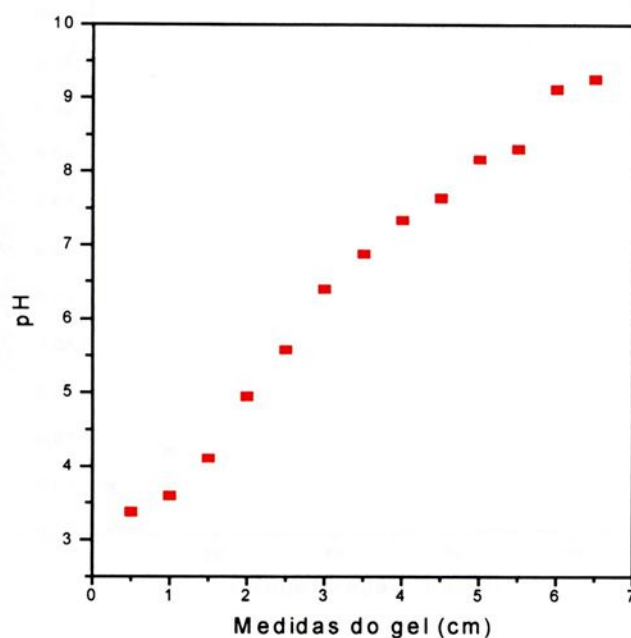


Figura 16: Representação gráfica dos valores indicados na tabela 4. Cada 0,5 cm do gel apresenta um valor de pH, o qual varia de 3,0 a 10,0. Pela medida da banda da proteína (3,5 cm), foi estimado o valor do pI da catepsina D (6,8).

Foi medida a distância da banda da proteína obtida até a parte inferior do gel e verificou-se que o ponto isoelétrico da catepsina D de fígado porcino é 6,8, como foi demonstrado no modelo da figura 15.

VI.2.3. Dosagem de proteína

A concentração da amostra de catepsina D foi determinada a partir de uma amostra de albumina, proteína usada como padrão. Foi obtido uma reta usando os valores da concentração final de albumina na solução e as respectivas absorbâncias (Fig. 17).

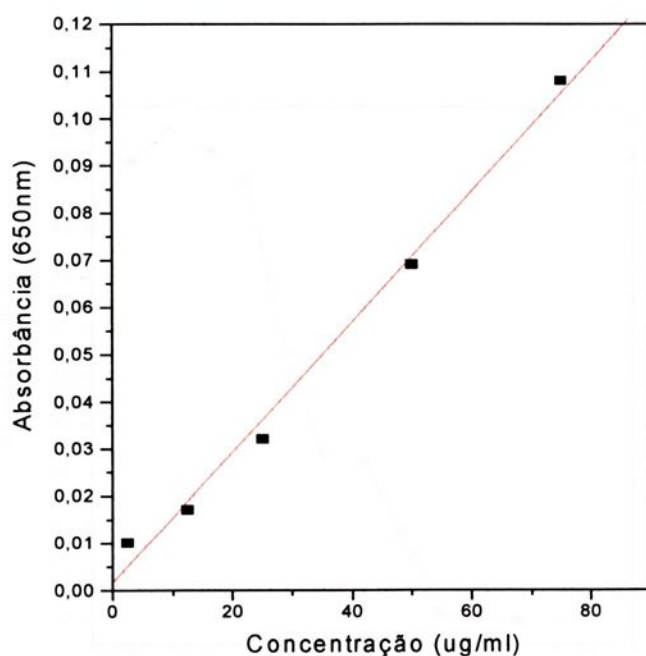


Figura 17: Gráfico obtido a partir da leitura das absorbâncias, a 650 nm, de diferentes concentrações de albumina bovina, a proteína padrão.

O mesmo experimento, realizado com uma amostra de catepsina D, resultou numa absorbância de 0,069. Este valor indica uma concentração de 1 µM (45 µg/ml).



VI.2.4. Atividade proteolítica da catepsina D

É sabido, desde o início do trabalho, que a catepsina D possui alta atividade devido ao problema de autocatálise, mas foi realizado teste de atividade para verificação das condições ótimas para a atividade proteolítica da catepsina D de fígado porcino.

O experimento usando ampla faixa de valores de pH (2,0 a 8,0), nos mostrou o intervalo de pH em que a proteína tem atividade. A figura 18 mostra o perfil de atividade da catepsina D. Vê-se o máximo de sua atividade proteolítica em pH 2,5 e, em valores maiores ou igual a 6,0, ela já não tem mais ação sobre o seu substrato (hemoglobina bovina desnaturada).

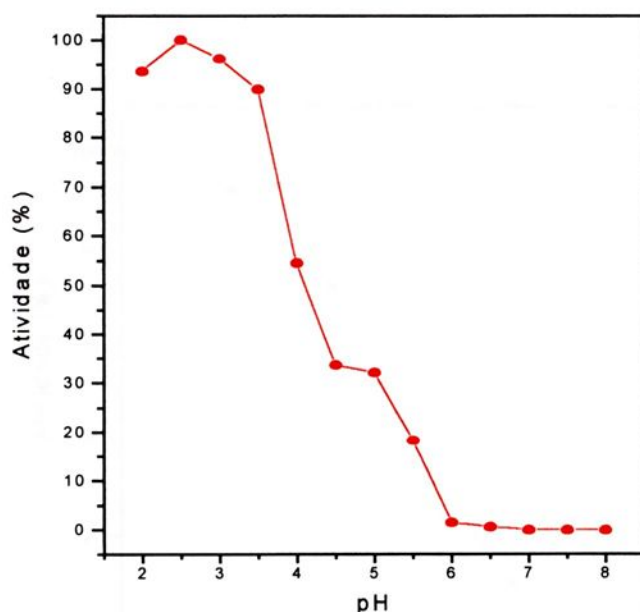


Figura 18: Perfil de atividade da catepsina D em diferentes valores de pH (2,0 a 8,0) utilizando como substrato, a hemoglobina bovina desnaturada.

A catepsina D têm função fisiológica na degradação de proteínas intracelulares (Dean, 1975; Poole, 1975). Seu local de ação, o lisossomo, tem pH

em torno de 4,5, o qual é mantido por bombas de íons hidrogênio da membrana lisossomal. Este pH interno desnatura proteínas a serem degradadas, tornando-se acessíveis à ação da catepsina D e de outras proteases lisossomais (Lodish et al., 1995).

O experimento em que foram usados 4 diferentes concentrações de inibidor pepstatina A está representado na figura 19. Verificou-se que a concentração de 9,45 $\mu\text{g/ml}$ de inibidor foi necessária para que a inibição fosse completa, ou seja, foi necessário saturar a solução de inibidor para que houvesse inibição total, já que a concentração de catepsina D no experimento foi 6,42 $\mu\text{g/ml}$. Valores de concentração inferiores mostraram atividade mais baixa do que o controle (ausência de inibidor).

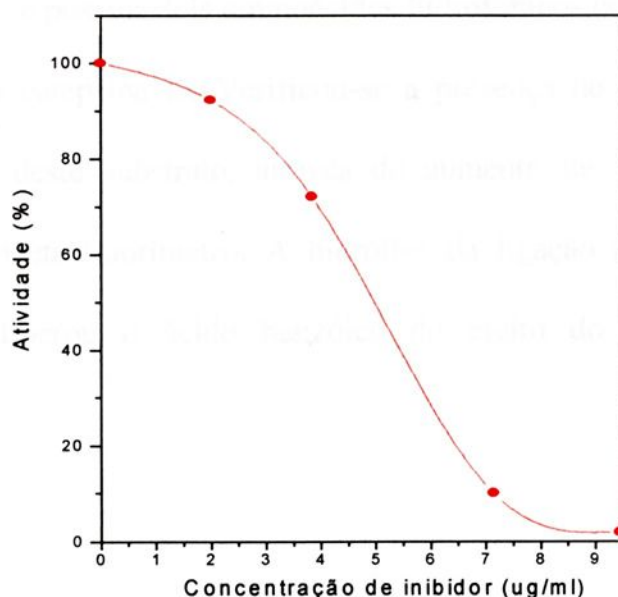


Figura 19: Atividade catalítica da catepsina D sobre a hemoglobina na ausência e na presença de diferentes concentrações de pepstatina A (2,0, 3,84, 7,14 e 9,45 $\mu\text{g/ml}$).

O complexo pepstatina-catepsina D é estabilizado por numerosas ligações de hidrogênio entre átomos da cadeia principal do inibidor, e ambos, átomos da cadeia principal e lateral da enzima (Baldwin et al., 1993).

O experimento usando o substrato fluorescente contendo apenas dois resíduos de aminoácidos (Phe e Arg) não foi reconhecido pela catepsina D, devido ao tamanho do substrato (muito pequeno) e da presença da arginina. A catepsina D requer um substrato mais longo para que a ligação possa existir (> 5 aminoácidos). A fórmula estrutural da arginina também não é compatível com o sítio ativo da catepsina D. A fenilalanina é um dos aminoácidos ideais para o seu reconhecimento, mas quando este está ligado a um outro aminoácido hidrofóbico (Cunningham & Tang, 1976).

O uso do segundo substrato sintético confirmou estes dados. Por ser um substrato longo e possuir dois aminoácidos hidrofóbicos consecutivos (Phe – Phe), foi acessível à catepsina D. Verificou-se a presença de atividade em diferentes concentrações deste substrato, através do aumento de fluorescência observada através do espectrofluorímetro. A hidrólise da ligação peptídica entre as duas fenilalaninas liberou o ácido benzóico do efeito do Eddnp, aumentando a fluorescência.

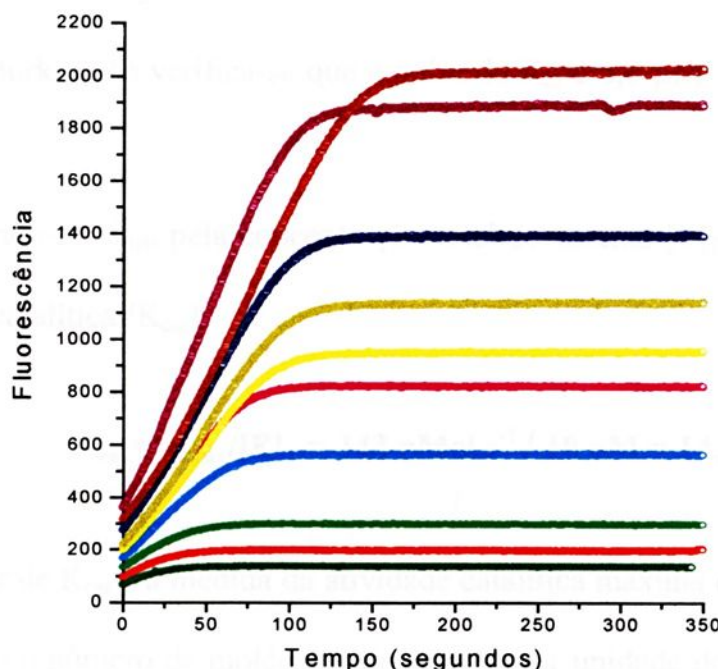


Figura 20: Cinética enzimática da catepsina D (10nM) em diferentes concentrações de substrato fluorescente (0,61 ●; 1,02 ●; 2,04 ●; 4,08 ●; 6,12 ●; 8,16 ●; 10,2 ●; 12,24 ●; 16,32 ● e 20,4 ● μM). Comprimento de onda de emissão: 420nm; comprimento de onda de excitação: 320nm).

A velocidade inicial da reação foi determinada segundo o método de Filippova et al., (1996). Os valores foram calculados a partir da equação:

$$V_o = I_t \cdot [S_o] / (I^{100} - I^0) \cdot t$$

onde, V_o é a velocidade inicial de hidrólise (nM/s), S_o é a concentração inicial do substrato (μM), I^0 é a fluorescência inicial, I^{100} é a fluorescência no final de 343,2 segundos de hidrólise enzimática, e I_t é a fluorescência após a hidrólise enzimática do substrato para t segundos.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas pelo método formulado por Hans Lineweaver e Dean Burk. A figura 21 mostra o gráfico de Michaelis-Menten e a figura 22, o gráfico de Lineweaver-Burk, onde verifica-se que o valor de K_m é $6,6 \mu M$ e de $V_{m\acute{a}x}$ é 143 nMol.s^{-1} .

Dividindo-se $V_{m\acute{a}x}$ pela concentração total de enzima $[E]_T$, têm-se o valor da constante catalítica (K_{cat}).

$$K_{cat} = V_{m\acute{a}x} / [E]_T = 143 \text{ nMol.s}^{-1} / 10 \text{ nM} = 14,3 \text{ s}^{-1}$$

O valor de K_{cat} é a medida da atividade catalítica máxima da enzima. Ela é definida como o número de moléculas de enzima por unidade de tempo, quando esta está saturada com o substrato. K_{cat} representa a eficiência cinética da enzima (Garret & Grisham, 1995).

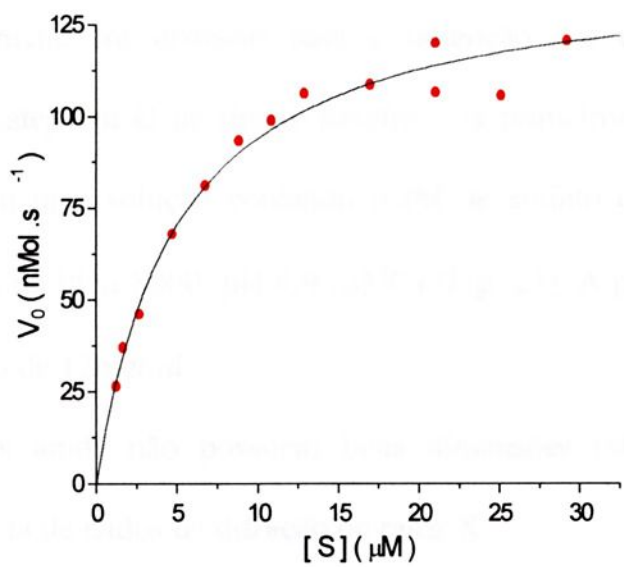


Figura 21: Gráfico de Michaelis-Menten obtido a partir das cinéticas mostradas na figura 20.

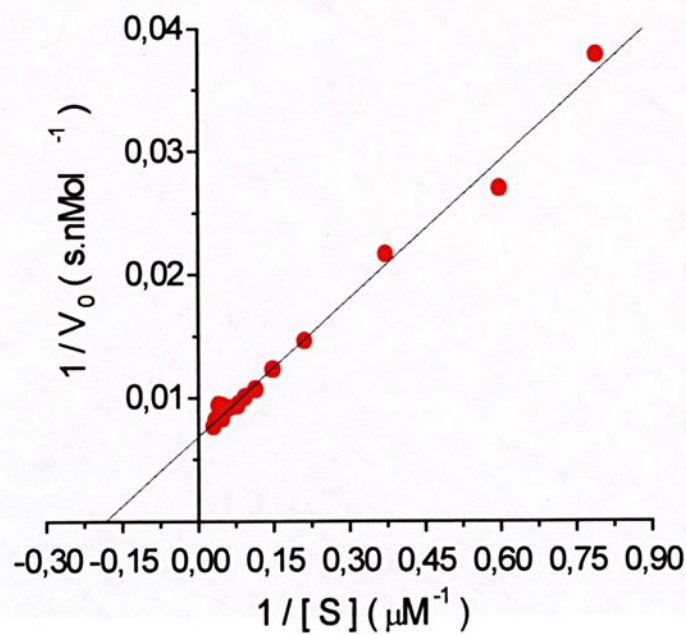


Figura 22: Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para a catepsina D de fígado porcino, a partir da transformação do gráfico de Michaelis-Menten, o qual foi usado para derivar os valores de K_m e V_{max} da reação.

VI.3. Cristalização

O teste inicial foi decisivo para a obtenção das condições ideais de cristalização de catepsina D de fígado porcino. Os primeiros cristais apareceram após 48 horas em uma solução contendo 0,2M de sulfato de amônio, 0,1M de cacodilato e 30% de PEG 8000, pH 4,9 (25°C) (Fig. 23). A proteína usada possui uma concentração de 12mg/ml.

Os cristais ainda não possuem boas dimensões (<0,2mm) para serem submetidos à coleta de dados de difração de raios X.

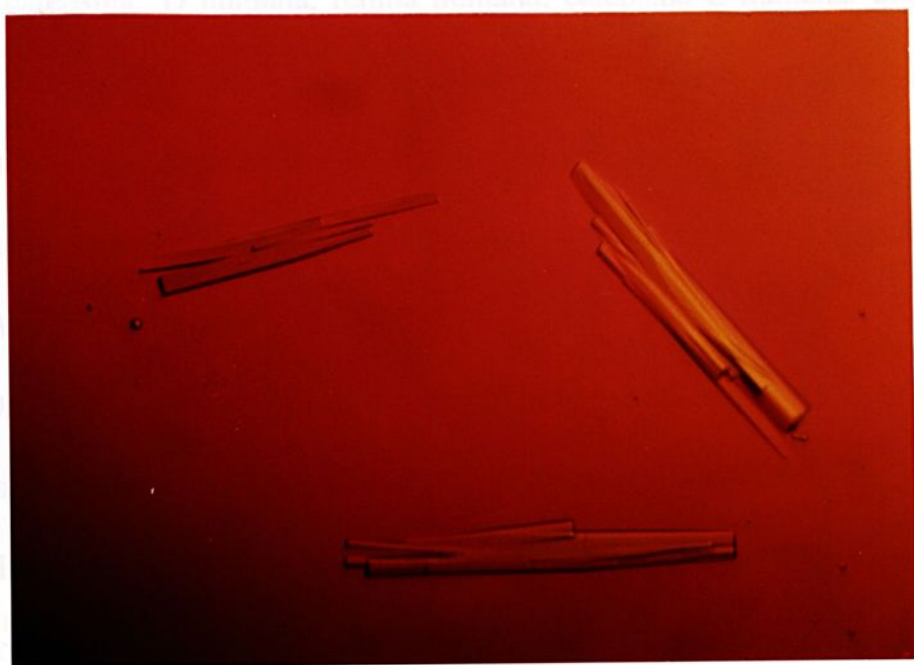


Figura 23: Fotografia dos cristais de catepsina D obtidos em solução de sulfato de amônio, cacodilato e PEG8000, pH 4,9.

VI.4. Comparação entre proteases aspárticas

A comparação das estruturas cristalográficas entre as proteases aspárticas, realizada com a ajuda de programas computacionais, resultou em dados bastante interessantes.

Dentre os membros da família protease aspártica, a catepsina D é o membro que possui duas cadeias polipeptídicas, sendo uma cadeia leve, de 97 aminoácidos, e a outra pesada, de 241 aminoácidos. A protease do HIV possui uma cadeia polipeptídica de 99 aminoácidos, e sofre uma dimerização necessária para a formação do centro ativo, resultando numa molécula cataliticamente ativa.

O alinhamento das sequências primárias das proteases: catepsina D porcina, catepsina D humana, renina humana, catepsina E humana, quimosina bovina, pepsina de levedura, penicilopepsina e protease do HIV, estão representados na figura 24. Nesta figura pode-se observar que a catepsina D possui maior número de aminoácidos, a qual sofre excisão de 8 aminoácidos, entre a Asn98 e Gly106.

Os aminoácidos do sítio ativo, em destaque, estão conservados, o que foi observado também nas sobreposições das estruturas cristalográficas (Fig. 25).

Há uma ponte de dissulfeto entre os resíduos de cisteína 27 e 96, a qual não tem sido observada nos outros membros (Fig. 24). A presença desta ponte de dissulfeto na cadeia leve da catepsina D deve estabilizá-la contra a degradação proteolítica (Baldwin et al., 1993; Yonezawa et al., 1988).

A tabela 7 mostra a porcentagem de aminoácidos idênticos, conservados e idênticos/conservados entre a catepsina D e outras proteases alinhadas.



Tabela 7: Dados comparativos sobre o número de posições idênticas e conservadas entre a catepsina D e outros membros

	Catepsina D (porcina)	Renina	Pepsina	Quimosina	Penicilo pepsina	Catepsina E	Protease do HIV
Catepsina D (humana)							
Idênticas e conservadas	76,6%	54,8%	54,8%	54,3%	37,4%	58,1%	37,0%
Idênticas	72,9%	40,7%	39,9%	40,4%	24,8%	45,4%	20,3%
Conservadas	3,6%	14,0%	14,8%	13,9%	12,5%	12,6%	16,6%

Na comparação, é analisado a estrutura secundária da molécula. O programa WHATIF usa estes elementos da estrutura secundária (principalmente, α -hélices e β -folhas da molécula) para realizar a sobreposição. O valor desta é dado em RMS (root-mean square deviation) (desvio da raiz quadrada média). Este número indica a média da distância entre os carbonos α das duas proteínas. Este processo é interativo, e a apuração da sobreposição é feita com a análise das moléculas sobrepostas na tela do computador (Silicon Graphics) (figura 25). A tabela 8 mostra os valores de RMS e número de aminoácidos sobrepostos, usando apenas os carbonos α das moléculas. Os códigos entre parênteses indicam a localização da proteína no banco de dados (PDB).

Tabela 8: Valores obtidos nas sobreposições da catepsina D com as outras proteases aspárticas.

	Renina (pdb1bbs.ent)	Quimosina (pdb1cms.ent)	Pepsina (pdb1psn.ent)	Penicilopepsina (pdb3app.ent)	protease do HIV (pdb2hvp.ent)
Catepsina D (pdb1lya.ent)					
Número de aminoácidos sobrepostos	270	283	281	213	35
RMS (Å)	0,820	1,033	0,933	1,452	1,609
Número total de aminoácidos	320	320	326	323	97

* não há coordenadas da catepsina E no banco de dados (PDB).

Conforme alinhamento sequencial e sobreposições, a molécula que mais se difere da catepsina D é a penicilopepsina, uma protease do microrganismo *Penicillium janthinellum*. O alinhamento é feito em ordem de semelhanças, ou seja, sequências mais similares ficam mais próximas. Sendo assim, conclui-se que a renina é a mais semelhante à catepsina D, o que é verificado também na sobreposição, onde o RMS foi de 0,820 Å.

Diferenças marcantes foram observadas nas alças (loops) das sobreposições. Cada uma das proteases possui seus loops característicos, o que lhe confere a especificidade.

Figura 24: Alinhamento das sequências primárias das proteases aspárticas: catepsina D (CATD_PIG e CATD_HUMAN), renina (RENI_HUMAN), catepsina E (CATE_HUMAN), quimosina (CHYM_BOVIN), pepsina (PEPS_YEAST), penicilopepsina (PENP_PENJA) e protease do HIV (PROT_HIV). Caixa azul: aminoácidos do sítio ativo; caixa verde: região de ligação dos carboidratos; caixa amarela: excisão de aminoácidos na catepsina D; linhas verde e vermelha: pontes de dissulfeto.

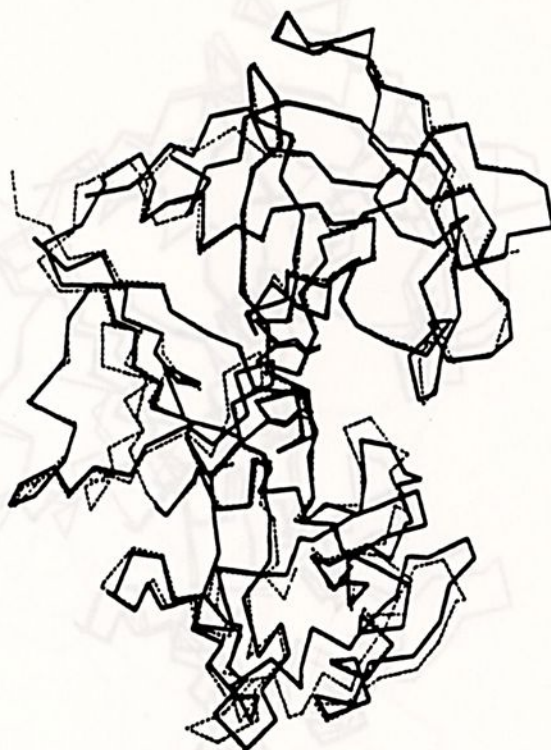


Figura 25a: Sobreposição da catepsina D com renina, usando 270 carbonos α (RMS= 0,820Å).



Figura 25b: Sobreposição da catepsina D com pepsina, usando 284 carbonos α (RMS= 0,929Å).



Figura 25c: Sobreposição da catepsina D com quimosina, usando 283 carbonos α (RMS= 1,033Å).

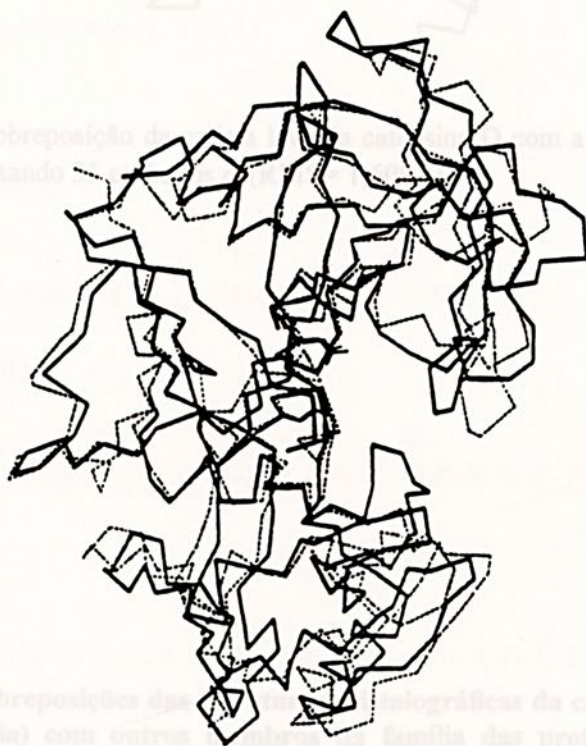


Figura 25d: Sobreposição da catepsina D com penicilopepsina, usando 213 carbonos α (RMS= 1,452Å).

VII. Discussão

A especificidade da cathepsina D envolve interações do substrato com o sítio ativo, o qual induz uma conformação distorcida no substrato, quando ele liga-se à protease. As dimensões do sítio de clivagem dependem do movimento relativo entre os domínios, e da ligação do substrato dentro da cavidade, que é diretamente afetado por este movimento (Cunningham & Tang, 1976).

Estudos cinéticos com substratos sintéticos (Offerman et al., 1983; Dunn et al., 1986; Imoto et al., 1987; Drift, 1989; Jupp et al., 1990) mostra que a cathepsina D é influenciada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente os resíduos de valina e leucina (Cunningham & Tang, 1976). Ile e Val são conhecidos por serem resíduos de carbono β que dificultam a ligação. A cathepsina D cliva peptídeos com resíduos de 3 resíduos de aminoácidos, em condições de pH ácido (Bond & Butler, 1987).

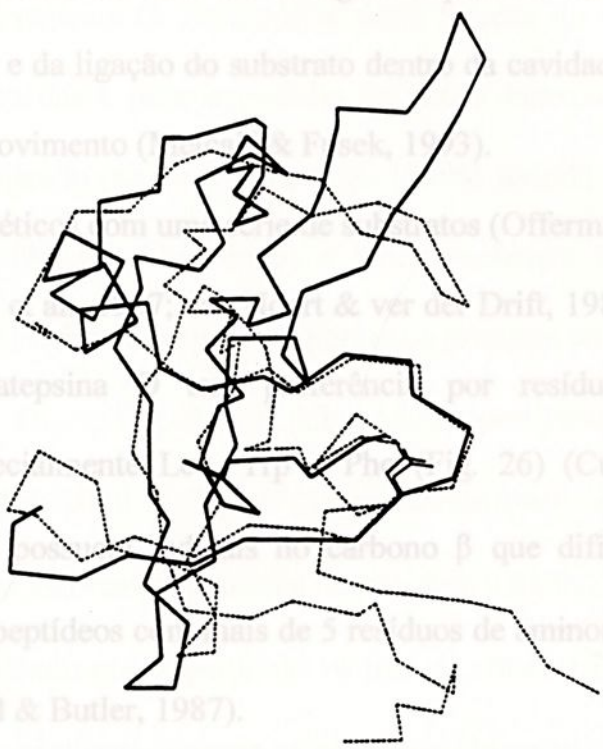


Figura 25e: Sobreposição da cadeia leve da cathepsina D com a protease do HIV, usando 35 carbonos α (RMS= 1,609Å).

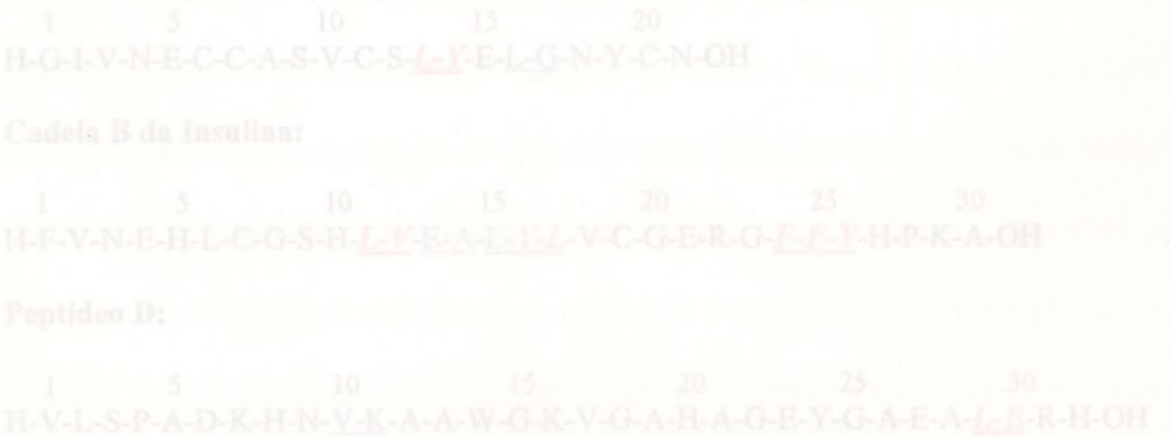


Figura 25: Sobreposições das estruturas cristalográficas da cathepsina D (linha cheia) com outros membros da família das proteases aspárticas (linha tracejada).

Figura 25: Sobreposições das estruturas cristalográficas da cathepsina D indicando locais de ligação de peptídeos (L-F: resíduos com maior afinidade; L-R: resíduos com menor afinidade) (Cunningham & Tang, 1976).

VII. Discussão

A especificidade da catepsina D envolve interações do substrato com o sítio ativo, o qual induz uma conformação distorcida no substrato, quando ele liga-se à protease. As dimensões do sítio de clivagem dependem do movimento relativo entre os domínios, e da ligação do substrato dentro da cavidade, que é diretamente afetado por este movimento (Metcalf & Fusek, 1993).

Estudos cinéticos com uma série de substratos (Offerman et al., 1983; Dunn et al., 1986; Imoto et al., 1987; van Noort & ver der Drift, 1989; Jupp et al., 1990) mostra que a catepsina D tem preferência por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente Leu, Trp e Phe (Fig. 26) (Cunningham & Tang, 1976). Ile e Val possuem radicais no carbono β que dificultam a ligação. A catepsina D cliva peptídeos com mais de 5 resíduos de aminoácidos, em condições de pH ácido (Bond & Butler, 1987).

Cadeia A da Insulina:

1 5 10 15 20
H-G-I-V-N-E-C-C-A-S-V-C-S-L-Y-E-L-G-N-Y-C-N-OH

Cadeia B da Insulina:

1 5 10 15 20 25 30
H-F-V-N-E-H-L-C-G-S-H-L-V-E-A-L-Y-L-V-C-G-E-R-G-F-F-Y-H-P-K-A-OH

Peptídeo D:

1 5 10 15 20 25 30
H-V-L-S-P-A-D-K-H-N-V-K-A-A-W-G-K-V-G-A-H-A-G-E-Y-G-A-E-A-L-E-R-H-OH

Figura 26: Alguns substratos da catepsina D indicando locais de hidrólise da ligação peptídica (**R-R**: resíduos com maior afinidade; **R-R**: resíduos com menor afinidade) (Cunningham & Tang, 1976).

Os resultados obtidos nos experimentos em que foram usados 2 substratos fluorescentes mostraram que realmente a catepsina D requer um substrato com mais de cinco resíduos de aminoácidos e com dois deles de características hidrofóbicas realizando uma ligação peptídica. É esta ligação, especificamente, reconhecida pela catepsina D. A hidrólise desta ligação do substrato resultou no aumento da fluorescência pela exposição do ácido benzóico. Um experimento semelhante foi realizado por Filippova et al. (1996) usando um substrato similar (Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Eddnp) e cinco proteases aspárticas diferentes, entre elas, catepsina D humana, pepsina porcina e protease do HIV. A constante de Michaelis-Menten ($K_m = 1,9; 3,0$ e $6,2 \mu\text{M}$, respectivamente) e a constante catalítica ($K_{cat} = 5,2; 32,0$ e $1,0 \text{ s}^{-1}$, respectivamente) obtidas por eles são compatíveis com os valores encontrados no presente trabalho ($K_m = 6,6 \mu\text{M}$ e $K_{cat} = 14,3 \text{ s}^{-1}$). Foi verificado que a partir de $16 \mu\text{M}$ de substrato não há mais variação significativa de fluorescência, ou seja, a catepsina D se aproxima de seu $V_{\text{máx}}$. As condições do ensaios foram as mesmas: foi usado tampão citrato pH 3,0 a 37°C . Neste valor de pH, a catepsina D possui 95% de atividade proteolítica, como mostrado neste e no trabalho de Tanji et al. (1991). Estes autores realizaram experimentos com catepsina D de músculo esquelético de macaco usando como substrato, hemoglobina desnaturada, como descrito no presente trabalho e observou que a atividade máxima da catepsina D é em pH 3,5, e que em pH maior que 6,0, a proteína perde toda a sua atividade proteolítica. Para a catepsina D de fígado porcino foi observado atividade máxima em pH 2,5 e perda de atividade em pH maior do que 6,0. Tanji et al. (1991) mostra também a perda da atividade proteolítica na presença de concentrações crescentes de pepstatina A e, como

substrato, hemoglobina desnaturada em pH 3,0 a 37°C. O perfil da curva obtida por eles é similar a curva apresentada.

Tanji et al. (1991) determinaram o peso molecular da enzima purificada por filtração em gel, em coluna Sephadex G-100. Encontraram o valor de 45 kDa. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em condições reduzidas, apresentou 2 bandas da proteína, correspondendo aos pesos moleculares de 30 e 15 kDa. O mesmo padrão de bandas foram encontrados por Gulnik et al. (1992) e Fusek et al. (1992).

Os resultados obtidos para a catepsina D de fígado porcino são idênticos aos apresentados por estes autores. Géis realizados na presença de SDS e mercaptoetanol mostraram 2 bandas da proteína desnaturada. A sequência de aminoácidos da catepsina D mostra a região em que a proteína sofre excisão (entre os aminoácidos 98 e 105).

O alinhamento realizado com a sequência primária da catepsina D e outras proteases aspárticas mostra uma interrupção nesta região de perda de 8 aminoácidos e consequente existência de duas cadeias polipeptídicas. Tang & Wong (1987) realizou um alinhamento similar e encontrou o mesmo padrão. Usaram sequências primárias de 16 proteases aspárticas, entre elas catepsina D porcina, procatepsina D humana, renina humana e pepsinogênio de várias espécies.

Na tabela 9 está listado a composição de aminoácidos da catepsina D de fígado porcino e de baço humano e da catepsina D de músculo esquelético de macaco. A análise dos números mostra que, dentre as catepsinas D destas espécies, porcina é mais similar à humana do que à catepsina D de macaco. Existem



algumas diferenças no conteúdo de aminoácidos entre os representantes porcina e macaco. Há mais glicina e isoleucina em catepsina D porcina e menos glutamina, do que em catepsina D de macaco. Catepsinas D humana e porcina são muito similares. As maiores diferenças: catepsina D porcina possui 3Gly e 3Ile a mais do que humana, enquanto que esta possui 3Leu a mais do que porcina.

Tabela 9: Composição de aminoácidos da catepsina D de três espécies: *Sus scrofa*, *Homo sapiens* e *Macaca fuscata fuscata*.

Aminoácidos	Catepsina D fígado porcino	Catepsina D baço humano	Catepsina D músculo esquelético de macaco^a
Lys	20	20	19
His	6	5	4
Arg	8	9	12
Asp	30	30	31
Thr	19	18	17
Ser	24	25	25
Glu	27	29	33
Pro	20	20	19
Gly	39	36	29
Ala	17	17	16
Cys	8	8	7
Val	27	28	23
Met	8	8	5
Ile	23	20	18
Leu	28	31	30
Tyr	17	18	15
Phe	12	13	14
Trp	4	4	ND
Total	337	340	322^b

^aTanji et al. (1991)

^bNúmero de resíduos de triptofano não incluídos. ND, não determinado.

Como pôde ser observado na figura 24, a presença de uma ponte de dissulfeto entre a Cys27 e Cys96 da catepsina D, a qual não está presente nos outros membros da família, é devido à existência de duas cadeias. Esta ponte de dissulfeto é importante para estabilizar o C-terminal da cadeia leve contra degradação proteolítica. Ainda assim, existe degradação em catepsina D de fígado



porcino. Asn 70 e Asn 199 apresentam importância no momento de transporte e encapsulamento pelos lisossomos, pois são nestes aminoácidos que os oligossacarídeos se ligam e são reconhecidos pela N-acetil glucosamina fosfotransferase, enzima que realiza o processo de transporte de enzimas endossomais.

A comparação da catepsina D com outros membros da família, realizada através das sobreposições dos carbonos α da proteína mostra muitas similaridades, mas também muitas diferenças relevantes. Apesar da catepsina D apresentar muitas semelhanças com a renina, a cavidade do sítio catalítico da catepsina D é mais largo. O contrário acontece com a penicilopepsina, em relação à catepsina D. Esta é uma das características importantes para o estabelecimento da especificidade de cada proteína. Apesar de as posições dos aminoácidos essenciais do centro catalítico serem totalmente conservados, além da conformação estrutural como um todo, a especificidade de cada membro é o motivo da diversificação entre as proteases aspárticas.

Os membros da família protease aspártica possuem um ancestral comum. Por evolução divergente, originaram os diferentes membros da família (Tang et al., 1978).



Considerando a sequência primária, a observação da árvore filogenética da figura 27 mostra uma relação entre os membros da família. Proteases aspárticas de organismos inferiores estão na base da figura, e a distância ao longo do eixo vertical é proporcional à diferença entre as sequências (Cho & Raikhel, 1992). No processo de evolução divergente, houve mudanças complementares nos resíduos de aminoácidos (Tang et al., 1978), os quais contribuíram para a diversificação entre estas proteases, como diferenças observadas nas alças externas e do centro catalítico, que conferem especificidade a cada membro. No entanto, observamos que o sítio ativo se conserva em todos eles, como veremos adiante (Tang & Wong, 1987).

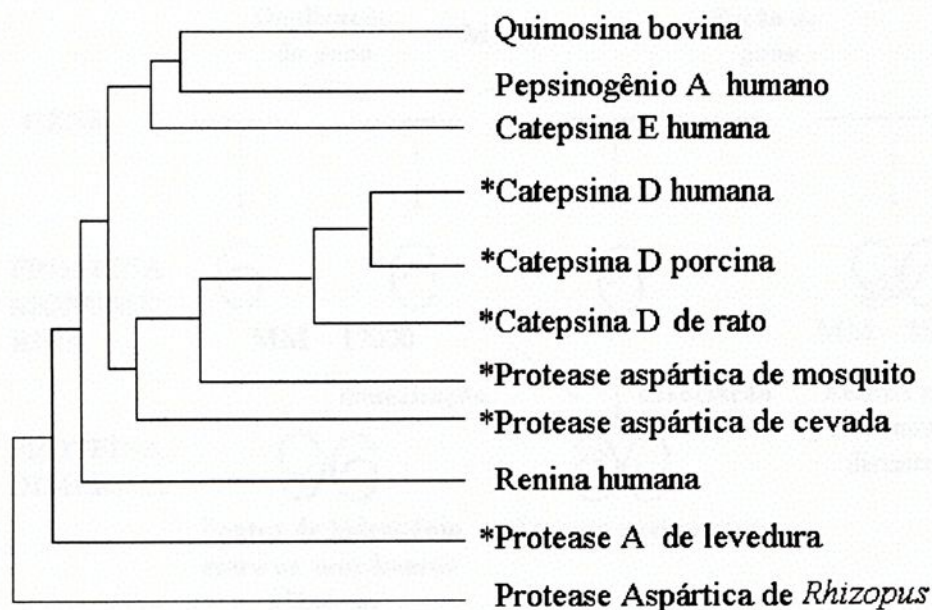


Figura 27: Árvore filogenética gerada por comparação das sequências de aminoácidos deduzidas dentre as proteases aspárticas. *indicam enzimas lisossomais ou vacuolares (Cho & Raikhel, 1992).

A protease aspártica do vírus da imunodeficiência humana, a protease do HIV, sofre dimerização para o estabelecimento do sítio catalítico (Tang et al., 1978). Todas as proteases aspárticas possuem dois domínios principais. No caso de estruturas moleculares que possuem dois domínios, provavelmente houve duplicação de genes e a sua fusão (figura 28). É possível o envolvimento de proteínas a partir de unidades funcionais pequenas, por fusão de genes. Cada domínio possui aproximadamente 35% dos seus resíduos de aminoácidos nas posições topologicamente equivalentes (Tang et al., 1978). Os dois domínios entre si também evoluíram de forma divergente, já que os grupos carboxílicos dos dois resíduos de ácido aspártico desenvolveram pKs diferentes (James et al., 1977).

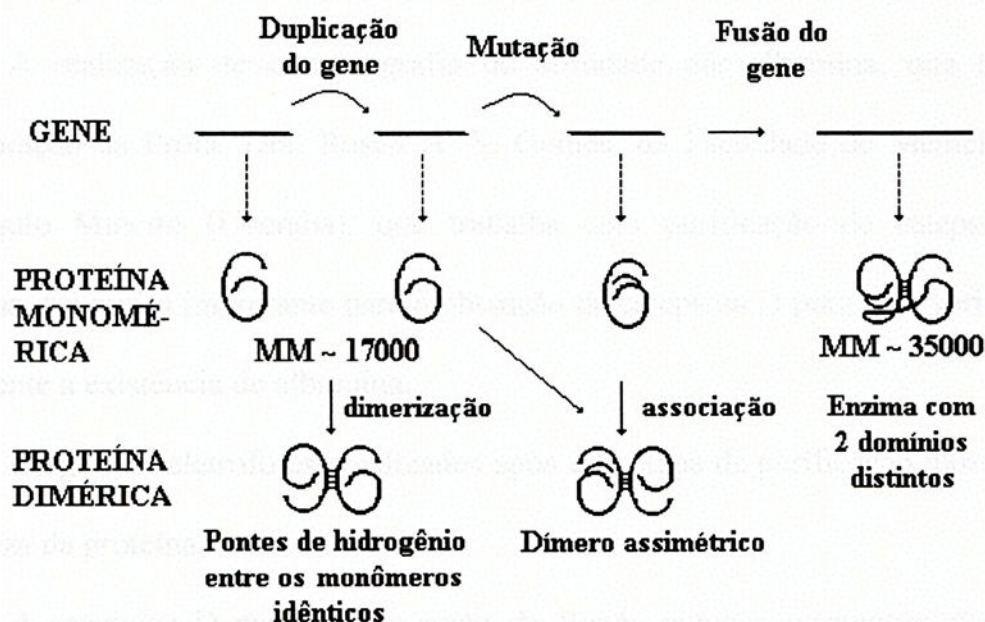


Figura 28: Representação esquemática da evolução das proteases aspárticas (Tang et al., 1987).

VIII. Conclusões

A catepsina D é bastante similar às outras enzimas da família, no que diz respeito à seqüência de aminoácidos do sítio ativo, e conformação estrutural. As diferenças observadas nas comparações das estruturas mostram que cada membro da família possui sua especificidade para reconhecer e ligar-se ao seu substrato. Dentre todas as proteases, a renina é a que mais se assemelha à catepsina D, e a penicilopepsina, a que mais se difere.

A etapa de purificação em que foi utilizado uma cromatografia de afinidade por catepsina D foi muito importante, contudo esta não produziu catepsina D numa pureza adequada para a realização da caracterização bioquímica e da cristalização.

A realização de cromatografia de afinidade por albumina, que teve a colaboração da Profa. Dra. Roseli A. S. Gomes, da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (Uberaba), que trabalha com purificação de catepsina D humana, foi muito importante para a obtenção de catepsina D pura. Foi verificado realmente a existência de albumina.

Os géis de eletroforese realizados após esta etapa da purificação mostraram a pureza da proteína.

A catepsina D purificada a partir de fígado porcino apresentou atividade catalítica alta em pHs menores que 4,0 usando-se como substrato, a hemoglobina bovina desnaturada, e foi totalmente inibida pela pepstatina A, seu inibidor específico, em condições de saturação. Concluiu-se, portanto, a grande



importância da realização de uma cromatografia de afinidade por catepsina D, usando-se Pepstatina A, em pH 3,5.

De uma maneira geral, os resultados obtidos na caracterização bioquímica da catepsina D porcina são consistentes com os resultados observados na literatura para a catepsina D humana. São muito semelhantes, portanto, estrutural e funcionalmente.

Já com o protocolo de purificação estabelecido e condições de cristalização definidos, o próximo passo deste trabalho será o refinamento das condições de cristalização para o melhoramento das dimensões dos cristais e então submetê-los à difração de raios X para a realização da coleta de dados e futura determinação da estrutura cristalográfica da catepsina D de fígado porcino.

Esta etapa será conteúdo de um novo projeto de pesquisa do grupo de Biologia Estrutural deste instituto.



IX. Referências Bibliográficas

- Andreeva, N.S.; Zdfanov, A S.; Gustchina, A E. & Federov, A.A., (1984) Structure of ethanol-inhibited porcine pepsin at 2Å resolution and binding of the methyl ester of phenylalanyldiiodotyrosine to the enzyme. *J. Biol. Chem.* **259**, 11353-11364.
- Anson, M.L. (1939) The estimation of pepsin, trypsin and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **23**, 695.
- Baldwin, E.T.; Bhat, N.; Gulnik, S.; Hosur, M.V.; SowderII, R.C.; Cachau, R.E., Collins, J.; Silva, A.M. & Erickson, J.W. (1993) Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: Implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6796-6800.
- Baranski, T.J., Faust, P.L. & Kornfeld, S. (1990) Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* **63**, 281-291.
- Baranski, T.J., Koelsch, G., Hartsuck, J.A. & Kornfeld, S. (1991) Mapping and molecular modeling of a recognition domain for lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **266**, 23365-23372.
- Barrett, A.J. (1970) Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem. J.* **117**, 601-607.
- Barrett, A.J. (1977) Cathepsin D and others carboxyl proteinases in *Proteinases in Mammalian Cells and Tissue* (Barrett, A.J., ed.) pp. 209-248, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York.



- Barrett, A.J. & Kirschke, H. (1981) Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L
Methods in Enzymology **80**, 535-561, Academic Press, New York.
- Berkaloff, A.; Bourguet, J.; Favard, P.; Favard, N. & Lacroix, J.C. (1978)
Biologie et physiologie cellulaires, vol. III. Herman, Paris.
- Bernstein, F.C.; Kotzle, T.F.; Williams, G.J.B.; Meyer, E.F. Jr; Bryce, M.D.;
Rodgers, J.R.; Kennard, O.; Simanouchi, T. & Tasumi, M. (1977) The Protein
Data Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *J.*
Mol. Biol. **112**, 535-542.
- Beynon, R.J., Bond, J.S. (1989) *Proteolytic Enzymes* IRL Press, Oxford, England.
- Bieber, F.; Brachvogel, V.; Arni, R.K.; Fusek, M. & Metcalf, P. (1992)
Crystallization and initial crystallographic results for pepstatin A inhibited
bovine cathepsin D. *J. Mol. Biol.* **227**, 1265-1268.
- Blundell, T.L. & Johnson, L.N. (1976) *Protein Crystallography* Academic
Press, New York.
- Bond, J.S. & Buttler, P.E. (1987) Intracellular proteases. *Annu. Rev. Biochem.* **56**,
333-364.
- Bott, R.; Subramanian, E.; Davies, D.R. (1982) Three-dimensional structure of a
complex of the *Rhizopus chinesis* carboxyl proteinase. *Biochemistry* **21**, 6956-
6962.
- Carson, M. (1991) Ribbons 2.0 *J. Appl. Cryst.* **24**, 958-961.
- Carter, C.W., Jr. & Carter, C.W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 12219.



- Cho, W-L. & Raikhel, A.S. (1992) Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease: Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsin D and E. *J. Biol. Chem.* **267**, 21823-21829.
- Conner, G.E. & Richo, G. (1992) Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D. *Biochemistry* **31**, 1142-1147.
- Conner, G.E.; Blobel, G. & Erickson, A.H. (1987) in *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown* (Glaumann H. & Ballard, J. eds.) pp. 151-162, Academic Press, London.
- Cunningham, M. & Tang, J. (1976) Purification and properties of cathepsin D from porcine spleen. *J. Biol. Chem.* **251**, 4528-4536.
- Dean, R. T. (1975) Direct evidence of importance of lysosomes in degradation of intracellular proteins. *Nature* **257**, 414-416.
- Dhanaraj, V.; Dealwis, CG.; Frazao, C.; Badasso, M.; Sibanda, D.L.; Tickle, I.J.; Cooper, J.M.; Driessen, H.P.C.; 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 (London)* **357**, 466-472.
- Ducruix, A. & Giegé, R. (1992) *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach* (Rickwood, D. & Hames, B.B. eds.), 331p. IRL Press, New York.



- Dunn, B.M. & Fink, A.L. (1984) Cryoenzymology of porcine pepsine. *Biochemistry* **23**, (22), 5241-5247.
- 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**, 899-906.
- Erickson, A.H.; Conner, G.E. & Blobel, G. (1981) Biosynthesis of a lysosomal enzyme. *J. Biol. Chem.* **256**, 11224-11231.
- Ferguson, J.B.; Andrews, J.R.; Voynick, I.M. & Fruton, J.S. (1973) The specificity of cathepsin D. *J. Biol. Chem.* **248**, 6701-6708.
- Filippova, I. Yu.; Lysogorskaya, E.N.; Anisimova, V.V.; Suvorov, L.I.; Oksenoit, E.S. & Stepanov, V.M. (1996) Fluorogenic peptide substrates for assay of aspartyl proteinases. *Analytical Biochemistry* **234**, 113-118.
- Fruton, J. S. & Bergmann, M. (1939) On the proteolytic enzymes of animal tissues. *J. Biol. Chem.* **130**, 19.
- Fusek, M; Baudys, M. & Metcalf, P. (1992) Purification and crystallization of human cathepsin D. *J. Mol. Biol.* **226**, 555-557.
- Garrett, R.H. & Grisham, C.M. (1995) *Biochemistry* Saunders College Publishing, 1100p. USA.
- Gulnik, S., Baldwin, E.T., Tarasova, N. & Erickson, J. (1992) Human liver cathepsin D: Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a lysosomal enzyme. *J. Mol. Biol.* **227**, 265-270.
- Hasilik, A & Neufeld, E.F. (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **255**, 4946-4950.



- Hofmann, T. & Fink, A. L. (1984) Cryoenzymology of penicillopepsin. *Biochemistry* **23**, (22) 5247-5256.
- Imoto, T., Okazaki, K., Koga, H. & Yamada, H. (1987) Specificity of rat liver cathepsin D. *J. Biochem.* **101**, 575-580.
- James, M.N.G.; Tang, J.; Hsu, I.N.; Jenkins, J.A. & Blundell, T.L. (1977) Mechanism of acid protease catalysis based on the crystal structure of penicillopepsin. *Nature* **267**, 808-813.
- James, M.N.G. & Sielecki, A.R. (1983) Structure and refinement of penicillopepsin at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* **163**, 299-361.
- James, M.N.G., Sielecki, A. R., Hofmann, I. (1985) X-ray diffraction studies on penicillopepsin and its complexes: The hydrolytic mechanism in *Aspartic Proteinases and Their inhibitors*, (Kostka, V., eds.) pp. 163-177, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Jancarik, J. & Kim, S. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.
- Jupp, R.A., Dunn, B.M., Jacobs, J.W., Vlasuk, G., Arcuri, K.E., Veber, D.F., Perlow, D.S., Payne, L.S., Boger, J., DeLaszlo, S., Chakravarty, P.K., TenBroeke, J., Hangauer, D.G., Ondeyka, D., Greenlee, W.J. & Kay, J. (1990) The selectivity of statine-based inhibitors against various human aspartic proteinases. *Biochem. J.* **265**, 871-878.
- Karp, G. (1979) *Cell Biology* McGraw-Hill Kogakusha Ltd, Tokio.
- Kawabata, T.; Nishimura, Y.; Higaki, M. & Kato, K. (1993) Purification and processing of rat liver procathepsin B. *J. Biochem.* **113**, 389-394.



- Klotz, I.M. (1970) Comparison of molecular structures of proteins: helix content; distribution of apolar residues. *Arch. Biochem. Biophys.* **138**, 704-706.
- Kornfeld, S. & Mellman, I. (1989) The biosynthesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483-525.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.
- Lang, L., Reitman, M.L., Tang, J., Roberts, R.M. & Kornfeld, S. (1984) Lysosomal enzyme phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **259**, 14663-14671.
- Lee, B. & Richards, F.M. (1971) The interpretation of proteins structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400.
- Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipurski, S.L.; Matsudaira, P. & Darnell, J. (1995) *Molecular Cell Biology* 3ed., 1344p. Scientific American Books, Inc. USA.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement and the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marciniszyn, J. Jr., Huang, J.S., Hartsuck, J.A & Tang, J. (1976) Mechanism of intramolecular activation of pepsinogen. *J. Biol. Chem.* **251**, 7095-7102.
- Marshall, G.R. (1976) Structure-activity relations of antagonists of the renin-angiotensin system. *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* **35**, 2494.
- Metcalf, P. & Fusek, M. (1993) The crystal structures for cathepsin D: The lysosomal targeting signal and active site. *The EMBO Journal* **12** (4), 1293-1302.



- McIntyre, G.F. & Erickson, A. H. (1991) Procathepsin L and D are membrane-bound in acidic microsomal vesicles. *J. Biol. Chem.* **266**, 15438-15445.
- Nishimura, Y. & Kato, K. (1987) Intracellular transport and processing of lysosomal cathepsin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 254-259.
- Nishimura, Y.; Amano, J.; Sato, H.; Tsuji, H. & Kato, K. (1988) Biosynthesis of lysosomal cathepsins B and H in cultured rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 159-170.
- Offermann, M.K., Chlebowski, J.F. & Bond, J.S. (1983) Action of cathepsin D on fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochem. J.* **211**, 529-534.
- Pearl, L. & Blundell, T.L. (1984) The active site of aspartic proteinases. *FEBS Letters* **174**, 96-101.
- Pearl, L. (1985) The extended binding cleft of aspartic proteinases and its role in peptide hydrolysis in *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors* (Kostka, V. eds.), pp. 189-195, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Poole, B. (1975) in *Intracellular Protein Turnover* (Shimke, R. & Katsunuma, N., eds), pp. 249-264, Academic Press, New York.
- Press, E.M.; Porter, R.R. & Cebra, J. (1960) The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen. *Biochem. J.* **74**, 501-514.
- Reitman, M.L. & Kornfeld, S. (1981) Lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **256**, 11977-11980.
- Rich, D.H.; Bernatowicz, M.S.; Agarwal, N.S.; Kawai, M.; Salituro, F.G. & Schmidt, P.G. (1985) Inhibition of aspartic proteases by pepstatin and 3-



- methylstatine derivatives of pepstatin: Evidence for collected-substrate enzyme inhibition. *Biochemistry* **24**, (13) 3165-3173.
- Richo, G.R. & Conner, G.E. (1994) Structural requirements of procathepsin D: activation and maturation. *J. Biol. Chem.* **269**, 14806-14812.
- Righetti, P.G.; Gianazza, C.G. & Chiari, M. (1990) Isoelectric Focusing. In: Hames, B.D. & Rickwood, D. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. 2ed., cap. 2, p.149-214. Oxford University Press, New York.
- Rijnbout, S., Kal, A J., Geuze, H.J., Aerts, H. & Strous, G.J. (1991a) Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 23586-23592.
- Rijnbout, S.; Aerts, H.M.; Geuze, H.J.; Tager, J.M. & Strous, G.J. (1991b) Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 4862-4868.
- Rochefort, H., Capony, F., Garcia, M., Cavailles, V., Freiss, G., Chambon, M., Morrisset, M. & Vignon, F. (1987) Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? *J. Cell Biochem.* **35**, 17-29.
- Rochefort, H; Capony, F. & Garcia, M. (1990) Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* **9**, 321-331.
- Shewale, J.G., Takahashi, T. & Tang, J. (1985) The primary structure of cathepsin D and the implications for its biological functions in *Aspartic Proteinases and*

- their Inhibitors* (Kostka, V., ed.) pp. 101-116, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Sly, W.S. & Fisher, D. (1982) The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes. *J. Cell. Biochem.* **18**, 67-85.
- Smarra, A.L.S. (1997) Caracterização parcial das propriedades funcionais e estruturais das hemoglobinas de *Lipossarcus anisitsi* (Pisces). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
- Tallan, H.H.; Jones, M.E. & Fruton, J.S. (1952) On the proteolytic enzymes of animal tissues. *J. Biol. Chem.* **194**, 793.
- Tang, J.; James, M.N.G.; Hsu, I.N.; Jenkins, J.A. & Blundell, T.L. (1978) Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature* **271**, 618-621.
- Tang, J. & Wong, R.N.S. (1987) Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J. Cell Biochem.* **33**, 53-63.
- Van Holde, K.E. (1971) *Bioquímica Física* (Edgard Blucher ed.) 195p., São Paulo.
- van Noort, J.M. & ver der Drift, A.C.M. (1989) The selectivity of cathepsin D suggests and involvement of the enzyme in the generation of T-cell epitopes. *J. Biol. Chem.* **264**, 14159-14164.
- Vidal, B.C. & Mello, M.L.S. (1987) *Biologia Celular* Livraria Atheneu, 347p., Rio/São Paulo.



- Voet, D. & Voet, J.G. (1995) *Biochemistry* John Wiley & Sons 2ed., 1360p., New York.
- Von Figura, K. & Hasilik, A. (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu. Ver. Biochem.* **55**, 167-193.
- Vriend, G. (1990) WHATIF: A molecular modelling and drug design program. *J. Mol. Graphics* **8**, 52-55.
- Yaron, A.; Carmel, A. & Katchalski-katzir, E. (1979) Intramolecular quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes. *Analytical Biochemistry* **95**, 228-235.
- Yonezawa, S., Takahashi, T., Wang, X. & Wong, R.N.S. (1988) Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D. *J. Biol. Chem.* **263**, 16504-16511.
- Walsh, K.A. (1986) *Methods in Protein Sequence Analysis*. Humana Press, Clifton, New Jersey.



Curriculum Vitae

Fernanda Canduri nasceu no dia 08 de agosto de 1972 em São José do Rio Preto-SP.

Iniciou o curso de graduação de bacharel em Ciências Biológicas no câmpus da UNESP de São José do Rio Preto em 10 de fevereiro de 1992. Concluiu o curso de graduação em 07 de dezembro de 1995.

Realizou estágio de iniciação científica no departamento de Física da mesma unidade, na área de Biofísica Molecular sob a orientação do Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo, onde desenvolveu um projeto de pesquisa intitulado: Efeitos de Solutos Neutros sobre a Atividade da Ribonuclease A de pâncreas bovino. No mesmo departamento, realizou estágio sob orientação do Prof. Dr. R. K. Arni no laboratório de Cristalografia de Proteínas, onde adquiriu técnicas básicas para cristalização de proteínas e desenvolveu um projeto intitulado: Cristalização da Piratoxina I, um Homólogo de Fosfolipase A₂ do Veneno de *Bothrops pirajai*.

Realizou também estágio no laboratório de Enzimologia do departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp no mês de janeiro de 1994, sob orientação do Prof. Dr. Hiroshi Aoyama onde desenvolveu parte do projeto intitulado: Propriedades Cinéticas da Fosfatase Ácida.

Já no mestrado, realizou um curso no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp denominado Princípios de



Engenharia Genética, ministrado pelo Prof. Dr. Adilson Leite, no mês de julho de 1996.

Participou das XXIV^a, XXV^a e XXVI^a Reuniões Anuais da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizadas em Caxambu/MG apresentando, respectivamente, os trabalhos: “Does RNase A Catalyse Synthetic RNA Denaturation” em maio de 1995; “Crystallization of Piratoxin I Isolated from the Venom of *Bothrops pirajai*” em maio de 1996; e “Purification and Characterization of Cathepsin D: An Aspartic Lysosomal Protease” em maio de 1997.

Participou também dos VII e VIII Wokshops Anuais de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), realizados no próprio laboratório em Campinas/SP, apresentando os respectivos trabalhos: “Crystallization of Piratoxin I Isolated from the Venom of *Bothrops pirajai*” em novembro de 1996 e “Crystal Structure of Piratoxin I: A Calcium-Independent, myotoxic Phospholipase A₂ – Homologue from *Bothrops pirajai* venom” em novembro de 1997.

Portanto, em paralelo, desenvolveu um projeto com um homólogo da fosfolipase A₂ do veneno da serpente *Bothrops pirajai*, a Piratoxina I.



Lista de Publicações:

- Canduri, F., Mancuso, L.C., Soares, A.M., Ward, R.J., Arni, R.K. (1997)
Crystallization of Piratoxin-I, a myotoxic Lys-49-Phospholipase A₂
homologue isolated from the venom of *Bothrops pirajai*, *Toxicon*. (aceito)
- de Azevedo, W.F., Canduri, F., Soares, A.M., Ward, R.J., Arni, R.K. (1997)
Crystal Structure of Piratoxin-I: A Calcium-Independent, Myotoxic
Phospholipase A₂ – Homologue from *Bothrops pirajai* Venom, *Toxicon*.
(aceito)
- Canduri, F., de Azevedo, W.F., Gomes, R.A.S., Ward, R.J., Arni, R.K. (1998)
Purification and Partial Characterization of Cathepsin D from Porcine (*Sus
scrofa*) Liver using Affinity Chromatography, *Biochemistry and Molecular
Biology International*. (aceito)
- Canduri, F., Teodoro, L.G.V.L., Lorenzi, C.C.B., Gomes, R.A.S., Fontes, R.M.,
Arni, R.K., de Azevedo Jr., W.F. (1998) Crystallization, Preliminary X-ray
Analysis, and Molecular Replacement Solution of a New Aspartic Protease
Isolated From Human Urine, *Biochemistry and Molecular Biology
International*. (submetido)

Anexo I

ITEM	DESCRIÇÃO	TEMPLO	PRECIPITANTE
1	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	10% PEG
2	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
3	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
4	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
5	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
6	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
7	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
8	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
9	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
10	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
11	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
12	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
13	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
14	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
15	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
16	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
17	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
18	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
19	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
20	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
21	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
22	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
23	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
24	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
25	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
26	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
27	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
28	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
29	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
30	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
31	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
32	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
33	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
34	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
35	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
36	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
37	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio
38	0,2M Cloreto de sódio	0,1M Acetato	0,1M Formato de sódio

Anexos

Anexo I

	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE
1	0,05M Cloreto de cálcio	0,1M Acetato	30% MPD
2	----	----	0,4M Tartarato de Na/K
3	----	----	0,4M Fosfato de amônio
4	----	0,1M Tris	2,0M Sulfato de amônio
5	0,2M Citrato de sódio	0,1M Hepes	40% MPD
6	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
7	----	0,1M Cacodilato	1,5M Acetato de sódio
8	0,2M Citrato de sódio	0,1M Cacodilato	30% Isopropanol
9	0,2M Acetato de amônio	0,1M Citrato	30% PEG 4 K
10	0,2M Acetato de amônio	0,1M Acetato	30% PEG 4 K
11	----	0,1M Citrato	1,0M Fosfato de amônio
12	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Hepes	30% Isopropanol
13	0,2M Citrato de sódio	0,1M Tris	30% PEG 400
14	0,2M Cloreto de cálcio	0,1M Hepes	28% PEG 400
15	0,2M Sulfato de amônio	0,1M Cacodilato	30% PEG 8 K
16	----	0,1M Hepes	1,5M Sulfato de lítio
17	0,2M Sulfato de Lítio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
18	0,2M Acetato de magnésio	0,1M Cacodilato	25% PEG 8 K
19	0,2M Acetato de amônio	0,1M Tris	30% Isopropanol
20	0,2M Sulfato de amônio	0,1M Acetato	25% PEG 4 K
21	0,2M Acetato de magnésio	0,1M Cacodilato	30% MPD
22	0,2M Acetato de sódio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
23	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Hepes	30% PEG 400
24	0,2M Cloreto de cálcio	0,1M Acetato	20% Isopropanol
25	0,1M Sulfato de cádmio	0,1M Hepes	1,0M Acetato de sódio
26	0,2M Acetato de amônio	0,1M ácido cítrico	30% MPD
27	0,2M Citrato de sódio	0,1M Hepes	20% Isopropanol
28	0,2M Acetato de sódio	0,1M Cacodilato	30% PEG 8 K
29	----	0,1M Hepes	0,8M Tartarato de Na/K
30	0,2M Sulfato de amônio	----	30% PEG 8 K
31	0,2M Sulfato de amônio	----	30% PEG 4 K
32	----	----	2,0M Sulfato de amônio
33	----	----	4,0M Formiato de sódio
34	----	0,1M Acetato	2,0M Formiato de sódio
35	----	0,1M Hepes	1,6M Fosfato de Na/K
36	----	0,1M Tris	8% PEG 8 K
37	----	0,1M Acetato	8% PEG 4 K
38	----	0,1M Hepes	1,4M Citrato de sódio

	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE
39	----	0,1M Hepes	2% PEG 400 2,0M Sulfato de amônio
40	----	0,1M Citrato	20% Isopropanol 20% PEG 4 K
41	----	0,1M Tris	10% Isopropanol 20% PEG 4 K
42	0,05M Fosfato de potássio	----	20% PEG 8 K
43	----	----	30% PEG 1500
44	----	----	0,2M Formiato de Mg
45	0,2M Acetato de zinco	0,1M Cacodilato	18% PEG 8 K
46	0,2M Acetato de cálcio	0,1M Tris	18% PEG 8 K
47	----	0,1M Acetato	2,0M Sulfato de amônio 5% Isopropanol
48	0,8M Sulfato de lítio	----	2% PEG 8 K
49	1,0M Sulfato de lítio	----	10% PEG 8 K
50	----	----	1,0M Imidazol
51	----	0,1M Hepes	70% MPD
52	0,1M Cloreto de cádmio	0,1M Acetato	30% PEG 400
53	0,02M Cloreto de cádmio	0,1M Hepes	30% PEG 4 K

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF CATHEPSIN D FROM PORCINE (*Sus scrofa*) LIVER USING AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Fernanda Canduri¹, Richard J. Ward^{1*}, Walter F. de Azevedo Jr.¹, Roseli A. S. Gomes² and R. K. Arni^{1#}

¹ Departamento de Física, IBILCE/UNESP, 15054-000, São José do Rio Preto, S.P., Brazil. FAX 0055 017.224-8692; ² Departamento de Bioquímica Celular e Biofísica, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, FMTM, 38015-050, Uberaba, M.G., Brazil.

SUMMARY: Cathepsin D, a lysosomal aspartic protease, has been purified from porcine liver using a combination of pepstatin-A agarose and Affi-Gel Blue affinity chromatography, followed by size-exclusion chromatography. The purified protein consists of two polypeptide chains of 15 and 30 kDa, and has an isoelectric point of 6.8. Porcine liver cathepsin D has maximum activity at pH 2.5-3.0 as determined by its activity against hemoglobin, with a K_{cat} of 14.3 s^{-1} and a k_{cat}/K_M of $2.70 \times 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ as determined by the hydrolysis of a fluorogenic peptide substrate.

Key Words: Cathepsin D, aspartic protease, lysosomal enzyme, affinity chromatography, pepstatin A

INTRODUCTION

The aspartic protease family includes pepsin, renin, HIV protease and cathepsins D and E. Cathepsin D is the major lysosomal enzyme in liver, spleen, kidney, gastric mucous, placenta, brain and skin (1), and is synthesized as a single chain pro-enzyme. After transfer to the Golgi complex, the protein is phosphorylated (N-linked mannose-6-phosphate) and cleaved to form two chains, a light chain of 15 kDa and a heavy chain of 30 kDa (2, 6). Phosphorylation serves as a recognition signal for N-acetylglucosamine phosphotransferase (7, 8) which is the cell signal for the transport of cathepsin D to the lysosomal vesicle (9). Various pathological processes are associated with increases in lysosomal activity (3), and the elevated levels of cathepsin D in tumor cell lysosomes is a diagnostic aid of breast cancer metastases (4, 5).

* Current address: Department of Biochemistry, FMRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil.

To whom correspondence should be addressed.

Cathepsin D hydrolyses the peptide bond on the N-terminal side of hydrophobic amino acids, principally Trp, Phe and Leu (10). Two aspartic acid residues (Asp33 and Asp231, in cathepsin D) are essential for the hydrolysis of the substrate (11, 12) and are structurally conserved in all the members of this family. The pH optimum for activity is between 2 and 3, which is the pH encountered in the endosomal medium (13). Pepstatin A, a peptide of 7 amino acids, is a naturally occurring potent aspartic protease inhibitor (14). Exploiting its high affinity for pepstatin-A, we have affinity-purified and characterized the kinetics of lysosomal cathepsin D from porcine liver.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of tissue extract: 500g of frozen porcine liver was freed of fatty tissue, cut into small cubes, the volume adjusted to 500ml with buffer (50mM NaAcetate, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.2mM PMSF e 1% TRITON X100, pH 4.6) and homogenized in a Waring blender. The homogenate was filtered through a gauze mesh to separate fatty material and centrifuged at 20 000g for 45 min at 4°C. The pH of the supernatant fraction was adjusted to 3.5 with glacial acetic acid, and maintained at 4°C with constant agitation for 60 min. During this time further precipitation of liver proteins occurred, and a second centrifugation at 30 000g cleared the extract (final volume 300ml) prior to application of the supernatant fluid to the pepstatin A-affinity column.

Pepstatin A-agarose affinity chromatography: An XK16/40 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) was packed with 10ml of the affinity resin pepstatin A-affinity agarose (Sigma). All procedures were performed at 4°C, unless otherwise indicated. The column was equilibrated with buffer B (50mM NaAcetate, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH 3.5) at a flow rate of 0.5 ml.min⁻¹. The liver extract was applied to the affinity column at a flow rate of 0.2 ml.min⁻¹ using a peristaltic pump. The column was initially washed with approximately 250 ml (25 column volumes) of buffer B at a flow rate of 0.2 ml.min⁻¹. The column was then inverted, and subjected to a second wash at room temperature at a flow rate of 1.0 ml.min⁻¹ with 100ml of buffer C (Buffer B + 150mM NaCl) using an FPLC system (Pharmacia). During this second wash, the absorbance at 280 nm was monitored, and after a steady O.D. baseline was established, the column was eluted using buffer D (50mM Tris, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8.5) and a flow rate of 1 ml.min⁻¹. Fractions were collected over the absorbance peaks, and pooled typically giving a total volume of ~30 ml.

Affi-Gel Blue affinity chromatography: 4.0 ml of Affi-Gel Blue (BioRad) was packed into a 1cm diameter column and equilibrated with 50ml of sodium phosphate 0.1M, pH 7.0. The pooled pepstatin A-affinity eluate was passed over the column at a flow rate of 2.0 ml.min⁻¹ with continuous monitoring of absorbance at 280nm. The eluate was collected and concentrated with centrifuge-spin filters (Centricon, 20 kDa cut-off) to a final volume of 2ml, and stored at -20°C in 50mM sodium citrate buffer pH 5.0. This second affinity purification was used to remove trace quantities of serum albumin.

Size-Exclusion Chromatography: A Superdex10/75 (Pharmacia) column (1.6 x 70 cm) was equilibrated with buffer D, and 0.4 mg of cathepsin D was applied in a total volume of 0.5 ml. The column was eluted at 1 ml.min⁻¹, and the absorbance of the eluate monitored at 280 nm. This final step was used for all preparations in order to eliminate trace contaminants detected in some earlier preparations.

Electrophoresis: Sodium dodecylsulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed (15). Samples were prepared by heating at 90°C for 5 min in the presence of 2% SDS and 0.5% β-mercaptoethanol. Non-denaturing isoelectric focussing was performed (16) using an anfoline (Sigma) pH gradient of 3.0 – 10.0. Protein was visualized by silver staining.

Determination of Protein Concentration: The concentration was determined using bovine serum albumin as standard (17). In all cases, a blank sample was prepared under the same conditions, but with the absence of protein.

Determination of Proteolytic Activity: Two separate methods were used to determine proteolytic activity using as substrates denatured bovine hemoglobin and a synthetic fluorogenic peptide. The activity over a pH range of 2-8 in 0.5 unit increments was measured by the hydrolysis of denatured bovine hemoglobin (18). Due to the broad pH range tested, three buffer systems were employed; 0.2 M Glycine-HCl (pH 2.0), 0.2 M citrate-phosphate (pH 2.5-7.0) and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5-8.0). Kinetic parameters were measured by the hydrolysis of a synthetic fluorogenic peptide containing at the extremities the chromophore *o*-aminobenzoyl (Abz) and its quenching partner ethylenediaminidinitrophenol (Eddnp) which are separated by 8 amino acid residues including two consecutive phenylalanine residues (19). Cleavage of the peptide between these hydrophobic residues results in separation of the two peptide fragments, and a consequent dequenching of the Abz which leads to an increase in the fluorescence signal. Cathepsin D at a fixed concentration of 0.45 μg.ml⁻¹ was incubated with the fluorogenic peptide at concentrations of 0.61-32.7 μM in 2.0 ml total volume of 50 mM sodium citrate, pH 3.0. The increase in fluorescence was measured with a Hitachi F-4500 spectrofluorimeter in time-scan mode with an excitation wavelength of 320 nm, and an emission wavelength of 420 nm. The initial rates of peptide hydrolysis were calculated from the increase in the fluorescence signal (19) by the equation:

$$V_0 = I_t \cdot [S_0] / (I^{100} - I^0) \cdot t$$

where V_0 is the initial rate of substrate hydrolysis (nMol.s⁻¹), S_0 is the initial substrate concentration (μM), I^0 and I^{100} are the initial and final plateau fluorescence signals respectively, I_t is the fluorescence signal at time t , and t is the time in seconds. The Michaelis-Menten constant (K_M) and maximum velocity (V_{max}) were determined using Lineweaver-Burk plots. The k_{cat} was calculated using the equation:

$$k_{cat} = V_{max} / [E]_T$$

where $[E]_T$ is the total enzyme concentration (nM).

RESULTS

Figure 1a shows the SDS-PAGE gel of the cathepsin D from porcine liver after purification using pepstatin-A and Affi-Gel blue affinity resins, and size-exclusion chromatography (SEC). In the final SEC purification step, a single peak of ~45kDa is observed (data not shown), however under the reducing and denaturing conditions of SDS-PAGE, two bands of 15 and 30 kDa are observed. In contrast, under the non-denaturing and non-reducing conditions of the isoelectric focussing gel presented in Figure 1b, cathepsin D focusses to a single band corresponding to an isoelectric point of 6.8. Both Figures 1a and 1b show well defined bands, with no detectable contaminants shown by the silver staining technique.

As illustrated in Figure 2, the activity tests performed over the pH range of 2-8, using denatured bovine haemoglobin as a substrate, indicate a pH optimum of 2.5-3.0 for porcine liver cathepsin D. As the pH is increased, the activity of the enzyme declines to 50% at pH values ranging from 4.0-4.5, and above pH 6.0 hydrolysis of substrate is not detected. Activity tests were also performed in 0.1 M sodium formate pH 3.0, both in the absence and presence of the inhibitor pepstatin-A. The activity decreases in proportion to the inhibitor concentration, and complete inhibition is reached at a pepstatin-A concentration of $9.5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (data not shown).

The initial rates of hydrolytic activity using the synthetic fluorogenic peptide substrate are presented in Figure 3 as a Michaelis-Menten plot. These data were analysed using a hyperbolic least-squares-fit function, which yielded values for the K_M and $V_{\max}$ of $6.5 \mu\text{M}$ and $140 \text{ nMol}.\text{s}^{-1}$ respectively. The insert to Figure 3 presents the Lineweaver-Burk transformation of the data, from which were derived values for K_M of $6.6 \mu\text{M}$ and a $V_{\max}$ of $143 \text{ nMol}.\text{s}^{-1}$. Using this value of $V_{\max}$ yields a k_{cat} of 14.3 s^{-1} , and a k_{cat}/K_M ratio of $2.70 \times 10^6 \text{ s}^{-1}.\text{M}^{-1}$.

DISCUSSION

Using a combination of affinity and size-exclusion chromatography, the cathepsin D was isolated from porcine liver with a high degree of purity. The initial pepstatin-A affinity purification yielded samples containing several minor contaminants, and the subsequent Affi-Gel blue and size-exclusion chromatographic (SEC) steps successively improved the purity of the preparation. In the final SEC step, an eluted peak corresponding to a protein molecular weight 45 kDa yielded a single band of $\text{pI}=6.8$ using an isoelectric focussing gel. However, under the

reducing and denaturing conditions of SDS-PAGE, this fraction yielded two bands corresponding to polypeptides of 15 and 30 kDa respectively.

The processing of human cathepsin D from the 45 kDa pro-enzyme to the heterodimeric species is known to occur in the Golgi apparatus (2,6). In several preparations, we have observed, by the silver stained SDS-PAGE, a 45 kDa protein present in small amounts in samples taken immediately after elution of the pepstatin-A column which may correspond to the native protein. This protein species is unstable, and is not observed either in the final sample or after storage of the pepstatin-A column eluate at 4°C. The degradation of the purified 45 kDa species suggests that conversion of the pro-enzyme may occur through auto-hydrolysis, however proteolysis by trace contaminants of other proteases cannot be ruled out.

An optimum pH of 2.5-3.0 for the activity of the purified porcine liver cathepsin D is typical of the lysosomal aspartic proteases. The crucial role played by the aspartic acid residues in the catalytic mechanism is evident from the pH value of 4.0-4.5 for the 50% activity observed here, which approximately corresponds to the pK' of aspartic acid. The values derived for the K_M and k_{cat} are within the range of values for other aspartic proteases using the same substrate, however they are higher than those observed for human cathepsin D (19). Nevertheless, the value for k_{cat}/K_M ratio is similar for these two enzymes (2.74×10^6 for human cathepsin D (19) versus 2.70×10^6 for the porcine enzyme), indicating that despite the differing values of k_{cat} and K_M , the efficiencies of the two enzymes are comparable.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors are indebted to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual Paulista (FUNDUNESP).

REFERENCES

1. Barret, A. J. (1970) *Biochem. J.* 117, 601-607.
2. Barret, A. J. (1977) *Proteinases in Mammalian Cells and Tissue* (Elsevier-North-Holland, New York), pp. 209-248.
3. Voet, D. & Voet, J.G. (1990) 'Biochemistry', John Wiley & Sons, New York.
4. Rochefort, H; Capony, F. & Garcia, M. (1990) *Cancer and Metastasis Reviews* 9, 321-331.
5. Spyrtos, F., Brouillet, J.P., Deffrene, A., Hacene, K., Rouesse, J., Maudelonde, T., Brunet, M., Andrieu, C., Desplaces, A. & Rochefort, H. (1989) *Lancet* 8672, 1115-1118.
6. Gulnik, S., Baldwin, E. T., Tarasova, N. & Erickson, J. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 265-270.
7. Kornfeld, S. & Mellman, I. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 483-525.
8. Von Figura, K. & Hasilik, A. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* 55, 167-193.

9. Metcalf, P. & Fusek, M. (1993) *The EMBO Journal* 12 (4), 1293-1302.
10. Cunningham, M. & Tang, J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4528-4536.
11. Andreeva, N.S.; Zdfanov, A S.; Gustchina, A E. & Federov, A A , (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 11353-11364.
12. Bott, R.; Subramanian, E. & Davies, D.R. (1982) *Biochemistry* 21, 6956-6962.
13. Bond, J.S. & Buttler, P.E. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 333-364.
14. Baldwin, E.T.; Bhat, N.; Gulnik, S.; Hosur, M.V.; SowderII, R.C.; Cachau, R.E., Collins, J.; Silva, A.M. & Erickson, J.W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6796-6800.
15. Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
16. Righetti, P.G.; Gianazza, C. G. & Chiari, M. (1990) in *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. (Hames, B. D. & Rickwood, D., Eds.) Cap. 2, 2ed., p. 149-214, Oxford University Press, New York, N.Y.
17. Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
18. Anson, M. L. (1939) *J. Gen. Physiol.* 23, 695.
19. Filippova, I. Yu., Lysogorskaya, E.N., Anisimova, V.V., Suvorov, L.I., Oksenoit, E.S. & Stepanov, V.M. (1996) *Analytical Biochemistry* 234, 113-118.

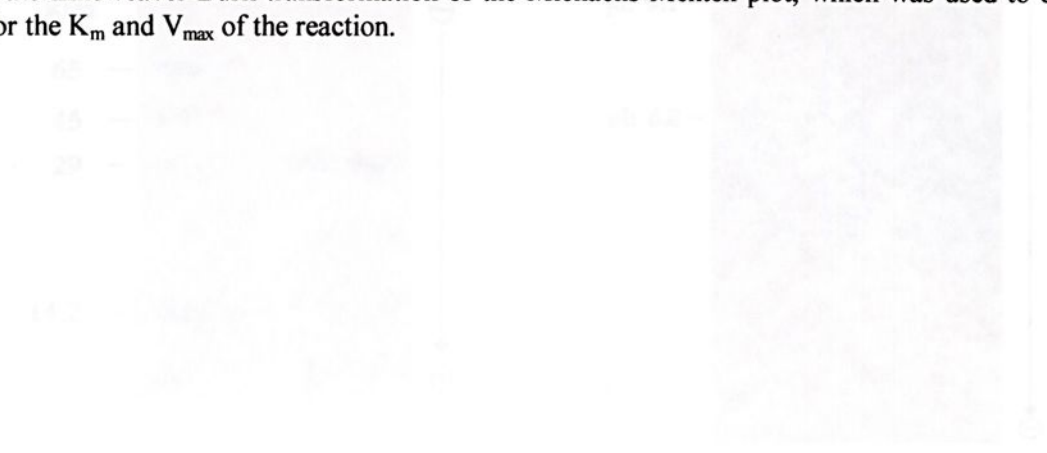


Figure 1 (a). Silver stained 12% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) of the purified porcine liver cathepsin D (lanes 1 and 2). The molecular weights of the protein markers (lane M) are shown in kDa to the right of the gel. (b) Silver stained 7.5% polyacrylamine isoelectric focussing gel showing the purified porcine liver cathepsin D (lanes 1 and 2). Lane 3 shows the marker piratoxin I (pI=9.1).

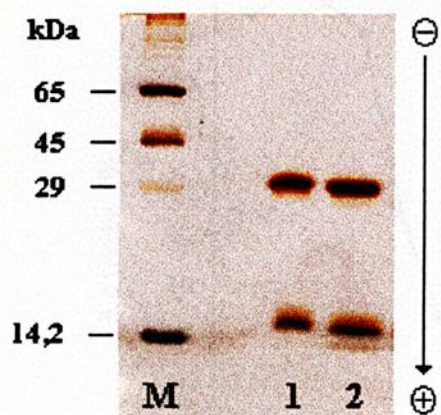
Figure 2. Activity of porcine liver cathepsin D against denatured bovine haemoglobin as a function of pH. Activity is expressed as the percentage of the maximum activity observed at pH 2.5.

The data were fitted with a hyperbolic function using a least-squares fitting routine (curve shown). The fit was done using the Lineweaver-Burk transformation of the Michaelis-Menten plot, which was used to derive the values for the K_m and V_{max} of the reaction.

Figure 3. Michaelis-Menten plot of the initial reaction rates (V_0) measured from the increase in fluorescence due to hydrolysis of a fluorogenic substrate as a function of the substrate concentration, $[S]$. The data were fitted with a hyperbolic function using a least-squares-fitting routine (curve shown). The inset shows the Lineweaver-Burk transformation of the Michaelis-Menten plot, which was used to derive the values for the K_m and V_{max} of the reaction.



(a)



(b)

