

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE PRÓ- HORMÔNIO CONVERTASE 1/3

Aline Aparecida de Souza¹; Marcella Araújo Manfredi²; Wagner Alves de Souza Júdice³

Estudante do Curso de Farmácia; aline.sale@hotmail.com

Estudante do Curso de Doutorado em Biotecnologia; marcella_manfredi@hotmail.com

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; wagnerjudice@gmail.com

Área do Conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: serino-protease, PC1, glicosaminoglicanos, heparina

INTRODUÇÃO

As serino proteases, ou enzimas proteolíticas dependentes de um resíduo de serina para a atividade catalítica, estão largamente representadas na natureza, sendo encontradas em vírus, bactérias e eucariotos (BARRET, 1994). Nos eucariotos, diversas proteínas que passam pela via secretória são sintetizadas como pró-proteínas e sofrem endo ou exo-proteólise. São exemplos clássicos alguns fatores secretados, como a insulina; proteínas de membrana podem sofrer esse tipo de processamento, como é o caso do receptor da insulina ou a proteína gp 160 do HIV (FULLER, *et al.*, 1988). A especificidade das enzimas proteolíticas depende de vários fatores e, no caso das enzimas de processamento intracelular, há compartimentalização intracelular, permitindo assim a co-localização com o substrato, limitando sem dúvida a variedade de moléculas expostas à ação enzimática, juntamente com as condições reguláveis do meio. As SPCs (subtilisin-like proprotein convertases) de mamíferos funcionam ou no ramo regulatório ou constitutivo da via secretória. As convertases PC2 e PC1/3 são as principais formas expressas no sistema neuroendócrino e cerebral, onde elas agem sobre pró-hormônios e precursores neuropeptídicos em vesículas pela via secretória. Pró-hormônio convertase 1/3 (PC1) é membro da subfamília da pró-proteína convertase/kexina das serino proteases, a qual está envolvida na maturação proteolítica de uma variedade de proteínas (SEIDAH *et al.*, 1998). PC1, hidrolisa seus substratos após um par de resíduos básicos (Lys-Arg), embora em um menor número de peptídeos bioativos, hidrólises ocorrem em um único resíduo básico (HUTTON, 1990). Glicosaminoglicanos (GAGs) é um grupo de polissacarídeos lineares de alto peso molecular com várias unidades dissacarídicas repetidas e usualmente ocorrendo em proteoglicanos, incluindo condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato e heparina, queratan sulfato e ácido hialurônico. Tem sido mostrado que a interação de enzimas e glicosaminoglicanos são capazes de modular a atividade de diferentes proteases e também afetar suas estruturas (TERSARIOL *et al.*, 2002). Dados da literatura mostram que as interações macromoleculares de GAGs com proteases são capazes de promover alterações estruturais (ALMEIDA *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2001) proteger contra inativação alcalina, intensificar a atividade catalítica, aumentar a estabilidade protéica (ALMEIDA *et al.*, 1999), e reduzir a inibição protéica por inibidores naturais (LINDSTEDT, KOVANEN, 2001). Estudos demonstraram que GAGs heparina-símile podem modular a atividade de algumas serino proteases e seus inibidores naturais (GETTINS *et al.*, 1996). No caso das cisteíno proteases, mais especificamente em relação à papaína, heparina e heparan sulfat induz a um aumento do conteúdo de α -

hélice o que estabiliza a estrutura da enzima mesmo em pH alcalino (ALMEIDA *et al.*, 1999). A utilização de estudos físico-químicos permite um aprofundamento das etapas do um mecanismo catalítico e especificidade de substratos sob serino proteases. Portanto, o objetivo deste trabalho é expressar, purificar pró-proteino convertases mPC1 e estudar sua atividade cinética.

OBJETIVOS

Expressar, purificar e estudar a atividade cinética da pró-proteino convertase mPC1 utilizando abordagens físico-químicas.

METODOLOGIA

A enzima mPC1 foi expressa e purificada no departamento de Biofísica-UNIFESP e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Vitor de Oliveira. Foram utilizados substratos com fluorescência internamente apagada Abz-peptidil-EDDnp. As cinéticas enzimáticas foram realizadas a 37°C em tampão Bis-Tris 200mM, 0,01% de Triton X-100, 1mM de CaCl₂, pH 7 e a hidrólise dos substratos acompanhada nos comprimentos de onda EX=320nm e EM=420nm em espectrofluorímetro *Hitachi F-2500* e os dados analisados no programa Grafit 5.0. A determinação dos pKas da mPC1 nas diferentes situações de glicosaminoglicanos (GAGs) e substrato foi realizado em tampão universal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio realizado na presença de heparina apresentou um valor de IC₅₀= 12,03±0,66 µM. Pode-se observar que a heparina teve uma ação inibitória sobre a enzima (**FIGURA 1A**). Para corroborar a inibição, foi realizado um ensaio para verificação da supressão da fluorescência pela heparina, onde se utilizou o substrato Abz-peptidil-EDDnp hidrolisado e as mesmas concentrações de heparina do ensaio anterior. A **FIGURA 1B** nos mostra que não ocorreu supressão por parte da heparina no grupo fluorescente, não interferindo no resultado apresentado anteriormente.

Após os ensaios para verificação do comportamento da heparina frente a mPC1, foi realizado ensaios para a determinação dos pKs da enzima na ausência e na presença de 250mM de potássio (KCl). O experimento foi realizado em tampão universal, cobrindo uma faixa de pH variando de 3,5 a 9.

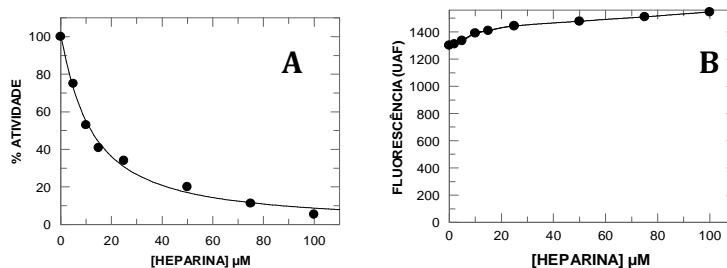


FIGURA 1: Inibição da mPC1 por heparina.

A) Perfil da inibição da protease de processamento mPC1; B) Análise da supressão da fluorescência do grupo ABZ.

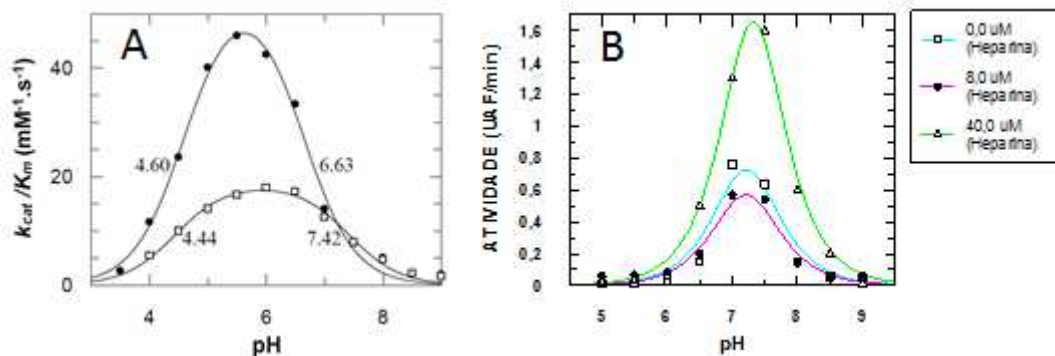


Figura 2: Perfil de pH da hidrólise do substrato fluorescente Abz-SKRSALRDQ-EDDnp pela mPC1. A→Condições: Tampão contendo glicina 25 mM, ácido acético 25 mM, MES 25 mM, Tris-HCl 75 mM, 37°C, na ausência (□) ou na presença (●) de KCl 250 mM. Os parâmetros cinéticos k_{cat}/K_m foram determinados em condições de pseudo-primeira ordem, onde a concentração de substrato foi 10-20 vezes menor que o valor de K_m . Os valores de pK_{e1} e pK_{e2} são mostrados no gráfico. B→ Condições: Tampão contendo glicina 25 mM, ácido acético 25 mM, MES 25 mM, Tris-HCl 75 mM, 250mM de KCl, 37°C, na ausência (□) de heparina ou na presença de heparina nas concentrações de 8μM (●) e 40μM (Δ). As atividades foram determinadas em condições de primeira ordem, onde a concentração de substrato foi 10-20 vezes maior que o valor de K_m .

Pela **FIGURA 2A**, claramente observa-se que o potássio atua aumentando a eficiência catalítica (K_{cat}/K_M) da mPC1 de aproximadamente 15 para $45\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, correspondendo a uma ativação enzimática de 3 vezes. Por outro lado, a presença de potássio afeta muito pouco pK_{e1} deslocando em 0,2 unidades para a direita enquanto sobre pK_{e2} o potássio desloca a curva em 0,79 unidades para a esquerda, isso implica que na presença de potássio a protease mPC1 é mais sensível ao meio alcalino sofrendo uma desprotonação mais precoce comparativamente em ambiente na ausência do potássio.

Na análise da atividade da mPC1 em primeira ordem (**FIGURA 2B**), onde temos saturação de substrato, na ausência e presença de heparina em duas concentrações, 8 e $40\mu\text{M}$, em função do pH, verificamos que baixa concentração de heparina promoveu um decaimento da atividade em relação ao controle ($0,0\mu\text{M}$ de heparina). Nestas condições foram determinados os valores de pK_{es} correspondendo os pK da interação enzima-substrato os quais foram na ausência de heparina $pK_{es1}=6,69\pm 0,13$ e $pK_{es2}=7,74\pm 0,13$, com $8\mu\text{M}$ de heparina obtivemos $pK_{es1}=6,81\pm 0,24$ e $pK_{es2}=7,61\pm 0,25$, e com $40\mu\text{M}$ de heparina verificou-se os valores de $pK_{es1}=6,36\pm 0,11$ e $pK_{es2}=8,28\pm 0,11$.

Dessa forma observa-se que heparina $40\mu\text{M}$ promoveu deslocamento da curva de pH para a direita em 0,54 unidades de pH na presença de 250mM de potássio. Ou seja, heparina promoveu uma maior resistência da mPC1 em ambientes alcalinos mesmo na presença de potássio o qual, sem heparina, torna a protease mais suscetível à alcalinidade, assim, heparina foi capaz de modular a atividade da mPC1.

Uma vez que heparina é capaz de modular a atividade da mPC1 realizamos o acompanhamento da fluorescência intrínseca do triptofano em diferentes concentrações deste GAG. A **FIGURA 3** mostra que não houve alterações das curvas nas diferentes concentrações de heparina ($0-100\mu\text{M}$). Esses dados nos informa que não houve alterações nos posicionamentos dos triptofanos na estrutura de forma mensurável e que a ação da heparina deve estar localizada mais diretamente no sítio catalítico.

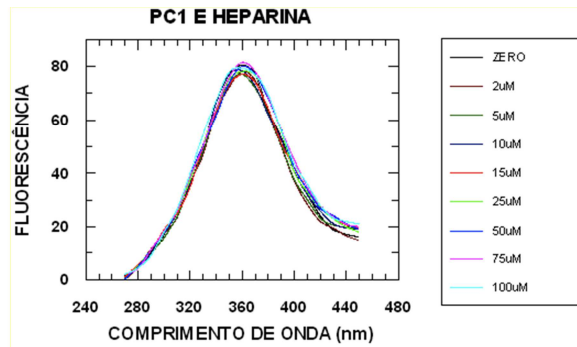


Figura 3: Fluorescência intrínseca da mPC na presença de heparina. O monitoramento de triptofano da mPC1 foi realizado em tampão Bis-Tris 50mM, pH 7 em comprimento de onda de excitação de 295nm e emissão no intervalo de 270 a 410nm.

CONCLUSÃO.

Heparina é capaz de inibir a atividade enzimática da protease de processamento mPC1. Na presença de potássio verificou-se deslocamento do perfil da curva de pH tornando a enzima mais label em meio alcalino, entretanto, a presença de 40uM de heparina foi capaz de reverter esse efeito do potássio inclusive promovendo uma maior resistência em meio alcalino. A modulação da atividade da mPC1 deve estar ocorrendo diretamente no sítio catalítico uma vez que não se observou variação da fluorescência intrínseca do triptofano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P.C.; NANTES, I. L.; RIZZI, C. C. A.; JUDICE, W. A.; CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; NADER, H. B., TERSARIOL, I. L. S. *J. Biol.Chem.* v. 274, p. 30433-30438,1999.
- ALMEIDA, P.C.; NANTES, I. L.; CHAGAS, J. R.; RIZZI, C. C. A.; FALJONNI-ALARIO, A.; CARMONA, E.; JULIANO, L.; NADER, H. B.; TERSARIOL, I. L. S. *Biol.Chem.* v. 276, p. 944-951, 2001.
- BARRETT, A. J. *Methods Enzymol.*, v.244, p.1-15, 1994.
- FULLER, R. S.; STERNE, R. E.; THORNER, J. *Annu. Rev. Physiol.* v. 50, p. 345-362, 1988.
- GETTINS, P. G. W.; PATSTON, P. A.; OLSON, S. T. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 33062-3306,1996
- HUTTON J.C. *Curr. Opin. Cell. Biol.* v. 2, 1131-1142, 1990.
- LINDSTEDT, L.; LEE, M.; KOVANEN, P. T. *Atherosclerosis*, v. 155, 87-97, 2001.
- SEIDAH, N.G., MBIKAY, M., MARCINKIEWICS, M., CHRETIEN, M. *Proteolytic and Cellular Mechanisms in Prohormone Processing* p. 49-76, 1998.
- TERSARIOL, I.L.S., PIMENTA, D.C., CHAGAS, J.R., ALMEIDA, P.C. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 35, p. 135-144, 2002.