

# EXPRESSÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DA ATIVIDADE CINÉTICA DE PRÓ-PROTEÍNO CONVERTASES: UMA ABORDAGEM FÍSICO-QUÍMICA

Jéssica Satie Hosoe<sup>1</sup>; Marcella Araújo Manfredi<sup>2</sup>; Wagner Alves de Souza Júdice<sup>3</sup>.

Estudante do curso de Farmácia; e-mail: satii.h@hotmail.com<sup>1</sup>

Doutoranda na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: marcella\_manfredi@hotmail.com<sup>2</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com<sup>3</sup>

Área de Conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Pró-proteína convertases, Kex2, Glicosaminoglicano, Heparina, Modulação

## INTRODUÇÃO

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; ROUILLE *et al.*, 1995; SEIDAH *et al.*, 1994).

A Kex2 ou kexina é uma enzima proteolítica transmembranar, Ca<sup>2+</sup> dependente, descrita originalmente em *Saccharomyces cerevisiae*, pertencente ao grupo das serino-proteases. Constitui o modelo para uma sub-família particular dentro da família das subtilisinas, a sub-família das Kexinas (BRENNER *et al.*, 1994). As enzimas homólogas nos mamíferos foram chamadas de Furina (EC 3.4.21.75) (NAKAYAMA, 1994) e proteases conversoras de pró-hormônios (PCs), que incluem da PC1 até a PC8 (SEIDAH, CHRETIEN, 1994). Uma característica funcional comum a essas proteases é a ativação de precursores de polipeptídeos biologicamente ativos ou a ativação de precursores de proteínas secretadas ou transmembranais, através da hidrólise seletiva após um par de resíduos básicos.

Tem sido mostrado que a interação de enzimas e glicodaminoglicanos são capazes de modular a atividade de diferentes proteases e também afetar suas estruturas (TERSARIOL *et al.*, 2002).

## OBJETIVOS

Expressar, purificar e caracterizar a atividade cinética da enzima de processamento Kex2, uma serino protease, utilizando abordagens físico-químicas.

## METODOLOGIA

Para expressão da enzima Kex2, utilizou-se da cepa AFY 490 de *Saccharomyces cerevisiae* contendo o plasmídeo CB023 - pG5-KEX2ΔC3. Esta cepa foi plaqueada num meio mínimo para seleção de células resistentes, contendo: meio YNB (Yeast nitrogen base W/O amino acids) 6,7g/L (0,67%), bacto agar 20g/L (2%), dextrose 25g/L (2,5%), água destilada para um litro de solução. O plaqueamento do *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado adicionando-se às placas os seguintes complementos: Histidina 2,4mg/mL, Leucina 3,6mg/mL, Adenina 1,2mg/mL e L-Triptofano 2,4mg/mL. Esses complementos são importantes para proporcionar o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*. Essa mistura foi homogeneizada sobre a própria placa e após a secagem, foi realizado o esfregado de material contendo a cepa AFY 490. A partir do plaqueamento, realizou-se a expansão da cepa e expressão da protease Kex2, para isso preparou-se um meio líquido completo (Full media contendo YNB + Gluc + Try/Ade - HCl) adicionando-se 0,85g de YNB w/o acids, 0,66g de NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 2,5g de NH<sub>4</sub>Cl, 15mL de Bis-Tris.HCl 1M pH 7, 20mL de Dextrose 50%, 12,5mL de Casamino acids 20%, 10% de Glicerol, e o volume foi

completado com água destilada para 500mL e em seguida a mistura foi autoclavada. Preparou-se uma solução contendo 240mg de hidrocloreto de adenina (Ade.HCl), 120mg de L-triptofano em volume final de 10mL de água esterilizada, filtrando-se a mistura em sistema estéril. Tomou-se 5mL dessa solução e adicionou-se ao meio líquido YNB. Da placa de cultura contendo colônias da cepa AFY490 retirou-se uma fração desta e posteriormente foi misturada a uma alíquota de 10mL do meio líquido completo seguindo de agitação constante a 180 RPM a 30°C. Quando nessa alíquota o crescimento celular atingiu o desejado, transferiu-se para o restante do meio sob as mesmas condições (180 RPM a 30°C). O crescimento do número de células foi acompanhado por densidade óptica (OD) do meio medindo-se a absorbância em comprimento de onda de 600nm até uma concentração de 3,0 (assumindo 1 OD = 10<sup>7</sup> células). Após o processo de expressão da enzima Kex2, uma alíquota da amostra foi separada para a realização da dosagem de proteínas totais pelo Método de Bradford. Em uma segunda etapa, foi realizada a medida de condutividade da amostra e do tampão de partida, Bis-Tris.HCl 40mM, pH 7, 10% (v/v) glicerol. Para a purificação da protease contida no sobrenadante, o ensaio foi realizado através de um sistema de cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna contendo 9mL de resina aniônica DEAE-Sepharose devidamente ativada em 100mL de solução NaCl 0,2M com NaOH 1M e equilibrada com 150mL de tampão Bis-Tris.HCl 40mM, pH 7, 10% (v/v) glicerol para início da injeção. O sistema foi mantido em câmara fria a 4°C e foi realizada a aplicação da amostra na coluna e o material não retido, foi guardado. O material retido foi eluído por gradiente de NaCl (0-1M) sendo utilizado como tampão A 25mL de tampão Bis-Tris.HCl 40mM, pH 7, 10% (v/v) glicerol e como tampão B 25mL de tampão Bis-Tris.HCl 40mM, NaCl 1M, pH 7, 10% (v/v) glicerol. A enzima Kex2 foi eluída entre 400 e 750mM de NaCl. Foram coletadas alíquotas de 1mL e guardado a -20°C. Posteriormente, a coluna foi lavada com 100mL solução tampão Bis-Tris.HCl 40mM, NaCl 1M pH 7, 10% (v/v) glicerol, equilibrada com 100mL de solução etanol 20% e guardada a 4°C. Foram realizados dois processos de injeção de amostra na resina, e coletados cerca de 40 alíquotas de 1mL, que posteriormente passaram pelo processo de leitura de absorbância em nanoespectrofotômetro *NanoDrop* ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ). Foi realizado o perfil cromatográfico das amostras coletadas para indicar as alíquotas com maior concentração proteica. Posteriormente, estas alíquotas foram concentradas em aproximadamente 10 vezes, usando filtros AMICON (NWNWL 10000), a 4°C. A enzima retida foi então coletada e alíquotas foram separadas para posterior realização de eletroforese e ensaios para verificação da atividade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de expressão as clones de *S. cereviceae* apresentaram crescimento de acordo com a Figura 1A com densidade óptica de aproximadamente 3,0 de absorbância.

A purificação proteína mostrou que a Kex2 foi eluída em concentração de 500mM de NaCl (Figura 1B) sendo realizado o “pool” entre os tubos 20 a 31.

A análise do gel de SDS-PAGE (FIGURA 1C) mostrou uma banda em 120kDa correspondendo à protease não processada e uma banda de 58kDa correspondendo à Kex2 matura sendo as demais bandas correspondentes aos fragmentos do processamento da pré-pró-enzima. Os valores de massas moleculares foram estabelecidos a partir dos padrões de logaritmo das massas moleculares em função da mobilidade eletroforética (Figura 1D) a partir da equação da reta  $y = -0,1570 + 2,2842x$ .

Os estudos de cinética enzimática foram realizados frente a glicosaminoglicanos na ausência e presença de potássio. O ensaio realizado na ausência de potássio apresentou um valor de  $IC_{50} = 69,2\mu\text{M}$  (Figura 2A) enquanto que, na presença de potássio o valor de  $IC_{50} = 290,0\mu\text{M}$  (FIGURA 2B). Pode-se observar que a ausência de potássio favorece a ligação da heparina na enzima. O decaimento da atividade observada deve-se a ação da heparina sobre a protease Kex2 e não supressão da fluorescência do grupamento Abz (Figura 2C).

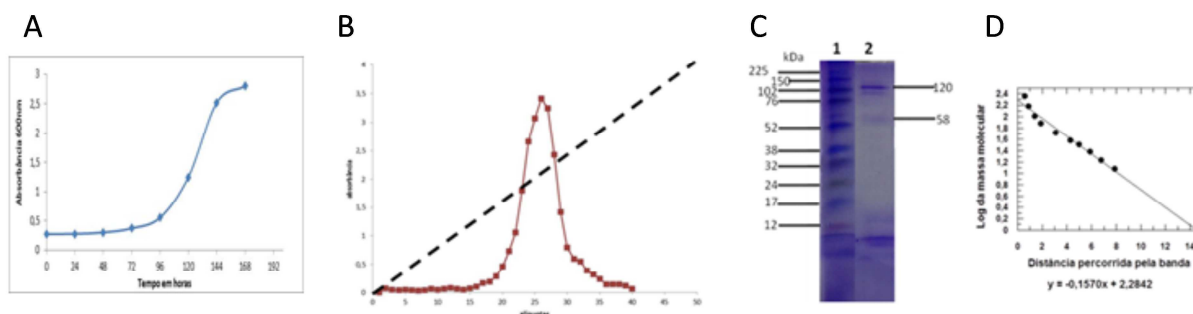


FIGURA 1: Expressão e purificação da kex2.

A) Curva de crescimento da cepa AFY490 (eixo y) em função do tempo em horas (eixo x). As medidas foram tomadas em intervalo de 24 horas; B) Perfil cromatográfico contendo o gradiente de NaCl; C) SDS-PAGE de 15%; D) Curva padrão do log da massa molecular em função do movimento eletroforético do padrão.

Após os ensaios para verificação do comportamento da heparina frente a kex2, foi iniciado os ensaios para a determinação dos pK<sub>a</sub>s da enzima. O experimento foi realizado em tampão universal, contendo glicina 25 mM, ácido acético 25 mM, MES 25 mM, Tris-HCl 75 mM a 37°C, cobrindo uma faixa de pH variando de 3,5 a 11. Os ensaios foram realizados à temperatura de 37°C medindo-se a velocidade máxima com concentração de substrato Abz-peptidil-EDDnp 10 vezes o valor de K<sub>M</sub>.

A partir da figura 4 foi possível determinar os valores de pK<sub>es1</sub> = 5,58 ± 0,05 e de pK<sub>es2</sub> = 9,40 ± 0,05, o primeiro correspondendo ao evento de protonação da enzima e o segundo ao processo de desprotonação, sendo que a Kex2 apresentou sua atividade máxima no pH ótimo de 7,5.

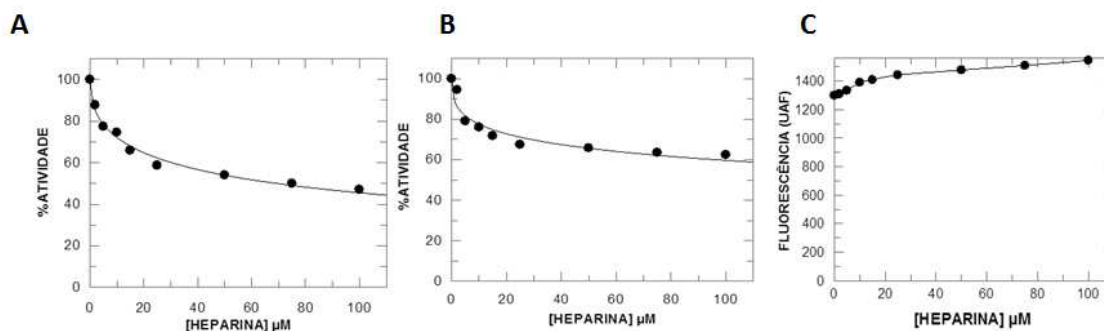


FIGURA 2: Inibição da atividade da protease Kex2 em função de heparina na ausência e presença de potássio.

- A enzima Kex2 foi ensaiada em tampão nas seguintes condições: Bis-Tris 200mM, 0,01% de Triton X-100, 1mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7. O gráfico apresenta os valores obtidos da atividade enzimática em porcentagem (eixo y) e as diferentes concentrações de heparina (eixo x).
- A enzima Kex2 foi ensaiada em tampão nas seguintes condições: Bis-Tris 200mM, 0,01% de Triton X-100, 1mM de CaCl<sub>2</sub>, 150mM de KCl, pH 7. O gráfico apresenta os valores obtidos da atividade enzimática em porcentagem (eixo y) e as diferentes concentrações de heparina (eixo x).
- Ensaio para verificação de supressão da fluorescência do grupamento Abz (ácido orto-aminobenzóico) do substrato pela heparina, onde: no eixo x temos as diferentes concentrações de heparina e no eixo y a fluorescência em UAF (unidades arbitrárias de fluorescência).

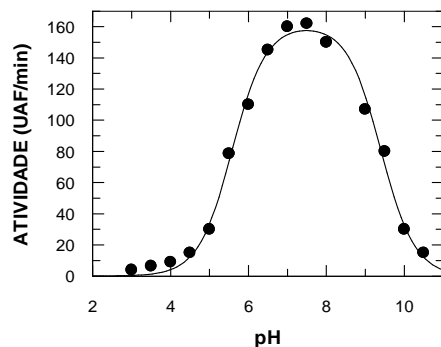


FIGURA 3: Perfil de pH da hidrólise do substrato fluorescente Abz-SKRSALRDQ-EDDnp pela kex2.

## CONCLUSÃO

Estabelecemos em nosso laboratório a expressão da protease de processamento Kex2, entretanto necessitamos promover um melhor rendimento em nossos processos.

Verificamos que a ausência de potássio favorece a ligação da heparina na enzima atuando este glicosaminoglicano como inibidor da atividade enzimática. O que foi confirmado pelo fato da heparina não estar suprimindo a fluorescência do grupo fluorescente Abz, assim sendo, o decaimento da atividade deve-se de fato a inibição e não supressão. Em relação à atividade enzimática no contexto do pH, a kex2 apresenta sua máxima atividade em pH alcalino ao redor de 7,5, entretanto, o topo da curva é alargado permitindo uma faixa de trabalho mais amplo entre 6,5 a 8,5. Heparina foi capaz de modular a atividade da kex2 na presença de cloreto de potássio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRET A.J., RAWLINGS N.D. *Biol. Chem.*, v. 382, p. 727-733, 2001.

BRENNER, C., BEVAN, A., and FULLER, R.S. *Methods Enzymol.* 244:152-167, 152-167, 1994.

FULLER, R.S., STERNE, R.E., and THORNER, J. *Annu. Rev. Physiol.* 50, 345-362, 1988.

NAKAYAMA, K. *Methods Enzymol.* 244:167-75, 167-175, 1994.

ROUILLE, Y., DUGUAY, S.J., LUND, K., FURUTA, M., GONG, Q., LIPKIND, G., OLIVA, A.A.J., CHAN, S.J., AND STEINER, D.F. *Front. Neuroendocrinol.* 16, 322-361, 1995.

SEIDAH, N.G. and CHRÉTIEN, M. *Methods Enzymol.* 244:175-88, 175-188, 1994.

SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., and DAY, R. *Biochimie* 76, 197-209, 1994.

TERSARIOL, I.L.S., PIMENTA, D.C., CHAGAS, J.R., ALMEIDA, P.C. (2002) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 135-144.