

# EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DE CISTEÍNO PROTEASES LISSOSSOMAIS

Mariana Cristina Kabakura do Amaral Lima<sup>1</sup>; Alyne Alexandrino Antunes<sup>2</sup>; Wagner  
Alves de Souza Júdice<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: marikabakura@hotmail.com<sup>1</sup>  
Doutoranda da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: alexandrinoaa@gmail.com<sup>2</sup>  
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br<sup>3</sup>

Área do Conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: cisteíno-protease, catepsina; glicosaminoglicanos; heparina

## INTRODUÇÃO

Catepsinas são enzimas que estão distribuídas entre as famílias das aspartil, serino e cisteíno proteases. Para as cisteíno proteases lisossomais, particularmente em humanos, a família *Catepsina* apresenta um total de 11 membros (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, X) que compartilham um sítio ativo conservado formado por resíduos de Cys (cisteína), His (histidina) e Asn (asparagina), que compõem a tríade catalítica. Os membros desta família apresentam alta similaridade de sequência de aminoácidos e alta similaridade estrutural (MOHAMED, SLOANE, 2006).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) fazem parte de 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. Estudos demonstram que na interação de enzimas com GAGs, estes são capazes de modular a atividade de diferentes proteases e também afetar suas estruturas (TERSARIOL *et al*, 2002). No caso das cisteíno proteases, mais especificamente em relação à papaína, a heparina e heparan sulfato induzem a um aumento do conteúdo de  $\alpha$ -hélice, o que estabiliza a estrutura da enzima, mesmo em pH alcalino (ALMEIDA *et al*, 1999).

## OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo realizar a expressão e purificação das catepsinas lisossomais S e V, e realizar estudos da atividade cinética destas catepsinas, utilizando abordagens físico-químicas, como a influência de GAGs e do pH na atividade destas enzimas.

## METODOLOGIA

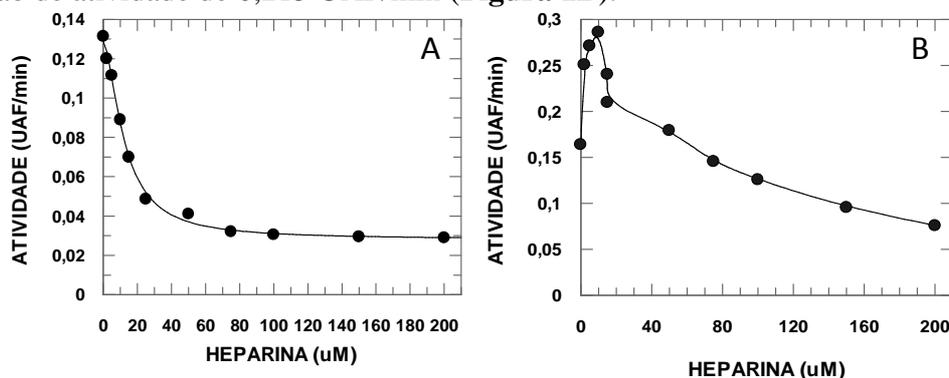
Expressão e purificação: As catepsinas S e V recombinantes humanas foram expressas em *Pichia pastoris* de acordo com a metodologia descrita por Linnevers e colaboradores, 1997. Os clones foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da University of British Columbia, Vancouver, Canadá. Posteriormente as enzimas foram purificadas através de um sistema de troca iônica, utilizando a resina catiônica HiTrap SP HP (Sephacrose High Performance) 1 mL (*GE Life Sciences*), utilizando os tampões acetato de sódio 50mM, pH 5,0 e acetato de sódio 50 mM + NaCl 1M, pH 5,0.

Cinética enzimática: foi usado tampão acetato de sódio 100 mM, com 5mM de EDTA, pH 5,5 para catepsina V e tampão fosfato de sódio 100mM com 1mM de EDTA, pH 6,0

para catepsina S. Substrato Z-FR-MCA foi utilizado como sonda fluorescente e sua hidrólise monitorada em espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS55 e os parâmetros cinéticos analisados por regressão não linear usando o programa Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltda).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Inibição enzimática:** objetivando verificar o efeito da heparina sobre a atividade das catepsinas foi realizado o teste de inibição enzimática da catepsina S frente a heparina, obtendo-se um valor de  $IC_{50} = 12,34 \pm 0,7 \mu M$  (**Figura 1A**). Em relação à catepsina V, notou-se que em baixas concentrações de heparina ocorre um aumento da atividade enzimática ao redor de 75% com  $10 \mu M$  de heparina e a partir disso verificou-se um decaimento da atividade em pH 5,5 de forma contínua até  $200 \mu M$  de heparina, sendo que entre a atividade máxima em  $10 \mu M$  de heparina e a mínima em  $200 \mu M$  há uma variação de atividade de  $0,215$  UAF/min (**Figura 1B**).

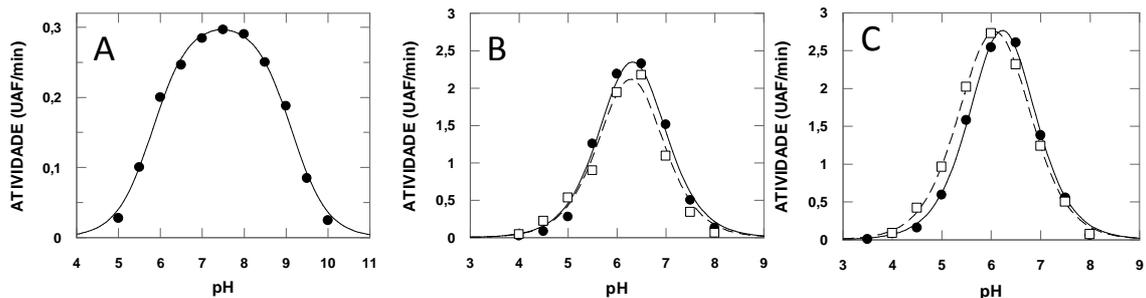


**Figura 1** - Atividade enzimática da catepsina S e V em função de heparina.

- Catepsina S → Condições: tampão acetato de sódio 100 mM, 1mM de EDTA, pH 7,0, 2mM de DTT, 37°C. Substrato ZFRMCA (concentração de  $7,4 \mu M$  final na cubeta).  $IC_{50} = 12,34 \pm 0,7 \mu M$ .
- Catepsina V → Condições: tampão acetato de sódio 100 mM, 1mM de EDTA, pH 5,5 e 2mM de DTT, 37°C. Substrato ZFRMCA (concentração de  $7,4 \mu M$  final na cubeta).

**Análise da atividade enzimática de em função de GAG e pH:** foi observado um pico de atividade em pH 7,5 sendo determinados os valores de  $pK_{es}$ , que definem que nas condições experimentais estamos estudando o efeito de pH do complexo enzimático enzima-substrato, correspondendo ao parâmetro  $es$ . Os valores determinados foram  $pK_{es1} = 5,82 \pm 0,05$  correspondendo à porção ácida, onde temos o advento da protonação; e  $pK_{es2} = 9,12 \pm 0,05$  correspondendo à porção básica, onde temos o advento da desprotonação (**Figura 2A**). Em relação aos perfis de pH da catepsinas V (**Figura 2B**) observamos que a curva apresentou-se mais estreita tanto na base quando no ápice do que à da catepsina S e tendo sua atividade máxima em pH ~ 6,3, contudo, a presença de  $40 \mu M$  de heparina não promoveu alterações significativas nos valores de  $pK_{es1}$  e  $pK_{es2}$ .

Para compreender a estabilidade da catepsina V em função do pH com variação de heparina, foi realizado o experimento apresentado na **Figura 3**, na qual a atividade enzimática da catepsina V foi monitorada em tampão universal pH 6,5, variando a [heparina] de 0 a  $100 \mu M$ . Interessantemente não se observou a ativação da enzima com  $10 \mu M$  em relação ao controle sem heparina, indicando que outros eventos poderiam estar envolvidos no processo de redução da atividade.

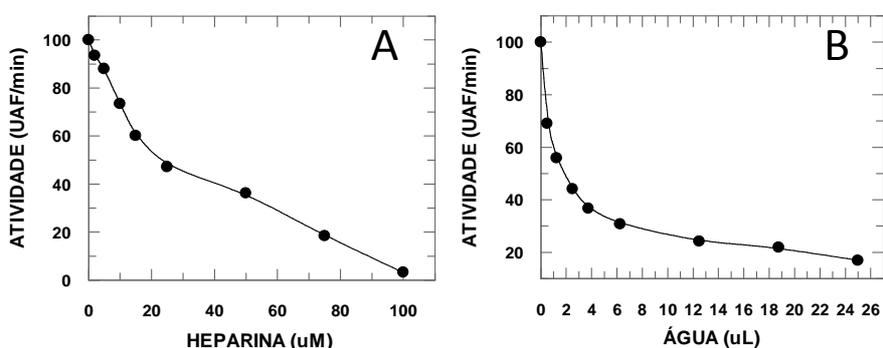


**Figura 2** – Perfil de pH da atividade da catepsina S e V.

A: Catepsina S na ausência de heparina. Valores de pKs determinados:  $pK_{es1}=5,82 \pm 0,05$  e  $pK_{es2}=9,12 \pm 0,05$  (sem heparina). B: Catepsina V na ausência de heparina (●), na presença de 40μM de heparina (□). Valores de pKs determinados:  $pK_{es1}=5,99 \pm 0,11$  e  $pK_{es2}=6,64 \pm 0,11$  (sem heparina),  $pK_{es1}=6,01 \pm 0,05$  e  $pK_{es2}=6,57 \pm 0,05$  (heparina 40μM). Condições: tampão universal contendo 25mM de MES, 25mM de glicina, 25mM de acetato de sódio e 75mM de Trizma-base, 37°C. Substrato ZFRMCA (concentração de 7,4μM final na cubeta). C: Condições: tampão universal contendo 25mM de MES, 25mM de glicina, 25mM de acetato de sódio e 75mM de Trizma-base, 37°C. Nesta condição este tampão abrange uma ampla faixa de pH variando de 3 a 11. Substrato ZFRMCA (concentração de 7,4μM final na cubeta). Heparina 10uM (□), Heparina 200uM (●). Valores de pKs determinados:  $pK_{es1}=5,98 \pm 0,04$  e  $pK_{es2}=6,47 \pm 0,04$  (200μM de heparina),  $pK_{es1}=5,58 \pm 0,06$  e  $pK_{es2}=6,56 \pm 0,06$  (10μM de heparina).

Realizou-se o experimento apresentado na **Figura 3A**, em que a atividade enzimática foi acompanhada apenas com a adição de água milli-Q, uma vez que a heparina foi solubilizada também em água milli-Q observando-se decaimento da atividade. Como os experimentos da **Figura 3A, B** foram realizados por meio de adição de heparina e água no mesmo sistema reacional, temos a variável tempo atuando nesse sistema. Apesar de na **Figura 3A** termos heparina em μM, o volume adicionado é compatível ao volume de água milli-Q utilizado na **Figura 3B**.

Assim, temos que em pH 6,5 a catepsina V apresenta uma maior instabilidade molecular caracterizando redução da atividade, contudo a presença de heparina reduz a velocidade de perda estrutural quando se compara a **Figura 3A e B**. Esses dados são compatíveis com o verificado com a papaína na presença de heparina, onde em pH alcalino, a heparina promoveu maior estabilidade estrutural (BARRETT *et al*, 1982).



**Figura 3** - Análise da atividade da catepsina V em pH 6,5.

A: Variação da concentração de heparina (0 a 100μM); B: Variação do volume de água Milli-Q, com volume correspondente à adição de heparina. Condições: tampão universal contendo 25mM de MES, 25mM de glicina, 25mM de acetato de sódio e 75mM de Trizma-base, pH 6,5, 37°C. Substrato ZFRMCA (concentração de 7,4μM final na cubeta).

## **CONCLUSÕES**

O GAG (heparina) foi capaz de modular a atividade enzimática das catepsinas S e V, sendo que baixas concentrações de heparina promovem um aumento da atividade da catepsina V até 10 $\mu$ M, e acima disso temos um processo de inibição. Em pH 6,5 a catepsina V apresenta maior instabilidade, o que foi observado pelo decaimento da atividade quando monitorada apenas com a adição de água, porém, a presença de heparina é capaz de promover uma proteção relativa, pois observa-se que o decaimento da atividade foi menos acentuado na presença deste GAG, o que é corroborado pelo descolamento da curva de pH para região menos ácida. Comparando as curvas de pH das catepsinas S e V verificou-se que a primeira apresenta perfil mais largo com pH ótimo em meio básico enquanto que a segunda prefere ambientes mais ácidos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA, P.C.; NANTES, I.L.; RIZZI, C.C.A.; JUDICE, W.A.; CHAGAS, J.R., JULIANO L, NADER HB & TERSARIOL ILS. Cysteine proteinase activity regulation. A possible role of heparin and heparin-like glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274; p. 30433-30438, 1999.

MOHAMED, M.M.; SLOANE, B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v.6, p.764-775, 2006.

TERSARIOL, I.L.S.; PIMENTA, D.C.; CHAGAS, J.R.; ALMEIDA, P.C. Proteinase activity regulation by glycosaminoglycans. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 135-144, 2002.