

CARACTERIZAÇÃO DE POTENCIAIS INIBIDORES PARA A THIMET OLIGOPEPTIDASE

Thaís Louise Silva Fortunato¹; Tayná Torino Mendes Crepaldi²; Maurício Ferreira Marcondes Machado³

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: thaislsfortunato@gmail.com¹

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: taynamedes@hotmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br³

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: thimet, inibidores, cinética

INTRODUÇÃO

A oligopeptidase thimeti oligopeptidase (TOP, EC 3.4.24.15), é uma metalo-oligopeptidase presente em praticamente todos os tecidos. O mecanismo catalítico das metalopeptidases em geral ainda não é totalmente esclarecido, porém a partir da resolução da estrutura cristalográfica da TOP (Ray e cols., 2004), aliados a estudos cinéticos destas peptidases realizados anteriormente por nosso grupo, inclusive contendo mutações sítio dirigidas, sugerem que alguns resíduos próximos ao centro catalítico interagem com o substrato sendo importante para a interação entre enzima e substrato (Oliveira e cols., 2003; Machado e cols., 2007; Machado e cols., 2010). A possui uma alça flexível próxima ao centro catalítico desta peptidase, esta alça é formada por 13 resíduos sendo quatro deles resíduos de glicina (599, 603, 604 e 611), que confere a flexibilidade a esta alça, também são encontrados quatro resíduos de tirosina (605, 609, 610 e 612), os resíduos Tyr605 e Tyr612 já foram estudados anteriormente por nosso grupo de pesquisa em trabalhos com mutações sítio dirigidas, e verificou-se que estes dois resíduos interagem diretamente com o substrato. A partir da comparação da estrutura 3-D da TOP com as estruturas de duas oligopeptidases homologas a ela (ACE-2 e Dcp), porém que foram cristalizadas complexadas com substrato ou inibidor, ficou demonstrado que essas oligopeptidases sofrem uma grande mudança conformacional no momento da catálise enzimática rearranjando os resíduos destas enzimas na interação com o substrato. A partir destes dados nossa proposta de trabalho é que alguns resíduos da TOP interagem com o substrato e/ou inibidor formando o complexo tetraédrico e estabilizando o complexo enzima-substrato para que ocorra a catálise. Neste projeto ensaiamos diversos compostos que agem como potenciais inibidores seletivos para a TOP.

OBJETIVOS

Caracterização de potenciais inibidores da Thimet oligopeptidase.

METODOLOGIA

Foi realizado primeiramente a triagem de compostos derivados de Flavonoides (IC) e benzofenonas (FB), onde foi encubada 20 nM da enzima em 1 mL de tampão de Tris 50 mM, NaCl 100 mM, com pH ajustado a 7,4 e a 37°C, posteriormente adicionou-se 3 µM de substrato (Abz-GFSAFRQ-Eddnp) e a velocidade da hidrólise foi monitorada em um espectrofluorímetro ajustado a fendas de excitação e emissão à 5 e 5 nm com fendas ajustadas para $\lambda_{em} = 420\text{nm}$ e $\lambda_{ex} = 320\text{nm}$. Utilizou-se cubetas de caminho óptico de 10mm com volume final de 2mL. Para verificar o efeito dos compostos sobre a atividade

da enzima, as condições citadas foram mantidas, mas adicionando-se após o tempo de encubação 10 ou 100 μM os compostos com a enzima sem a presença de inibidor calculamos a porcentagem representativa da velocidade remanescente para cada composto. Após a feita a triagem verificou-se a interferência do DTT sobre a atividade inibitória, onde as condições de ensaio foram mantidas, adicionando durante a pré-encubação 0,5 μM de DTT. Após a realização destes dois testes, realizou-se o teste de IC₅₀ para verificar o cálculo da potência inibitória. Após o cálculo da potência inibitória realizou-se a cinética enzimática para verificar o mecanismo de ação dos inibidores, O mesmo foi realizado para concentrações de 2mM, 4mM, 6mM e 8mM de inibidor para ver o comportamento frente as diferentes concentrações.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Realizou-se uma triagem inicial com os 15 compostos sintéticos derivados de flavonoides (IC) e benzofenonas (FB). Observamos que os compostos FB1-10, FB1-11, FB1-23, IC-3 foram os mais efetivos para a TOP tendo inibido totalmente a atividade proteolítica desta enzima na concentração de 10 mM (Figura 1).

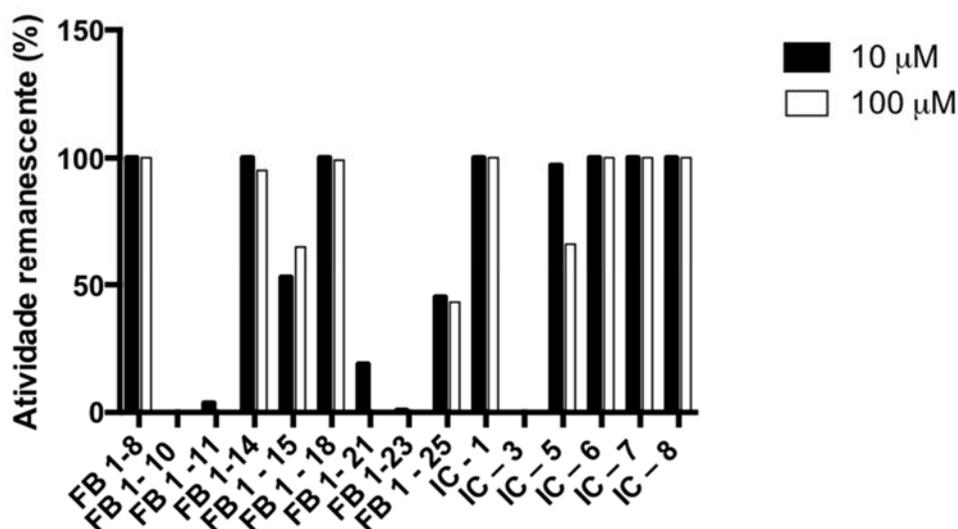


Figura 1. Triagem dos Compostos FB e IC sobre a atividade da TOP.

Testamos a ação inibitória do agente redutor DTT, e somente o composto FB1-23 foi capaz de inibir totalmente a atividade da TOP na concentração de 10 μM , porém os compostos FB1-10 e FB1-11 inibiram totalmente a atividade da TOP na concentração de 100 μM . Para confirmarmos a inibição dos compostos de benzofenonas, ensaiamos sua ação na presença e ausência de DTT, onde FB1-11 teve sua inibição totalmente revertida pelo DTT e possivelmente está agindo sobre as cisteínas de superfície da enzima de forma alostérica, já os compostos FB1-10 e FB1-23 não tiveram sua atividade revertida pelo DTT demonstrando serem inibidores mais efetivos para a TOP. Com os inibidores que se destacaram partimos para o cálculo do potencial inibitório (IC₅₀). Na figura 2A, observa-se que conforme a concentração de inibidor aumenta, a velocidade de atividade enzimática cai, assim consideramos que inibidor FB1-10 em baixas concentrações (14 μM) consegue reduzir a atividade enzimática da TOP pela metade, já o inibidor FB1-23, o teste foi realizado nas mesmas condições e concentrações do inibidor FB1-10 e apresenta os resultados na figura 2B, após analisarmos os resultados, pode-se concluir que em baixas concentrações (9,6 μM) o mesmo inibe metade da atividade enzimática da Thimet oligopeptidase (TOP).

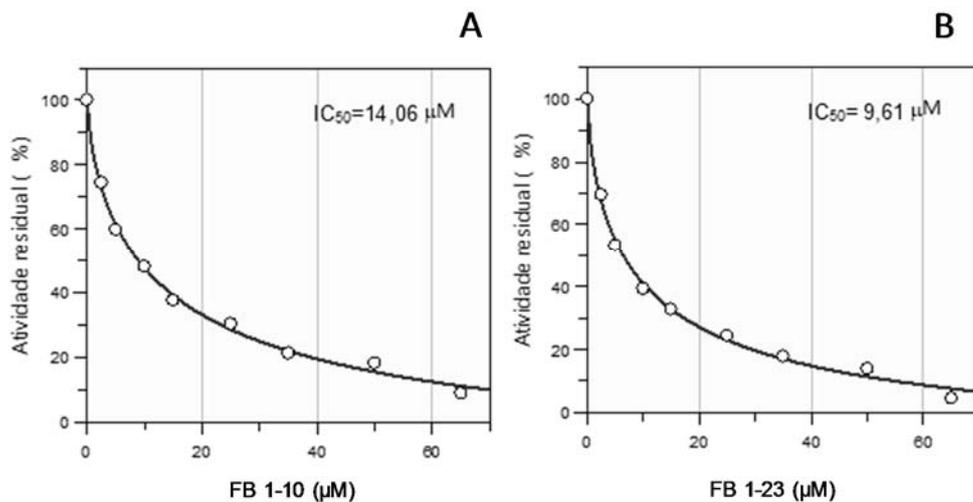


Figura 2: IC-50 do inibidor FB1-23.

Realizamos o mecanismo de inibição do mesmo realizando cinéticas enzimáticas em diferentes concentrações destes compostos como demonstrado na a figura 3 demonstra que a partir do plote dos inversos as retas não se cruzam nem no eixo X e tendem a se cruzar no eixo Y o que demonstra uma tendência que ambos compostos se tratam de inibidores competitivos.

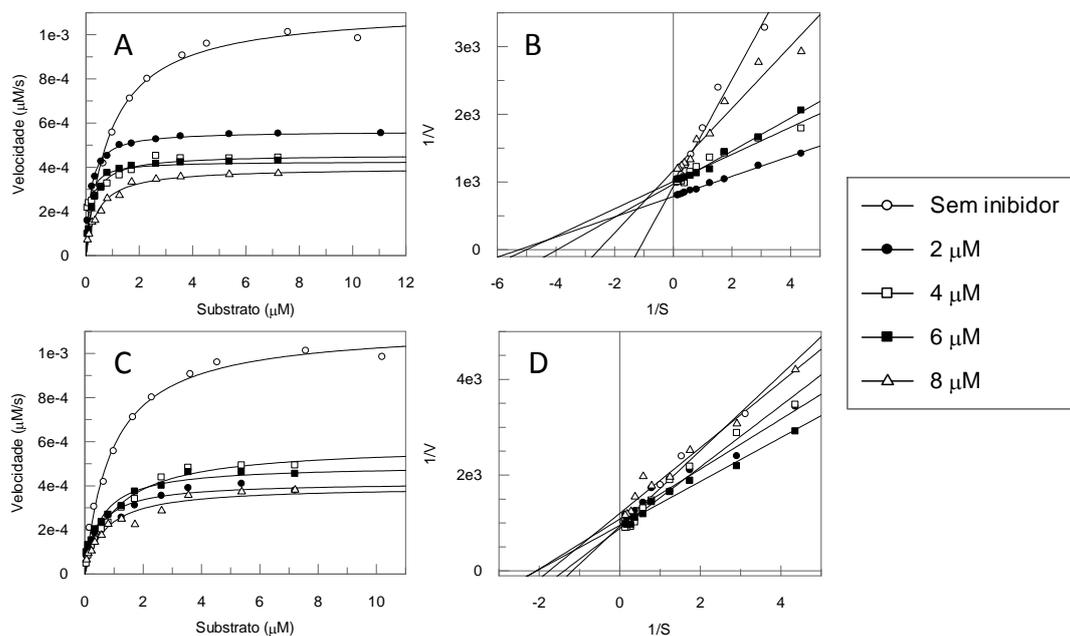


Figura 3: Mecanismo de inibição dos compostos (A e B) FB1-10 e (C e D) FB1-23.

CONCLUSÕES

De todos os compostos ensaiados verificamos que os derivados de benzofenonas FB1-10 e FB 1-23 foram mais efetivos como inibidores da TOP com uma tendência que ambos compostos se tratam de inibidores competitivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MACHADO, M. F. e cols. Catalytic properties of thimet oligopeptidase H600A mutant. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, n. 2, p. 429-33, Apr 02 2010.

MACHADO, M. F. e cols. The role of Tyr605 and Ala607 of thimet oligopeptidase and Tyr606 and Gly608 of neurolysin in substrate hydrolysis and inhibitor binding. **Biochem J**, v. 404, n. 2, p. 279-88, Jun 01 2007.

OLIVEIRA, V. e cols. A structure-based site-directed mutagenesis study on the neurolysin (EC 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) catalysis. **FEBS Lett**, v. 541, n. 1-3, p. 89-92, Apr 24 2003.

RAY, K. e cols. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. **J Biol Chem**, v. 279, n. 19, p. 20480-9, May 07 2004.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, FAEP e CNPq