

Sondas fluorescentes para o estudo cinético da proteína dissulfeto isomerase

Altamir Fernandes de Oliveira (PG), Pricila de Figueiredo Reis (IC), *Tessa Martins de Carvalho Carneiro (IC), Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão (PQ)

Tessamartins@hotmail.com

Palavras Chave: PDI, eosina isotiocianato, GSSG.

Introdução

A proteína dissulfeto isomerase (PDI, E.C. 5.3.1.4), pertencente à classe das chaperonas, com ação catalítica na formação e/ou reposicionamento de pontes dissulfeto¹. Um dos desafios em estudar a catalise da PDI é a falta de ensaios sensíveis que possam detectar baixa atividade enzimática em preparação de amostras purificadas e/ou extratos celulares/tissulares brutos².

Resultados e Discussão

Para sintetizar uma sonda que atue como pseudo-substrato para PDI, glutationa oxidada (GSSG) foi incubada com excesso molar de eosina isotiocianato (EITC) ou de fluoresceína isotiocianato (FITC) em tampão fosfato 100mM, pH 8, EDTA 2mM, 8h, 25°C visando a síntese das sondas Di-EITC-GSSG e Di FITC-GSSG (Figura 1).



Figura 1. Esquema de reação proposto para as sondas Di-EITC-GSSG e Di-FITC-GSSG, onde R¹= eosina ou fluoresceína e R²=GSSG.

Foi realizada cromatografia em coluna aberta (Sephadex G-25, 100x3mm, tampão fosfato 100mM, pH 7,0) para separar as sondas dos produtos que não reagiram. As frações eluídas foram submetidas à varredura espectral (Espectrofotômetro Genesys 5) para determinação do comprimento de onda de máxima absorvância. Os eluídos que apresentaram absorvância significativa foram reunidos e alíquotas retiradas e colocadas em diferentes temperaturas, ao abrigo da luz. Durante 48 horas foram feitas leituras da densidade óptica das alíquotas para determinação da estabilidade das sondas.

Não foi obtido sucesso na síntese da sonda Di-FITC-GSSG, cuja eluição não apresentou pico de densidade óptica definido para constatar separação de produtos. A eluição da sonda Di-EITC-GSSG apresentou perfil de eluição cromatográfico com pico de densidade óptica em 521nm (Figura 1). A pureza da sonda foi testada através de cromatografia líquida de alta eficiência com eluição em gradiente (fase A: ácido acético 0,25%, pH 3,9;

fase B: metanol) no esquema: 0-5 min 100%A; 5-10 min: 75%A; 10-20 min 100%B), coluna C18 (250x4,6-ODS), vazão de 1ml.min⁻¹. As análises foram feitas em equipamento Shimadzu (Prominence), acoplado a um detector de fluorescência (λ_{ex}=525nm, λ_{em}=545nm)(Figura 3).

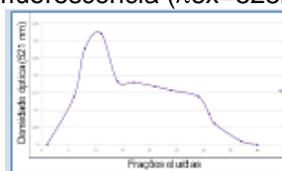


Figura 2. Relação tempo de retenção x densidade óptica.

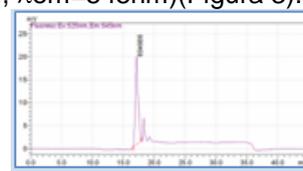


Figura 3. Eluição da sonda por CLAE.

A presença de dois fluoróforos na mesma estrutura química da sonda Di-EITC-GSSG determinou efeito “quencher” da fluorescência da eosina. Para testar a sensibilidade da sonda a agentes redutores, alíquotas foram incubadas com ditioneitol e borohidreto de sódio (5 μM, 60 min, 25°C), os quais não foram capazes de reduzir a ponte dissulfeto na estrutura da GSSG.

Foi monitorada a atividade catalítica redutora da PDI sobre Di-EITC-GSSG (tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, EDTA 2mM) fazendo-se ensaio com diferentes concentrações de PDI (5-20nM) e Di-EITC-GSSG (150nM) na presença de 5 μM de DTT. O aumento da fluorescência foi proporcional à concentração enzimática, mostrando que a redução da ponte dissulfeto da GSSG na sonda libera o monômero fluorescente EITC-GSH.

Conclusões

A sonda Di-EITC-GSSG é um pseudo-substrato para PDI, útil para monitorar a atividade catalítica de redução de dissulfetos dessa chaperona.

Agradecimentos

CNPq; PIBIC, INCT-Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma

¹WILKINSON B., GILBERT H.F. (2004) Protein dissulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699:35-44.

²RATURI A.,MUTUS BULENT. (2007) Characterization of redox state and reductase activity of protein dissulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Rad. Biol. Med.* 43(1): 62-70.

