

Implementação de nova metodologia para monitoramento da modulação da atividade catalítica de proteínas fosfatases

Caroline C. S. Gonçalves (PQ)¹; Bruna Z. da Costa (PG)¹; Anita J. Marsaioli (PQ)¹; Carmem V. Ferreira (PQ).²

^a Instituto de Química, UNICAMP, Brasil, ^b Instituto de Biologia, UNICAMP.

Tel./Fax: +55-19-3521-3067; *e-mail: anita@iqm.unicamp.br.

Palavras Chave: proteína tirosina fosfatase, sonda fluorogênica, inibição enzimática.

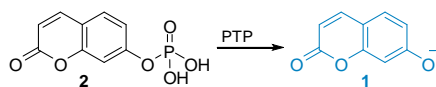
Introdução

As proteína tirosina fosfatases (PTP) catalisam a hidrólise de grupos fosfatos ligados a resíduos de tirosina em proteínas. Anormalidades na fosforilação/desfosforilação de proteínas podem levar a diversas enfermidades como câncer, diabetes e doenças auto-imunes.¹

Como a inibição de PTPs está intimamente relacionada ao tratamento de diversos tipos de cânceres, o objetivo deste trabalho foi estudar e validar uma metodologia para a modulação da atividade catalítica (inibição/ativação) de uma PTP de baixo peso molecular (LMW-PTP, recombinante, pâncreas humano) utilizando sonda fluorogênica derivada de umbeliferona.

Resultados e Discussão

Para a triagem por HTS foi utilizada a sonda **2** a qual, após hidrólise do grupo fosfato pela enzima libera o ânion da umbeliferona (**1**), permitindo a detecção da atividade enzimática (Esquema 1). A sonda **2** foi sintetizada a partir da umbeliferona (**1**), empregando-se metodologia descrita na literatura.²



Esquema 1: Sonda para triagem de LWPTP.

As reações enzimáticas foram conduzidas a 37 °C, em tampão acetato pH 5,0, e finalizadas pela adição de tampão borato pH 8,0. Os parâmetros cinéticos foram obtidos a partir da construção de um gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burke. Sendo obtidos os valores de K_M ($1,98 \cdot 10^{-3} \text{M}$) e V_{max} ($0,93 \cdot 10^{-6} \text{M} \cdot \text{s}^{-1}$), k_{cat} (223 s^{-1}) e ϵ ($113 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). O valor obtido de k_{cat} significa que 223 moléculas de substrato são convertidas em produto, por segundo, em uma única unidade enzimática, um valor expressivo para reações de hidrólise de grupos fosfatos. Este resultado representa a elevada eficiência catalítica desta enzima frente a sonda **2**, indicando que a estrutura deste composto é bem acomodada no sítio ativo enzimático, facilitando a catálise.

A validação da metodologia foi feita por comparação com o método colorimétrico baseado na hidrólise do fosfato de *p*-nitrofenol (**3**).

Comparando-se os dois substratos para dosagem da atividade fosfatásica, a utilização do substrato **2** apresenta as seguintes vantagens: maior afinidade enzimática pela mesma, metodologia 50 vezes mais sensível, utilização de menor concentração de enzima, substrato e candidato a inibidor. Visando comprovar a maior afinidade da LMW-PTP frente ao substrato **2**, foram realizados ensaios de competição com o substrato **3**. (Tabela 1).

Tabela 1. Ensaios de competição entre os substratos **2** e **3** na presença da LMW-PTP.

Resposta	Substratos ^b		
	2	3	2 + 3
% Fluorescência ^a	42,8	--	44,0
% Absorbância ^a	--	54,3	25,8

^a %F ou %A= [(E-CN)/CP]*100, onde E é a intensidade de fluorescência ou absorbância do ensaio, CN é a intensidade do controle negativo e CP é a intensidade do controle positivo..

Os resultados deste teste comprovam a maior afinidade da LMW-PTP frente ao substrato **2**, pois foi observado que as intensidades de fluorescência foram pouco influenciadas pela presença do *p*NPP, enquanto que o efeito contrário foi verificado para as intensidades de absorbância. Com a metodologia implementada estão sendo realizadas triagens de candidatos a inibidores de fosfatase sintéticos e naturais fornecidos por grupos de pesquisa do Instituto de Química.

Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia eficiente para a detecção da atividade de uma LMW-PTP, permitindo ensaios em formato de triagem de alto desempenho para a seleção de inibidores desta enzima.

Agradecimentos

FAPESP, CNPQ, Petrobrás.

¹Moorhead, G. B. G.; Trinkle-Mulcahy, L.; Ulke-Lemée, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 2342

²Gonzales-Garcia, E. M.; Grognux, J.; Wahler, D.; Reymond, J. L. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2458.