

3,6-Difosfato de Fluoresceína para a Detecção de Proteínas Tirosina Fosfatases

Bruna Z. da Costa (PG)*, Daniela Trivella (PQ), Valéria Scorsato (PG), Natália L. Bazzo (IC), Thayane Previdelli (IC), Ricardo Aparicio (PQ), Ronaldo A. Pilli (PQ), Anita J. Marsaioli (PQ)

¹Instituto de Química – UNICAMP. Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas - SP.
e-mail: brucosta@iqm.unicamp.br

Palavras Chave: proteínas tirosina fosfatases, sondas fluorogênicas, fluoresceína.

Introdução

Ensaio enzimáticos baseados em fluorescência são bastante sensíveis, empregando concentrações diluídas de substrato e catalisador. Estes ensaios utilizam um substrato fluorogênico cuja sinalização resulta da transformação enzimática do substrato de interesse.

A fosforilação e desfosforilação de proteínas desempenham papel central em vias de sinalização celular, sendo governadas pela ação de proteínas quinases e proteínas fosfatases, respectivamente. Anormalidades na ação destas enzimas podem levar a diversas enfermidades como câncer, diabetes e doenças auto-imunes.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a especificidade do substrato fluorogênico 3,6-difosfato de fluoresceína para a detecção de três proteínas tirosina fosfatases (PTPs) diferentes.

Resultados e Discussão

No presente trabalho, o 3,6-difosfato de fluoresceína (**1**), foi empregado na detecção da atividade das PTPs: LMW-PTP, PTP1B e Cdc25b. A ação destas enzimas sobre **1** promove a liberação dos fluoróforo ânionico **2**, que pode ser detectado por fluorescência utilizando λ_{exc} = 490 nm e λ_{em} = 520 nm (Figura 1).

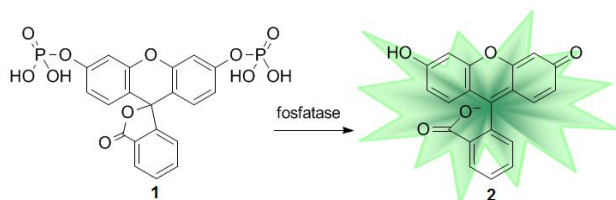


Figura 1. Liberação do fluoróforo **2** pela ação enzimática sobre o substrato fluorogênico **1**.

Todos os ensaios foram realizados em placas de polipropileno de 96 poços e incubadas em leitor de placas *FlashScan 530 Analytic Jena*, com temperatura controlada a 37 °C. As reações foram realizadas variando-se a concentração de substrato de 10 a 1000 μ M, e o tempo reacional de 0 a 60 min

para a LMW-PTP e Cdc25b, e de 0 a 120 min para a PTP1B. Os parâmetros da cinética enzimática foram obtidos a partir da construção do gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos determinados para as PTPs avaliadas na presença do substrato **1**.

	LMW-PTP ^a	PTP1B ^b	Cdc25b ^c
K_M (μ M)	59	580	135
V_{max} (μ M/s)	0,21	0,02	0,04
k_{cat} (s^{-1})	21,3	0,23	8,8
ϵ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$3,6.10^5$	$4,0.10^2$	$6,4.10^4$

^a10 nM em tampão acetato pH 5, NaCl 150 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,01%, por 60 min.

^b75 nM em tampão bis-trispropano pH 7,2, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,01%, por 120 min.

^c5 nM em tampão bis-trispropano pH 8,2, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,01%, por 60 min.

Os resultados obtidos demonstram a seguinte ordem de afinidade das PTPs pelo substrato **1**: PTP1B < Cdc25b < LMW-PTP. Os valores de k_{cat} observados para a LMW-PTP e Cdc25b indicam uma elevada taxa de conversão do substrato no produto fluorescente. Além disso, quantidades mínimas destas enzimas (10 e 5 nM, respectivamente) foram requeridas para um bom andamento do ensaio.

Conclusões

A sonda fluorogênica **1** mostrou-se eficiente para a detecção da atividade das três PTPs avaliadas. O monitoramento enzimático intracelular em células de câncer está em andamento.

Agradecimentos

IQ-UNICAMP, CNPq, FAPESP e ANP.

Responsabilidade dos autores:

Projeto temático FAPESP (09/51602-5) coordenado por Prof Ronaldo A. Pilli; Expressão de PTPs: grupo de pesquisa do Prof. Ricardo Aparicio; Teste das fosfatases: grupo Profa Anita J. Marsaioli.

¹Bialy, L.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 3814-3839.

²Reymond, J. L. *Enzyme Assays*. **2006**, 1ª edição, WILEY-VCH.