

# PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CINÉTICA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (ECA) COM MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS DOS AMINOÁCIDOS ALVO DE INTERAÇÕES COM SEUS INIBIDORES ESPECÍFICOS

Bruna Ricelli<sup>1</sup>, Danielle Sanches Aragão<sup>1</sup>, Larissa Miranda Pereira<sup>1</sup> e Dulce Elena Casarini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>:Departamento de Medicina, Laboratório de Nefrologia, Universidade Federal de São Paulo, Brasil;

## Introdução

A ECA é uma zinco-metalopeptidase considerada a enzima chave do sistema renina angiotensina (SRA), está envolvida na regulação da pressão arterial e na homeostase de eletrólitos e fluídos. A ECA é responsável pela geração do mais importante peptídeo vasoconstritor do SRA, a angiotensina II e o bloqueio desse sistema com o uso de inibidores da ECA e antagonistas dos receptores da angiotensina II são estratégias para o tratamento da hipertensão. Considerando sua importância fisiológica, a ECA tem sido alvo de diversos estudos terapêuticos que buscam um melhor entendimento de sua estrutura e de sua interação com inibidores específicos.

## Objetivos

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de mutações dirigidas dos aminoácidos alvo a fim de investigar se essas modificações podem comprometer a interação enzima/inibidor por meio da caracterização bioquímica e estrutural de mutantes da ECA.

## Métodos

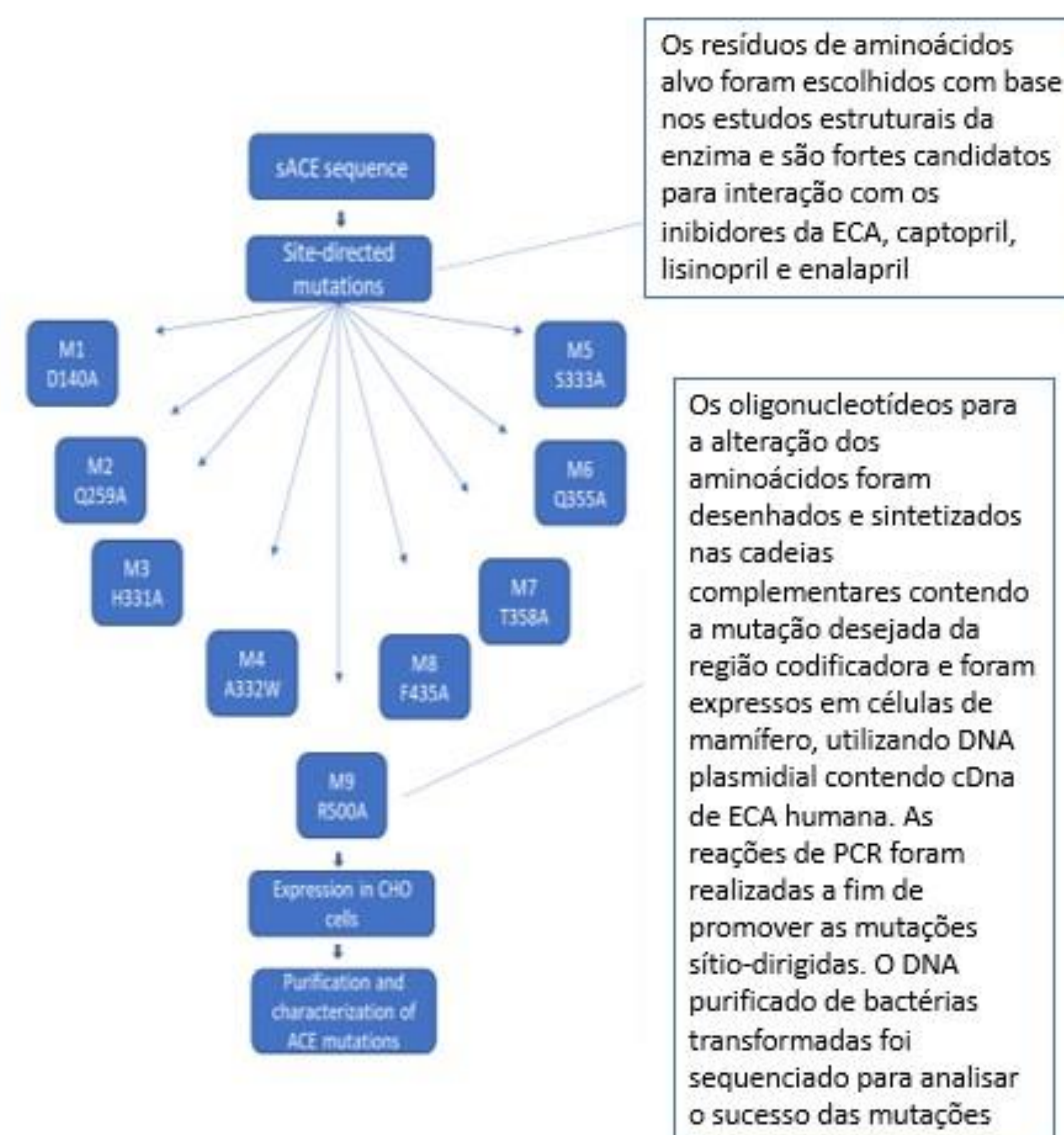


Tabela 1: códons alterados para as mutações sítio-dirigidas

Mutation name	Mutation	Original codon	Altered codon
M1	D140A	GAT	AGC
M2	Q259A	GAC	TGC
M3	H331A	CAT	AGC
M4	A332W	GCG	CCA
M5	S333A	AGC	TGC
M6	Q355A	CAG	CGC
M7	T358A	ACC	TGC
M8	F435A	TTT	AGC
M9	R500A	CGC	GGC

## Resultados

- Obtivemos as proteínas mutadas M4, M7, M8 e ECA selvagem em um bom nível de purificação. Estas mutações foram purificadas por uma coluna de Superdex 200 acoplada ao Sistema HPLC.
- As enzimas purificadas foram caracterizadas bioquimicamente por meio de ensaios enzimáticos utilizando os substratos específicos para ECA, Hippuryl-His-Leu (HHL) e Z-Phe-His-Leu (z-FHL), ECA selvagem, M4 e M7 apresentaram altos valores de atividade específica.
- Analizando a eficiência catalítica (kcat/Km) observamos que as enzimas mutantes hidrolisam melhor o substrato z-FHL quando comparadas ao HHL.
- M7 apresentou maior especificidade (0.39mM) e velocidade catalítica (1.02s<sup>-1</sup>) para o substrato z-FHL. Aquela com a melhor especificidade para o substrato HHL (1.35mM) e velocidade catalítica (0.54s<sup>-1</sup>) foi a M4.
- Captopril inibiu as enzimas de forma mais eficiente usando HHL como substrato, enquanto Lisinopril foi o que melhor inibiu as enzimas usando z-FHL. Isso sugere que há uma cooperação negativa entre os dois sítios catalíticos da ECA pelo substrato.

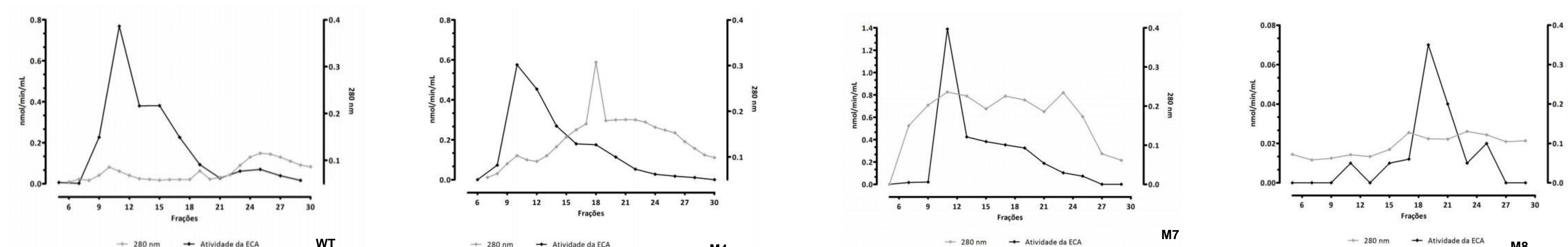


Fig.1: WT, M4, M7 and M8 gel filtration chromatography on Superdex S-200 column

Table 2: Kcat and Km determination for the HHL substrate

Enzyme	Kcat (s <sup>-1</sup> )	Km (mM)	Kcat/Km (s <sup>-1</sup> /Mm)
ACE WT	219,1	1,5	146
M4	438,9	1,35	325
M7	354	2,87	123
M8	8,98	7,6	1,18

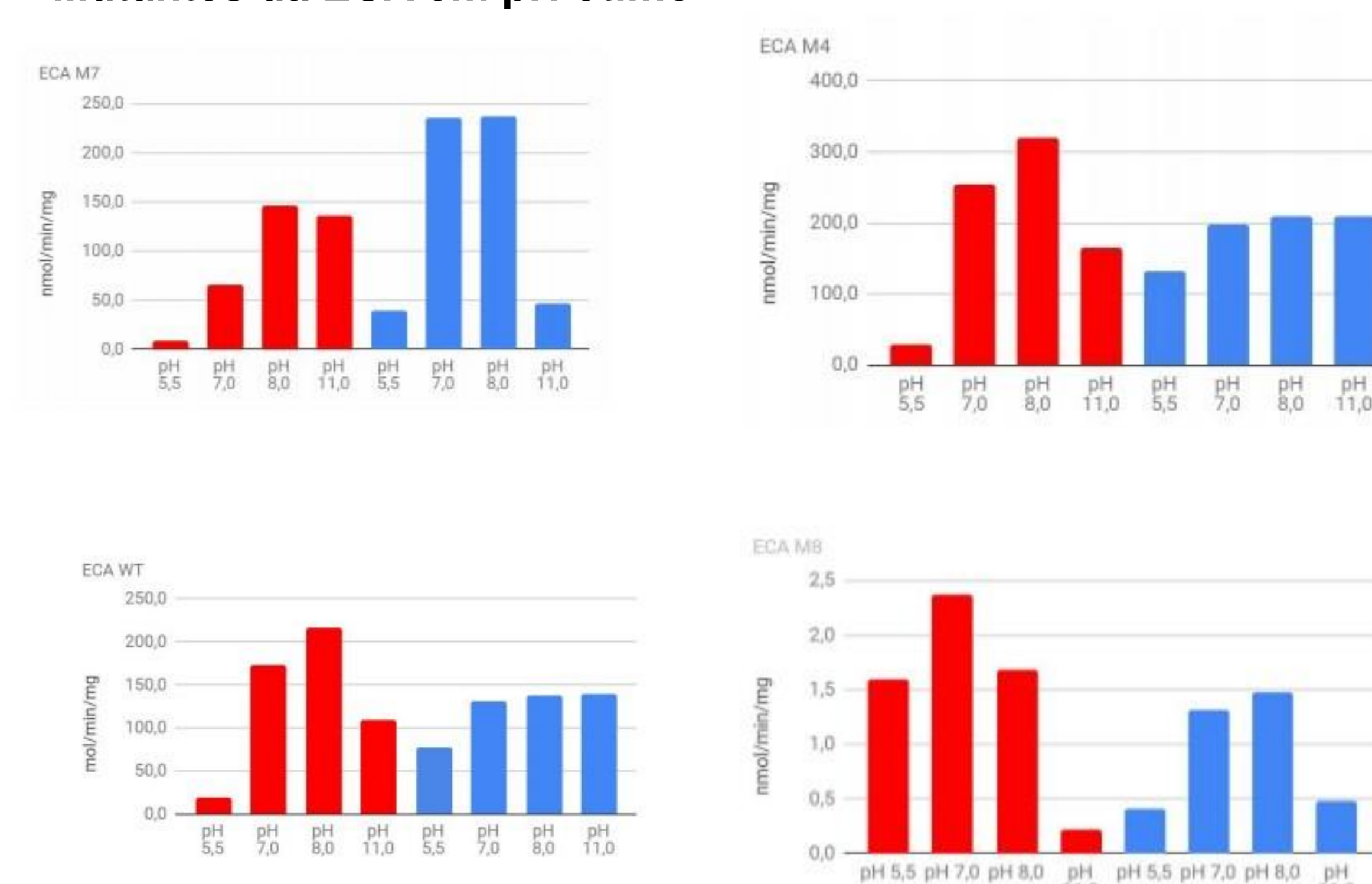
Table 3: Kcat and Km determination for the z-FHL substrate

Enzyme	Kcat (s <sup>-1</sup> )	Km (mM)	Kcat/Km (s <sup>-1</sup> /Mm)
ACE WT	282,6	1,4	201,8
M4	757,9	1,8	421
M7	450,4	0,5	900,8
M8	-	-	-

Atividade enzimática usando os substratos HHL e zPHE-HL

	HHL	ZPHE-HL
WT	169,02	118,94
M4	227,57	185,31
M7	89,18	124,69
M8	0,98	0,51

## Mutantes da ECA em pH ótimo



## Inibidores específicos e sua interação com ECA selvagem, M4, M7 e M8

	HHL		ZPhe-HL	
	CAPTOPRIL	LISINOPRIL	CAPTOPRIL	LISINOPRIL
WT	98,61	97,83	40,95	90,87
M4	87,02	97,83	71,32	90,19
M7	94,84	98,72	92,04	96,86
M8	70,41	36,73	18,23	40,56

## Conclusão

- Nós estudamos a construção de mutantes da ECA para avaliar se os aminoácidos alvo escolhidos são importantes na interação enzima/inibidor e analisamos a ECA selvagem, M4, M7 e M8.
- Concluímos que a melhor inibição ocorreu com M7, sugerindo que esta mutação pode ter alterado a interação da enzima ativa.
- Os resultados obtidos podem levar a um melhor entendimento da importância desses resíduos de aminoácidos para a atividade/funcionalidade da enzima, visando a identificação de novas moléculas que possam inibir a ECA. Apoio FAPESP (2017/17027-0)