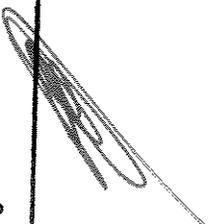


THELMA LOPES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA FOSFOTIROSINA PROTEÍNA  
FOSFATASE DE BAIXA MASSA MOLECULAR RELATIVA DO RIM DE  
CARNEIRO. ESTUDO DE INIBIDORES.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
*Thelma Lopes da Silva*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.



27/3/99

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Biológicas na  
Área de Bioquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga

9916036

1999

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAC I. B.

UNIDADE	BC
N.º CROMÁTICO	
V.	Ex.
T. Nº BC/	38456
DATA	22/9/99
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/08/99
N.º CDD	

CM-00125590-6

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

**Thelma, Lopes da Silva**  
**Si38c** Caracterização cinética da fosfotirosina proteína fosfatase  
de baixa massa molecular relativa do rim de carneiro. Estudo  
de inibidores/Thelma Lopes da Silv. -- Campinas, SP. [s.n.], 1999.  
76f.:ilus.

Orientador: Eulázio Mikio Taga  
Dissertação(mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1. Fosfatase ácida. 2. Enzimas. 3. Cinética. I. Taga, Eulázio  
Mikio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia  
III. Título.

Data da Defesa: 27/07/1999

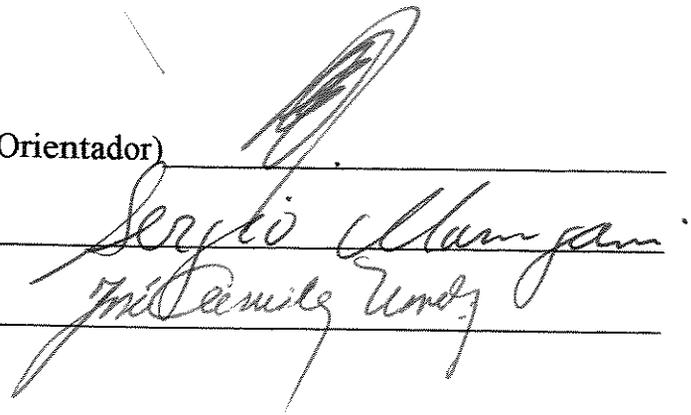
Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga (Orientador)

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Prof. Dr. José Camillo Novello



The image shows three handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The first signature is for Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga, the second for Prof. Dr. Sérgio Marangoni, and the third for Prof. Dr. José Camillo Novello. The signatures are fluid and cursive.

Suplentes:

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Aos meus pais, *Hermes e Encarnação*, meus profundos agradecimentos por sempre acreditarem e incentivarem todos os momentos de minha vida estudantil, priorizando a educação, o aprimoramento pessoal e, principalmente, depositando uma enorme carga de confiança em todas as etapas desta caminhada;

Às minhas irmãs, *Thatiana e Andréa*, pela amizade e apoio;

E ao *Lourival*, pela compreensão durante as ausências nos feriados, férias e fins-de-semana, pelo enorme auxílio e dedicação integral nas mais variadas tarefas, pela amizade e carinho em todos os momentos, pelas longas esperas, por estar sempre ao meu lado e, principalmente, pelo seu amor;

Dedico este trabalho

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Eulázio M. Taga, meu orientador, grande amigo que me deu a oportunidade de iniciar os primeiros passos na vida acadêmica, pesquisador dedicado e incansável, o meu reconhecimento pelo seu trabalho e amor à profissão,

Ao Prof. Hiroshi Aoyama, um profissional de extrema competência e dedicação, cujos conselhos e observações foram muito importantes na execução deste trabalho. Agradeço também pela amizade que tive a felicíssima oportunidade de vivenciar.

Ao Prof. José Mauro Granjeiro, profissional competente e dedicado, grande amigo que muito me incentivou durante a execução deste trabalho. Agradeço ainda o enorme auxílio e dedicação nas mais variadas tarefas.

À Prof. Marília A.R. Buzalaf, pelo apoio e amizade compartilhados.

Ao Prof. Sérgio Marangoni pelas discussões e sugestões propostas no Exame de Qualificação.

~~Aos professores de Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Instituto de Biologia/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos.~~

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru pelo auxílio na realização dos levantamentos bibliográficos e obtenção das separatas, sem os quais este trabalho não poderia ser desenvolvido.

À Isabele, Marília, Ana Cláudia, Carmen, Patrícia, Paulo, Marilena, Angélica, Adriana, Márcio, pelo estímulo constante e amizade.

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo convívio agradável e aprendido.

..... Aos amigos do Departamento de Bioquímica da FOB/USP, Gilmar e Vera, pelo apoio e colaboração.

Ao amigo Ovídio, que na minha ausência, soube resolver situações diversas com tamanha competência.

À Andréia, Marina e Mírian, pela convivência agradável e auxílio na secretaria.

A todos os amigos do Laboratório de Enzimologia do departamento de Bioquímica, IB/UNICAMP.

Ao Prof. Alceu S. Trindade Jr., chefe do departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP, pela autorização de meus deslocamentos para UNICAMP, para fins de conclusão do curso de pós-graduação.

À Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Aymar Pavarini, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia/UNICAMP

---

À FAEP/UNICAMP, FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro para a compra de material permanente e de consumo em projetos de pesquisa aprovados.

Ao Matadouro *Dom Pig* de Bauru-SP, pela gentil cessão do material biológico essencial à realização deste trabalho.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURA</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>III</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1 MATERIAL .....	13
3.1.1 <i>Obtenção do rim de carneiro</i> .....	13
3.1.2 <i>Reagentes e Soluções</i> .....	13
3.2 MÉTODOS .....	13
3.2.1 <i>Purificação da Enzima</i> .....	13
3.2.1.1 Obtenção do extrato .....	14
3.2.1.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio .....	14
3.2.1.3 Cromatografia em SP-Sephadex I .....	14
3.2.1.4 Cromatografia em SP-Sephadex II .....	15
3.2.1.5 Cromatografia de Exclusão Molecular em Sephacryl S-200 .....	15
3.2.1.6 Armazenamento da Enzima .....	15
3.2.2 <i>Determinação da Atividade Enzimática</i> .....	15
3.2.2.1 Dosagem do p-Nitrofenol (Monitoramento da Atividade Enzimática) .....	16
3.2.2.2 Dosagem do Fosfato Inorgânico (Pi) .....	16
3.2.2.3 Dosagem da Tirosina .....	16
3.2.2.4 Dosagem do $\beta$ -Naftol .....	17
3.2.3 <i>Determinação da Concentração Proteica</i> .....	17
3.2.4 <i>Estudos Cinéticos</i> .....	17
3.2.4.1 Efeito do tempo de incubação .....	17
3.2.4.2 Efeito da Concentração da enzima .....	17
3.2.4.3 Efeito do pH .....	17
3.2.4.4 Efeito da Temperatura e Determinação da Energia de Ativação (Ea) .....	18
3.2.4.5 Estudo de Especificidade .....	18
3.2.4.6 Determinação dos Parâmetros Cinéticos .....	18
3.2.4.7 Efeito do BSA na Determinação dos Parâmetros Cinéticos .....	18
3.2.4.8 Efeito do BSA na Ea para a hidrólise do pNPP .....	19
3.2.4.9 Efeito de Compostos na Estabilidade Térmica .....	19
3.2.4.10 Efeito de Compostos na Atividade .....	19
3.2.4.11 Efeito de Metais na Atividade .....	20

3.2.4.12	Efeito de potenciais Inibidores .....	20
3.2.4.13	Estudo dos Mecanismos de Inibição .....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
4.1	PURIFICAÇÃO DA ENZIMA.....	22
4.2	ESTUDOS CINÉTICOS .....	23
4.2.1	<i>Efeito do Tempo de Incubação.....</i>	23
4.2.2	<i>Efeito da Concentração da Enzima .....</i>	23
4.2.3	<i>Efeito do pH.....</i>	23
4.2.4	<i>Efeito da Temperatura e Determinação da Ea.....</i>	24
4.2.5	<i>Estudo de Especificidade .....</i>	34
4.2.6	<i>Determinação dos Parâmetros Cinéticos .....</i>	34
4.2.7	<i>Efeito do BSA na Determinação dos Parâmetros Cinéticos .....</i>	38
4.2.8	<i>Efeito do BSA na Temperatura Ótima e, na Ea.....</i>	38
4.2.9	<i>Efeito de Compostos na Estabilidade Térmica.....</i>	39
4.2.10	<i>Efeito de Compostos na Atividade .....</i>	43
4.2.11	<i>Efeito de Metais na Atividade .....</i>	43
4.2.12	<i>Efeito de Potenciais Inibidores .....</i>	44
4.2.13	<i>Estudos dos Mecanismos de Inibição .....</i>	49
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>62</b>

---

**ABREVIATURA**

---

<b><math>\beta</math>-SH</b>	$\beta$ -Mercaptoetanol
<b>AcP</b>	Fosfatase Ácida
<b>A.E.</b>	Atividade Específica
<b>AMP</b>	Adenosina Monofosfato
<b>AMr</b>	Alta Massa Molecular Relativa
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BMr</b>	Baixa Massa Molecular Relativa
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovino
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>Ea</b>	Energia de Ativação
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetraacético
<b>EGF-r</b>	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
<b>FMN</b>	Flavina Mononucleotideo
<b>G-SH</b>	Glutationa Reduzida
<b>HCPTP</b>	Proteína Tirosina Fosfatase de Placenta Humana
<b>IF1</b>	Isoforma 1
<b>IF2</b>	Isoforma 2
<b>IMr</b>	Intermediária Massa Molecular Relativa
<b>I<sub>50</sub></b>	Concentração de Composto que Causa 50% de Inibição
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de Inibição
<b>K<sub>ia</sub></b>	Constante de Inibição Acompetitiva
<b>K<sub>ic</sub></b>	Constante de Inibição Competitiva
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>Mr</b>	Massa Molecular Relativa
<b>NO</b>	Óxido Nítrico

---

<b>P</b>	Fosfato
<b>PCMB</b>	p-Cloromercuribenzoato
<b>PDGF-r</b>	Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
<b>Pi</b>	Fosfato Inorgânico
<b>PNP</b>	p-Nitrofenol
<b>pNPP</b>	p-Nitrofenil Fosfato
<b>PPi</b>	Pirofosfato Inorgânico
<b>PTK</b>	Proteína Tirosina Kinase
<b>PTP</b>	Proteína Tirosina Fosfatase
<b>SDS</b>	Lauril Sulfato de Sódio
<b>SP-Sephadex</b>	Sulfopropil-Sephadex
<b>UE</b>	Unidade Enzimática
<b>Vmax</b>	Velocidade Máxima

---

## RESUMO

A proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (20 kDa) do rim de carneiro foi purificada 1.291 vezes até a homogeneidade, com rendimento de 4%, através de um procedimento envolvendo fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca-iônica em SP-Sephadex com eluição por íon-afinidade e cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200). A enzima purificada apresentou uma A.E. de  $99,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . O estudo do efeito do pH na atividade enzimática revelou uma faixa de pH ótimo de 4,0 a 5,5. A enzima apresentou uma atividade máxima a  $57^\circ\text{C}$ . A atividade da enzima foi pouco sensível a diversos compostos, reagentes redutores de tióis e íons metálicos, exceto pela inibição por  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ag}^+$  e, pela ativação por guanosina. A energia de ativação para a hidrólise do pNPP, determinada pelo gráfico de Arrhenius, foi de  $54,5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ . Dos substratos testados, o pNPP, o  $\beta$ -Naftil-P, a FMN e a Tyr-P foram os únicos hidrolisados significativamente com  $K_m$  de  $0,08 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $0,37 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $10,9 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,51 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. A análise dos parâmetros cinéticos na presença de BSA  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (no meio de diluição ou no meio de reação) para os substratos pNPP e  $\beta$ -Naftil-P, mostrou um aumento na  $K_m$  e na  $V_{\text{max}}$ , enquanto que para a Tyr-P a  $K_m$  diminuiu. A  $K_m$  para a hidrólise da FMN não foi alterada. A  $E_a$  para a hidrólise do pNPP, na presença de BSA no meio de reação ou no meio de diluição, foi similar à obtida na ausência de BSA. Nos estudos de estabilidade térmica observamos que os diversos compostos testados ( $\text{Pi}$ , BSA, Glicerol e DTT) somente protegeram a enzima quando utilizados em conjunto. Isoladamente não houve proteção significativa. O estudo de inibidores demonstrou insensibilidade ao tartarato e fluoreto, e inibição por vanadato ( $K_i$ ,  $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), piridoxal-5-P ( $K_i$ ,  $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $\text{Pi}$  ( $K_i$ ,  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ ), molibdato de amônio ( $K_{ic}$ ,  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $K_{ia}$ ,  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e pCMB. Assim como para o pNPP, o vanadato era um inibidor competitivo com relação a FMN e Tyr-P, com valores de  $K_i$  de  $0,34 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,48 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

## SUMMARY

A low molecular weight sheep kidney protein tyrosine phosphatase was purified 1291-fold to homogeneity, with 4% recovery, by a procedure involving ammonium sulfate fractionation, SP-Sephadex ion-exchange chromatography with ion-affinity elution and molecular exclusion chromatography. The purified enzyme had a specific activity of  $99.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . The pNPP hydrolysis reaction catalyzed by this enzyme had a broad pH optimum of 4.0-5.5 and maximal activity at  $57^\circ\text{C}$ . Reducing thiol compounds, metal ions and other different compounds did not significantly affect the enzyme activity except for the inhibition by  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  and activation by guanosine. An activation energy value of  $54.5 \text{ kJ.mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  was determined from Arrhenius plot for the hydrolysis of pNPP. The apparent  $K_m$  values obtained, at  $37^\circ\text{C}$  and pH 5.0, for the best substrates were  $0.08 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0.37 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0.51 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $10.9 \text{ mmol L}^{-1}$  for pNPP,  $\beta$ -Naphthyl-P, FMN and Tyr-P, respectively. Kinetic parameters in the presence of  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA, in the reaction medium or in the enzyme dilution medium, showed an increase in  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  for the substrates pNPP and  $\beta$ -Naphthyl-P. For the substrates Tyr-P and FMN, the  $K_m$  decreased or was not affected, respectively. The activation energy was not also affected in the presence of BSA. The following compounds Pi, DTT, BSA, and glycerol only protected the enzyme against thermal inactivation if used together. The enzyme was inhibited by vanadate ( $K_i$ ,  $0.18 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), pyridoxal-5-P ( $K_i$ ,  $3.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), inorganic phosphate ( $K_i$ ,  $0.6 \text{ mmol L}^{-1}$ ), ammonium molybdate ( $K_{ic}$ ,  $0.1 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $K_{ia}$ ,  $0.2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and pCMB. Both tartrate and fluoride were ineffective inhibitors. As observed for pNPP, was a competitive inhibitor, in relation to FMN and Tyr-P, with the following  $K_i$  values:  $0.34 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $0.48 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively.

## 1 INTRODUÇÃO

Um mecanismo fundamental que uma célula utiliza para controlar seus processos biológicos é via fosforilação e defosforilação de proteínas. Em particular, a fosforilação e defosforilação de resíduos de tirosina em proteínas tem emergido como um evento chave na regulação da divisão, diferenciação e desenvolvimento celular, regulação do metabolismo, expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória. (Cohen, 1988; Johnson e Barford, 1993; Zhang, 1998).

As atividades de proteína quinases e fosfatases são cuidadosa e fortemente reguladas “in vivo”. Mudanças anormais na atividade dessas enzimas podem proporcionar conseqüências graves que incluem câncer e doenças resultantes de defeitos imunológicos (Jia, 1997).

Nas células normais, muitos receptores de fatores do crescimento possuem domínios intracelulares com atividade proteína tirosina quinase (PTK). Um grande número de produtos de oncogenes tem estruturas semelhantes a estes receptores porém, permitem uma atividade PTK desregada, caracterizada pela fosforilação inadequada em tirosina com conseqüente proliferação descontrolada e oncogênese (Ramponi e Stefani, 1997; Byon *et al*, 1997).

São conhecidas muitas enzimas capazes de hidrolisar proteínas fosforiladas em tirosina. Apesar da seqüência de aminoácidos ser extremamente variada, todas compartilham um padrão de sítio ativo constituído de uma cisteína e uma arginina, separados por cinco resíduos de aminoácidos e abreviado como  $Cx_5R$ , onde x pode ser qualquer aminoácido. Bioquimicamente, estas fosfatases podem ser identificadas pela sensibilidade ao vanadato, insensibilidade ao ácido ocadáico, independência de íons metálicos, habilidade em defosforilar p-nitrofenilfosfato (pNPP) e total perda de atividade após mutação da cisteína do sítio ativo por serina. Todas estas fosfatases parecem preferir peptídeos contendo fosfotirosina, apesar de um subgrupo apresentar uma atividade dupla, também hidrolisando fosfotreonina e fosfoserina. Com base na função, estrutura e seqüência, estas fosfatases podem ser agrupadas em quatro famílias principais: i)

as proteína tirosina fosfatases (PTPs) específicas; *ii*) as fosfatases com dupla especificidade tipo VH1; *iii*) as cdc25; *iv*) as proteínas tirosina fosfatases de baixa massa molecular relativa (BMr <20 kDa) (Fauman e Saper, 1996; Jia, 1997).

As proteínas tirosina fosfatases específicas são as enzimas melhor estudadas na superfamília das PTPs e apresentam alta massa molecular relativa (AMr >100 kDa). Elas estão envolvidas em uma grande gama de vias de sinalização e, nos últimos anos, mais de 100 PTPs foram isoladas e seqüenciadas a partir de diversos organismos incluindo bactérias, leveduras, nematóides, insetos e vertebrados. Todas apresentam um domínio catalítico de aproximadamente 230 resíduos de aminoácidos, dos quais 71 são altamente conservados. Esta família é ainda subdividida em dois grupos: fosfatases transmembrana tipo receptor e as fosfatases citoplasmáticas tipo não-receptor (Fauman e Saper, 1996).

As PTPs tipo receptor são modulares, consistindo de domínios extracelulares variáveis, seguidos de um segmento transmembrana simples e um ou dois domínios catalíticos intracelulares. Quando estão presentes dois domínios catalíticos, o domínio carboxílico terminal é cataliticamente inativo. O alinhamento dos domínios catalíticos de todas as PTPs conhecidas sugere que as do tipo receptor derivam de uma enzima ancestral simples (Krueger *et al.*, 1990). É consenso que as PTPs tipo receptor estão envolvidas na comunicação célula a célula pela transdução transmembrana de sinais, o que acarreta uma mudança na fosforilação intracelular da tirosina, agindo de modo compensatório à ação da PTK (Jia, 1997).

As PTPs citossólicas tipo não-receptor freqüentemente contém segmentos extracatalíticos os quais podem estar envolvidos diretamente na regulação da atividade catalítica ou podem tornar a enzima em alvo para regiões específicas da célula e substratos. Estes segmentos estão associados ao grupamento C- ou N-terminal e são os responsáveis pela função única e pelas propriedades das PTPs (Jia, 1997). As PTPs podem ainda sofrer fosforilação do domínio não catalítico, causando modificações na atividade catalítica ou na localização celular.

Outra característica marcante das PTPs específicas é a capacidade de hidrolisar 100.000 vezes mais rápido a fosfotirosina do que a fosfoserina ou fosfotreonina. Isto se deve possivelmente à presença de resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo, criando uma parede, dentro da qual somente a fosfotirosina pode penetrar e sofrer a hidrólise; esta região (resíduos de 43-46, KNRY) é denominada “região de reconhecimento da fosfotirosina” (Yuvaniyama *et al.*, 1996).

As fosfatases com dupla especificidade tipo VH1 são capazes de hidrolizar fosfatos monoésteres de peptídeos contendo tanto fosfotirosina como fosfoserina/treonina, estas enzimas regulam a transdução de sinais mitogênicos e desempenham um importante papel no controle do ciclo celular. A presença de um padrão característico do sítio ativo (His-Cys-X-X-Gly-X-X-Arg-Ser/Thr) análogo ao das PTPs indica fortemente que estas fosfatases com dupla especificidade, apesar de não compartilharem qualquer outra homologia estrutural, possuem um sítio ativo e um mecanismo catalítico similares aos das PTPs (Jia, 1997). Esta característica parece estar associada à menor profundidade do sítio, de aproximadamente 6Å nas PTP de dupla especificidade (contra os 9Å das PTPs específicas), além da ausência da seqüência KNRY (Yuvaniyama *et al.*, 1996).

As fosfatases *cdc25* são enzimas relacionadas com o controle da divisão celular, foram inicialmente identificadas em leveduras (Nurse, 1990) onde desfosforilavam a Tyr-15 do componente quinase, dependente de ciclina, no fator promotor da maturação (*cdc2*). O *cdc2* assim ativado, iniciava a fase M fosforilando uma grande gama de proteínas celulares incluindo histonas. Este é o principal exemplo de uma fosfatase iniciando, ao invés de finalizando, um processo de sinalização celular. As próprias *cdc25* são reguladas por fosforilação.

O domínio catalítico das *cdc25* mostra uma conservação de seqüência maior do que todas as outras famílias de fosfatases e, embora não estejam disponíveis, até o momento, informações sobre sua estrutura, suspeita-se que o padrão Cx<sub>5</sub>R responsável pela ligação do fosfato seja similar ao das outras tirosina fosfatases.

Apesar das cdc25 também apresentarem dupla especificidade, a seqüência de seu sítio ativo é muito diferente da família tipo VH1. Faltam os resíduos de glicina conservados nas PTPs específicas e nas de dupla especificidade tipo VH1, tanto quanto os resíduos contendo hidroxila logo após a arginina; mesmo a histidina não é bem conservada nesta família. Ao contrário, o padrão do sítio ativo das cdc25 apresenta resíduos de fenilalanina e ácido glutâmico.

Recentes estudos levaram à identificação de um grupo de PTPs citoplasmáticas, as proteína tirosina fosfatases de BMr, caracterizadas pela reduzida massa molecular (~18 kDa). Estas enzimas não compartilham qualquer homologia de seqüência com qualquer das outras PTPs, exceto pelo padrão do sítio ativo e do mesmo mecanismo de catálise. As PTPs de BMr diferem das fosfatases ácidas clássicas pela inibição por vanadato, ao invés do tartarato, e pelo mecanismo catalítico, o qual procede via formação de um fosfointermediário envolvendo uma cisteína altamente conservada. As PTPs de BMr foram identificadas em procariotos, leveduras e mamíferos, embora os genes para as outras PTPs não tenham sido encontrados em procariotos (Ramponi e Stefani, 1997).

Ramponi e Stefani (1997) publicaram uma revisão bastante completa sobre a PTP de BMr onde resumiram as informações mais recentes sobre a evolução, estrutura, cinética e características biológicas desta família de tirosina fosfatases. Destacaremos alguns dos aspectos mais importantes abordados nessa revisão.

A primeira PTP de BMr (E.C.3.1.3.48.) foi estudada inicialmente como uma fosfatase ácida solúvel de BMr (E.C.3.1.3.2.) em função da marcante atividade sobre o pNPP. A presença desta enzima em mamíferos foi inicialmente descrita por Heinrikson (1969) e Chaimovich e Nome (1970); posteriormente, a fosfatase ácida de BMr de eritrócito foi purificada e caracterizada por Dissing *et al.* (1979), de fígado bovino por Lawrence e Van Etten (1981) e de fígado humano (Taga e Van Etten, 1982). A enzima foi ainda purificada do coração bovino (Chernoff e Li, 1985), placenta humana (Waheed *et al.*, 1988), fígado de

rato (Fujimoto *et al.*, 1988), coração bovino (Zhang e Van Etten, 1990), fígado de rato (Manao *et al.*, 1992), fígado de porco (Caselli *et al.*, 1994a), rim bovino (Granjeiro *et al.*, 1997a), pulmão bovino (Buzalaf *et al.*, 1998).

Várias isoenzimas foram isoladas (Dissing e Svensmark, 1990) e seqüenciadas (Dissing *et al.*, 1991; Dissing e Johnsen, 1992) a partir de eritrócitos humanos. Três alelos foram identificados para esta enzima, cada um gerando duas isoenzimas, denominadas rápida (r) e lenta (l) com base na mobilidade eletroforética. Concomitantemente, duas isoenzimas do fígado de rato, AcP1 e AcP2, foram isoladas (Manao *et al.*, 1992). Os genes para duas isoenzimas de placenta humana (HCPTP-A e HCPTP-B), correspondentes às formas rápida e lenta dos eritrócitos e fígado de rato, foram clonadas, seqüenciadas e expressas (Wo *et al.*, 1992a). Outras duas isoenzimas foram seqüenciadas através de clonagem molecular (Shekels *et al.*, 1992) a partir de células 3T3-L1, capazes de hidrolisar a fosfotirosina de uma proteína ligadora de lipídeos do adipócito.

As isoenzimas (r) dos eritrócitos, a AcP1, e a HCPTP-A tem sido indicadas como sendo a isoforma-1 (IF1), e as isoenzimas (l) dos eritrócitos, a AcP2, a HCPTP-B, as PTPs do fígado de humanos, bovinos e suínos e do rim bovino como sendo a isoforma-2 (IF2), apesar da IF1 também estar presente. É possível concluir que se trata da IF2, pois durante a purificação ela se liga à resina de SP-Sephadex quando em alta força iônica. Por outro lado, a IF1 só se liga em baixa força iônica. A IF1 e IF2 diferem uma da outra na seqüência dos resíduos de aminoácidos da região de 40-73, na afinidade pelo substrato e na sensibilidade a ativadores e inibidores (Baxter e Suelter, 1985; Wo *et al.*, 1992a; Cirri *et al.*, 1993a; 1993b; 1995; 1996).

Recentemente, a PTP de BMr (17,4 kDa) tem sido identificada, purificada e caracterizada de vários microorganismos como *Schizosaccharomyces pombe* (Mondesert *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Modesti *et al.*, 1995; Hengge *et al.*, 1997), *Saccharomyces cerevisiae* (Ostanin *et al.*, 1995), *Streptomyces coelicolor* (Li e Strohl, 1996).

As PTP de BMr tem sido extensamente estudadas com relação ao mecanismo catalítico (Davis *et al.*, 1994; Chiarugi *et al.*, 1994), homologia (Dissing e Johnsen, 1992) e estrutura conformacional (Logan *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1994). A primeira enzima seqüenciada, a do fígado bovino (Camici *et al.*, 1989), possui um domínio simples com 157 resíduos de aminoácidos (17.953 Da) contendo 8 cisteínas, todas na forma reduzida, e o resíduo N-terminal acetilado. Não há homologia entre esta enzima e as fosfatases ácidas de alta e intermediária Mr, fosfatases alcalinas, as fosfotreonina/serina fosfatases, ou ainda com outras PTPs. Dentre as PTPs, a única semelhança reside na seqüência do sítio ativo altamente conservado (Cx<sub>5</sub>RS/T) (Hiraga e Tzuiki, 1991; Cirri *et al.*, 1993b).

As seqüências das PTPs de BMr de procariotos, de leveduras e das IF1 e IF2 tem sido determinadas por vários laboratórios; todas possuem de 156-166 resíduos de aminoácidos e uma seqüência altamente conservada, especialmente na região dos resíduos de 10-28 que contém o sítio ativo. As IF1 e IF2 diferem uma da outra somente na seqüência da região de 40-73, sugerindo que elas tenham se originado de um único gene, mais provavelmente através de “splicing” alternativo do RNA (Dissing *et al.*, 1991), apesar de a duplicação do gene também ter sido sugerida (Wo *et al.*, 1992a).

A análise por raios X permitiu, recentemente, elucidar a estrutura terciária, com resolução de 2,1 Å, da enzima do fígado e coração bovino (Su *et al.*, 1994; Zhang, M. *et al.*, 1994). A proteína possui dimensões relativas de 34x42x48 Å, sendo constituída de um domínio simples  $\beta\alpha\beta$ , contendo 4 folhas- $\beta$  centrais, paralelas e torcidas, envolvidas por  $\alpha$ -hélices de conexão nos dois lados. Os resíduos de 13-17 do sítio ativo formam uma alça (alça fosfato) que conecta a primeira folha- $\beta$  com a primeira  $\alpha$ -hélice. O sítio ativo é localizado na base de uma depressão formada pelo lado C-terminal de uma folha- $\beta$  paralela; a borda desta depressão é margeada por resíduos hidrofóbicos divididos em três grupos: resíduos de 46-58, de 90-95 e de 128-132, os quais podem interagir com a estrutura aromática dos substratos que contém fosfotirosina ou os outros resíduos de aminoácidos vizinhos. Estes resíduos hidrofóbicos estão presentes também nas enzimas de leveduras e em algumas de procariotos (Mondesert *et al.*, 1994;

Zhang *et al.*, 1995; Modesti *et al.*, 1995; Li e Strohl, 1996), o que também reforça a possível importância destes no reconhecimento do substrato.

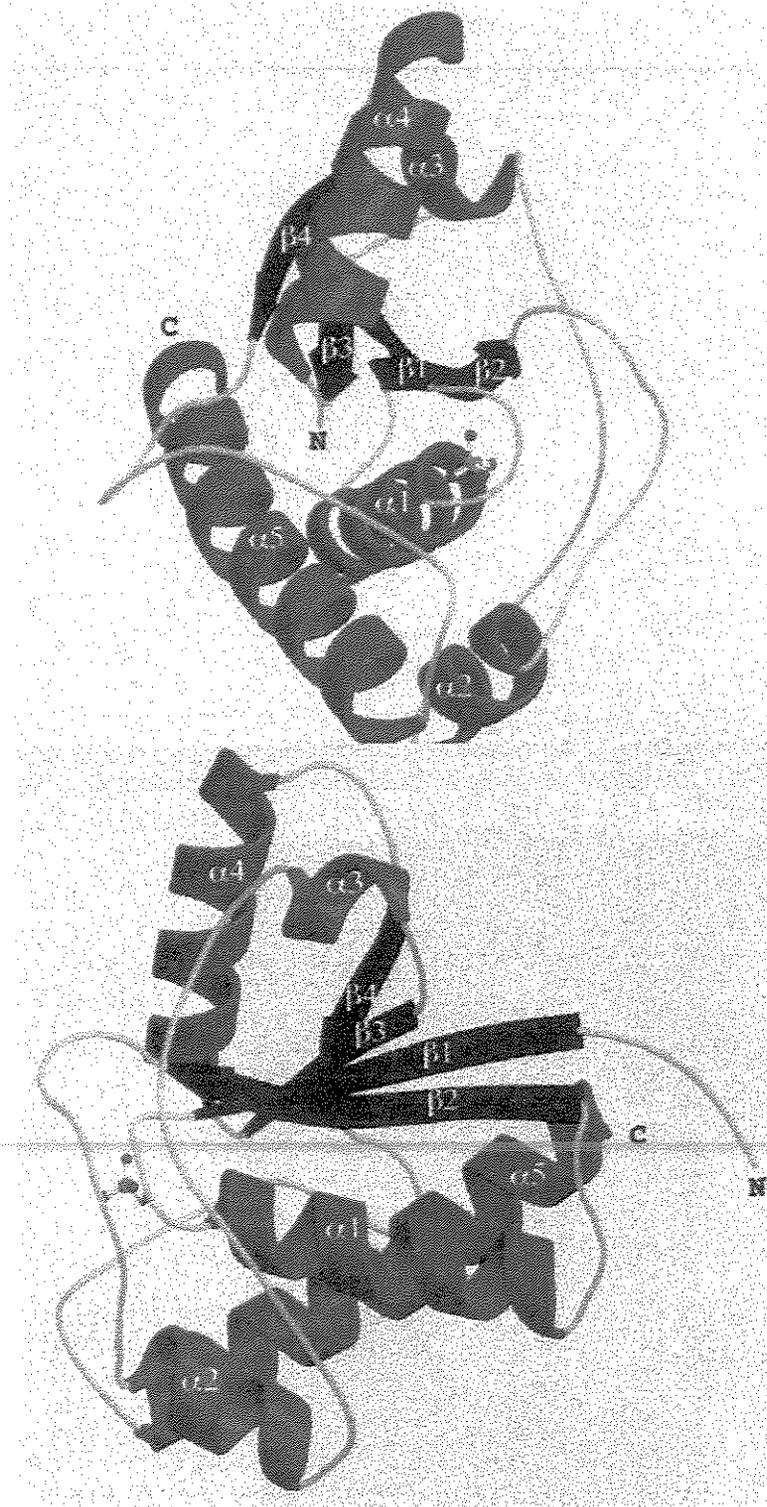


Figura A. Disposição das  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$  na estrutura terciária da PTF de BMr do coração bovino (Zhang, M *et al.*, 1994). A alça fosfato do sítio ativo encontra-se entre a folha  $\beta 1$  e a  $\alpha$ -hélice 1.

Estudos cinéticos (Baldijão *et al.*, 1975; Bittencourt e Chaimovich, 1976; Zhang e Van Etten, 1991a, 1991b; Zhang *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1993), de mutação sítio dirigida (Chiarugi *et al.*, 1992; Wo *et al.*, 1992a, 1992b; Davis *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1996) e a determinação da estrutura terciária da PTP de BMr (Su *et al.*, 1994; Logan *et al.*, 1994; Zhang, M. *et al.*, 1994) permitiram identificar a Cys-12, Arg-18 e Asp-129 como os resíduos essenciais para a catálise enzimática, sendo que os resíduos de Cys e Arg estão muito próximos e constituem a alça fosfato. Atuando indiretamente, a His-72, Ser-43, Ser-19 e Asn-15 constituem e estabilizam o sítio ativo (Zhang, M. *et al.*, 1994).

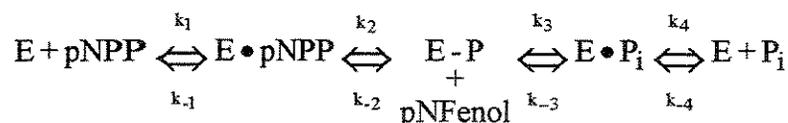
As PTPs de BMr de mamíferos hidrolisam com muita eficiência arilfosfatos como o pNPP e a fosfotirosina, tanto quanto acilfosfatos, sejam naturais ou sintéticos, como o carbamoil fosfato, acetil fosfato e benzoil fosfato, mas apresenta baixa atividade sobre alquil fosfatos (revisto por Ramponi e Stefani, 1997), com exceção das flavina mononucleotideo (FMN) (Taga e Van Etten, 1982; Fuchs *et al.*, 1992; Granjeiro *et al.*, 1997b). Estas enzimas, bem como as oriundas de procariotos e leveduras, também apresentam uma atividade marcante sobre peptídeos e proteínas fosforilados em tirosina (Chernoff e Li, 1985; Ramponi *et al.*, 1989; Zhang e Van Etten, 1991b; Shekels *et al.*, 1992; Stefani *et al.*, 1993; Li e Strohl, 1996). Esses autores ainda afirmam que a atividade sobre fosfoserina/treonina é insignificante, mas são contestados por Zhang *et al.*, (1995). Outra característica marcante das PTPs de BMr é a capacidade de catalisar reações de transfosforilação (Hollander, 1971; Tanizaki *et al.*, 1977; Cirri *et al.*, 1993b).

Um grande número de estudos cinéticos determinou que o modelo cinético da reação catalisada pela IF2 da PTP de BMr é do tipo  $S_n2P$ , onde ocorre a entrada de um substrato e a saída de dois produtos. A reação procede via formação de um intermediário cisteinil fosfato Cys-12 (Wo *et al.*, 1992b; Cirri *et al.*, 1993b), sendo que o passo que leva a sua formação é acompanhado pela protonação do grupo que sai (primeiro produto; grupo fenólico no caso do pNPP). A hidrólise do intermediário cisteinil fosfato é o passo limitante da reação. A Cys-12, mantida na forma de tiolato pela Ser-19; seria responsável pelo

ataque nucleofílico ao átomo de fósforo do substrato, levando à formação do intermediário fosfoenzima; o Asp-129 atuaria como doador de próton para o grupo que deixa a enzima e a Arg-18 seria responsável pelo reconhecimento do substrato e estabilização do estado de transição (Zhang, Z. *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1996).

Zhang, M. *et al* (1994) propuseram que a His-72, Ser-19 e Ser-43 teriam o papel de estabilizar o sítio ativo através da formação de uma rede de pontes de hidrogênio que interage com a Asn-15 presente na alça do sítio ativo, propiciando a geometria mais favorável para a ligação do fosfato. Ao contrário do que se imaginava inicialmente, os resíduos de His-66 e -72 não atuam diretamente no sítio ativo, sendo que a His-66 encontra-se muito longe ( $>15\text{\AA}$ ) e no lado oposto da molécula.

O seguinte modelo cinético para a hidrólise de fosfatos monoésteres pela PTP de BMr foi proposto (Baldijão *et al.*, 1975; Zhang e Van Etten, 1991b; Evans *et al.*, 1996):



O papel catalítico da Cys e da Arg são iguais aos de outras PTPs, inclusive as de dupla especificidade, nas quais o padrão do sítio ativo conserva a seqüência Cx<sub>5</sub>R.

Estudos recentes sobre o mecanismo de catálise da AcP1 e AcP2 do fígado de rato, utilizando 4 substratos diferentes (inclusive fosfotirosina) confirmam que a hidrólise dos substratos procede pelo mesmo mecanismo para ambas as isoenzimas (Cirri *et al.*, 1995).

As PTPs são inibidas competitivamente por vanadato, assim como as de BMr (Zhang e Van Etten, 1990; Granjeiro *et al*, 1997a; Buzalaf *et al*, 1998) e irreversivelmente por peroxivanadato (o complexo do vanadato com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), através da oxidação da Cys-12, determinada por espectrometria de massa; agentes redutores como o ditioneitol (DTT), presentes no meio de reação, mantém a cisteína reduzida e convertem mais rapidamente o peróxido em

vanadato (Huyer *et al.*, 1997). O íon vanadato forma uma ligação covalente com o nucleófilo Cys-12 no sítio ativo, que apresenta uma geometria trigonal bipiramidal, e desta forma, inibe a atividade PTP por atuar como um análogo do estado de transição (Zhang, M. *et al.*, 1997). A injeção intraperitoneal de vanadato induz a fosforilação em tirosina de diversas proteínas como os receptores para o fator de crescimento epidermal, insulina e fator de crescimento do hepatócito (Ruff *et al.*, 1997). Ultimamente tem se mostrado que compostos geradores de NO e o próprio NO são capazes de inativar a PTP de BMr *in vitro* (Caselli *et al.*, 1994b; Li e Strohl, 1996). Esta inativação foi reduzida na presença do fosfato inorgânico, um inibidor competitivo da enzima, sugerindo que a ação do NO modifica a Cys-12 e Cys-17 (Caselli *et al.*, 1994b).

Até 1985, o papel biológico das fosfatases ácidas de BMr era completamente obscuro; a enzima já havia sido purificada de diversas fontes, sendo encontrada praticamente em qualquer tecido de mamíferos e também em aves. Contudo, neste ano, Chernoff e Li purificaram a PTP do coração bovino associada à fosfatase ácida de BMr e concluíram que se tratava da mesma enzima. A partir desse ano, os trabalhos se intensificaram de tal maneira que, além de uma profunda caracterização do mecanismo de catálise e da estrutura, já destacado anteriormente, muito se pesquisou sobre os possíveis substratos fisiológicos.

O primeiro relato neste sentido ocorreu em 1989, quando Ramponi *et al.* observaram que a PTP de BMr do fígado de bovino defosforilava eficientemente *in vitro* o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-r). Posteriormente, utilizando peptídeos sintéticos contendo fosfotirosina, Stefani *et al.*, (1993) relataram uma atividade hidrolítica preferencial sobre o peptídeo derivado de um sítio de fosforilação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-r).

A autofosforilação de receptores de fatores do crescimento tem sido apontada como um passo crucial na proliferação celular induzida por sinais mitogênicos. Além disso, um maior estímulo na atividade tirosina quinase (Lau *et al.*, 1989) e/ou modificação no nível da atividade celular da PTP (Klarlund,

1985; Klarlund *et al.*, 1988) tem sido demonstrada em transformações neoplásicas. Isto levou alguns pesquisadores a supor que a sobre-expressão de algumas PTPs poderia suprimir ou mesmo reverter a transformação celular (Liebow *et al.*, 1989), até mesmo utilizando as PTPs de BMr (Ramponi *et al.*, 1992).

Ao menos para a IF2, Ramponi e colaboradores têm demonstrado que seu papel fisiológico está associado à hidrólise de resíduos de tirosina no EGF-r e PDGF-r autofosforilado, sendo que sua atividade pode ser regulada via fosforilação a nível de tirosina. O verdadeiro, se é que se pode falar assim, substrato fisiológico ainda não foi encontrado. Assim, como também não se sabe com certeza a função.

## 2 PROPOSIÇÃO

Como destacada na introdução desta Dissertação, as proteínas tirosina fosfatases desempenham um papel importante no controle do ciclo celular. Especificamente quanto a PTP de BMr, ainda não se sabe sua função fisiológica ou mesmo o substrato fisiológico.

Neste trabalho objetivamos caracterizar cineticamente a PTP de BMr do rim de carneiro, especialmente com relação à inibição por alguns compostos. Também avaliaremos o efeito da albumina do soro na atividade da enzima uma vez que diversos indícios apontam para um efeito ativador desta proteína, visto também que na literatura, não há citação sobre esse efeito do BSA. Para tanto, é fundamental a obtenção de uma enzima pura e homogênea, a qual foi obtida através de procedimentos de baixo custo visto que nosso laboratório não dispõe de equipamentos sofisticados.

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Material*

##### 3.1.1 *Obtenção do rim de carneiro*

O rim de carneiro foi obtido do Matadouro *Dom Pig* de Bauru-SP. As peças foram removidas logo após o sacrifício dos animais e transportadas em gelo moído para o laboratório onde foram limpas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.2 *Reagentes e Soluções*

Resinas para as colunas cromatográficas: SP-Sephadex C50-120 e Sephacryl S-200 (Pharmacia).

Substratos: pNPP, piridoxal-5-P, FMN, Tyr-P,  $\beta$ -naftil-P,  $\alpha$ -naftil-P, PPI, Ser-P,  $\alpha$ -glicero-P, D-glicose-6-P, ATP, AMP (Sigma Chemical Co.);  $\beta$ -glicero-P, ácido-6-fosfoglicônico (E. Merck Darmstadt).

Inibidores: molibdato de amônio, vanadato (Merck); pCMB, fluoreto de sódio, tartarato de sódio, piridoxal-HCl (Sigma Chemical Co.).

Reagentes para preparo dos tampões: ácido acético, glicina, glicil-glicina, ácido etilenodinitrilotetracético sal dissódico (EDTA), sulfato de amônio, fosfato dissódico (Merck); hepes, imidazol, bis-tris (hidroxi) metilaminometano (Sigma Chemical Co.).

Glicerol e reagentes redutores de tióis: DTT, G-SH,  $\beta$ -SH (Merck).

Todos os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema Milli Q.

#### 3.2 *Métodos*

##### 3.2.1 *Purificação da Enzima*

A metodologia utilizada para a purificação das fosfatases ácidas de BMr de rim de carneiro ocorreu exatamente como descrito por Taga e Van Etten (1982).

As etapas abaixo descritas foram realizadas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.1.1 Obtenção do extrato

Os rins de carneiro (1.000g), descongelados e cortados em fatias, foram homogeneizados em tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,0 (homogeneizador Omni-Mixer, 3 min, velocidade máxima), na proporção de 1,0 g de tecido para 4,0 mL de tampão. Em seguida, o homogeneizado obtido foi centrifugado por 20 min a 10.000 rpm em centrífuga refrigerada SORVALL RC 2B, com rotor GSA. Desprezado o precipitado, coletou-se o sobrenadante, o qual foi filtrado através de 4 camadas de gaze. O efluente obtido constituiu o extrato límpido.

### 3.2.1.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio

Realizou-se o fracionamento a 60% de saturação adicionando-se sulfato de amônio sólido (390,0 g de sal por litro de solução) ao extrato sob agitação em câmara fria a 4°C. Depois da adição completa do sal, deixa-se agitando lentamente por 2 horas. Após este período, centrifugou-se novamente a solução a 10.000 rpm por 20 min (rotor GSA). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso, numa redução de 1/5 do volume inicial, em tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 4,9, contendo EDTA 5 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 1 mmol L<sup>-1</sup>. A suspensão foi clarificada por centrifugação a 10.000 rpm por 20 min (rotor GSA).

### 3.2.1.3 Cromatografia em SP-Sephadex I

#### Eluição com Fosfato

A amostra clarificada (720 mL) foi aplicada a uma coluna de SP-Sephadex (4,5 x 16,5 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, contendo sulfato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, EDTA 5 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 1 mmol L<sup>-1</sup>. Após a passagem de toda amostra, a resina foi exaustivamente lavada com o mesmo tampão até A<sub>280</sub> praticamente igual a zero. A eluição da atividade se deu aplicando tampão fosfato dissódico 0,3 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,0, contendo EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. Foram coletadas frações de 20,0 mL, sob um fluxo de 4,0 mL min<sup>-1</sup> (bomba peristáltica BP-100, Incibrás). As frações eluídas com o tampão fosfato (inibidor competitivo desta enzima) contendo mais do que 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas e a solução resultante foi concentrada com sulfato de amônio sólido a 75%

de saturação (5 16,0 g de sal por litro de solução). Após agitação por uma hora, foi centrifugada a 18.000 rpm por 30 min (rotor SS-34). O precipitado foi ressuspenso em tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, contendo sulfato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, EDTA 5 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 0,5 mmol L<sup>-1</sup>.

#### 3.2.1.4 Cromatografia em SP-Sephadex II

##### Eluição com Fosfato

A fração da etapa anterior (40,0 mL) foi aplicada a uma segunda coluna de SP-Sephadex (2,5 x 9,0 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, contendo sulfato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, EDTA 5 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. Após a passagem de toda amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão até A<sub>280</sub> praticamente igual a zero. A enzima foi eluída como descrito anteriormente e as frações (12 mL) contendo atividade superior a 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas e concentradas por ultrafiltração sob pressão positiva de nitrogênio.

#### 3.2.1.5 Cromatografia de Exclusão Molecular em Sephacryl S-200

A fração da etapa anterior (8,5 mL) foi aplicada a uma coluna de Sephacryl S-200 (3,0 x 110 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, contendo cloreto de sódio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, EDTA 5 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 5 mmol L<sup>-1</sup>. Após a penetração da amostra no gel a cromatografia foi desenvolvida pela passagem do tampão de equilíbrio com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, as frações (13 mL) contendo atividade superior a 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas e concentradas por ultrafiltração sob pressão positiva de nitrogênio.

#### 3.2.1.6 Armazenamento da Enzima

A enzima purificada foi estocada a -20°C, em glicerol 50%, fosfato 10mM e β-SH 1 mmol L<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 Determinação da Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade enzimática, a enzima foi diluída em tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, imediatamente antes do ensaio, e mantida a 4 °C.

A atividade enzimática foi determinada através dos seguintes métodos:

### 3.2.2.1 Dosagem do *p*-Nitrofenol (Monitoramento da Atividade Enzimática)

Em um volume final de 1 mL, a reação foi iniciada pela adição da enzima a um meio contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão acetato de sódio, pH 5,0, e 5 mmol L<sup>-1</sup> de pNPP. A paralização ocorreu pela adição de 1 mL de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, após incubação por 10 min a 37°C. A formação do *p*-Nitrofenol (pNP) foi determinada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro ULTROSPEC 2000-Pharmacia Biotech) pela leitura da absorção a 405 nm (coeficiente de extinção molar da forma do *p*-nitrofenóxido: 18.000 (mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>) (Chaimovich and Nome, 1970).

Uma Unidade de Atividade Enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de pNP por min.

A Atividade Enzimática Específica (AE) é expressa como Unidade de Atividade Enzimática por miligrama de proteína (AE = UE/mg).

### 3.2.2.2 Dosagem do Fosfato Inorgânico (Pi)

A reação procedeu como descrito em 3.2.2.1 exceto que a paralisação da mesma foi feita pela adição de 1 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,0). A coloração do complexo fosfo-molibdico foi adquirida a temperatura ambiente pela adição de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,0), como redutor, de acordo com o método descrito por Lowry and Lopez (1946). A absorbância foi medida a 700 nm, 30 min após a adição do ácido ascórbico. O coeficiente de extinção molar para o complexo reduzido (azul de molibdênio) é 4.000 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.2.3 Dosagem da Tirosina

A atividade fosfotirosina-fosfatase da enzima foi medida de maneira similar à descrita em 3.2.2.1, usando como substrato Tyr-P 5 mmol L<sup>-1</sup>. A produção de tirosina foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorção a 293 nm e usando um coeficiente de extinção molar de 2.381 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup> (Fasman, 1976).

#### 3.2.2.4 Dosagem do $\beta$ -Naftol

A reação ocorreu segundo Material e Métodos, 3.2.2.1, mas usando como substrato  $\beta$ -naftil-P  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . O  $\beta$ -naftol formado foi medido espectrofotometricamente pela leitura da absorção a 346 nm e usando um coeficiente de extinção molar de  $2.780 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ .

#### 3.2.3 Determinação da Concentração Proteica

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry como descrito por Hartree (1972), utilizando BSA como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 2,0 mL do Reagente C a 0,2 mL da amostra. Após 10 min, adicionou-se 0,2 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu (1:1). A leitura da absorbância foi realizada a 660 nm após 30 min da adição do reagente de Folin-Ciocalteu à temperatura ambiente.

O perfil proteico obtido das colunas cromatográficas foi estabelecido através da leitura direta da  $A_{280}$  (Layne, 1957).

#### 3.2.4 Estudos Cinéticos

Com a enzima purificada, realizou-se alguns estudos cinéticos. Todos os ensaios, sem exceção, foram feitos, ao menos, em triplicata. As barras de erro nas figuras correspondem ao erro padrão (s.e.).

##### 3.2.4.1 Efeito do tempo de incubação

A atividade enzimática foi determinada nas condições de ensaio descritas, com exceção do tempo de paralização da reação que variou de 0 a 40 min. Para cada tempo foi feito um controle, sendo que neste tubo o hidróxido de sódio foi adicionado antes da adição da enzima.

##### 3.2.4.2 Efeito da Concentração da enzima

A atividade enzimática foi determinada como descrito utilizando-se diferentes concentrações da enzima (de 15  $\eta\text{g}$  a 322  $\eta\text{g}$ ).

##### 3.2.4.3 Efeito do pH

O efeito do pH no meio de ensaio foi estudado utilizando-se meios de incubação preparados com diferentes tampões na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os

tampõe utilizados foram glicina (pH 2,5 e 3,0); acetato (pH 3,5-5,5); bis-tris (pH 6,0 e 6,5); hepes (pH 7,0 e 8,0) e glicil-glicina (pH 9,0). A atividade foi determinada como descrito.

#### 3.2.4.4 Efeito da Temperatura e Determinação da Energia de Ativação ( $E_a$ )

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Material e Métodos, 3.2.2.1, utilizando um tempo de reação de 5 min. A reação foi iniciada pela adição da enzima previamente diluída em tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,0.

A  $E_a$  da reação de hidrólise do pNPP (5 mmol L<sup>-1</sup>) pela PTP de BMr do rim de carneiro foi determinada através do gráfico de Arrhenius:  $\log k \times 1/T$  (K<sup>-1</sup>), onde  $k$  é a velocidade máxima em diferentes temperaturas (de 0 a 67 °C), expressa em UE (μmol min<sup>-1</sup>). No gráfico de Arrhenius, a inclinação =  $-E_a/2,3R$ .

#### 3.2.4.5 Estudo de Especificidade

A atividade da PTP de BMr de rim de carneiro sobre alguns compostos fosforilados foi determinada dosando o fosfato liberado no meio de reação como descrito, sendo que a concentração da enzima utilizada foi de 215 ηg mL<sup>-1</sup>. A atividade sobre o pNPP foi considerada como 100%.

Os compostos fosforilados testados foram: FMN, Tyr-P, pNPP, β-naftil-P, α-naftil-P, PPI, Ser-P, piridoxal-5-P, α-glicero-P, β-glicero-P, D-glicose-6-P, ácido 6-fosfogluônico, ATP e AMP (todos a 5 mmol L<sup>-1</sup>).

#### 3.2.4.6 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) da reação catalisada pela PTP de BMr do rim de carneiro foram determinados utilizando-se o pNPP, FMN, Tyr-P e β-naftil-P como substrato. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculados através do ajuste dos pontos pela equação da hipérbole retangular (Programa Origin, v. 5.0).

#### 3.2.4.7 Efeito do BSA na Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) da reação catalisada pela PTP de BMr do rim de carneiro foram determinados utilizando-se o pNPP, FMN, Tyr-P e β-naftil-P como substrato, contendo BSA 1 mg mL<sup>-1</sup>, no meio de reação ou no meio de

diluição da enzima. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculados como descrito em Material e Métodos, 3.2.4.6).

#### 3.2.4.8 Efeito do BSA na $E_a$ para a hidrólise do pNPP

A atividade enzimática foi determinada como descrito (item 3.2.2.1). A reação foi iniciada pela adição da enzima previamente diluída em tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, na presença de BSA 1 mg mL<sup>-1</sup>, no meio de reação ou no meio de diluição. Como controle, a reação procedeu na ausência de BSA tanto no meio de diluição como de reação.

A  $E_a$  da reação de hidrólise do pNPP (5mM) pela PTP de BMr do rim de carneiro, foi determinada na presença de BSA 1 mg mL<sup>-1</sup>, no meio de reação, ou no meio de diluição (item 3.2.4.4).

#### 3.2.4.9 Efeito de Compostos na Estabilidade Térmica

Neste experimento a enzima foi diluída (43 µg mL<sup>-1</sup>) e pré-incubada a 60°C, em tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, na ausência ou na presença de BSA 0,1%, DTT 1 mmol L<sup>-1</sup>, glicerol 50%, fosfato inorgânico (Pi) 10 mmol L<sup>-1</sup> ou todos os quatro juntos. Após intervalos de tempo definidos (0 a 15 min), alíquotas de 500 µl foram retiradas e colocadas em gelo. Em seguida, a atividade residual foi determinada (Material e Métodos, 3.2.2.1) tomando-se a atividade enzimática no tempo zero de pré-incubação como 100%.

#### 3.2.4.10 Efeito de Compostos na Atividade

O efeito de diversos compostos na atividade da PTP de BMr do rim de carneiro foi verificado como descrito (item 3.2.2.1) utilizando um tempo de reação de 10 min. A atividade na ausência do composto foi tomada como 100%.

Os compostos utilizados foram: glicerol (5 mmol L<sup>-1</sup>), ácido úrico (1 mmol L<sup>-1</sup>), β-SH (5 mmol L<sup>-1</sup>), EDTA (10 mmol L<sup>-1</sup>), G-SH (5 mmol L<sup>-1</sup>), DTT (5 mmol L<sup>-1</sup>), adenosina (1 mmol L<sup>-1</sup>), guanosina (1 mmol L<sup>-1</sup>), SDS (10 mmol L<sup>-1</sup>), triton X-100 (0,2%), lactose (15 mmol L<sup>-1</sup>), glicose (15 mmol L<sup>-1</sup>) e sacarose (15 mmol L<sup>-1</sup>).

### 3.2.4.11 Efeito de Metais na Atividade

O efeito de diversos íons metálicos na atividade da PTP de BMr do rim de carneiro foi verificado como descrito (Material e Métodos, 3.2.2.1 e 2, sem ou com pré-incubação, respectivamente), a 37°C por 20 min. A atividade na ausência do metal foi tomada como 100%.

Os metais utilizados foram:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ag}^+$  (todos a 1 mmol L<sup>-1</sup>).

### 3.2.4.12 Efeito de potenciais Inibidores

O efeito de diversos potenciais inibidores da atividade da PTP de BMr do rim de carneiro foi verificado como descrito em 3.2.2.1. A atividade na ausência do inibidor foi tomada como 100%.

Os inibidores testados foram: piridoxal-5-P (0,01 e 0,1 mmol L<sup>-1</sup>), vanadato (0,01 e 0,1 mmol L<sup>-1</sup>), pCMB (1 e 10 µmol L<sup>-1</sup>), molibdato (0,01 e 0,1 mmol L<sup>-1</sup>), fosfato (1 e 10 mmol L<sup>-1</sup>), fluoreto (1 e 10 mmol L<sup>-1</sup>), tartarato (1 e 10 mmol L<sup>-1</sup>), piridoxal-HCl (0,1 e 1 mmol L<sup>-1</sup>).

### 3.2.4.13 Estudo dos Mecanismos de Inibição

O tipo de inibição e as constantes de inibição ( $K_i$ ) para o Pi, piridoxal-5-P, molibdato de amônio e vanadato foram determinados através dos gráficos de Lineweaver-Burk (1934), de Dixon (1979) ou de Cornish-Bowden (1995). Através do gráfico de Lineweaver-Burk é possível determinar o tipo de inibição, se competitivo, não-competitivo, misto ou acompetitivo. A  $K_i$  para a inibição competitiva e não-competitiva foi determinada através do gráfico de Dixon (Inclinação das retas do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* a concentração do inibidor). O intercepto no eixo  $x$  corresponde ao valor de  $K_i$  em módulo.

Na inibição mista, as retas no gráfico de Lineweaver-Burk se interceptam no 2º quadrante e indicam a existência de 2 constantes de inibição, uma constante de inibição competitiva ( $K_{ic}$ ) e uma constante de inibição acompetitiva ( $K_{ia}$ ). A primeira é determinada através do intercepto das retas no gráfico de  $1/V$  *versus*  $[I]$  determinados em duas ou mais concentrações diferentes do substrato. A segunda constante,  $K_{ia}$ , corresponde ao intercepto das retas no gráfico da  $S/V$  *versus*  $[I]$ ,

---

também determinados em duas ou mais concentrações distintas do substrato (Cornish-Bowden, 1995).

Para a determinação da  $I_{50}$  para vanadato foram utilizados diferentes substratos, a hidrólise foi medida na presença de várias concentrações de vanadato, como descrito em Material e Métodos, 3.2.2.2.

Para a hidrólise da FMN e da Tyr-P, os valores da  $K_i$  para o vanadato foram determinados através do método de Dixon (1979). A hidrólise da FMN foi monitorada de acordo com Material e Métodos, 3.2.2.2. A hidrólise da Tyr-P foi determinada pela quantificação da tirosina em meio alcalino (Material e Métodos, 3.2.2.3).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Purificação da Enzima

O estudo da PTP de BMr constitui-se de grande importância, especialmente por estar relacionada a diversos processos celulares como crescimento, diferenciação, proliferação celular e controle do metabolismo, e ainda por desconhecermos seu substrato fisiológico. A fim de que seja possível qualquer tipo de estudo mais profundo sobre a atividade desta enzima, sua purificação até homogeneidade é crucial. Desta forma, neste trabalho, realizamos a purificação da fosfatase ácida de BMr do rim de carneiro e a caracterização de algumas propriedades físico-químicas e cinéticas.

A fim de obter a quantidade de material necessária ao estudo, 1,0 kg de rim de carneiro foi processado gerando grande volume de solução proteica. A técnica de purificação foi a mesma desenvolvida por Taga e Van Etten (1982), envolvendo o fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias de troca-iônica em SP-Sephadex por íon afinidade (Figuras 1 e 2). A enzima, praticamente pura e homogênea, foi obtida após a segunda cromatografia. Em seguida, foi concentrada com nitrogênio (sob pressão positiva) e submetida à cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200) de modo que qualquer outro possível contaminante fosse removido (Figura 3). A Tabela I exhibe um resumo dos passos fundamentais para o processo de purificação da fosfatase ácida de BMr (< 20 kDa) de rim de carneiro.

A PTP de BMr foi purificada cerca de 1.291 vezes, apresentando A.E. de 99,4  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  e um rendimento de cerca de 4%. A enzima foi estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  em um meio contendo glicerol 50%, fosfato 10  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\beta\text{-SH}$  1  $\text{mmol L}^{-1}$ . Nestas condições a enzima foi estável por um ano.

## 4.2 Estudos Cinéticos

### 4.2.1 Efeito do Tempo de Incubação

Iniciando o estudo cinético da PTP de BMr do rim de carneiro verificamos que ela apresentou uma linearidade na formação do produto, quando os ensaios eram realizados por um tempo de 0 a 40 min (Figura 4).

### 4.2.2 Efeito da Concentração da Enzima

Através da influência da concentração da enzima, na velocidade da reação, verificamos uma correlação linear entre a [Enzima] e a [Produto] formado até a concentração de  $241,0 \text{ ng mL}^{-1}$ , correspondendo a 0,6 unidades de absorvância de 405 nm (Figura 5), mas acima desta concentração, a formação do produto não é mais linear, provavelmente pelo fato do substrato não estar em concentração saturante. Podemos afirmar que este não é um efeito relacionado à sensibilidade do espectrofotômetro uma vez que a curva padrão de p-nitrofenol, nas mesmas condições que o ensaio, é linear até a absorvância de valor 2,0, pois, conforme a Lei de Beer-Lambert, a absorvância A é diretamente proporcional à concentração do soluto absorvente.

### 4.2.3 Efeito do pH

O gráfico da velocidade em função da variação do pH (entre 2,5 e 9,0), resultou numa curva em forma de sino, revelando entre o pH 4,0 e 5,5, uma ~~variação mínima na quantidade de produto liberado (aproximadamente de 10%),~~ evidenciando muito mais um platô de atividade do que um pH ótimo (Figura 6). Este aspecto é similar ao referido para as PTP de BMr do fígado (Heinrikson, 1969), cérebro (Chaimovich and Nome, 1970; Saeed *et al*, 1990) e coração bovinos (Chernoff and Li, 1985) quanto à faixa de pH ótimo para a enzima. Verificando a atividade enzimática uma unidade abaixo e acima o platô, notamos que no pH 3,0 a atividade é cerca da metade obtida no pH 6,2 (40,5 e 89%, respectivamente). Evans *et al* (1996), demonstraram que o pKa para a Cys-12, essencial para a catálise enzimática, era menor ou igual a 4,0. Assim, no pH 3,0, este resíduo de Cys estará

na forma protonada (R-SH), dificultando a catálise. Além disso, no pH 7,0, a atividade residual é de apenas 24% em relação ao pH 5,0.

#### 4.2.4 Efeito da Temperatura e Determinação da $E_a$

A análise do efeito da temperatura na atividade enzimática foi estudada medindo-se a formação do produto (pNP) após 5 min de incubação a diferentes temperaturas (4, 27, 37, 47, 57 e 67°C) e revelou-se muito interessante.

O ensaio foi realizado em pH 5,0 e iniciado pela adição da enzima. O gráfico da velocidade em UE em função da temperatura exibiu um crescimento significativo da atividade até atingir, na temperatura de 57°C, a máxima formação do produto. A partir deste ponto a queda na velocidade é vertiginosa, tomando-se como referência a velocidade na temperatura de 37°C (100%), chama a atenção que, a 57°C, esta é cerca de 2,8 vezes maior; a 67°C a velocidade é um pouco maior que a 37°C; a 27°C a velocidade corresponde a cerca de 35%, aproximadamente (Figura 7).

Pudemos verificar que a formação do produto aumenta consideravelmente com a temperatura. Alguns fatores podem explicar este comportamento como a influência da temperatura na quebra do complexo enzima-produto (E-P); pelo efeito na afinidade enzima-substrato; devido a alguma alteração nos pKs, os quais são determinados por suas energias de ativação (Dixon & Webb, 1979). Entretanto, a determinação de qual ou quais fatores estão influenciando neste caso não pode ser realizada através deste estudo. A grande complexidade das variáveis envolvidas exige a determinação de constantes termodinâmicas a partir das constantes de velocidade, implicando em diversos experimentos e tratamentos matemáticos dos resultados, o que foge ao nosso objetivo.

A análise do efeito da temperatura na atividade da fosfatase ácida em mamíferos não é freqüente, especialmente com relação à enzima de BMr. Uma rara exceção é o relato de Dissing & Svensmark (1990), onde verificaram que as isoenzima *f* e *s* de eritrócitos humanos sofreram inativação térmica a 63 e 66°C, respectivamente. Relataram ainda que a atividade residual após a pré-incubação a 60°C sofreu uma elevação considerável (quase 2 vezes) nos instantes iniciais do tratamento. Esta ativação foi explicada como um rearranjo transitório das moléculas

da enzima, a qual foi sucedida por uma inativação dependente do tempo que eliminou praticamente toda atividade após 20 minutos de pré-incubação. Kanai & Kondo (1991) trabalhando com suspensão de *Pseudomonas pseudomallei* e *P. cepacia*, verificaram a retenção de grande parte da atividade após 20 minutos de pré-incubação a 60°C.

Os estudos de estabilidade térmica e, principalmente, temperatura ótima e cálculo da energia de ativação tem sido realizado com maior frequência em fosfatase ácidas de plantas. Diversos trabalhos tem relatado uma temperatura ótima de 60°C como Ullah & Gibson, 1988 (cotilédone de soja); De-Kundu & Banerjee, 1990 (caule em germinação de *Vigna radiata*), Biswas & Cundiff, 1991 (semente em germinação de *Vigna sinensis*).

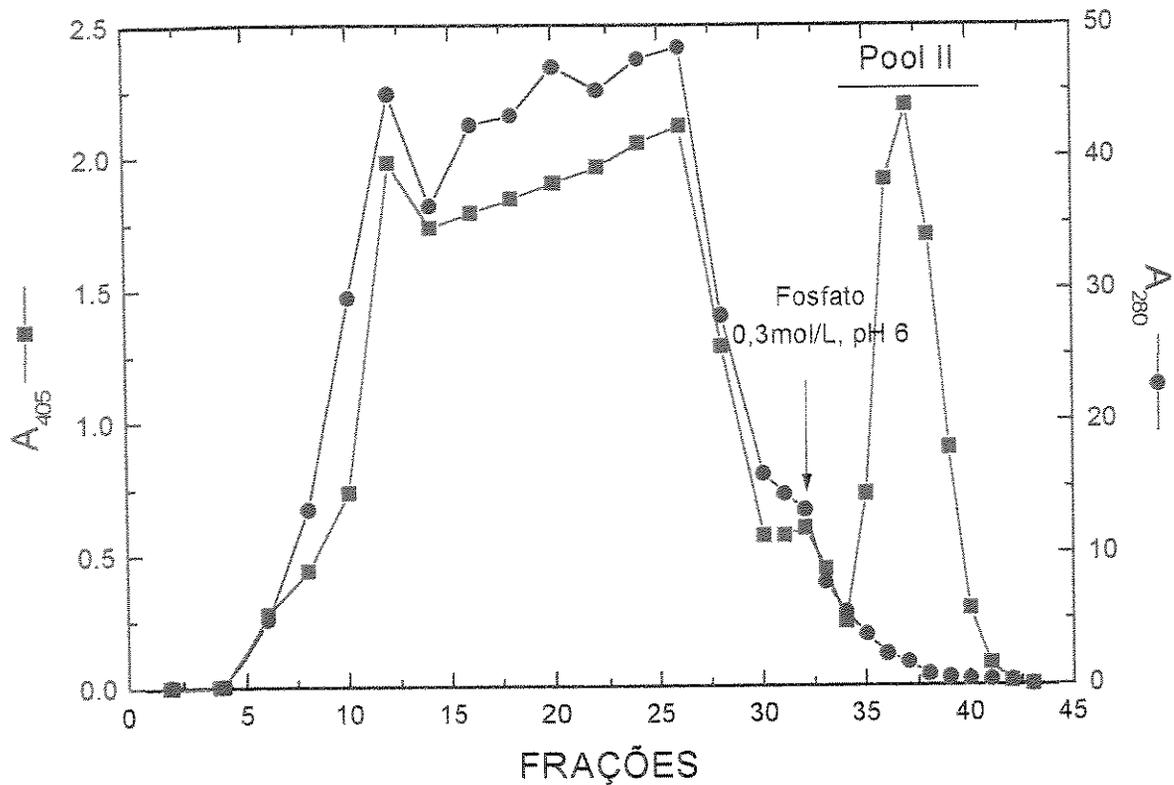
Com relação à Ea, também poucos são os relatos na literatura, especialmente quanto às PTP de BMr. O valor da energia de ativação (Figura 7, Interno) obtido neste trabalho ( $54,5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) é semelhante à resultados obtidos por Zhang & Van Etten (1991) onde realizaram estudos de dependência da temperatura para a PTP de BMr do coração bovino nos valores de pH 5,0 e 7,0 e revelaram energia de ativação praticamente idênticas para o passo limitante da reação ( $56,9$  e  $58,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , respectivamente).

Assim, este conjunto de experimento serviu, principalmente, para determinar as condições padrão de ensaio a serem empregadas durante a análise das outras características cinéticas da PTP de BMr do rim de carneiro. Os ensaios posteriores foram realizados por um período de incubação que variava de 10 a 40 min, e com uma concentração de enzima variando entre 40 e 215  $\eta\text{g}$  por tubo, dependendo do experimento, mantido o pH 5,0, a 37°C. Esta temperatura foi a escolhida pelo fato da PTP apresentar uma estabilidade térmica nesta temperatura maior que a 55°C (resultado não mostrado), e por não promover a hidrólise térmica espontânea do substrato em níveis significativos, e por permitir comparação com dados da literatura.

**Tabela I. Purificação da Fosfatase Ácida de Rim de Carneiro.**

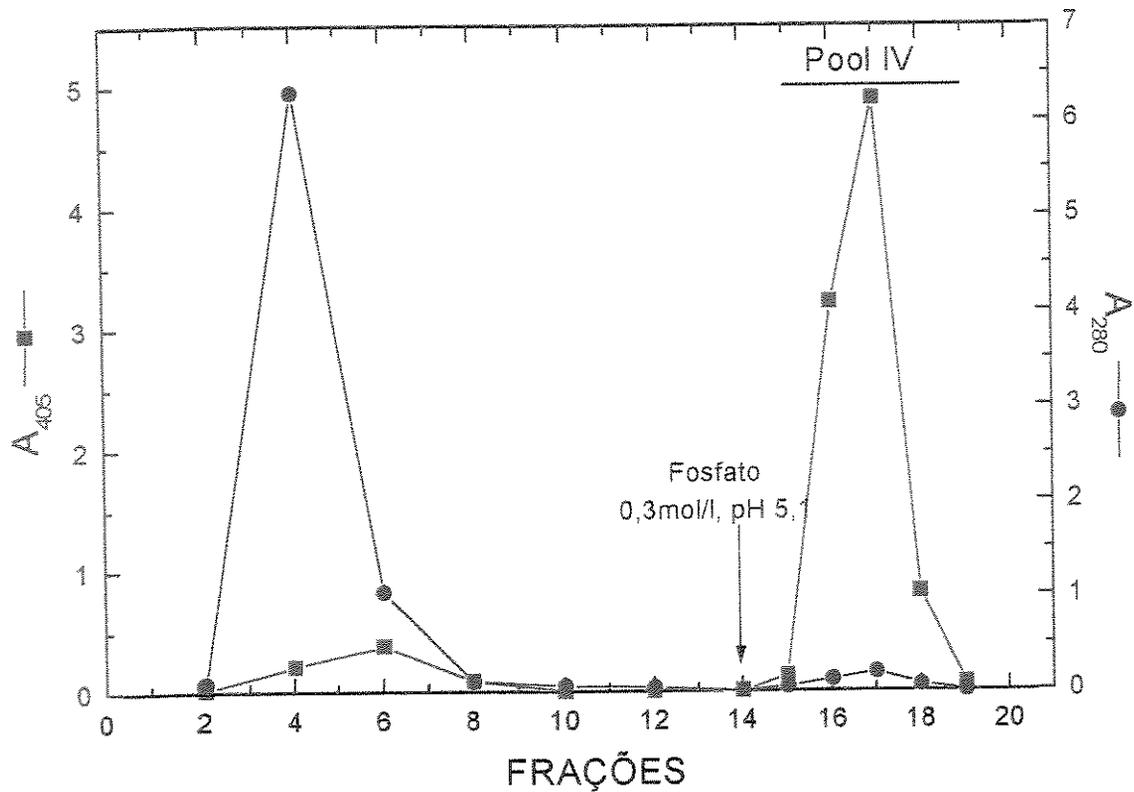
Para a purificação, 1,0 kg de rim de carneiro foi utilizado.

Fração	Volume (mL)	U.E. Totais	Proteína Total (mg)	A.E. U.E./mg	Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato	4.200	3.255	41.895	0.077	1.0	100
Sulfato de amônio 0-60%	800	2.932	24.897	0.118	1.53	90.1
1ª.SP-Sephadex	26	308.75	62.24	4.96	64.42	9.49
2ª.SP-Sephadex	8.5	219.69	5.20	42.25	548.70	6.75
Sephacryl	1.5	128.26	1.29	99.43	1291.3	3.94



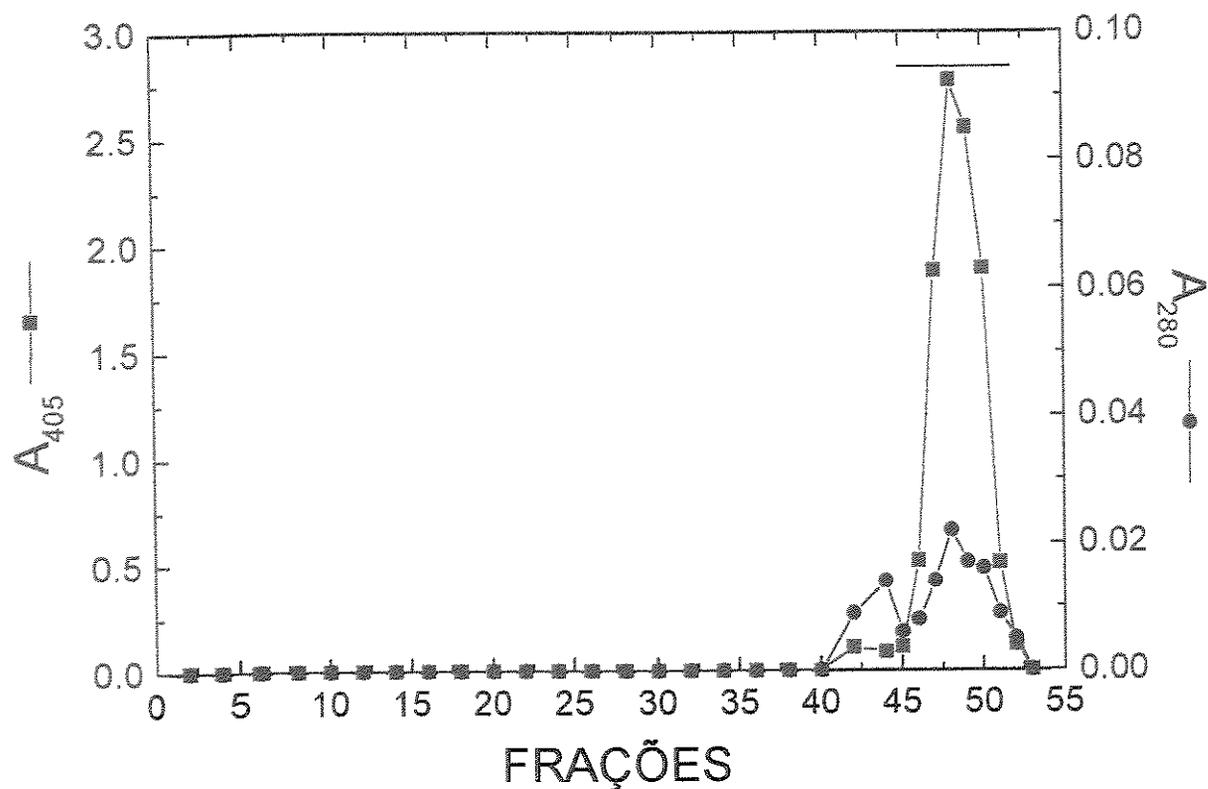
**FIGURA 1. Cromatografia em SP-Sephadex - I.**

A amostra ressuspendida e clarificada após a concentração com sulfato de amônio 60% foi aplicada à primeira coluna de SP-Sephadex C-50 (4,5 x 16,5 cm) equilibrada com tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), contendo sulfato de amônio 100 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 5 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. Utilizou-se o mesmo tampão para a lavagem da coluna e o tampão fosfato 300 mmol L<sup>-1</sup> (pH 6,0), contendo EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 0,5 mmol L<sup>-1</sup> para a eluição. As frações (25,0 mL) foram monitoradas a 280 nm para proteína e a 405 nm para a atividade como indicado. As frações com mais de 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas ("pool" II) e concentradas com sulfato de amônio a 75% de saturação.



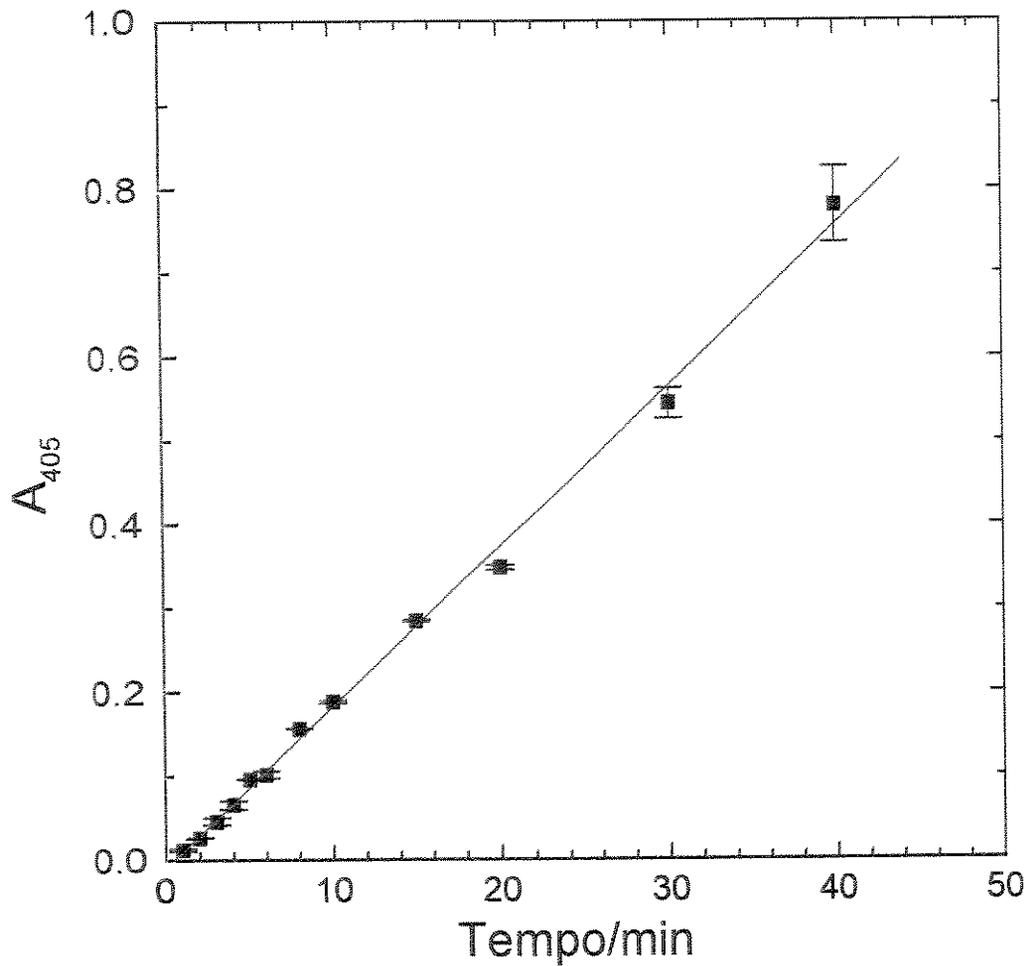
**FIGURA 2. Cromatografia em SP-Sephadex - II**

O sobrenadante límpido do passo anterior foi aplicado a uma segunda coluna de SP-Sephadex (2,5 x 9,0 cm) equilibrada com tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), contendo sulfato de amônio 100 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup> e β-SH 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. A coluna foi lavada e a atividade eluída conforme descrito na Figura 1. As frações (12,0 mL) foram monitoradas a 280 nm para proteína e 405 nm para a atividade como descrito e, aquelas contendo mais de 0,1 UE mL<sup>-1</sup>, foram reunidas ("pool" IV) e concentradas por ultrafiltração sob positiva pressão de nitrogênio.



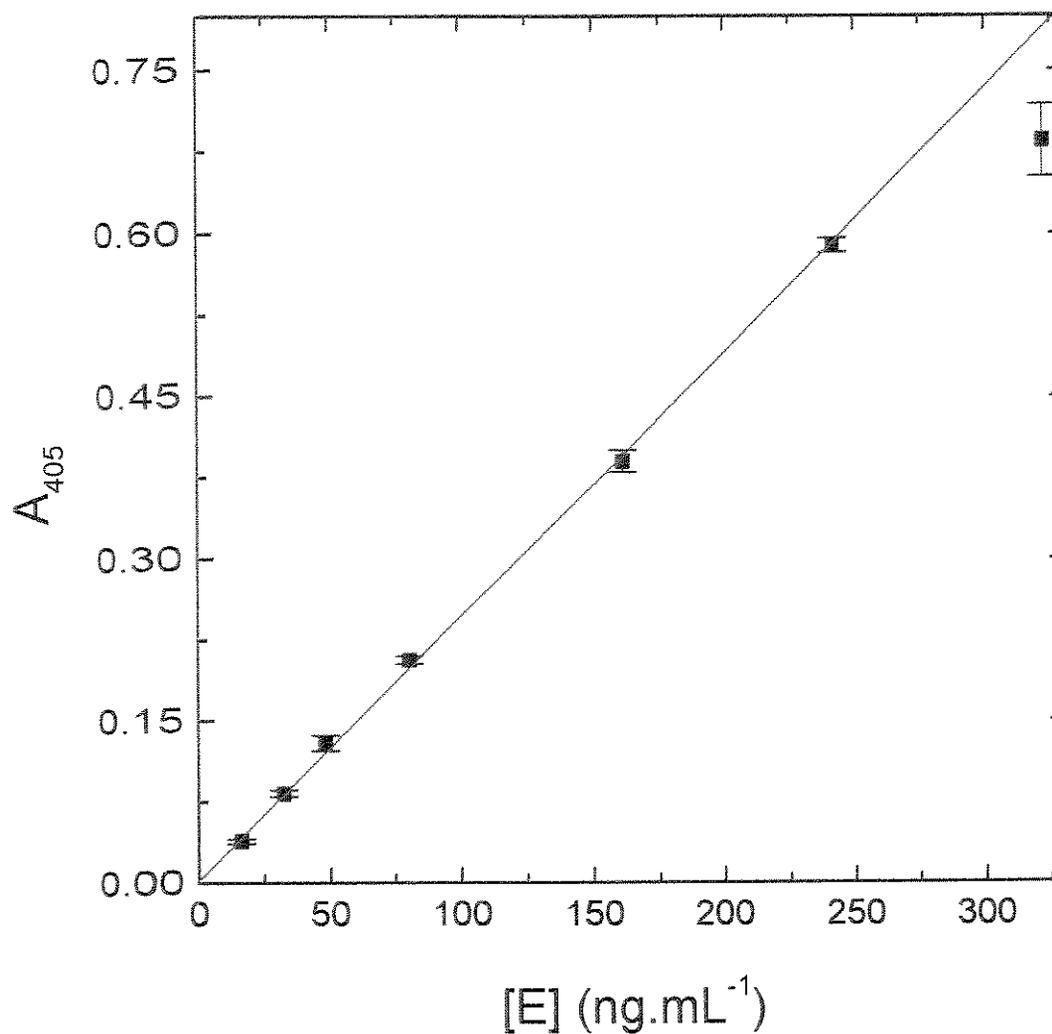
**FIGURA 3. Cromatografia de Exclusão Molecular - Sephacryl S-200**

A enzima concentrada na etapa anterior (8,5 mL) foi aplicada à coluna de Sephacryl S-200 (3,5 x 75 cm), equilibrada com tampão acetato 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, contendo 250 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl e 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de β-mercaptoetanol. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e as frações (13 mL) foram monitoradas a 280 nm para proteína e a 405 nm para atividade, como indicado.



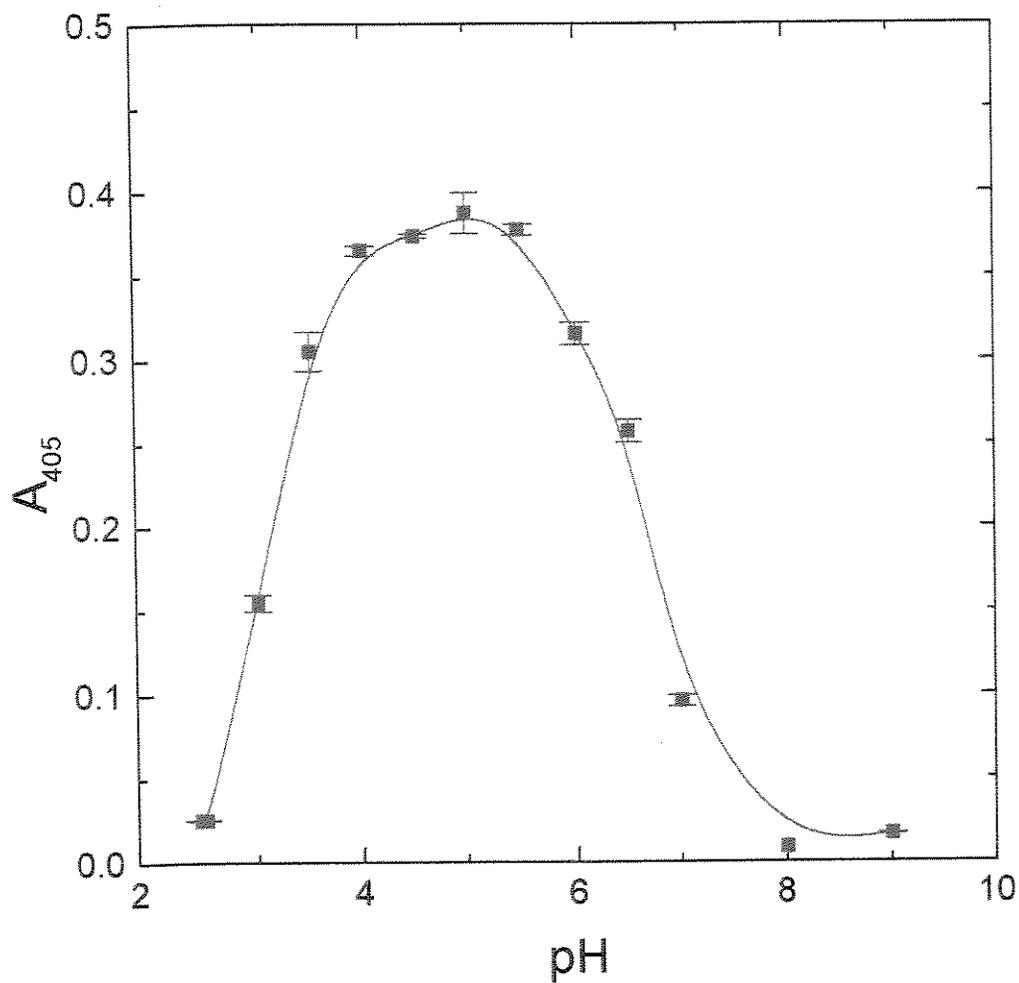
**FIGURA 4. Influência do Tempo de Incubação na Atividade da PTP.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1) utilizando o pNPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 43  $\eta$ g de enzima.



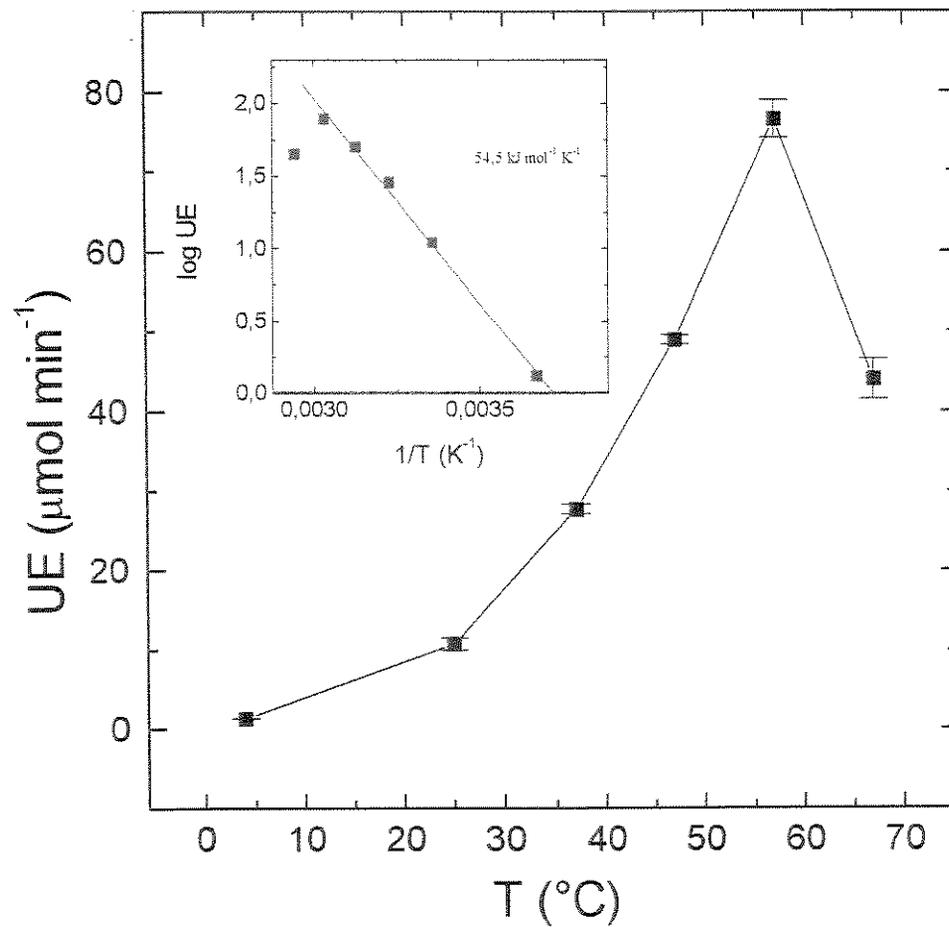
**FIGURA 5.** Influência da Concentração de Enzima na Atividade da PTP.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1) utilizando o pNPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de substrato.



### FIGURA 6. Influência do pH na Atividade da PTP

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1) utilizando o pNPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 53,75 ng enzima. Os tampões utilizados na concentração de 100 mmol L<sup>-1</sup> foram: Glicina (pH 2,5-3,0), Acetato (pH 3,5-5,5), bis-Tris (pH 6,0-6,5), hepes (pH 7,0-8,0), glicil-glicina (pH 9,0).



**FIGURA 7. Influência da Temperatura na Atividade da PTP.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1) utilizando o pNPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 143,3 ng de enzima. Interno: Gráfico de Arrhenius. A  $E_a$  para a hidrólise do pNPP foi calculada como descrito em Material e Métodos (3.2.4.4).

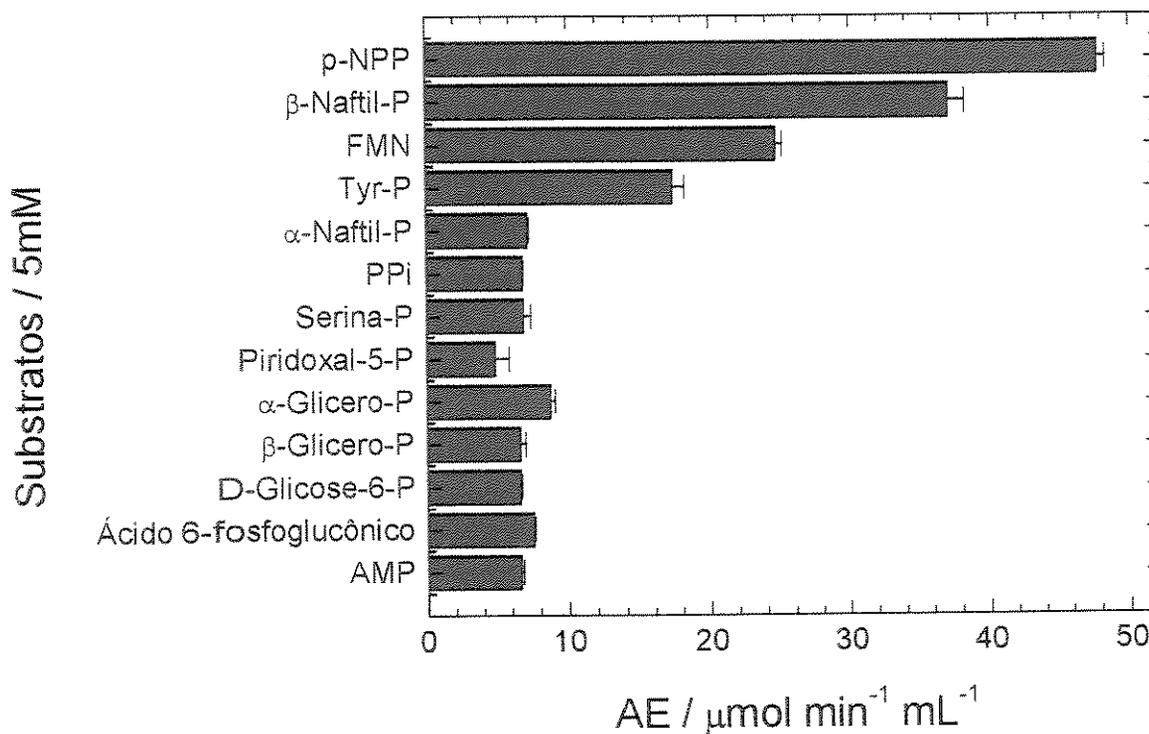
#### 4.2.5 Estudo de Especificidade

A atividade relativa da PTP de BMr sobre diversos substratos revela uma seletiva especificidade da enzima. Dos substratos testados, esta somente hidrolizou significativamente pNPP,  $\beta$ -naftil-P, FMN, e Tyr-P, sendo que estes dois últimos são potenciais substratos fisiológicos. Os demais substratos não apresentaram atividade significativa (Figura 8). Estudos realizados por Zhang & Van Etten (1990); Wo *et al* (1992) demonstraram anteriormente a necessidade do substrato possuir uma estrutura aromática ligada à molécula do substrato, bem como uma estrutura orgânica específica, como no caso da FMN.

#### 4.2.6 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

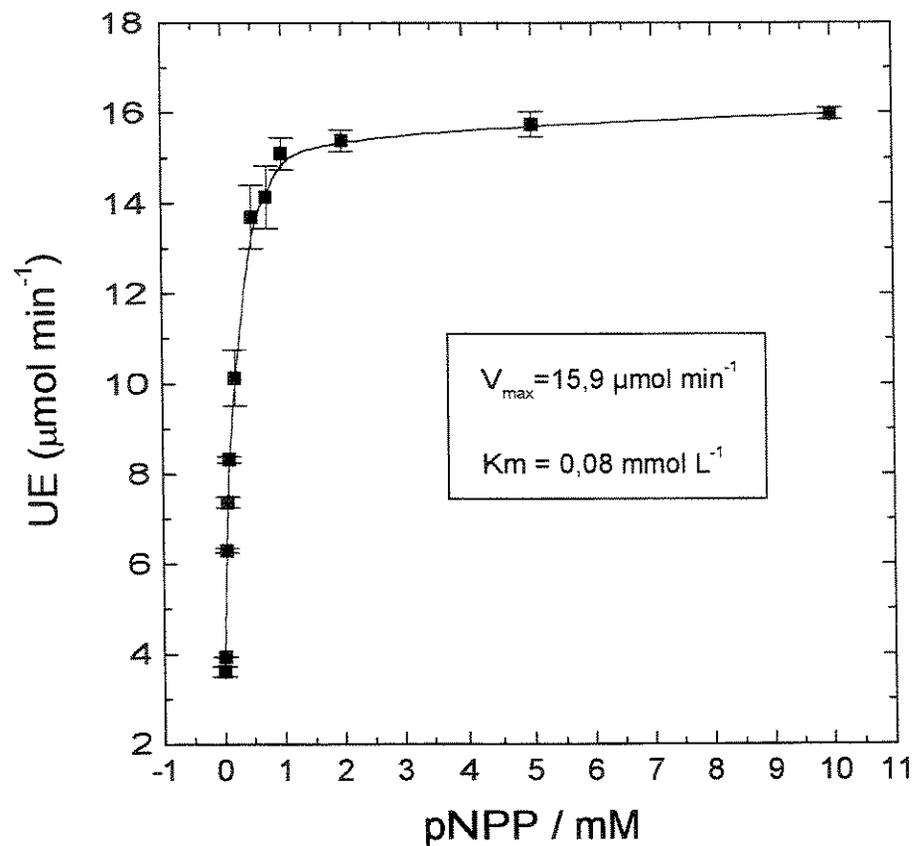
O efeito da concentração do substrato (pNPP) na atividade enzimática foi analisado utilizando uma concentração de pNPP entre 0,01 e 10,0 mmol L<sup>-1</sup>. O gráfico da velocidade contra concentração do substrato apresenta uma curva típica de Michaelis-Menten (hipérbole retangular) e podemos notar que o estado estacionário é atingido com uma concentração de pNPP de cerca de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 9). Os parâmetros cinéticos,  $K_m$  e  $V_{max}$ , foram obtidos através do Programa Origin (v. 5.0) pelo ajuste dos pontos obtidos, a equação da hipóbole retangular.

O mesmo procedimento experimental foi realizado para a FMN, Tyr-P e  $\beta$ -naftil-P, sendo os parâmetros cinéticos resumidos na Tabela II. Assumindo a relação  $k_{cat} K_m^{-1}$  (s<sup>-1</sup> mmol<sup>-1</sup> L) como uma medida da especificidade, podemos notar que a Tyr-P apresenta-se como um substrato pobre ( $k_{cat} K_m^{-1} = 0,66$ ), muito embora, em relação ao pNPP, sua velocidade de hidrólise é apenas cerca de 35% menor (Figura 8). O que ocorre aqui é a baixa afinidade da enzima por este substrato,  $K_m$  de 8,75 mmol L<sup>-1</sup>, fato também observado para a PTP de cérebro bovino,  $K_m$  5,3 mmol L<sup>-1</sup> (Saeed *et al*, 1990); para a IF2 de PTP de BMr de ratos,  $K_m$  6,0 mmol L<sup>-1</sup> (Ramponi & Stefani, 1997). De maneira geral, estas fosfatases apresentam uma atividade sobre a Tyr-P da ordem de 35 a 60% em relação ao pNPP.



### FIGURA 8. Especificidade da PTP

A formação do produto foi quantificada através da liberação do Pi, como descrito em Material e Métodos (3.2.2.2). A reação foi iniciada pela adição 215,0 ng de enzima, e a concentração final dos substratos era de 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.



**FIGURA 9.** Influência da Concentração do pNPP na Atividade da PTP.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1) utilizando o pNPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 215,0 ng de enzima.

**Tabela II. Efeito de BSA nos Parâmetros Cinéticos da PTP de Rim de Carneiro com Diferentes Substratos.**

O ensaio foi realizado na ausência ou na presença de BSA ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ); o BSA estava presente no meio de reação ou no meio de diluição da enzima.

	Substrato			
	pNPP	$\beta$ -Naftil-P	Tyr-P	FMN
$K_m$ ( $\text{mmol L}^{-1}$ )				
Ausente	0.08	0.37	10.90	0.51
Meio de Reação	0.25	1.38	9.17	-
Meio de Diluição	0.18	0.63	3.38	0.49
$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )				
Ausente	15.9	10.9	10.4	11.3
Meio de Reação	20.8	20.8	13.5	-
Meio de Diluição	29.5	23.4	16.2	20.1
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )				
Ausente	22.3	7.6	7.2	7.9
Meio de Reação	29.1	7.2	9.4	-
Meio de Diluição	82.4	32.8	11.3	28.1
$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \text{ mmol L}^{-1}$ )				
Ausente	278.8	20.6	0.66	15.4
Meio de Reação	116.5	5.2	1.03	-
Meio de Diluição	457.6	52.1	3.34	57.4

#### 4.2.7 Efeito do BSA na Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Verificando-se que nos experimentos realizados com BSA em nosso laboratório, ocorria uma elevação dos valores nas atividades enzimáticas, resolvemos estudar o que de fato poderia estar ocorrendo.

Foram realizados diversos experimentos para se determinar os parâmetros cinéticos para a hidrólise dos melhores substratos na ausência ou na presença da BSA ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A albumina esteve presente tanto no meio de reação como no de diluição da enzima.

Analisando os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  obtidos (Tabela II), verificamos que há um aumento da  $V_{max}$  para todos; enquanto que a  $K_m$  aumenta para pNPP e  $\beta$ -naftil-P, para a Tyr-P diminui e não é alterada para a FMN. Estes resultados sugeriam uma possível ativação pela BSA nestes experimentos. Contudo, em conversa recente com Prof. Van Etten em nosso laboratório, durante sua visita ao Brasil, ele sugeriu tratar-se de uma possível adsorção da enzima à parede de vidro do tubo ao qual foi realizado tais experimentos, resultando na diminuição dos valores dos parâmetros, quando realizados sem a presença de BSA; resultados estes podem ser resolvidos, se utilizarmos tubos de sílica, aconselhou o Prof. Van Etten, visto que em seu laboratório, aconteciam resultados semelhantes e foram resolvidos desta forma.

#### 4.2.8 Efeito do BSA na Temperatura Ótima e, na $E_a$

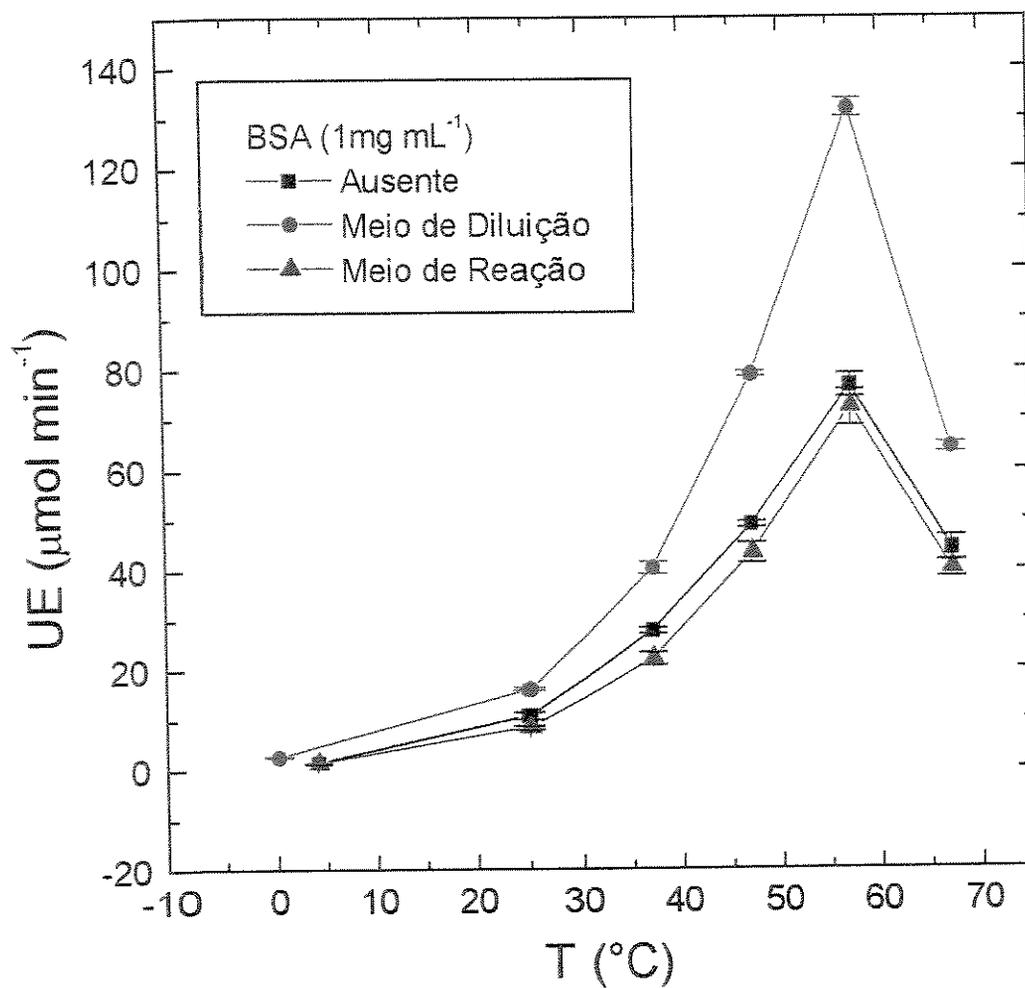
O efeito do BSA na temperatura ótima (Figura 10) e na  $E_a$  (Figura 11) para a hidrólise do pNPP foi realizado utilizando-se enzima diluída apenas em tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,0, ou no mesmo tampão acrescido de BSA  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; também foi determinada a  $E_a$  para a hidrólise do pNPP na presença de BSA  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Na Figura 11, podemos constatar que a  $E_a$  é praticamente a mesma nas duas condições. Isto nos mostra que o efeito do BSA não está relacionado com a diminuição da barreira energética. Podemos ainda constatar que, em ambas situações, a  $E_a$  da hidrólise do pNPP pela PTP de BMr do rim de carneiro é semelhante aos valores encontrados por Zhang and Van Etten (1991). Este resultado reforça a hipótese de que não há uma interação direta entre a enzima e a albumina;

possivelmente a albumina, em maior concentração, adsorve preferencialmente às superfícies, preservando a enzima livre no tubo.

#### 4.2.9 Efeito de Compostos na Estabilidade Térmica

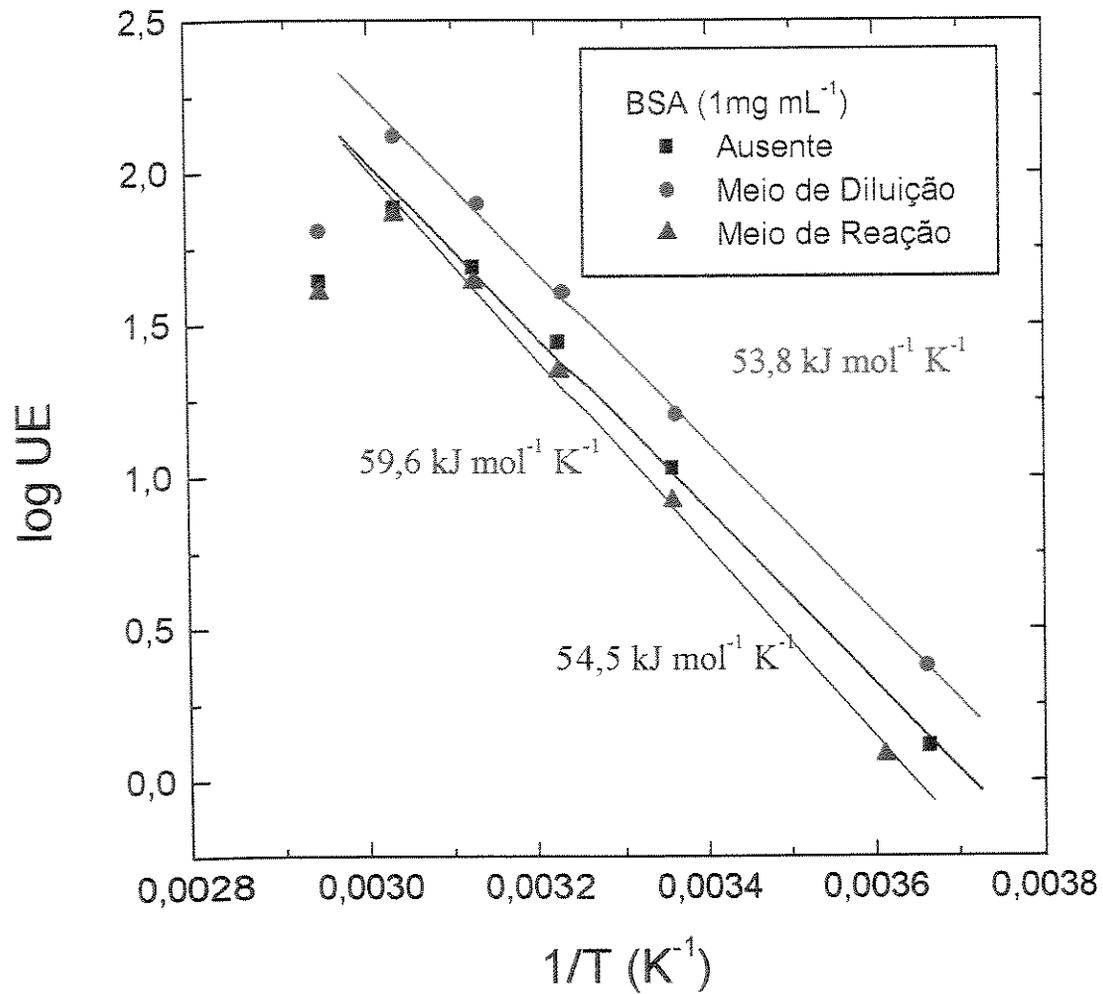
A fim de avaliar a estabilidade térmica da enzima, vários compostos foram testados no meio de diluição da enzima (Figura 12). Pudemos observar que no tempo zero, quando diluída na presença de BSA, DTT ou combinação dos compostos ocorre um aumento na atividade relativa, enquanto que na presença de glicerol houve uma queda de cerca de 50%; na presença de fosfato inorgânico não houve modificação na atividade relativa. Após 1 min de pré-incubação obtivemos uma queda brusca em todas as situações. Comparando-se com a diminuição da atividade residual do controle (tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5,0). Com o do DTT e BSA não observamos grandes diferenças; a atividade residual após 10 min de pré-incubação na presença de fosfato inorgânico e glicerol também são equivalentes (cerca de 15%). A situação que proporciona a maior atividade residual é a combinação de todos os compostos; sendo que após 15 minutos de pré-incubação a 60°C, a atividade residual é menor de que 30%.

O estudo da influência do DTT na inativação térmica a 60°C (Figura 12) reforça a existência de grupos -SH essenciais à atividade e que quando protegidos da oxidação e/ou de reação cruzada com outro -SH, conferem à enzima uma maior estabilidade. Um estudo semelhante foi realizado por Janska *et al* (1988) onde os autores analisaram a termoestabilidade da fosfatase ácida de maior (140,5 kDa) e menor (38,2 kDa) Mr. Seus resultados revelaram que após 5 min de pré-incubação das enzimas a 56°C houve uma perda drástica da atividade da enzima de maior Mr; por outro lado, a isoenzima de menor Mr demonstrou um crescimento constante na atividade até os 30 min de pré-incubação.



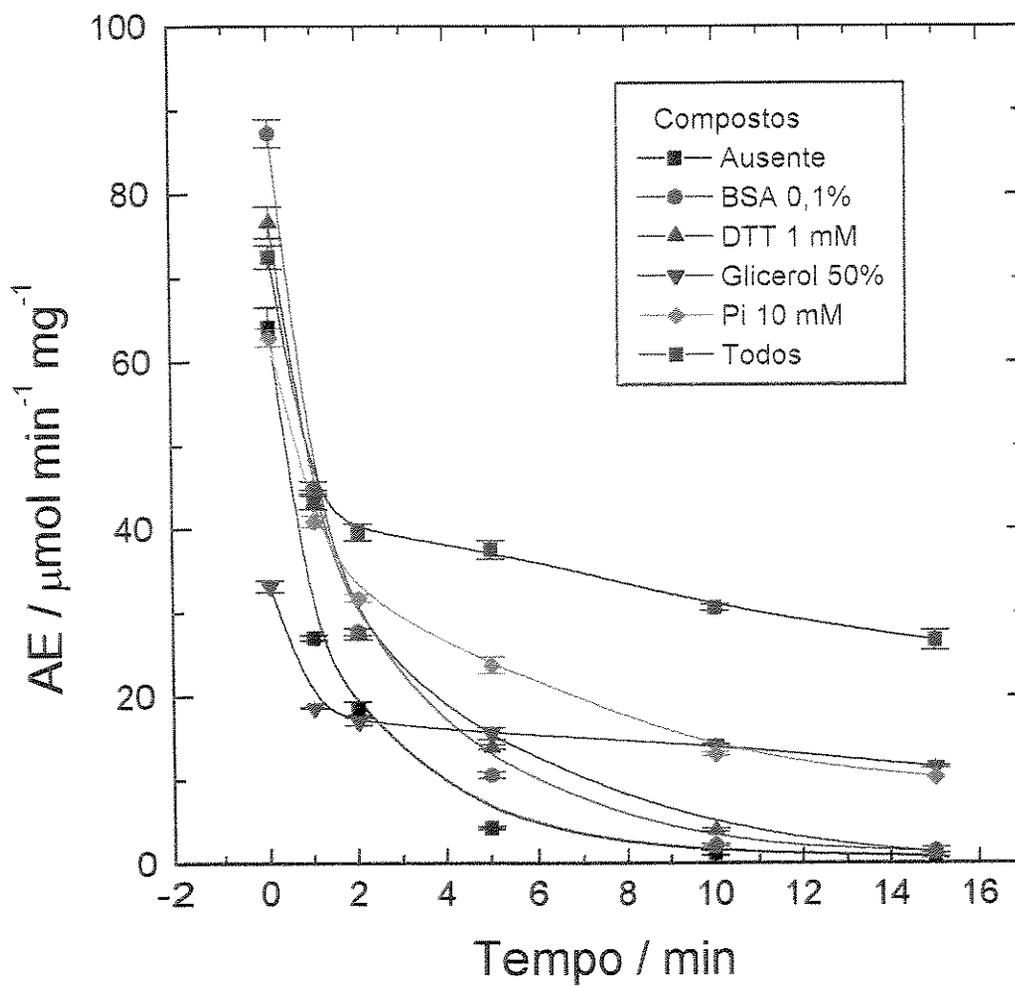
**FIGURA 10. Influência da Temperatura na Atividade da PTP.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1) utilizando o pNPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 143 ng de enzima.



**FIGURA 11. Determinação da Energia de Ativação pelo Gráfico de Arrhenius.**

O gráfico de Arrhenius foi construído utilizando os dados obtidos na Figura 10.



**FIGURA 12.** Efeito de Diferentes Compostos na Estabilidade Térmica da PTP de BMr.

A enzima (43,0  $\mu\text{g}$ ) foi pré-incubada na ausência ou na presença de diferentes compostos como indicado, a 60°C. Após diferentes intervalos de tempo, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  foi retirada e colocada no gelo para posterior medida da atividade enzimática. O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1) utilizando o pNPP como substrato, sendo a reação iniciada pela adição de 1.075  $\mu\text{g}$  de enzima.

#### 4.2.10 Efeito de Compostos na Atividade

Com a PTP de BMr purificada, foram também estudados os efeitos de alguns compostos na atividade da mesma, a guanosina promoveu uma ativação de 100% na atividade enzimática, similar ao descrito por Tanizaki *et al* (1977) para derivados purínicos. Enquanto o Triton X-100 promoveu uma ligeira ativação, o SDS provocou uma inibição total; os outros compostos testados não promoveram efeito significativo (Figura 13). A ativação apresentada pela enzima em presença do Triton X-100 é comumente relatada para a PTP de BMr (Saeed *et al*, 1990). Da mesma maneira, também é comum a inibição pelo SDS que promove o desenovelamento da proteína com a conseqüente perda da sua atividade catalítica (Biswas and Cundiff, 1991).

Este estudo é de suma importância pois permite a detecção de possíveis efeitos, tanto positivos quanto negativos, da atividade enzimática. Estas informações são fundamentais para a otimização do processo de purificação bem como para a execução dos estudos cinéticos e para o efeito de comparação com outras PTP, especialmente as de BMr de mamíferos as quais possuem padrões de comportamento muito precisos frente aos compostos testados.

#### 4.2.11 Efeito de Metais na Atividade

Na Figura 14 analisamos o efeito de íons metálicos na atividade da PTP de BMr sem e com pré-incubação. Em ambas as situações a enzima foi completamente inibida por  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ , mas insensível ao  $\text{Mn}^{2+}$ .

Na presença do  $\text{Mg}^{2+}$  uma pequena ativação (aproximadamente 20%) foi verificada. Para o  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  a inibição da atividade enzimática foi mais pronunciada após a pré-incubação. Tanto o  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  podem interagir com grupos sulfidrílicos presentes no sítio ativo das PTPs, causando inibição.

Por outro lado, a inibição pelo  $\text{Zn}^{2+}$  foi muito mais intensa sem pré-incubação do que com pré-incubação (95% e 30%, respectivamente). Da mesma forma, Sotiroudis and Geladopoulos (1990) mostraram que  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  promoveu uma inibição maior que 95% na PTP do músculo esquelético de coelho. A suave inibição na pré-incubação é um resultado inesperado. Uma possível explicação seria

algum tipo de complexação do  $Zn^{2+}$  e o pNPP, na ausência da pré-incubação, indisponibilizando o substrato para a catálise.

No trabalho de Fujimoto *et al* (1984), a enzima foi pré-incubada da mesma maneira que por nós descrita, por 20 min com o íon antes de ser submetida ao ensaio da atividade, ocorrendo uma inibição de 50% em presença de sulfato de ferro ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

A independência de íons metálicos para a atividade desta PTP de BMr pode ser confirmada pelo mínimo efeito causado pela alta concentração de EDTA utilizado no ensaio (Figura 13).

De maneira geral estes resultados são similares aos relatados para outras PTP de BMr (Chaimovich & Nome, 1970; Galka *et al*, 1980; Chernoff & Li, 1985; Saeed *et al*, 1990). Entretanto, algumas diferenças foram observadas como a maior sensibilidade ao  $Mn^{2+}$  apresentada pela PTP de BMr de cauda de *Xenopus laevis* (Filbur, 1973). Outras diferenças também são notadas quando analisamos o comportamento de fosfatases ácidas purificadas de plantas, como o menor poder de inibição exibido pelo  $Cu^{2+}$  (De-Kundo & Banerjee, 1990; Pasqualini *et al*, 1992).

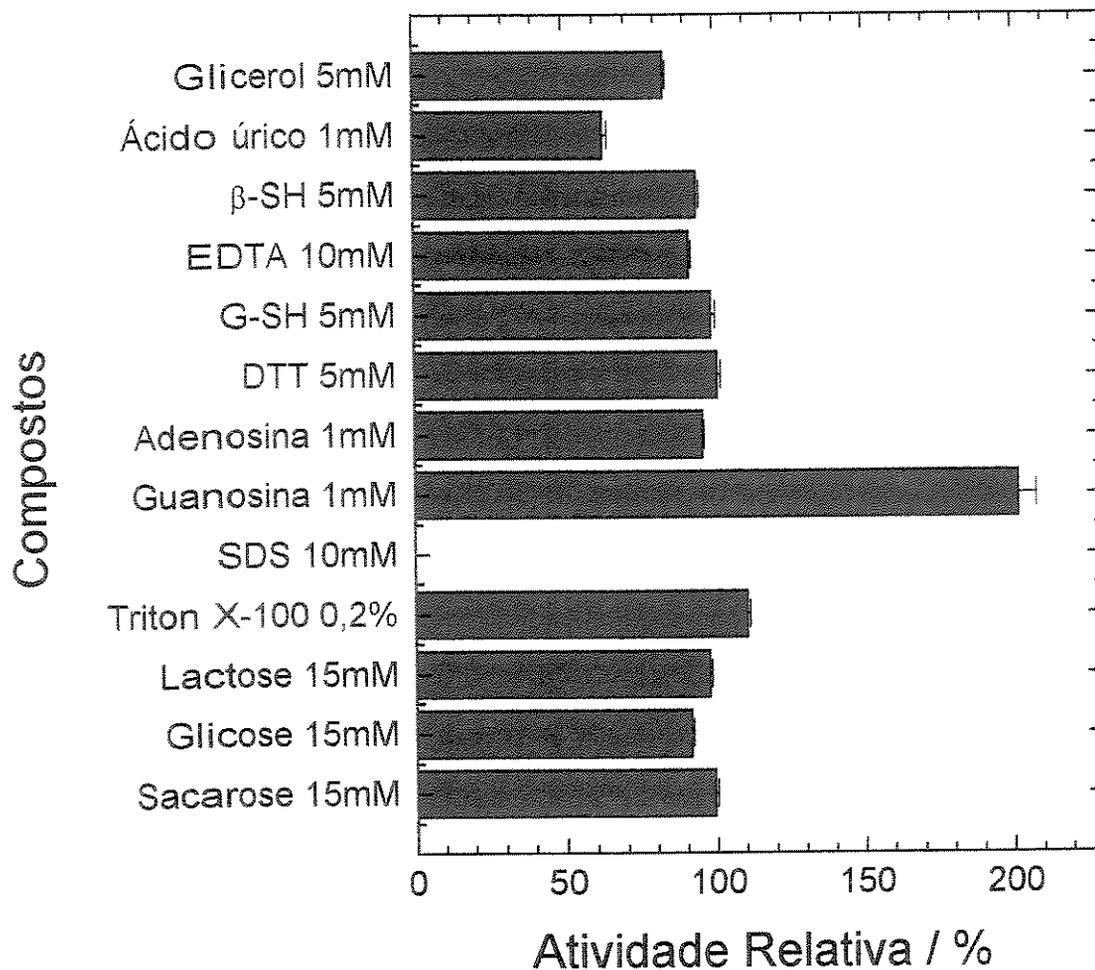
O efeito de íons metálicos deve ser analisado como um aspecto característico e específico da enzima em estudo. A análise da literatura, não sustenta a hipótese de que grupos de isoenzimas possuam comportamentos idênticos frente a determinado íon. Um exemplo claro é o do  $Zn^{2+}$  que, na concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , ativa em 20% a fosfatase ácida de AMr do coleóptilo de cevada (Pasqualini *et al*, 1992) e inibe em 80% a atividade da enzima de AMr da semente de *Vigna sinensis* em germinação (Biswas & Cundiff, 1991).

#### 4.2.12 Efeito de Potenciais Inibidores

Diversos inibidores em potencial da PTP de BMr foram testados (Figura 15). A análise dos resultados revelou que uma concentração de  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de Piridoxal-5-P promoveu uma inibição de 40% da atividade. Por outro lado, nesta mesma faixa de concentração o molibdato de amônio e o vanadato promoveram uma inibição de aproximadamente 80 e 90% na atividade, respectivamente. A maior inibição foi obtida em presença de pCMB, onde  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  do composto promoveu

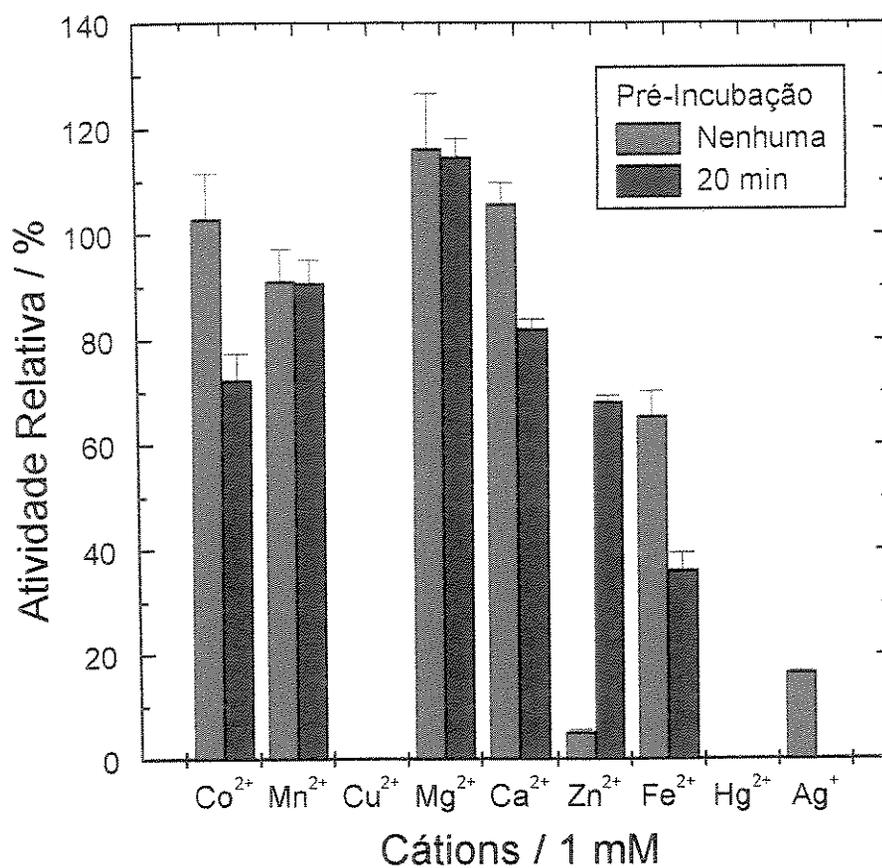
inibição total, enquanto que Tartarato e Fluoreto em altas concentrações (10 mmol L<sup>-1</sup>) não afetaram a enzima. Dos compostos mencionados na Figura 15, foram selecionados e estudados com mais detalhes o fosfato inorgânico, piridoxal-5-fosfato, molibdato de amônio e o vanadato.

Estudando o efeito de inibidores em potencial na atividade desta enzima (Figura 15) pudemos, de maneira indubitável, classificá-la como uma PTP de BMr. O comportamento frente a inibidores clássicos como tartarato, fluoreto, pCMB e fosfato corresponde ao citado nos diversos relatos acerca desta proteína o que permite diferenciá-las das fosfatases de alto, intermediário e BMr (Filburn, 1973; De Araújo; Mies & Miranda, 1976; Taga & Van Etten, 1982; Fujimoto *et al*, 1984; Waheed *et al*, 1988; Sotiroudis & Geladopoulos, 1990; Panara *et al*, 1992; Granjeiro, 1994; Ramponi & Stefani, 1997).



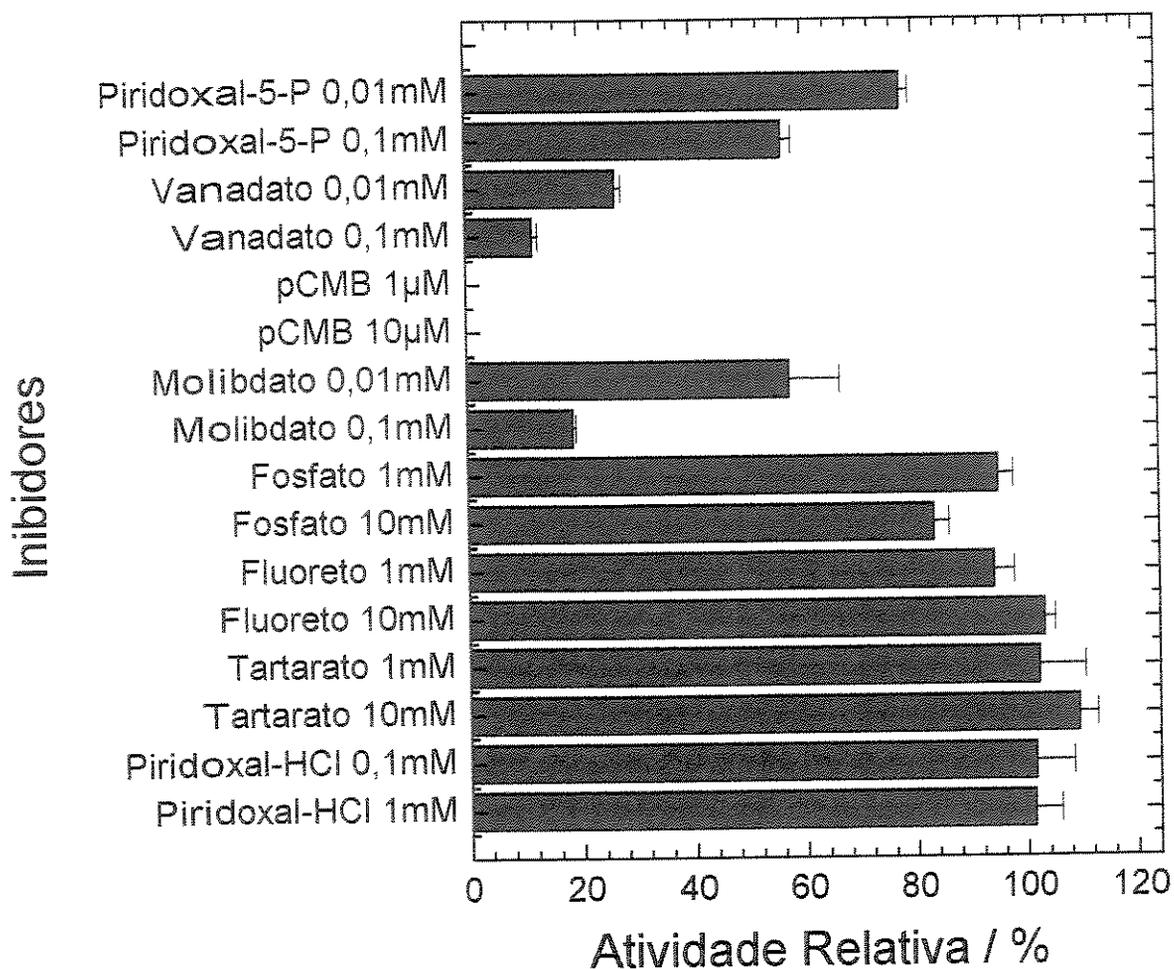
### FIGURA 13. Efeito de Compostos Variados na Atividade da PTP.

Diversos compostos foram adicionados ao meio de reação e a atividade residual foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto. A reação foi iniciada pela adição da enzima (107,5 ng) e o produto foi quantificado como descrito em Métodos (3.2.2.1).



**FIGURA 14. Efeito de Íons Metálicos na Atividade da PTP.**

O efeito dos íons metálicos (1 mmol L<sup>-1</sup>) foi estudado sem pré-incubação (Material e Métodos, 3.2.2.1), ou após 20 min de pré-incubação (Material e Métodos, 3.2.2.2). A atividade relativa foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do íon. A reação foi iniciada pela adição de 107,5  $\eta$ g enzima.



**FIGURA 15. Efeito de Inibidores na Atividade da PTP de BMr.**

Os inibidores em potencial foram adicionados ao meio de reação e a atividade residual foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto. A reação foi iniciada pela adição de 53,75  $\mu$ g de enzima e o produto foi quantificado como descrito em Material e Métodos (3.2.2.1).

#### 4.2.13 Estudos dos Mecanismos de Inibição

Dentre os inibidores testados, o Pi, o piridoxal-5-P, o molibdato de amônio e o vanadato foram os que apresentaram os efeitos mais significativos. Com relação ao Pi, o gráfico dos duplos recíprocos mostrou tratar-se de uma inibição competitiva (Figura 16). A regressão linear dos pontos obtidos no gráfico da inclinação destas retas contra as concentrações do inibidor proporcionaram, na interseção com o eixo da concentração do inibidor, o valor da constante de inibição,  $K_i$ , de aproximadamente  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 16, Interno), resultado este similar ao relatado em outros trabalhos: Chaimovich and Nome ( $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ); Taga and Van Etten ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); Zhang and Van Etten ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Este valor por nós encontrado, corresponde a cerca de 7 vezes a  $K_m$ .

O fosfato assume ainda um importante papel durante o processo de purificação da PTP de BMr, atuando como um ligante específico que interage com a enzima ligada à resina da SP-Sephadex e permitindo a eluição da enzima (Lawrence and Van Etten, 1981).

O tipo de inibição da PTP de BMr por piridoxal-5-P foi classificado, através do gráfico de Lineweaver-Burk, como competitiva (Figura 17). A constante de inibição obtida por meio do gráfico da inclinação das retas contra concentrações de piridoxal-5-P corresponde a  $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 17, Interno).

A inibição por piridoxal-5-P não tem sido muito descrita, possivelmente pela atenção estar mais especificamente voltada para a possibilidade de atuar como um substrato fisiológico, similarmente ao que ocorre com a fosfatase ácida de IMr (Fujimoto *et al*, 1984) onde foi utilizada como substrato para a localização histoquímica específica da fosfatase ácida do complexo de Golgi no tecido ósseo (Coleman, Schofield & McDonald, 1980). A inibição causada em concentrações micromolares, semelhante ao relatado por Saeed em 1990, pode significar algum tipo de regulação fisiológica dada à importância deste metabólito, além do fato de permitir o estudo quanto à participação da lisina no sítio ativo.

O grupo de Ramponi demonstrou que o piridoxal-5-P interage com a enzima tanto pelo grupo fosfato como pelo aldeído e que a Cys-17, essencial para a

atividade da PTP de BMr do fígado bovino, interage com o fosfato do piridoxal-5-P. Sugere que as PTPs de BMr, com baixa afinidade pelo inibidor piridoxal-5-P, sejam chamadas de Tipo 1, enquanto aquelas com alta afinidade pelo inibidor sejam designadas como Tipo 2 (Cirri, 1993).

Mais recentemente, Zhou & Van Etten (1999) demonstraram que o piridoxal-5-P interagia também com o resíduo de ácido aspártico, diminuindo sensivelmente sua capacidade de realizar o ataque nucleofílico sobre o complexo E-P; impedindo a continuidade da catálise.

Utilizando o pNPP como substrato, para estudarmos o tipo de inibição do molibdato de amônio, determinamos através da análise do gráfico dos duplos recíprocos (Figura 18) que a inibição da atividade enzimática era do tipo misto; o gráfico da inclinação das retas contra concentrações de molibdato de amônio (Figura 18, Interno), não se apresentou linear, indicando não se tratar de um mecanismo simples. Utilizando o método de Cornish-Bowden (1995), determinamos o valor das constantes de inibição competitiva ( $K_{ic}=0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e incompetitiva ( $K_{ia}=0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ), Figura 19 A e B, respectivamente.

A inibição causada pelo molibdato de amônio está associada à formação de complexos comumente relacionados com grupamentos -SH de cisteínas. No caso das PTP de BMr é da existência de 2 cisteínas reduzidas (Cys-12 e Cys-17) na alça do fosfato no sítio ativo; destes grupos, a Cys-12 é essencial para a catálise (Su *et al.*, 1994; Logan *et al.*, 1994; Zhang, M. *et al.*, 1994)

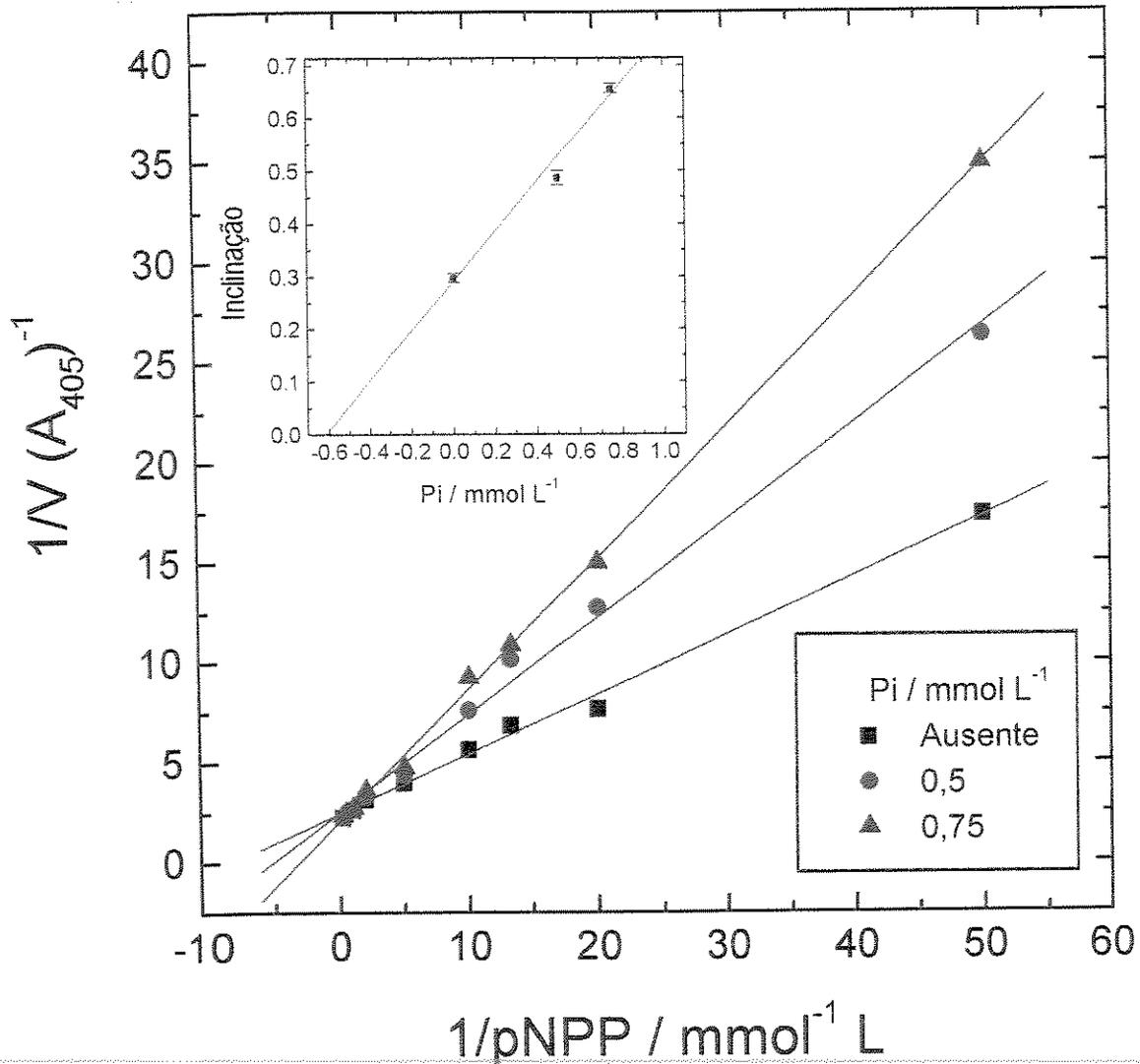
O aspecto de maior especulação neste conjunto de experimentos é a inibição pelo íon vanadato, reconhecidamente relacionado com a inibição de PTP envolvidas nos processos de proliferação, crescimento e diferenciação celular.

Os valores de  $I_{50}$  para a inibição por vanadato foram  $0,022 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $2,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente para as hidrólises da FMN, pNPP e Tyr-P (Figura 20).

O efeito do vanadato foi classificado como competitivo como demonstrado pelo método de Dixon (1979) com relação a pNPP (Figura 21), FMN (Figura 22) e Tyr-P (Figura 23), com valores de  $K_i$  de  $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0,34 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $0,48 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Constatamos resultados surpreendentes, quando

comparamos o efeito do vanadato na hidrólise da FMN, sendo de 1400 vezes menor que em relação ao da Tyr-P, considerado um substrato muito mais sensível.

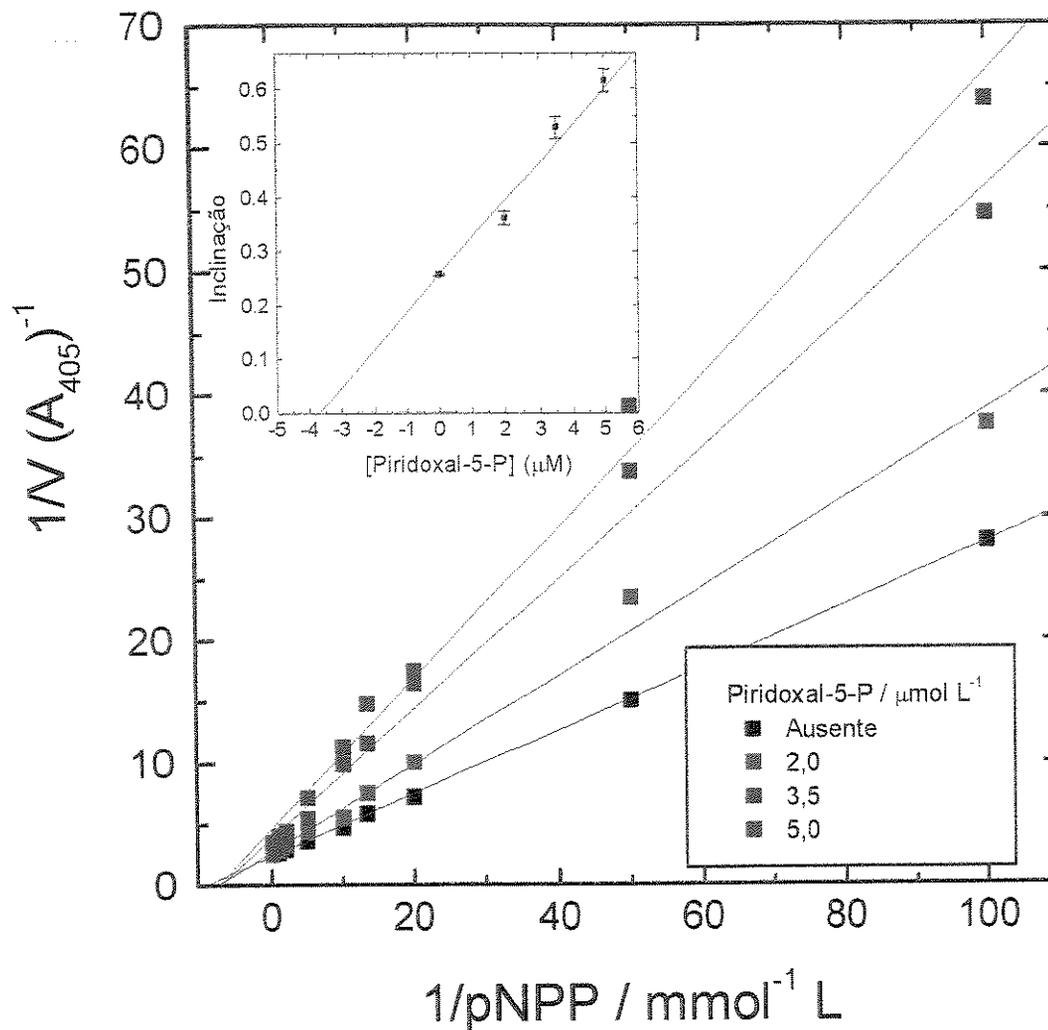
O efeito inibitório do vanadato deve-se fundamentalmente por ser um análogo estrutural do Pi no estado de transição (Zhang & Van Etten, 1990) o qual é o produto da reação catalisada pela PTP e tem a capacidade de inibir competitivamente a atividade enzimática. O valor encontrado para a hidrólise do pNPP para vanadato foi  $K_i$   $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ , semelhante ao referido por Waheed *et al*, (1988) ( $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).



**FIGURA 16. Gráfico dos Duplos Recíprocos da Inibição da PTP de BMr por  $P_i$ .**

A reação foi realizada na ausência e na presença de concentrações crescentes de fosfato. A atividade foi determinada como no Material e Métodos utilizando 0,11  $\mu\text{g}$  de enzima/tubo e pNPP como substrato.

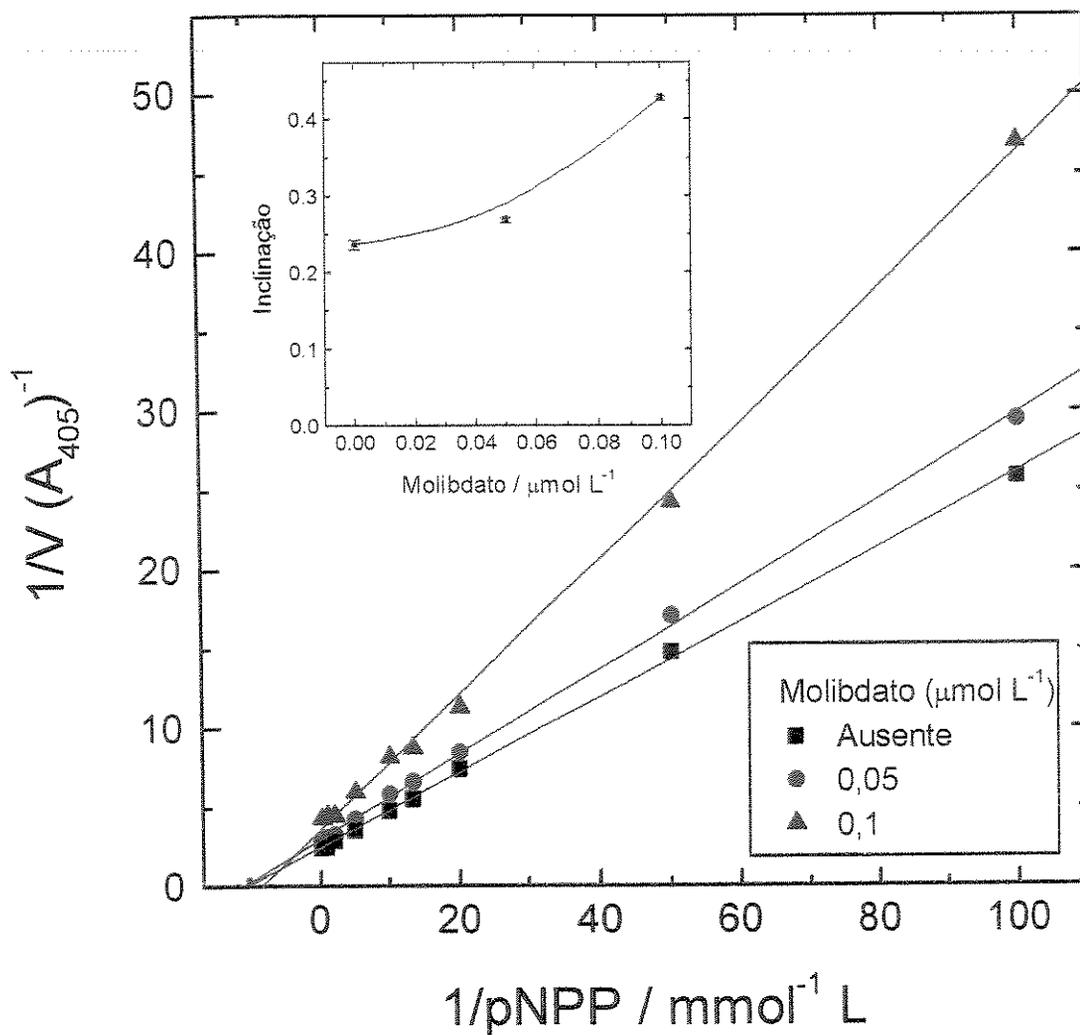
**Interno:** Gráfico de Dixon. Gráfico da inclinação das retas contra a concentração de fosfato.



**FIGURA 17. Gráfico dos Duplos Recíprocos da Inibição da PTP de BMr por Piridoxal-5-P.**

A reação foi realizada na ausência e na presença de concentrações crescentes de Piridoxal-5-P. A atividade foi determinada como no Material e Métodos utilizando 0,11  $\mu\text{g}$  de enzima/tubo e pNPP como substrato.

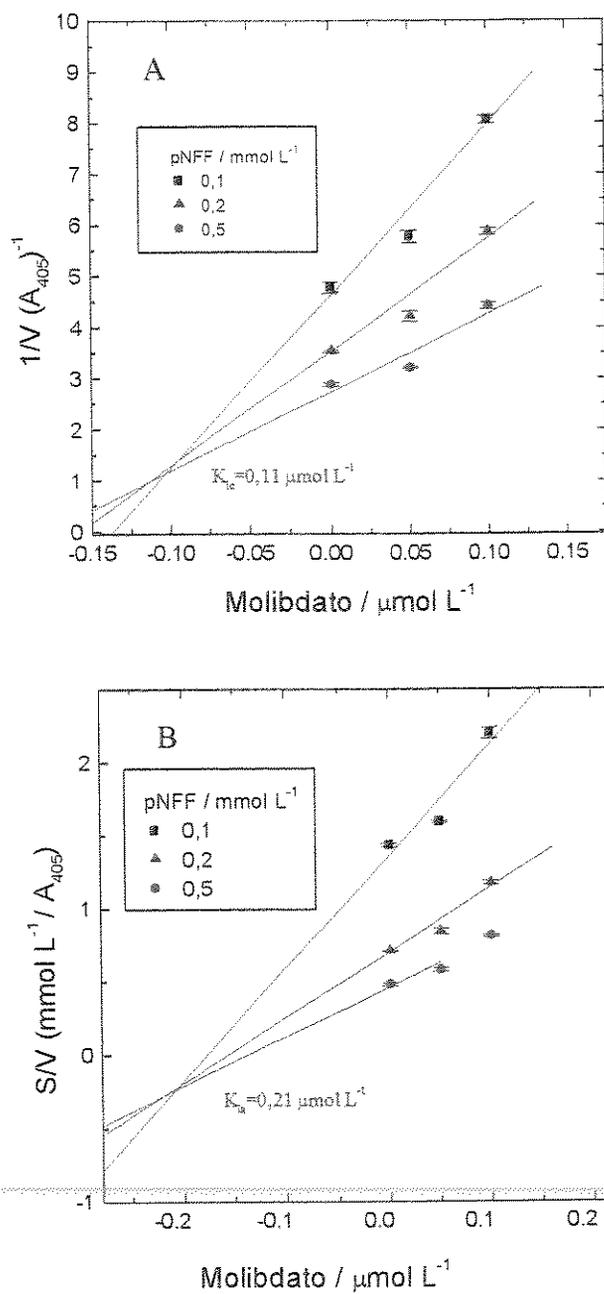
**Interno:** Gráfico de Dixon. Gráfico da inclinação das retas contra a concentração de Piridoxal-5-P.



**FIGURA 18. Gráfico dos Duplos Recíprocos da Inibição da PTP de BMr por Molibdato de Amônio.**

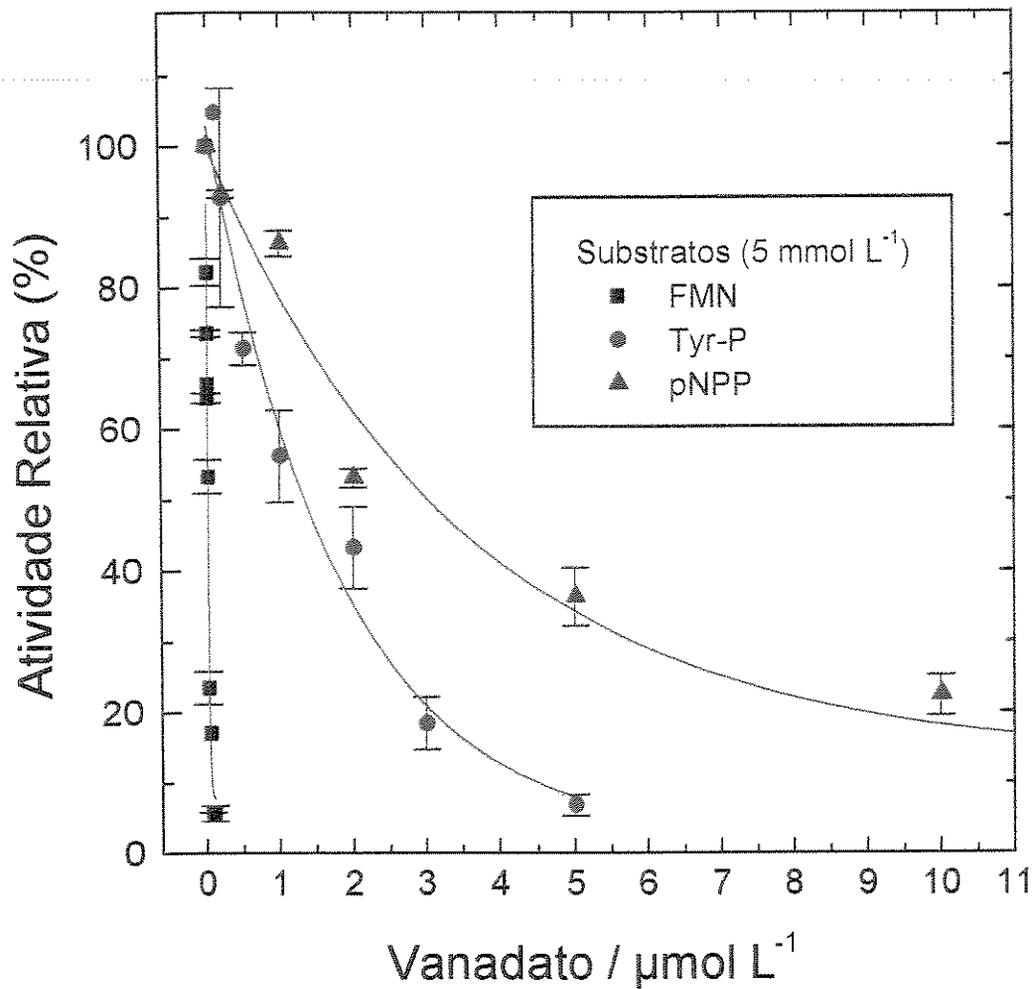
A reação foi realizada na ausência e na presença de concentrações crescentes de molibdato de amônio. A atividade foi determinada como no Material e Métodos utilizando 0,11  $\mu\text{g}$  de enzima/tubo e pNPP como substrato.

**Interno:** Gráfico de Dixon. Gráfico da inclinação das retas contra a concentração de molibdato de amônio.



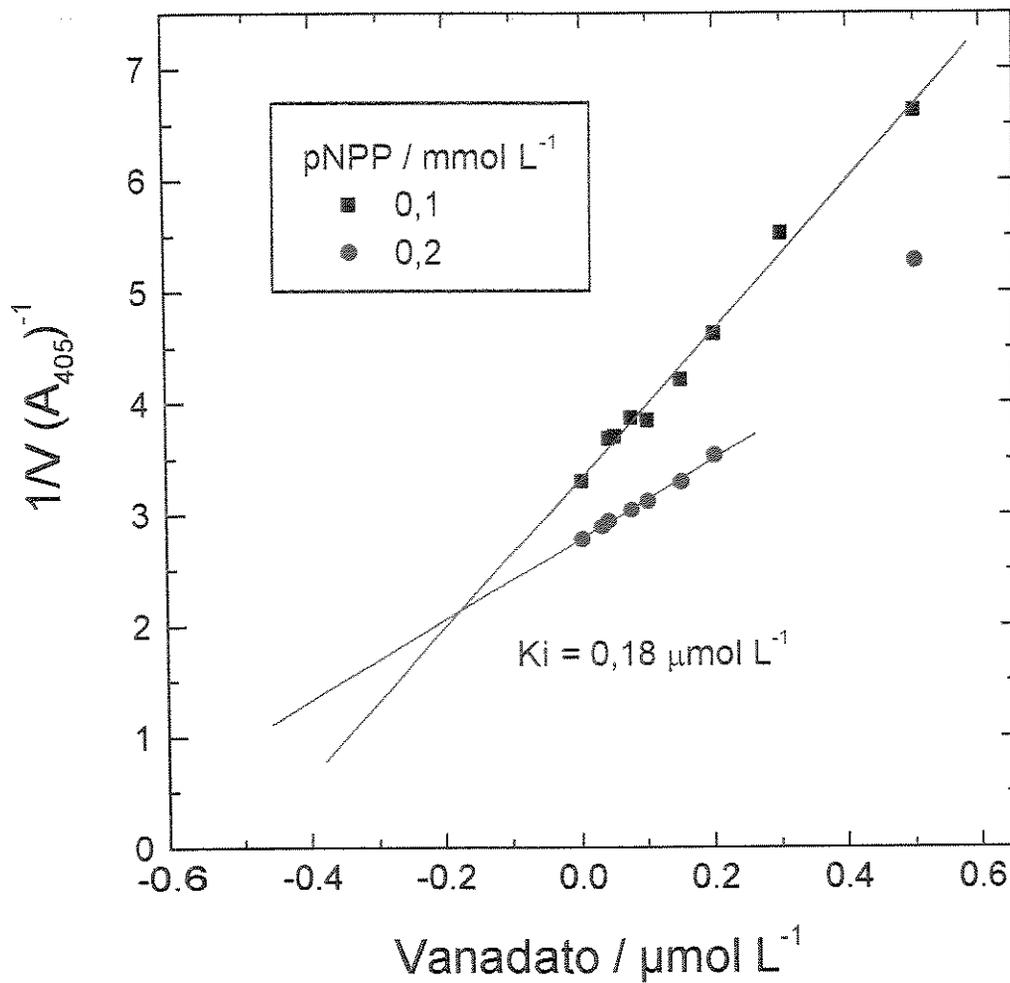
**FIGURA 19.** Gráfico de Cornish-Bowden para a Inibição da PTP de BMr por Molibdato de Amônio.

Gráfico de  $1/V$  (A) e  $S/V$  (B) na presença de diferentes concentrações de pNPP contra a concentração de molibdato de amônio.



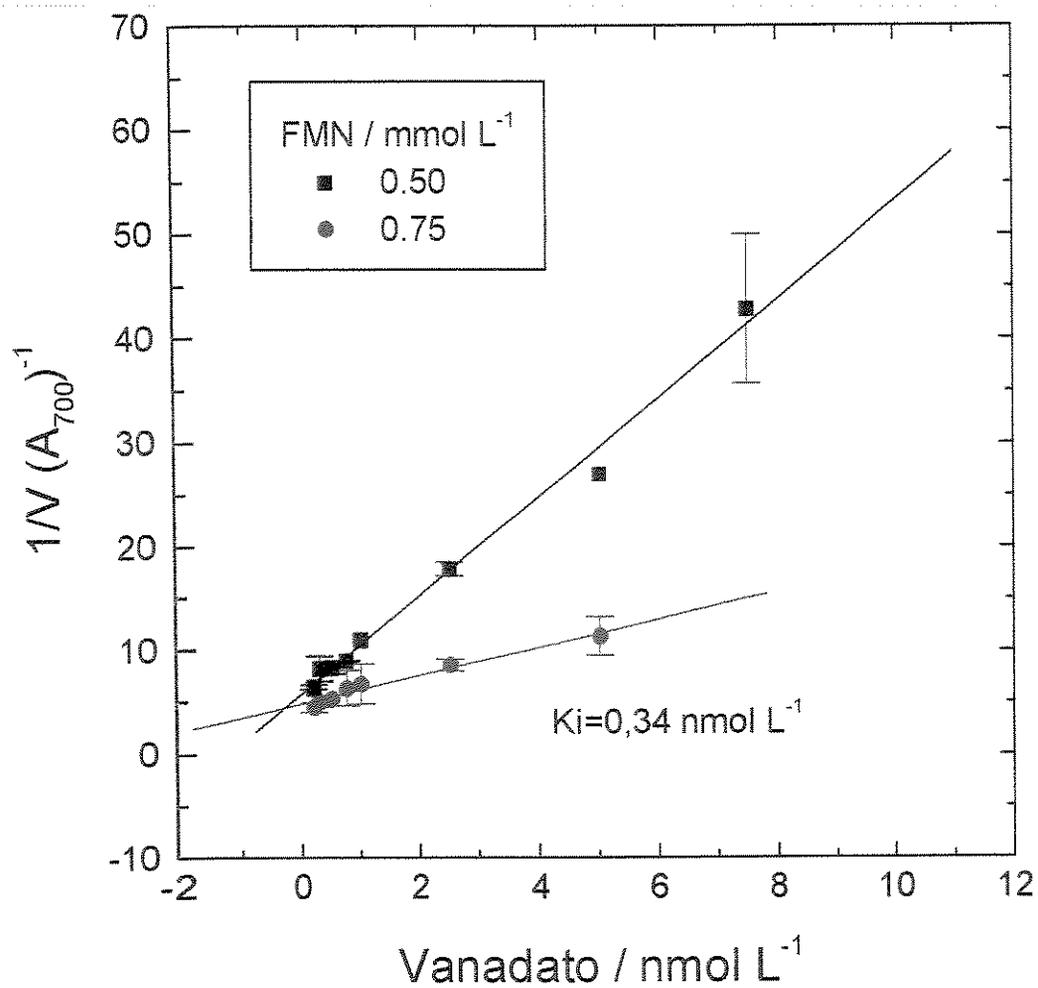
**Figura 20. Determinação da  $I_{50}$  para vanadato utilizando diferentes substratos.**

A hidrólise de diferentes substratos foi medida na ausência ou na presença de diferentes concentrações de vanadato, como descrito em 3.2.2.2.



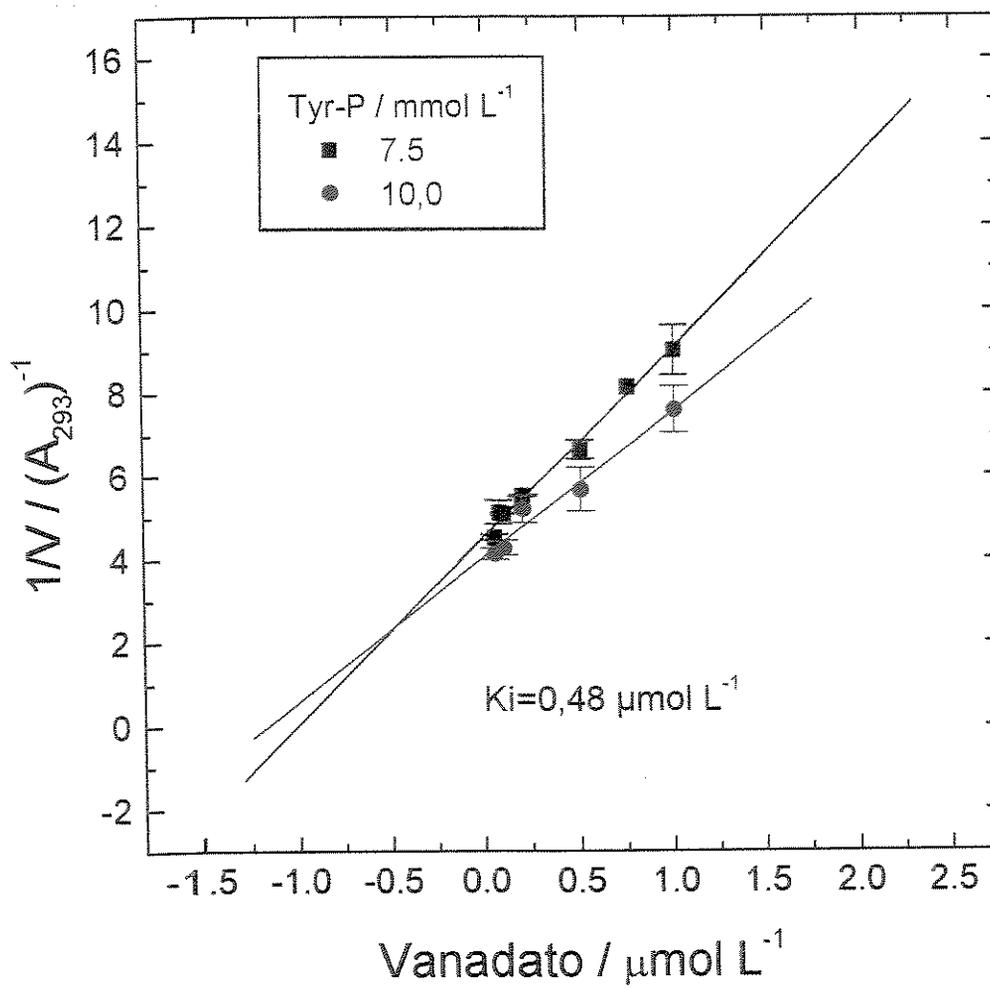
**FIGURA 21.** Gráfico de Dixon para a Inibição da PTP de BMr por Vanadato, com pNPP como substrato.

Gráfico do inverso da velocidade utilizando duas concentrações de pNPP, como indicado, contra diferentes concentrações de vanadato.



**FIGURA 22.** Gráfico de Dixon para a Inibição da PTP de BMr por Vanadato, com FMN como substrato.

Gráfico do inverso da velocidade utilizando duas concentrações de FMN, como indicado, contra diferentes concentrações de vanadato.



**FIGURA 23.** Gráfico de Dixon para a Inibição da PTP de BMr por Vanadato, com Tyr-P como substrato

Gráfico do inverso da velocidade utilizando duas concentrações de Tyr-P, como indicado, contra diferentes concentrações de vanadato.

## 5 CONCLUSÕES

A PTP de BMr do rim de carneiro foi purificada 1.291 vezes até a homogeneidade, com uma A.E. de  $99,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  e um rendimento de 4%, através de um procedimento envolvendo fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca-iônica em SP-Sephadex com eluição por íon-afinidade e cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200).

Verificando os experimentos realizados com BSA em nosso laboratório, observamos que ocorria um aumento na  $V_{\text{max}}$ , sugerindo uma possível ativação pelo BSA. Determinamos então, os parâmetros cinéticos na ausência e na presença de BSA ( $1 \text{mg mL}^{-1}$ ) no meio de reação ou no meio de diluição da enzima, para os substratos pNPP,  $\beta$ -naftil, Tyr-P e FMN. Os valores de  $K_m$  para os substratos pNPP e  $\beta$ -naftil aumentaram enquanto que para a Tyr-P o valor de  $K_m$  diminuiu e para FMN não foi alterado. Nas mesmas condições observamos, para a hidrólise do pNPP, que não havia alteração da  $E_a$ , sugerindo que não houve uma interação direta entre a enzima e a albumina. Em conversa com Prof. Van Etten em nosso laboratório, ele sugeriu tratar-se de uma possível adsorção da enzima à parede dos tubos de vidro utilizados nos experimentos. Possivelmente a albumina em maior concentração adsorve preferencialmente às superfícies, preservando a enzima livre no tubo.

O estudo de inibidores demonstrou insensibilidade ao tartarato e fluoreto, e inibição por vanadato ( $K_i$ ,  $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), piridoxal-5-P ( $K_i$ ,  $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), Pi ( $K_i$ ,  $0,6 \text{mmol L}^{-1}$ ) e pCMB. Para a hidrólise da FMN, pNPP e Tyr-P, os valores de  $I_{50}$  foram  $0,022 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $2,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o vanadato, respectivamente.

O efeito do vanadato foi classificado como competitivo com valores de  $K_i$ ,  $0,34 \text{nmol L}^{-1}$  (FMN);  $K_i$ ,  $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$  (pNPP) e  $K_i$ ,  $0,48 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Tyr-P), constatando um resultado surpreendente, quando comparamos o efeito do vanadato na hidrólise da FMN, sendo de 1400 vezes menor que em relação ao da Tyr-P, considerado um substrato muito mais sensível.

## 6 PERSPECTIVAS

Em organismos superiores, as funções fisiológicas das proteínas tirosinas fosfatases de BMr são conhecidas superficialmente (como é o caso de diversas PTPs). Estas enzimas participam de uma rede de reações controlando a proliferação e diferenciação celular, porém em muitos casos, seus substratos fisiológicos verdadeiros ainda não tem sido encontrados. Todavia, uma riqueza de dados na implicação biológica das PTPs, em geral, e das PTPs de BMr, em particular, está emergindo.

A caracterização cinética da PTP de BMr de rim de carneiro associada à investigação de seus substratos e inibidores fisiológicos será de relevância crucial na determinação de seu papel no processo da vida celular.

Outro aspecto importante a ser estudado é a determinação do perfil desta isoforma nos diversos tecidos e organismos. A utilização de inibidores específicos poderá auxiliar na identificação da PTP de BMr durante diversos processos fisiológicos relevantes e, até mesmo, durante o processo de reparo dos tecidos, onde a proliferação celular é exigida.

Também seria interessante verificar se, devido ao baixo valor de  $K_i$ , o vanadato pudesse promover uma proteção maior da enzima, por exemplo, da inativação térmica, com FMN como substrato, quando comparado com pNPP e Tyr-P como substratos.

---

## 7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Baldijão, C. E. M.; Guija, E.; Bittencourt, M. S. and Chaimovich, H. (1975) **Steady state kinetics and kinetics and effect of SH inhibitors on acid phosphatase from bovine brain.** *Biochim. Biophys. Acta*, 391: 316-325.
2. Baxter, J.H. and Suelter, C.H. (1985) **Resolution of the low-molecular-weight acid phosphatase in avian pectoral muscle into distinct enzyme forms.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 239: 29-37.
3. Biswas, T.K and Cundiff, C. (1991) **Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*.** *Phytochemistry*, 30: 2119-2125.
4. Bittencourt, H. M. S. and Chaimovich, H. (1976) **Importance of SH groups in catalysis by bovine brain acid phosphatase.** *Biochim. Biophys. Acta*, 438: 153-158.
5. Buzalaf, M.A.R., Taga, E.M., Granjeiro, J.M., Ferreira, C.V., Lourenção, V.A., Ortega, M.M., Poletto, D.W. and Aoyama, H. (1998) **Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase.** *Exp. Lung Res.*, 24: 269-272.
6. Byon, J.C.H.; Kenner, K.A.; Kusari, A.B.; Kusari, J. (1997) **Regulation of Growth Factor-Induced Signaling by Protein-Tyrosine-Phosphatases.** *Proced. Soc. Exper. Med. Biol.*, 216: 1-20.
7. Camici, G.; Manao, G.; Cappugi, G.; Modesti, A.; Stefani, M. and Ramponi, G. (1989) **The complete amino acid sequence of the low molecular weight cytosolic acid phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, 264: 2560-2567.
8. Caselli, A; Pazzagli, L.; Paoli, P.; Manao G.; Camici, G.; Cappugi G. and Ramponi G (1994a) **Porcine liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatase: the amino acid sequence.** *J. Prot. Chem.*, 13: 107-115.
9. Caselli, A; Camici, G.; Manao G.; Moneti, G.; Pazzagli, L.; Cappugi G. and Ramponi G (1994b) **Nitride oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, 269: 24878-24882.
10. Chaimovich, H. and Nome, F. (1970) **Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 139: 9-16.
11. Chernoff, J. and Li, H. C. (1985) **A major phosphotyrosylprotein phosphatase from bovine heart is associated with a low-molecular-weight acid phosphatase.** *Arch. Biochem. Biophys.* 240: 135-145
12. Chiarugi, P. Mazocchini, R.; Raugei, G.; Pazzagli, C.; Berti, A.; Camice, G.; Manao, G.; Cappugi, G. and Ramponi, G. (1992) **Differential role of four cysteines on the activity of low Mr phosphotyrosine protein phosphatase.** *FEBS Lett.*, 310: 9-12.

13. Chiarugi, P.; Cirri, G.; Camici, G.; Manao, G.; Fiaschi, T.; Raugei, G.; Cappugi, G. and Ramponi, G. (1994) The role of His65 and His72 in the reaction mechanism of bovine liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatase. *Biochem. J.*, 298: 427-433.
14. Cirri, P.; Chiarugi, P.; Camici, G.; Manao, G.; Raugei, G.; Capuggi, G.; and Ramponi, G. (1993a) The role of Cys 12, Cys 17 and Arg 18 in the catalytic mechanism of low-Mr cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.*, 214: 647-657.
15. Cirri, P.; Chiarugi, P.; Camici, G.; Manao, G.; Pazzagli, L.; Caselli, A.; Barghini, I.; Capuggi, G.; Raugei, G. and Ramponi, G. (1993b) The role of Cys 17 in the pyridoxal 5'-phosphate inhibition of the bovine liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1161: 216-222.
16. Cirri, P.; Caselli, A.; Manao, G.; Camici, G.; Polidori, R.; Cappugi, G. and Ramponi, G. (1995) Kinetic studies on rat liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. The activation mechanism of the isoenzyme AcP2 by cGMP. *Biochim. Biophys. Acta*, 1243: 129-135.
17. Cirri, P.; Fiaschi, T.; Chiarugi, P.; Camici, G.; Manao, G.; Raugei, G. Ramponi, G. (1996) The molecular basis of the differing kinetic behaviour of the two low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase isoforms. *J. Biol. Chem.*, 271: 2604-2607.
18. Cohen, P. (1988) Protein phosphorylation and hormones action. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 234: 115-144.
19. Coleman, R.A.; Schofield, B.H.; & McDonald, D.F. (1980) Selective localization of a Golgi apparatus acid phosphatase isoenzyme in bone using pyridoxal-5'-phosphate. *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 115-123.
20. Cornish-Bowden, A. (1995) **Fundamentals of Enzyme kinetics**. Portland Press, London, pp. 93-105.
21. Davis, J. P.; Zhou, M. -M. and Van Etten, R. L. (1994) Kinetic and site-directed mutagenesis studies of the cysteine residues of bovine low molecular weight phosphotyrosil protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 269: 8734-8740.
22. De Araújo, P.S.; Mies, V. & Miranda, O. (1976) Subcellular distribution of low-molecular-weight acid phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 452: 121-130.
23. De-Kundu, P. & Banerjee, A.C. (1990) Multiple forms of acid phosphatase from seedlings axes of *Vigna radiata*. *Phytochemistry*, 29: 2825-2828.
24. Dissing, J.; Dahl, O. and Svensmark, O. (1979) Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 569: 159-176.
25. Dissing, J. & Svensmark, O. (1990) Human red cell acid phosphatase: purification and properties of the A, B e C isoenzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1041: 232-242.

26. Dissing, J.; Johnsen, A.H. and Sensabaugh, G.F. (1991) **Human red cell acid phosphatase (ACP1). The amino acid sequence of the two isozymes Bf and Bs encoded by the ACP1\*B allele.** *J. Biol. Chem.*, 266: 20619-20625.
27. Dissing, J. and Johnsen, A. H. (1992) **Human red cell acid phosphatase (ACP1). the primary structure of the two pairs of isozymes encoded by the ACP1\*A and ACP1\*C alleles.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1121: 261-268.
28. Dixon, M. and Webb, E.C. (1979) **Enzyme inhibition and activation, Cap VIII. In Enzymes, 3<sup>rd</sup> Edn, Longmans, London, pp. 332-399.**
29. Evans, B.; Tishmack, A.; Pokalsky, C.; Zhang, M. and Van Etten, R. L. (1996) **Site-directed mutagenesis, kinetic, and spectroscopic studies of the P-loop residues in a low molecular weight protein tyrosine phosphatase.** *Biochemistry*, 35: 13609-13617.
30. Fasman, G.D. (Ed.) (1976) **CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology 3<sup>rd</sup> ed., Vol.1, p.187.**
31. Fauman, E. B. and Saper, M. A. (1996) **Structure and function of the protein tyrosine phosphatases.** *Trends Biochem. Sci.*, 21:413-417.
32. Filburn, C.R. (1973) **Acid phosphatase of *Xenopus laevis* tadpole tails. I. Separation and partial characterization.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 159: 683-693.
33. Fuchs, K. R.; Shekels, L. L. and Bernlohr, D. A. (1992) **Analysis of the ACP1 gene product: classification as an FMN phosphatase.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189: 1598-1605.
34. Fujimoto, S. et al.(1984) **Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex.** *J. Biochem.*, 96: 1079-1088.
35. Fujimoto, S.; Murakani, K.; Ishikawa, A. Himi, K. and Ohara, A. (1988) **Two distinct low-molecular-weight acid phosphatases from rat liver.** *Chem. Pharm. Bull.*, 36: 3020-3026.
36. Galka, M. Dziembor-Gryszkiewicz, E.; Kos, S.; Ostrowski, W. (1980) **Properties of low-molecular-weight acid phosphatases isolated from cytosol and chromatin of rat liver.** *Acta Biochim. Pol.*, 27: 281-293.
37. Granjeiro, J. M. (1994) **Purificação e caracterização da fosfatase ácida de rim bovino.** *Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp.*
38. Granjeiro, J. M.; Taga, E. M. and Aoyama, H. (1997a) **Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase.** *An. Acad. Bras. Ci.*, 69: 451-460.
39. Granjeiro, J. M.; Ferreira, C. V.; Jucá, M. B.; Taga, E. M. and Aoyama, H. (1997b) **Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics.** *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41: 1201-1208.
40. Hartree, E.F. (1972) **Determination of Protein: A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response.** *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.

41. Heinrikson, R. L. (1969) **Purification and characterization of a low molecular weight acid phosphatase from bovine liver.** *J. Biol. Chem.*, 244: 299-307.
42. Hengge, A. C.; Zhao, Y.; Wu, L. and Zhang, Z. -Y (1997) **Examination of the transition state of the low-molecular mass small tyrosine phosphatase 1. Comparisons with other protein phosphatases.** *Biochemistry*, 36: 7928-7936.
43. Hiraga, A. and Tzuiki, S. (1991) **Rat liver protein-tyrosine phosphatase: purification and characterization of two isoforms.** *Adv. Prot. Phosphatases*, 6: 251-264.
44. Hollander, P. V. (1971) **Acid phosphatases**, in **The Enzymes**, 2nd ed, Cap. IV, Edited by Boyer P.D.N.Y., Academic Press, pp. 449.
45. Huyer, G.; Liu, S.; Kelly, J.; Moffat, J.; Payette, P.; Kennedy, B.; Tsaprailis, G.; Gresser, M. and Ramachandran, C. (1997) **Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate.** *J. Biol. Chem.*, 272: 843-851.
46. Janska, H. Kubicz, A.; Szalewicz, A.; Harazna, J. (1988) **The high molecular weight and the low molecular weight acid phosphatases of the frog liver and their phosphotyrosine activity.** *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B: 173-178.
47. Jia, Z. (1997) **Protein phosphatases: structures and implications.** *Biochem. Cell. Biol.*, 75: 17-26.
48. Johnson, L. N. and Barford, D. (1993) **The effect of phosphorylation on the structure and function of proteins.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22: 199-232.
49. Kanai, K. & Kondo, E. (1991) **Substrate response in acid phosphatase activity of *Pseudomonas pseudomallei* and *Pseudomonas cepacia*, with special reference to tyrosine phosphatase.** *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 44: 225-237
50. Klarlund, J.K. (1985) **Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins.** *Cell*, 41: 707-717.
51. Klarlund, J.K.; Latini, S. and Forchhammer, J. (1988) **Numerous proteins phosphorylated on tyrosine and enhanced tyrosine kinase activities in vanadate-treated NIH 3T3 fibroblasts.** *Biochim. Biophys. Acta*, 971: 112-120.
52. Krueger, N. X.; Streuli, M. and Saito, H. (1990) **Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases.** *EMBO J.*, 9: 3241-3252.
53. Lau, K.-H.W.; Farley, J.R. and Baylink, D.J. (1989) **Phosphotyrosyl protein phosphatases.** *Biochem. J.*, 257: 23-36.
54. Layne, E. (1957) **Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins.** *Meth. Enzymol.*, III: 447-454.
55. Lawrence, G. L. and Van Etten, R. L. (1981) **The low-molecular-weight acid phosphatase from bovine liver: isolation, amino acid composition, and chemical modifications studies.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 206: 122-131.

56. Li, Y. and Strohl, W. R. (1996) **Cloning, purification, and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* (A3(2)).** *J. Bacteriol.*, 178: 136-142.
57. Liebow, C.; Reilly, C.; Serrano, M. and Schally, A. V. (1989) **Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 2003-2007.
58. Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) **The determination of enzyme dissociation constants.** *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-666.
59. Logan, T. M.; Zhou, M., -M.; Nettesheim, D. G.; Meadows, R. P.; Van Etten, R. L. and Fesik, S. W. (1994) **Solution structure of a low molecular weight protein tyrosine phosphatase.** *Biochemistry*, 33: 11087-11096.
60. Lowry, O. H. and Lopez, J. (1946) **The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters.** *J. Biol. Chem.*, 162: 421-424.
61. Manao, G.; Pazzagli, L.; Cirri, P.; Caselli, A.; Camici, G.; Cappugi, G.; Saeed, A. and Ramponi, G. (1992) **Rat liver low Mr phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes: purification and amino acid sequences.** *J. Prot. Chem.*, 3: 333-345.
62. Modesti, A.; Cirri, P.; Raugei, G.; Carraresi, L.; Magherini, F.; Manao, G.; Camici, G. Ramponi, G. (1995) **Expression, purification and kinetic behaviour of fission yeast low Mr protein-tyrosine phosphatase.** *FEBS Lett.*, 375: 235-238.
63. Mondesert, O.; Moreno, S. and Russel, P. (1994) **Low molecular weight protein-tyrosine phosphatases are highly conserved between fission yeast and man.** *J. Biol. Chem.*, 269: 27996-27999.
64. Nurse, P. (1990) **Universal control mechanism regulating onset of M-phase.** *Nature*, 344: 503-508.
65. Ostanin, K.; Pokalsky, C.; Wang, S. and Van Etten, R. L. (1995) **Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding the low molecular weight protein-tyrosine phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, 270: 18491-18499.
66. Panara, F. Angiolillo A, Fagotti A, Di Rosa I, Francesca S, Pascolini R (1992) **Acid phosphatases in mammalian tissues. Evidence for the existence of a 57 kDa Zn<sup>2+</sup>-dependent acid phosphatase form.** *Int. J. Biochem.*, 24: 1619-1623.
67. Pasqualini, S., Panara, F., Bracardi, P. & Antonielli, M. (1992) **Hight molecular weight acid phosphatases from barley coleoptiles.** *Phytochemistry*, 31: 3703-3706.
68. Ramponi, G.; Manao, G.; Camici, G.; Cappugi, G.; Ruggiero, M. and Bottaro, B. P. (1989) **The 18 kDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine phosphatase activity on the autophosphorylated epidermal growth factor receptor.** *FEBS Lett.*, 250: 469-473.

69. Ramponi, G.; Rugiero, M.; Raugei, G.; Berti, A.; Modesti, A.; Degl'Innocenti, D.; Magnelli, L.; Pazzagli C.; Chiarugi, V. P. and Camici, G. (1992) **Overexpression of a synthetic phosphotyrosine protein phosphatase gene inhibits normal and transformed cell growth.** *Int. J. Canc.*, 51: 652-656.
70. Ramponi, G. and Stefani, M. (1997) **Structural, catalytic, and functional properties of low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 279-292.
71. Ruff, S. J.; Chen, K. and Cohen, S. (1997) **Peroxo vanadate induces tyrosine phosphorylation of multiple signaling proteins in mouse liver and kidney.** *J. Biol. Chem.*, 272: 1263-1267.
72. Saeed, A.; Tremori, E.; Manao, G.; Camici, G.; Cappugi, G. and Ramponi, G. (1990) **Bovine brain low Mr acid phosphatase: purification and properties.** *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR*, 22: 81-94.
73. Shekels, L. L.; Smith, A. J.; Van Etten, R. L. and Bernlohr, D. A. (1992) **Identification of the adipocyte acid phosphatase as a PAO-sensitive tyrosyl phosphatase.** *Protein Sci.*, 1: 710-721.
74. Sotiropoulos, T.G. and Geladopoulos, T.P. (1990) **A low molecular weight acid phosphatase present in crystalline preparation of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b.** *FEBS Lett.*, 271: 76-78.
75. Stefani, M.; Caselli, A.; Bucciantini, M.; Pazzagli, L.; Dolfi, F.; Camici, G.; Manao, G. and Ramponi, G. (1993) **Dephosphorylation of tyrosine phosphotyrosylated synthetic peptides by rat liver phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes.** *FEBS Lett.*, 326: 131-134.
76. Su, X. -D.; Taddei, N.; Stefani, M.; Ramponi, G. and Nordlund, P. (1994) **The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase.** *Nature*, 370: 575-578.
77. Taga, E.M. and Van Etten, R.L. (1982) **Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 214: 505-515.
78. Tanizaki, M.M.; Bittencourt, H.M.S. and Chaimovich, H. (1977) **Activation of low molecular weight acid phosphatase from bovine brain by purines and glycerol.** *Biochim. Biophys. Acta*, 485: 116-123.
79. Ullah, A. H. J. & Gibson D. M. (1988) **Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 514-520.
80. Waheed, A.; Laidler, P. M.; Wo, Y. Y. P. and Van Etten, R. L. (1988) **Purification and physicochemical characterization of a human placental acid phosphatase activity.** *Biochemistry*, 27: 4265-4273.
81. Wo, Y.-Y. P.; McCormack, A. L.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Davis, J. P.; Mitchell, G. L. and Van Etten, R. L. (1992a) **Sequencing, cloning and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, 267: 10856-10865.

82. Wo, Y.-Y. P.; Zhou, M. M.; Stevis, P.; Davis, J. P.; Zhang, Z. -Y. and Van Etten, R. L. (1992b) **Cloning, expression, and catalytic mechanism of the low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart.** *Biochemistry*, 31: 1712-1721.
83. Yuvaniyama, J.; Denu, J. M.; Dixon, J. E. and Saper, M. A. (1996) **Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR.** *Science*, 272: 1328-1331.
84. Zhang, M.; Van Etten, R. L. and Stauffacher, C. V. (1994) **Crystal structure of bovine heart phosphotyrosyl phosphatase at 2.2 Å resolution.** *Biochemistry*, 33: 11097-11105.
85. Zhang, M.; Zhou, M.; Van Etten, R. L. and Stauffacher, C. V. (1997) **Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate.** *Biochemistry*, 36: 15-23.
86. Zhang, Z. and Van Etten, R. L. (1990) **Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase - a phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 282: 39-49.
87. Zhang, Z. -Y. and Van Etten, R. L. (1991a) **Leaving group dependence and proton inventory studies of the phosphorylation of a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart.** *Biochemistry*, 30: 8954-8959.
88. Zhang, Z. -Y. and Van Etten, R. L. (1991b) **Pre-steady-state and steady-state kinetic analysis of the low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart.** *J. Biol. Chem.*, 266: 1516-1525.
89. Zhang, Z. -Y.; Davis, J. P. and Van Etten, R. L. (1992) **Covalent modification and active site directed inactivation of a low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart.** *Biochemistry*, 31: 1701-1711.
90. Zhang, Z. -Y.; Wang, Y. and Dixon, J. E. (1994) **Dissecting the catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 1624-1628.
91. Zhang, Z.-Y.; Zhou, G.; Denu, J. M.; Wu, L.; Tang, X.; Mondesert, O.; Russel, P.; Butch, E. and Guan, K.-L. (1995) **Purification and characterization of the low molecular weight protein tyrosine phosphatase, Stp1, from the fission yeast *Shizosaccharomyces pombe*.** *Biochemistry*, 34: 10560-10568.
92. Zhang, Z-Y. (1998) **Protein-Tyrosine Phosphatases: Biological Function, Structural Characteristics, and Mechanism of Catalysis.** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 33(1): 1-52.
93. Zhou, M. and Van Etten, R. L. (1999) **Structural basis of the tight binding of pyridoxal r'-phosphate to a low molecular weight protein tyrosine phosphatase.** *Biochemistry*, 38: 2636-2646.
94. Zhou, M. M.; Davis, J. P. and Van Etten, R. L. (1993) **Identification and pKa determination of the histidine residues of human low-molecular-weight phosphotyrosyl protein phosphatases: a convenient approach using an mEV-17 spectral editing scheme.** *Biochemistry*, 32: 8479-8486.