



MARÍLIA AFONSO RABELO BUZALAF

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FOSFOTIROSINA  
PROTEÍNA FOSFATASE DE BAIXA MASSA MOLECULAR  
RELATIVA DO FÍGADO DE CARNEIRO

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato (a)  
*Marília Afonso Rabelo Buzalaf*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.  
*26/11/99*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Doutor em  
Biologia Funcional e Molecular, na Área  
de Bioquímica.

Orientador: Prof.Dr. Eulázio Mikio Taga



200003643

UNIDADE	B.e.		
N.º CHAMADA:	T/unicamp		
	B988p		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	40482		
PROC.	248/00		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	\$ 11,00		
DATA	14/03/00		
N.º CPD			

CM-00139099-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**B988p Buzalaf, Marília Afonso Rabelo**  
Purificação e caracterização da fosfotirosina proteica fosfatase de baixa massa molecular relativa do fígado de carneiro/Marília Afonso Rabelo Buzalaf. - - Campinas, SP: [s.n], 1999.  
126f: ilus.

Orientador: Eulázio Mikio Taga  
Tese(doutorado) - 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.

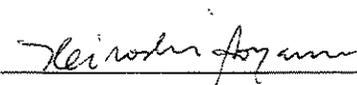
Data da Defesa: 26/11/99

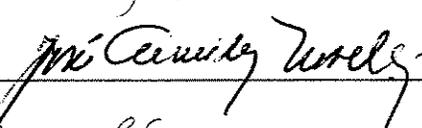
Banca Examinadora

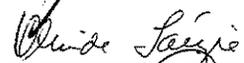
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

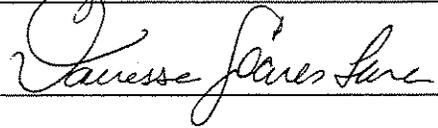
Titulares:

Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga (Orientador)  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Camillo Novello  \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Olinda Tarzia  \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Vanessa Soares Lara  \_\_\_\_\_

Suplentes:

Prof. Dr. Sérgio Marangoni \_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro \_\_\_\_\_

Ao meu esposo *Claudio*, pela compreensão durante as ausências, pelo incentivo constante e pelo amor que torna a vida mais bela;

Aos meus filhos, *Nathalia, Gabriel e Rafael*, que viveram parte desta experiência ainda *in utero* e que vieram a encher de bênçãos os meus dias;

Aos meus pais, *Américo e Sônia*, meus eternos mentores, cujos ensinamentos sempre nortearam e continuarão guiando os meus passos;

À *Elizabeth* pela amizade e carinho que só uma irmã pode oferecer;

Aos meus avôs *Mário e José*, cuja experiência de vida muito me tem ajudado;

Às minhas avós *Elizabeth e Odete (in memoriam)*, que não puderam acompanhar a finalização deste trabalho, mas cuja lembrança sublime é bálsamo para os meus dias;

Dedico este trabalho.

Ao Prof. Eulázio Mikio Taga, brilhante orientador deste trabalho, cujos ensinamentos vêm sendo essenciais para minha formação acadêmica. Gostaria de relembrar aqui uma frase que já lhe disse: “Também é pai aquele que forma.”.

Ao Prof. Hiroshi Aoyama, profissional exemplar e ser humano da mais pura e nobre estirpe. Suas lições muito me têm ajudado, tanto na vida acadêmica quanto na pessoal.

Ao Prof. José Mauro Granjeiro, colega e amigo, pelo auxílio inestimável na realização deste trabalho. Seu altruísmo e disponibilidade para ajudar cativam a todos que o rodeiam.

Ao Prof. José Camillo Novello pelas sugestões propostas no Exame de Qualificação.

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

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Thelma, Isabele, Paulo, Carmen, Ana Cláudia, Angélica, Márcio, Alexandre e André pelo estímulo constante e amizade.

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.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica da FOB-USP, Thelma, Ovídio e Gilmar pelo apoio e pela torcida.

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

À Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Aymar Pavarini, por me permitir realizar o curso de Pós-Graduação no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia/UNICAMP.

À CAPES, pela concessão da Bolsa PICD.

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 São Manoel-SP, pela gentil cessão do material biológico essencial à realização deste trabalho.

## ÍNDICE

Abreviaturas e Símbolos .....	viii
Abreviatura de aminoácidos.....	x
Resumo.....	xi
Summary .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 A superfamília das proteína tirosina fosfatases.....	2
1.1.1 Proteína Tirosina Fosfatases Específicas .....	3
1.1.2 Fosfatases de Especificidade Dual Tipo VH1.....	5
1.1.3 Fosfatases cdc25 .....	6
1.1.4 Proteína Tirosina Fosfatase de BMr .....	7
1.1.5 Estrutura .....	9
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Materiais.....	20
3.1.1 Obtenção do Fígado de Carneiro .....	20
3.1.2 Reagentes e Soluções .....	20
3.2 Métodos.....	21
3.2.1 Purificação da Enzima.....	21
3.2.2 Determinação de Atividade Enzimática.....	23
3.2.3 Determinação da Concentração de Proteína .....	26
3.2.4 Determinação da Massa Molecular .....	26
3.2.5 Estudos Eletroforéticos .....	27
3.2.6 Estudos Cinéticos.....	28
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
4.1 Purificação da Enzima .....	34
4.2 Determinação da Massa Molecular Relativa.....	36
4.3 Estudos Eletroforéticos .....	38
4.4 Estudos Cinéticos.....	38
4.4.1 Efeito do Tempo de Incubação.....	38

4.4.2	Efeito da Concentração da Enzima.....	39
4.4.3	Efeito do pH .....	39
4.4.4	Efeito da Temperatura e Determinação da Ea.....	39
4.4.5	Estudo de Especificidade .....	55
4.4.6	Determinação dos Parâmetros Cinéticos.....	58
4.4.7	Efeito da BSA no Meio de Reação.....	67
4.4.8	Efeito da BSA no meio de Diluição.....	67
4.4.9	Efeito da BSA na Ea para Hidrólise do pNPP .....	68
4.4.10	Efeito de Compostos na Atividade .....	74
4.4.11	Efeito de Metais na Atividade .....	77
4.4.12	Estudos de Inibição .....	81
5	CONCLUSÕES .....	943
6	PERSPECTIVAS.....	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

**ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

<b>A<sub>280</sub></b>	Absorbância em 280 nm
<b>A<sub>405</sub></b>	Absorbância em 405 nm
<b>AE</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>DTAB</b>	Brometo de dodecil trimetilamônio
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>E<sub>a</sub></b>	Energia de ativação
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diaminotetraacético
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal
<b>FAc</b>	Fosfatase ácida
<b>FMN</b>	Flavina mononucleotídeo
<b>FPLC</b>	Cromatografia líquida de “performance” rápida
<b>G-SH</b>	Glutathiona reduzida
<b>IF1 e 2</b>	Isoforma 1 e 2
<b>IMr</b>	Massa molecular relativa intermediária
<b>k<sub>cat</sub></b>	Constante catalítica

<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inibição
<b>K<sub>ic</sub>/K<sub>ia</sub></b>	Constante de inibição competitiva/acometitiva
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis
<b>M<sub>r</sub></b>	Massa molecular relativa
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>pCMB</b>	p-Cloromercuribenzoato
<b>P<sub>i</sub>/P</b>	Fosfato inorgânico
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>pNP</b>	p-Nitrofenol
<b>pNPP</b>	p-Nitrofenil fosfato
<b>PP<sub>i</sub></b>	Pirofosfato
<b>PTP</b>	Proteína tirosina fosfatase
<b>PTQ</b>	Proteína tirosina quinase
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SP-Sephadex</b>	Sulfopropil-Sephadex
<b>Tyr-P</b>	Tirosina fosfato
<b>UE</b>	Unidade enzimática ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidade máxima

BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

X

**ABREVIATURA DOS AMINOÁCIDOS:**

---

A	Ala	Alanina	N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asparagina ou aspartato	P	Pro	Prolina
C	Cys	Cisteína	Q	Gln	Glutamina
D	Asp	Aspartato	R	Arg	Arginina
E	Glu	Glutamato	S	Ser	Serina
F	Phe	Fenilalanina	T	Thr	Treonina
G	Gly	Glicina	V	Val	Valina
H	His	Histidina	W	Trp	Triptofano
I	Ile	Isoleucina	X		Desconhecido ou raro
K	Lys	Lisina	Y	Tyr	Tirosina
L	Leu	Leucina	Z	Glx	Glutamina ou glutamato
M	Met	Metionina			

---

## RESUMO

A PTP de BMr do fígado de carneiro foi purificada 1350 vezes até a homogeneidade, com rendimento de 2,6%, através de um procedimento envolvendo fracionamento com sulfato de amônio, diálise, cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex com eluição por íon afinidade e cromatografia de exclusão molecular. Os critérios de pureza utilizados foram a AE, PAGE, SDS-PAGE e filtração em gel (Superdex HR 200). A enzima purificada (AE de 81,18  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) é composta por uma cadeia polipeptídica simples e possui Mr de 17,4 e 18,3 kDa, como determinado através de filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente. O estudo do efeito do pH na atividade enzimática revelou que o pH ótimo é em torno de 5,5. A enzima apresentou uma atividade máxima a 50°C. A energia de ativação para a hidrólise do pNPP, determinada pelo gráfico de Arrhenius, foi de 49,674  $\text{kJ mol}^{-1}$ . A adição de BSA (0,1 a 0,75  $\text{mg/mL}$ ) ao meio de reação enzimática promoveu um incremento de até 40% na atividade enzimática, sendo que concentrações maiores tiveram pouco efeito. Já a adição de BSA ao meio de diluição enzimática elevou a velocidade em até 350%, tendo provocado um ligeiro aumento na  $K_m$ , praticamente sem interferir com a  $E_a$ . A atividade da enzima foi pouco sensível a diversos compostos e íons metálicos, exceto pela ativação por guanosina e inibição por SDS, ácido úrico,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . O estudo de inibidores demonstrou insensibilidade ao tartarato e fluoreto e inibição por vanadato ( $K_i$  de 0,097  $\mu\text{M}$ ), fosfato inorgânico ( $K_i$  de 0,94  $\text{mM}$ ), molibdato de amônio ( $K_{ic}$  de 12,8  $\mu\text{M}$  e  $K_{ia}$  de 2,7  $\mu\text{M}$ ) e pCMB. Dos substratos testados, apenas pNPP,  $\beta$ -Naftil-P, Tyr-P e FMN foram hidrolisados significativamente, com  $K_m$  de 0,151, 0,726, 3,873 e 0,12  $\text{mM}$ , no pH 5,0 e 1,861, 4,447, 5,673 e 0,11  $\text{mM}$  no pH 7,0, respectivamente. Também houve hidrólise sobre o acetil-P ( $K_m$  de 0,18  $\text{mM}$ ) no pH 5,0, entretanto com uma velocidade 100 vezes menor em relação ao pNPP.

### SUMMARY

A low molecular weight sheep liver phosphotyrosine protein phosphatase was purified 1350-fold to homogeneity, with 2.6% recovery, by a procedure involving ammonium sulfate fractionation, dialysis, SP-Sephadex ion-exchange chromatography with ion-affinity elution and molecular exclusion chromatography. The following homogeneity criteria were used: specific activity, PAGE, SDS-PAGE and gel filtration (Superdex HR 200). The purified enzyme (specific activity  $81,18 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) contained a single peptide chain and had a relative molecular mass of 17.4 and 18.3 kDa, as determined by gel filtration chromatography and SDS-PAGE, respectively. pNPP hydrolysis catalyzed by this enzyme had a pH optimum of 5.5 and maximal activity at 50°C. An activation energy value of  $49.674 \text{ kJ mol}^{-1}$  for the reaction of pNPP hydrolysis was determined from Arrhenius plot. Addition of BSA (0.1 to 0.75 mg/mL) to enzyme reaction media increased until 40% enzyme activity, but higher concentrations of BSA had a small effect. Addition of BSA to enzyme dilution media increased velocity until 350%, causing a slight increase in  $K_m$ , without interfering in activation energy. Different compounds and metallic ions did not significantly affect enzyme activity, except for inhibition by SDS, uric acid,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  and activation by guanosine. Enzyme was also inhibited by vanadate ( $K_i$ ,  $0.097 \mu\text{M}$ ), inorganic phosphate ( $K_i$   $0.94 \mu\text{M}$ ), ammonium molybdate ( $K_{ic}$ ,  $12.8 \mu\text{M}$  and  $K_{ia}$ ,  $2.7 \mu\text{M}$ ) and pCMB. Both tartrate and fluoride were very weak inhibitors. Apparent  $K_m$  values obtained, at 37°C were 0.151, 0.726, 3.873 and 0.12 mM at pH 5.0 and 1.861, 4.447, 5.673 and 0.11 mM, at pH 7.0, for pNPP,  $\beta$ -Naftil-P, Tyr-P and FMN, respectively. Acetyl-P was also hydrolyzed ( $K_m$ , 0.18 mM) at pH 5.0, but the velocity was 100 times smaller in respect to pNPP.

## 1 INTRODUÇÃO

Durante a última década, considerável progresso tem sido feito na elucidação do controle do crescimento e coordenação em células eucarióticas. O balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como hormônios, mitógenos, oncogenes, citocinas e neurotransmissores. Em particular, a fosforilação e desfosforilação de resíduos de tirosina em proteínas tem emergido como um evento chave na regulação da divisão, diferenciação e desenvolvimento celular, regulação do metabolismo e expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Cohen, 1988; Johnson and Barford, 1993). Diversos autores têm trabalhado sistematicamente na compreensão destes fenômenos e diversas revisões sobre o assunto são disponíveis (Lau *et al.*, 1989; Trowbridge, 1991; Pot and Dixon, 1992; Cohen, 1992; Walton and Dixon, 1993; Krebs, 1994; Lenburg and O'Shea, 1996; Barford, 1996; Tonks and Neel, 1996; Denu *et al.*, 1996; Fauman and Saper, 1996; Jia, 1997; Ramponi and Stefani, 1997; Byon *et al.*, 1997; Zhang, 1998).

Serina, treonina e tirosina são os resíduos de aminoácidos predominantemente fosforilados, apesar da histidina ser também um alvo para a fosforilação (Swanson *et al.*, 1994). 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 neoplasias e doenças resultantes de defeitos imunológicos. Vários organismos patogênicos alteram, *in vivo*, o nível de proteínas fosforiladas em células eucarióticas, tanto pela codificação de proteínas quinases e fosfatases, como pela modulação da atividade endógena destas enzimas (Jia, 1997).

Nas células normais, muitos receptores de fatores de crescimento possuem domínios intracelulares com atividade proteína quinase (PTQ); muitos produtos

de oncogenes têm estruturas semelhantes, porém, permitem uma atividade PTQ desregada, caracterizada pela fosforilação inadequada em tirosina, com conseqüente proliferação descontrolada e oncogênese (Ramponi and Stefani, 1997).

### *1.1 A superfamília das proteína tirosina fosfatases*

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 ocadaico, independência de íons metálicos, habilidade em desfosforilar p-nitrofenil fosfato (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 grupo apresentar 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 específicas; *ii*) as fosfatases com dupla especificidade tipo VH1; *iii*) as cdc25 e *iv*) as fosfatases ácidas de BMr (Fauman and Saper, 1996; Jia, 1997).

Estas famílias apresentam regiões de consenso na seqüência de aminoácidos, principalmente no sítio ativo, as quais são resumidas no quadro abaixo.

Seqüência de consenso do Sítio Ativo para os quatro principais subgrupos na Superfamília das Tirosina Fosfatases (Fauman and Saper, 1996)				
Subgrupo	Doador de Prótons		Padrão do Sítio Ativo	Seqüências conhecidas
PTP	<i>SWPDH</i>	X <sub>24</sub>	<i>PIVVHCSAGVGR TG</i>	103
Tipo VH1	<i>PVEDN</i>	X <sub>24</sub>	<i>RVLVHCQAGISRSA</i>	28
Cdc25	<i>YIIDC</i>	X <sub>40</sub>	<i>IIVFHCEFSSERGP</i>	22
PTP de BMr	<i>DIEDP</i>	X <sub>-95</sub>	<i>SVL FVCLGNICRSP</i>	14

As letras em itálico representam os resíduos altamente conservados (90% das seqüências possuem o resíduo idêntico ou um aminoácido similar). O número  $x_n$  refere-se ao número de resíduos de aminoácidos entre o doador de prótons e o sítio ativo; nas PTP de BMr, o doador de prótons vem após a alça do sítio ativo na seqüência de aminoácidos, sendo indicado pelo número negativo.

### 1.1.1 Proteína Tirosina Fosfatases Específicas

As proteína tirosina fosfatases específicas são as enzimas melhor estudadas na superfamília das PTPs e apresentam alta massa molecular relativa (AMr). 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 invertebrados. 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 fosfatases citoplasmáticas tipo não-receptor (Fauman and Saper, 1996).

Foram relatadas as estruturas cristalinas do domínio catalítico de três PTPs, determinadas por raios X: a PTP $\alpha$  tipo-receptor humana (Bilwes *et al.*, 1996), a PTP 1B citoplasmática humana (Barford *et al.*, 1994) e a fosfatase de *Yersinia* (Stuckey *et al.*, 1994; Fauman *et al.*, 1996). As estruturas apresentam em comum 7 folhas torcidas e flanqueadas por oito  $\alpha$ -hélices, tendo na porção central a alça

contendo o padrão Cx<sub>2</sub>R. O alto grau de similaridade entre estas diferentes PTPs sugere que todos os membros deste subgrupo sejam muito parecidos (Fauman and Saper, 1996).

As **PTP 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, 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).

O domínio extracelular das PTPs tipo receptor apresenta uma grande variabilidade, presumivelmente devido às diferentes funções e ligantes fisiológicos, como imunoglobulinas, fibronectina tipo III, domínio com atividade anidrase carbônica, sítios para glicosilação e regiões ricas em cisteína (Jia, 1997; Byon *et al.*, 1997). É consenso que as PTPs tipo receptor estão envolvidas na comunicação célula a célula pela transdução de sinais transmembrana, o que acarreta uma mudança na fosforilação intra-celular da tirosina, agindo de modo compensatório à ação de PTQs (Jia, 1997).

As **PTPs citosólicas tipo não-receptor** freqüentemente contêm segmentos extracatalíticos, os quais podem estar envolvidos diretamente na regulação da atividade catalítica. Estes segmentos estão associados ao grupamento C- ou N-terminal e são os responsáveis pela função única e pelas propriedades das PTPs (Jia, 1997). Por exemplo, as PTPs SHP-1 e SHP-2 possuem um par de domínios SH2 responsáveis pela ligação com proteínas contendo tirosina fosforilada, incrementando sua capacidade catalítica. As PTP 1B e a PTP da célula T possuem segmentos C-terminal hidrofóbicos, que restringem a localização da enzima à região do retículo endoplasmático (Fauman and Saper, 1996; Byon *et al.*, 1997).

As PTPs podem sofrer ainda fosforilação do domínio não catalítico, causando modificações na atividade catalítica ou na localização celular.

Outra característica marcante das PTPs é a capacidade de hidrolisar 100.000 vezes mais rápido a fosfotirosina 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, por ser mais comprida, pode penetrar e sofrer a hidrólise; esta região (resíduos de 43-46, KNRY) é denominada “região de reconhecimento da fosfotirosina” (Yuvaniyama *et al.*, 1996).

### 1.1.2 Fosfatases de Especificidade Dual Tipo VH1

Capazes de hidrolisar fosfatos monoésteres de peptídeos contendo tanto fosfotirosina quanto fosfoserina/treonina, estas enzimas regulam a transdução de sinais mitogênicos e desempenham um papel importante no controle do ciclo celular. A primeira tirosina fosfatase identificada que também possuía atividade sobre fosfoserina/treonina foi encontrada no vírus *vaccinia*, desfosforilando especificamente uma proteína viral tipo histona essencial para a formação do capsídeo (Fauman and Saper, 1996). Uma enzima homóloga foi detectada em humanos (VHR, enzima relacionada à *vaccinia* H1), mas sua função ainda é desconhecida. Keyse (1995) sugere seu envolvimento na desfosforilação de resíduos de treonina e tirosina de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases). 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 especificidade dual, apesar de não compartilharem qualquer outra homologia estrutural, possuem um sítio ativo e um mecanismo catalítico similares aos das PTPs (Jia, 1997). Esta característica dual parece estar associada à menor profundidade do sítio ativo, de aproximadamente 6 Å nas PTPs de especificidade

dual, contra os 9Å das PTPs específicas, além da ausência da seqüência KNRY (Yuvaniyama *et al.*, 1996).

### 1.1.3 Fosfatases *cdc25*

As *cdc25* (enzimas relacionadas com o controle da divisão celular) foram inicialmente identificadas em leveduras (Nurse, 1990), onde desfosforilavam a Tyr-15 do componente quinase, dependente da 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. Em mamíferos, há três *cdc25* específicas (A, B e C), cada uma responsável por um complexo CDK-ciclina (complexo quinase ciclina dependente de ciclina) distinto; elas colaboram para o controle de diferentes pontos de checagem no ciclo 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 especificidade dupla 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.

### 1.1.4 Proteína Tirosina Fosfatase de BMr

Recentes estudos levaram à identificação de um grupo de PTPs citoplasmáticas, caracterizadas pela reduzida massa molecular (~20 kDa). Estas enzimas não compartilham qualquer homologia de seqüência com qualquer outra das PTPs, exceto pelo padrão do sítio ativo e o mesmo mecanismo de catálise. As PTPs de BMr diferem das fosfatases ácidas clássicas pela inibição pelo vanadato, ao invés de 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, mamíferos, apesar de os genes para as outras PTPs não terem sido encontrados em procariotos (Ramponi and Stefani, 1997).

Recentemente, Ramponi and 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. A seguir, destacaremos alguns dos aspectos mais importantes abordados nesta revisão.

#### 1.1.4.1 Distribuição

A primeira PTP de BMr (E.C. 3.1.3.48.) foi estudada inicialmente como uma fosfatase ácida solúvel de baixa Mr (E.C. 3.1.3.2.), em função da marcante atividade sobre o pNPP. A presença desta enzima foi inicialmente descrita por Heinrikson (1969) e Chaimovich and Nome (1970). Posteriormente, Dissing *et al.*(1979) e Taga and Van Etten (1982) purificaram e caracterizaram a fosfatase ácida de BMr de eritrócitos e fígado humanos, respectivamente, e Lawrence and Van Etten (1981) purificaram a enzima do fígado bovino. A enzima foi ainda purificada a partir da placenta humana (Waheed *et al.*, 1988), coração bovino (Chernoff and Li, 1985; Zhang and Van Etten, 1990), rim bovino (Granjeiro *et*

*al.*, 1997a), pulmão bovino (Buzalaf *et al.*, 1998), fígado de porco (Caselli *et al.*, 1994a) e de rato (Manao *et al.*, 1992) e rim de carneiro (Silva, 1999).

Várias isoenzimas foram isoladas (Dissing and Svensmark, 1990) e seqüenciadas (Dissing *et al.*, 1991; Dissing and Johnsen, 1992) a partir de eritrócitos humanos. Três alelos foram identificados para estas enzimas, cada um gerando duas isoenzimas, denominadas rápida (f) e lenta (s), com base na mobilidade eletroforética. Concomitantemente, duas isoenzimas de fígado de rato, AcP1 e AcP2 foram isoladas (Manao *et al.*, 1992). Os genes para duas isoenzimas do coração bovino (HCPTP-A e HCPTP-B), correspondentes às formas rápida e lenta dos eritrócitos foram clonados, seqüenciados e expressos (Wo *et al.*, 1992b). 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 lipídios do adipócito.

As enzimas (f) dos eritrócitos, a AcP1, e a HCPTP-A têm sido indicadas como sendo a isoforma-1 (IF1), e as isoenzimas (s) dos eritrócitos, a AcP2, a HCPTP-B, as PTPs do fígado de humanos, bovinos, suínos, do rim bovino e de carneiro e do pulmão bovino, como sendo a isoforma 2 (IF2). A IF1 e a 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 and Suelter, 1985; Wo *et al.*, 1992a; Cirri *et al.*, 1993a; 1993b, 1995; 1996).

PTPs de BMr foram também identificadas, purificadas e caracterizadas a partir 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) e *Streptomyces coelicolor* (Li and Strohl, 1996).

Outras PTPs de BMr, estruturalmente não relacionadas com as PTPs IF1/IF2, de procariotos e leveduras, têm sido purificadas e caracterizadas (Keyse, 1995). Todas estas enzimas, possivelmente também as IF1 e IF2, possuem uma dupla especificidade, apesar de apresentarem uma atividade muito mais intensa sobre a fosfotirosina. Zhang *et al.* (1995) propuseram que estas enzimas seriam, na verdade, PTPs de dupla especificidade envolvidas no controle do ciclo celular.

### 1.1.5 Estrutura

As PTPs de BMr têm sido extensamente estudadas com relação ao mecanismo catalítico (Davis *et al.*, 1994; Chiarugi *et al.*, 1994), homologia (Dissing and 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 kDa) 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, fosfoserina/treonina fosfatases, ou ainda com outras PTPs, exceto pela seqüência do sítio ativo altamente conservada (Cx<sub>3</sub>RS/T), comum a todas as PTPs (Hiraga and Tzuiki, 1991; Cirri *et al.*, 1993b).

As seqüências das PTPs de BMr de procariotos, de leveduras e das IF1 e IF2 têm 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 contêm o sítio ativo. As IF1 e IF2 diferem uma da outra somente na seqüência da região 40-73, sugerindo que elas tenham se originado de um único gene, mais provavelmente através do “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 elucidar a estrutura terciária, com resolução de 2,1 Å, da enzima do fígado e coração bovinos (Su *et al.*, 1994; Zhang, M. *et*

*al.*, 1994 (HCPTPB) e 1998 (HCPTPA)). 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 dos 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 contêm fosfotirosina ou 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 and Strohl, 1996), o que também reforça a sua importância, possivelmente, no reconhecimento do substrato (Figura A).

Estudos cinéticos (ão *et al.*, 1975; Bittencourt and Chaimovich, 1976; Zhang and Van Etten, 1991; Zhang and Van Etten, 1992; Zhou *et al.*, 1993), 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 (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).

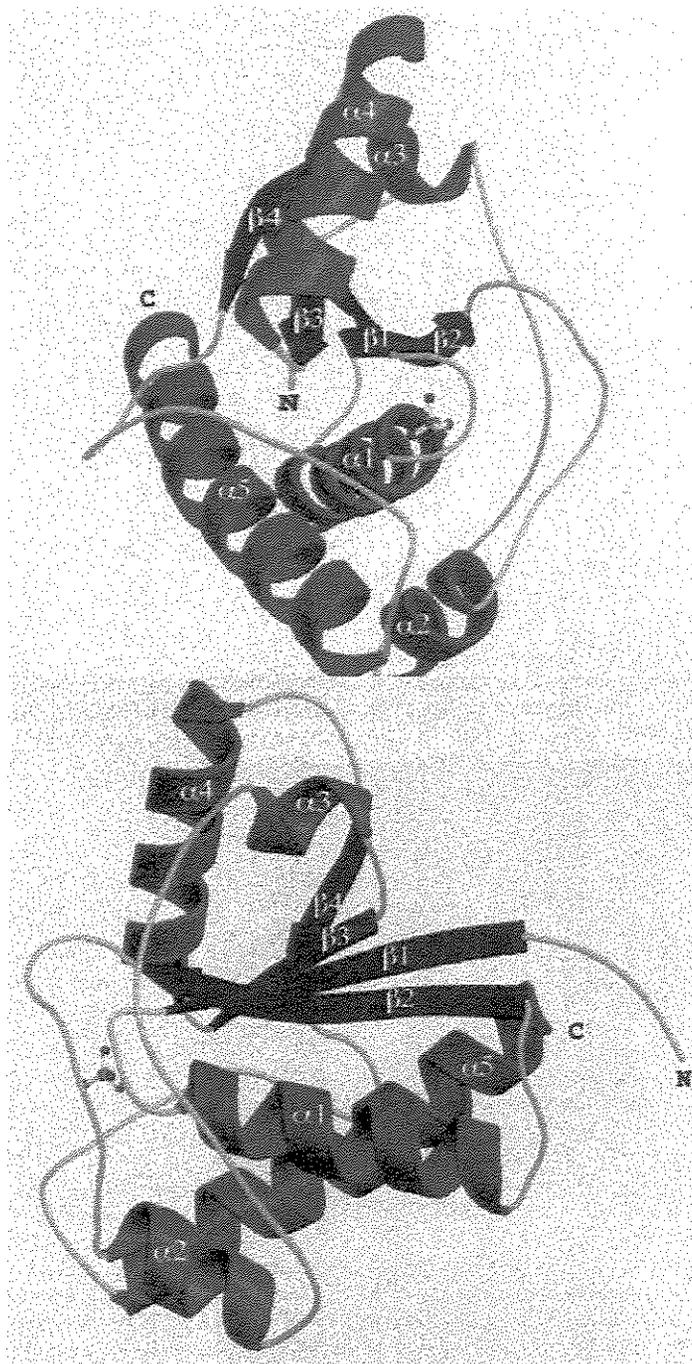


FIGURA A. Disposição das  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$  na estrutura terciária da PTP de BMr do coração bovino (Zhang, M. *et al.*, 1994). A alça fosfato do sítio ativo encontra-se entre a folha  $\beta$ 1 e a  $\alpha$ -hélice 1.

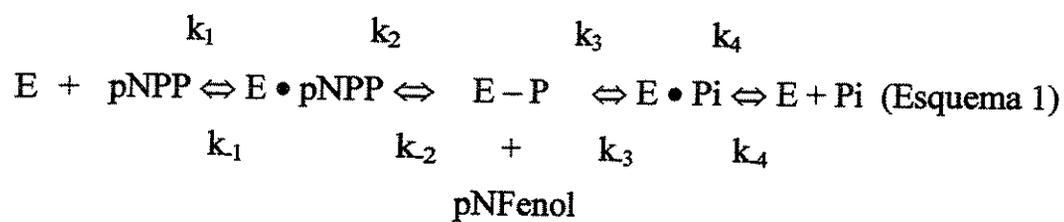
### 1.1.5.1 Mecanismo Catalítico

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 apresentam baixa atividade sobre alquil fosfatos (revisto por Ramponi, 1994), com exceção das FMN (Taga and Van Etten, 1982; Fuchs *et al.*, 1992; Granjeiro *et al.*, 1997b). Estas enzimas, bem como as oriundas de procariotos e leveduras, também apresentam uma marcante atividade sobre peptídeos e proteínas fosforilados em tirosina (Chernoff and Li, 1985; Ramponi *et al.*, 1989; Zhang and Van Etten, 1991b; Shekels *et al.*, 1992; Stefani *et al.*, 1993; Li and Strohl, 1996). Estes autores ainda afirmam que a atividade sobre a 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 o modelo cinético da reação catalisada pela IF2 da PTP de BMr. Na reação, ocorre a entrada de um substrato e a saída de dois produtos ( $S_n2P$ ) e procede via formação de um intermediário cisteinil fosfato (Cys-12; Wo *et al.*, 1992b; Cirri *et al.*, 1993b), sendo que o passo que leva à 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 no substrato, levando à formação do intermediário fosfo-enzima; o Asp-129 atuaria como doador de próton para o grupo que deixa a enzima, sendo que sua ligação ao piridoxal 5-fosfato torna-o indisponível para exercer este papel catalítico, atuando como um ácido geral (Zhou and Van Etten, 1999). 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 Cys-12 e 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 se encontra 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 and Van Etten, 1991b); Evans *et al.*, 1996):



O papel catalítico da Cys e da Arg é igual ao 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 pelo vanadato, assim como as de BMr (Zhang and Van Etten, 1990; Granjeiro *et al.*, 1997a) 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 massas. Agentes redutores como o DTT, presentes no meio de reação, mantêm 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 and Strohl, 1996). Esta inativação é reduzida pela presença do fosfato inorgânico, um inibidor competitivo da enzima, sugerindo que a ação do NO modifica a Cys-12 e a Cys-17 (Caselli *et al.*, 1994b).

#### **1.1.5.2 Importância Biológica**

Até 1985, o papel biológico das FAcS de BMr era completamente desconhecido. A enzima já havia sido purificada de diversas fontes, sendo encontrada em qualquer tecido de mamíferos e também de aves. Contudo, neste ano, Chernoff and Li purificaram a PTP do coração bovino associada à FAc de BMr e concluíram que se tratava da mesma enzima. A partir deste ano, os trabalhos se intensificaram a tal ponto que, além de uma profunda caracterização do mecanismo de catálise e da estrutura, já destacado nos tópicos anteriores, 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 bovino desfosforilava eficientemente *in vitro* o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-r), mas Rigacci *et al.* (1998a) relataram que esta desfosforilação não ocorre *in vivo*.

Utilizando peptídeos sintéticos contendo fosfotirosina, Stefani *et al.* (1993) relataram uma atividade hidrolítica preferencial sobre um peptídeo derivado de um sítio de fosforilação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-r).

A autofosforilação de receptores de fatores de crescimento tem sido apontada como um passo crucial na promoção da proliferação celular induzida por sinais mitogênicos. Além disto, um maior estímulo da atividade tirosina quinase (Lau *et al.*, 1989) e/ou uma 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 super-expressão de algumas PTPs poderia suprimir ou mesmo reverter a transformação celular (Liebow *et al.*, 1989), mesmo no caso das PTPs de BMr (Ramponi *et al.*, 1992).

O aumento artificial, por transfecção, do nível da PTP em células normais ou transformadas provocou a diminuição da taxa de crescimento e proliferação (Ramponi *et al.*, 1992), sendo que o nível máximo de atividade PTP foi detectado quando o crescimento foi inibido pelo contato célula-célula, indicando que o nível desta enzima pode ser dependente da densidade celular, como é o caso de outras PTPs (Pallen and Tong, 1991; Woodford-Thomas *et al.*, 1992).

A IF2 do fígado bovino e seu mutante inativo, onde a Cys-12 é substituída por Ser (C12S) parece interagir especificamente com o PDGF-r autofosforilado, tanto *in vitro* como *in vivo* (Rigacci *et al.*, 1998a). Rugiero *et al.* (1993) demonstraram ainda que a super-expressão de PTP de BMr em células transformadas provocava uma diminuição intensa (cerca de 50%) na síntese de DNA, proporcionalmente ao nível da PTP de BMr, quando comparado com as células normais, exceto para as células v-H-ras transformadas (Ramponi *et al.*, 1992). Berti *et al.* (1994) demonstraram uma diminuição em até 90% na resposta mitogênica ao PDGF, além de uma diminuição no nível de autofosforilação do PDGF-r após super-expressão da IF2. Logo após, Chiarugi *et al.* (1995) relataram que a super-expressão da PTP de BMr mutante e inativa (C12S) proporcionava um aumento intenso do nível de autofosforilação de PDGF-r; as células ainda apresentavam aumento de proliferação.

Chiarugi *et al.* (1998) relataram que a súper-expressão da PTP de BMr em células NIH/3T3 reduz a ativação do PDGF-r e a sua ligação com c-Src. As formas selvagem e mutante negativa (C12S) da PTP de BMr regulam diferentemente a ativação e a fosforilação em tirosina da STAT1 e STAT3, mas não afetam a atividade quinase regulada por sinais extracelulares. A despeito deste fato, as modificações observadas estão associadas a mudanças na expressão de fos. Os efeitos da PTP de BMr se restringem à fase G1, provavelmente por alterações na expressão dos proto-oncogenes myc e fos, sem afetar as vias do fosfatidilinositol 3-quinase e da fosfolipase C $\gamma$ -1, que são vias independentes envolvidas na mitogênese induzida por PDGF. Rigacci *et al.* (1998b) demonstraram que a PTP de BMr, tanto expressa naturalmente quanto súper expressa em células NIH/3T3 muda da fração citosólica para a fração Triton X-100 insolúvel após a estimulação com PDGF, o que significa que a fosforilação de uma população definida de PDGF-rs, que está localizada nesta fração e tem características e funções peculiares, é particularmente afetada pela súper expressão da PTP de BMr.

A súper-expressão da PTP de BMr interfere também com a via src da sinalização por insulina, influenciando a velocidade da síntese de glicogênio (Chiarugi *et al.*, 1997). A interação com a enzima selvagem leva à desfosforilação destes receptores, o que os tem indicado como verdadeiros substratos fisiológicos desta enzima (Chiarugi *et al.*, 1995; Chiarugi *et al.*, 1996; Chiarugi *et al.*, 1997, Bucciantini *et al.*, 1998).

Um estudo recente de Rovida e colaboradores (1998) demonstrou que a PTP de BMr é fisiologicamente expressa em macrófagos murinos, e desfosforila *in vitro* e *in vivo* o receptor do fator estimulante do crescimento de colônias, reduzindo a resposta mitogênica induzida pelo fator.

Um relato interessante foi publicado por Rigacci *et al.* em 1996, demonstrando uma possível regulação da atividade da IF2. Os autores suspeitam que esta enzima se encontra constitutivamente fosforilada em um ou mais resíduos de tirosina nas células NIH/3T3 transformadas pela quinase pp60<sup>v-src</sup>. A fosforilação promove um aumento na atividade enzimática e é estimulada pela presença de inibidores da fosfatase, que permitem a detecção de uma maior quantidade de PTP de BMr fosforilada porque inibem a auto-desfosforilação. Os resultados obtidos demonstraram que a enzima era capaz de catalisar a reação de auto-desfosforilação inter-molecular. Bucciantini *et al.* (1999) mostraram que a pp60<sup>src</sup>, *in vitro*, fosforila a enzima em dois resíduos de tirosina, a Tyr-131 e a Tyr-132, sendo que a fosforilação na Tyr-131 provoca um grande aumento na atividade catalítica da enzima (cerca de 25 vezes).

O controle negativo da atividade da PTP *in vitro* e *in vivo* tem sido reputado à inibição por peróxido de hidrogênio (Caselli *et al.*, 1998), produzido fisiologicamente em resposta à estimulação por TGFs (fatores de crescimento da transformação), EGF e PDGF (Bae *et al.*, 1997). A geração de espécies reativas de oxigênio em resposta a vários estímulos externos tem sido relatada para a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B (Schreck *et al.*, 1991) e AP-1 (Lo *et al.*, 1996), proteínas-quinases ativadas por mitógenos (Chen *et al.*, 1995) e fosfolipase A<sub>2</sub>, disparando a apoptose e inibição de PTP.

Com relação ao papel da PTP de BMr em microrganismos, Grangeasse *et al.* (1998) relataram que a PTP de BMr de *Acinetobacter johnsonii* desfosforila uma proteína quinase de sua membrana interna, autofosforilada em vários resíduos de tirosina. Isto representou a primeira identificação de um substrato proteico para uma PTP bacteriana, constituindo-se num possível modelo para a análise do papel da fosforilação reversível em tirosina na regulação da fisiologia microbiana. O mesmo grupo demonstrou ainda, pela primeira vez, que a *Escherichia coli* contém tanto uma PTK quanto uma PTP, sendo que a PTP utiliza a PTK como um

substrato endógeno, o que sugere a ocorrência de um mecanismo regulatório conectado com a fosforilação reversível de proteínas em resíduos de tirosina. Através da análise comparativa da seqüência de aminoácidos, a PTK pareceu similar a várias proteínas presentes em outras espécies bacterianas, envolvidas com a síntese e exportação de exopolissacarídeos. Sendo que estes polímeros são considerados importantes fatores de virulência, os autores sugeriram que a fosforilação reversível de proteínas em tirosina pode ser parte de uma cascata de reações que determinam a patogenicidade de bactérias (Vincent *et al.*, 1999).

Dessa forma, ao menos para a IF2, Ramponi e colaboradores têm demonstrado que seu papel fisiológico está associado à hidrólise de resíduos de tirosina no PDGF-r autofosforilado, sendo que sua atividade pode ser regulada via fosforilação a nível de tirosina. Também se tem relatado que esta isoforma desfosforila *in vivo* o receptor do fator estimulante do crescimento de colônias e os receptores de insulina. Contudo, há poucos relatos com respeito à função desta enzima em microrganismos e com relação à função da IF1. A regulação de ambas as isoformas também é outro ponto que merece ser melhor estudado.

## 2 PROPOSIÇÃO

Devido às várias características apresentadas por PTPs de BMr nos diferentes tecidos onde foi encontrada, não há uma técnica única para sua purificação, sendo necessárias metodologias específicas para cada tecido em estudo. Algumas publicações têm relatado técnicas de purificação caras, envolvendo o uso de cromatografias de afinidade, as quais nem sempre estão disponíveis aos laboratórios de recursos limitados. Além disto, a análise da literatura revela a inexistência de relatos da purificação da enzima a partir do fígado de carneiro.

Baseado nisto, propomo-nos a purificar a FAc de BMr do fígado de carneiro e realizar sua caracterização eletroforética, físico-química e cinética.

A presente tese contém resultados referentes a dois pontos fundamentais. Um deles é a utilização de uma metodologia simples e de baixo custo para a purificação da PTP de BMr, constituída de centrifugações diferenciais, fracionamento com sal e uso de colunas cromatográficas de troca iônica e exclusão molecular. Uma vez purificada a enzima, serão determinados seus parâmetros cinéticos, como  $V_{max}$  e  $K_m$ , Ea na presença e ausência de BSA, que tem sido apontada como um ativador da enzima, especificidade por substratos, efeito de inibidores, da temperatura e do pH.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

##### **3.1.1 Obtenção do Fígado de Carneiro**

O fígado de carneiro foi obtido do frigorífico Dom Pig, São Manoel (SP), removido logo após o sacrifício do animal, transportado para o laboratório em gelo moído e imediatamente processado.

##### **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, acetil-fosfato (Sigma Chemical Co.);  $\beta$ -glicero-P, ácido-6-fosfogluconico (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 etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA), sulfato de amônio, fosfato dissódico (Merck); hepes, bis-tris (hidroxi) (Sigma Chemical Co.).

Glicerol e reagentes redutores de tióis: DTT, G-SH, 2-mercaptoetanol (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**

Foi realizada a partir de uma modificação da técnica descrita por Caselli *et al* (1994a) para o fígado de porco.

As etapas abaixo descritas foram realizadas a 4°C.

#### **3.2.1.1 Obtenção do extrato**

O fígado de carneiro fresco e cortado em cubos (2kg) foi homogeneizado em tampão acetato 100mM, pH 5,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 2mM (homogeneizador Omni-mixer, 3 minutos, velocidade máxima), na proporção de 1,0 g de tecido para 4,0 mL de tampão. Em seguida, centrifugou-se o homogeneizado a 8.000 x g, por 20 minutos. Desprezado o precipitado, coletou-se o sobrenadante, o qual foi filtrado em 4 camadas de gaze. O efluente obtido constituiu o extrato límpido.

#### **3.2.1.2 Fracionamento com sulfato de amônio e diálise**

Realizou-se o fracionamento a 60% de saturação adicionando-se sulfato de amônio sólido ao extrato (390,0 g de sal por litro de solução), que permaneceu sob agitação lenta por 2 horas. Após este período, centrifugou-se novamente a solução a 8.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso no menor volume possível em tampão acetato 10 mM, pH 5,0, contendo EDTA 5mM e 2-mercaptoetanol 1mM. Esta solução foi dialisada contra 15 volumes de tampão acetato 0,01M, pH 5,0, contendo EDTA 2mM, 2-mercaptoetanol 2mM e sulfato de amônio 0,1M. O dialisado foi centrifugado a 8000 x g por 20 minutos para se eliminar o precipitado formado durante a diálise.

### **3.2.1.3 Cromatografia em SP-Sephadex I.**

A amostra clarificada (1200 mL) foi aplicada a uma coluna de SP-Sephadex (4,5 x 16,5 cm) previamente calibrada com tampão acetato 10mM, pH 5,0, contendo sulfato de amônio 100mM, EDTA 5mM e 2-mercaptoetanol 0,5mM. A lavagem da coluna foi feita com o mesmo tampão até que  $A_{280}$  se aproximasse de zero. A eluição da atividade se deu aplicando-se tampão fosfato dissódico 300mM, pH 6,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 0,5mM. Foram coletadas frações de 20,0 mL, sob um fluxo de 4,0 mL minuto<sup>-1</sup>. As frações eluídas com o tampão fosfato contendo mais que 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas e a solução resultante foi concentrada com sulfato de amônio sólido a 60% de saturação e mantida sob agitação por 2 horas e então procedeu-se à centrifugação a 10000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso no menor volume possível em tampão acetato 10 mM, pH 5,0, contendo EDTA 5mM e 2-mercaptoetanol 1mM.

### **3.2.1.4 Cromatografia em SP-Sephadex II**

A fração da etapa anterior (55,0 mL) foi aplicada a uma segunda coluna de SP-Sephadex (3,0 x 20,0 cm) previamente calibrada com tampão acetato 10mM, pH 5,0, contendo sulfato de amônio 100mM, EDTA 5mM e 2-mercaptoetanol 0,5mM. A lavagem da coluna foi feita com o mesmo tampão até que  $A_{280}$  se aproximasse de zero. A eluição da atividade se deu aplicando-se tampão fosfato dissódico 300mM, pH 5,1, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 0,5mM. Foram coletadas frações de 12,0 mL, sob um fluxo de 4,0 mL minuto<sup>-1</sup>. As frações eluídas com o tampão fosfato contendo mais que 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas num "pool" e concentradas por ultrafiltração sob pressão positiva de nitrogênio (4,0 kgf (cm<sup>2</sup>)<sup>-1</sup>), utilizando-se uma membrana Millipore do tipo PM-10.

### **3.2.1.5 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200**

A fração da etapa anterior (9,0 mL) foi aplicada a uma coluna de Sephacryl S-200 (3,0 X 110,0 cm) previamente calibrada com tampão acetato 100 mM, pH 5,0, contendo NaCl 500mM, fosfato dissódico 50 mM e DTT 0,1 mM. Após a penetração da amostra no gel a cromatografia foi desenvolvida pela passagem do tampão de equilíbrio com fluxo de 1,0 mL minuto<sup>-1</sup>. As frações (13,0 mL) contendo atividade superior a 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas e concentradas por ultrafiltração sob pressão positiva de nitrogênio (4 kgf (cm<sup>2</sup>)<sup>-1</sup>), utilizando-se uma membrana Millipore do tipo PM-10.

### **3.2.1.6 Armazenamento da enzima**

Para estudos posteriores, a enzima foi armazenada a -20°C em presença de glicerol 50%, fosfato 10 mM e 2-mercaptoetanol 5 mM.

## **3.2.2 Determinação de Atividade Enzimática**

Para a determinação da atividade enzimática, a enzima foi diluída em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 , contendo BSA 0,1%.

### **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 100 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0, e 5 mM de pNPP. A paralisação ocorreu pela adição de 1 mL de NaOH 1 M, após incubação por 10 minutos a 37°C. A formação do 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 M<sup>-1</sup> 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  $\mu\text{mol}$  de pNP por minuto.

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

### ***3.2.2.2 Dosagem do fosfato inorgânico***

A reação procedeu como descrito em 3.2.2.1 exceto que a paralisação da mesma foi feita pela adição de 1,0 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 200 mM pH 4,0). A coloração do complexo fosfo-molíbídico foi adquirida à temperatura ambiente pela adição de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 200 mM, pH 4,0), como redutor, de acordo com o método descrito por Lowry and Lopez (1946). A absorvância foi medida a 700 nm, 30 minutos após a adição do ácido ascórbico. O coeficiente de extinção molar para o complexo reduzido (azul de molibdênio) é  $4.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### ***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 mM. A produção de tirosina foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorção a 293 nm e usando um coeficiente de extinção molar de  $2.381 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (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 mM. O  $\beta$ -naftol formado foi medido espectrofotometricamente pela leitura da absorção a 346 nm e usando um coeficiente de extinção molar de  $2.780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2.2.5 Dosagem do ácido hidroxâmico

**Princípio:** Este método é baseado na reação do acetil-fosfato com a hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ ), para formar o ácido hidroxâmico, que, na presença de sais férricos, dá um complexo com cor vermelha a violeta, que pode ser determinado quantitativamente por análise colorimétrica (Ramponi, 1975).

#### Reagentes:

- a. Tampão acetato 1M pH 5,0.
- b. Acetil-fosfato 60 mM
- c. Solução A: é uma solução de hidroxilamina-HCl neutralizada. Foi preparada logo antes do uso, misturando-se volumes iguais de  $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$  4M e NaOH 3,5M.
- d. Solução B: foi preparada misturando-se volumes iguais de  $\text{FeCl}_3$  5% em HCl 0,1N e ácido tricloroacético 12% em HCl 3N.

Para um volume final de 1,0 mL, a reação foi iniciada pela adição da enzima a um meio contendo 100 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 6 mM de acetil-fosfato. A paralisação foi feita pela adição de 1,0 mL da solução A. Depois de a preparação ficar por 5 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 1,0 mL de água e então 3,0 mL da solução B e agitou-se vigorosamente.

A formação do ácido hidroxâmico foi determinada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 - Pharmacia Biotech) pela leitura da absorção a 530 nm.

### 3.2.3 Determinação da Concentração de Proteína

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

Reagente A - Carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 N.

Reagente B –  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5% em citrato de sódio 1%

Reagente C – 1,0 mL reagente B + 50,0 mL reagente A

Reagente de Folin-Ciocalteau (diluído 1:1 em  $\text{H}_2\text{O}$ )

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

### 3.2.4 Determinação da Massa Molecular

#### *a) Filtração em Gel (Superdex HR 200)*

A Mr da enzima foi determinada por filtração em Superdex HR 200 10/30, acoplada a um sistema FPLC da Pharmacia, equilibrada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, contendo NaCl 200 mM. A coluna foi pré-calibrada com as seguintes proteínas de Mr conhecida: Azul de Dextrana (2000,0 kDa), Albumina de Soro Bovino (66,3 kDa), Ovalbumina (45,0 kDa), Anidrase Carbônica (29,0 kDa) e Lisozima (14,3 kDa).

#### *b) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS*

A mobilidade eletroforética em condições desnaturantes foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (10,0%) contendo SDS, de acordo com a técnica de Weber and Osborne (1969). As seguintes proteínas de Mr conhecida

foram utilizadas como padrões: Lisozima (14,3 kDa),  $\beta$ -Lactoglobulina (18,4 kDa), Tripsinogênio (24,0 kDa), Pepsina (34,7 kDa), Ovalbumina (45,0 kDa) e Albumina de Soro Bovino (66,3 kDa).

Os géis de poliacrilamida na concentração de 10,0% de acrilamida e 0,3% de *bis*acrilamida, foram preparados em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), contendo 1,0% de SDS e colocados a polimerizar em tubos de 8,0 x 0,6 cm. Os dois compartimentos do aparelho de eletroforese foram preenchidos com o tampão do gel diluído 1:1 com água deionizada. As amostras para a corrida foram preparadas tomando-se 1 volume de cada amostra (0,5 mg/mL) e 9 volumes do tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, contendo 1,0 % de SDS, 1,0% de 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05% em água e 1 gota de glicerol, sendo incubadas por 5 minutos a 100°C. Estas amostras de proteínas foram cuidadosamente pipetadas em cada tubo e a corrida eletroforética, com uma corrente elétrica de 10 mA por tubo, teve duração de 4 horas e foi realizada à temperatura ambiente.

A coloração dos géis foi realizada durante 2 horas com uma solução contendo 1,25 g de “Coomassie Brilliant Blue” em uma mistura de 454 mL de metanol 50% e 46 mL de ácido acético glacial. A descoloração foi obtida após lavagens sucessivas em uma solução contendo 75 mL de ácido acético glacial, 50 mL de metanol e 875 mL de água deionizada.

### **3.2.5 Estudos Eletroforéticos**

#### *a) Eletroforese em condições nativas: pH 4,3*

Foi realizada conforme descrito por Reisfeld *et al.* (1962), utilizando-se o tampão acetato pH 4,3 no gel de separação. A eletroforese em disco foi realizada em uma coluna de gel de poliacrilamida 7,5%. As condições de preparo do gel, bem como das soluções, são essencialmente as descritas por Reisfeld *et al.*

(1962). A eletroforese foi executada aplicando-se uma corrente de 2,5 mA por tubo, até que o marcador (“front”) estivesse próximo da extremidade inferior do gel. A corrida foi realizada em banho de gelo. Ao final, os géis foram imediatamente removidos do tubo de vidro com o auxílio de uma seringa, onde a agulha foi passada suavemente entre o gel e a parede do vidro, em movimentos circulares, tomando o cuidado de não quebrar o gel, ao mesmo tempo em que se injetou uma fina camada de água ou tampão de corrida entre o gel e o tubo.

Os géis foram corados como descrito por Vesterberg (1972). A solução corante era constituída de 0,3 g de “Coomassie Brilliant Blue”, dissolvido em uma solução contendo 75,0 mL de metanol, 186,0 mL de água deionizada e, em seguida foram adicionados 9,0 g de ácido sulfosalicílico e 30,0 g de ácido tricloroacético. O tempo de coloração foi de 1 a 2 horas. Ao final deste período os géis foram descorados por lavagens em solução contendo 80,0 mL de ácido acético, 250 mL de etanol e 650 mL de água deionizada, de acordo com Vestberg (1972).

A estocagem dos géis se deu em uma solução de ácido acético 7% dentro de tubos longos e de pequeno diâmetro, com tampa plástica de rosca.

#### *b) Eletroforese em condições nativas: pH 8,9*

Foi realizada conforme descrito para a eletroforese em condições nativas no pH 4,3, mas foi usado o tampão Tris, pH 8,9 no gel de separação.

### **3.2.6 Estudos Cinéticos**

Com a enzima purificada, realizaram-se vários 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.).

### ***3.2.6.1 Efeito do tempo de incubação***

A atividade enzimática foi determinada nas condições de ensaio descritas (3.2.2.1), com exceção do tempo de paralisação da reação, que variou de 0 a 40 minutos. Para cada tempo foi feito um controle, sendo que neste tubo o hidróxido de sódio foi adicionado antes da adição da enzima.

### ***3.2.6.2 Efeito da concentração da enzima***

A atividade enzimática foi determinada como descrito em 3.2.2.1, utilizando-se diferentes concentrações da enzima (de 11,64 a 873  $\eta$ g).

### ***3.2.6.3 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 M. Os tampões 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 conforme descrito em 3.2.2.1.

### ***3.2.6.4 Efeito da temperatura e determinação da energia de ativação ( $E_a$ )***

A atividade enzimática foi determinada como descrito em 3.2.2.1, utilizando-se um tempo de reação de 5 minutos em temperaturas variando entre 0 e 67°C.

A  $E_a$  da reação de hidrólise do pNPP (5mM) pela enzima foi determinada através do gráfico de Arrhenius:  $\log k \times 1/T$  ( $K^{-1}$ ), onde  $k$  é a velocidade máxima nas diferentes temperaturas, expressa em UE ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). No gráfico de Arrhenius, inclinação =  $-E_a/2,3R$ , onde  $R=8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

### ***3.2.6.5 Estudo de especificidade***

A atividade da PTP de BMr de fígado de carneiro sobre alguns compostos fosforilados foi determinada dosando o fosfato liberado no meio de reação como descrito em 3.2.2.2. A atividade sobre o pNPP foi considerada como 100%.

Os compostos fosforilados testados na concentração de 5,0 mM foram: FMN, Tyr-P, pNPP, PPI, Ser-P, Piridoxal-5-P,  $\alpha$ -glicero-P,  $\beta$ -glicero-P, D-glicose-6-P, ácido-6-fosfogluconico, ATP, AMP,  $\alpha$ -naftil-P e  $\beta$ -naftil-P.

### ***3.2.6.6 Determinação dos parâmetros cinéticos***

Os parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) da reação catalisada pela PTP de BMr do fígado de carneiro foram determinados utilizando-se como substratos pNPP, FMN, Tyr-P e  $\beta$ -naftil-P, nos pHs 5,0 e 7,0. Também foi usado o acetil-fosfato como substrato, mas apenas no pH 5,0. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculados através do ajuste dos pontos pela equação da hipérbole retangular (Programa Origin, v. 4.1).

### ***3.2.6.7 Efeito da BSA na diluição***

A diluição da PTP de BMr do fígado de carneiro foi feita com concentrações de BSA variando entre 0 e 10 mg/mL, ou seja, a razão moles BSA/moles enzima variou entre 0 e 9,77. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito em 3.2.2.1, utilizando um tempo de reação de 20 minutos. A atividade na ausência de BSA foi tomada como 100%. Também foram calculados os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  na presença (0,1%) e ausência de BSA, utilizando-se o pNPP como substrato, conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1).

### **3.2.6.8 Efeito da BSA no meio de reação**

A atividade da PTP de BMr do fígado de carneiro foi determinada conforme descrito em 3.2.2.1, com exceção da adição de albumina no meio de reação em concentrações variando entre 0 e 5 mg/mL. A enzima foi diluída em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e o tempo de reação foi de 20 minutos. A atividade na ausência de BSA foi tomada como 100%.

### **3.2.6.9 Efeito da BSA na Ea para a hidrólise do pNPP**

A atividade enzimática foi determinada como descrito em 3.2.2.1., com exceção do tempo de paralisação da reação que variou de 1 a 20 minutos. Foram feitas quatro séries de experimentos, nas temperaturas de 35 e 45 °C, e na presença ou ausência de BSA no meio de diluição da enzima na concentração de 0,1%.

A Ea da reação de hidrólise do pNPP (5,0 mM) pela PTP de BMr do fígado de carneiro foi determinada na presença de BSA 0,1% no meio de diluição, ou na sua ausência, utilizando-se a forma integrada da equação de Arrhenius:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{Ea}{2,3R} \left( \frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right)$$

Nesta equação, as constantes de velocidade  $k_1$  e  $k_2$  correspondem à inclinação das retas de V (UE) contra tempo de incubação (minutos), nas temperaturas de 308K ( $T_1$ ) e 318K ( $T_2$ ), respectivamente, e  $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

### **3.2.6.10 Efeito de compostos na atividade**

O efeito de diversos compostos na atividade da PTP de BMr do fígado de carneiro foi verificado como descrito (item 3.2.2.1), utilizando um tempo de

reação de 20 minutos. A atividade na ausência do composto foi tomada como 100%.

Os compostos utilizados foram: sacarose (15 mM), glicose (15 mM), lactose (15 mM), Triton X-100 (0,2%), SDS (1 mM), guanosina (1 mM), adenosina (1 mM), DTT (1 mM), G-SH (1 mM), EDTA (5 mM), 2-mercaptoetanol (1mM) e ácido úrico (1 mM).

#### ***3.2.6.11 Efeito de metais na atividade***

O efeito de diversos metais na atividade da PTP de BMr do fígado de carneiro foi verificado como descrito em 3.2.2.1, a 37°C, por 20 minutos.

Os metais utilizados foram:  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+}$  e  $\text{Ag}^{+}$  (todos a 1 mM).

#### ***3.2.6.12 Efeito de potenciais inibidores***

O efeito de diversos potenciais inibidores da atividade da PTP de BMr do fígado de carneiro foi verificado como descrito em 3.2.2.1, utilizando um tempo de reação de 20 minutos. A atividade na ausência do inibidor foi tomada como 100%.

Os inibidores testados foram: piridoxal-5-P (0,1, 0,5 e 1 mM), tartarato (1 e 10 mM), fluoreto (1 e 10 mM), fosfato (1, 5 e 10 mM), molibdato (0,01, 0,05 e 0,1 mM), pCMB (0,001, 0,01 e 0,1 mM) e vanadato (0,01, 0,05 e 0,1 mM).

#### ***3.2.6.13 Estudo dos mecanismos de inibição***

O tipo e as constantes de inibição ( $K_i$ ) para o Pi, 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 competitiva, não-

competitiva, mista ou incompetitiva. 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* concentração do inibidor). O intercepto no eixo x corresponde ao valor de  $K_i$  em módulo.

Na inibição mista, as retas do gráfico de Lineweaver-Burk se interceptam no 2° quadrante, e indicam a existência de 2 constantes de inibição, uma constante de inibição competitiva ( $K_{ic}$ ) e uma constante de inibição incompetitiva ( $K_{ia}$ ). A primeira é determinada através do intercepto das retas no gráfico de  $1/V$  *versus* concentração do inibidor, 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* concentração do inibidor, também determinados em duas ou mais concentrações distintas do substrato (Cornish-Bowden, 1995).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Purificação da Enzima*

A PTP de BMr de fígado de carneiro (2,0kg) foi purificada cerca de 1350 vezes, com uma atividade específica de 81,18 UE/mg de proteína e um rendimento de 2,6%. Nosso rendimento foi um pouco menor em relação a dados encontrados na literatura (Caselli et al., 1994a), mas vale a pena ressaltar que estes autores utilizaram cromatografia de afinidade, que sabemos aumentar o rendimento, mas tem um custo elevado. Devemos ressaltar ainda que realizamos estudos com inibidores (tartarato e pCMB) em todas as etapas da purificação e similarmente ao descrito por Fujimoto *et al.* (1984) encontramos uma atividade fosfatásica de BMr em torno de 40-50% da atividade total no extrato. Assim, a recuperação da fosfatase ácida de BMr em relação àquela existente no extrato seria, aproximadamente, de 6%. Em estudos feitos previamente observamos que um rendimento melhor é obtido quando se utiliza o fígado fresco. A purificação da enzima pôde ser concluída em 4 dias de trabalho ininterrupto. A tabela I mostra um resumo dos passos fundamentais para o processo de purificação.

O pH de extração da fosfatase ácida foi estabelecido em 5,0, e a relação entre o volume de tampão/grama de tecido em 4:1 em função da experiência anteriormente adquirida pelo laboratório no estudo da fosfatase ácida e dos relatos da literatura. Utilizando-se esta relação de 4:1 obtinha-se com regularidade uma atividade enzimática de cerca de 0,7 U/mL no extrato, o que correspondia, em média, a 2,7 UE/grama de tecido de fígado bruto, com uma AE de 0,06 UE/mg de proteína (Tabela I). A quantidade de proteína no extrato correspondia a aproximadamente 4,5% da quantidade de fígado utilizado.

A etapa de fracionamento com sulfato de amônio apresentou, em média, cerca de 9% de perda na atividade enzimática da fosfatase ácida em relação ao

extrato, sem contudo promover aumento significativo na AE. Em experimentos prévios fizemos precipitação isoelétrica com a finalidade de se reduzir a quantidade de proteína total para facilitar a cromatografia que seria feita a seguir, evitando-se a deposição de proteínas insolúveis na resina, mas observamos uma grande perda de atividade enzimática (cerca de 60% em relação ao extrato) e por isto optamos por não mais realizar a precipitação isoelétrica, pois a clarificação realizada antes da aplicação da amostra na resina de SP-Sephadex foi suficiente para remover grande quantidade de proteínas insolúveis .

Em experimentos prévios, quando não fazíamos diálise, observávamos que apenas uma pequena quantidade de enzima ficava retida na resina SP-Sephadex (no máximo 200 UE). Realizando a diálise contra um tampão contendo sulfato de amônio 0,1M tínhamos a certeza de que a amostra estaria com a mesma força iônica que a resina, que havia sido equilibrada com tampão contendo sulfato de amônio 0,1M . Isto nos permitiu conseguir a retenção de 993 UE na primeira cromatografia em SP-Sephadex, embora a AE não tenha aumentado tanto (Tabela I).

O perfil cromatográfico obtido na primeira cromatografia em SP-Sephadex (Figura 1) evidenciou a existência de dois picos de atividade fosfatásica. O primeiro pico ("pool" I) corresponde à proteína não retida na coluna e segundo experimentos por nós realizados (dados não mostrados) e de conformidade com relatos de outros autores (Taga, 1979) corresponde à fosfatase ácida de AMr em função da sensibilidade ao tartarato e relativa insensibilidade ao pCMB, característica desta classe de fosfatase ácida (Fujimoto *et al.*, 1984). A eluição com o tampão fosfato permitiu a obtenção de um outro pico ("pool II"), altamente definido e coincidente com o pico de proteína. Um estudo com os inibidores tartarato e pCMB (dados não apresentados) nos revelou que a atividade do "pool" II era resistente ao tartarato (atividade residual de 100%) e sensível ao pCMB (atividade residual de 1,5%), reforçando que o "pool" II consistiria de uma

fosfatase ácida de BMr. Este passo mostrou um rendimento aproximado de 19% em relação ao extrato (Tabela I).

A recromatografia do "pool" II em SP-Sephadex (Figura 2) mostrou-se bastante efetiva, proporcionando um grande aumento na atividade específica da enzima (cerca de 40 vezes em relação à cromatografia anterior), devido à grande redução na concentração proteica em relação à menor redução na atividade enzimática total. A atividade específica por nós obtida (7,102 UE/mg proteína) nesta etapa foi similar àquela descrita por Baxter and Suelter (1985) para as formas A e B da FAc de BMr do músculo peitoral de aves, embora Granjeiro (1994) tenha relatado nesta etapa uma AE de 100 UE/mg proteína para a PTP de BMr do rim bovino.

A filtração em Sephacryl S-200 (Figura 3) elevou a atividade específica para cerca de 82 UE/mg proteína e pudemos observar um pico de atividade coincidente com o pico de proteína.

#### ***4.2 Determinação da Massa Molecular Relativa***

A Mr da enzima pura foi determinada por filtração em Superdex HR 200 10/30. O cálculo da Mr foi obtido através do gráfico do semi-log de Mr x  $K_{AV}$ , sendo o  $K_{AV}$  obtido através da seguinte equação:

$$K_{AV} = \frac{V_r - V_o}{V_c - V_o}$$

onde,  $V_r$  = volume de retenção da amostra;

$V_o$  = volume morto da coluna;

$V_c$  = volume da coluna (24 mL).

O  $V_0$  e o  $V_c$  foram obtidos, respectivamente, através do volume de retenção do Azul de Dextrana (9,2 mL) e do manual de especificações técnicas do fabricante da coluna.

O perfil do cromatograma exhibe um pico de proteína único e simétrico (Figura 4), sendo que a atividade monitorada nestas frações mostrou-se coincidente com o pico de proteína (dados não mostrados), o que denota o alto grau de pureza da enzima.

A regressão linear dos pontos obtidos no gráfico do semi-log  $M_r$  contra  $K_{AV}$  (Figura 5), nos permitiu estimar a  $M_r$  em 17,36 kDa.

A  $M_r$  da PTP também foi determinada através da mobilidade da enzima em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, verificando-se a presença de uma única banda bem definida, mesmo em presença de concentrações crescentes de proteína (Figura 6), o que também evidencia a homogeneidade da amostra. A regressão linear dos pontos obtidos no gráfico do semi-log da  $M_r$  contra a mobilidade eletroforética relativa nos permitiu calcular a  $M_r$  da PTP em 18,3 kDa (Figura 7). A mobilidade foi calculada a partir da seguinte equação:

$$Mobilidade = \frac{\text{Distancia proteina}}{\text{Distancia fronte}}$$

Analisando estes resultados conjuntamente, podemos afirmar que a proteína consiste de uma única cadeia polipeptídica, e a amostra purificada encontra-se altamente homogênea. É interessante destacar que obtivemos  $M_r$  muito semelhantes pelos dois métodos de cálculo, ou seja, tanto por filtração em gel quanto por SDS-PAGE. Na literatura há vários trabalhos que relatam uma  $M_r$  bem menor, em torno de 13-14 kDa, quando calculada por filtração em gel (Zhang and Van Etten, 1990; Laue and Rhodes, 1990; Granjeiro *et al.*, 1997a), o que os autores atribuem ao fato de que estes métodos não sejam tão precisos para a determinação da  $M_r$ . Granjeiro *et al.* (1997a) utilizaram a coluna da filtração em

gel Superdex HR 70 10/30, enquanto que nós utilizamos a Superdex HR 200 10/30, que se mostrou melhor para resolver  $M_r$  de tais ordens.

### **4.3 Estudos Eletroforéticos**

A análise através da eletroforese em condições não desnaturantes permitiu detectar a presença de apenas uma banda proteica (Figura 8, gel A, pH 8,9; gel B, pH 4,3) quando utilizamos o método descrito no item 3.2.5 em pH 4,3. Convém destacar que fizemos a eletroforese no pH 8,9 baseados em dados da literatura que mostram valores de  $pI$  em torno de 7,0 (Waheed *et al.*, 1988; Zhang and Van Etten, 1990). Esperávamos, assim, que no pH 8,9 a enzima estivesse carregada negativamente o suficiente para ter uma boa migração. A pequena mobilidade encontrada, entretanto, parece indicar que o  $pI$  da PTP de BMr do fígado de carneiro seja um pouco mais alto em relação ao relatado na literatura. Esta dúvida poderia ser solucionada através de focalização isoeletrica, que não foi objetivo do nosso trabalho.

### **4.4 Estudos Cinéticos**

#### **4.4.1 Efeito do Tempo de Incubação**

A reação de hidrólise do p-NPP pela PTP de BMr do fígado de carneiro exibe uma relação de proporcionalidade entre a quantidade de produto liberado e o tempo de incubação, a qual se mantém com certeza até 30 minutos de incubação (Figura 9). A partir deste ensaio, os demais experimentos foram realizados com um tempo de incubação de 20 minutos e com uma diluição da enzima tal que proporcionasse leituras de absorbância a 405 nm entre 0,2 e 0,8. Nestas condições, ocorre um consumo de cerca de 5% do substrato, o que garante que a reação procede, durante todo o ensaio, em condições saturantes.

#### 4.4.2 Efeito da Concentração da Enzima

Estudando a influência da concentração da enzima na velocidade da reação, encontramos uma correlação linear entre a concentração de enzima e a concentração de produto formado até 873  $\eta$ g, correspondendo a 1,95 unidades de absorvância a 405 nm (Figura 10).

#### 4.4.3 Efeito do pH

Através do estudo da influência do pH na atividade enzimática (Figura 11) sob as condições padrão de ensaio, verificamos que a atividade ótima ocorre no pH 5,5. Este achado é similar ao encontrado por Granjeiro (1994) para a FAc de BMr de rim bovino, só que neste caso observou-se que nos valores de pH entre 3,0 e 5,5, a variação na quantidade de produto liberado é mínima (aproximadamente 10% entre o pico e os extremos), evidenciando muito mais um platô de atividade do que um pH ótimo, o que foi relatado também por outros autores (Heinrikson, 1969; Chaimovich and Nome, 1970; Saeed *et al.*, 1990; Buzalaf, 1995), embora alguns deles tenham observado esta faixa ótima de pH um pouco mais deslocada para o meio neutro (pH de 5,0 a 6,0). No nosso caso, para valores de pH menores que 4,5 e maiores que 6,0 a atividade foi sempre menor que a metade daquela encontrada para o pH 5,5. Outro aspecto que convém ressaltar é a baixa atividade encontrada nos valores de pH 2,5 e 3,0 (menos que 1/10 da atividade no pH 5,5) em tampão glicina, similar ao encontrado para a enzima do pulmão bovino (Buzalaf *et al.*, 1998), mas não coincidente com os relatos de Granjeiro (1994), que encontrou alta atividade nestes pHs para a enzima do rim bovino.

#### 4.4.4 Efeito da Temperatura e Determinação da Ea

A análise do efeito da temperatura na atividade enzimática foi estudado medindo-se a formação do produto (pNP) após 5 minutos de incubação a

diferentes temperaturas (0, 25, 37, 47, 50, 57 e 67°C). O ensaio foi realizado em pH 5,0 e iniciado pela adição de enzima (Figura 12). Num experimento piloto, sem a incubação a 50°C, notamos que a atividade crescia com o aumento da temperatura, atingindo o máximo em 47°C e, a partir daí tínhamos praticamente um platô até 57°C. Então, optamos por fazer um novo experimento, inserindo agora o ponto de 50°C, e, como esperávamos, obtivemos aí o máximo de formação de produto. A partir de 57°C, o gráfico da velocidade em UE em função da temperatura mostra uma queda vertiginosa na velocidade. Tomando-se como referência a velocidade na temperatura de 37°C (100%), observamos que, enquanto a 50°C, a velocidade é 2,4 vezes maior, a 67°C já notamos uma queda acentuada na velocidade, atingindo apenas 42% daquela obtida a 37°C. Por outro lado, a 25°C, a velocidade corresponde a 34% em relação àquela encontrada em temperatura fisiológica. Os estudos para se determinar a temperatura ótima têm sido realizados com maior freqüência em fosfatases ácidas de plantas. Diversos trabalhos têm relatado uma temperatura ótima de 60°C, como Ullah and Gibson, 1988 (cotilédone de soja), De Kundu and Banerjee, 1990 (caule em germinação de *Vigna radiata*), Biswas and Cundiff, 1991 (semente em germinação de *Vigna sinensis*). Apresentando temperaturas ótimas menores há os relatos de Panara; Pasqualini and Antonielli (1990) e Miernyk (1992), que determinaram temperatura ótima de 30°C (cevada) e 50°C (endosperma de milho), respectivamente. Com relação às PTP de BMr, temos os trabalhos de Granjeiro (1994) e Silva (1999), que encontraram temperatura ótima de 60°C (rim bovino) e 57°C (rim de carneiro), respectivamente.

Há poucos trabalhos na literatura relatando valores de  $E_a$  para as PTP de BMr. Neste trabalho obtivemos um valor de  $E_a$  (Figura 12, interno) de 49,674 kJ mol<sup>-1</sup>, semelhante ao resultado mostrado por Zhang and Van Etten (1991), que realizaram estudos de dependência de temperatura para a PTP de BMr do coração

bovino em pHs 5,0 e 7,0, encontrando  $E_a$  de 56,9 e 58,9 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

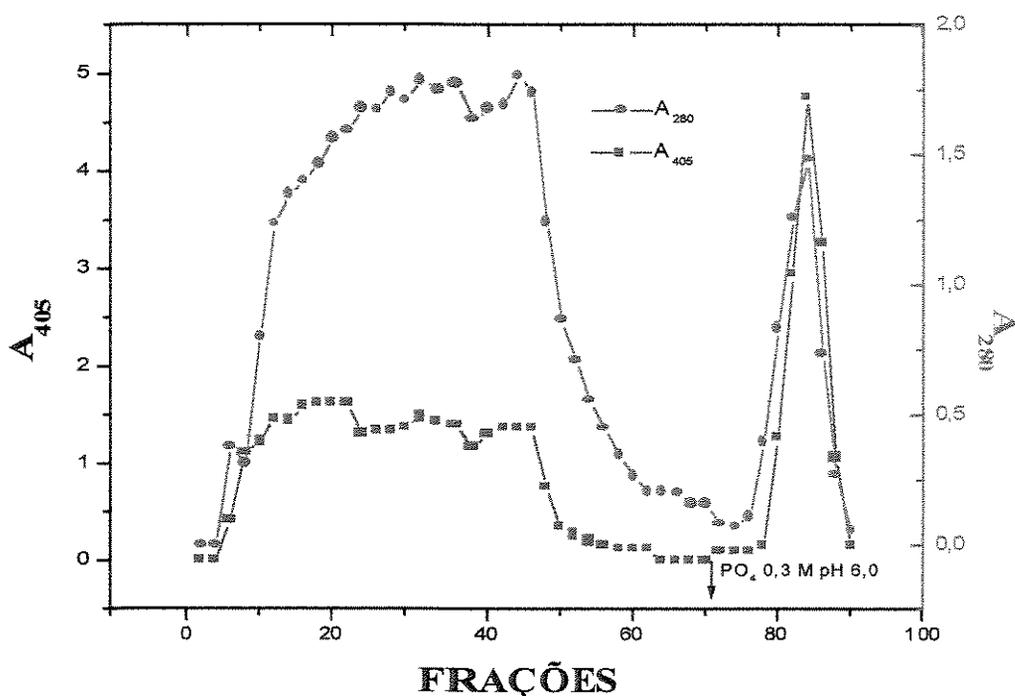
Assim, este conjunto de experimentos serviu, principalmente, para determinar as condições padrão de ensaio a serem empregadas durante a análise das outras características cinéticas da PTP de BMr do fígado de carneiro.

A partir daí, os ensaios posteriores foram realizados utilizando-se um período de incubação variando entre 10 e 30 minutos, com uma concentração de enzima variando entre 69,85 e 1397  $\eta$ g por tubo, dependendo do experimento, sendo mantidos o pH 5,0 e a temperatura de 37°C, escolhida por não promover hidrólise térmica espontânea do substrato em níveis significativos, e por permitir uma melhor comparação com dados da literatura.

**Tabela I - Purificação da FAc de BMr do fígado de carneiro.**

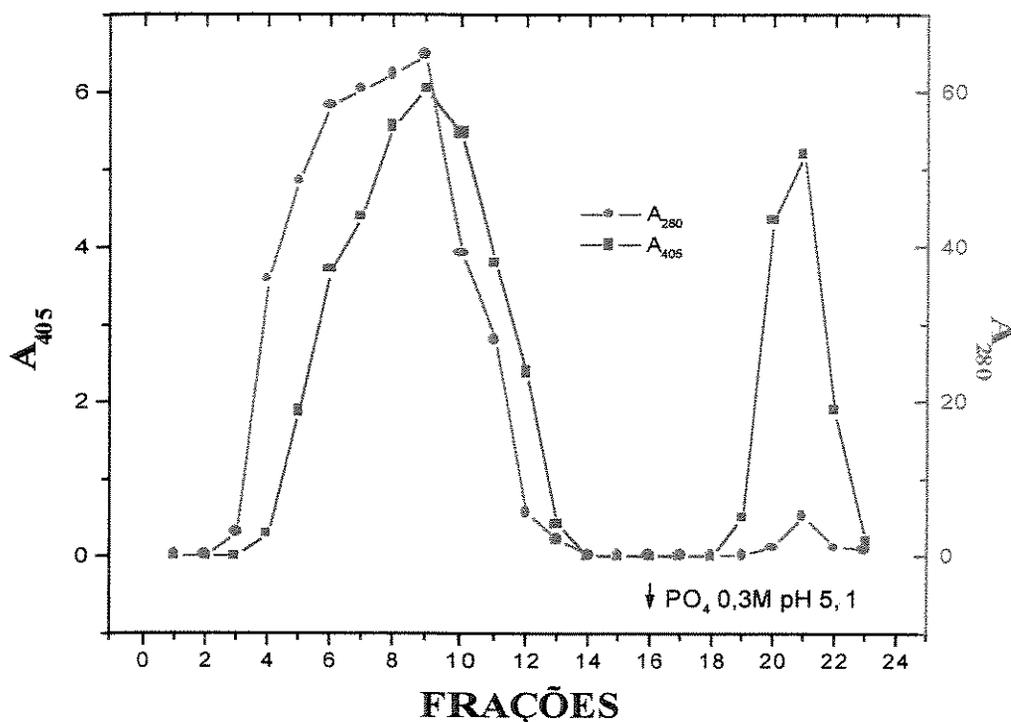
Para a purificação, 2,0 kg de fígado de carneiro foram utilizados.

<b>Fração</b>	<b>Volume (ml)</b>	<b>UE totais</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>AE (UE/mg)</b>	<b>Purificação (vezes)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Extrato</b>	7960	5292	87453	0,06	1,0	100,0
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0-60%</b>	1200	4865	60467	0,08	1,3	92
<b>SP-Sephadex I</b>	55	993	5694	0,174	2,9	18,8
<b>SP-Sephadex II</b>	9	363	51	7,10	118,4	6,8
<b>Sephacryl S- 200</b>	1,5	138	1,7	81,18	1353	2,60



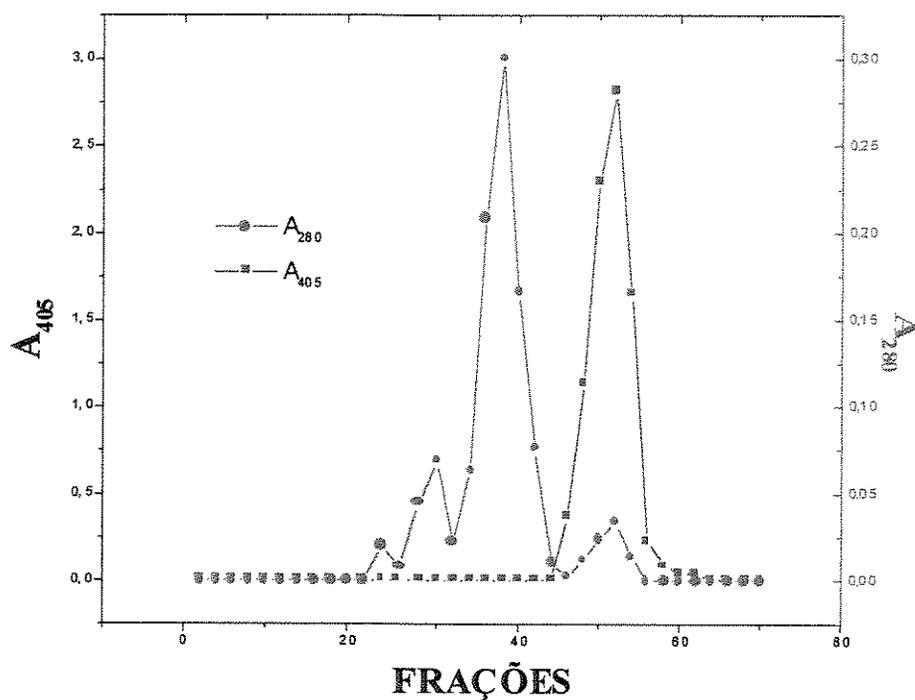
**FIGURA 1. CROMATOGRAFIA EM SP-SEPHADEX-I.**

A amostra ressuspensa e clarificada após a concentração com sulfato de amônio foi aplicada à primeira coluna de SP-Sephadex (4,5 X 16,5 cm), equilibrada com tampão de diálise. Utilizou-se o mesmo tampão para a lavagem da coluna e o tampão fosfato 300mM (pH 6,0) para a eluição, cujo início está indicado pela seta. As frações de 20,0 mL, coletadas sob um fluxo de 4,0 mL minuto<sup>-1</sup>, foram monitoradas a 280 nm para proteína e a 405 nm para atividade. As frações com mais de 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas num "pool" e concentradas com sulfato de amônio a 60% de saturação.



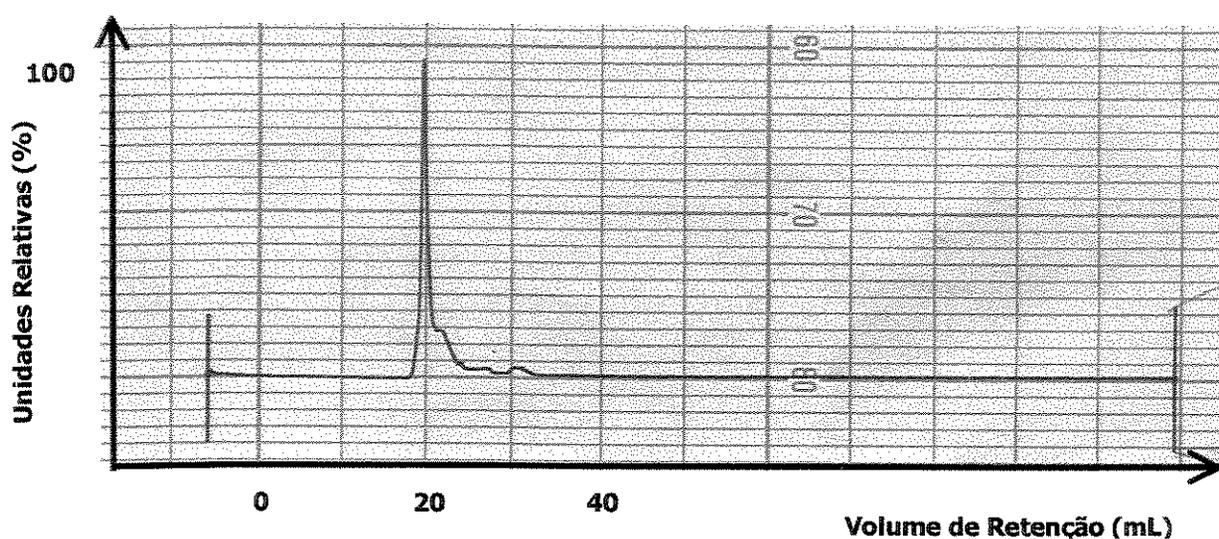
**FIGURA 2. CROMATOGRAFIA EM SP-SEPHADEX – II**

A amostra clarificada após a concentração com sulfato de amônio foi aplicada a uma segunda coluna de SP-Sephadex (3,0 X 20,0cm) equilibrada com tampão acetato 10mM, pH 5,0, contendo sulfato de amônio 100 mM, EDTA 5 mM e 2-mercaptoetanol 0,5 mM. A coluna foi lavada e a atividade eluída conforme descrito na Figura 1. As frações de 12,0 mL, coletadas sob um fluxo de 4,0 ml min<sup>-1</sup>, foram monitoradas a 280 nm para proteína e 405 nm para atividade e, aquelas contendo mais de 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas e concentradas por ultrafiltração sob pressão de nitrogênio.



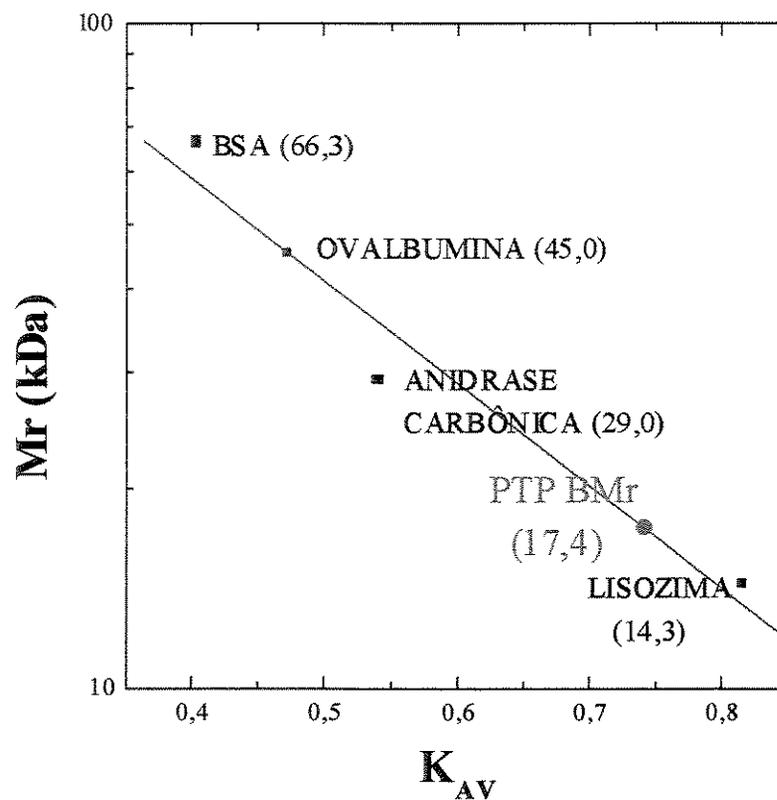
**FIGURA 3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR – SEPHACRYL S-200.**

A fração da etapa anterior (9,0 mL) foi submetida à cromatografia em uma coluna de filtração em gel equilibrada com tampão acetato 100 mM, pH 5,0, contendo fosfato dissódico 50 mM, DTT 0,1 mM e NaCl 500 mM. O fluxo empregado foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. As frações de 13 mL contendo atividade superior a 0,1 UE mL<sup>-1</sup> foram reunidas e concentradas por ultrafiltração.



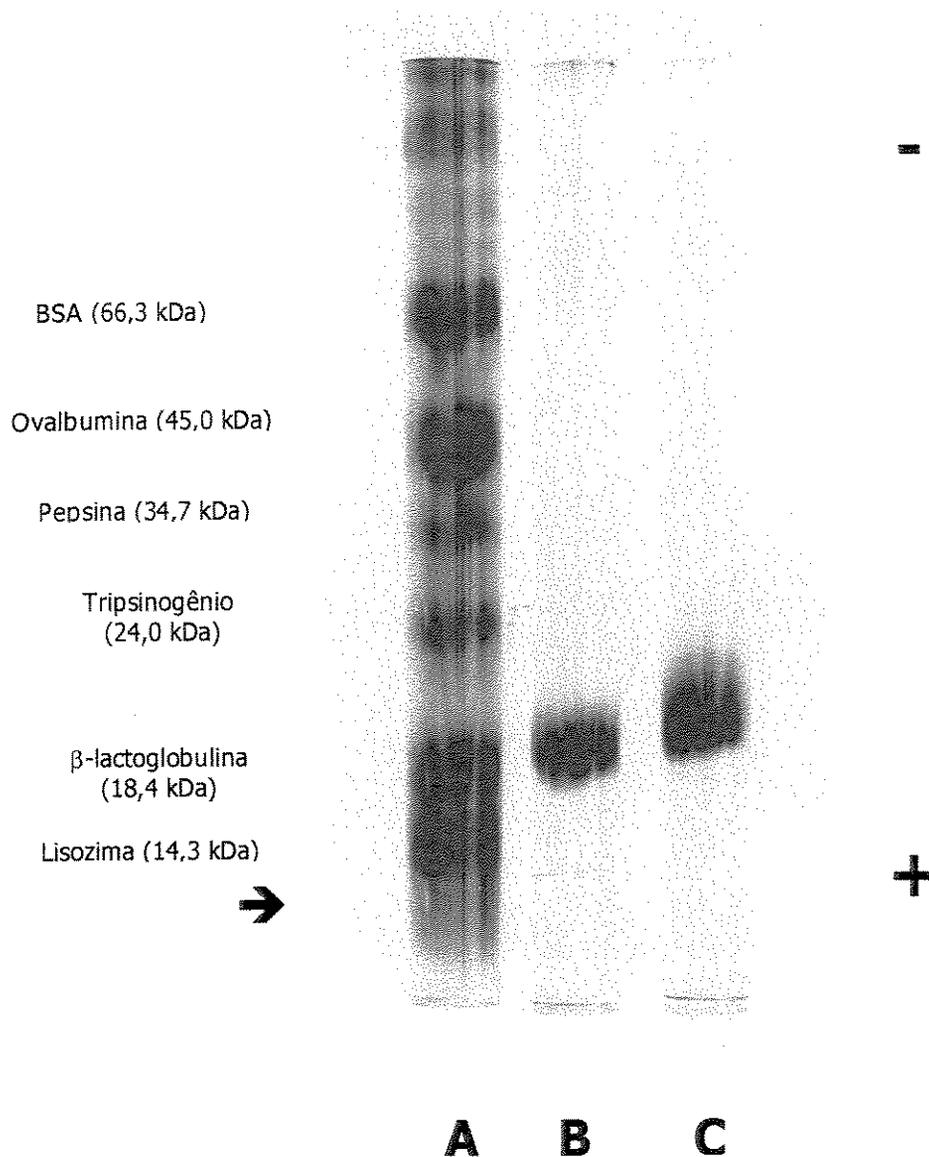
**FIGURA 4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR – SUPERDEX HR 200 10/30.**

Uma alíquota de 50  $\mu\text{l}$  (25,66  $\mu\text{g}$ ) da PTP de BMr de fígado de carneiro nativa foi submetida à cromatografia em uma coluna de filtração em gel equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, contendo NaCl 200 mM. A eluição foi realizada com o mesmo tampão, sob um fluxo de 0,4 mL  $\text{minuto}^{-1}$ . A coluna foi pré-calibrada com as seguintes proteínas de Mr conhecida: Azul de Dextrana (2000,0 kDa), Albumina de Soro Bovino (66,3 kDa), Ovalbumina (45,0 kDa), Anidrase Carbônica (29,0 kDa) e Lisozima (14,3 kDa).



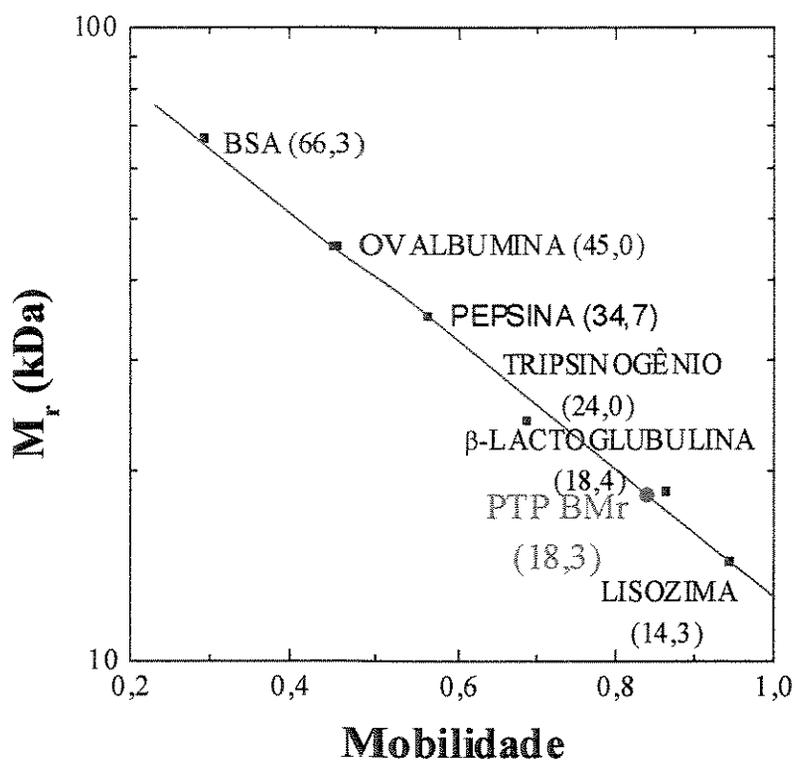
**FIGURA 5. DETERMINAÇÃO DA  $M_r$  DA PTP DE BMR POR FILTRAÇÃO EM GEL.**

A  $M_r$  foi determinada por regressão linear através dos pontos obtidos das coordenadas  $M_r \times K_{AV}$ , este último calculado conforme descrito no texto (Resultados e Discussão 4.2), a partir dos dados da Figura 4. Entre parênteses estão indicadas as  $M_r$  das proteínas (kDa).



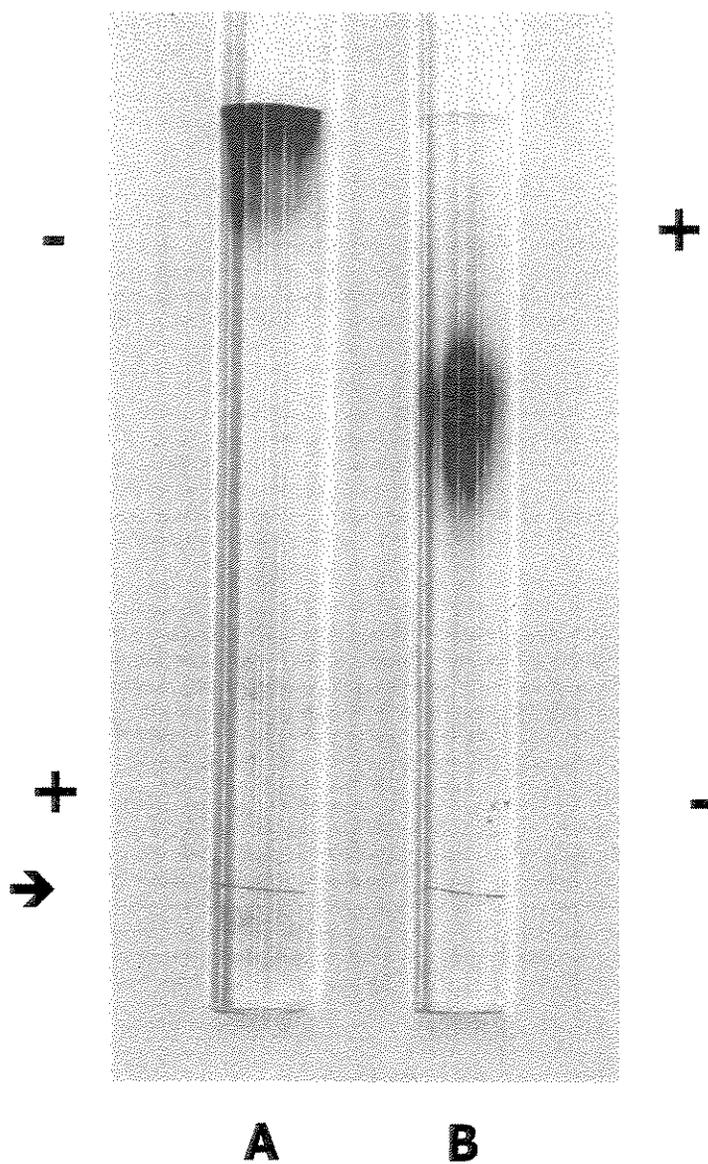
**FIGURA 6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (10%) DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO. CONDIÇÕES DESNATURANTES.**

As condições de corrida são descritas no texto (Material e Métodos 3.2.4.b). No gel A foram aplicados os padrões de Mr, no B, 50 e no C, 100  $\mu$ g de PTP de BMr do fígado de carneiro. (Frente: seta)



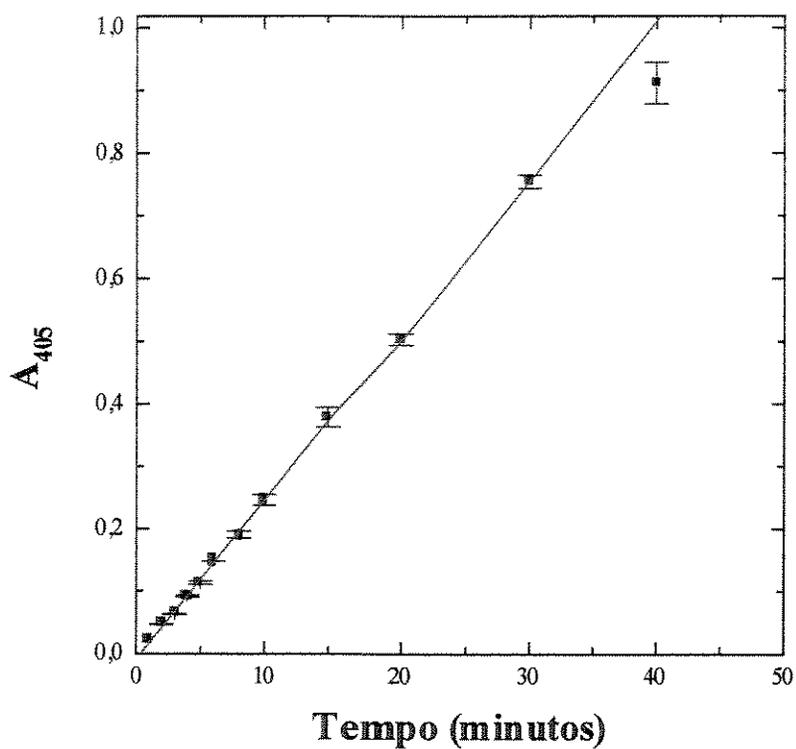
**FIGURA 7. DETERMINAÇÃO DA MR DA PTP DE BMR POR PAGE-SDS.**

A Mr foi determinada por regressão linear através dos pontos obtidos das coordenadas Mr x Mobilidade, conforme descrito no texto (Resultados e Discussão 4.2). Os padrões de Mr utilizados foram: Lisozima,  $\beta$ -Lactoglobulina, Tripsinogênio, Pepsina, Ovalbumina e Albumina de Soro Bovino, cujas Mr (kDa) estão indicadas entre parênteses.



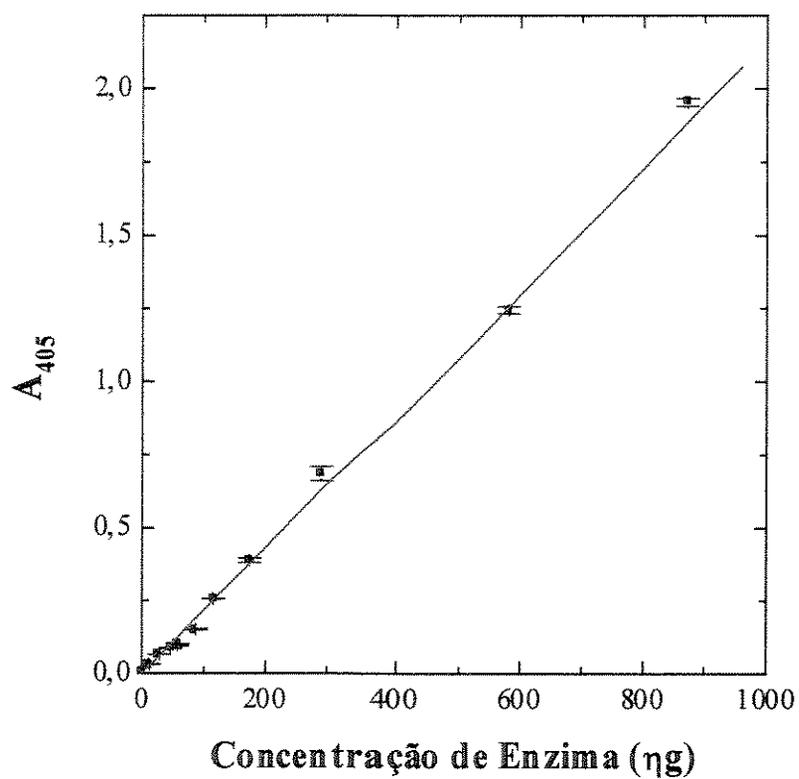
**FIGURA 8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (7,5%) DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO. COLORAÇÃO PARA PROTEÍNA.**

As condições de corrida são descritas no texto (Material e Métodos 3.2.5). A quantidade de proteína aplicada foi de 50  $\mu\text{g}$ . O gel A corresponde ao pH 8,9 e o B, ao 4,3. (Frente: seta)



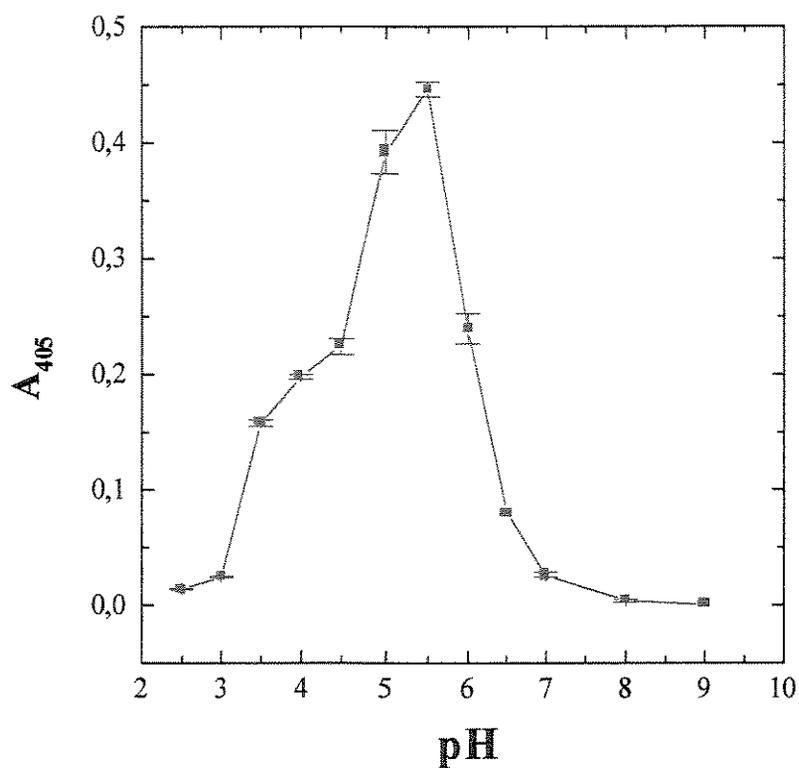
**FIGURA 9. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO.**

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 256  $\eta$ g de enzima.



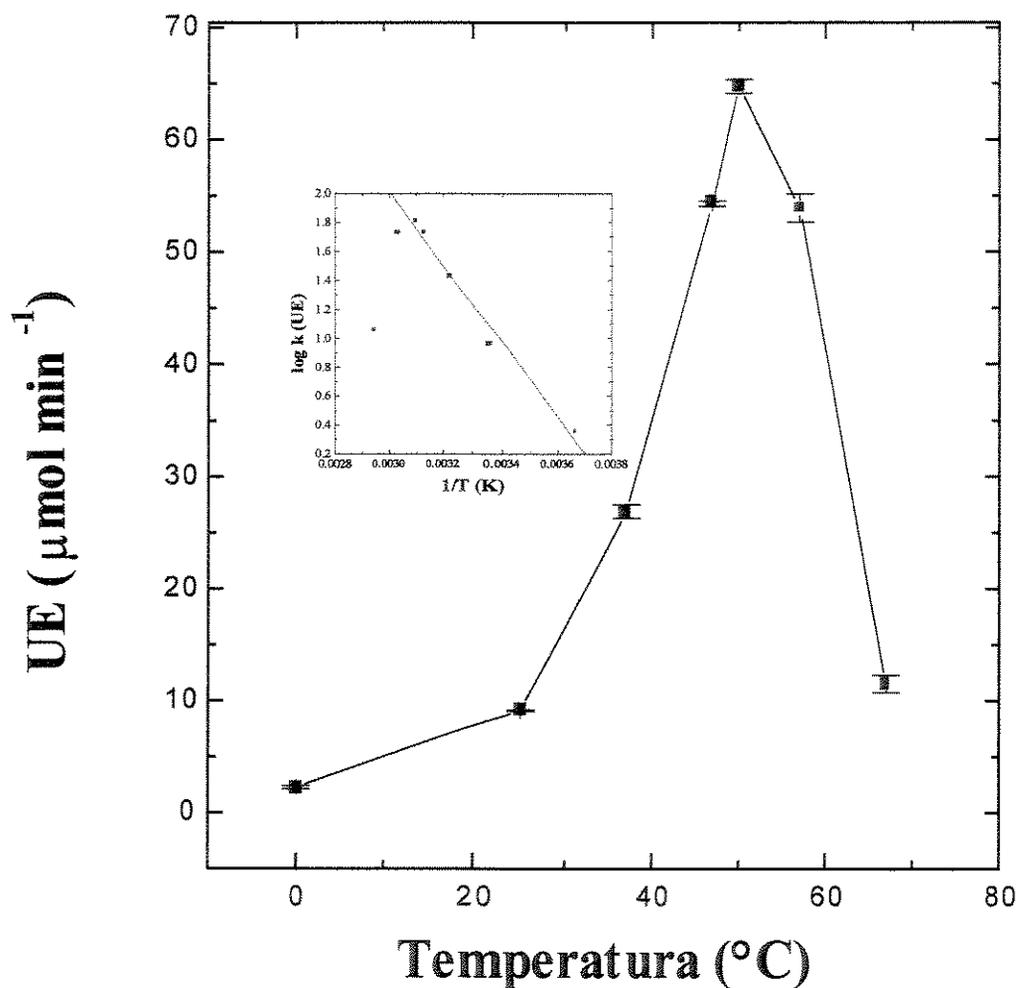
**FIGURA 10. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA ATIVIDADE DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO.**

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. A concentração de enzima variou entre 11,64 e 873 ηg.



**FIGURA 11. INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO.**

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 495  $\eta$ g de enzima. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM 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) e Glicil-Glicina (pH 9,0).

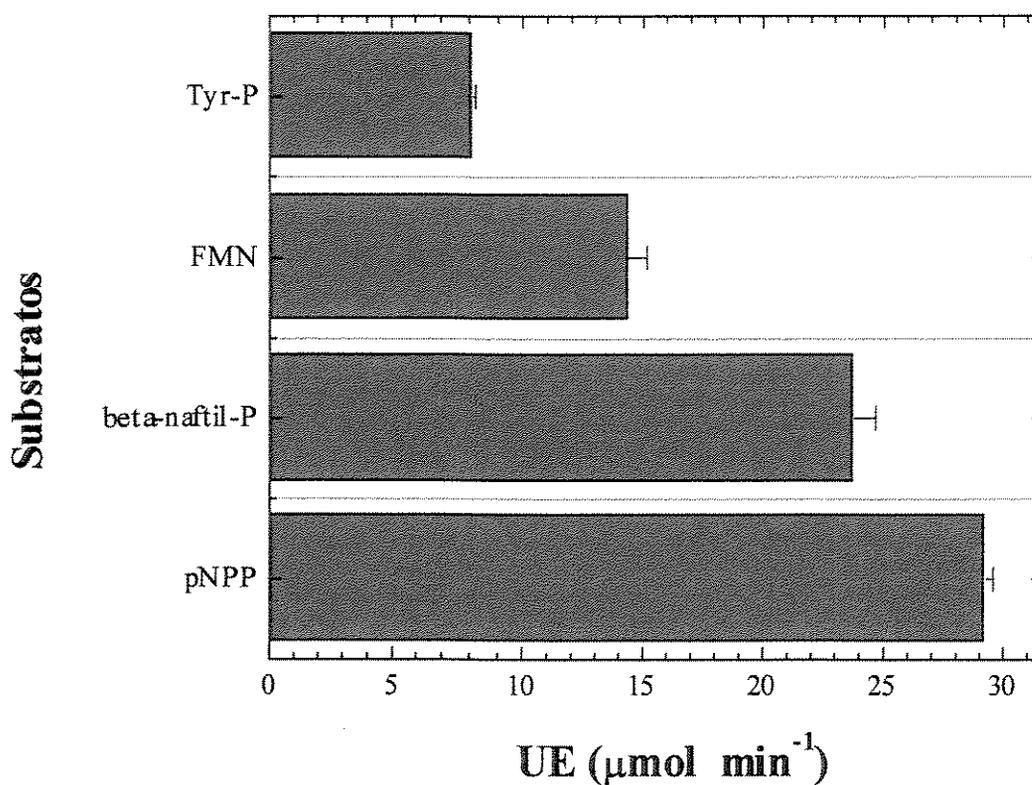


**FIGURA 12. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO.**

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 256,5 ng de enzima. Interno: Gráfico de Arrhenius. A  $E_a$  para hidrólise do pNPP foi calculada como descrito em Material e Métodos (3.2.2.4).

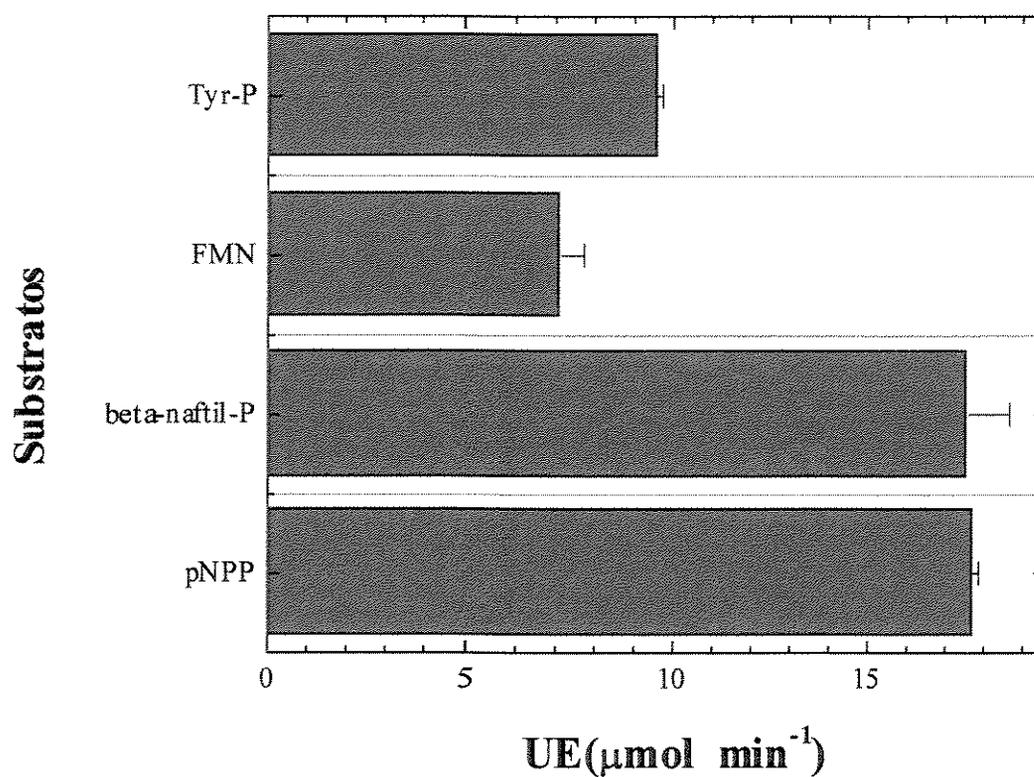
#### 4.4.5 Estudo de Especificidade

A atividade relativa da PTP de BMr do fígado de carneiro sobre diversos substratos fosforilados mostra uma especificidade seletiva. Dos substratos testados, somente houve hidrólise significativa, nos dois valores de pH testados, do pNPP,  $\beta$ -naftil-P, FMN e Tyr-P, sendo estes dois últimos potenciais substratos fisiológicos (Figura 13, pH 5,0 e Figura 14, pH 7,0). Sobre os demais substratos, em ambos os pHs, não houve atividade significativa. Esta especificidade por substratos reforça a hipótese de que há necessidade de o substrato possuir uma estrutura aromática ligada à sua molécula, bem como uma estrutura orgânica específica, como no caso da FMN (Zhang and Van Etten, 1990; Wo *et al.*, 1992). Com relação à FMN, desde o trabalho de Heinrikson, em 1969, vem sendo analisada a capacidade de diversas FAc de BMr de hidrolisar este substrato fisiológico, sem, entretanto, estabelecer-se sua função. Na literatura observamos que a atividade relativa sobre a FMN, tomando-se o pNPP como referência, geralmente gira em torno de 70 a 100% (Heinrikson, 1969; Filburn, 1973; Fujimoto *et al.*, 1984), embora Baxter and Suelter (1985) mostraram que as isoenzimas A e B do músculo peitoral de aves hidrolisavam a FMN numa extensão de cerca de 50%, similarmente ao encontrado por nós. Também é importante notar que as outras formas de FAc, as de AMr e IMr, ou não atuam sobre a FMN ou o fazem em uma taxa significativamente menor que a FAc de BMr (Filburn, 1973; Fujimoto *et al.*, 1984; Janska *et al.*, 1986). O significado fisiológico da especificidade para a FMN ainda não foi completamente elucidado. Taga and Van Etten (1982) sugeriram que talvez a enzima desempenhe o papel de modificar a permeabilidade da FMN, facilitando a sua passagem através das membranas celulares.



**FIGURA 13. ESPECIFICIDADE DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO POR SUBSTRATOS NO PH 5,0.**

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 de 678,7 ng de enzima, e a concentração final dos substratos era 5,0 mM.



**FIGURA 14. ESPECIFICIDADE DA PTP POR SUBSTRATOS NO PH 7,0.**

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 de 1,026 μg de enzima, e a concentração final dos substratos era 5,0 mM.

#### 4.4.6 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

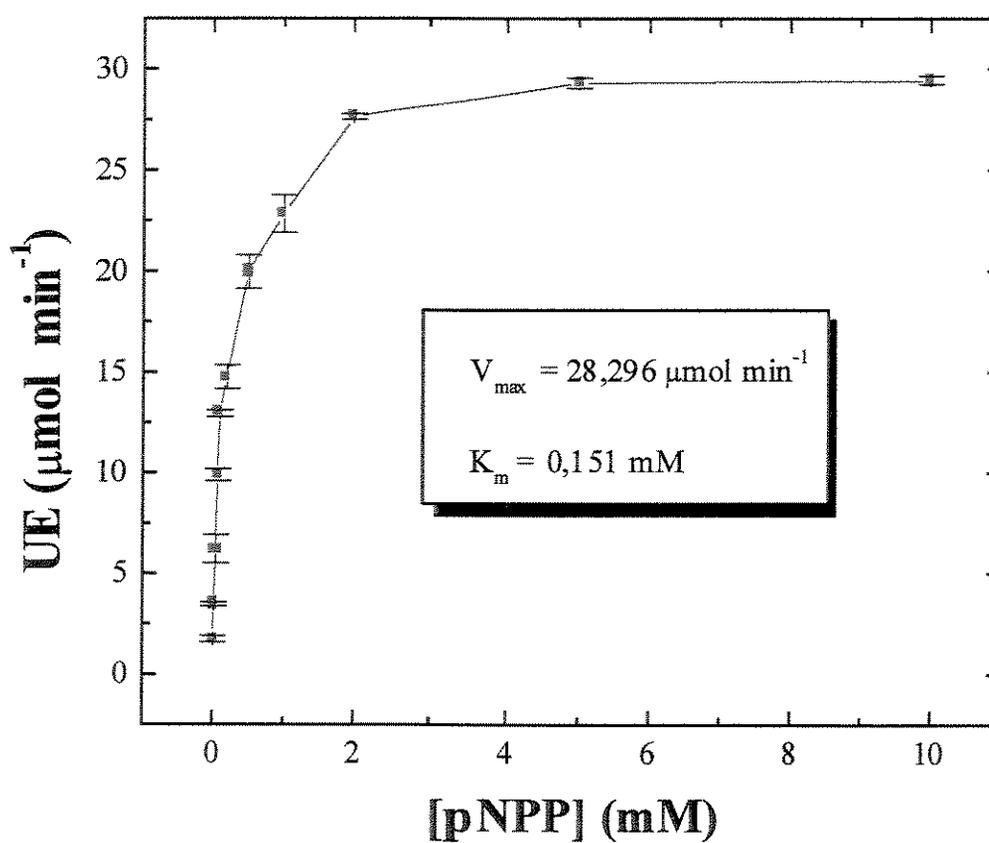
O efeito da concentração do substrato (pNPP) foi analisado utilizando uma concentração entre 0,01 e 10,0 mM. O gráfico da velocidade contra a concentração do substrato mostra uma curva típica de Michaelis-Menten (hipérbole retangular) e podemos notar que o estado estacionário é atingido com uma concentração de pNPP de cerca de 2,0 mM, idêntico ao relatado por Granjeiro (1994). Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  foram obtidos através do ajuste da hiperbole retangular (Figuras 15, pH 5,0 e 16, pH 7,0). A afinidade da FAc de BMr do fígado de carneiro pelo p-NPP, no pH 5,0, é similar à de diversas outras FAc de BMr, conforme pode ser observado na Tabela II, através dos valores de  $K_m$ .

O mesmo procedimento experimental foi realizado para a FMN, Tyr-P e  $\beta$ -naftil-P, sendo os parâmetros cinéticos resumidos na Tabela III. Assumindo  $K_{cat}/K_m$  como uma medida de especificidade, podemos notar que o melhor substrato, embora não potencialmente fisiológico, é o pNPP, no pH 5,0, apresentando uma relação  $K_{cat}/K_m$  cerca de 20 vezes maior em relação aos demais substratos. Já no pH 7,0, a eficiência do pNPP é bastante reduzida, sendo similar à do  $\beta$ -Naftil-P e FMN, ambos no pH 5,0. É interessante notar que a especificidade da enzima pela Tyr-P foi pequena ( $K_{cat}/K_m$  em torno de 2,0) e praticamente a mesma nos dois pHs testados. Sendo a Tyr-P um substrato fisiológico em potencial, seria esperado que sua eficiência fosse alta no pH mais próximo do fisiológico. Entretanto, devemos levar em consideração que em nosso experimento usamos apenas Tyr-P, enquanto que os substratos fisiológicos esperados deveriam ser peptídeos/proteínas contendo fosfotirosina.

O grupo de Ramponi sintetizou vários peptídeos contendo fosfotirosina, derivados do receptor de PDGF, e analisou os parâmetros cinéticos destes substratos frente às isoformas 1 e 2 da PTP de BMr de fígado de rato. De todos os

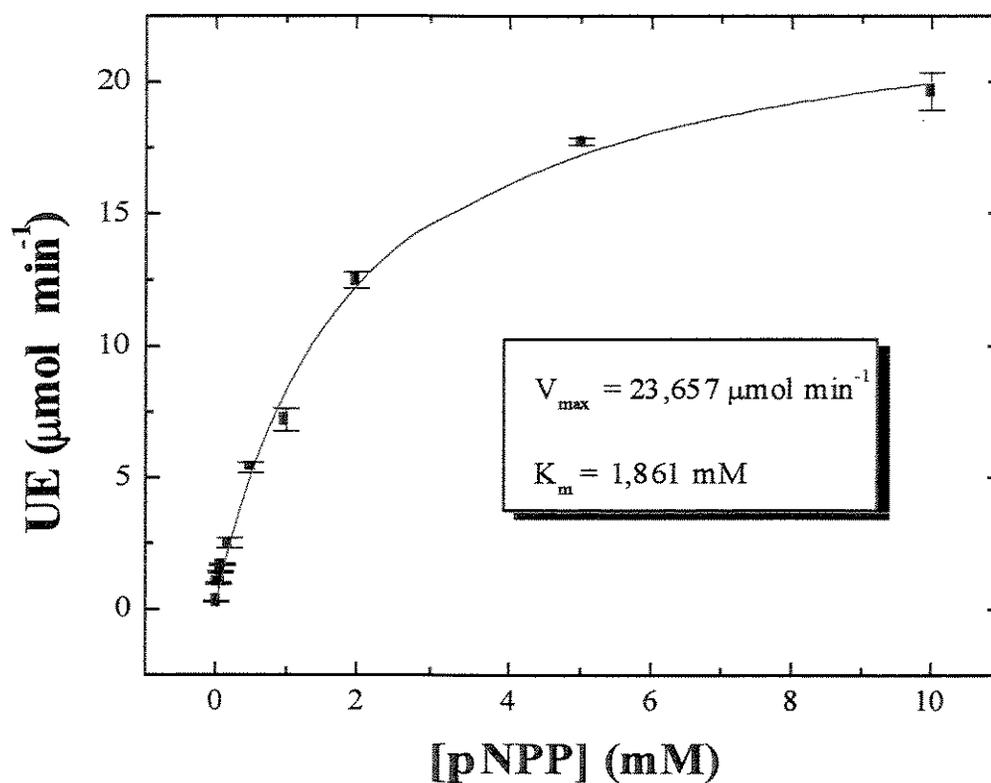
peptídeos sintetizados, apenas um deles, denominado PDGFRP9 se mostrou um bom substrato para a isoforma 2, que hidrolisa melhor peptídeos contendo resíduos hidrofóbicos próximo à fosfotirosina N-terminal. A isoforma 2 apresentou, em relação a este substrato,  $K_m$  de 0,03 mM,  $K_{cat}$  de 26,32 s<sup>-1</sup> e  $K_{cat}/K_m$  de 877,33 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>, para o pH 5,5. Os valores de  $K_{cat}/K_m$  encontrados para os demais peptídeos, em relação à isoforma 2 ficaram entre 0,14 e 15,48, enquanto encontramos um valor de 2,086 no pH 5,0 e 2,199, no pH 7,0. Já para a isoforma 1, nenhum dos peptídeos sintetizados pareceu ser um bom substrato, o que indica que as duas isoformas atuam em substratos fisiológicos diferentes. Os autores reforçam que a preferência da isoforma 2 pelo PDGFRP9 não necessariamente significa que a Tyr-1009, o sítio de fosforilação do receptor de PDGF que correspondente a este peptídeo, seja o sítio preferencial de interação desta isoforma com o receptor, mas indica que os substratos preferenciais da enzima devem possuir um padrão de reconhecimento no qual os resíduos hidrofóbicos próximos à fosfotirosina N-terminal desempenham um papel importante (Bucciantini *et al.*, 1998).

Taga and Van Etten publicaram em 1982 um relato interessante onde mostram que a atividade da FAc de BMr do fígado humano sobre a FMN foi maior que a do pNPP cerca de 3 vezes no pH 5,0, e mais de 7 vezes no pH 7,0. Assumindo  $V_{max}/K_m$  como uma constante de especificidade, os autores encontraram para o pNPP uma relação de 500 no pH 5,0 e de 22,2 no pH 7,0, enquanto para a FMN esta relação foi de 417 no pH 5,0 e de 92,7 no pH 7,0. Estes dados demonstram claramente uma maior especificidade pela FMN no pH 7,0, não relatado para as outras FAc de BMr, inclusive para a enzima do fígado de carneiro por nós purificada, para a qual encontramos uma constante de especificidade no pH 7,0 ligeiramente menor para a FMN, em relação ao pNPP.



**FIGURA 15.** INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO pNPP NA ATIVIDADE DA PTP NO pH 5,0.

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 128  $\eta\text{g}$  de enzima.



**FIGURA 16.** INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO pNPP NA ATIVIDADE DA PTP NO pH 7,0.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1), utilizando o pNPP como substrato, no pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 128  $\eta\text{g}$  de enzima.

**TABELA II.  $K_m$  do p-NPP para Diversas Fosfatases Ácidas Purificadas.**

<b>REFERÊNCIA</b>	<b>FONTE</b>	<b><math>K_m</math> (<math>10^{-4}M</math>)</b>
Chaimovich and Nome, 1970	Cérebro Bovino	0,75
Taga and Van Etten, 1982	Fígado Humano	2,20
Waheed <i>et al.</i> , 1988	Placenta Humana	1,69
Dissing and Svensmark, 1990	Eritrócito Humano	
	Isoenzima Bf	0,37
	Isoenzima Bs	5,30
Saeed <i>et al.</i> , 1990	Coração Bovino	3,80
Zhang and Van Etten, 1990	Coração Bovino	3,80
Granjeiro <i>et al.</i> , 1997a	Rim Bovino	1,42
Buzalaf <i>et al.</i> , 1998	Pulmão Bovino	6,72

**Tabela III. Parâmetros Cinéticos da PTP de BMr do Fígado de Carneiro com Diferentes Substratos.**

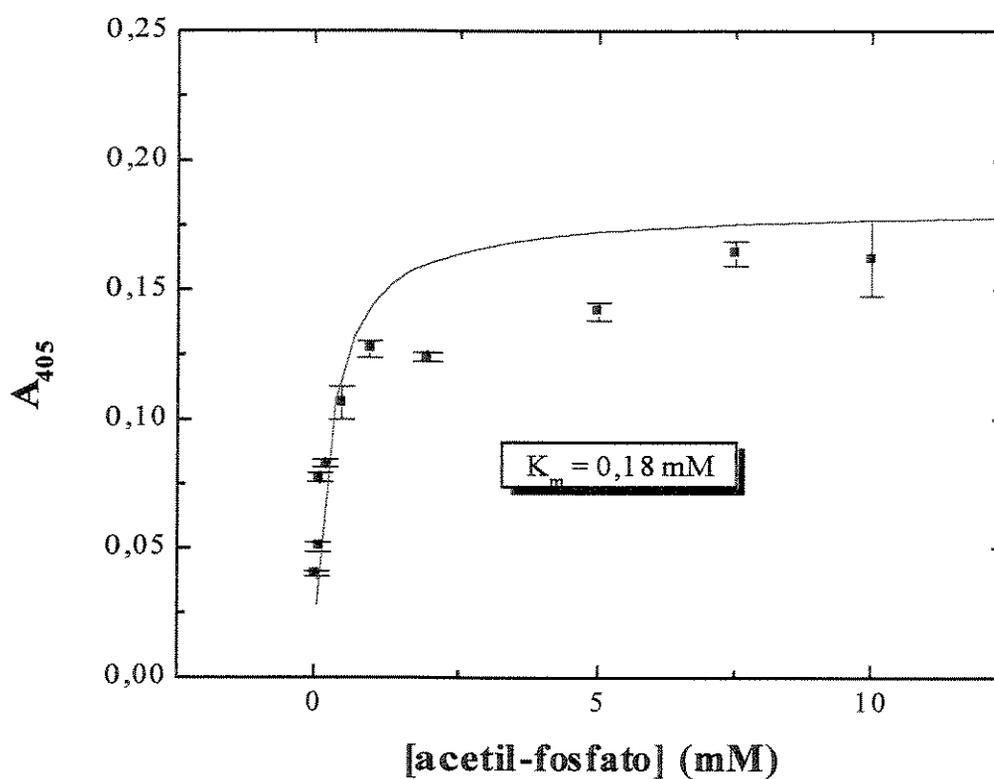
Parâmetros	Substrato							
	pNPP		$\beta$ -Naftil-P		Tyr-P		FMN	
	pH 5,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 7,0
$K_m$ (mM)	0,151	1,861	0,726	4,447	3,873	5,673	0,120	0,11
$V_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	28,296	23,657	26,656	30,578	13,575	20,966	6,096	4,40
$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	66,422	55,493	26,000	25,480	8,080	12,480	3,500	2,00
$K_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \text{mM}^{-1}$ )	439,880	29,818	35,780	5,730	2,086	2,199	29,70	18,7

Também foi testado como substrato o acetil-fosfato. A Figura 17 mostra o efeito da concentração de acetil-fosfato na atividade da enzima no pH 5,0. A concentração de substrato variou entre 0,05 e 10,0 mM. A  $K_m$  obtida a partir do ajuste da hipérbole retangular foi de 0,18 mM, ou seja, a afinidade da enzima pelo acetil fosfato no pH 5,0 foi praticamente a mesma que pelo pNPP, no mesmo pH. Entretanto, a velocidade da reação foi extremamente baixa, sendo que as leituras de absorvância obtidas foram de apenas 1% em relação ao pNPP, exigindo que se trabalhasse com grandes concentrações de enzima. Procuramos realizar este experimento também no pH 7,0, mas a velocidade da reação foi ainda mais baixa, mesmo com elevadas concentrações de enzima, não obedecendo aos padrões de Michaelis-Menten (dados não mostrados).

A acil-fosfatase (EC 3.6.1.7) é uma enzima citosólica que catalisa a hidrólise de acil-fosfatos orgânicos, estando presente nos tecidos de mamíferos em 2 isoformas, muscular e eritrocítica. Assim como as FAc de BMr, sua função biológica ainda não foi elucidada, mas vários estudos mostram que a enzima está envolvida no controle de bombas iônicas em membranas biológicas, uma vez que catalisa a hidrólise do intermediário aspartil-fosfato formado durante a ação de bombas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Dolfi *et al.*, 1993). Outros estudos têm mostrado que a acil-fosfatase controla o fluxo glicolítico, pois sua super-expressão em leveduras provoca um aumento na produção de etanol. Há ainda relatos sugerindo o envolvimento da acil-fosfatase em outros processos celulares importantes, como diferenciação e apoptose (Pieri *et al.*, 1998), pois substâncias que provocam a diferenciação causam super-expressão de isoenzimas de acil-fosfatase e a enzima é capaz de migrar em direção ao núcleo durante a apoptose (Pazzagli *et al.*, 1998).

A atividade da FAc de BMr sobre acil-fosfatos vem sendo motivo de discussão desde 1982, quando Taga e Van Etten encontraram uma atividade significativa da FAc de BMr do fígado humano sobre o acetil-fosfato, embora tenham relatado uma  $K_m$  de 11,9 mM, ou seja, duas ordens de grandeza maior que

aquela encontrada por nós. Os autores chamaram a atenção para as semelhanças entre as FAc de BMr e as acil-fosfatases, com relação à massa molecular relativa, ponto isoelétrico, composição de aminoácidos e capacidade de hidrólise sobre compostos com grupamentos acil-fosfato, como acetil-fosfato, 1,3-difosfoglicerato e benzoil fosfato. Entretanto, existem diferenças entre as enzimas em vários aspectos, pois as acil-fosfatases não hidrolisam pNPP, não são inibidas por íons de metais pesados e provavelmente não têm grupamentos -SH essenciais à catálise. No mesmo trabalho, os autores mostram que a FAc de BMr do fígado humano hidrolisa o acetil-fosfato com uma velocidade 8 vezes maior que a acil-fosfatase purificada a partir de eritrócitos, e tem uma  $K_m$  semelhante à da acil-fosfatase de fígado de porco em relação a este substrato. Assim, sugeriu-se que a FAc de BMr poderia ter um papel na regulação metabólica da célula, em virtude de sua ação sobre o 1,3-difosfoglicerato ou outros acil-fosfatos e que esta ação sobre acil-fosfatos poderia ser uma propriedade geral das FAc de BMr. A importância desta observação reside na possibilidade de os acil-fosfatos poderem ser substratos fisiológicos das FAc de BMr. Entretanto, para a FAc de BMr do fígado de carneiro, no pH 7,0, não conseguimos determinar a  $K_m$  para o acetil-fosfato, devido à baixíssima atividade encontrada, o que põe em dúvida sua participação na hidrólise de acil-fosfatos *in vivo*.



**FIGURA 17. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO ACETIL-FOSFATO NA ATIVIDADE DA PTP NO pH 5,0.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.5), utilizando o acetil-fosfato como substrato, no pH 5,0. A reação foi iniciada pela adição de 848  $\eta\text{g}$  de enzima.

#### 4.4.7 Efeito da BSA no Meio de Reação

Devido ao fato de que quando realizávamos experimentos na presença de BSA, havia uma elevação na atividade enzimática, resolvemos estudar o que poderia estar ocasionando tais resultados. Assim, foram feitos vários experimentos, empregando BSA tanto no meio de reação quanto no meio de diluição da enzima. Quando empregamos BSA no meio de reação, nas concentrações de 0 a 5 mg/mL, observamos que houve um incremento de até 40% na atividade enzimática, principalmente nas concentrações mais baixas (0,1 a 0,5 mg/mL). Entre 0,75 e 2 mg/mL ainda houve um incremento na atividade, embora menor. Já acrescentando-se BSA na concentração de 5 mg/mL, a atividade foi ligeiramente menor em relação ao controle (Figura 18).

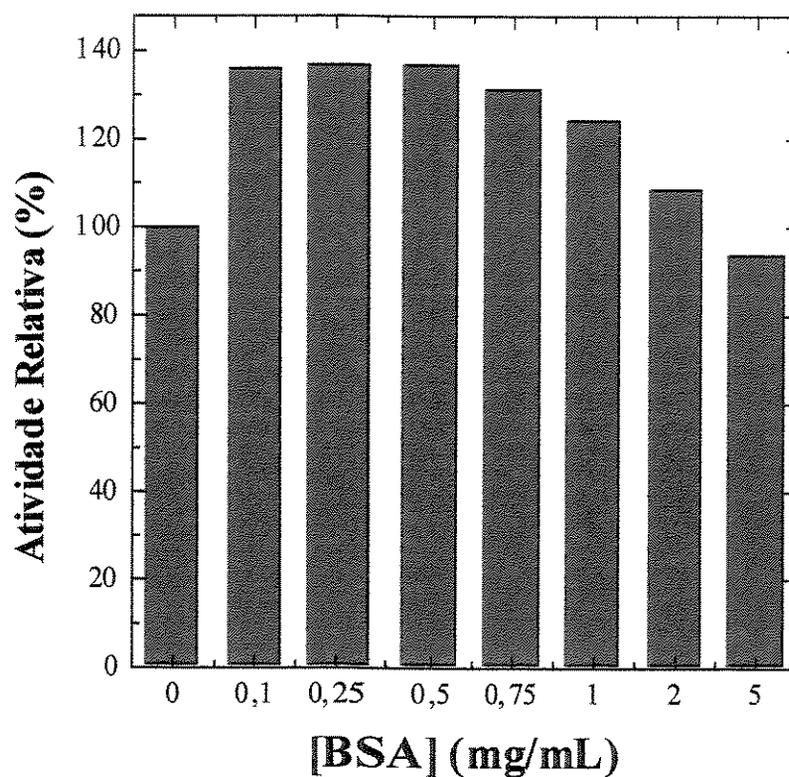
#### 4.4.8 Efeito da BSA no meio de Diluição

Acrescentando-se BSA no meio de diluição, notamos um incremento na atividade enzimática crescente com o aumento da concentração de BSA, parecendo ter havido uma estabilização na concentração de 5 mg/mL (Figura 19). Estimando-se a  $M_r$  da enzima em 18kDa, notamos que a BSA promove um incremento na atividade enzimática na proporção moles BSA/moles enzima de até aproximadamente 2 (Figura 20). Analisando-se os parâmetros cinéticos para a reação enzimática ocorrendo na ausência de BSA, notamos uma ligeira diminuição da  $K_m$  (0,10 mM) e uma diminuição dramática na  $V_{max}$  ( $8,91 \mu\text{mol min}^{-1}$ ), quando comparados com os parâmetros cinéticos na presença de BSA no meio de diluição ( $K_m = 0,151 \text{ mM}$ ,  $V_{max} = 28,296 \mu\text{mol min}^{-1}$ ). Estes resultados sugeriam uma possível ativação pela BSA neste experimento. Entretanto, numa solução proteica diluída, a proteína adsorve-se ao vidro, ocasionando uma redução na atividade. Havendo BSA na solução em maior concentração, ela irá se adsorver preferencialmente, deixando mais enzima livre, provocando um aumento na velocidade. Há então duas alternativas viáveis para se minimizar a adsorção de

enzima ao tubo de ensaio, ou seja, colocação de BSA, sendo que a melhor concentração é a de 1 mg/mL, e utilização de tubos de sílica (Van Etten, comunicação pessoal).

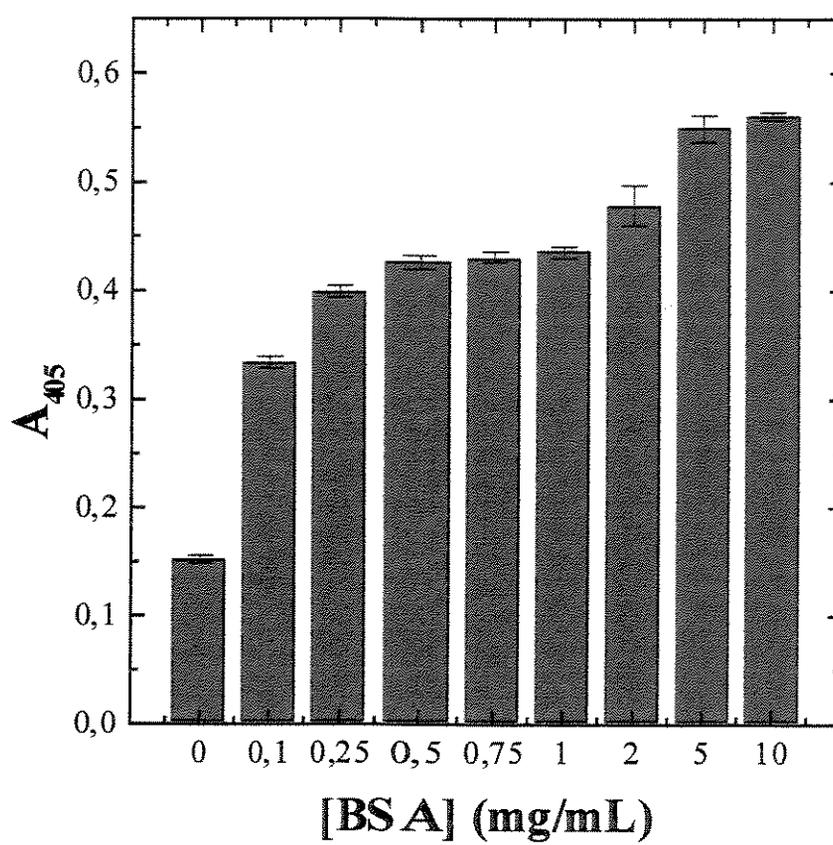
#### **4.4.9 Efeito da BSA na $E_a$ para Hidrólise do pNPP**

A  $E_a$  para hidrólise do pNPP na ausência de BSA no meio de diluição da enzima foi de  $38,726 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Figura 21), muito semelhante àquela encontrada na presença de BSA (1 mg/mL), que foi de  $31,994 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Figura 22). Convém ressaltar que a diferença de  $E_a$  de  $6,732 \text{ kJ mol}^{-1}$ , encontrada nos dois experimentos, equivale a apenas  $1,61 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Isto nos mostra que o efeito do BSA não está relacionado com a diminuição da barreira energética. Valores parecidos de  $E_a$  também foram encontrados por Zhang and Van Etten (1991) e por Silva (1999). 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.



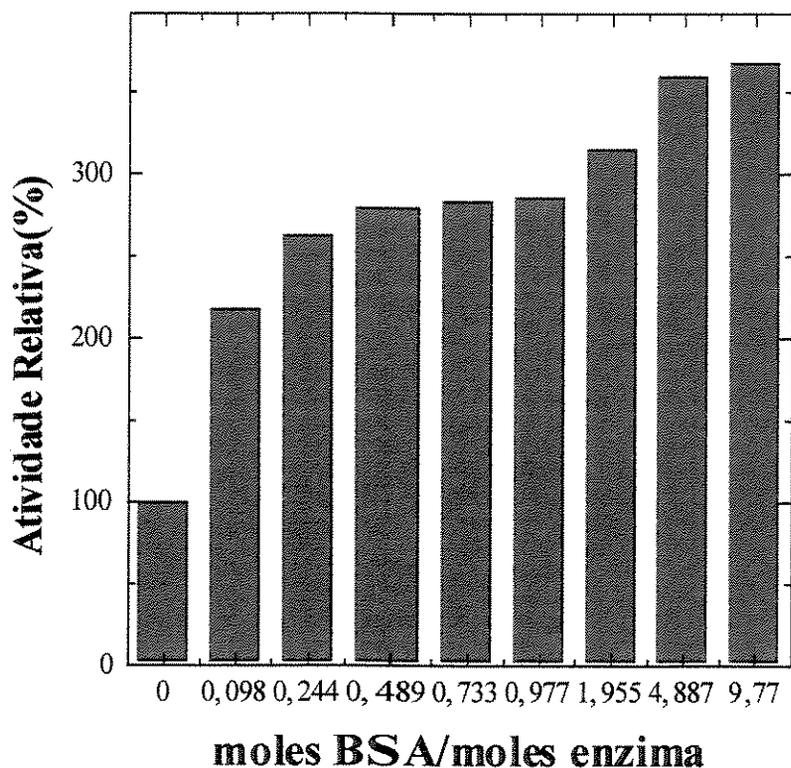
**FIGURA 18. EFEITO DA BSA NO MEIO DE REAÇÃO DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1), exceto pela adição de BSA ao meio de reação em concentrações variando entre 0,1 e 5,0 mg/mL. A atividade na ausência de BSA foi tomada como 100%. A reação foi iniciada pela adição de 1397 ng de enzima.



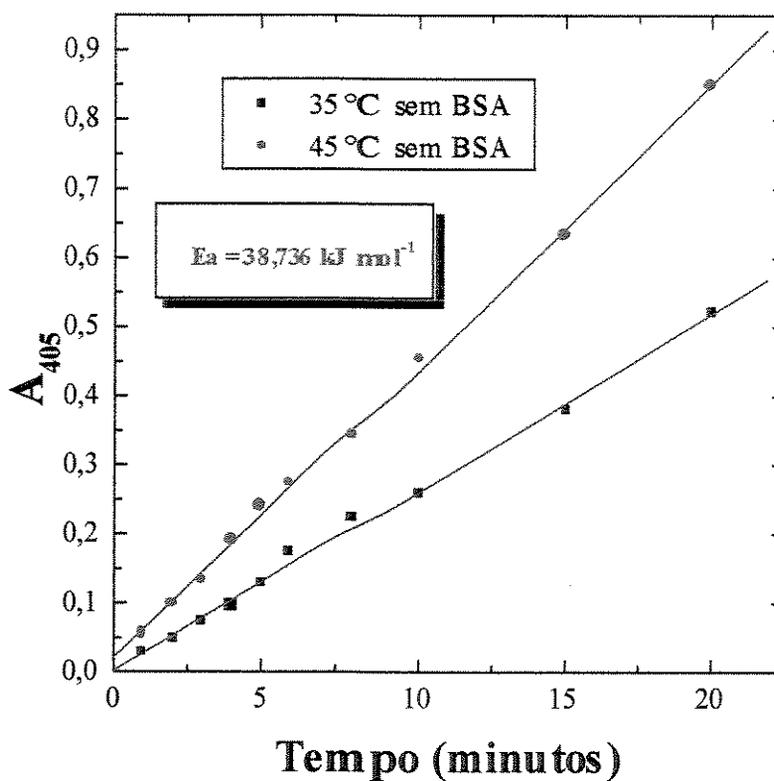
**FIGURA 19. EFEITO DA BSA NO MEIO DE DILUIÇÃO DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1), exceto pela diluição da enzima em tampão acetato de sódio pH 5,0 contendo concentrações de BSA variando entre 0,1 e 10,0 mg/mL.



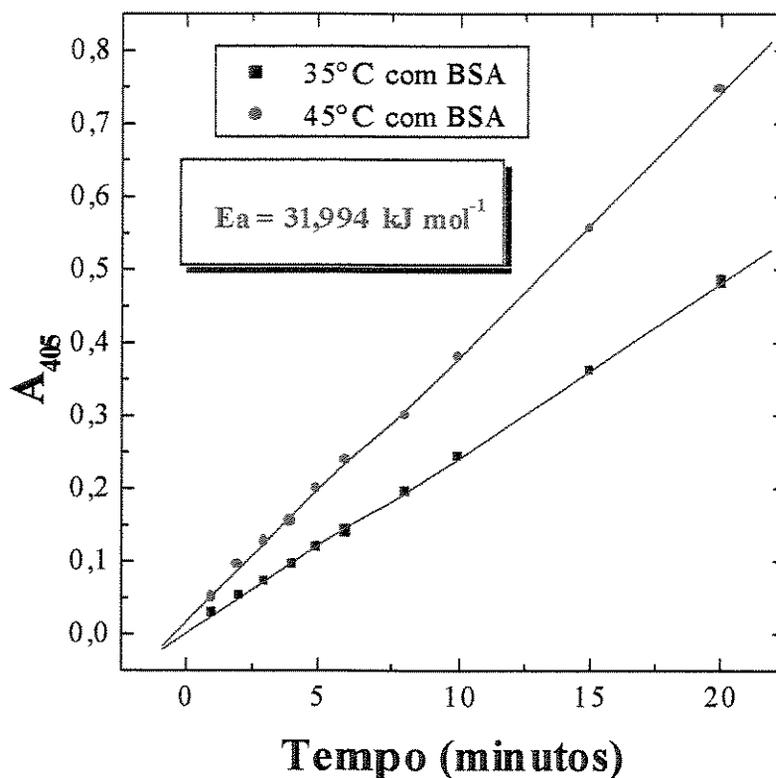
**FIGURA 20. EFEITO DA BSA NO MEIO DE DILUIÇÃO DA PTP DE BMR DO FÍGADO DE CARNEIRO.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1), exceto pela diluição da enzima em tampão acetato de sódio pH 5,0 contendo concentrações de BSA variando entre 0,1 e 10,0 mg/mL. . A relação moles BSA/moles enzima foi estabelecida estimando-se a Mr da enzima em 18 kDa.



**FIGURA 21. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA HIDRÓLISE DA PTP DE BMR DE FÍGADO DE CARNEIRO, NA AUSÊNCIA DE BSA NO MEIO DE DILUIÇÃO.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1), a temperaturas de 35 e 45°C, exceto pela diluição da enzima em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. A reação foi iniciada pela adição de 174,6  $\mu$ g de enzima. A inclinação das retas foi calculada por regressão linear.



**FIGURA 22. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA HIDRÓLISE DA PTP DE BMR DE FÍGADO DE CARNEIRO, NA PRESENÇA DE BSA NO MEIO DE DILUIÇÃO.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1), a temperaturas de 35 e 45°C, com diluição da enzima em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 contendo BSA (1mg/mL). A reação foi iniciada pela adição de 69,85  $\mu$ g de enzima. A inclinação das retas foi calculada por regressão linear.

#### 4.4.10 Efeito de Compostos na Atividade

A Figura 23 mostra o efeito de vários compostos na atividade da fosfatase ácida. Dos compostos testados, 2-mercaptoetanol, G-SH, EDTA, Triton X-100, lactose, DTT, adenosina, glicose e sacarose apresentaram nenhum, ou um efeito muito pequeno na atividade, enquanto que o ácido úrico e o SDS a inibiram (em 50 e 100%, respectivamente) e a guanosina a ativou em cerca de 75%.

O estudo do efeito de compostos na atividade da FAc é de extrema importância, pois permite a identificação de possíveis efetores, 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 efeito de comparação com outras FAc, especialmente as de BMr de mamíferos, que possuem comportamentos bastantes semelhantes frente a determinados compostos.

Sabendo da importância dos grupos  $-SH$  para a atividade da FAc de BMr (Bittencourt and Chaimovich, 1976; Laidler *et al.*, 1982; Chiarugi *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992), estudamos o efeito de compostos sulfidrílicos que pudessem proteger estes grupos. Dos compostos testados, G-SH 1mM e 2-mercaptoetanol 1 mM não apresentaram nenhum efeito significativo, enquanto que o DTT 1 mM provocou uma ligeira inibição, em torno de 15%, da atividade enzimática, o que não é comum na literatura, onde se encontram casos de ausência de efeito de protetores de  $-SH$  (Chaimovich and Nome, 1970), mas o mais comum é encontrarmos relatos de ativação da enzima frente a estes compostos (Galka *et al.*, 1980; Fujimoto *et al.*, 1984; De-Kundu and Banerjee, 1990). O trabalho de Hayman *et al.* (1989) encontrou um efeito inibidor da FAc de osteoclastoma humano (30,0 kDa) em presença de 200 mM de 2-mercaptoetanol. No caso das FAc de BMr, cuja atividade é dependente de um ou mais grupos  $-SH$  localizados no ou próximo do sítio ativo, seria mais esperado que o efeito de compostos

protetores de  $-SH$ , como o próprio nome já diz, se manifestasse mais na proteção dos grupos tiólicos do que na ativação da enzima em condições normais.

Vários autores têm descrito a ativação da FAc de BMr por purínicos. Em nosso estudo, a guanosina, na concentração de 1 mM, provocou uma ativação de aproximadamente 75%, o que também foi relatado por Granjeiro (1994). Tanizaki; Bittencourt and Chaimovich (1977) relataram que a ativação das FAc de BMr por purinas parece ser geral para esta classe de FAc e específica com relação à estrutura do ativador. Baseados na variação do nível de ativação em função de mudanças no núcleo purínico e pela fosforilação do nucleosídeo, juntamente com os dados cinéticos, os autores sugerem que deva existir um sítio específico na enzima capaz de ligar a purina. Esta ligação, ocorrendo após a formação do complexo E-S, resultaria em um aumento da atividade catalítica.

Dissing; Rangaard and Christensen (1993) descreveram a modulação da atividade das isoenzimas “lenta” (*s*) e “rápida” (*f*) da FAc de BMr citosólica de eritrócitos humanos por purinas. Verificaram efeitos distintos da adenina e hipoxantina sobre as isoenzimas. A atividade catalítica da isoenzima *f* foi aumentada em 5,1 vezes pela hipoxantina e diminuída em 40% pela adenina, enquanto que a forma *s* não foi afetada pela hipoxantina, mas foi aumentada em 4,6 vezes pela adenina. Os autores concordam com um sítio específico para a ligação do efetor, mas discordam quanto à sugestão de que o efetor somente se ligue ao complexo E-S, conforme sugerido por Tanizaki; Bittencourt and Chaimovich (1977). Os autores propuseram um mecanismo pelo qual o efetor poderia se ligar tanto à enzima livre quanto ao complexo E-S. Relataram que a afinidade dos efetores positivos (adenina para *s* e hipoxantina para *f*) pela enzima livre foi maior que pelo complexo E-S. Em contraste, a afinidade do inibidor adenina para a forma livre da isoenzima *f* foi menor do que para o complexo E-S. Sugerem então a existência de um sítio de ligação paraestéreo que permite o contato químico entre o efetor e o substrato devido às profundas diferenças dos

efeitos causados pelas moléculas de hipoxantina e adenina, quimicamente similares. Os estudos cinéticos neste trabalho indicaram que a ligação de efetores positivos à enzima resultaria em uma modificação do sítio ativo, que provocaria um decréscimo na energia do estado de transição do passo limitante da reação. Por outro lado, a ligação do efetor negativo, a adenina para a forma *f*, provavelmente aumentaria a energia necessária para superar o estado de transição.

Granjeiro (1998) também relatou efeitos distintos de compostos purínicos com diferentes estruturas químicas na atividade da PTP de BMr de rim bovino. A guanosina, adenina e inosina promovem ativação, enquanto a guanina e o ácido úrico, inibição. O autor afirmou ainda que a ativação é do tipo mista e ocorre devido à diminuição da energia de ativação, sendo que a interação da enzima com a guanosina envolve duas classes de sítios de ligação distintos e apresenta uma variação de entalpia muito grande e negativa ( $80 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). A interação com a guanosina diminui a estabilidade térmica da enzima. Uma constatação interessante foi que o efeito ativador independe do pH, mas depende do tipo de substrato utilizado, pois enquanto a hidrólise da FMN foi inibida pelo AMP e ativada pela adenina, o inverso ocorria durante a hidrólise da Tyr-P, ou seja, inibição pela adenina e ativação pelo AMP. Já a inibição pelo ácido úrico é reversível do tipo mista, promove um deslocamento do pH ótimo da reação (de 5,0 para 6,5), é dependente da dose, tempo e também do substrato e envolve o sítio ativo, uma vez que é protegida pelo fosfato.

Com relação aos detergentes, o Triton X-100, que é um detergente não iônico não afetou a atividade da FAc de fígado de carneiro. Na literatura a maioria dos trabalhos relata uma ativação das FAc de BMr pelo Triton X-100 (Granjeiro, 1994; Buzalaf, 1995), podendo chegar até a 40-50% (Filburn, 1973; Saeed *et al.*, 1990). Já a inibição pelo SDS (um detergente aniônico), que promove o desenovelamento da proteína, com a conseqüente perda de sua atividade catalítica (Biswas and Cundiff, 1991), é um relato comum. Como o

DTAB, um detergente catiônico cuja porção hidrofóbica (cauda) tem o mesmo número de carbonos que a porção hidrofóbica do SDS, do qual só difere pela cabeça polar, não interfere na atividade da FAc de BMr de pulmão bovino, Buzalaf (1995) sugeriu que provavelmente, uma forte interação iônica também seja responsável pelo processo inibitório, que é favorecido quando a cabeça polar do surfatante possui carga negativa, como é o caso do SDS.

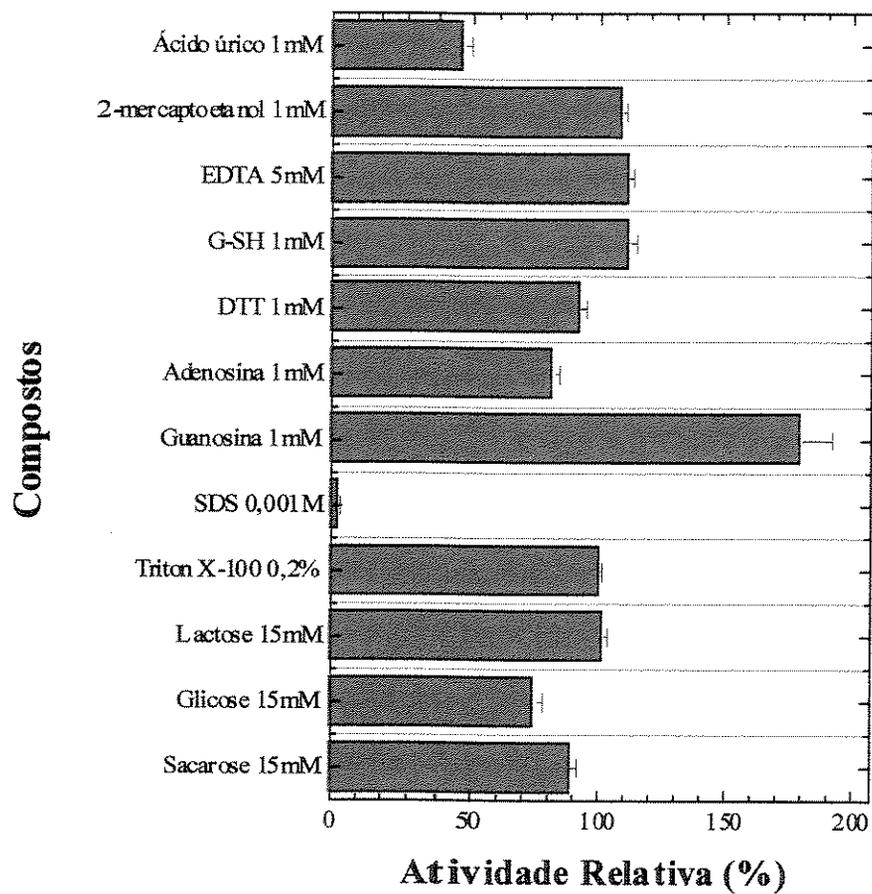
#### 4.4.11 Efeito de Metais na Atividade

Na Figura 24 analisamos o efeito de íons metálicos na atividade da PTP de BMr. Na concentração analisada (1mM), a atividade residual, relativa ao ensaio na ausência de íons, revelou um efeito inibitório discreto do  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , moderado na presença do  $\text{Zn}^{2+}$  e muito forte na presença de  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , com inibição de 80, 85 e 90% da atividade, respectivamente. Esta inibição das PTPs de BMr por metais pesados é devida à interação destes metais com grupamentos sulfidrílicos essenciais à catálise enzimática (resíduos de cisteína), presentes no sítio ativo das enzimas. Destaca-se que o  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Mn}^{2+}$  foram inertes em relação à atividade da enzima, na concentração utilizada.

A independência de íons metálicos para a atividade desta PTP de BMr pode ser confirmada pelo mínimo efeito causado pela alta concentração de EDTA, conforme observamos na Figura 23.

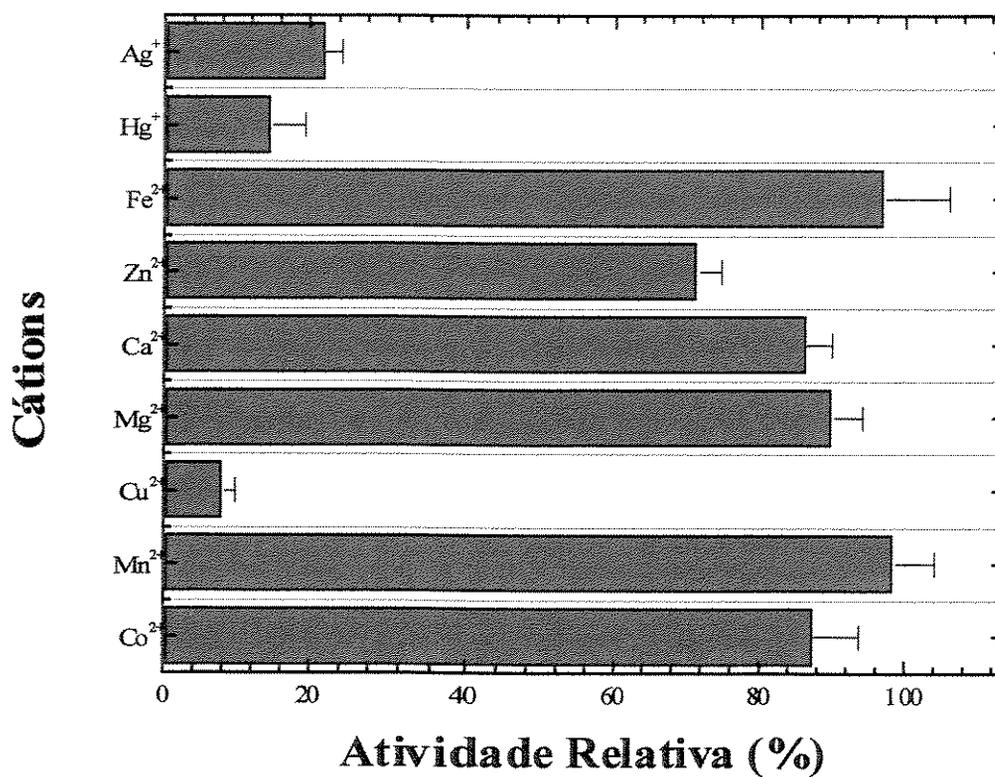
De maneira geral, nossos resultados são similares aos relatados para outras PTP de BMr (Chaimovich and Nome, 1970; Galka *et al.*, 1980; Chernoff and Li, 1985; Saeed *et al.*, 1990). No entanto, algumas diferenças foram notadas, como a maior sensibilidade ao  $\text{Mn}^{2+}$  apresentada pela PTP de BMr da cauda de *Xenopus laevis* (Filburn, 1973). Outra divergência encontrada é em relação à inibição pelo ferro, pois Fujimoto *et al.* (1984) relataram uma inibição de 50% em relação ao  $\text{FeSO}_4$  (1mM), enquanto obtivemos uma inibição de apenas 5%. Na verdade, tem-se relatado que o ferro poderia formar complexos com a enzima, através dos

grupamentos –SH, da mesma maneira que acontece com o zinco e o cobre. Uma possível explicação para esta diferença pode residir no fato de que, no trabalho de Fujimoto, a enzima foi pré-incubada com o íon por 20 minutos antes de ser submetida ao ensaio da atividade, enquanto que nós não realizamos pré-incubação. Outras diferenças também são notadas quando analisamos o comportamento de FAc purificadas de plantas. Algumas isoenzimas sofrem uma pequena ativação em presença do  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , variando entre 13 e 40% (De-Kundu and Banerjee, 1990; Biswas and Cundiff, 1991; Pasqualini *et al.*, 1992). Outro aspecto é o menor poder de inibição exibido pelo  $\text{Cu}^{2+}$  (De-Kundu and Banerjee, 1990; Pasqualini *et al.*, 1992). Assim, devemos analisar o efeito de íons metálicos como sendo um aspecto característico e específico da enzima em estudo. A análise da literatura, bem como de nossos resultados não sustentam a hipótese de que grupos de isoenzimas possuam comportamentos idênticos frente a um determinado íon. Um exemplo claro disto é o do  $\text{Zn}^{2+}$ , que, na concentração de 1 mM, ativa em 20% a FAc de AMr do coleóptilo de cevada (Pasqualini *et al.*, 1992) e inibe em 80% a atividade da FAc de AMr da semente de *Vigna simensis* em germinação (Biswas and Cundiff, 1991).



**FIGURA 23. 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 de 495,83  $\mu$ g de enzima.



**FIGURA 24. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE DA PTP.**

O efeito de íons metálicos (1mM) foi estudado sem pré-incubação (Material e Métodos, 3.2.2.1). A atividade relativa foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do íon. A reação foi iniciada pela adição de 595 $\eta$ g de enzima.

#### 4.4.12 Estudos de Inibição

Diversos inibidores em potencial foram testados (Figura 25). A análise dos resultados mostrou um pequeno efeito inibitório de altas concentrações (10 mM) de fluoreto e tartarato na atividade, o que é esperado, pois tais compostos são inibidores clássicos das FAc de AMr (Di Pietro and Zengerle, 1967). Na concentração de 100  $\mu$ M, o molibdato e o vanadato inibiram 60% da atividade, enquanto que na mesma faixa de concentração o piridoxal-5-P promoveu uma reduzida inibição da atividade, idêntico ao relatado por Granjeiro *et al.* (1997a) para a enzima do rim bovino. Já para a enzima do rim de carneiro (Silva, 1999), observou-se uma inibição pelo piridoxal-5-P, na concentração de 100  $\mu$ M, da ordem de 40%. Convém ressaltar que apesar das PTP de BMr apresentarem cerca de 90% de homologia, pequenas alterações em resíduos de aminoácidos são suficientes para provocar estas diferenças observadas nas enzimas purificadas de diferentes órgãos e/ou espécies. A maior inibição foi obtida na presença do pCMB, onde 100  $\mu$ M do composto promoveu inibição total, apesar de nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ M ter havido inibição de 10% da atividade, apenas. Este fato não é comum na literatura, onde se tem observado uma sensibilidade maior das PTPs de BMr ao pCMB. Granjeiro *et al.* (1997a) observaram uma inibição total pelo pCMB na concentração de 10  $\mu$ M, enquanto que Silva (1999) relatou inibição total pelo pCMB já a 1  $\mu$ M. O fosfato, produto da reação catalisada pela fosfatase ácida, na concentração de 10 mM inibiu cerca de 40 % da atividade.

Estudando o efeito destes inibidores na atividade da PTP podemos, sem margem a dúvidas, classificá-la como uma PTP de BMr. O comportamento frente a inibidores clássicos como tartarato, fluoreto, pCMB e fosfato inorgânico corresponde ao citado nos diversos relatos acerca destas enzimas, permitindo diferenciá-las entre fosfatases de AMr, IMr e BMr (Filburn, 1973; De Araújo *et*

*al.*, 1976; Taga and Van Etten, 1982; Fujimoto *et al.*, 1984; Waheed *et al.*, 1988; Sotiroudis and Geladopoulos, 1990; Panara *et al.*, 1992).

Dos compostos mencionados na Figura 25 foram selecionados e estudados com mais detalhes o fosfato inorgânico, vanadato e molibdato.

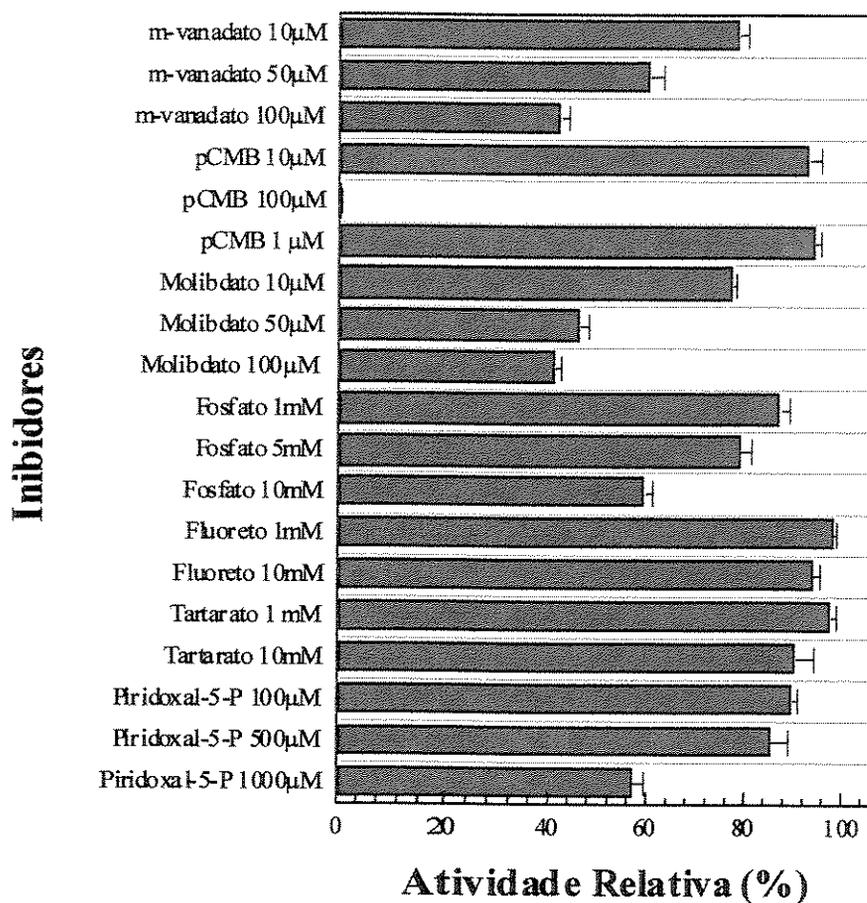
Com relação ao fosfato, o gráfico dos duplos recíprocos mostrou tratar-se de uma inibição reversível competitiva (Figura 26). A regressão linear dos pontos obtidos no gráfico da inclinação das retas contra as concentrações do inibidor proporcionou, na intersecção com o eixo da concentração do inibidor, o valor da constante de inibição,  $K_i$ , de 0,94 mM (Tabela IV, Figura 27), resultado este semelhante ao relatado em outros trabalhos, como o de Buzalaf *et al.* em 1998 (0,3 mM); Chaimovich and Nome em 1970 (0,7 mM); Granjeiro *et al.* em 1997a (0,8 mM); Taga and Van Etten em 1982, (1 mM), Zhang and Van Etten em 1990 (2 mM). Convém destacar que o fosfato assume também um papel importante no processo de purificação da PTP, pois atua como um ligante específico que interage com a enzima e desempenha um tipo de eluição por afinidade para liberá-la da resina de SP-Sephadex (Lawrence and Van Etten, 1981).

O efeito inibitório do vanadato deve-se ao fato de o mesmo ser um análogo do  $P_i$  no estado de transição (Zhang and Van Etten, 1990). Trata-se, portanto, de uma inibição reversível competitiva. Sabendo-se disto, o valor de  $K_i$  foi calculado através do gráfico de Dixon, que é um gráfico de  $1/V$  versus a concentração de inibidor, determinados em duas concentrações de substrato. Neste gráfico, o valor de  $K_i$ , de 0,097  $\mu\text{M}$  foi determinado através da projeção, para o eixo x, do intercepto das retas (Figura 28). Este valor de  $K_i$  foi praticamente da mesma ordem de grandeza do relatado por Waheed *et al.* em 1988 (0,13  $\mu\text{M}$ ), por Granjeiro *et al.* em 1997 (0,465  $\mu\text{M}$ ) e por Silva em 1999 (0,18  $\mu\text{M}$ ). Na literatura há ainda relatos de  $K_i$  para o vanadato, utilizando o pNPP como substrato, cerca de uma ordem de grandeza maior que o encontrado por nós, ou seja, 3,0  $\mu\text{M}$

(Saeed *et al.*, 1990) e até mesmo 2 ordens de grandeza maior (Zhang and Van Etten, 1990, 29,0  $\mu\text{M}$ ). Esta variação é comum entre as PTP de diferentes órgãos e/ou espécies, apesar da existência de 90% de homologia entre elas.

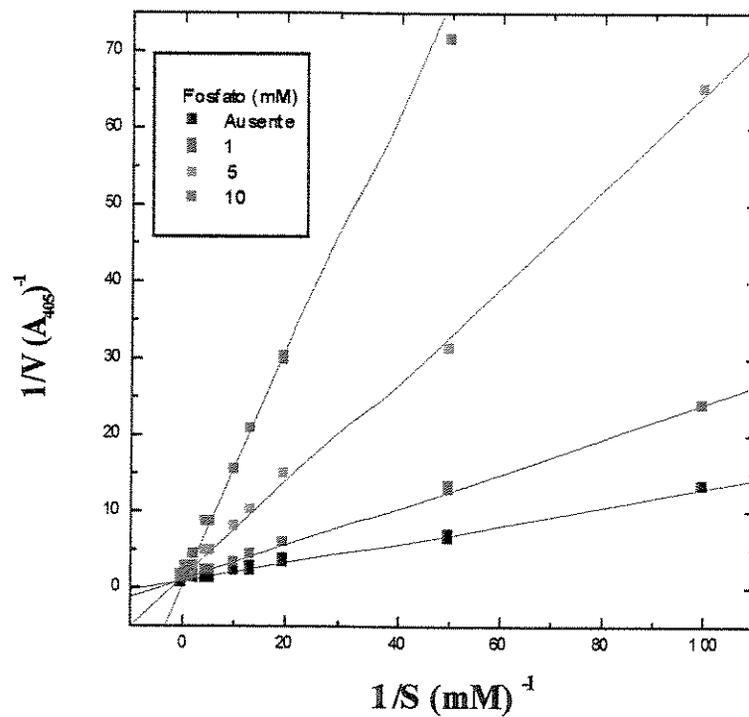
O gráfico dos duplos recíprocos da inibição da PTP de BMr do fígado de carneiro por molibdato de amônio (Figura 29), mostrou tratar-se de uma inibição mista. O gráfico da inclinação das retas contra a concentração de molibdato de amônio (Figura 29, interno) não se mostrou linear, indicando não se tratar de um mecanismo simples. O gráfico de Cornish-Bowden nos permitiu calcular a  $K_{ic}$  em 12,8  $\mu\text{M}$  (Figura 30) e a  $K_{ia}$  em 2,7 $\mu\text{M}$  (Figura 31). Silva (1999), para a PTP de rim de carneiro, relatou  $K_{ic}$  de 100  $\mu\text{M}$  e  $K_{ia}$  de 200  $\mu\text{M}$ .

A inibição causada pelo molibdato está relacionada à formação de complexos com grupamentos -SH de cisteínas. No caso da PTP de BMr há 2 cisteínas reduzidas (Cys-12 e Cys-17), sendo a Cys-12 essencial à catálise (Su *et al.*, 1994; Logan *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994).



**FIGURA 25. 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 inibidor. A reação foi iniciada pela adição de 966  $\eta$ g de enzima e o produto foi quantificado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1).



**FIGURA 26. GRÁFICO DO 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 descrito em Material e Métodos (3.2.2.1). A reação, utilizando o pNPP como substrato, foi iniciada pela adição de 396  $\mu\text{g}$  de enzima.

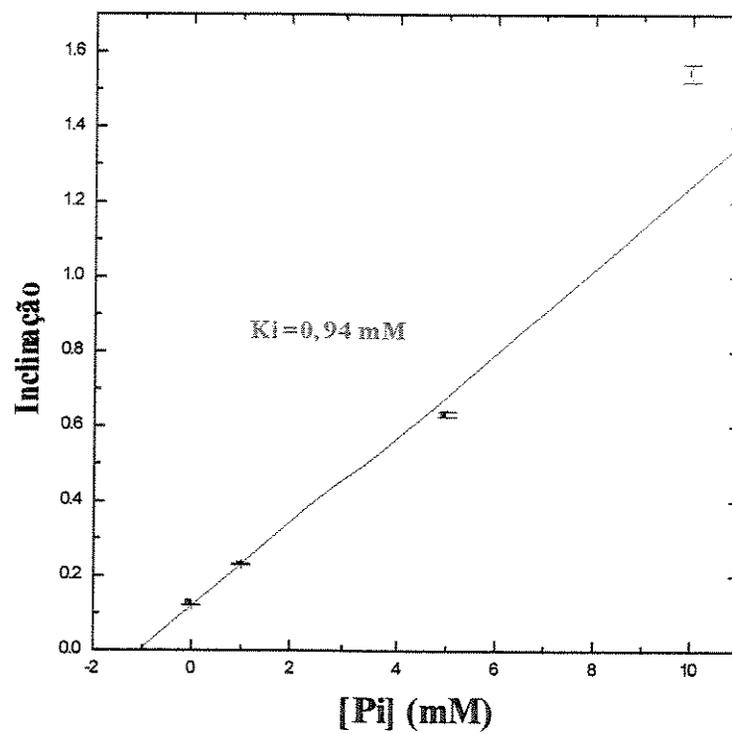
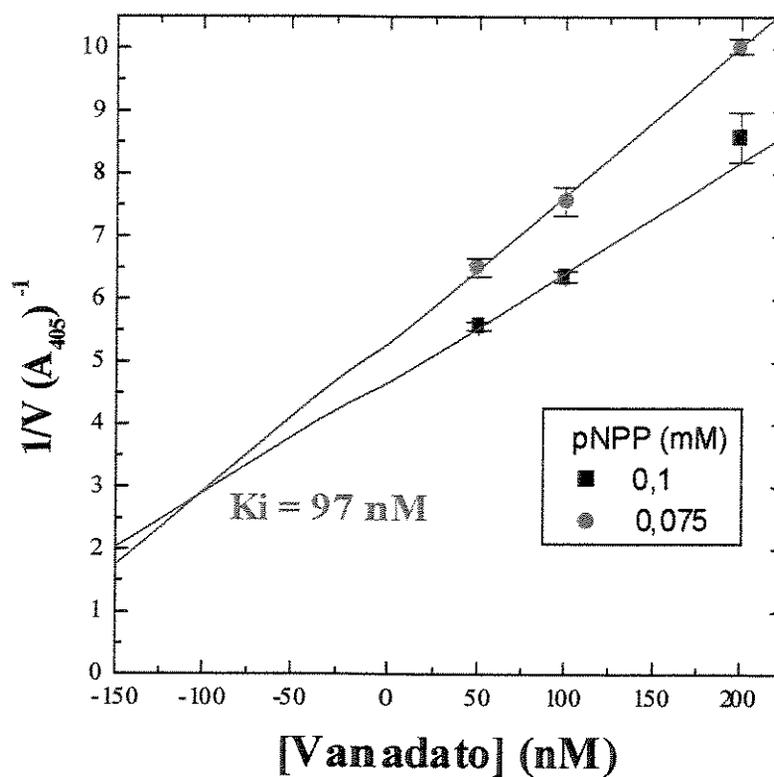
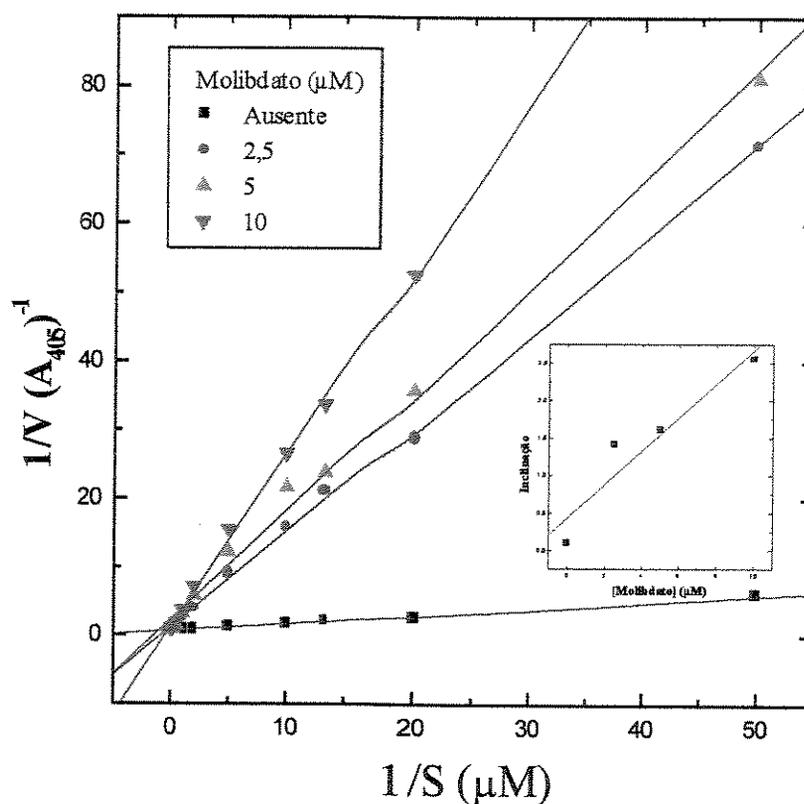


FIGURA 27. GRÁFICO DE DIXON. GRÁFICO DA INCLINAÇÃO DAS RETAS CONTRA A CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO.



**FIGURA 28. GRÁFICO DE DIXON PARA A INIBIÇÃO DA PTP DE BMR POR VANADATO.**

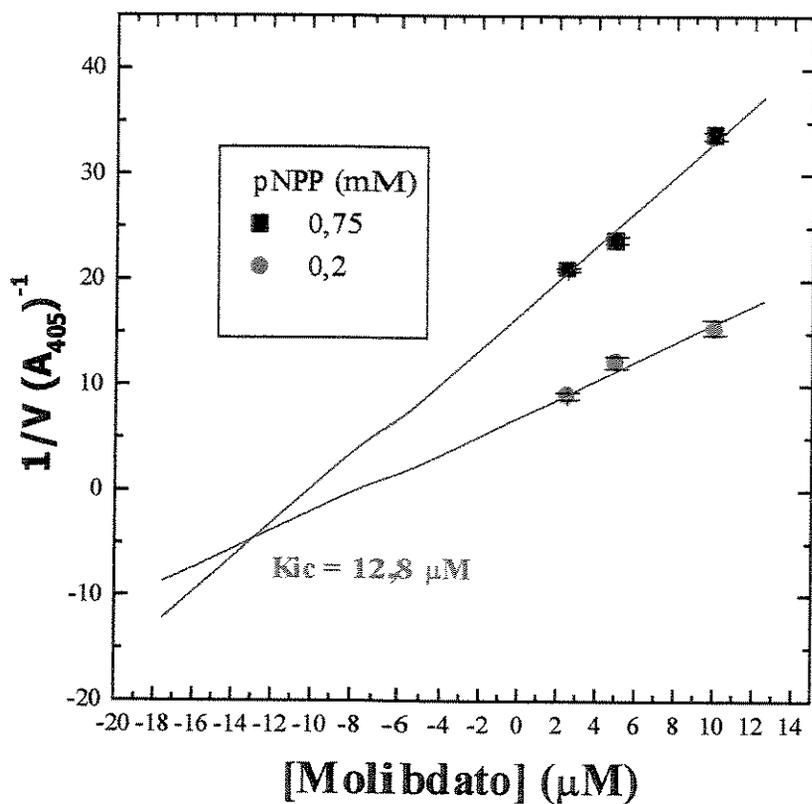
Gráfico do inverso da velocidade contra diferentes concentrações de vanadato, utilizando duas concentrações de pNPP, como indicado. A atividade foi determinada como descrito em Material e Métodos (3.2.2.1). A reação foi iniciada pela adição de 496  $\eta$ g de enzima.



**FIGURA 29. GRÁFICO DOS DUPLOS RECÍPROCOS DA INIBIÇÃO DA PTP DE BMR POR MOLIBDATO DE AMÔNIO.**

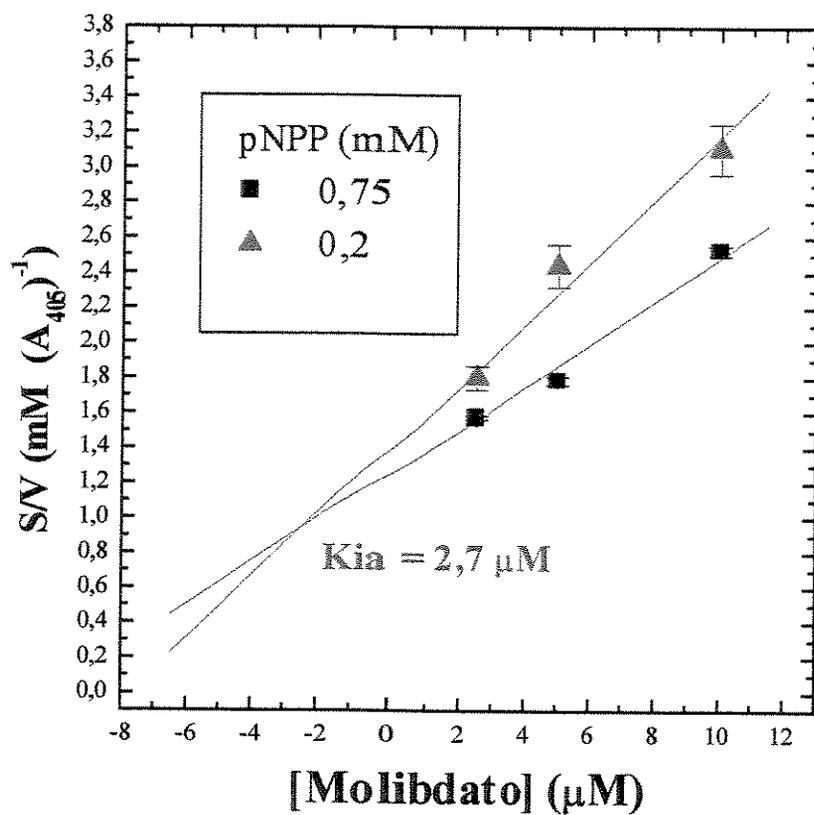
A reação foi realizada na ausência e na presença de concentrações crescentes de molibdato de amônio. A atividade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos (3.2.2.1). A reação foi iniciada pela adição de 595  $\eta g$  de enzima.

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



**FIGURA 30. GRÁFICO DE CORNISH-BOWDEN PARA A INIBIÇÃO DA PTP DE BMR POR MOLIBDATO DE AMÔNIO.**

Gráfico de  $1/V$  contra a concentração de molibdato de amônio, na presença de diferentes concentrações de pNPP.



**FIGURA 31. GRÁFICO DE CORNISH-BOWDEN PARA A INIBIÇÃO DA PTP DE BMR POR MOLIBDATO DE AMÔNIO.**

Gráfico de  $S/V$  contra a concentração de molibdato de amônio, na presença de diferentes concentrações de pNPP.

**Tabela IV. Constantes de Inibição da PTP de BMr.**

<b>Inibidor</b>	<b>Ki (M)</b>
Fosfato	$9,4 \times 10^{-4}$
Vanadato	$9,7 \times 10^{-8}$
Molibdato	$K_{ic} = 1,28 \times 10^{-5}$ $K_{ia} = 2,7 \times 10^{-6}$

## 5 CONCLUSÕES

A PTP de BMr do fígado de carneiro foi purificada 1350 vezes até a homogeneidade, com uma AE de  $81,18 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  e um rendimento de 2,6%, através de um procedimento envolvendo fracionamento com sulfato de amônio, diálise, cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex com eluição por íon afinidade e cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200).

A enzima purificada é composta por uma cadeia polipeptídica simples e possui Mr de 17,4 e 18,3 kDa, como determinado por filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente.

O pH ótimo da enzima é em torno de 5,5 e sua temperatura ótima,  $50^{\circ}\text{C}$ , apresentando uma energia de ativação para hidrólise do pNPP, determinada pelo gráfico de Arrhenius, de  $49,674 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

A adição de BSA em concentrações de 0,1 a 0,75 mg/mL ao meio de reação enzimática promove um incremento de até 40% na atividade, sendo que concentrações maiores têm pouco efeito. Já a adição de BSA ao meio de diluição enzimática eleva a velocidade da reação em até 350% e provoca um ligeiro aumento da  $K_m$ , praticamente sem interferir com a  $E_a$ . Acredita-se que este incremento na velocidade se deve à adsorção preferencial da BSA ao tubo de ensaio, preservando a enzima livre.

A atividade da enzima é pouco sensível a diversos compostos e íons metálicos, exceto pela ativação pela guanosina e inibição por SDS, ácido úrico,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ .

O estudo de inibidores demonstra insensibilidade ao tartarato e fluoreto e inibição por vanadato ( $K_i$  de  $0,097 \mu\text{M}$ ), fosfato inorgânico ( $K_i$  de  $0,94 \text{ mM}$ ), molibdato de amônio ( $K_{ic}$  de  $12,8 \mu\text{M}$  e  $K_{ia}$  de  $2,7 \mu\text{M}$ ) e pCMB.

Dos substratos testados, apenas o pNPP,  $\beta$ -naftil-P, Tyr-P e FMN são hidrolisados significativamente, com  $K_m$  de 0,151, 0,726, 3,873 e 0,12 mM, no pH 5,0 e 1,861, 4,447, 5,673 e 0,11 mM no pH 7,0, respectivamente. Também há hidrólise sobre o acetil-P ( $K_m$  de 0,18 mM) no pH 5,0, entretanto, com uma velocidade 100 vezes menor em relação ao pNPP.

## 6 PERSPECTIVAS

A análise da literatura exhibe um detalhado estudo das fosfotirosina proteínas fosfatases. Diversos parâmetros cinéticos foram profundamente estudados, sendo conhecidos aspectos estruturais desta importante classe de enzimas.

Contudo, ainda permanece em debate a função fisiológica destas enzimas, bem como a modulação de sua atividade. Neste sentido, a obtenção da enzima em quantidade é imperioso de modo a permitir análises espectroscópicas refinadas, que possam contribuir para a elucidação de complexos da enzima com potenciais moduladores.

Assim, nosso laboratório pretende concentrar esforços no sentido de clonar e expressar PTPs de BMr, para que se obtenha grandes quantidades de enzima.

Uma vez feito isto, pretendemos cristalizar a enzima e determinar sua estrutura sozinha ou complexada com moduladores, como por exemplo a guanossina, para se estudar as interações e as conseqüências para o enovelamento da proteína.

Pretendemos ainda, aplicar o conhecimento adquirido no campo da enzimologia, em especial com relação às PTPs, ao estudo do processo de remodelação óssea e testes de biocompatibilidade de enxertos ósseos realizados em nosso Departamento de Bioquímica, na Faculdade de Odontologia de Bauru.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bae, Y. S.; Kang, S. W.; Seo, M. S.; Baines, I. C.; Tekle, E.; Chock, P. B. and Rhee, S. G. (1997) **Epidermal growth factor induced (EGF)-induced regeneration of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation.** *J. Biol. Chem.*, 272: 217-221.
- Baldijão, C. E. M.; Guija, E.; Bittencourt, M. S. and Chaimovich, H. (1975) **Steady state kinetics and effect of SH inhibitors on acid phosphatase from bovine brain.** *Biochim. Biophys. Acta*, 391: 316-325.
- Barford, D.; Flint, A. J. and Tonks, N. K. (1994) **Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B.** *Science*, 263: 1397-1404.
- Barford, D. (1996) **Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases.** *TIBS*, 21: 407-412.
- 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.
- Berti, A.; Rigacci, S.; Raugei, G.; Degl'Innocenti, D. and Ramponi, G. (1994) **Inhibition of cellular response to platelet-derived growth factor by low Mr phosphotyrosine protein phosphatase overexpression.** *FEBS Lett.*, 349: 7-12.
- Bilwes, A. M.; den Hertog, J.; Hunter, T. and Noel, J. P. (1996) **Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-a by dimerization.** *Nature*, 382: 555-559.

- Biswas, T.K and Cundiff, C. (1991) **Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis***. *Phytochemistry*, 30: 2119-2125.
- 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.
- Bucciantini, M.; Stefani, M.; Taddei, N.; Chiti, F.; Rigacci, S.; Ramponi, G. (1998) **Sequence-specific recognition of peptide substrates by the low Mr phosphotyrosine protein phosphatase isoforms**. *FEBS Lett.*, 422:213-217.
- Bucciantini, M.; Chiarugi, P.; Cirri, P.; Taddei, L.; Stefani, M.; Raugei, G.; Nordlund, P. and Ramponi, G. (1999) **The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131 or Tyr132 by Src kinase**. *FEBS Lett.*, 456: 73-78.
- Buzalaf, M. A. R. (1995) **Caracterização cinética da fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa do pulmão bovino**. *Tese de Mestrado*, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- 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.
- Byon, J. C. H.; Kenner, K. A.; Kusari, A. B. and Kusari, J.. (1997) **Regulation of growth factor-induced signaling by protein-tyrosine phosphatases**. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 216: 1-20.

- 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.
- 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.
- Caselli, A.; Camici, G.; Manao, G.; Moneti, G.; Pazzagli, L.; Cappugi, G. and Ramponi, G. (1994b) **Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, 269: 24878-24882.
- Caselli, A.; Marzocchini, R.; Camici, G.; Manao, G.; Moneti, G.; Pieraccini, G. and Ramponi, G. (1998) **The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** *J. Biol. Chem.*, 273: 32554-32560.
- Chaimovich, H. and Nome, F. (1970) **Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 139: 9-16.
- Chen, Q.; Olashaw, N. and Wu, J. (1995) **Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen –activated protein kinase activation pathway.** *J. Biol. Chem.*, 270: 28499-28502.
- 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
- Chiarugi, P. Mazocchini, R.; Raugei, G.; Pazzagli, C.; Berti, A.; Camici, 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.

- 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.
- Chiarugi, P.; Cirri, P.; Raugei, G.; Camici, G.; Dolfi, F.; Berti, A and Ramponi, G. (1995) **PDGF receptor as a specific *in vivo* target for low Mr phosphotyrosine protein phosphatase.** *FEBS Lett.*, 372: 49-53.
- Chiarugi, P.; Cirri, P.; Raugei, G.; Manao, G.; Taddei, L.; and Ramponi, G. (1996) **Low Mr phosphotyrosine protein phosphatase interacts with the PDGF receptor directly via its catalytic site.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 219: 21-25.
- Chiarugi, P.; Cirri, P.; Marra, F.; Raugei, G.; Camici, G.; Manao, G and Ramponi, G. (1997) **LMW-PTP is a negative regulator of insulin-mediated mitotic and metabolic signaling.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 238: 676-682.
- Chiarugi, P.; Cirri, P.; Marra, F.; Raugei, G.; Fiaschi, T.; Camici, G. Manao, G; Romanelli, R. G. and Ramponi, G. (1998) **The Src and signal transducers and activators of transcription pathways as specific targets for low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase in PDGF signaling.** *J. Biol. Chem.*, 273: 6776-6785.
- 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.
- 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.
- Cirri, P.; Caselli, A.; Manao, G.; Camici, G.; Polidori, R.; Capuggi, 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.
- Cirri, P.; Fiaschi, T.; Chiarugi, P.; Camici, G.; Manao, G.; Raugeri, G. and Ramponi, G. (1996) **The molecular basis of the differing kinetic behavior of the two low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase isoforms.** *J. Biol. Chem.*, 271: 2604-2607.
- Cohen, P. (1988) **Protein phosphorylation and hormones action.** *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 234: 115-144.
- Cohen, P. (1992) **Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates.** *Trends Biochem. Sci.*, 17: 408-413.
- Cornish-Bowden, A. (1995) **Fundamentals of Enzyme Kinetics.** Portland Press, London, pp. 93-105.
- 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 phosphotyrosyl protein phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, 269: 8734-8740.
- De Araújo, P.S.; Mies, V. and Miranda, O. (1976) **Subcellular distribution of low-molecular-weight acid phosphatases.** *Biochim. Biophys. Acta.*, 452: 121-130.

- De-Kundu, P. and Banerjee, A.C. (1990) **Multiple forms of acid phosphatase from seedlings axes of *Vigna radiata*. *Phytochemistry*, 29: 2825-2828.**
- Denu, J. M.; Stuckey, J. A.; Saper, M. A.; Dixon, J. E. (1996) **Form and function in protein dephosphorylation. *Cell*, 87: 361-364.**
- Di Pietro, D. L. and Zengerle, F. S. (1967) **Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta. *J. Biol. Chem.*, 242: 3391-3396.**
- 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.**
- Dissing, J. and Svensmark, O. (1990) **Human red cell acid phosphatase: purification and properties of the A, B e C isoenzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1041: 232-242.**
- Dissing, J.; Johnsen, A. H. and Sensabaugh, G. F. (1991) **Human red cell acid phosphatase (ACP1). The amino acid sequence of the two isoenzymes Bf and Bs encoded by the ACP1\*C allele. *J. Biol. Chem.*, 266: 20619-20625.**
- Dissing, J. and Johnsen, A. H. (1992) **Human red cell acid phosphatase (ACP1). The primary structure of the two pairs of isoenzymes encoded by the ACP1\*A and ACP1\*C alleles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1121: 261-268.**
- Dissing, J.; Rangaard, B.; Christensen, U. (1993) **Activity modulation of the fast and slow isozymes of human cytosolic low-molecular-weight acid phosphatase (ACP1) by purines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1162: 275-282.**

- 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.
- Dolfi, F.; Carnero, A.; Ramponi, G and Lacal, J. C. (1993) **Microinjection of acylphosphatase blocks *Xenopus laevis* oocytes maturation induced by *ras-p21***. *FEBS Lett.*, 326:167-170.
- 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.
- Fasman, G.D. (Ed.) (1976) **CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology** 3<sup>rd</sup> ed., Vol.1, p.187.
- Fauman, E. B. and Saper, M. A. (1996) **Structure and function of the protein tyrosine phosphatases**. *Trends Biochem. Sci.*, 21:413-417.
- Fauman, E. B.; Yunanuyama, C.; Schubert, H. L.; Stuckey, J. A. and Saper, M. A. (1996) **The x-ray crystal structures of *Yersinia* tyrosine phosphatase with bound tungstate and nitrate**. *J. Biol. Chem.*, 271: 18780-18788.
- Filburn, C.R. (1973) **Acid phosphatase of *Xenopus laevis* tadpole tails. I. Separation and partial characterization**. *Arch. Biochem. Biophys.*, 159: 683-693.
- Fujimoto, S.; Murakani, K.; Ishikawa, A.; Himi, K. and Ohara, A. (1984) **Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex**. *J. Biochem.*, 96: 1079-1088.
- Fuchs, K. R. ; Shekels, L. L. and Bernlohr, D. A. (1992) **Analysis of the ACP1 gene product: classification as an FMN phosphatase**. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 189: 1598-1605.

- 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.
- Grangeasse, C.; Doublet, P.; Vincent, C.; Vaganay, E.; Riberty, M.; Duclos, B. and Cozzone, A. J. (1998) **Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosine protein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii*.** *J. Mol. Biol.*, 278(2): 339-347.
- Granjeiro, J. M. (1994) **Purificação e caracterização da fosfatase ácida de rim bovino.** *Tese de Mestrado*, Instituto de Biologia, Unicamp.
- Granjeiro, J. M. (1998) **Estudo do efeito da série homóloga de surfatantes aniônicos e catiônicos e de compostos purínicos na atividade da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa do rim bovino.** *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, Unicamp.
- 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.
- 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.
- Hartree, E.F. (1972) **Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.** *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.
- Hayman, A. R.; Warburton, M. J.; Pringle, J. A. S.; Coles, B.; Chambers, T. J. (1989) **Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclastomas.** *Biochem. J.*, 261: 601-609.

- Heinrikson, R. L. (1969) **Purification and characterization of a low molecular weight acid phosphatase from bovine liver.** *J. Biol. Chem.*, 244: 299-307.
- 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.
- Hiraga, A. and Tzuiki, S. (1991) **Rat liver protein-tyrosine phosphatase: purification and characterization of two isoforms.** *Adv. Prot. Phosphatases*, 6: 251-254.
- Hollander, P. V. (1971) **Acid phosphatases, in The Enzymes**, 2<sup>nd</sup> ed, Cap. IV, Edited by Boyer P.D.N.Y, Academic Press, pp. 449.
- 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.
- Janska, A; Kubicz, A.; Szalewicz, A.; Harazna, J. (1986) **Catfish liver acid phosphatase differently glycosylated enzyme molecules with altered kinetic properties.** *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B: 753-758.
- Jia, Z. (1997) **Protein phosphatases: structures and implications.** *Biochem. Cell Biol.*, 75: 17-26.
- 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
- Keyse, S. M. (1995) **An emergent family of dual specificity MAP kinase phosphatases.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1265: 152-160.

- Klarlund, J.K. (1985) **Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins.** *Cell*, 41: 707-717.
- 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.
- Krebs, E. G. (1994) **The growth of research on protein phosphorylation.** *Trens Biochem. Sci.*, 19: 439-440.
- 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.
- Laidler, P. M.; Taga, E. M. and Van Etten, R. L. (1982) **Human liver acid phosphatases: cysteine residues of low molecular weight enzyme.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 216: 512-521.
- Lau, K.-H.W.; Farley, J.R. and Baylink, D.J. (1989) **Phosphotyrosyl protein phosphatases.** *Biochem. J.*, 257: 23-36.
- Laue, T. M. and Rhodes, D. G. (1990) **Determination of size, molecular weight and presence of subunits.** *Methods Enzymol.*, 182: 566-87.
- Lawrence, G. L. and Van Etten, R. L. (1981) **The low-molecular-weight acid phosphatase from bovine liver: isolation, amino acid composition, and chemical modification studies.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 206: 122-131.
- Layne, E. (1957) **Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins.** *Meth. Enzymol.*, III: 447-454.

- Lenburg, M. E. and O'Shea, E. K. (1996) **Signaling phosphate starvation.** *Trends Biochem. Sci.*, 21: 383-387.
- 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.
- 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. USA*, 86: 2003-2007.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) **The determination of enzyme dissociation constants.** *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-666.
- Lo, Y. Y. C.; Wong, J. M. S. and Cruz, T. F. (1996) **Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-jun NH2-terminal kinases.** *J. Biol. Chem.*, 271: 15703-15707.
- 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.
- 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.
- 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.
- Miernyk, J. A. (1992) **Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures.** *Phytochemistry*, 31: 2613-2616.

- Modesti, A.; Cirri, P.; Raugei, G.; Carraresi, L.; Magherini, F.; Manao, G.; Camici, G. and Ramponi, G. (1995) **Expression, purification and kinetic behaviour of fission yeast low Mr protein-tyrosine phosphatase.** *FEBS Lett.*, 375: 235-238.
- 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.
- Nurse, P. (1990) **Universal control mechanism regulating onset of M-phase.** *Nature*, 344: 503-508.
- Ostanin, K.; Pokalsky, C.; Wang, S. nad 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.
- Pallen, C. J. and Tong, P. H. (1991) **Elevation of membrane tyrosine phosphatase activity in density-dependent growth-arrested fibroblasts.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6996-7000.
- Panara, F.; Angiolillo, A.; Fagotti, A.; Di Rosa, I.; Francesca, S. and 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: 1619-23.
- Panara, F.; Pasqualini, S and Antonielli, M. (1990) **Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme.** *Biochem. Biophys. Acta*, 1037: 73-80.
- Pasqualini, S., Panara, F., Bracardi, P. and Antonielli, M. (1992) **High molecular weight acid phosphatases from barley coleoptiles.** *Phytochemistry*, 31: 3703-3706.

- Pazzagli, L.; Manao, G.; Cappugi, G.; Caselli, A.; Camici, G.; Moneti, G and Ramponi, G. (1998) **The amino acid sequences of two acylphosphatase isoforms from fish muscle (*Lamna nasus*).** *Biochim. Biophys. Acta*, 1387: 264-274.
- Pieri, A.; Magherini, F.; Liguri, G.; Raugei, G.; Taddei, N.; Bozetti, M. P.; Cecchi, C and Ramponi, G. (1998) ***Drosophila melanogaster* acylphosphatase: a common ancestor for acylphosphatase isoenzymes of vertebrate species.** *FEBS Lett.*, 443: 205-210.
- Pot, D. A. and Dixon, J. E. (1992) **A thousand and two protein tyrosine phosphatases.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1136: 35-43.
- Ramponi, G. (1975) **1,3-Diphosphoglycerate Phosphatase.** *Meth. Enzymol.*, 42: 411-2.
- Ramponi, G.; Manao, G.; Camici, G.; Capuggi, G.; Ruggiero, M. and Botaro, B. P. (1989) **The 18 kDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine phosphatase activity on the autophosphorylated epidermal growth factor.** *FEBS Lett.*, 250: 469-473.
- Ramponi, G.; Ruggiero, 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. Can.*, 51: 652-656.
- 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.

- Reisfeld, R. A.; Lewis, V. J. and Williams, D. E. (1962) **Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels.** *Nature*, 195: 281-283.
- Rigacci, S.; Degl'Innocenti, D.; Bucciantini, M.; Cirri, P.; Berti, A. and Ramponi, G. (1996) **pp60<sup>v-src</sup> phosphorylates and activates low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatases.** *J. Biol. Chem.*, 271: 1278-1281.
- Rigacci, S.; Marzocchini, R.; Bucciantini, M. and Berti, A. (1998a) **Different in vitro and in vivo activity of low Mr phosphotyrosine protein phosphatase on epidermal growth factor receptor.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 250: 577-581.
- Rigacci, S.; Bucciantini, M.; Marzocchini, R. and Berti, A. (1998b) **Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase translocation during cell stimulation with platelet-derived growth factor.** *FEBS Lett.*, 432 (3): 145-149.
- Rovida, E.; Rigacci, S.; Paccagnini, A.; Sbarba, P. D. and Berti, A. (1998) **The low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase, when overexpressed, reduces the mitogenic response to macrophage colony-stimulating factor and tyrosine phosphorylation of its receptor.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 253: 300-304.
- Ruff, S. J.; Chen, K. and Cohen, S. (1997) **Peroxivanadate induces tyrosine phosphorylation of multiple signaling protein in mouse liver and kidney.** *J. Biol. Chem.*, 272: 1263-1267.
- Rugiero, M.; Pazzagli, C.; Rigacci, S.; Magnelli, L.; Raugei, G.; Berti, A.; Chiarugi, V. P.; Pierce, J. H.; Camici, G. and Ramponi, G. (1993) **Negative growth control by a novel low Mr phosphotyrosine protein**

**phosphatase in normal and transformed cells.** *FEBS Lett.*, 326: 294-298.

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. and Med. NMR*, 22: 81-94.

Schreck, R.; Rieber, P.; and Baeuerle, P. A. (1991) **Reactive hydrogen peroxide intermediates an apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1.** *EMBO J.*, 10: 2247-2258.

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: 710-21.

Silva, T. L. (1999) **Caracterização da fosfotirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa do rim de carneiro.** *Tese de Mestrado*, Instituto de Biologia, UNICAMP.

Sotiroudis, 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.

Stefani, M.; Caselli, A.; Bucciantini, M.; Pazzagli, L.; Dolfi, F.; Camici, G.; Manao, G. and Ramponi, G. (1993) **Dephosphorylation of tyrosine phosphorylated synthetic peptides by rat liver phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes.** *FEBS Lett.*, 326: 131-134.

Stuckey, J. A.; Schubert, H. L.; Fauman, E. B.; Zhang, Z. -Y.; Dixon, J. E. and Saper, M. A. (1994) **Crystal structure of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase at 2,5Å and the complex with tungstate.** *Nature*, 370: 571-575.

- Su, X. -D.; Taddei, N.; Stefani, M.; Ramponi, G. and Norlund, P. (1994) **The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase.** *Nature*, 370: 571-575.
- Swanson, R. V.; Alex, L. A. and Simon, M. I. (1994) **Histidine and aspartate phosphorylation: two component systems and the limits of homology.** *Trens Biochem. Sci.*, 19: 485-490.
- 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.
- Taga, E. M. (1979) **Fosfatase ácida de fígado de cobaia: purificação, estudos eletroforéticos e algumas propriedades.** *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, USP.
- 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.
- Tonks, N. K. and Neel, B. G. (1996) **From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases.** *Cell*, 87: 365-368.
- Trowbridge, I. S. (1991) **A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases.** *J. Biol. Chem.*, 266: 23517-23520.
- Ullah, A. H. J. and Gibson D. M. (1988) **Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 514-520.
- Vesterberg, O. (1972) **Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels.** *Biochim. Biophys. Acta*, 257: 11-19.
- Vincent, C.; Doublet, P.; Grangeasse, C.; Vaganay, E.; Cozzone, A. J. and Duclos, B. (1999) **Cells of Escherichia coli contain a protein-tyrosine**

- kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb.** *J. Bacteriol.*, 181(11): 3472-3477.
- 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.
- Walton, W. M. and Dixon, J. E. (1993) **Protein tyrosine phosphatases.** *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 101-120.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) **The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresys.** *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-12.
- Wo, Y.-Y. P.; Mc Cormack, 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.
- Wo, Y.-Y. P.; Mc Cormack, A. L.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Davis, J. P.; Mitchell, G. L. and Van Etten, R. L. (1992b) **Cloning, expression, and catalytic mechanism of the low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart.** *Biochemistry*, 31: 17-12-1721.
- Woodford-Thomas, T. A.; Rhodes, J. D. and Dixon, J. E. (1992) **Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts.** *J. Cell Biol.*, 117: 401-414.
- Yuvaniyama, J.; Denu,, J. M.; Dixon, J. E. and Saper, M. A. (1996) **Crystal strucuture of the dual specificity protein phosphatase VHR.** *Science*, 272: 1328-1331.

- 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.
- 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.
- Zhang, Z.-Y. (1998) **Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis.** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 33 (1): 1-52.
- 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.
- Zhang, Z.-Y. 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.
- Zhang, Z. -Y. and Van Etten, R. L. (1991) **Leaving group dependence and proton inventory studies of the phosphorylation of a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart.** *Biochemistry*, 30: 8954-8959.
- 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.

- Zhang, M.; Stauffacher, C. V.; Lin, D. and Van Etten, R. L. (1998) **Crystal structure of a human low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, 273: 21714-21720.
- Zhou, 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 mIEV-17 spectral editing scheme.** *Biochemistry*, 32: 8479-8486.
- Zhou., M. and Van Etten, R. L. (1999) **Structural basis of the tight binding of pyridoxal 5'-phosphate to a low molecular weight protein tyrosine phosphatase.** *Biochemistry*, 38: 2636-2646.