

Protocolo para a determinação da atividade da ECA

O ensaio, para a medida da atividade proteolítica da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I), empregando os substratos FRET Abz_FRK(Dnp)P-OH, Abz-SDK(Dnp)P-OH e Abz-LFK(Dnp)-OH tem a vantagem de ser rápido, extremamente sensível e descomplicado. Estes substratos FRET para ECA-I são ideais para os estudos em cinéticas enzimáticas e para a análise da atividade somática ou seletiva dos domínios C e N de ECA-I. Os ensaios podem ser realizados diretamente em cubeta e a hidrólise monitorada pelo registro contínuo por 5 a 10 minutos.

MATERIAIS

Reagentes:

- Substratos FRET: Abz-FRK(Dnp)P-OH, Abz-SDK(Dnp)P-OH e Abz-LFK(Dnp)-OH.
- Tampão de ensaio: 0,1 M Tris.HCl, pH 7,0 com 50 mM NaCl e 10 μ M ZnCl₂ (ver preparação dos reagentes).
- Dimetilsulfóxido - DMSO
- Inibidores específicos de ECA: Captopril ou Lisinopril.
- Inibidores usados para dosar ECA em tecidos: *trans*-epoxy-succinyl-L-leucylamido-(4-guanido)-butene (E-64), phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF), pepstatin, N-tosyl-L-phenylalanyl-chloromethyl ketone (TPCK), N-tosyl-lysyl-chloromethyl ketone (TLCK).
- Reagente de Bradford.
- Albumina Bovina para ser usada como padrão.
- ECA purificada de pulmão de coelho.

Equipamentos:

- Espectrofluorímetro com célula com temperatura controlada e agitador
- Banho com circulação e temperatura controlada adaptado para o espectrofluorímetro.
- Cubeta de quartzo
- Barra magnética PTFE-coated
- Espectrofluorímetro de microplaca automático equipado com controlador de temperatura e shaker.
- Placa de 96 poços de poliestireno preta.
- Gravit versão 5.0 (Erithacus Software Ltda).

Preparação dos Reagentes:

- Solução estoque de peptídeos FRET: Dissolver 1 mg do peptídeo em 100% DMSO. Esta solução pode ser preparada com antecedência e estocada a 4°C por 6 meses.
- Tampão de ensaio: Dissolver 12,1 g de Tris.Base, 2,92 g de NaCl e 1.36 mg de ZnCl₂ em 1 litro de água deionizada. Ajustar o pH para 7,0 com HCl. Esta solução pode ser estocada por 2 meses a 4°C.
- Inibidores: 1 mM de lisinopril ou 1 mM de captopril preparados com água deionizada. Estas soluções podem ser estocadas a -20°C por 1 ano.

PROTOCOLO

Preparação da solução estoque dos peptídeos FRET:

1. Preparar a solução estoque dos peptídeos FRET em 100% de DMSO. (em geral, solução de 1 mg ml⁻¹).
2. Usar 4 diferentes volumes da solução estoque do peptídeo para a construção da curva padrão e para a determinação da concentração pelo espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 365 nm e o coeficiente de extinção molar do grupo Dnp, $\epsilon_{365} = 17,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
3. Uma reta representa a dependência entre a absorbância e a concentração do substrato. O coeficiente angular da reta servirá para obter a concentração de substrato no ensaio em termos de μM .

Conversão de unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) em micromoles:

4. Usar 1 μM de Abz-FRK(Dnp)P-OH, de Abz-FRK(Dnp)P-OH (com a concentração determinada conforme descrito nas etapas de 1 a 3), para determinar o sinal da fluorescência do segmento Abz-FR-OH, resultante da hidrólise total do peptídeo.
5. Colocar a cubeta no compartimento com temperatura controlada do espectrofluorímetro, sob agitação, utilizando uma barra magnética. Adicionar o tampão de ensaio (ver preparação dos reagentes) e 1 μM de Abz-FRK(Dnp)P-OH (com a concentração determinada conforme descrito nas etapas de 1 a 3).
6. Esperar cerca de 5 minutos até a temperatura atingir 37°C, com agitação constante do substrato na cubeta. Adicionar 3 μl de ECA purificada de pulmão de coelho (1U ml⁻¹) em um volume final de 1 ml. Registrar continuamente o aumento da fluorescência com o tempo ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} =$

420 nm) até atingir a hidrólise total (velocidade de hidrólise=0), a fluorescência se torna constante.

7. Este valor representa a hidrólise total do peptídeo, corresponde a fluorescência de 1 μM de Abz detectado pelo espectrofluorímetro (levando em conta o caminho percorrido e a largura da fenda), o que permite a conversão de unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) em micromoles de peptídeo hidrolisado.

▲ Passo Crítico: A calibração do espectrofluorímetro deve ser feita mensalmente.

Determinação da atividade da ECA:

8. Para a ECA purificada, seguir a opção (A), para a ECA no plasma, seguir a opção (B) e para a ECA em tecido, seguir a opção (C).

(A) Enzima Purificada:

- (i) Colocar a cubeta contendo a mistura do tampão de ensaio (ver preparação dos reagentes) e o substrato FRET na célula com temperatura controlada do espectrofluorímetro. Aguardar cerca de 5 minutos para a temperatura atingir 37°C. A agitação da mistura deve ser constante por meio de uma barra magnética. Durante este tempo não deve ser observada nenhuma mudança significativa na leitura da fluorescência.
- (ii) Adicionar amostras de ECA purificada (1 a 50 μl) na cubeta. Registrar continuamente o aumento da fluorescência com o tempo ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$), mantendo a temperatura a 37°C e em agitação constante.
- (iii) A velocidade de hidrólise deve ser linear e constante (5 a 10 minutos é o suficiente para estabelecer uma velocidade de hidrólise). A velocidade expressa em UAF min^{-1} deve ser convertida em micromol de substrato hidrolisado por minuto (baseado na hidrólise total do peptídeo, como descrito nas etapas de 4 a 7). O volume final pode variar de 0,35 a 2,0 ml.
- (iv) Para a determinação do k_m , usar pelo menos cinco diferentes concentrações de substrato. A velocidade de hidrólise depende da concentração do substrato, isso é estabelecido nas velocidades iniciais, que deve ser constante e não ultrapassar 5% da concentração total de substrato. A avaliação da cinética é feita através da utilização das velocidades iniciais na equação de Michaelis-Menten no “nonlinear least-square regression” do programa Grafit.

(B) ECA no Plasma:

- (i)** O sangue tratado com heparina deve ser centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C.
- (ii)** O plasma deve ser separado e estocado.
- (iii)** Colocar a cubeta contendo a mistura do tampão de ensaio (ver preparação dos reagentes) com 10 μM de Abz-FRK(Dnp)P-OH na célula com temperatura controlada do espectrofluorímetro. Aguardar cerca de 5 minutos até a temperatura atingir 37°C. A agitação da mistura deve ser constante, utilizando uma barra magnética. Durante este tempo não deve ser observada nenhuma mudança significativa na leitura da fluorescência.
- (iv)** Adicionar 1 a 10 μl do plasma na cubeta. Registrar continuamente o aumento da fluorescência com o tempo ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$), mantendo a temperatura a 37°C e sob agitação constante. O volume final pode variar de 0,35 a 2,0 ml.
- (v)** O coeficiente angular deve ser convertido em nanomoles de substrato hidrolisado por minuto (baseado na curva de calibração obtida da hidrólise total do peptídeo, como descrito nas etapas de 4 a 7). A atividade da ECA pode ser expressa como nmol por min por ml de plasma (1 mU = nmol de Abz-FRK(Dnp)P-OH hidrolisado por minuto).

(C) ECA em tecidos homogeneizados:

- (i)** As amostras de tecido devem ser rapidamente colhidas, lavadas, e homogeneizadas em tampão Tris.HCl, pH 7,0, com 50 mM NaCl.
- (ii)** O tecido homogeneizado deve ser centrifugado a 1000 g por 10 minutos a 4°C. Conservar o sobrenadante.
- (iii)** Medir a concentração de proteína das amostras utilizando o ensaio de Bradford, com albumina bovina como padrão.
- (iv)** Colocar a cubeta contendo a mistura do tampão de ensaio (ver preparação dos reagentes) e o substrato FRET na célula com temperatura controlada do espectrofluorímetro. Inibidores específicos para cada classe de protease (10 μM de E64, 1 μM de pepstatina, 100 μM de PMSF, 100 μM de TLCK e 100 μM de TPCK) também devem ser adicionados para prevenir hidrólise inespecífica. Esperar cerca de 5

minutos para a temperatura atingir 37°C, a agitação da mistura deve ser constante, utilizando uma barra magnética. Durante este tempo não deve ser observada nenhuma mudança significativa na leitura da fluorescência.

- (v) A escolha do substrato deve ser: Abz-FRK(Dnp)P-OH para a leitura do domínio somático de ECA, Abz-SDK(Dnp)P-OH para o domínio N e Abz-LFK(Dnp)-OH para o domínio C e para ECA em testículo.
- (vi) Adicionar o tecido homogeneizado (1 a 50 μ l). Registrar continuamente o aumento da fluorescência com o tempo ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm), mantendo a temperatura a 37°C e sob agitação constante. A velocidade de hidrólise deve ser linear e constante (5 a 10 minutos é o suficiente para estabelecer uma velocidade de hidrólise).
- (vii) O coeficiente angular deve ser convertido em nanomoles de substrato hidrolisado por minuto (baseado na curva de calibração obtida da hidrólise total do peptídeo, como descrito nas etapas de 4 a 7). A atividade da ECA pode ser expressa como nmol por minuto por mg de proteína ou mU por mg de proteína (1 mU = nmol de substrato hidrolisado por minuto).
- (viii) Como controle negativo, o ensaio deve ser feito na presença de 0,5 μ M de inibidores específicos de ECA, captopril ou lisinopril. Nestas condições a hidrólise é completamente abolida.

Referências:

- Carmona AK, Schwager SL, Juliano MA, Juliano L, Sturrock ED.

A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nat Protoc.* **2006**; 1(4):1971-6.