

Ensaio radiométrico de tirosinase

Enzymatic activity assay of tyrosinase

Lorena Juliana Nascimento Oliveira¹; Irene Machado Rocha² & Lidia Andreu Guillo³

RESUMO – A tirosinase é uma importante enzima responsável pela formação da melanina. Este artigo descreve um ensaio para medir a atividade enzimática da enzima comercial extraída de cogumelo. Os resultados indicaram que existe uma relação linear entre as unidades de enzima e a formação de água triciada. Estes resultados capacitam-nos a utilizar este ensaio para determinar as propriedades pigmentogênicas de plantas.

PALAVRAS-CHAVE – Ensaio de tirosinase; melanina; pigmentação.

SUMMARY – Tyrosinase is an important enzyme responsible for the melanin formation. This paper describes an assay to measure the enzymatic activity of the commercial enzyme mushroom tyrosinase. The results indicated that there is a linear relation between the units of the enzyme and the formation of tritiated water. These results prompted us to utilize this assay to determine the pigmentogenic properties of plants.

KEYWORDS – Tyrosinase assay; melanin; pigmentation.

INTRODUÇÃO

A tirosinase (E.C. 1.14.18.1) é uma enzima chave na via biossintética que leva à produção de melanina, que ocorre nos melanócitos, a célula pigmentar. O gene da tirosinase humana foi clonado por Kwon *et al.*, 1987 e está localizado no cromossomo 11, sendo expresso como um polipeptídeo precursor de 529 aminoácidos e peso molecular de 55 kDaltons (kDa). A enzima possui 6 sítios de glicosilação, sendo o peso molecular da enzima madura cerca de 70kDa (Branza-Nichita *et al.*, 2000). A tirosinase não é encontrada somente em mamíferos. Animais inferiores, plantas e fungos também a possuem, embora a especificidade com relação ao substrato e co-fatores não seja tão marcante como em mamíferos. Duas outras proteínas relacionadas à tirosinase, denominadas TRP-1 e TRP-2 (Fig. 1) também participam dessa via (Jackson, 1994).

A reação inicial para a formação de melanina envolve a hidroxilação do substrato L-tirosina em 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), com a liberação de uma molécula de água, catalisada por tirosinase. A tirosinase também está envolvida na oxidação de DOPA em DOPAquinona e na oxidação de 5,6-dihidroxiindol (DHI) a indol-5,6-quinona (Tripathi *et al.*, 1992), Fig. 1.

A melanina possui muitas e interessantes propriedades que são benéficas ao organismo. Elas incluem a absorção da radiação solar proporcionando proteção contra os efeitos deletérios da luz ultravioleta e a supressão de radicais livres gerados no interior da célula (Mani *et al.*, 2001). Muitos dos distúrbios da pigmentação humana envolvem de certa forma a enzima tirosinase. O albinismo por exemplo, resulta de mutações no gene da tirosinase (Glebel and Spritz, 1992). No soro de pacientes portadores de vitiligo, doença que se caracteriza pela presença de manchas brancas na pele, foram encontrados anticorpos anti-tirosinase, demonstrando erros no processamento e endereçamento dessa proteína (Kemp *et al.*, 1997).

Este trabalho descreve uma metodologia para

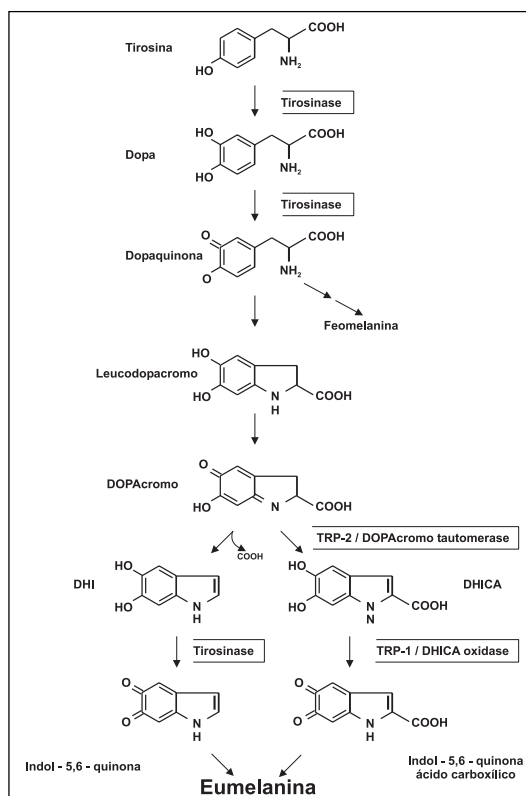


FIG. 1 - Síntese de melanina, a partir de tirosina, que ocorre nos melanócitos. As reações enzimáticas atribuídas à tirosinase, TRP-1 e TRP-2 estão indicadas. Na etapa inicial da reação, a tirosinase catalisa a hidroxilação da L-tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e a oxidação de DOPA a Dopaquinona. Nesta reação também é liberada uma molécula de água. O produto formado pela copolimerização da melanina com os derivados de DOPA contendo enxofre dá origem à feomelanina (pigmento amarelo avermelhado). A enzima DOPAcromo tautomerase (TRP-2) converte o componente DOPAcromo para 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA). A enzima DHICA oxidase (TRP-1) catalisa a oxidação de DHICA a indol-5,6-quinona-2-ácido carboxílico. Como produto final da reação há formação da eumelanina (pigmento preto ou marrom).

avaliar a atividade da enzima tirosinase, empregando o substrato L-tirosina marcado radioativamente. Com isso espera-se contribuir para o desenvolvimento

Recebido em 17/10/2002

Auxílios Financeiros: PRPPG/UFG, FUNAPE, CNPq

¹ Bolsista de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq quando estudante do Curso de Ciências Biológicas - Instituto de Ciências Biológicas - UFG;

² Bolsista CAPES/CNPq ex-aluna do Mestrado em Biologia do Inst. de Ciênc. Biol.; UFG; ³ Prof^a Titular do Dept^o de Ciências Fisiológicas - UFG (orientadora)

de testes precisos que avaliem o poder pigmentogênico de plantas usadas pela medicina popular no tratamento de doenças relacionadas com a pigmentação humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

L-tirosina, L-DOPA, tirosinase de cogumelo (mushroom tyrosinase), TES (ácido sulfônico N-hidroximetil-2-aminoetano), Tris (ácido hidroximetilaminometano), sacarose, cloreto de potássio (KCl), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), resina Dowex 50W X4-400, adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA); [3,5-³H]-tirosina adquirido da Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, USA).

Ensaio radiométrico para tirosinase

Esse ensaio mede a reação inicial da via biosintética de formação de melanina e depende da liberação de água marcada radioativamente (água triciada, ³H₂O), durante a formação de DOPA a partir de [3,5-³H]-tirosina (Fig. 1). Os ensaios foram feitos em triplicata, segundo protocolo estabelecido por Townsend *et al.*, 1984 com algumas modificações. Adicionou-se inicialmente a tubos "ependorf" de 1,5ml, 20μl de L-tirosina 8,4mM, 9μl de L-DOPA 5,0mM, 18μl de tampão de ajuste de pH (Tris 50mM, KC 21mM, sacarose 137mM, TES 57mM e Triton X-100 2%, pH 7,8) e 3μl de L-[3,5-³H]-tirosina (56Ci/mmol; 1mCi/ml). Dessa solução são retirados 35μl e transferidos para novos tubos "ependorf" contendo diferentes concentrações da enzima comercial, ajustando-se o volume final para 60μl com o tampão de amostra (KCl 10mM; sacarose 236mM; Tris 3,32mM; TES 6,67mM; 2,0mM PMSF e 1,0mM EDTA, pH 7,2). A concentração de L-tirosina e L-DOPA nos ensaios foi de 1,96mM e 525μM, respectivamente. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante três horas. A reação foi finalizada pela adição de 600μl de carvão ativo seguido de centrifugação a 1000xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para o topo de uma coluna contendo resina de troca catiônica (Dowex 50W), para remoção da tirosina que não reagiu e finalmente recolhido em frascos contendo 5ml de líquido de cintilação para amostras aquosas. A quantidade de água triciada formada foi medida em um aparelho contador de cintilação líquida (1600TR Tri-Carb, Packard, USA). Os controles utilizados incluíam brancos onde: i) eliminou-se a adição de L-DOPA; ii) eliminou-se a adição de tirosinase da mistura de reação. A velocidade de formação de ³H₂O foi calculada em função do número de moles de substrato utilizado no ensaio, segundo a fórmula:

$$\frac{1 \text{ nmol} \times (\text{cpm da amostra} - \text{cpm dos brancos})}{(\text{cpm totais} - \text{cpm dos brancos}) \times 3 \text{ horas}} = \text{nmoles de } ^3\text{H}_2\text{O formada/hora}$$

*1 nmol = número de moles de L-tirosina inicialmente adicionada ao ensaio. A quantidade de tirosina triciada pode ser considerada desprezível.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio mostrou-se linear para a faixa de concentrações da enzima (Fig. 2) A linearidade do ensaio reflete a relação entre a quantidade de enzima presente e a formação de água triciada nas condições de tempo e temperatura determinadas neste trabalho. Essas condições portanto, deverão ser utilizadas nos ensaios envolvendo a determinação da atividade pigmentogênica de extratos de plantas. Assim, o aumento na velocidade de formação de

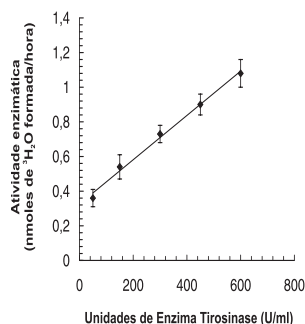


FIG. 2 - Correlação entre a quantidade de enzima e a velocidade de formação de água triciada (³H₂O). Diferentes alíquotas de uma solução-estoque de tirosinase comercial são adicionadas ao tampão de amostra contendo [3,5-³H]-tirosina, L-tirosina (1,96 mM), L-DOPA (525 μM). Após incubação por 3h a 37°C, adiciona-se 600ml de carvão ativo, centrifuga-se e o sobrenadante é aplicado a uma coluna Dowex 50W X4-400. O eluato contendo a água triciada é coletado em frascos de cintilação, conforme descrito em Material e Métodos. As barras indicam os desvios-padrão de cada triplicata de experimentos.

água triciada devido à presença de agentes pigmentogênicos, poderá ser rápida e precisamente determinado através deste ensaio radiométrico.

A utilização do substrato marcado radioativamente aumenta a sensibilidade do método. Entretanto, deve-se ter sempre em mente que o substrato [3,5-³H]-tirosina pode trocar o trício com a água, formando água triciada de maneira não-enzimática, comprometendo o ensaio. Entretanto, o problema pode ser minimizado pelo uso de brancos adequados tais como a realização dos ensaios na ausência da enzima. Caso os valores obtidos nesses controles ainda permaneçam altos, torna-se necessário purificar a tirosina em coluna de troca iônica. Em nossos ensaios não foi necessária a realização dessa etapa de purificação.

CONCLUSÃO

A velocidade de formação de água triciada a partir do aminoácido L-tirosina pela enzima comercial tirosinase é proporcional à quantidade de enzima adicionada ao ensaio. Uma vez que as condições ideais para estímulo da enzima tirosinase foram obtidas, o ensaio poderá ser empregado na determinação da atividade pigmentogênica de extratos de plantas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos professores Dr. Marcelo Brígido (Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília) e Dr^a Silvana Petrofeza (Universidade Federal de Goiás), pelas facilidades concedidas no aparelho contador de cintilação líquida.

REFERÊNCIAS

1. Branza-Nichita, N., Negriou, G., Petrescu, A.J., Garman, E.F. Platt, F.M., World, M.R., Dwek, R.A., Petrescu, S.M. Mutations at critical N-glycosylation sites reduces tyrosinase activity by altering folding and quality control. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 8169-75, 2000.
2. Giebel, L.B., Spritz, R.A. The molecular basis of type I (Tyrosinase-deficient) human oculocutaneous albinism. *Pigment Cell Research*, v. 2, p. 101-6, 1992.
3. Jackson, I.J. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annual Review of Genetics*, v.28, p.189-217, 1994.
4. Kemp, E.H., Gawkrödger, D.J., Watson, P.F., Weetman, A.P. Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). *Clinical and Experimental Immunology*, v.109, p.495-500, 1997.
5. Know, B.S., Haq, A.K., Pomerantz, S.H., Halaban, R. Isolation and sequence of cDNA clone from human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, p.7473-7, 1987.
6. Mani, I., Sharma, V., Tamboli, I., Raman, G. Interaction of melanin with proteins - The importance of an acidic intramelanosomal pH. *Pigment Cell Research*, v. 14, p. 170-9, 2001.
7. Townsend, D., Guillery, P., King, R. Optimized assay for mammalian tyrosinase (polyhydroxyl phenyloxidase). *Analytical Biochemistry*, v. 139, p.345-352, 1984.
8. Tripathi, R.K., Hearing, V.J., Urabe, K. Aroca, P., Spritz, R.A. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p.23707-12, 1992.

Endereço para correspondência

Prof^a Dr^a Lidia Andreu Guillo

Instituto de Ciências Biológicas/UFG - Dept^o Ciências Fisiológicas

ICBII/Campus II/CP 131/74001-970/Goiânia GO

Tel. (0xx62)521-1495 - Fax (0xx62)521-1190