

A Descoberta da Atividade ATPase da Quinase de Abelson (Abl) e suas Implicações no Desenvolvimento de Ensaio Simples para Triagem de Fármacos Antileucêmicos

Diego M. Martins^{1*} (PG), Philipe O. Fernandes² (PG), Adolfo H. Moraes¹ (PQ)

¹Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas (ICEx), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 31.270-901

²Departamento de Produtos Farmacêuticos/Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 31.270-901

ddmagn838@gmail.com

RESUMO

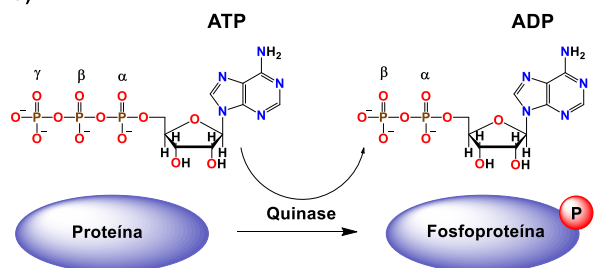
As proteínas quinases (PKs) são enzimas que catalisam a transferência de grupos fosforila para proteínas. Sua relevância como alvos terapêuticos é amplamente reconhecida, devido ao seu papel central na regulação celular e na patogênese de diversas doenças. Neste estudo, relatamos que a quinase de Abelson (Abl), associada à leucemia mieloide crônica, apresenta, além da atividade quinase, uma atividade ATPase secundária. A enzima foi expressa em *Escherichia coli*, purificada por cromatografia (afinidade e exclusão por tamanho) e caracterizada por SDS-PAGE e RMN. Por meio de espectroscopia de RMN 1D de ³¹P, demonstramos a conversão de ATP em ADP e fosfato pela Abl. Inibidores ortostéricos, como imatinibe e dasatinibe, suprimem essa reação, sugerindo correlação funcional. O monitoramento da atividade ATPase da Abl configura um método alternativo para triagem de fármacos, superando limitações dos ensaios clássicos disponíveis comercialmente.

Palavras-chave: Atividade ATPase, Quinase de Abelson (Abl), RMN 1D de ³¹P, Ensaio de atividade, Triagem de inibidores

Introdução

As proteínas quinases (PKs) são enzimas que catalisam a transferência de grupos fosforila, geralmente a partir do ATP, para proteínas, alterando sua atividade, capacidade de interação e localização celular (1,2).

a)



b)

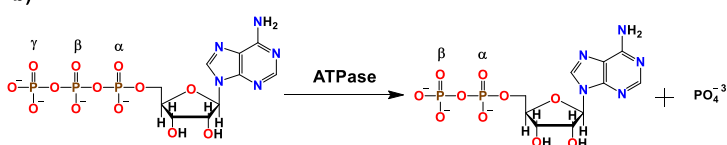


Figura 1. Esquema de uma reação catalisada por uma proteína quinase em (a) e por uma ATPase em (b).

A relevância das PKs como alvos terapêuticos é amplamente reconhecida, em virtude de seu papel central na regulação de processos celulares e na patogênese de diversas doenças. Apesar das PKs serem extensivamente estudadas, há poucos relatos poucos na literatura sobre enzimas dessa família que apresentam atividade

ATPase intrínseca, descrita como uma reação secundária. O presente trabalho relata a descoberta da atividade ATPase da quinase de Abelson (Abl), uma quinase de tirosina amplamente estudada devido ao fato de que sua atividade desregulada leva ao surgimento da leucemia mieloide crônica (LMC) (2), e explora essa reação como uma alternativa para triagem de inibidores dessa enzima.

Experimental

Expressão, purificação e caracterização da enzima Abl.

A enzima Abl foi produzida em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) em meio de cultura Luria-Bertani (LB) sob o controle do promotor T7 e purificada por meio de um protocolo envolvendo três etapas cromatográficas sequenciais: duas de afinidade e uma de exclusão por tamanho. A quinase obtida foi caracterizada por SDS-PAGE e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), visando confirmar sua obtenção, pureza e enovelamento.

Ensaio de atividade

As reações enzimáticas foram realizadas em tampão tris-HCl 40 mM pH 7,5 contendo 2,5 mM de MgCl₂ e 2% v/v de DMSO. As reações foram paradas após 2 horas com uma solução de EDTA, capaz de se complexar com o cofator Mg⁺², de modo que sua concentração final foi de 30 mM. As reações foram analisadas por espectroscopia de RMN 1D de ³¹P quantitativa. O fosfato de trimetilo (TMP) foi utilizado como padrão interno na concentração final de 2,14 mM. Os espectros foram obtidos a 25 °C, utilizando um espectrômetro Bruker Avance III Nanobay de 400 MHz, equipado com sonda PABBF0-H-D/Z-grad de 5 mm.



Resultados e Discussão

Utilizando a espectroscopia de RMN 1D de ^{31}P , foi possível monitorar e quantificar a conversão de ATP em ADP e fosfato inorgânico (Pi) catalisada pela Abl, mesmo na ausência de substratos adicionais (Figura 2), demonstrando que essa enzima possui uma atividade ATPase intrínseca.

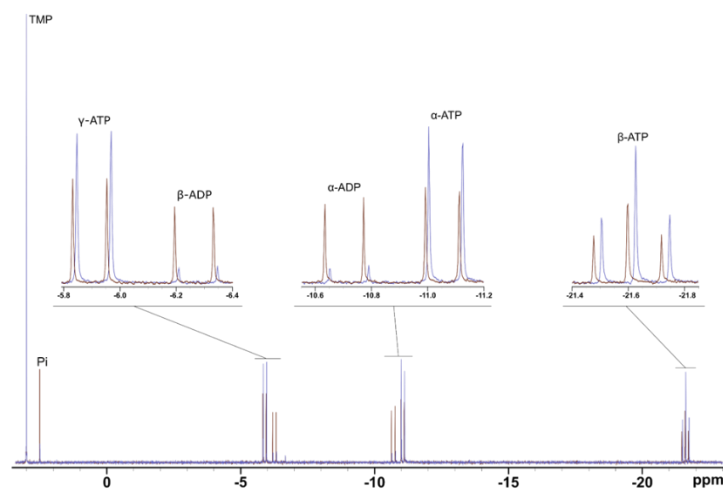


Figura 2. Espectros de RMN de 1D de ^{31}P . O meio reacional consistiu em tampão Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), 2,5 mM de cloreto de magnésio e 2% v/v de DMSO. O espectro em marrom corresponde ao meio contendo 1,27 μM da enzima Abl, enquanto o espectro em azul representa o controle, sem a enzima, no qual não foi observada reação. As reações foram iniciadas pela adição de ATP até a concentração final de 1,6 mM, incubadas por 2 horas e, em seguida, interrompidas com EDTA antes da análise por RMN de ^{31}P .

Visando avaliar a possibilidade de utilizar a atividade ATPásica da Abl quinase como método bioquímico para ensaios enzimáticos. Determinou-se o k_{cat} aparente da reação, obtendo-se um valor de $5,3 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$ ($8,8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), cerca de 80 vezes inferior ao reportado para o peptídeo abltide, substrato modelo da Abl para atividade quinase. Embora a velocidade de hidrólise de ATP seja consideravelmente menor que a atividade fosfotransferase típica, essa diferença era esperada por se tratar de uma reação de fundo, comportamento já descrito para outras quinases (3).

Com base nos dados experimentais, foi possível construir uma curva de inibição com imatinibe, evidenciando uma inibição dependente da concentração, com um K_d de $2,7 \pm 0,7 \mu\text{M}$ (Figura 3a). A comparação entre imatinibe e dasatinibe revelou perfis inibitórios distintos (Figura 3b): enquanto o imatinibe inibiu cerca de 50% da atividade a 3 μM , o dasatinibe promoveu inibição completa nessa mesma concentração, refletindo sua maior afinidade pela Abl.

Apesar da baixa velocidade da atividade ATPásica intrínseca da Abl, o estudo demonstrou a viabilidade de um ensaio baseado nessa atividade, com quantificação de fosfato por RMN de ^{31}P , técnica específica e precisa, mas de alto custo. Alternativas como o método do azul de molibdênio, técnicas eletroanalíticas e cromatografia iônica surgem como estratégias promissoras para ampliar a acessibilidade e a aplicação desses ensaios (4,5).

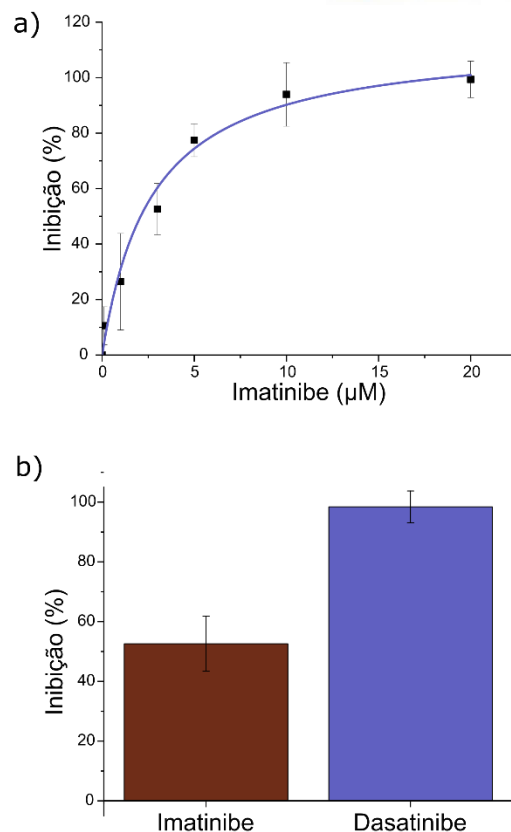


Figura 3. Desenvolvimento de um ensaio para a Abl baseado na atividade ATPásica. a) Efeito da concentração de imatinibe sobre a atividade da Abl, avaliado por RMN 1D de ^{31}P nas mesmas condições de tampão descritas anteriormente. b) Comparação entre imatinibe e dasatinibe (3 μM cada) na inibição da atividade da Abl.

Conclusões

O monitoramento da atividade ATPásica da Abl resultou no desenvolvimento de uma nova tecnologia (6), configurando uma estratégia metodológica simples e custo-efetiva para avaliar a inibição da quinase, sem a necessidade de substratos peptídicos. Este ensaio representa um avanço para o desenvolvimento de métodos de nova geração aplicáveis à Abl e potencialmente a outras quinases, superando as limitações dos métodos clássicos, que são onerosos, complexos ou geram resíduos radioativos.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela FAPEMIG, CNPq e CAPES. Agradecimentos adicionais ao Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução da UFMG – LAREMAR.

Referências

1. G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science*. **2002**, 298, 1912–1934.
2. D. M. Martins, P. O. Fernandes. *Chembiochem*. **2024**, 25(23), e202400296.
3. Y. Wang, G. Hanrahan, F. Abou Azar, A. Mittermaier, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **2022**, 1870, 140720.
4. E. A. Nagul, I. D. McKelvie, P. Worsfold, S. D. Kolev, *Analytica Chimica Acta*, **2015**, 890, 60–82.
5. J. Krämer, R. Kang, L. M. Grimm, L. De Cola, P. Picchetti, F. Biedermann, *Chem. Rev.* **2022**, 122, 3459–3636.
6. D. M. Martins. P. O. Fernandes. B. R. Patente 10 2025 005162 1, **2025**.