

Modelos matemáticos para determinação das velocidades de síntese, degradação e do tempo de meia vida de proteínas

Shigehiro Funayama (Doutor)

Curso de Medicina Veterinária – Universidade Tuiuti do Paraná

Cristiane Gugelmin (Especialista)

Curso de Medicina Veterinária – Universidade Tuiuti do Paraná

João Ari Gualberto Hill (Mestre)

Curso de Medicina Veterinária – Universidade Tuiuti do Paraná

Dicezar Gonçalves (Mestre)

Curso de Medicina Veterinária – Universidade Tuiuti do Paraná

Wellington Hartmann (Mestre)

Curso de Medicina Veterinária – Universidade Tuiuti do Paraná

Cristiano José da Silva (Médico Veterinário Autônomo)

Ana Paula Borsari (Médica Veterinária Autônoma)

Resumo

Esta revisão mostra como se pode utilizar radioimunoensaios para determinar velocidade de síntese, degradação e o tempo de meia vida de proteínas. As velocidades de síntese e degradação diferem de uma proteína para outra e são afetadas pelas condições fisiológicas, nem sempre fáceis de serem controladas entre um experimento e outro. Assim, podem-se observar valores de velocidades de degradação numericamente iguais às velocidades de sínteses de proteínas. Os dados apresentados neste trabalho mostram evidências que a síntese e a degradação são mecanismos que ocorrem simultaneamente no organismo vivo.

Palavras chaves: proteínas, velocidade de síntese, velocidade de degradação, tempo de meia vida, radioimunoensaios.

Abstract

This minireview shows how one can use radioimmunoassay to determine rates of synthesis and degradation, and half-life time of proteins. The rates of synthesis and degradation differ among different proteins and are greatly affected by physiological conditions not easily controlled from one experiment to the next. So one can observed rates of degradation equal in magnitude to the normal rate of synthesis of the protein. The data presented in this paper shows evidence that synthesis and degradation is mechanisms, which occur, simultaneously in living organism.

Key words: proteins, rates of synthesis, rates of degradation, half-life time, and radioimmunoassay.

1 Introdução

Existem alguns metabólitos que interferem favorável ou desfavoravelmente sobre as velocidades de síntese e de degradação das proteínas de organismos (Kenney, 1962; Feigelson *et al.*, 1962; Tata *et al.*, 1963; Ferguson *et al.*, 1967; Hansen *et al.*, 1977; Funayama *et al.*, 1981). Existem evidências inequívocas que alterações dos sistemas endócrinos ou do estado fisiológico do organismo interferem nas velocidades de biossíntese de proteínas. A determinação precisa desses parâmetros cinéticos é de fundamental importância para o esclarecimento de muitos mecanismos fisiológicos envolvidos nos processos de síntese “de novo”. Esta necessidade despertou o interesse de idealizar e padronizar metodologias que possibilitassem quantificar tais parâmetros por muitos grupos de pesquisas.

Este trabalho de revisão, mostra de maneira acessível à estratégia bioquímica idealizada por Funayama *et al.* em 1981 que sugere uma metodologia simples

para determinação das velocidades de síntese, velocidade de degradação e o tempo de meia vida de proteínas, e, analisa comparativamente os modelos matemáticos propostos por Segal & Kim (1963), Williams & Neidhardt (1969) e Funayama *et al.* (1981).

2 Materiais e métodos

As cinéticas de aparecimento e desaparecimento de determinada proteína em função do tempo, em qualquer organismo, podem ser avaliadas determinando as atividades específicas (atividade biológica da proteína por miligramas das proteínas totais) em diferentes estágios da vida ou em diferentes condições fisiológicas (Ferguson *et al.*, 1967; Hansen *et al.*, 1977, Williams & Neidhardt, 1969; Funayama *et al.*, 1979; Gancedo *et al.*, 1980).

Este trabalho sumariza um método para determinação das velocidades de síntese e degradação de proteínas com boa precisão, desde que obedecidas as seguintes etapas: a) isolamento e purificação da proteína modelo até a homogeneidade eletroforética em gel de poliacrilamida (Funayama *et al.*, 1979); b) preparo de anticorpos específicos em coelhos albinos New Zealand contra a proteína estudada (Funayama *et al.*, 1979); c) incorporação de um aminoácido radioativo, a L-(4,5 ³H) leucina, na molécula da proteína; d)

emprego de técnicas bioquímicas e imunoradioativas (Funayama *et al.*, 1981); e emprego dos modelos matemáticos para determinação dos parâmetros da síntese e degradação de proteínas.

2.1 Modelo matemático I

A velocidade com que a concentração da proteína em estudo varia em determinada condição fisiológica do organismo, foi assumida por Williams & Neidhardt (1969), como a soma algébrica das velocidades de síntese e de degradação, ambas reações de primeira ordem.

$$(1) \quad \frac{\delta P^*}{\delta t} = k_1 [P] - k_2 [P^*]$$

onde [P] é a quantidade total de proteínas (mg/mL), [P*] é a quantidade da proteína estudada (expressa em atividade biológica por mililitro da preparação) e k_1 e k_2 são constantes de velocidades de síntese e degradação respectivamente.

$$(2) \quad k_1 [P] = \frac{\delta P^*}{\delta t} + k_2 [P^*]$$

A velocidade de síntese protéica total é expressa pela equação (3) e a equação (4) traduz a atividade específica que eventualmente a proteína em estudo pode atingir no *steady-state* (equilíbrio). Substituindo as equações (3) e (4) na equação (2), teremos a equação (5).

$$(3) \quad \frac{\delta P}{\delta t} = k_3[P]$$

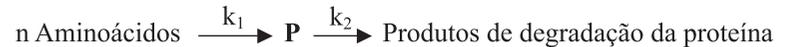
$$(4) \quad \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{P^*(t)}{P(t)} = P_{S^*}$$

$$(5) \quad k_1 = P_{S^*} (k_2 + k_3)$$

A partir da equação (5), pode-se calcular o valor de k_1 que é a velocidade de síntese de P^* (unidades de atividade biológica x mg de proteínas⁻¹ x hora⁻¹), k_2 (hora⁻¹) é a velocidade de inativação ou de degradação de P^* , k_3 (hora⁻¹) é a velocidade de proliferação das células que produzem P^* que tende para P_{S^*} . O valor de P_{S^*} (atividade específica da proteína P^* no equilíbrio biológico) deve ser determinado experimentalmente.

2.2 Modelo Matemático II

Desde que a concentração de aminoácidos, em qualquer sistema biológico é infinitamente grande em relação à concentração de determinada proteína, podemos assumir que a velocidade com que a referida concentração se altera, é igual a soma algébrica da velocidade de síntese de ordem zero e da velocidade de degradação de primeira ordem.



A quantidade de proteína sintetizada na unidade de tempo será determinada pela equação (1):

$$(1) \quad \frac{\delta P}{\delta t} = k_1 - k_2[P]$$

onde P é a quantidade da proteína, k_1 é a velocidade de síntese e k_2 é a velocidade de degradação ou de inativação da proteína. Num período de tempo muito curto a quantidade de proteína sintetizada é igual a zero, equação (2):

$$(2) \quad \frac{\delta P}{\delta t} = 0 \quad \text{logo, } k_1 - k_2[P] = 0 \quad \text{ou} \quad (3) \quad k_1 = k_2[P_0]$$

onde o P_0 da equação (3) é uma quantidade de proteína muito pequena de modo que, nesta fase, a velocidade de síntese é numericamente igual à velocidade de degradação. Substituindo o valor de k_1 da equação (3) na equação (1) temos a equação (4).

$$(4) \quad \frac{\delta P}{\delta t} = k_2[P_0] - k_2[P]$$

$$(5) \quad \delta P = k_2[P_0]\delta t - k_2[P]\delta t$$

Dividindo a equação (5) por dP , desenvolvendo a expressão resultante e isolando o valor de dt teremos a equação (6).

$$(6) \quad \delta t = \frac{\delta P}{k_2[P_0] - k_2[P]} = \frac{\delta P}{k_2[P_0 - P]}$$

Integrando a equação (6) dentro dos limites t_0 a t e P a P_s^* , teremos:

$$(7) \quad \int_{t_0}^t \delta t = \frac{1}{k_2} \int_P^{P_s^*} \frac{\delta P}{[P_0 - P]}$$

Multiplicando a equação (7) por k_2 e desenvolvendo a expressão resultante teremos a equação (8).

$$(8) \quad k_2 \int_{t_0}^t \delta t = \int_P^{P_s^*} \frac{\delta P}{[P_0 - P]} = - \int_P^{P_s^*} \frac{\delta P}{[P - P_0]}$$

Se $[P - P_0] = v$ e $\delta v = -\delta P$ e sabendo-se que: $\int \frac{\delta v}{v} = \ln v$

Desenvolvendo a equação (8) teremos a equação final.

$$\ln [P - P_0] = \ln [P_s^* - P_0] - k_2 t$$

Plotando $\ln [P - P_0]$ na ordenada e tempo na abscissa, a inclinação da reta descendente permite a determinação de k_2 , a constante de velocidade de degradação.

2.3 Modelo matemático III

Para determinar o tempo de meia vida ($t/2$) de uma proteína ou de qualquer substância, pode-se utilizar o modelo matemático abaixo, desde que se conheça a verdadeira constante de velocidade de degradação.

Consideremos a equação (1), onde P é a concentração da proteína analisada e k a sua constante de velocidade de degradação.

$$(1) \quad - \frac{\delta P}{\delta t} = k[P] \quad \text{Integrando a equação (1) temos:}$$

$$(2) \quad - \int \frac{\delta P}{P} = k \int \delta t$$

$$(3) \quad - \ln P = kt + C \quad \text{onde, C é a constante de integração.}$$

Para um tempo igual a $t = 0$, a equação (3) pode ser escrita da seguinte forma:

$-\ln P = C = -\ln P_i$. Substituindo esse valor na equação (3) obtemos a equação (4).

$$(4) \quad \ln P_i - \ln P = kt \quad , \text{ onde } P_i \text{ é a quantidade inicial da proteína.}$$

Admitindo-se que os processos de degradação ou de inativação obedecem às reações de primeira ordem, então, num tempo $t = t/2$ a quantidade da proteína P será igual a $P_i/2$. Substituindo esses valores na equação (4), teremos a equação final que permite a determinação do tempo de meia vida da proteína em estudo.

$$\text{ou} \quad \frac{t}{2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \frac{t}{2} = \frac{0,6931}{k}$$

Proteína analisada (Organismo) (Condição fisiológica)	Modelos matemáticos	Atividade específica [mU/mg]	Constante de velocidade de síntese (k_1) [mU/mg/h]	Constante de velocidade de degradação [k_2]	Tempo de meia vida [t/2]
Alanina amino transferase (ratos sem tratamento)	Segal & Kim (1963)	31,40	151	4,80 h	0,144 h
Alanina amino transferase (ratos sem tratamento)	Deste trabalho	-	155	4,94 h	0,140 h
Alanina amino transferase (ratos tratados com glucocorticoide)	Segal & Kim (1963)	108	1555	14,40 h	0,048 h
Alanina amino transferase (ratos tratados com glucocorticoide)	Deste trabalho	-	1590	14,80	0,046 h
Histidil-tRNA sintetase (<i>Escherichia coli</i> em crescimento)	Williams & Neidhardt (1969)	42	61	1,45 h	0,47 h
Histidil-tRNA sintetase (<i>Escherichia coli</i> em crescimento)	Deste trabalho	-	60	1,43 h	0,48 h
Frutose-1,6-bisfosfatase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> em crescimento)	Deste trabalho	57	4,8	0,084 h	8,25 h
Frutose-1,6-bisfosfatase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> em crescimento na presença de etanol e tratada com glucose).	Deste trabalho	8,57	15	1,74 h	0,398 h

3 Resultados e discussão

Este trabalho mostra três desenvolvimentos de modelos matemáticos para determinação de velocidade de síntese, velocidade de degradação e tempo de meia vida de proteínas de maneira simples e objetiva.

Os dados experimentais empregados nas equações propostas, forneceram valores de velocidade de síntese, velocidade de degradação e tempo de meia vida bastante coerente com os publicados por diferentes grupos de pesquisas. A tabela abaixo ilustra comparativamente alguns desses parâmetros. Em um grande número de modelos biológicos (Kenney, 1962; Feigelson *et al.*, 1962; Tata *et al.*, 1963; Segal & Kim, 1963; Ferguson, 1967; Williams & Neidhardt, 1969; Hansen *et al.*, 1977; Funayama *et al.*, 1979; Gancedo *et al.*, 1980; Funayama *et al.*, 1981; Thomaz *et al.*, 1983; Pardo *et al.*, 1992; Twerdochilib *et al.*, 1994), temos observado que as sínteses de proteínas são passíveis de serem induzidas ou estimuladas em um mesmo organismo submetido a uma determinada condição fisiológica. Isto significa que a síntese e a degradação

de proteínas ocorrem paralelamente e que a velocidade de síntese pode superar a velocidade de degradação e vice-versa, dependendo da condição fisiológica do organismo no momento da avaliação destes parâmetros. Parece-nos racional admitir que num organismo em crescimento a velocidade de síntese supere a velocidade de degradação, em organismos adultos tenham valores equivalentes e em organismos doentes e/ou envelhecidos a velocidade de degradação supere a velocidade de síntese. É razoável ainda admitir que a função biológica do processo de degradação é a eliminação de proteínas que deixaram de ter significado estrutural e ou funcional por alterações do metabolismo. Esse processo, no entanto não deve ser visto como puramente degradativo e sim também como um mecanismo auxiliar para ressíntese de proteínas, uma vez que, o organismo poderá reutilizar os aminoácidos resultantes da degradação para biossíntese de novas proteínas, agora necessárias para adaptação à nova condição fisiológica ou mesmo para simples reposição da proteína cuja vida média já tenha atingido.

Referências bibliográficas

- FEIGELSON, M.; GROSS, P. R.; FEIGELSON, P. (1962). Early effects of cortisone on nucleic acid and protein metabolism of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 55: 495.
- FERGUSON, J. Jr.; BOLL, M.; HOLZER, H. (1967). Yeast malate dehydrogenase: Enzyme inactivation in catabolite repression. *European Journal of Biochemistry*, 1: 21-25.
- FUNAYAMA, S.; GANCEDO, J.M.; GANCEDO, C. (1981). Turnover of yeast Fructose Bisphosphatase in different metabolic conditions. *European Journal of Biochemistry*, 109: 61-66.
- FUNAYAMA, S; MOLANO, J; GANCEDO, C. (1979). Purification and properties of a D-Fructose-1, 6 bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 197: 170-177.
- GANCEDO, C.; FUNAYAMA, S.; GANCEDO, J. M. (1980). Physiological Inactivation of Enzyme in Yeast. In: MILDNER, P. & RIES, B. (eds.). *Enzyme Regulation and Mechanism of Action*. Oxford: Pergamon Press, pp.15-22.
- HANSEN, R. J.; SWITZER, R. L.; HINZE, H.; HOLZER, H. (1977). Effects of glucose and Nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 496: 103-114.
- KENNEY, F. T. (1962). Induction of tyrosine- α -ketoglutarate transaminase in rat liver. IV. Evidence for an increase in the rate of enzyme synthesis. *Journal Biological Chemistry*, 237: 3495 - 3498.
- PARDO, E. H.; FUNAYAMA, S.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U. (1992). *Pichia stipitis* L-rhamnose dehydrogenase and a catabolite-resistant mutant able to utilize 2-deoxy-D-glucose. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 417 - 422.
- SEGAL, H. L. & KIM, Y. S. (1963). Glucocorticoid stimulation of the biosynthesis of glutamic-alanine transaminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 50: 912-917.
- TATA, J. R.; ERNSTER, L.; LINDBERG, O.; ARRHENIUS, E.; PEDERSEN, S.; HEDMAN, R. (1963). The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochemical Journal*, 86: 408 - 428.

THOMAZ, V.; ZANCAN, G. T.; FUNAYAMA, S. (1983). Regulation of L-lactate dehydrogenase levels in *Dactylium dendroides*. *Revista de Microbiologia*, 14: 259 - 264.

TWERDOCHILIB, A. L.; PEDROSA, F. O.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. (1994). L-Rhamnose metabolism in *Pichia stipitis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 896-902.

WILLIAMS, L. S. & NEIDHARDT, F. C. (1969). Synthesis and inactivation of aminoacyl-transfer RNA synthetases during growth of *Escherichia coli*. *Journal Molecular Biology*, 43: 529-550.