

Aplicação de espectroscopia de fluorescência de emissão no estudo das interações entre proteínas e ligantes

Alessandra Prando* (PG) e Ljubica Tasic (PQ).

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp - *alessandra@iqm.unicamp.br; ljubica@iqm.unicamp.br

Fluorescência, interação proteína ligante, Hsp90 da laranja, ATP.

Introdução

O estudo das interações entre proteínas ajuda a entender o funcionamento das células e a interação entre proteínas e ligantes auxilia no desenho de fármacos. Para estes estudos foi utilizada a técnica de Espectroscopia de Fluorescência de Emissão¹. Como as proteínas apresentam aminoácidos cromóforos como o triptofano (Trp), esta técnica é usualmente empregada para estudar o comportamento das proteínas em solução e frente a ligantes.

Neste trabalho relatamos a investigação das interações da Hsp90 (Heat Shock Protein) da laranja², de aproximadamente 90 kDa, com o objetivo de definir suas interações com os três possíveis ligantes: ATP, ADP e ATP γ S. Além disso, pretendemos, também, estudar a interação desta com a geldanamicina, um inibidor que se liga a esta proteína alterando a sua função. Acreditamos que estas interações são importantes em atuação de Hsp90, já que a sua função é auxiliar o enovelamento correto de várias proteínas inclusive, da patogenicidade e virulência.

Resultados e Discussão

A proteína escolhida para os testes de interação proteína-ligante foi a Hsp90 da laranja em colaboração com o grupo do Prof. Carlos H. I. Ramos. Esta proteína apresenta na sua estrutura primária 6 resíduos de triptofano (W,Trp) e é um bom alvo para estudos por fluorescência de emissão. O espectro de fluorescência de emissão para a proteína alvo titulada com o ligante ADP está na Figura 1, e os valores de Kd calculados para todos ligantes estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de Kd calculados a partir da titulação da proteína Hsp90 com os ligantes.

Ligantes	Kd (10 ⁻⁶)
ATP	4,97
ADP	2,67
ATP γ S	1,71
Geldanamicina	0,17

*O cálculo de Kd foi baseado considerando que todos os resíduos de Trp comportassem de forma similar.

As concentrações da proteína e dos ligantes ATP, ADP, ATP γ S e geldanamicina, foram: $2,67 \times 10^{-6}$, 80×10^{-3} , 80×10^{-3} , 80×10^{-3} e $1,78 \times 10^{-3}$ molL⁻¹, respectivamente. As análises foram realizadas em espectrofluorímetro Varian com cubeta de quartzo de caminho ótico de 10mm. A proteína foi excitada em 277nm e teve emissão máxima em 340nm.

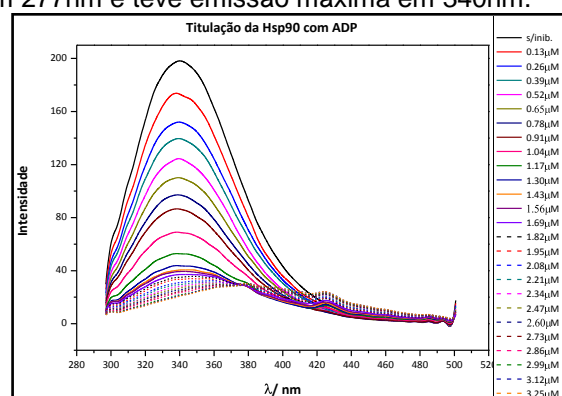


Figura 1. Titulação da proteína Hsp90 da laranja com o ligante ADP.

Conclusões

Neste trabalho foi observado a interação da Hsp90 com os dois ligantes naturais ATP e ADP, ATP γ S uma molécula conhecida como potencial ligante e o inibidor geldanamicina. Verificou-se que a geldanamicina é um inibidor potente (Kd menor) e que sua interação com a Hsp90 é bem mais forte que os ligantes naturais (ATP e ADP). Além disso, notou-se que a interação da proteína Hsp90 com os ligantes ATP e ADP (Fig.1) afeta os resíduos de Trp devido ao notável decaimento de fluorescência de emissão. Também, observou-se mudanças em espectro da Hsp90-ligante e novos máximos de emissão.

Agradecimentos

Capes, CNPq, IQ-UNICAMP, Laboratório de Química Biológica e Laboratório do Prof. Dr. Carlos H. I. (Yuri A. Mendonça).

¹ Tasic, L.; Borin, P.F.L.; Khater, L.; Ramos, C.H.I. *Protein Expr. Purif.* **2007**, *53*, 363.

² Garavaglia, B.S.; Garofalo, C.G.; Orellano, E.G.; Ottado, J. *Eur J.Plant Pathol* **2009**, *123*, 91.