

# Estudo do processo de agregação da proteína p53 por espectroscopia Raman

Vanessa E. de Oliveira (PQ)<sup>\*1</sup>, Luciana Rangel (PQ)<sup>1</sup>, Luiz F. C. de Oliveira (PQ)<sup>2</sup>, Jerson Lima (PQ)<sup>1</sup>

\*[vanessaenddeoliveira@yahoo.com.br](mailto:vanessaenddeoliveira@yahoo.com.br)

<sup>1</sup> Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ - CCS -Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21941-901.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Campus Martelos – Juiz de Fora – Minas Gerais, MG – CEP 36036-900.

Palavras Chave: p53, Raman, agregação.

## Introdução

p53 é uma proteína de massa molecular 53 kDa<sup>1</sup> conhecida como “guardião do genoma”. Ela atua como um fator de transcrição, ativando genes envolvidos no reparo do DNA<sup>1,2</sup>. 50% dos casos de câncer apresentam mutações nesta proteína, sendo estas relacionadas à agregação específica desta proteína no citoplasma<sup>2</sup>.

O estudo de materiais biológicos por espectroscopia Raman é justificado pela possibilidade de realização das medidas *in situ* e na presença de água<sup>3</sup>. No caso específico de proteínas, esta técnica é excepcional tanto na execução da medida (sem grandes manipulações) quanto na possibilidade de explorar efeitos eletrônicos (utilização de várias linhas laser)<sup>4</sup>.

O espectro Raman de proteínas mostra uma série de bandas características sensíveis a influências estruturais locais<sup>5</sup>. Neste trabalho foi investigado o efeito da desnaturação por aumento de temperatura nas propriedades espectroscópicas da proteína p53. Trata-se de um efeito de perda de estrutura tridimensional suficiente para causar perda de função<sup>6</sup>. No caso específico do estudo Raman com a intenção de monitorar a agregação é de grande relevância as estruturas secundárias e terciárias.

## Resultados e Discussão

As medidas Raman foram realizadas em duas diferentes linhas laser com excitação em 514.5 e 1064 nm. As medidas foram realizadas em no máximo 10 minutos em solução tampão (Tris); 500 scans; resolução de 4 cm<sup>-1</sup>; para desnaturação a amostra foi mantida por 5h sob 17 °C.

O espectro Raman do padrão p53 (domínio central) nas duas linhas mostrou bandas bem definidas com pequenas diferenças nas porções extremas do espectro. A região do espectro acima de 2800 cm<sup>-1</sup> apresenta bandas associadas aos modos  $\nu(\text{NH})/(\text{CH})/(\text{OH})$  com grandes diferenças em suas intensidades relativas.

A segunda porção com grandes diferenças espectrais são as bandas abaixo de 800 cm<sup>-1</sup> que, no caso da linha em 1064 nm, apresentou 2 bandas alargadas com considerável intensidade relativa. Neste caso chama-se a atenção para a banda em 790 cm<sup>-1</sup>: atribuída à força das interações de hidrogênio e, que à medida que a proteína se desnatura ocorre diminuição em sua intensidade relativa devido à diminuição das interações intramoleculares (desenovelamento).

Em relação à desnaturação observa-se que após o tempo pré-determinado, o espectro apresenta alterações principalmente na faixa de “impressão digital” de 2000 a 1000 cm<sup>-1</sup>. Nesta região são observados os modos  $\nu(\text{C}\equiv\text{C})/\nu(\text{C}=\text{O})/ \nu(\text{C}=\text{C})/(\text{CO})/\delta(\text{CH})$  (região mais alargada que na proteína “padrão”). Para a proteína padrão, estas bandas estão mais definidas que na desnaturada provavelmente devido a maior organização daquela em relação à desenovelada. No caso da proteína não estruturada os

resíduos encontram-se mais “disponíveis” para efetivas interações de hidrogênio (da água presente no meio), promovendo maior alargamento das respectivas bandas.

O modo amida I é observado em cerca de 1650 (média/alargada) e 1550 cm<sup>-1</sup> (muito fraca) para as duas proteínas (padrão e desnaturada). Esta banda é mais especificamente atribuída ao modo estiramento C=O com pequenas contribuições dos modos  $\nu(\text{C-N})$  e  $\delta(\text{NH})$ . Assim, com o processo de agregação há alteração na energia necessária para estas vibrações: no espectro do agregado a banda se torna mais alargada e com menor intensidade relativa que a banda em 1465 cm<sup>-1</sup> ( $\delta(\text{CH})$ ).

A faixa em baixa frequência (50-500 cm<sup>-1</sup>) fornece informações sobre a dinâmica de proteínas, seus acoplamentos e relações com solventes. De modo geral, esta região expressa alterações de ambiente e a resposta da proteína à nova condição, no caso, de agregados. São observadas claramente duas bandas largas em 475 e 143 cm<sup>-1</sup> para ambas as amostras. Com o início da agregação, a banda centrada em 475 cm<sup>-1</sup> se apresenta ainda mais alargada com um “ombro” em 419 cm<sup>-1</sup>; além de uma nova banda em 282 cm<sup>-1</sup>. Hédoux e colaboradores<sup>7</sup> associam esta banda ao modo  $\nu(\text{OH})$  intermolecular com contribuição das moléculas de água presentes no meio. A alteração do perfil destas bandas em especial (e, do espectro como um todo) sugere fortemente alteração na estrutura da proteína em consequência da agregação.

## Conclusões

O presente estudo sugere que a técnica Raman é uma ferramenta muito útil e sensível para acompanhamento da integridade proteica. Constatou-se que a temperatura de 17 °C já é suficiente para se detectar o início de agregação, sendo possível observar alterações espectroscópicas passíveis de fornecer dados confiáveis para monitoramento do processo de agregação (mesmo em condições bastante iniciais de desenovelamento).

## Agradecimentos

CNPq, FAPERJ, CETEM e INCT.

(1) Silva, J. L.; Vieira, T. C. R. G.; Gomes, M. P. B.; Bom, A. P. A.; Lima, L. M. T. R.; Freitas, M. S.; Ishimaru, D.; Cordeiro, Y.; Foguel, D. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *43*, 271. (2) Xu, J.; Reumers, J.; Couceiro, J. R.; De Smet, F.; Gallardo, R.; Rudyak, S.; Cornelis, A.; Rozenski, J.; Zwolinska, A.; Marine, J.-C.; Lambrechts, D.; Suh, Y.-A.; Rousseau, F.; Schymkowitz, J. *Nat Chem Biol* **2011**, *7*, 285. (3) Ashton, L.; Dusting, J.; Imomoh, E.; Balabani, S.; Blanch, E. W. *Biophysical Journal* **2010**, *98*, 707. (4) Oladepo, S. A.; Xiong, K.; Hong, Z.; Asher, S. A. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 334. (5) Shashilov, V. A.; Lednev, I. K. *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *40*, 1749. (6) Meredith, S. C. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, *1066*, 181. (7) Hédoux, A.; Guinet, Y.; Paccou, L. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 6740.