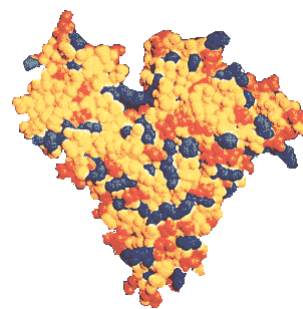


## **DETEÇÃO DE VARIAÇÕES CONFORMACIONAIS DE PROTEÍNAS POR TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA**

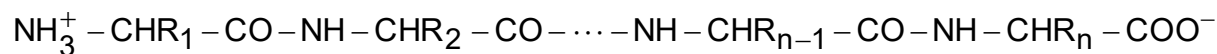


### **1. OBJETIVOS**

- Familiarização com a utilização de sondas fluorescentes intrínsecas dos sistemas biológicos.
- Detecção do processo de transferência de energia entre aminoácidos de uma proteína.
- Inferir as variações de conformação da proteína através da transferência direta de energia eletrônica.

### **2. INTRODUÇÃO**

As proteínas constituem a maior classe de compostos biológicos. São constituídas por polímeros de 20  $\alpha$ -aminoácidos diferentes, com fortes ligações peptídicas entre eles. Assim, a estrutura básica covalente de uma proteína é uma cadeia polipeptídica:



Uma proteína contém um número de aminoácidos superior a 50. Das diferentes combinações dos aminoácidos resultam macromoléculas biológicas distintas e com diferentes funções.

Este trabalho consiste na detecção das variações conformacionais da proteína albumina do soro bovino (BSA) com o pH do meio.

A albumina do soro (bovino – BSA ou humano – HSA) é a proteína mais abundante do sistema circulatório e vários estudos têm demonstrado que esta proteína é a principal responsável pela manutenção do pH do sangue. A estrutura proposta para a albumina do soro é em forma de coração [1,2] (fig. 1).

A lista de aminoácidos [3,4] que constituem a albumina do soro bovino (BSA) encontra-se na tabela 1.

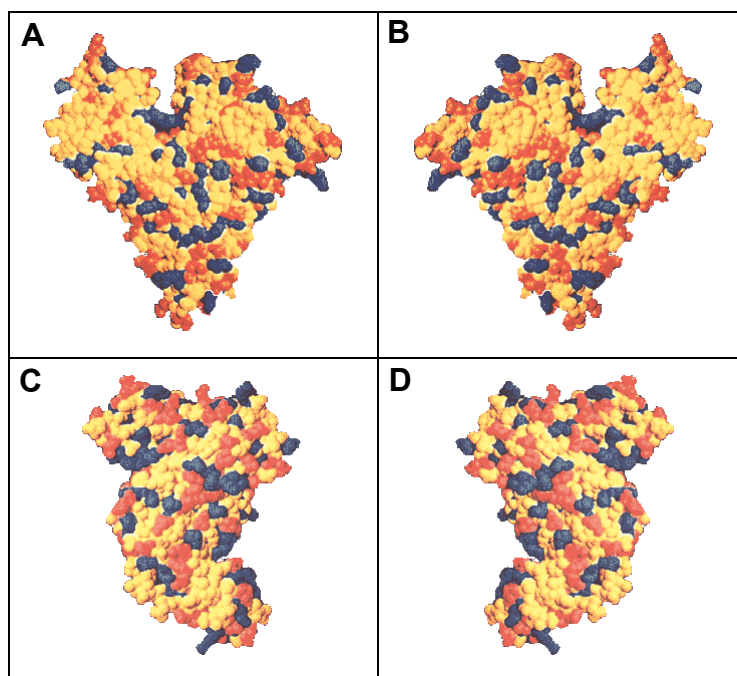
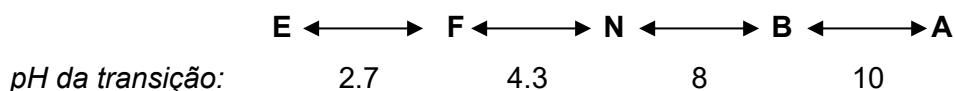


Figura 1 – Modelo da estrutura da proteína BSA, (A) vista de frente, (B) vista de trás, (C) lado esquerdo, (D) lado direito. Azul: resíduos básicos; Vermelho: resíduos ácidos; Amarelo: resíduos neutros.

Tabela 1 – Aminoácidos que constituem a BSA

Alanina (Ala): 48	Cisteína (Cys): 35	Aspartato (Asn): 41	Glutamato (Glu): 58
Fenilalanina (Phe):	Glicina (Gly): 17	Histidina (His): 16	Isoleucina (Ile): 15
Lisina (Lys): 60	Leucina (Leu): 65	Metionina (Met): 5	Asparagina (Asn):
Prolina (Pro): 28	Glutamina (Gln):	Arginina (Arg): 26	Serina (Ser): 32
Treonina (Thr): 34	Valina (Val): 38	Triptofano (Trp): 3	Tirosina (Tyr): 21

Com a variação do pH do meio, a proteína BSA sofre mudanças de conformação reversíveis [5], podendo exibir as formas **E** (*Expanded*), **F** (*Fast*), **N** (*Normal*), **B** (*Basic*) e **A** (*Aged*):



Na figura 2 apresentam-se, esquematicamente, algumas das diferentes conformações da BSA. Por aquecimento acima de 62 °C ou por adição de um tensioativo, a albumina do soro bovino sofre desnaturação, perdendo, no todo ou em parte, a sua estrutura em hélice.

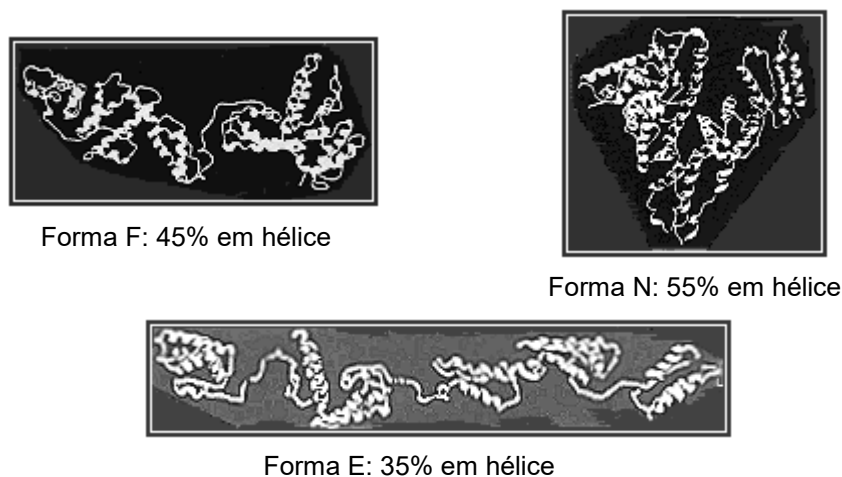


Figura 2 – Representação esquemática das conformações E, F e N da proteína BSA.

### 3. TRANSFERÊNCIA DIRETA DE ENERGIA ELETRÔNICA

A proteína BSA contém os aminoácidos fluorescentes tirosina e triptofano (fig. 3), na proporção de 21 para 3 (tabela 1). Para comprimentos de onda na região de 250 a 285 nm, é possível excitar ambos os aminoácidos e observar a sua emissão de fluorescência, dado que ambos

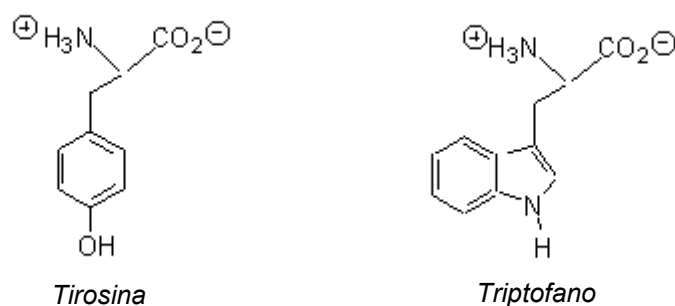


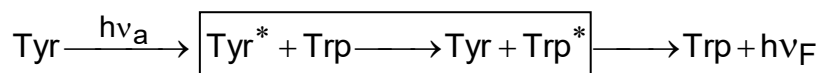
Figura 3 – Estrutura dos aminoácidos tirosina (Tyr) e triptofano (Trp).

Tabela 2 – Valores dos máximos de absorção e emissão e rendimento quântico de fluorescência,  $\phi_F$ , para a tirosina e o triptofano [6].

Resíduo	$\lambda_{\max}$ absorção (nm)	$\lambda_{\max}$ emissão (nm)	$\phi_F$
Triptofano (Trp)	280	348	0.20
Tirosina (Tyr)	274	303	0.14

Devido à existência de sobreposição espectral entre a emissão da tirosina e a absorção do triptofano, pode verificar-se um processo de transferência direta de energia da tirosina para o triptofano.

Neste processo de transferência de energia, uma molécula excitada de doador (Tyr\*) é desativada, transferindo a sua energia de excitação eletrónica para um aceitante (Trp):



em que \* designa a espécie no estado eletrónico excitado,  $h\nu_a$  é a energia da radiação absorvida pela Tyr, e  $h\nu_F$  é a energia da emissão de fluorescência do Trp. Desta forma, excitando o doador (Tyr) é possível observar a emissão do aceitante.

Este processo depende marcadamente da distância entre o doador (Tyr) e o aceitante (Trp). De facto, segundo o mecanismo de Förster, tem-se [6]:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \times \left( \frac{r_0}{r} \right)^6$$

em que  $k_{ET}$  é a constante de velocidade de transferência de energia,  $\tau_D$  é o tempo de vida do doador,  $r$  é a distância doador-aceitante e  $r_0$  é a distância crítica de transferência, à qual a eficiência de transferência iguala a eficiência do decaimento espontâneo.

## 4. TÉCNICA EXPERIMENTAL

### 4.1. Preparação de soluções

As soluções-tampão necessárias já se encontram preparadas.

- Preparar uma solução aquosa (pH=7) de tirosina  $4 \times 10^{-5}$  M, a partir de uma solução-mãe  $5 \times 10^{-4}$  M.
- Preparar uma solução aquosa (pH=7) de triptofano  $5.7 \times 10^{-6}$  M, a partir de uma solução-mãe  $10^{-3}$  M.
- A partir das soluções-mãe, preparar uma solução mista (pH=7) de tirosina e triptofano na proporção 21:3, com a concentração  $4 \times 10^{-5}$  M em tirosina.
- Preparar soluções aquosas (pH=7 e pH=2) da proteína BSA de concentração  $10^{-6}$  M, a partir da solução-mãe já existente aprox.  $10^{-4}$  M.

### 4.2. Traçado de espectros de absorção e emissão

Traçar os espectros de absorção das seguintes soluções, utilizando como referência a solução-tampão de pH=7:

- Solução aquosa diluída de tirosina a pH=7, entre 240 nm e 310 nm;
- Solução aquosa diluída de triptofano a pH=7, entre 240 nm e 310 nm.
- Solução mista 21:3 nas mesmas condições.

Traçar os espectros de emissão das seguintes soluções entre 280 nm e 450 nm ( $\lambda_{exc}=270$  nm):

- Solução aquosa diluída de tirosina a pH=7;
- Solução aquosa diluída de triptofano a pH=7;
- Solução diluída mista (pH=7) de tirosina e triptofano 21:3;
- Soluções aquosas de proteína BSA com pH=7 e pH=2.

#### 4.3. Efeito da adição de detergente

- Adicionar uma gota de detergente SLS diluído à célula de fluorescência que contém a solução da proteína BSA com pH=7.
- Traçar de novo o espectro de fluorescência da solução, nas mesmas condições que anteriormente.

### 5. ANÁLISE DE RESULTADOS

1. Compare os espectros de absorção e emissão da tirosina e do triptofano. O que pode concluir acerca da possibilidade de transferência direta de energia entre estes dois aminoácidos?
2. Compare os espectros de emissão das soluções de aminoácidos puros com o da solução mista Tyr/Trp 21:3. *Sugestão:* Faça a soma dos espectros das soluções de aminoácidos puros.
3. Compare o espectro de emissão da solução mista Tyr/Trp 21:3 com o espectro da solução de proteína BSA ao mesmo pH. Como explica as diferenças encontradas?
4. Analisando os espectros de emissão das soluções de proteína BSA a pH=7 e pH=2, o que pode inferir sobre as conformações adquiridas pela proteína?
5. Analise o efeito do detergente na proteína, baseando-se no espectro obtido após a adição de SLS.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] D.C. Carter, J.X. Ho, *Adv. Protein Chem.* **45** (1994) 153.
- [2] D.C. Carter, X.M. He, S.H. Munson, P.D. Twigg, K.M. Gernert, M.B. Broom, T.Y. Miller, *Science* **244** (1989) 1195.
- [3] R.G. Reed, F.W. Putnam, T. Peters Jr., *Biochem. J.* **191** (1980) 867.
- [4] K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, K.I. Fukuhara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173** (1990) 639.
- [5] J.F. Foster, in *"Albumin Structure, Function and Uses"*, V. M. Rosenoer, M. Oratz, M.A. Rothschild, Eds., Pergamon, Oxford, 1977.
- [6] C.R. Cantor, P.R. Schimmel, *"Biophysical Chemistry - Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function"*, Freeman and Co., New York, 1980.