

7. Efeitos estruturais na Na⁺, K⁺-ATPase devido às fenotiazinas

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína integral que tem como função principal transportar íons de sódio e potássio contra um gradiente eletroquímico. O mecanismo de bombeamento é baseado na mudança conformacional principalmente de sua subunidade α . O transporte destes íons está associado com a oscilação da proteína entre seus dois principais estados conformacionais (E_1 e E_2), os quais têm diferentes afinidades por ATP. Os efeitos estruturais gerais e locais em certos sítios de importância funcional numa proteína podem ser estudados usando sondas fluorescentes extrínsecas, como a FITC, ou intrínsecas, como os resíduos triptófanos da própria proteína. A FITC é um marcador fluorescente da subunidade α da Na⁺, K⁺-ATPase que inibe a atividade desta proteína, bloqueando o sítio de alta afinidade de ATP, no aminoácido lisina 501, na conformação E_2 (Ward D. et al., 1998; Linnertz H. et al., 1998).

A fluorescência intrínseca de uma proteína deve-se aos três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. A alta sensibilidade do triptofano ao seu entorno local pode ser uma vantagem para estudos de transições conformacionais, desnaturação, etc. Para proteínas com um ou poucos triptofanos é mais fácil interpretar os dados espectrais. Geralmente as proteínas contêm vários resíduos de triptofanos expostos em ambientes distintos, mostrando espectros de emissão mais complexos.

Mudanças no estado conformacional de uma proteína conduzem também a mudanças na acessibilidade relativa dos triptofanos, e as podemos ver refletidas nas características de supressão. Por exemplo, aparecem deslocamentos nos espectros de emissão e os gráficos de Stern - Volmer são complexos. Isto é devido à supressão seletiva dos triptofanos expostos ao supressor e aqueles internos à proteína. O estado estrutural tridimensional de uma proteína ligada a membrana e sua inserção na bicamada lipídica também são fatores determinantes na acessibilidade de moléculas supressoras aos resíduos de triptofanos.

Neste capítulo, empregando as frações de membranas - Na⁺,K⁺ - ATPase daremos ênfase ao estudo dos efeitos estruturais na proteína Na⁺,K⁺ - ATPase provocados pelas fenotiazinas, sem deixar de lado os possíveis efeitos colaterais que a bicamada lipídica possa ocasionar por efeito também das interações das fenotiazinas com as membranas.

7.1. Interação da TFP com a Na⁺, K⁺-ATPase

A Fig. 7.1 (A) mostra os espectros de emissão da proteína em diferentes concentrações de TFP. As medidas foram feitas em meio anaeróbico para evitar que a TFP fotodegrade no tempo de iluminação da medida. Os resíduos de triptofanos da Na⁺, K⁺ - ATPase excitados em 284 nm, produzem emissão em 330 nm. A emissão em 474 nm corresponde às moléculas de TFP, que possuem absorvância significativa em 284 nm.

Observa-se que, para a faixa concentrações pequenas de TFP, a diminuição de fluorescência dos triptofanos é maior. Nota-se também da Fig. 7.1 (A), que tanto o máximo de emissão dos triptofanos (330 nm) como da TFP (474 nm) não estão sofrendo deslocamento. Pode estar havendo transferência de energia dos resíduos de triptofano para a TFP, já que há superposição do espectro de emissão dos triptofanos com o de absorção da TFP (Fig. 5.1).

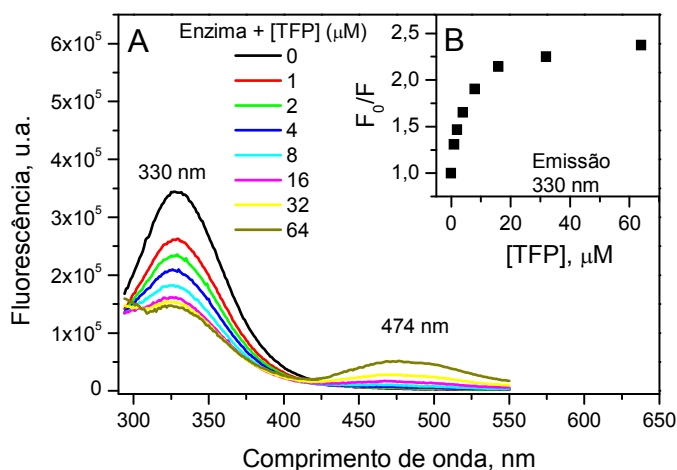


Figura 7.1. (A). Espectros de emissão da Na⁺,K⁺-ATPase (corrigidos para efeito de filtro interno) para diferentes concentrações de TFP, excitação em 284 nm. (B) Gráfico de Stern – Volmer em 330 nm (emissão do triptofano). Tampão TRIS 30 mM, Tris-fosfato 5 mM, EDTA 0,2 mM, e MgCl₂ 5 mM a pH 7,4 (para estabilizar a conformação E₂).

A Fig. 7.1 (B) mostra o gráfico de Stern-Volmer, onde observamos um efeito não linear para concentrações de TFP maiores que $8 \mu\text{M}$, indicando que nem todos os resíduos de triptofano são acessíveis à TFP.

Medidas de fluorescência da TFP (excitada também em 284 nm) foram realizadas paralelamente em ausência e em presença da proteína. A Fig. 7.2 mostra os resultados dessas medidas, em presença da membrana - Na^+ , K^+ - ATPase (A) e na ausência (B). Observa-se que o pico de emissão da TFP não se desloca em presença da proteína, porém sua intensidade fica maior.

A Fig. 7.3 mostra a intensidade de fluorescência da TFP nos casos (A) e (B) em função da concentração. Depois de ajustar os dados a uma reta achamos, por meio do coeficiente angular, que a fluorescência em (A) é quase 2,4 vezes maior que em (B), já considerando o fator de correção de filtro interno devido ao espalhamento, que foi de 1,53. Mesmo considerando que este pode estar superestimado, concluímos que a intensidade de fluorescência da TFP em membrana é maior do que em tampão por um fator f tal que $1,7 < f < 2,4$.

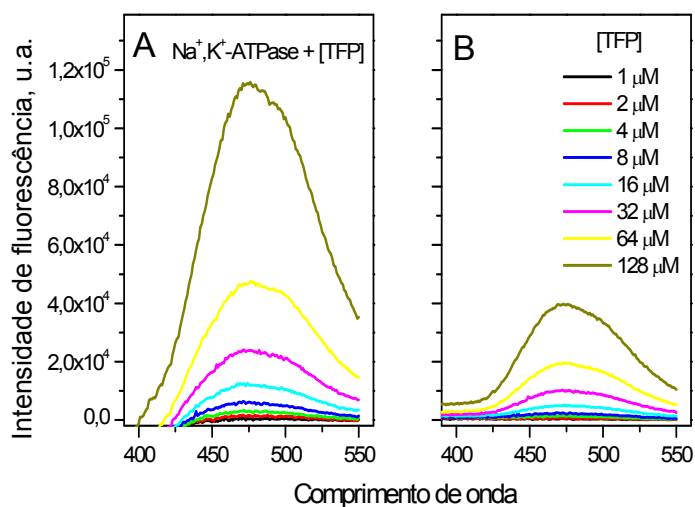


Figura 7.2. Espectros de emissão da TFP, excitada em 284 nm (corrigidos para efeito de filtro interno) em concentrações crescentes de TFP: (A) na presença e (B) ausência de membranas ricas em Na^+ , K^+ -ATPase. Em (A) subtraiu-se o espalhamento devido à membrana.

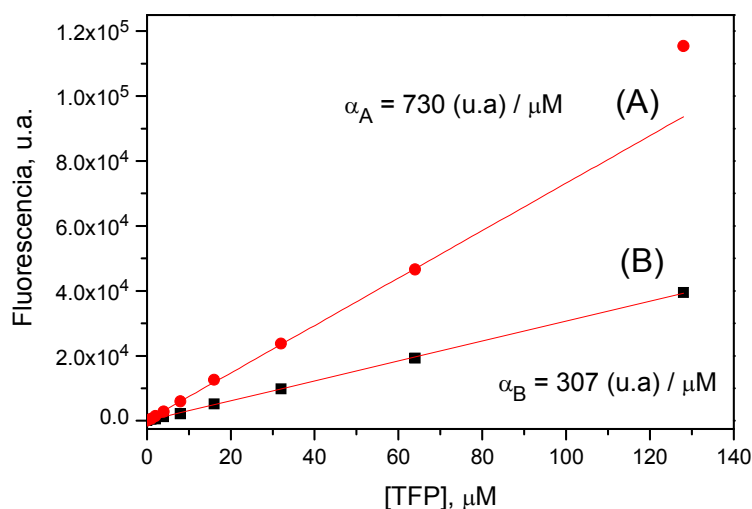


Figura 7.3. Emissão de fluorescência da TFP (A) na presença da Na⁺,K⁺-ATPase e (B) em sua ausência. A emissão foi em 474 nm e a excitação em 284 nm. Os valores de α_A e α_B representam os coeficientes angulares das retas.

A Fig. 7.4 apresenta o gráfico de Stern - Volmer modificado considerando duas populações de resíduos de triptofano, uma acessível à TFP e a outra inacessível ou embutida na proteína, sendo K_a a constante de supressão de Stern-Volmer da população acessível.

Observamos que o grau de acessibilidade depende da faixa de concentração da TFP. A concentrações menores do que 8 μM a fração de resíduos de triptofano f_a e a constante de supressão K_a foram 53% e $8,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. E para concentrações maiores f_a e K_a foram 60 % e $4,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. O parâmetro f_a indica que nem toda a fluorescência de triptofano é suprimida por TFP, em média suprime-se cerca de 56%. Conforme se vai aumentando a concentração de TFP (maior de 8 μM), a população que era antes inacessível parece tornar-se parcialmente acessível, modificando as características de supressão.

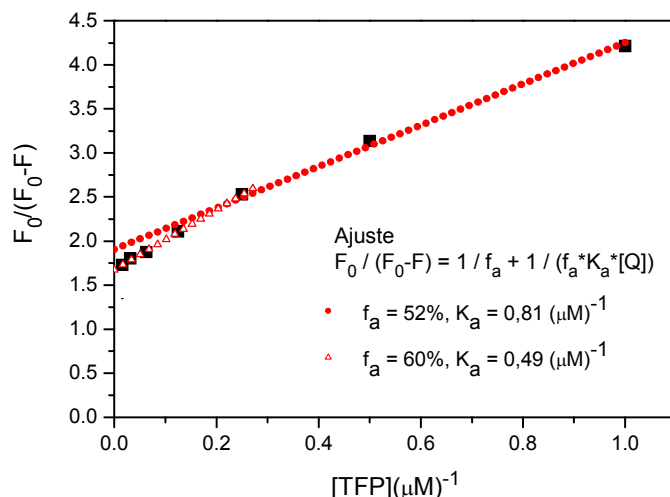


Figura 7.4. Gráfico de Stern - Volmer modificado da Na⁺,K⁺-ATPase (excitação 284 nm). f_a é a fração acessível do total de triptofano e K_a é a constante de Stern – Volmer de supressão para os resíduos de triptofano acessíveis.

A fluorescência dos resíduos de triptofanos da Na⁺, K⁺ - ATPase não é completamente suprimida, aparentemente a metade dos triptofanos parece ser afetada pela TFP (Fig. 7.1). Adhikary et al. (1994) encontraram que a CPZ suprime a fluorescência da Na⁺, K⁺ - ATPase, com $f_a= 68\%$ em presença de K⁺ e $f_a= 33\%$ em presença de Mg⁺². Nossos resultados de supressão pela TFP foram parecidos (60%).

Os resíduos de triptofano de uma proteína podem ser agrupados em quatro tipos de resíduos, com relação a sua emissão (Lakowicz, 2006): resíduos que são completamente expostos ao solvente ($\lambda_{MAX} \approx 350$ nm), resíduos parcialmente expostos, na superfície de uma proteína ($\lambda_{MAX} \approx 340$ nm), resíduos embutidos dentro da proteína, mas interagindo com grupos polares ($\lambda_{MAX} \approx 315$ nm a 330 nm), e resíduos embutidos completamente num núcleo apolar ($\lambda_{MAX} \approx 308$ nm). O máximo de emissão e o rendimento quântico do triptofano podem variar grandemente entre as proteínas. As moléculas de TFP parecem suprimir os triptofanos mais superficiais. Podemos comentar que a população de triptofano acessível à supressão está distribuída superficialmente ou é mais acessível ao solvente aquoso.

Em maior concentração de TFP, as características de supressão são alteradas (Fig. 7.4). Resíduos de triptofano podem ser encontrados dentro da bicamada lipídica perto da interface membrana e solvente (Yudouski G. et al., 2003). Ao

aumentar a concentração de TFP, a droga pode provocar mudanças conformacionais na proteína que deixem outros triptofanos mais acessíveis.

7.1.1.

Irradiação no UVB da TFP em presença da Na^+ , K^+ -ATPase

Irradiou-se em 310 nm a TFP em presença da membrana - Na^+ , K^+ - ATPase, em conformação E_2 . A Fig. 7.5 A mostra os espectros de emissão da TFP, com excitação em 310 nm, para diferentes tempos de irradiação. O espectro de emissão da proteína foi subtraído das demais medidas de emissão. Como vimos anteriormente, irradiando-se a TFP, esta começa a se fotodegradar criando outras espécies, como a espécie fluorescente em 410 nm. Aqui, também observamos que, conforme irradiamos a amostra, todo o espectro de emissão aumenta com o tempo. A Fig. 7.5 B mostra os espectros de emissão da TFP da Fig. 7.5 A subtraindo o espectro da TFP intacta em presença da proteína. Observamos facilmente que surge o fotoproduto em 410 nm e outra espécie em 502 nm.

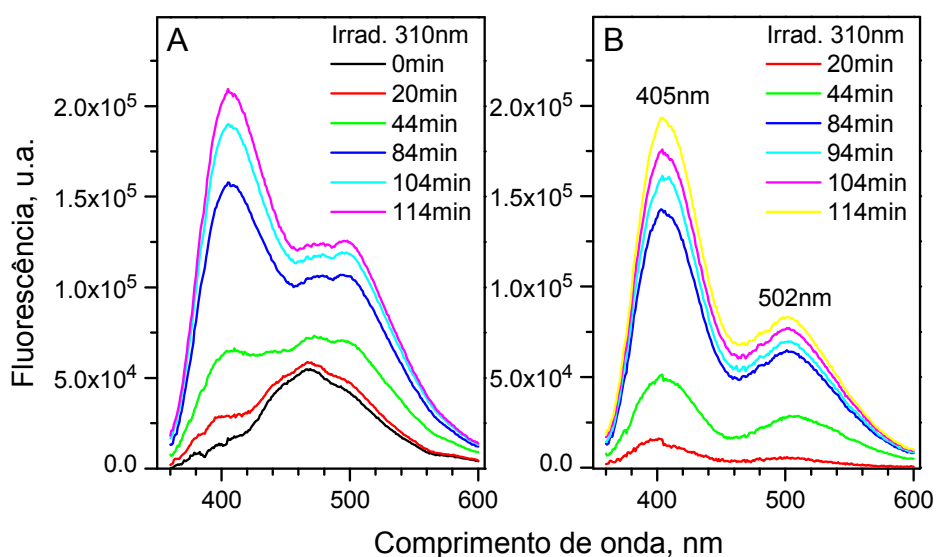


Figura 7.5. (A) Espectros de emissão da TFP ($20\mu\text{M}$) excitada e irradiada em 310 nm ($0,36\text{ mW}$), subtraíu-se o espectro da Na^+ , K^+ -ATPase ($80\ \mu\text{g/ml}$). (B) Subtraindo-se o espectro sem irradiar (0 min) dos espectros de emissão da parte A. O tampão usado foi TRIS 30 mM, Trisfosfato 5 mM, EDTA 0,2 mM, e MgCl_2 5 mM a pH 7,4 para estabilizar a conformação E_2 da proteína, também se empregou ATP a 0,5 mM.

A Fig. 7.6 mostra a variação da intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda 470, 495 e 410 nm em função do tempo. Observamos que as espécies que fluorescem em 502nm e 470nm parecem ser da mesma espécie já que evoluem da mesma forma no tempo. As espécies fluorescentes formadas por irradiação não saturam no período observado.

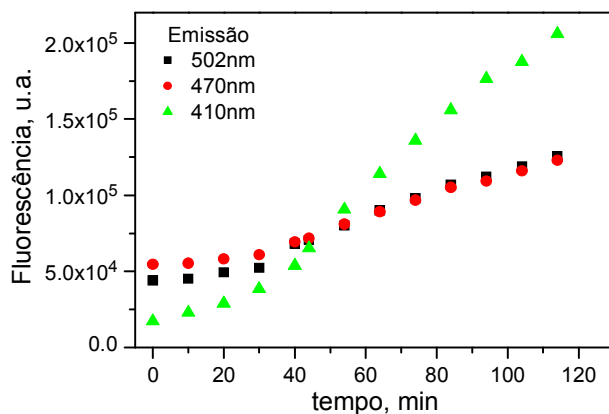


Figura 7.6. Variação da fluorescência da TFP em presença da proteína em função do tempo.

Foi feita a diálise da amostra previamente irradiada, para investigar se houve foto-associação de TFP com a proteína através de ligações covalentes. A Fig. 7.7 mostra os espectros de emissão das medidas de fluorescência estacionária da amostra depois da diálise. A espécie com pico em 494 nm permanece na amostra dialisada e parece ligar covalente a proteína (não se fotodegrada). O fotoproduto fluorescente em 410 nm também é observado em menores quantidades. Parece que a espécie fluorescente em 410 nm não se liga à Na^+ , K^+ - ATPase pois apenas uma pequena fração dessa espécie permaneceu na amostra após a diálise.

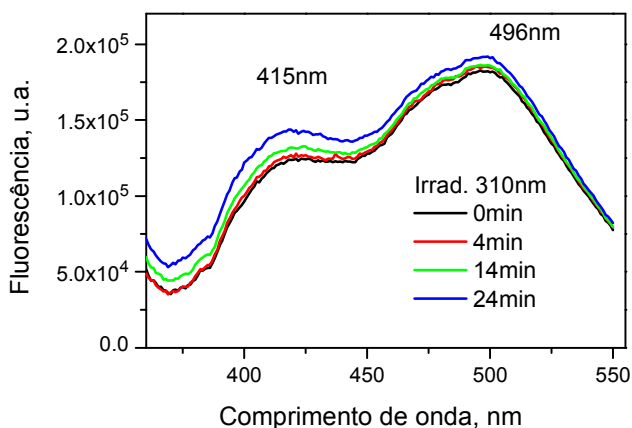


Figura 7.7. Fluorescência da amostra de TFP e Na^+ , K^+ -ATPase irradiada a 114 min e dializada. A amostra foi submetida a novos tempos de irradiação em 310 nm.

7.2. Interação da CPZ com a Na^+ , K^+ -ATPase marcada com FITC

A Fig. 7.8 apresenta o espectro de emissão e excitação da sonda fluorescente FITC depois de dialisar a amostra. Os espectros pertencem às moléculas de FITC ligadas à proteína. Seu espectro de excitação mostra dois picos de excitação em 470 nm e 494 nm. Os espectros de fluorescência da FITC são obtidos excitando-o em sua máxima excitação.

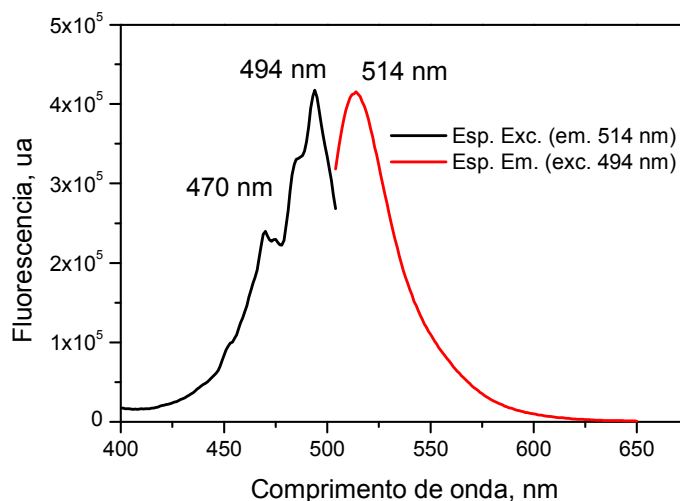


Figura 7.8. Espectros de emissão (curva vermelha) e excitação (curva preta) da FITC ligada à Na^+ , K^+ -ATPase.

Depois do processo de marcação da proteína com a FITC, a proteína foi titulada com CPZ. A Fig. 7.9 A, mostra o espectro de emissão de FITC- Na⁺, K⁺-ATPase para diferentes concentrações de fenotiazina. Observamos que a CPZ não causa nenhuma alteração na intensidade da FITC, sugerindo que a CPZ não altera a estrutura do sítio de ligação da FITC. Resultados obtidos com a sonda fluorescente antroil ouabaína (AO), mostraram que a CPZ liga-se à Na⁺, K⁺-ATPase perto do sítio de ouabaína (Guevara et al., 2007). O sítio de ouabaína (lado extracelular) se encontra longe do sítio de ATP (lado citoplasmático), a uma distância aproximada de 7,2 nm (Linnertz H. et al., 1998). Portanto é razoável que, nesse sítio, o fármaco não altere diretamente o sítio de ATP. No entanto, poderia haver outros sítios de ligação para a CPZ na proteína. Nosso resultado mostra que a CPZ não se liga a sítios próximos de FITC.

A Fig. 7.9 B mostra a fluorescência de FITC-Na⁺, K⁺-ATPase tratada com CPZ para diferentes tempos de irradiação.

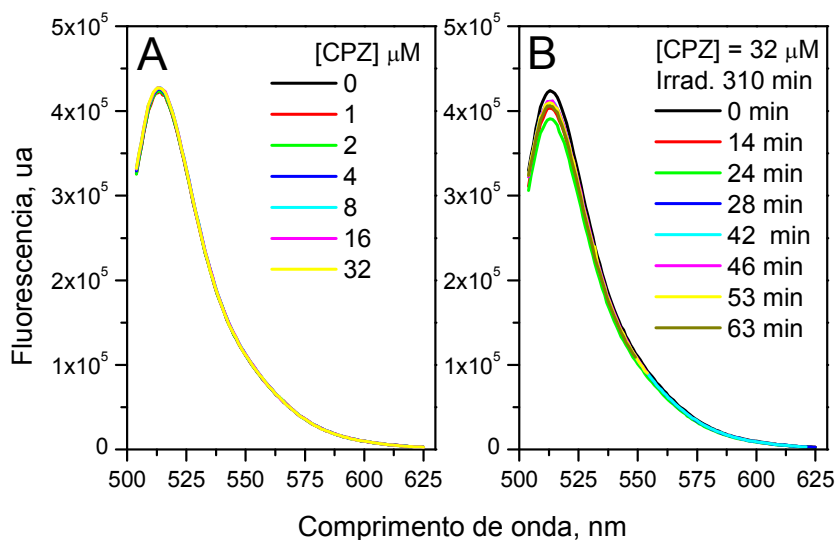


Figura 7.9. Espectro de fluorescência do marcador de fluorescência FITC da Na⁺, K⁺-ATPase a diferentes concentrações de CPZ (A) e a distintos tempos de irradiação da CPZ em 310 nm (B).

O resultado encontrado em Guevara et al. (2007) mostrou que a irradiação da amostra em 310 nm provoca a foto-associação de CPZ à proteína. Usando a AO, como sonda fluorescente da proteína, foi encontrado que o radical criado pela irradiação da CPZ (radical promazinil) liga-se à enzima perto do sítio da ouabaína.

Observamos da Fig. 7.9 B que a CPZ, mesmo irradiada, não altera significativamente a intensidade da FITC ligada à proteína. Então parece que os fotoprodutos da CPZ também não afetam significativamente a FITC.