

Estudio de la proteína MOPC por espectroscopia de fluorescencia

Adrián Fernández Gil

Departamento de Química Física II, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.
Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid. España.
afgil@estumail.ucm.es

Concepción Civera Tejuca. Francisco García Blanco.

Departamento de Química Física II, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.
Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid. España.
mccivera@farm.ucm.es. garblan@farm.ucm.es

Resumen: la mayoría de las proteínas contienen en su secuencia aminoácidos con propiedades fluorescentes: triptófano, tirosina y fenilalanina. La proteína coagulante obtenida a partir de las semillas de *Moringa oleifera*, se caracteriza por tener un residuo tirosina y una fenilalanina. Esta proteína tiene un gran interés, ya que, se utiliza de modo tradicional para potabilizar el agua de un modo no contaminante, su mecanismo de acción aún no se ha descrito. En este trabajo hemos estudiado las propiedades fluorescentes de esta proteína libre para poder entender el modo de interacción con sus diferentes ligandos, de este modo podremos explicar su acción y aportar conocimiento sobre su estructura.

Palabras clave: Fluorescencia. Proteínas. *Moringa oleifera*. Estructura. Interacciones.

INTRODUCCIÓN

La obtención de agua potable es uno de los principales problemas de los países en vías de desarrollo y del tercer mundo. Normalmente en estas regiones la potabilización del agua se lleva a cabo adicionando sales de aluminio y de hierro que son altamente contaminantes. Sin embargo, en algunas regiones de África se utiliza un método tradicional que consiste en la utilización de semillas de un árbol de la familia *Moringaceae*, con propiedades floculantes^(1,2). Las semillas de *Moringa oleifera* son las que presentan el mayor efecto, comparable al del sulfato de aluminio, llegando a eliminar entre el 92-99% la turbidez del agua⁽³⁾. Además el resto de los productos de extracción se pueden usar como fertilizante, alimento animal, incluyendo su potencial como biocombustible. También es destacable su uso en medicamentos, porque tiene actividad tanto antibacteriana al favorecer la sedimentación de las bacterias⁽⁴⁾.

OBJETIVO

En este estudio hemos investigado las propiedades conformacionales de la proteína coagulante de *Moringa oleifera*, MOCP, mediante la monitorización de la fluorescencia de su única tirosina, Y51 (Fig. 1).

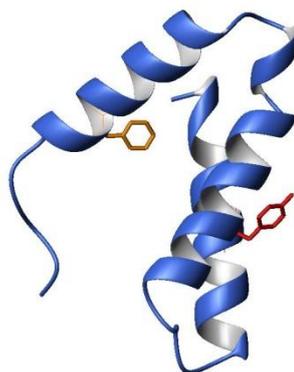


Figura 1. Modelo de la proteína MOCP donde se muestra la tirosina 52 en rojo y la fenilalanina en naranja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La proteína de las semillas *Moringa oleifera*, fue extraída según el protocolo⁽⁵⁾ en el Royal Institute of Technology (KTH) Estocolmo (Suecia).

Se utilizó una solución de ácido acético/acetato amónico 10mM para mantener el pH a 5,8. La concentración de la proteína fue de 70 μ M.

Métodos

- **Espectroscopia de absorción.** Los espectros de absorción de la proteína se realizaron utilizando un espectrofotómetro Cary 300 Bio.
- **Fluorescencia.** Los espectros de fluorescencia se obtuvieron utilizando un espectrofluorímetro modular PTI. Las longitudes de onda de excitación utilizadas fueron: 255, 265, 280 y 295 nm. La emisión fue registrada en el intervalo de 280 a 500nm. Las ranuras de excitación y emisión se ajustaron a 2nm. Para las medidas se utilizaron cubetas de cuarzo Hellma con longitud de paso de 0,2 cm. Los espectros se adquirieron con cinco acumulaciones. La temperatura de medida fue de 20°C mantenida con un controlador Peltier de temperatura TLC 50. El análisis

de los espectros se realizó con el programa de adquisición y análisis FELIX 32 incorporado en el equipo.

RESULTADOS

Los espectros de emisión de fluorescencia se adquirieron excitando a las siguientes longitudes de onda: 255 nm para fenol, 265 y 280 nm (Fig.2).

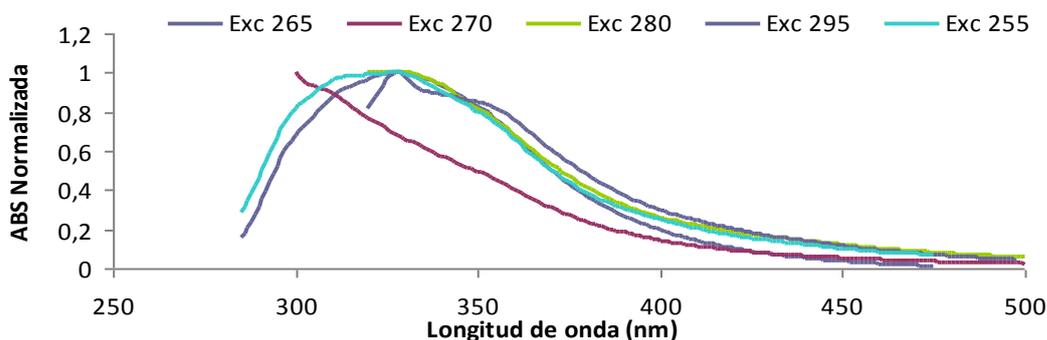


Figura 2. Espectro de emisión de estado estacionario de MOCP a varias longitudes de onda de excitación.

El espectro de excitación de fluorescencia fue adquirido a 300nm. La confirmación de la ausencia de triptófano y la presencia de tirosina, se realizó desnaturalizando la proteína y reduciendo los puentes disulfuro (Fig. 3).

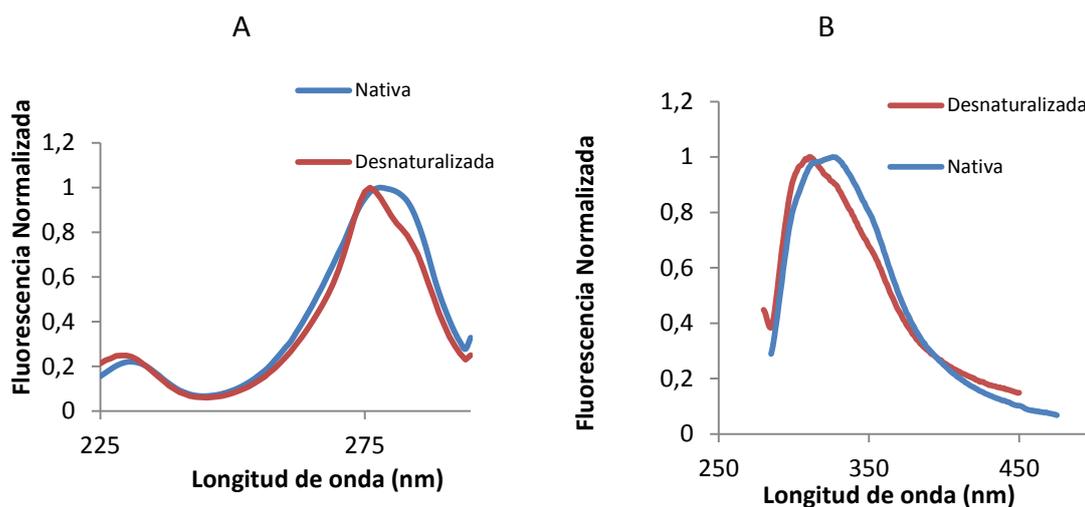


Figura 3. Espectro de emisión (A) y de excitación (B) de 70 μ M de MOCP, nativa y desnaturalizada, a pH 5,4 y 20°C.

Como se puede observar cuando la proteína se desnaturaliza la longitud de onda máxima de emisión de la tirosina se desplaza a los valores normales de 280nm en la excitación y 310nm en la emisión, con lo que podemos concluir que el desplazamiento anómalo hacia el rojo del máximo de longitud de onda debe atribuirse a interacciones entre el residuo tirosina y algún residuo cercano.

DISCUSIÓN

El máximo de emisión de 330 nm ha sido prácticamente el mismo para todas las longitudes de onda de excitación (Fig. 2). En la bibliografía aparecen descritas proteínas, que contienen una única tirosina con una banda de emisión similar entre 315 y 350nm a pH neutro, en vez de la longitud de onda normal de 303-305nm⁽⁶⁾. El origen de este desplazamiento hacia mayor longitud de onda debe atribuirse a la formación de un enlace de hidrógeno en el que está implicado el grupo hidroxilo fenólico, o bien a la presencia de un tiosinato en estado excitado, con un espectro de emisión hacia ~340nm^(7,8).

CONCLUSIONES

El espectro de emisión de fluorescencia del residuo Y51 de la proteína MOPC muestra una banda de emisión anómala para la tirosina de 330nm. Este desplazamiento del máximo puede ser debido a una transferencia de protón del grupo hidroxilo del fenol hacia un aceptor de protones presente en el microentorno de la α -hélice local alrededor del residuo de tirosina dando lugar a un desplazamiento del equilibrio dinámico de este único fluoróforo hacia la formación del tiosinato.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con las ayuda del grupo de investigación UCM-950247 y con el proyecto MAT2008-02542.

A Magali Boutonnet, Gunaratna Kuttuva Rajarao y Chuka Okoli del Royal Institute of Technology (KTH) Estocolmo (Suecia) por la proteína.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ndabigengesere A, Narasiah K, Talbot G. Active agents and mechanism of

coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. *Water Research*. 1995; 29(2): 703-710.

2. Katayon S, Ng SC, Megat Johari MMN, Abdul Ghani LA. Preservation of coagulation efficiency of *Moringa oleifera*, a natural coagulant. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2006; 11:489-495.
3. Suarez M, Haenni M, Canarelli S, Fisch F, Chodanowski P, Servis C, Michielin O, Freitag R, Moreillon P, Mermod N. Structure-Function Characterization and Optimization of a Plant-Derived Antibacterial Peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49(9):3847-3857.
4. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*. 2007; 21: 17–25.
5. Ghebremichael K, Gunaratna KR, Dalhammar G. Single-step ion exchange purification of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006 ;70: 526–532.
6. Raychaudhuri S, Choudhury KR, Palchoudhuri S, Chopra S, Bhattacharyya NP, Mukhopadhyay D. Spectroscopic studies reveal conformational flexibility of intrinsically unstructured protein HYPK. *Journal of Biophysical Chemistry*. 2011; 2, (4):434-442.
7. Ross JBA, Laws WR, Rousslang KW, Wyss-Brod HR. Topics in fluorescence spectroscopy: Biochemical applications. 1992: 2-5 y 49-50.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

8. Lakowicz J. Topics in Fluorescence Spectroscopy: Biochemical applications, Springer; 2006.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Moringa oleifera un árbol con enormes potencialidades. Disponible en (consulta: 09/03/2012):

<http://www.fao.org/WAIRDOCS/LEAD/X6324S/X6324S00.HTM>

Recibido: 16 marzo 2012.

Aceptado: 16 diciembre 2013.