

## RMN aplicada à triagem e identificação de interações proteína-ligante

Isis M. Figueiredo (PG) e Anita J. Marsaioli\* (PQ); anita@iqm.unicamp.br

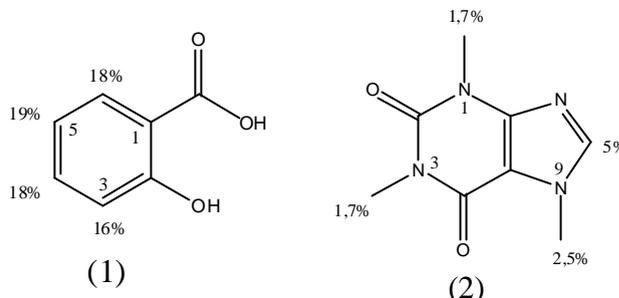
DQO/IQ – UNICAMP CP 6121, 13083-970, Campinas-SP. Palavras Chave: RMN, interações proteína-ligante.

### Introdução

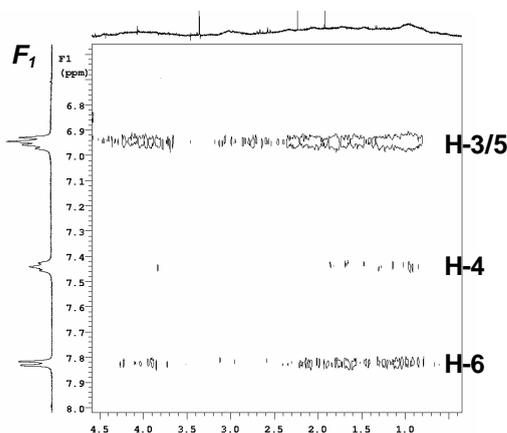
Com o sequenciamento do genoma humano completo as atenções foram direcionadas para a determinação estrutural e funcional das proteínas. Para isso, vários métodos proteômicos têm sido desenvolvidos usando ligantes como sondas para definir a função das proteínas<sup>1</sup>. O objetivo deste trabalho foi examinar a possibilidade de ligação de várias moléculas biologicamente importantes a Albumina de soro bovino (BSA) através de métodos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) baseados na transferência de NOE entre proteína-ligante, como: STD (Saturation Transfer Difference)<sup>2</sup>, WaterLOGSY (Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy)<sup>3</sup>, NOE pumping<sup>4</sup> e DOSY-NOESY (Diffusion-Ordered NOESY)<sup>5</sup>.

### Resultados e Discussão

De acordo com o fator STD (**Figura 1**) obtido ao irradiarmos a proteína em -0,50 ppm notou-se que o ácido salicílico (**1**) é o composto que mais interage com a BSA, apresentando %STD de aproximadamente 18% para os hidrogênios da porção aromática. Já a cafeína (**2**) interage principalmente através do H-8 e da CH<sub>3</sub>-9 que apresentaram um %STD de 5% e 2,5%, respectivamente. Os ácidos adípico (**3**) e cítrico (**4**) apresentaram uma percentagem de interação inferior a 2%. Ao irradiarmos a proteína em -1,00 ppm as percentagens de interação diminuíram pela metade. Estes resultados foram confirmados através dos experimentos de WaterLOGSY e NOE pumping, que em princípio fornecem as mesmas informações que o experimento de STD. O espectro de WaterLOGSY obtido com tempo de mistura de 0,8 s apresentou sinais positivos para os hidrogênios aromáticos de (**1**) e para as metilas 1, 3, e 9 e H-8 de (**2**). Já os hidrogênios de (**3**) e (**4**) apresentaram sinais negativos indicando que estes não interagem com a BSA. O espectro de NOE pumping obtido para a mistura indicou de forma análoga as outras análises que os compostos (**1**) e (**2**) interagem com a BSA e os outros não. Dentre as técnicas já citadas o NOE pumping é a menos sensível necessitando de um maior tempo de máquina. Uma outra técnica utilizada foi a DOSY-NOESY, a qual fornece informações sobre o epitopo de ambas espécies (ligante e proteína). Na **Figura 2**, plano de difusão de (**1**), podemos notar que os H-3/5 e H-6 de (**1**) apresentaram forte correlação com a porção alifática (0 a 3 ppm) e hidrogênios amídicos (3,5 a 4,5 ppm) da BSA, enquanto o H-4 não.



**Figura 1.** Mapeamento de epitopo (% STD) para os diferentes hidrogênios de (**1**) e (**2**). O fator STD é maior para aquelas partes do ligante mais próximas à proteína.



**Figura 2.** Mapa de contorno de RMN de DOSY-NOESY da mistura de 0,85 mM de ligantes e 0,10 mM de BSA a 25°C. Plano de NOESY obtido força de gradiente de 4,80 G.cm<sup>-1</sup>. Os sinais da proteína estão em (F<sub>2</sub>) e dos ligantes em (F<sub>1</sub>).

### Conclusões

Através dos experimentos de transferência de NOE observou-se que (**1**) e (**2**) interagem com a BSA, já (**3**) e (**4**) não. Além disso, os resultados obtidos através da técnica de STD foram reproduzidos pelos outros experimentos. O STD é o mais sensível e fornece o epitopo do ligante. Já o WaterLOGSY e o NOE pumping são menos populares por serem aplicados a sistemas mais específicos. Já o DOSY-NOESY, é menos sensível, entretanto, fornece o epitopo da macromolécula e do ligante.

### Agradecimentos

FAPESP e CNPq.

- Meyer, B.; Peters T. *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **2003**, *42*, 864.
- Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **1999**, *38*, 1784-1788.
- Dalvit, C.; *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 65.
- Chen, A.; Shapiro, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258.

<sup>5</sup> Gorenstein, D. G.; Gozansky, E. K.; *J. Mag. Reson. Series B*, **1996**, *111*, 94-96.