

Interação da Região N-terminal da Proteína MARCKS com o Anticorpo mAb3C3: Estudos por RMN e Dicroísmo Circular

Jully L. Fraga¹ (IC); Cristiane Dinis Anobom¹ (PQ); Flavio R. Zolessi² (PQ); Cristina Arruti² (PQ)
Luzineide W. Tinoco^{1*} (PQ) lwtinoco@nppn.ufrj.br

¹LADIE - Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais –UFRJ; ²Facultad de Ciências – Universidad de la República –Uruguay

Palavras Chave: *desordens neuronais, proteínas intrinsecamente desenoveladas, diferenciação neuronal*

Introdução

A proteína miristoilada rica em alanina (MARCKS – *Miristoilated Alanine Rich C Kinase Substrate*) é uma das proteínas que promove a conexão entre os diferentes caminhos da sinalização celular e uma das suas principais funções está relacionada com a dinâmica da regulação da actina. O anticorpo monoclonal mAb3C3 somente reconhece a isoforma fosforilada da MARCKS de células neuronais. Ratos que tiveram o gene para expressão da MARCKS removido, mostram um fenótipo caracterizado por defeitos em diferentes eventos do desenvolvimento neuronal. Assim, a identificação de um sítio de fosforilação neural específico pode ajudar na compreensão de uma função específica da MARCKS no desenvolvimento neuronal, e um anticorpo monoclonal de reconhecimento pode se tornar um instrumento molecular essencial para ser usado nesta área de estudo. O epitopo da MARCKS que se liga ao mAb3C3 está localizado na porção N-terminal (do resíduo 16 ao 35), sendo indispensáveis para a ligação ao anticorpo a Ser 25 fosforilada, a Lis 28 e a Ala 29.¹ O objetivo deste trabalho é avaliar por RMN a influência da fosforilação e a interação com o anticorpo na conformação do peptídeo (EKPGEA^ApSPSKANGQENG) e verificar se a Lis28 e a Ala29 participam diretamente da interação com o anticorpo.

Resultados e Discussão

Para as análises por dicroísmo circular (CD) as amostras dos peptídeos fosforilado (pS25) e não fosforilado (npS25) (0,1 mM) foram preparadas em solução tampão fosfato salina 20 mM a pH 5,0 e 7,0. As amostras dos peptídeos com anticorpo foram preparadas com a adição de 6,3 µg/µL do mAb3C3. Os espectros de CD indicaram que independente do pH ou da interação com o anticorpo tanto o peptídeo pS25 quanto o npS25 não apresentam estrutura secundária definida. Para os espectros de RMN os peptídeos fosforilado e não fosforilado (1 mM) foram dissolvidos em solução tampão fosfato pH 7,2 e 5,0 com 10% de D₂O e foram adicionados 315 µg do anticorpo mAb3c3 para os estudos de interação com o peptídeo. A análise da região amídica dos espectros TOCSY do

npS25, pS25 e pS25 na presença do anticorpo mAb 3c3 em pH 7,2 (Figura 1a) mostrou que a fosforilação promove uma maior separação dos sinais e que a interação com o anticorpo leva ao alargamento dos sinais na região entre 8,0 e 8,3 ppm. Em pH 5,0 o efeito do alargamento de linha foi menos pronunciado que em pH 7,2. Neste pH foram observados sinais correspondentes aos resíduos terminais que devido a efeitos de troca H/D não foram observados em pH 7,2 (Figura 1b). Através da análise do espectro TOCSY foi observada uma blindagem dos H_N da Lis28 de 8,177 para 8,164 ppm e da Ala29 de 8,100 para 8,081 ppm.

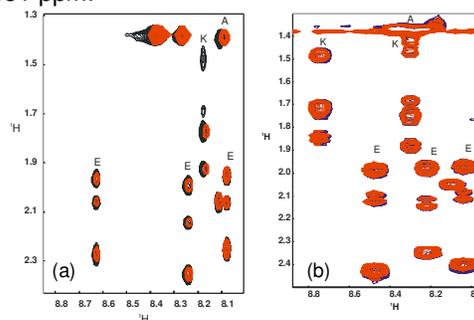


Figura 1: Espectros TOCSY do pS25 (preto) e do pS25 com mAb3c3 (vermelho). (a) pH 7,0 (b) pH 5,0.

Na análise comparativa dos espectros NOESY a 5°C e 25°C a presença de NOEs inter-resíduos indica que o peptídeo adquire uma conformação mais estável a baixa temperatura.

Conclusões

Os resultados indicam que o peptídeo não sofre variações conformacionais significativas ao interagir com o anticorpo e que a fosforilação da Ser25 e a presença da Lis28 e da Ala29 são importantes para a interação com o anticorpo.

Agradecimentos

CAPES, CNPq, FAPERJ, LNLs, CNRMN

¹Zolessi, F. R.; Engström, U.; Durán, R.; Cerveñansky, C.; Hellman, U.; Arruti, C. *J. Prot. Res.* **2004**, 3, 84-90.