

MAPEAMENTO DAS INTERAÇÕES PROTEÍNA-LIGANTE ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE RMN DE ¹H UTILIZANDO DETECÇÃO DO LIGANTE

Isis Martins Figueiredo e Anita Jocelyne Marsaioli*

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970
Campinas - SP, Brasil

Recebido em 11/8/06; aceito em 16/2/07; publicado na web em 29/8/07

SCREENING PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS USING ¹H NMR TECHNIQUES FOR DETECTING THE LIGAND. NMR is a valuable screening tool for the binding of ligands to proteins providing structural information on both protein and ligands and is thus largely applied to drug-discovery. Among the recent NMR techniques to probe weak binding protein-ligand complexes we have critically evaluated the advantages and disadvantages of STD (Saturation Transfer Difference), WaterLOGSY (Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy), NOE pumping and DOSY-NOESY (Diffusion-Ordered NOESY) using a mixture of BSA (bovine serum albumin) plus salicylic acid, caffeine, citric acid, adipic acid and D-glucose.

Keywords: NMR; protein-ligand interactions; bovine serum albumin.

INTRODUÇÃO

Os fenômenos físico-químicos desencadeados pelas interações intermoleculares entre ligantes e receptores macromoleculares são a chave para o entendimento dos processos biológicos¹. Neste contexto, a ressonância magnética nuclear (RMN) tornou-se *a priori* uma técnica poderosa no estudo de interações proteína-ligante, sendo capaz de detectar e quantificar as interações com alta sensibilidade sem o conhecimento prévio da função da proteína².

Entretanto, o monitoramento das interações através dos deslocamentos químicos das macromoléculas é difícil de ser analisado sem marcação isotópica. Isso faz com que o estudo das propriedades dos ligantes seja mais apreciado, pois, fornece espectros de RMN mais simplificados e resolvidos que os espectros das macromoléculas. Existem muitos métodos espectroscópicos para a observação do epitopo dos ligantes, como métodos baseados na relaxação³ T_2 e transferência de NOE⁴. Entende-se por epitopo a superfície de contato macromolécula-ligante que pode ser mapeada através dos hidrogênios situados na interface. Os principais experimentos utilizados na obtenção do epitopo do ligante são o STD^{5,6} (“Saturation Transfer Difference”), WaterLOGSY⁷ (“Water Ligand Observation with Gradient Spectroscopy”) e NOE pumping^{8,9}. Já o experimento de DOSY-NOESY (“Diffusion-Ordered” NOESY) permite a obtenção do epitopo da proteína. Portanto, estas técnicas fornecem informações complementares acerca das interações proteína/ligante.

Este trabalho está voltado para o estudo das funções de proteínas através de suas interações com metabólitos celulares e xenobióticos, aplicando-se técnicas de RMN ¹H e de transferência de NOE.

O efeito overhauser nuclear (NOE)

O NOE (Efeito Overhauser Nuclear) é definido como a mudança na área do sinal proveniente de um núcleo causada pela saturação do sinal de um segundo núcleo. Essa alteração resulta da transferência de polarização entre núcleos acoplados dipolarmente via mecanismos de relaxação spin-rede (T_1). Estes experimentos

têm a característica de “sondar” acoplamentos dipolares que são espectralmente “invisíveis” nas amostras líquidas, mas fornecem informações relevantes sobre os movimentos moleculares e distâncias intra e intermoleculares.

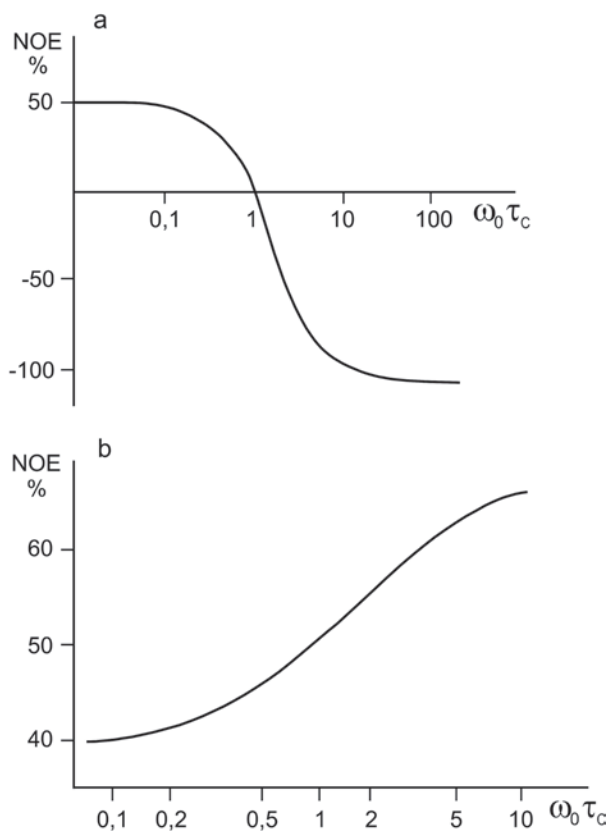
A transferência de NOE intermolecular entre macromoléculas e moléculas pequenas foi originalmente observada e descrita há mais de 30 anos^{10,11}, sendo aplicada na determinação estrutural de moléculas ligadas a receptores macromoleculares^{12,13}.

O NOE depende do tempo de correlação (τ_c) das moléculas ligadas e livres. Para pequenas moléculas (MM < 1000-2000) que se movimentam rapidamente ($w_0\tau_c < 1$), são observados NOE positivos com um aumento máximo de sinal de 50%. Para grandes moléculas com movimentos lentos ($w_0\tau_c > 1$), um NOE negativo máximo de -100% é observado¹⁴, Esquema 1a. Quando o produto $w_0\tau_c \cong 1$, os efeitos de NOE são muito pequenos, praticamente nulos. Neste caso, experimentos com trava de spin (“spin-lock”) como ROESY¹⁵ (“Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy”) transpõem esta barreira, pois a relaxação cruzada é positiva para todos os valores do tempo de correlação rotacional, como mostrado no Esquema 1b.

Na espectroscopia de RMN macromolecular, os NOEs são amplamente empregados na determinação dos sítios ativos de ligação através da transferência de magnetização receptor-ligante. Uma molécula pequena ligada a um receptor macromolecular comporta-se como parte da macromolécula, apresentando NOEs negativos e intensos. Entretanto, este efeito depende da velocidade de troca do equilíbrio. O “*calcanhar de Aquiles*” dos métodos de RMN para triagem de ligantes ativos é a dificuldade em detectar compostos fortemente ligados, que, por conseqüência, apresentam velocidades de dissociação lentas¹⁶. Esta limitação pode ser superada aplicando-se a técnica introduzida por Jahnke *et al.* utilizando competição pelo sítio ativo da proteína, em que um ligante fraco (repórter) é deslocado por um ligante forte. A vantagem desta metodologia é identificar um ligante em uma grande mistura de compostos e fornecer um K_d aproximado em um experimento simples. O epitopo pode ser evidenciado a seguir, aplicando-se técnicas como STD e WaterLOGSY^{17,18}.

Dessa forma, para implementar e interpretar experimentos de triagem por RMN é necessário revisar alguns conceitos básicos

*e-mail: anita@iqm.unicamp.br

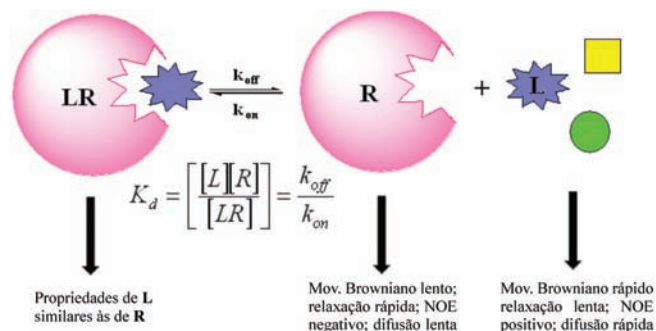


Esquema 1. Dependência do NOE homonuclear entre hidrogênios em função do produto $\omega_0 \tau_c$, a) em função da relaxação longitudinal e b) em função da relaxação transversal ou $T_{1\rho}$

sobre o equilíbrio de ligação, de forma a permitir uma melhor distinção entre princípios biológicos e físico-químicos a partir de novos desenvolvimentos na área da RMN.

Os fenômenos de troca

A natureza dinâmica dos processos de ligação entre ligante e receptor influencia os sinais nos espectros de RMN. Considerando o espectro de RMN do ligante no equilíbrio mostrado no Esquema 2 nota-se que quando a molécula pequena (**L**) se liga a um receptor macromolecular (**R**), **L** adquire propriedades de **R** e, conseqüentemente, as propriedades (RMN) serão alteradas.



Esquema 2. Alterações físicas e espectroscópicas resultantes da associação entre ligantes e macromoléculas. K_d - constante de dissociação; k_{off} - constante de velocidade para dissociação do complexo R-L; k_{on} - constante de velocidade para a formação do complexo R-L; $[L]$ concentração do ligante; $[R]$ concentração do receptor

Se o processo de troca for lento comparado à diferença de deslocamento químico (δ) entre os estados de ligante livre e ligado $|\delta_{livre} - \delta_{complexado}|$ dois conjuntos distintos de sinais serão observados, um para o ligante livre e outro para o ligante complexado. Entretanto, se o ligante se ligar ao receptor macromolecular com baixa afinidade, ou seja, no limite de troca rápida apenas um sinal **A**, δ é igual à média ponderada das populações de $\delta A_{complexado}$ e δA_{livre} ($\Delta\delta > k_{ex}$), será observado;

$$A = p_{complexado} A_{complexado} + p_{livre} A_{livre} \quad (1)$$

sendo $p_{complexado}$ a razão populacional do ligante complexado à proteína e p_{livre} a razão populacional de ligantes livres. A Equação 1 poderá ser aplicada somente se a troca química for rápida para escala de tempo da relaxação e do (δ) do sistema, ou seja, se k_{off} for maior que $|\delta_{livre} - \delta_{complexado}|$ e maior que as constantes de relaxação (T_1^{-1} ou T_2^{-1}) do complexo. Sob essas condições, as alterações dos sinais de RMN de $A_{complexado}$, geradas durante o estado de $L_{complexado}$ serão transferidas para o estado de L_{livre} e vice-versa; esse processo de transferência será mediado pela rápida velocidade de troca $L_{complexado}$ e L_{livre} durante o tempo t necessário para medir **A**. Então, se k_{off} for maior que a velocidade da relaxação transversal T_2^{-1} do complexo, a velocidade T_2^{-1} de um ligante **L** em uma mistura de ligante **L** e receptor **R** será dada por:

$$T_{2L}^{-1} = p_{L,complexado} T_{2L,complexado}^{-1} + p_{L,livre} T_{2L,livre}^{-1} \quad (2)$$

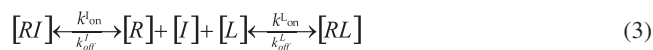
As populações individuais de $p_{L,complexado}$ e $p_{L,livre}$ dependem de K_d e das concentrações de **L** e **R** (Figura 1). A partir da Equação 2 ficou evidente que o sinal do ligante, em uma mistura ligante-receptor em que T_2 do receptor é curto, será observado se $p_{L,livre} \gg p_{L,complexado}$, ou seja, ligante em excesso em relação ao receptor ($[L] \gg [R]$). Nestas condições, se o sinal do complexo não é observado, os sinais do ligante livre fornecerão informações a respeito do epítipo do complexo¹⁹.

Resumidamente, o efeito de transferência de NOE é melhor observado para sistemas com $K_d \approx 10^{-3}$ e 10^{-9} M (constantes de dissociação para complexos fracos), nas quais o k_{off} é maior que T_1^{-1} do complexo, por exemplo para $T_1 \approx 10$ ms o $k_{off} > 100$ Hz. Para os sistemas em que a velocidade de dissociação é limitada pela difusão o k_{on} será aproximadamente 10^8 M⁻¹s⁻¹ e para um K_d entre 10^{-3} e 10^{-9} M o k_{off} será estimado entre 100 e 100.000.000 Hz.

Equilíbrio químico entre várias espécies

Na investigação do equilíbrio químico entre mais de duas espécies por RMN é necessário entender as etapas do equilíbrio químico competitivo que acontece nessas situações²⁰.

O caso mais simples é com dois ligantes **L** e **I** que competem pelo mesmo sítio de ligação do receptor **R**. Tomando **L** como o ligante previamente caracterizado e **I** como um novo ligante ou um “inibidor”, seus equilíbrios podem ser definidos usando $K_d = [R][L]/[RL]$ e $K_I = [R][I]/[RI]$. O equilíbrio apropriado para esse sistema pode ser escrito da seguinte forma:



A adição de **I** reduz $[RL]$ através de um deslocamento competitivo. Usando os limites de $I_T = [IR] + [I]$ e $R_T = [R] + [RI] + [RL]$ fica possível definir a constante de dissociação aparente $K_{d,ap}$ como:

$$K_{d,ap} = K_d \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) = \frac{(R_T - [RL])(I_T - [RL])}{[RL]} \quad (4)$$

em que R_T e L_T são concentrações totais do receptor e do ligante, respectivamente. Como esperado, o fator $(1 + [I]/K_d)$ deverá ser ≥ 1 e, desta forma, $K_{d,ap} \geq K_d$. O incremento no valor da constante de dissociação reflete a redução dos sítios de ligação disponíveis de **R** pela interação competitiva de **I**.

Se a constante de dissociação para o inibidor for conhecida, $K_i = [R][I]/[RI]$, torna-se possível estimar o K_d de **L** pela fração de troca causada por **I**. Para $K_i \ll K_d$ o inibidor **I** atuará deslocando **L**, para $I_T \ll L_T$. Desta forma, um inibidor pode ser um reagente muito útil, se **I** for um ligante específico e **L** for um ligante teste; este efeito poderá ser usado para identificar a especificidade do ligante teste. Adicionalmente, se **L** for um ligante específico e **I** um ligante teste, este efeito poderá ser usado em experimentos de triagem por RMN para identificar previamente ligantes desconhecidos.

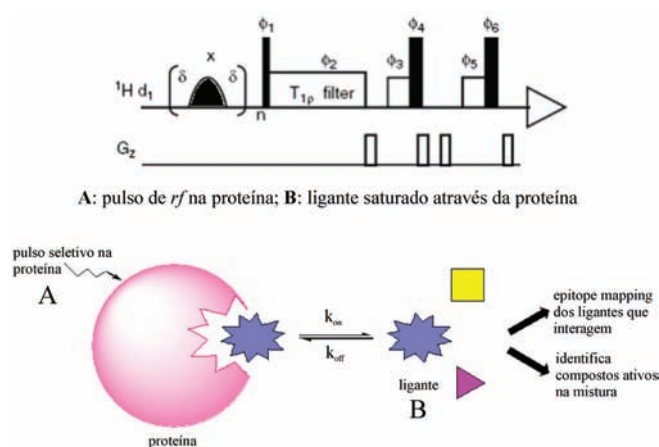
Um outro aspecto importante seria como a troca química, dirigida pelo equilíbrio químico, modula os parâmetros de RMN dos ligantes livres e ligados e do receptor. A observação desses parâmetros modulados forma a base de todos os experimentos de triagem por RMN.

Na prática, assume-se que os processos ocorrem sempre com troca rápida. Isso porque as condições experimentais para triagem por RMN são, normalmente, bem estabelecidas para troca rápida. Esses experimentos são, geralmente, realizados com a razão da concentração de ligante total vs receptor total, que tem que ser superior a 10 ($L_T/R_T > 10$) e ligantes fracamente associados que possuem um $K_d > 100 \mu\text{M}$. Os experimentos de triagem por RMN são, primariamente, baseados no ^1H ; conseqüentemente, k_{ex} excede a maioria das diferenças nas velocidades intrínsecas de relaxação de H e frequências de precessão; isso fornece a garantia de que a troca química rápida é válida. Além disso, nessas condições os parâmetros de RMN se tornam simples médias entre os parâmetros dos ligantes e dos receptores.

Existem diversas técnicas de RMN para estudar as interações proteína-ligante e serão discutidas aqui as metodologias que reparam no fenômeno de transferência de NOE para detectar e caracterizar ligantes ativos em misturas complexas.

Métodos de RMN aplicados na detecção do ligante

O experimento de STD²¹ (“Saturation Transfer Difference”) como o nome já diz consiste na diferença entre dois experimentos. No primeiro experimento (“on-resonance”), satura-se o receptor (proteína) via um trem de pulsos seletivos de rádio frequência (*rf*). Esses pulsos são aplicados na frequência de ressonância dos núcleos do receptor e não do ligante. A saturação propaga-se através dos hidrogênios do receptor via rede de interações dipolares intramoleculares H-H; esse processo chamado “difusão de spin” é eficiente devido a grande massa molecular do receptor. A saturação é transferida aos compostos ligados via relaxação cruzada intermolecular para a interface receptor-ligante. As pequenas moléculas dissociam-se do receptor, mas permanecem em um estado “saturado” devido aos seus longos tempos de T_1 quando livres. Logo, realiza-se um segundo experimento (“off-resonance”) no qual um trem de pulsos de *rf* idêntico ao primeiro é aplicado fora da faixa de ressonância dos núcleos dos ligantes e do receptor. A subtração dos experimentos fornece um espectro com os sinais dos ligantes^{22,23}. Nos experimentos “on-resonance” as proteínas são irradiadas em torno de -1,00 ppm, pois normalmente os ligantes não possuem sinais nessa região, enquanto as proteínas sim. Se os ligantes não possuem sinais na região aromática esta se torna uma região passível de irradiação. Pulsos seletivos são empregados nas irradiações de saturação dos sinais da proteína, pois estes devem ter sua posição de irradiação exatamente selecionada (Esquema 3).



Esquema 3. a) Sequência de pulsos do experimento de STD com uma sequência adicional WATERGATE para eliminar o sinal residual do H₂O. A subtração espectral é realizada depois de cada scan, através de ciclagem de fase. A frequência do pulso seletivo é colocada ora em -0,4 ppm (“on resonance”) ora em 30 ppm (“off-resonance”); b) representação esquemática do experimento de STD. Quando a proteína se torna saturada, os ligantes que estão ligados a ela se tornam saturados também, através da transferência de NOE intermolecular

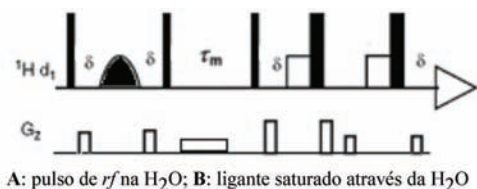
Os experimentos de STD são excelentes técnicas para determinação do epitopo e das constantes de ligação dos ligantes, informações estas de suma importância no desenvolvimento de novas drogas.

A técnica de STD, desenvolvida por Mayer e Meyer²¹, representa um dos mais sensíveis e populares métodos de triagem de ligantes e foi inicialmente aplicada na verificação da atividade de ligação entre moléculas de carboidratos e aglutinina de germen de trigo (WGA) em solução.

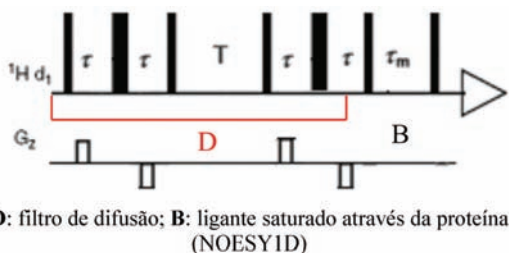
Apesar dos inúmeros trabalhos publicados recentemente utilizando o experimento de STD para detectar ligantes em potencial, esta metodologia é inadequada quando receptor e ligantes apresentam sinais nas mesmas regiões do espectro, como no caso de proteínas (**R**) e polipeptídeos (**L**) ou DNA (**R**) e polinucleotídeos (**L**). Por isso, uma variação do experimento de STD, o WaterLOGSY, foi proposto a fim de identificar um ligante ligado à proteína através de moléculas de H₂O usadas como repórteres.

O experimento de WaterLOGSY transfere parcialmente a magnetização a partir da água via complexo proteína-ligante para o ligante livre (Esquema 4)^{16,24}. Neste experimento, os sinais dos compostos não ligados aparecem com fase oposta e tendem a ser menos intensos que os sinais dos ligantes que interagem com a proteína. Baseados em muitas observações experimentais, Dalvit e colaboradores²⁵ desenvolveram um experimento que usa o volume de água para detectar a interação entre ligantes e proteína. Essa técnica obteve sucesso no estudo do mapeamento da ligação de dez ligantes de baixa massa molecular (na concentração de 100 μM cada) a uma cinase-2 dependente de ciclina (cdk2, 34 kDa, concentração 10 μM), sendo especialmente útil para complexos em que os participantes são fortemente hidratados, portanto, nesta técnica existe uma clara discriminação entre as moléculas livres e ligadas à proteína.

Outro experimento utilizado na triagem de ligantes que interagem com macromoléculas é o NOE “pumping”, que utiliza um filtro de difusão para eliminar os sinais dos ligantes livres na mistura enquanto preserva os sinais do receptor macromolecular, seguido por um tempo de mistura da sequência NOESY-1D que permite a difusão de spin através de caminhos de relaxação a partir da proteína para os ligantes (Esquema 5). A macromolécula complexada funcio-



Esquema 4. a) Sequência de pulsos do experimento de WaterLOGSY. O sinal da água é seletivamente invertido em varreduras alternadas de pulsos de 90° e deslocamentos de fase dos pulsos seletivos de 180°. A transferência de magnetização da água invertida, tanto para os ligantes livres como ligados, ocorre durante o T_m ; b) mecanismos de transferência de magnetização fundamentais do WaterLOGSY. A transferência de magnetização a partir da água para os ligantes ocorre via hidrogênios lábeis do receptor dentro e fora do sítio ativo. As bolinhas azuis indicam as moléculas de água invertidas. Somente os ligantes ligados experimentam ambos tipos de transferência de magnetização



Esquema 5. a) Sequência de pulsos do experimento de NOE pumping. As barras finas e grossas representam os pulsos de 90° e 180°, respectivamente; b) representação esquemática mostrando a ligação reversível do ligante (L) ao receptor (R) para formar o complexo RL. Os ligantes livres em solução têm seus sinais eliminados pelo filtro de difusão (D). Os caminhos de relaxação, a partir da proteína para o ligante, tornam-se visíveis durante o τ_m

na como um reservatório de polarização para os seus ligantes. Após a dissociação do complexo, os ligantes que sofreram transferência de magnetização apresentam alteração da amplitude dos seus sinais, efeito NOE, a qual perdura mais que na macromolécula devido aos longos tempos de T_1 das moléculas pequenas no estado livre.

Para demonstrar a eficiência deste método, Chen e Shapiro^{8,9} analisaram uma mistura de albumina humana (HSA) e possíveis ligantes como ácido salicílico, ácido ascórbico e a D-glucose, demonstrando que apenas o ácido salicílico interagia com a proteína.

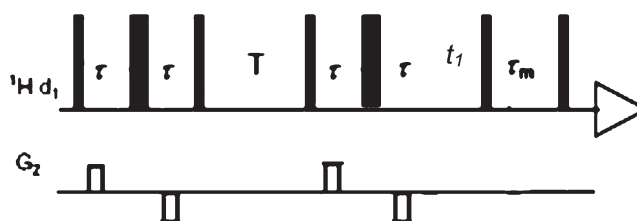
Uma variação deste experimento é o NOE “pumping” reverso (RNP), que consiste do experimento de NOE “pumping” acrescido de um filtro (CPMG- T_2). A avaliação da mistura de HSA e ácidos graxos lineares permitiu evidenciar o ligante ativo na mistura e a maior interação da macromolécula com os ácidos graxos de cadeia mais longa indicando que existe uma resposta espectral maior para os ácidos graxos de cadeia mais longa.

O método de NOE “pumping” é pouco sensível se comparado aos experimentos de STD e WaterLOGSY, consumindo um tempo de máquina pelo menos 5 vezes maior.

Em princípio, os NOEs intermoleculares que ocorrem entre um ligante e um receptor macromolecular permitem a determinação dos pontos de interação da proteína e do ligante (epitopo) e, portanto, a orientação do ligante no sítio ativo da proteína.

Recentemente, o 2D-DOSY²⁶ (“diffusion-ordered spectroscopy”) que usa gradientes de campo pulsados para medir coeficientes de difusão ganhou popularidade, possibilitando a medida exata e não invasiva dos coeficientes de difusão de componentes isolados em misturas complexas. Uma extensão do experimento de DOSY foi proposta e denominada de DOSY-NOESY (“diffusion-ordered NOESY”) por Gorenstein e Gozansky²⁷.

O DOSY-NOESY não mede os coeficientes de difusão, mas aplica a difusão molecular no estudo de misturas complexas ou de moléculas em equilíbrio dinâmico entre os estados ligados e livres. É importante que os componentes do sistema apresentem coeficientes de difusão significativamente diferentes para que os NOEs possam ser resolvidos baseados nas velocidades de difusão. Se a velocidade de troca for lenta para a escala de tempo da RMN, as correlações de NOE serão separadas pelos respectivos coeficientes de difusão. Contudo, se a velocidade for de moderada a rápida, os NOEs a partir do complexo terão um coeficiente de difusão aparente baseado na velocidade de troca. Teoricamente, a única exigência para o uso do DOSY-NOESY é a capacidade de separar os coeficientes de difusão entre as espécies de interesse do resto do sistema químico (Esquema 6).



Esquema 6. Sequência de pulsos do experimento de DOSY-NOESY. Este experimento é uma junção da sequência STE com a sequência de NOESY. Os tempos t_1 e τ_m são os tempos de evolução e de mistura, respectivamente

A base para determinação da razão de ligação é que os coeficientes de difusão se alterem pela interação com o receptor. Em um equilíbrio rápido, a Equação 5 descreve o quanto a magnitude da magnetização (I) é afetada pela força do gradiente no experimento de difusão²⁸.

$$I_k = I_0 \exp \left[-D \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) K^2 \right] \quad (5)$$

em que, $K = \gamma \delta g$, γ é a razão magnetográfica, δ é a largura do pulso de difusão, g é a força do gradiente, I_0 é a intensidade do sinal quando $g = 0$, D é o coeficiente de difusão e Δ é o tempo no qual a difusão é monitorada.

No experimento de DOSY-NOESY, a intensidade do sinal obtida pela transferência de NOE é determinada pela porção DOSY

da seqüência. A Equação 3 pode ser reescrita de forma que a inclinação da reta determinada pela $\ln[I(K)]$ (intensidade do sinal) versus g^2 (força do gradiente) seja proporcional ao coeficiente de difusão da espécie de interesse.

Tashiro e colaboradores²⁹ aplicaram a seqüência de pulsos DOSY-NOESY para verificar a interação entre os hidrogênios aromáticos do ácido salicílico e a região alifática da albumina de soro humano (HSA). Este experimento, diferentemente dos outros citados anteriormente, fornece também o epitopo da macromolécula, ou seja, além de mostrar quais hidrogênios da molécula pequena estão envolvidos na interação ainda mostra qual porção da proteína interage com o ligante, sem necessidade de marcação isotópica. Entretanto, é um método que consome em torno de 10 vezes mais de tempo de máquina que os outros experimentos citados anteriormente.

Vários critérios devem ser considerados para a escolha do método certo para identificar e caracterizar o ligante através da espectroscopia de RMN. A Tabela 1 é sumário de alguns desses métodos².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A parte introdutória deste artigo apresentou as quatro metodologias mais utilizadas nos estudos de interação receptor-ligante. Entretanto, a literatura é escassa, ou melhor, inexistente com relação a uma análise comparativa destas técnicas utilizando uma mesma amostra. Portanto, este trabalho teve como objetivo principal comparar os resultados obtidos aplicando estas quatro técnicas a uma amostra modelo de albumina de soro bovino (BSA) na presença de ácido adípico, ácido cítrico, cafeína, *D*-glucose e ácido salicílico. Essas moléculas pequenas foram utilizadas como modelos de metabólitos celulares, pois é conhecido que estas apresentam afinidade com as proteínas do sangue, com exceção da *D*-glucose que foi usada como controle negativo. Neste estudo, as concentrações das macromoléculas não foram variadas. Mudanças na concentração da proteína podem aumentar a viscosidade da solução se comparada à concentração do ligante, resultando em mudanças nos coeficientes de difusão do ligante independente da interação proteína/ligante.

Foram realizados três experimentos modelos: **1**) com 90 μ M de BSA (concentração determinada por UV) e uma mistura de ligantes, chamada de **mistura 1**, contendo 9,84 mM de ácido salicílico (**1**), 10,2 mM de cafeína (**2**), 10,5 mM de ácido cítrico (**3**), 10,4 mM de ácido adípico (**4**) e 10,0 mM de *D*-glucose (**5**) em tampão fosfato (pH = 7) em 99,9% de D₂O; **2**) com 90 μ M de BSA e uma mistura, chamada de **mistura 2**, contendo 10,9 mM de (**1**) e 10,3 mM de (**5**) em tampão fosfato (pH = 7) em 99,9% de D₂O e **3**)

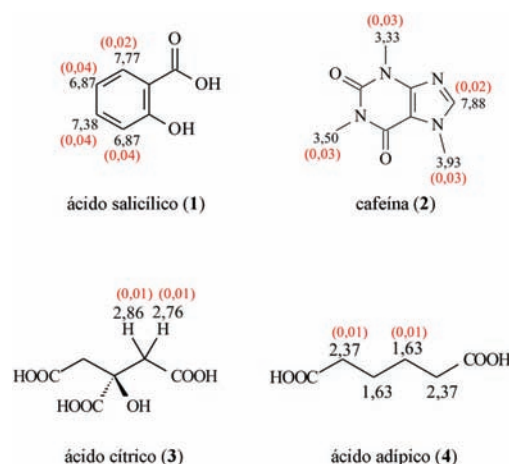
com 90 μ M de BSA e uma outra mistura, chamada de **mistura 3**, contendo 10,2 mM de (**2**) e 10,3 mM de (**5**) em tampão fosfato (pH = 7) em 99,9% de D₂O. Estes experimentos permitiram, além da otimização dos parâmetros experimentais, a investigação do equilíbrio químico competitivo entre mais de duas espécies por RMN.

Uma primeira avaliação da interação entre os ligantes e BSA já pode ser feita através do espectro RMN de ¹H observando a variação dos deslocamentos químicos (δ) dos ligantes da **mistura 1** na ausência e na presença de BSA. O δ_0 observado no espectro dos ligantes na presença da BSA é a média ponderada dos δ do ligante nos estados livre e ligado, como mostrado na Equação 6.

$$\delta_0 = (\delta_L \times f_L) + (\delta_B \times f_B) \quad (6)$$

em que, f_L e f_B são as frações molares dos ligantes livres e ligados. Além disso, o pequeno alargamento dos sinais dos ligantes (**1**) e (**2**) na presença de BSA e não a duplicação dos sinais é outro indicativo de que a interação acontece em um regime de troca rápida. Os números sobre as estruturas abaixo representam os δ_H dos respectivos sinais na presença de BSA e os números em vermelho representam as $\Delta\delta_H$ dos sinais na presença e na ausência de BSA, Esquema 7.

Foram realizados experimentos de difusão aplicando a seqüência de pulsos *DBPPSTE*³⁰ e os valores de K_d para os ligantes nas **misturas 1** e **2** puderam ser calculados a partir da Equação 7, como mostrado na Tabela 2.



Esquema 7. Os números sobre as estruturas acima representam os δ_H dos respectivos sinais na presença de BSA e os números em vermelho representam as $\Delta\delta_H$ dos sinais na presença e na ausência de BSA

Tabela 1. Técnicas de RMN para identificação e caracterização de ligantes

	STD	NOE “pumping”	WaterLOGSY	Experimentos de difusão
Proteínas (>30 kDa)	sim	sim	sim	não
Proteínas (<10 kDa)	não	não	não	sim
Proteínas marcadas isotopicamente	não	não	não	não
“Epitope mapping” da proteína	não	não	não	não
“Epitope mapping” do ligante	sim	sim	sim	Não
Quantidade de proteína a 500 MHz	0,1 nmol	~ 25 nmol	~ 25 nmol	~ 100 nmol
K_d (ligação forte) K_d (ligação fraca)	0,1 nM ~ 10 mM	1 nm ~ 1 mM	0,1 nM ~ 10 mM	~ 100 nM ~ 1 mM
Identificação do ligante	sim	sim	sim	sim
Comentários	Método robusto	Método estável, mas o excesso de ligante e o tempo de mistura devem ser otimizados	Bom para alvos ou ligantes hidrofílicos	Método relativamente pouco sensível

$$K_d = P_{tot} \left(\frac{D_b - D_0}{D_0 - D_f} \right) + L_{tot} \left(\frac{D_0 - D_b}{D_b - D_f} \right) \quad (7)$$

A constante de equilíbrio pode ser calculada a partir da concentração de proteína (P_{tot}) e de ligante (L_{tot}) e pela medida do coeficiente de difusão (D_0) para os ligantes na presença de proteína, do coeficiente de difusão (D_f) para o ligante na ausência de proteína e do coeficiente de difusão (D_b) para a proteína pura. A Equação 2 é adequada para sistemas de equilíbrio 1:1.

As constantes de dissociação aparentes calculadas para os ligantes indicaram fraca interação com a proteína, uma vez que os valores de K_d encontrados foram da ordem de 10^{-3} M. Além disso, foi possível constatar que (1) ($K_d = 26$ mM) interage em uma maior proporção com a BSA que (2) ($K_d = 128$ mM).

O aumento do valor de K_d para (1) na **mistura 1** ($K_d = 26$ mM) se comparado à (1) na **mistura 2** ($K_d = 3,6$ mM) pode ser racionalizado de duas formas: na **mistura 1**, ambos ligantes (1) e (2) estão competindo pelo mesmo sítio na BSA ou, na **mistura 1**, a cafeína liga-se a um sítio alostérico modificando a conformação da proteína e alterando a topologia do sítio ativo do ácido salicílico enfraquecendo a ligação e, portanto, aumentando K_d .

Entretanto, as constantes de dissociação determinadas por difusão sofrem distorções acarretadas pelas alterações conformacionais e dinâmicas impostas pela complexação. Além do mais, esta técnica não fornece nenhuma informação sobre o epitopo dos ligantes, sendo usada exclusivamente para triagem. Portanto, é de fundamental importância avaliar as associações supramoleculares aplicando metodologias complementares e uma alternativa escolhida foi o uso do experimento de STD.

Em princípio, no experimento de STD, o grau de saturação de um hidrogênio individual de um ligante reflete a proximidade deste à superfície da macromolécula. A intensidade relativa dos hidrogênios do ligante nos espectros de STD controle (I_0) e STD (I_{sat}) fornece o “fator STD” (A_{STD})²⁰, a partir da Equação 8:

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} = \frac{I_{STD}}{I_0} \quad (8)$$

A multiplicação do fator STD pelo excesso de ligante fornece o fator STD amplificado, que permite uma melhor avaliação do valor absoluto do efeito STD, fornecendo a quantidade de ligante ativo na mistura.

A Figura 1a mostra o espectro de STD da **mistura 1** e o mapa de epitopo de (1) e (2) na presença de 90 μ M de BSA (razão molar proteína-ligante igual a ~ 122). Os dados apresentados no espectro são as intensidades relativas ao espectro de referência (STD con-

trole) e obtidas a partir da Equação (1). O mapa de epitopo dos ligantes (1) e (2) foram obtidos pela normalização do sinal mais intenso de cada ligante para 100.

O espectro de STD da **mistura 1** mostrou que a BSA se ligou ao composto (1) através dos intensos sinais dos H-6 (7,77 ppm), H-4 (7,38 ppm) e H-3,5 (6,87 ppm) com um fator STD de 12 a 14 % e ao composto (2), em menor proporção (1 a 2 %), através dos H-8 (7,88 ppm), da CH₃-9 (3,93 ppm), CH₃-3 (3,50 ppm) e CH₃-1 (3,33 ppm).

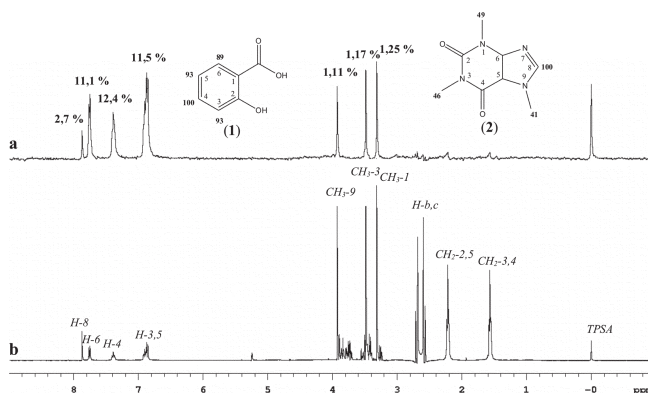


Figura 1. a) Espectro de STD e b) espectro de STD controle da **mistura 1** na presença de 90 μ M de BSA a 25°C. As intensidades relativas obtidas através do experimento de STD estão apresentadas em negrito sobre o espectro de STD e a atribuição de cada sinal está indicada em itálico sobre cada sinal no espectro de STD controle. Os números em negrito sobre as estruturas representam o mapa de epitopo

Objetivando uma otimização dos parâmetros de aquisição foi obtida uma série de espectros de STD para as **misturas 1 e 2** variando o tempo de saturação de 100 ms a 10 s, como mostrado nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

O fator STD máximo para o composto (1) foi conseguido com tempos de saturação em torno de 4,0 s tanto para a **mistura 1** como para a **mistura 2** (Figuras 2a e 3a), já para **mistura 3** cujo H-8 possui tempo de relaxação (T_1) maior o fator STD máximo não foi alcançado até 7,5 s (Figura 3b).

Uma outra constatação importante foi que para **mistura 1** a percentagem de interação foi 2% menor para (1) e 3% menor para (2) quando comparadas à percentagem de interação desses compostos nas **misturas 2 e 3** nas quais não foram adicionados outros ligantes. Essa redução no efeito STD pela adição de outros candidatos a ligantes fornece fortes evidências de uma possível competição pela BSA entre os compostos (1) e (2).

Tabela 2. Comparação dos valores de difusão da **mistura 1** na ausência e na presença de 90 μ M de BSA e valores de K_d para os ligantes (1) e (2) nas **misturas 1 e 2**

Composto	D (10^{-10} m ² s ⁻¹)	D/D_{D_2O}	D (10^{-10} m ² s ⁻¹)	D/D_{D_2O}	K_d (10^{-3} M)	K_d (10^{-3} M)
	Na ausência de BSA		Na presença de BSA		Mistura 1 Assumindo (1:1)	Mistura 2 Assumindo (1:1)
Ácido salicílico	7,82 ± 0,05	0,36	5,91 ± 0,10	0,28	26	3,6
Cafeína	6,71 ± 0,06	0,31	6,41 ± 0,05	0,30	187	
Ácido cítrico	6,52 ± 0,04	0,30	6,08 ± 0,06	0,28		
Ácido adípico	6,88 ± 0,04	0,32	6,47 ± 0,05	0,30		
D-glucose	5,23 ± 0,04	0,24	5,25 ± 0,09	0,25		
D ₂ O	21,6 ± 0,13	1,00	21,4 ± 0,12	1,00		
T ₁ PSA	7,08 ± 0,04	0,33	5,51 ± 0,06	0,26		

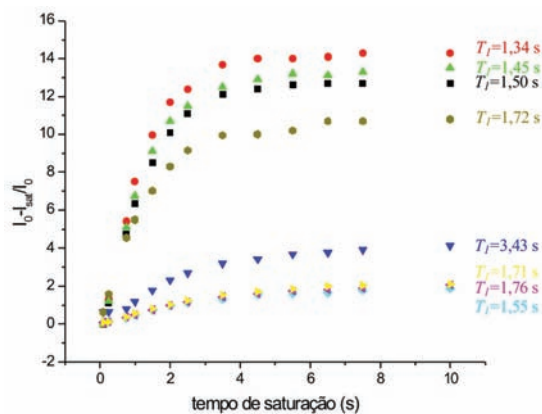


Figura 2. Gráfico do fator STD (%) versus o tempo de saturação (s) para **mistura 1**. A proteína foi irradiada com um trem de pulsos Gaussianos em $-0,50$ ppm para o espectro de STD e em 30 ppm para o espectro de STD-control. Os espectros foram adquiridos com um $d_1 = 1$ s e o tempo de saturação foi ajustado pelo número de pulsos Gaussianos. O tempo de relaxação longitudinal (T_1) para cada sinal na presença de BSA (● H-4, ▲ H-3,5 e ■ H-6 de (1); ▼ H-8, ► CH₃-1, ◄ CH₃-3, ◆ CH₃-9 de (2) e ● TPSA) está apresentado no gráfico

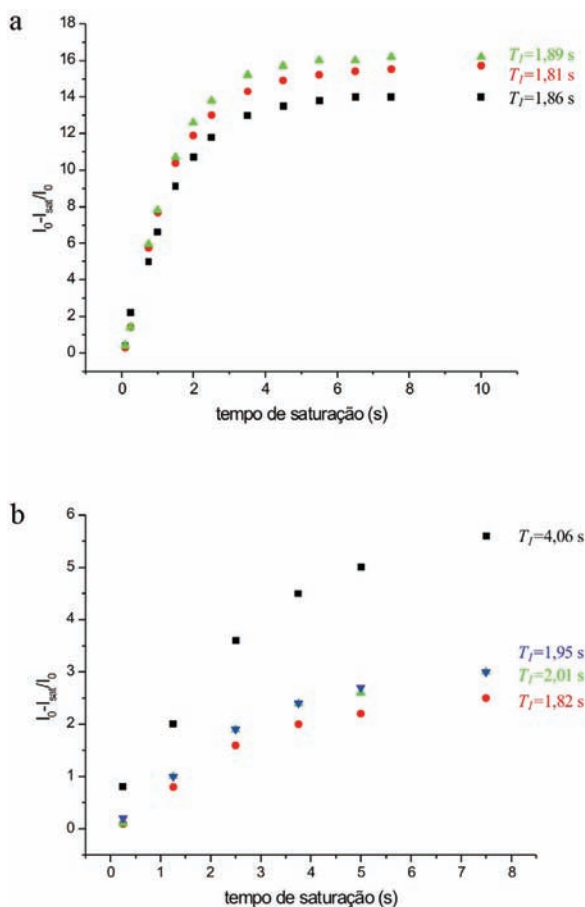


Figura 3. Gráfico do fator STD (%) versus o tempo de saturação (s) para **a) mistura 2** (▲ H-3,5, ● H-4, e ■ H-6 de (1)) **b) mistura 3** (■ H-8, ▲ CH₃-3, ▼ CH₃-1 e ● CH₃-9 de (2)). O tempo de relaxação longitudinal (T_1) para cada sinal na presença de BSA está apresentado no gráfico

Além disso, através do fator STD amplificado, foi possível quantificar a concentração de ligante “ativo”, permitindo uma estimativa da quantidade de proteína necessária para o experimento,

por exemplo, quando o H-4 apresentou um fator STD amplificado de 1,41 na presença de $90 \mu\text{M}$ de BSA, a concentração de ligante ativo foi de $127 \mu\text{M}$.

Os resultados obtidos na implementação da técnica de STD indicaram que este é um método rápido na triagem de ligantes na mistura e uma boa escolha na determinação do mapa de epitopo do ligante se os tempos de relaxação (T_1) individuais de seus hidrogênios forem similares.

Após a otimização dos parâmetros da seqüência de pulsos STD, passou-se para otimização do experimento de WaterLOGSY. Para tanto foi utilizada a mesma amostra contendo $90 \mu\text{M}$ de BSA e **mistura 1** acrescida de $20 \mu\text{L}$ de H_2O , pois, não foi observado nenhum sinal no espectro quando o experimento foi realizado com 99,9% de D_2O .

O tempo de mistura (τ_m) ótimo neste experimento depende do tamanho do complexo. Durante o tempo de mistura a magnetização da água é transferida para o complexo proteína-ligante. O tempo de mistura (τ_m) para este sistema variou de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 s. Com um τ_m de 0,1 s não se observou NOE positivo para nenhum componente da mistura, entretanto, observou-se NOEs negativos para os hidrogênios metílicos de (2), Figura 4b, ou seja, com τ_m muito curtos este composto aparece como não ligado. Já com um τ_m de 0,3 s observou-se NOEs positivos para os hidrogênios aromáticos de (1) em 7,77 ppm (H-6), 7,38 ppm (H-4) e 6,87 ppm (H-3,5) (Figura 5a), além de NOEs negativos para os compostos (2), (3) e (4). Com τ_m superiores a 0,5 s sinais positivos continuaram sendo observados para (1) e começaram a ser observados para os sinais em 7,88 ppm (H-8), 3,93 ppm (CH₃-9), 3,50 ppm (CH₃-3) e em 3,33 ppm (CH₃-1) de (2) indicando a interação destes com a BSA, enquanto que NOEs negativos em 2,86 e 2,76 ppm (CH_{b,c}) proveniente de (3) e em 2,37 ppm (CH₂-2,5) e em 1,63 ppm (CH₂-3,4) proveniente de (4) indicaram que estes compostos bem como a *D*-glucose (3,0 a 4,0 ppm) não interagem com a proteína. Ao aumentar o τ_m para 0,8 e 1,0 s observou-se um incremento de sinal para os compostos (1) e (2) que interagem com a BSA, o que não foi observado para os compostos (3) e (4) que não interagem com a BSA, indicando que a transferência de magnetização, nesse caso, foi mais efetiva com τ_m maiores.

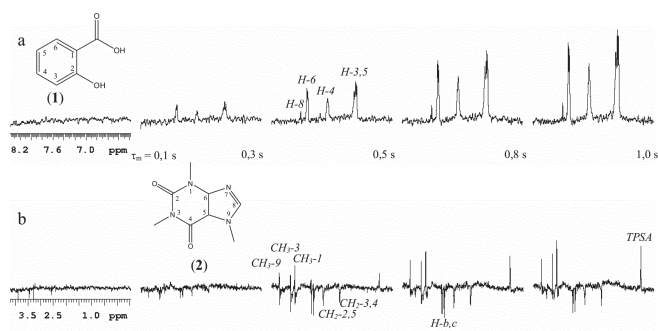


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H (499,883 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1) 2,5 mmol L^{-1} ; de d_7 -TPSA) WaterLOGSY, de uma mistura de $90 \mu\text{M}$ de BSA e a **mistura 1**, variando σ_m (0,1 a 1,0) s; a) região de 6,0 a 8,5 ppm e b) região de 0 a 4,0 ppm

Estes resultados confirmaram os resultados já obtidos por STD e mostraram a eficiente aplicação da técnica de WaterLOGSY na identificação de componentes ativos em misturas. De posse desses resultados passou-se para a otimização da técnica de NOE “pumping”.

Em contraste aos métodos de STD e WaterLOGSY, no experimento de NOE “pumping” os sinais dos compostos não ligados são eliminados por um filtro de difusão no início da seqüência de pulsos, fazendo com que apenas as moléculas que interagem com a proteína

sejam excitadas durante o tempo de mistura e, então, observadas.

Inicialmente, calibrar-se a força de gradiente necessária para cancelar os sinais das moléculas pequenas com τ_m de 0,001 s. Em seguida adquiriram-se espectros variando os tempos de mistura (τ_m) em (0,05; 0,30; 0,60 e 0,90 s). Estes resultados indicaram um aumento substancial das intensidades dos sinais dos ligantes com o aumento do τ_m , Figura 5. Com um τ_m de 0,30 s foram observados incrementos de NOE para os hidrogênios H-6, H-4, H-5,3 de (1) e para as metilas CH₃-1 e CH₃-3 de (2), já com τ_m igual a 0,60 s um incremento para metila CH₃-9 de (2) foi observado, e finalmente com um τ_m de 0,90 s foi observado incremento no H-8 de (2) que ainda não havia sido observado. Estes resultados demonstraram correlação intermolecular dos compostos (1) e (2) com a BSA conforme observado, previamente, com as técnicas de STD e WaterLOGSY.

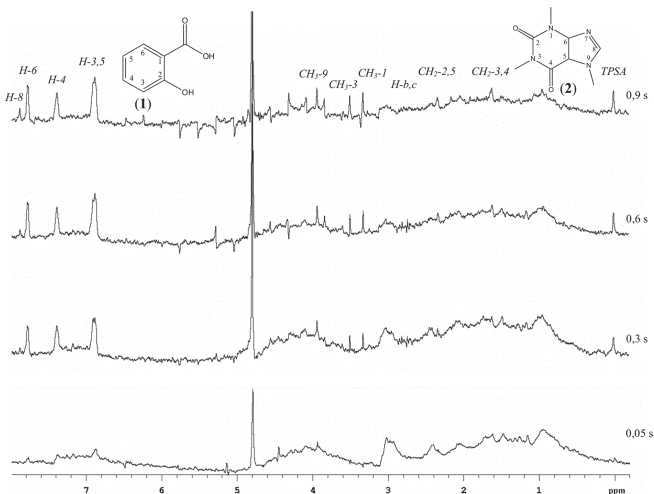


Figura 5. Espectro de RMN de ¹H (499,883 MHz, D₂O, 2,5 mmol L⁻¹; de d₂-TPSA) de NOE "pumping", de uma amostra contendo 90 µM de BSA e mistura 1, T = 150 ms, δ = 20 ms, variando o τ_m (0,05; 0,30; 0,60 e 0,90 s)

O experimento de NOE "pumping" foi eficiente na detecção dos componentes ativos na mistura, entretanto, os espectros de NOE "pumping" apresentaram uma razão sinal/ruído inferior às outras técnicas citadas, além de serem menos eficiente na redução dos sinais da proteína. Com isso, para usar esta metodologia seria necessário aumentar as concentrações dos componentes da mistura a fim de obter espectros mais bem resolvidos.

Em seguida, esta mesma amostra foi submetida a um experimento de DOSY-NOESY (Figura 6) com o intuito de identificar quais os segmentos da proteína interagiam com o ligante.

Para calcular o valor da força de gradiente (g) apropriada para obter o plano de difusão de (1), composto de interesse na mistura, fez-se um experimento de difusão usando a seqüência de pulsos DBPPSTE²⁹, que é a mesma seqüência usada com filtro de difusão no experimento DOSY-NOESY. Neste experimento de difusão variou-se o valor da força de gradiente de 3,81 a 22,86 G cm⁻² (0,0381 a 0,2286 T m⁻²). Dessa forma, obteve-se o decaimento dos sinais e os respectivos valores de difusão para os sinais de cada composto. De posse desses dados, fez-se um gráfico dos valores da força do gradiente (g²) ao quadrado versus o logaritmo neperiano da intensidade (lnI) de um determinado sinal rendendo uma reta para cada composto, Figura 6b. Fez-se uma regressão linear do decaimento do sinal do ácido salicílico (1) rendendo uma reta de equação y = A₀ + B x, em que A₀ é o valor da intensidade do sinal quando g² é igual a zero. De posse de todos parâmetros experimen-

tais o valor de g pode ser calculado a partir da Equação 5 que descreve o quanto a magnitude da "magnetização" foi afetada pela força do gradiente no experimento de DOSY.

Na seqüência NOESY foi necessário calibrar o tempo de mistura em 300 ms e adquirir espectros com fase 1,2. No plano de NOESY com coeficiente de difusão de 4,8.10⁻¹⁰ m²s⁻¹, obtido por DOSY-NOESY, foram observadas correlações entre os hidrogênios H-6 e H-3,5 de (1) e a BSA. Curiosamente, o H-4 foi o ponto que apresentou menor interação com a proteína através do experimento de DOSY-NOESY, resultado este conflitante com o obtido através do experimento de STD, o qual indicou ser o H-4 o ponto de maior interação. Como não existem outros exemplos na literatura será necessário realizar uma série de experimentos com outros sistemas para averiguar a origem da discrepância.

Além disso, foi possível sugerir, de acordo com a literatura³¹, que a BSA interage com (1) na região alifática da proteína de 0,90 a 1,40 ppm região dos hidrogênios metílicos de todos aminoácidos, de 1,00 a 3,30 ppm (H_β e CH alifáticos) e na região de 3,90 a 4,80

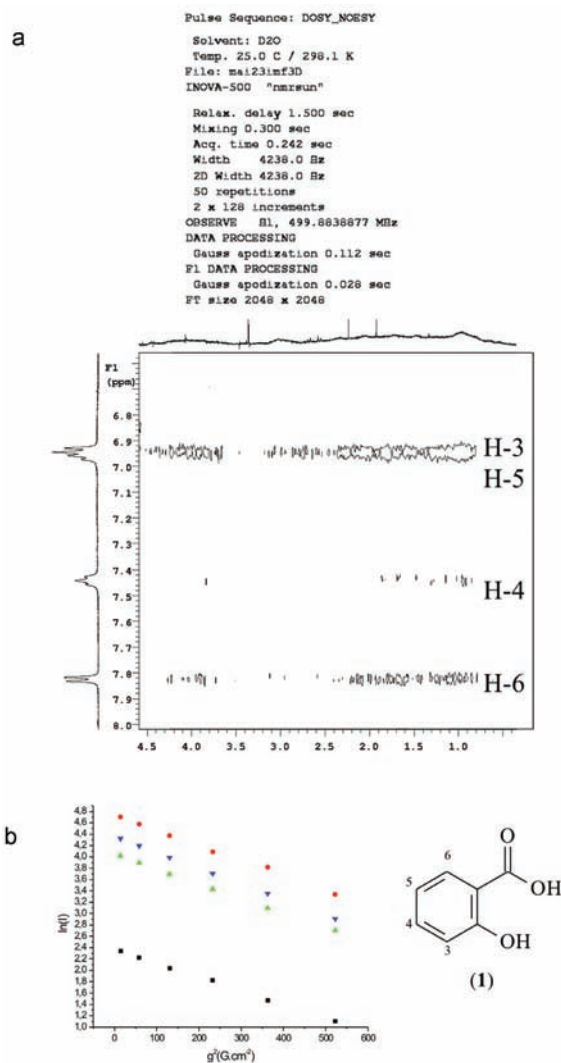


Figura 6. a) Mapa de contorno de DOSY-NOESY da mistura de 90 µM de BSA e a mistura 1 a 25°C, o plano de NOESY foi obtido com valor da força de gradiente de 4,76 G cm⁻¹. A expansão do espectro mostra a interação do ácido salicílico com a BSA com atribuição dos hidrogênios. Os sinais da proteína encontram-se na primeira dimensão (F₁) e os sinais dos ligantes na segunda dimensão (F₂); b) gráfico da força do gradiente ao quadrado versus o logaritmo neperiano da intensidade dos sinais ● (CH₃-9) de (2), ▼ (CH₂-2,5) de (4), ▲ (CH₂-b,c) de (3) e ■ (H-4) de (1)

ppm (H_{α} e H_{β}). Entretanto, para caracterizar a região exata da interação seria necessário utilizar mapeamento do deslocamento químico através espectroscopia de RMN de 2D e 3D.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O entendimento das interações proteína-ligante no nível molecular é de suma importância na compreensão dos mecanismos de ação das moléculas pequenas, revelando um panorama muito complicado, em que diversos efeitos podem ser responsáveis pela interação de uma determinada substância frente ao seu receptor macromolecular.

Dessa forma, os resultados obtidos para o sistema BSA ligantes indicaram que os experimentos de difusão, STD, WaterLOGSY, NOE “pumping” e DOSY-NOESY são técnicas de triagem eficientes para identificação de compostos ativos que se ligam a alvos macromoleculares com constantes de dissociação (K_d) entre 10^{-3} e 10^{-8} M.

Não obstante, a continuação deste trabalho e aplicação destas técnicas de transferência de NOE por RMN a outros sistemas receptor-ligante de relevante importância biológica é objetivo do nosso grupo de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de doutorado da aluna I. M. Figueiredo; Proc 03/00670-4. Ao Dr. M. Pons e M. Feliz (Universidade de Barcelona) pelas seqüências de pulsos de STD e WaterLOGSY, ao Dr. G. Gray (Varian-Palo Alto) pela seqüência de pulsos de NOE Pumping e ao Dr. E. Gozansky (University of Texas Medical Branch) pela seqüência de pulsos DOSY-NOESY.

REFERÊNCIAS

- Otting, G.; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 760.
- Meyer, B.; Peters T.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 864.
- Hadjuk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257.
- Ni, F.; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, *26*, 517.
- Mayer, M.; Meyer, B.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784.
- Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336.
- Dalvit, C.; *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 65.
- Chen, A.; Shapiro, M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258.
- Chen, A.; Shapiro, M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 414.
- Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Breslow, E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4015.
- Albrand, J. P.; Birdsall, B.; Feeney, J.; Roberts, G. C. K.; Burgen, A. S. V.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1979**, *1*, 37.
- London, R. E.; *J. Magn. Reson.* **1999**, *141*, 301.
- Bernie, A. J.; Moser, R.; Boumi, F.; Blaas, D.; Peters, T.; *Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14.
- Wuthrich, K.; Pellecchia, M.; Sem, D. S.; *Nature* **2002**, *1*, 211.
- Bothner-By, A. A.; Stephens, R. L.; Lee, J.; Warren, C. D.; Jeanloz, R. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811.
- Dalvit, C.; Fasolini, M.; Flocco, M.; Knapp, S.; Paolo, P.; Veronesi, M.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2610.
- Jahnke, W.; Floersheim, P.; Ostermeier, C.; Zhang, X.; Hemmig, R.; Hurth, K.; Uzunov, D. P.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *114*, 3570.
- Jahnke, W.; Widmer, H.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 580.
- Carlomagno, T.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 245.
- Peng, J. W.; Moore, J. M.; Lepre, C. A.; *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641.
- Mayer, M.; Meyer, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108.
- Meyer, B.; Peters, T.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 864.
- Heller, M.; Kessler, H.; *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1429.
- Tashiro, M.; Furihata, K.; Shimotakahara, S.; *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 69.
- Dalvit, C.; Pavarello, P.; Tato, M.; Veronesi, A.; Vulpetti, M.; *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 65.
- Morris, K. F.; Johnson Jr., C. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139.
- Gorenstein, D. G.; Gozansky, E. K.; *J. Magn. Reson. Series B* **1996**, *111*, 94.
- Stejskal, E. O.; Tanner, E. J.; *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 228.
- Tashiro, M.; Yamaguchi, K.; Seki, H.; Utsumi, H.; *Anal. Sci.* **2003**, *19*, 1441.
- Wu, D.; Chen, A.; Johnson, C. S.; *J. Magn. Reson. Series A*, **1995**, *115*, 260.
- Wultrich, K.; *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons: New York, 1986.