

# RMN BIOMOLECULAR – DESENVOLVIMENTOS RECENTES

## APLICAÇÕES MODERNAS DA RMN À BIOLOGIA

SOFIA R. PAULETA<sup>1</sup> E JOSÉ J. G. MOURA<sup>2</sup>

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é considerada uma das técnicas mais versáteis para estudar a nível atómico a estrutura/função e a dinâmica de biomoléculas em solução, tais como proteínas e ácidos nucleicos, e caracterizar problemas de interacção e reconhecimento molecular. Desenvolvimentos recentes têm permitido estudar problemas complexos desde a consideração de macromoléculas de elevada massa molecular, proteínas solúveis e membranares, proteínas contendo centros paramagnéticos, e abordar outros problemas, tais como a desnaturação de proteínas. A RMN é a única técnica espectroscópica com a qual se pode obter informação estrutural de biomoléculas com resolução atómica e em condições fisiológicas, pelo que as aplicações *in vivo* são muito exploradas. A aplicação de RMN no estado sólido a proteínas membranares é um domínio emergente. Este artigo pretende indicar desenvolvimentos recentes que permitem a aplicação da RMN a problemas biológicos complexos.

### Palavras chave

Ressonância Magnética Nuclear, Aplicações Biológicas, Desenvolvimentos recentes.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é hoje em dia considerada como sendo uma das técnicas mais versáteis para estudar a nível atómico a estrutura e a dinâmica de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos, e também caracterizar a interacção e reconhecimento molecular, nomeadamente interacções proteína-proteína, proteína-ligando ou proteína-ácidos nucleicos.

Um dos maiores problemas da RMN é a sua baixa sensibilidade, devido às transições magnéticas nucleares serem pouco intensas. No entanto, nos últimos anos têm-se verificado diversos avanços na técnica que permitem contornar este problema, permitindo a expansão da aplicação da RMN a tópicos, tais como:

- i. Proteínas com mais de 25 kDa,
- ii. Proteínas membranares,
- iii. Proteínas contendo centros paramagnéticos,

- iv. Proteínas desnaturadas,
- v. RMN de proteínas em células *in vivo*.

A aplicação da RMN a estes tópicos de interesse biológico foi possível devido a avanços significativos não só ao nível da instrumentação de RMN (campos magnéticos mais elevados e crio-sondas de maior sensibilidade), como também no desenvolvimento de novas sequências de pulsos, novos esquemas de aquisição de espectros multidimensionais, a detecção directa de <sup>13</sup>C, e também a marcação selectiva de aminoácidos, assim como a possibilidade de introduzir sondas paramagnéticas em proteínas.

Para além destas inovações na RMN de proteínas no estado líquido, tem-se assistido nos últimos anos ao desenvolvimento da RMN de sólidos aplicada a proteínas membranares, a proteínas contendo regiões desordenadas ou homomultímeros de elevada massa molecular.

Uma vez que estes avanços abrangem diversos tópicos, o artigo destaca

somente algumas destas inovações: métodos rápidos de RMN, detecção directa de <sup>13</sup>C e uso de sondas paramagnéticas, e são usados como exemplos a utilização da RMN na triagem de condições das amostras nos projectos de genómica estrutural e nos estudos de complexos transientes proteína-proteína.

Designaremos RMN biomolecular à aplicação de RMN a problemas de interesse biológico.

Os núcleos que são frequentemente observados por RMN biomolecular têm abundância natural (<sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P) ou podem ser enriquecidos através da expressão heteróloga, usando fontes de carbono e azoto enriquecidos nestes isótopos (<sup>13</sup>C e <sup>15</sup>N).

Uma vez que cada um destes núcleos dá origem a um sinal num espectro RMN, é de esperar que haja um grande número de sinais que se encontrem sobrepostos, e que têm de ser identificados de forma a se extrair toda a informação estrutural que contêm. Uma das formas de solucionar o

REQUIMTE/CQFB, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

<sup>1</sup> Email: srp@dq.fct.unl.pt

<sup>2</sup> Email: jose.moura@dq.fct.unl.pt

problema da sobreposição de sinais nos espectros de RMN foi a introdução de espectros multidimensionais, RMN nD. Estes espectros correlacionam a frequência de um sinal numa dimensão com outras frequências noutras dimensões, permitindo a identificação de sinais sobrepostos observados nos espectros unidimensionais.

Um dos espectros mais utilizados na RMN biomolecular, e que pode ser considerado como o espectro base, é o  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (correlação heteronuclear de quantum-simples), em que cada sinal observado corresponde a um próton ligado a um núcleo  $^{15}\text{N}$ . Uma vez que, numa proteína, cada resíduo, à excepção da prolina e do resíduo N-terminal, tem um próton ligado a um azoto na ligação peptídica, o número de sinais observados num  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de uma proteína deve corresponder ao número de resíduos da sua cadeia polipeptídica (as cadeias laterais dos resíduos de asparagina e glutamina contribuem com dois sinais cada) (ver Figura 3A). Por este motivo, este espectro é considerado como sendo a *impressão digital* de uma proteína, e a dispersão dos sinais observados indica que a proteína se encontra estruturada.

## 1) MÉTODOS RÁPIDOS DE RMN

Apesar das vantagens evidentes, a aquisição de espectros multidimensionais requer um maior tempo experimental para a aquisição de várias repetições das sequências de pulso, de forma a obter-se informação suficiente nas outras dimensões (denominadas de indirectas). Assim, apesar de um espectro de RMN 2D poder ser adquirido em apenas alguns minutos, o aumento de mais uma dimensão, espectro 3D, significa que a experiência poderá durar vários dias, pelo que a aquisição de espectros com um maior número de dimensões pode tornar-se impraticável (tanto pela estabilidade das proteínas como pelo tempo disponível e custo associado à utilização do aparelho).

Para ultrapassar este problema têm sido desenvolvidas formas mais rápidas para a realização de espectros de RMN que podem ser agrupadas em dois grupos: *i) métodos de amo-*

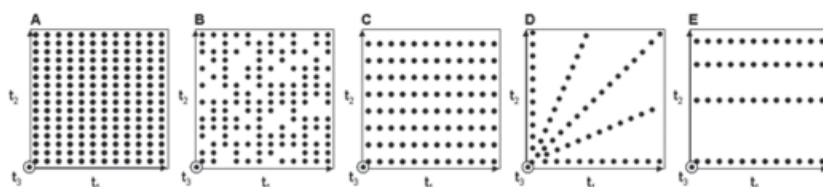
*stragem reduzida*, que se baseiam na optimização do número de pontos experimentais de uma experiência, por limitação do número de pontos adquiridos, e *ii) métodos de pulso rápido*, em que há a optimização do tempo de aquisição por redução do tempo de cada uma das repetições (Tabela 1).

**Tabela 1** – Metodologias que podem ser aplicadas na aquisição rápida de espectros de RMN

Técnicas		
<b>Amostragem reduzida</b>	Amostragem não-uniforme	[1]
	Subamostragem	[2]
	Espectroscopia de projecção	[3]
	Espectroscopia de Hadamard	[4]
	Codificação espacial	[5]
<b>Pulso-rápido</b>	Aumento da relaxação longitudinal	[6]
	Optimização do ângulo de Ernst	[7]

### *i) métodos de amostragem reduzida*

Considere-se uma experiência 3D que requer uma amostragem numa grelha bidimensional formada pelas variáveis temporais  $t_1$  e  $t_2$  (Figura 1A). Numa amostragem linear convencional, o espaçamento entre dois pontos sucessivos é determinado pelo inverso do intervalo do desvio químico (janela espectral) da frequência do núcleo observado, e o número de pontos adquiridos depende da resolução pretendida.



**Figura 1** – Representação esquemática dos vários tipos de métodos de amostragem reduzida

Assim, se se pretende diminuir o tempo total de aquisição de um espectro de RMN multidimensional, pode-se adquirir apenas um número menor de pontos escolhendo ao acaso pares ( $t_1$ ,  $t_2$ ) da grelha de amostragem, o que é denominado de amostragem não-uniforme (Figura 1B) [1]. O processamento destes dados não pode ser feito através dos métodos convencionais, como a Transformada de Fourier ou previsão linear, sendo necessário recorrer à utilização de algoritmos de processamento para a reconstrução do espectro de RMN multidimensional, como a reconstrução por máxima

entropia [1], ou decomposição multidimensional [8].

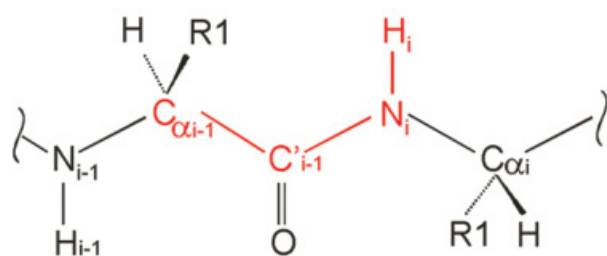
Uma outra metodologia para reduzir a amostragem consiste na subamostragem do domínio de tempo da grelha (Figura 1C), o que reduz aparentemente a janela espectral. Neste caso,

o que se obtém é o *folding* do espectro, pois a largura espectral é menor que o intervalo dos desvios químicos dos spins nucleares observados [2]. Esta metodologia tem que ser usada com cuidado, de forma a não sobrepor os sinais, mas pode reduzir, por exemplo, quatro vezes o tempo de aquisição de um espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, quando se aplica a subamostragem à dimensão  $^{15}\text{N}$ .

Por outro lado, a espectroscopia de projecção consiste no incremento si-

multâneo de vários tempos de evolução indirectos (neste caso,  $t_1$  e  $t_2$ ), e traduz-se numa amostragem radial do domínio temporal indirecto da grelha de amostragem (Figura 1D). As projecções nos domínios de frequência são depois utilizadas para reconstruir o espectro de RMN completo, através de algoritmos específicos [3, 9]. Um exemplo desta metodologia são as sequências desenvolvidas por Wüthrich e seus colaboradores, designadas por APSY (Espectroscopia de Projecção automatizada, *Automated Projection Spectroscopy*) [10], para a identificação de ressonâncias da cadeia

carbonada de proteínas de tamanho médio (15 kDa) [11], e de proteínas intrinsecamente desnaturadas [12]. Neste tipo de espectroscopia, APSY, a análise da projecção dos espectros é feita automaticamente (sem a análise humana dos espectros multidimensionais), obtendo-se no final uma lista das frequências correspondentes aos sinais que seriam observados nesses espectros multidimensionais. Por exemplo, numa experiência APSY-HNCO-CA 4D [10], obtém-se uma lista com os desvios químicos dos spins:  $H_i$ ,  $N_i$ ,  $C'_{i-1}$  e  $C_{\alpha i-1}$  (Figura 2).



**Figura 2** – Representação da cadeia polipeptídica, evidenciando os núcleos, cujo desvio químico é obtido através da sequência APSY-HNCOCA 4D

A espectroscopia de Hadamard (Figura 1E) explora o facto de se conhecer *a priori* os desvios químicos das frequências de interesse e de, por este motivo, se poder escolher os spins que se pretendem excitar. Desta forma, substitui-se o domínio temporal por um domínio de frequência. Nestas sequências de pulsos utilizam-se pulsos de radio-frequência selectivos, que são aplicados simultaneamente (um para cada frequência de interesse) em substituição dos pulsos não selectivos para a excitação dos spins nas sequências convencionais [4, 13]. A experiência é repetida N vezes, e em cada repetição os pulsos são aplicados de forma a que o sinal de cada frequência é modelado de acordo com a matriz de Hadamard de ordem N estabelecida. Esta mesma matriz, escolhida para codificar as frequências, é posteriormente utilizada no processamento do espectro, de forma a separar cada uma dessas frequências.

Esta metodologia permite adquirir espectros contendo somente frequências de interesse, como as correspondentes aos grupos amida de resíduos do centro activo de uma proteína (útil no teste e procura de ligandos) [14], ou obter espectros  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC codificados por classe de aminoácido

(7 classes de aminoácidos podem ser definidas com base na diferente multiplicidade das ligações C-C e C-H [15]).

### ii) métodos de pulso rápido

As técnicas de RMN de pulso rápido consistem na diminuição do “tempo de espera” entre cada scan sucessivo, fazendo com que o tempo para se adquirir o mesmo número de scans seja menor. Esta técnica pode ser acoplada às técnicas de amostragem reduzida mencionadas anteriormente,

o que pode reduzir de forma significativa o tempo de aquisição de espectros de RMN.

Este “tempo de espera” é necessário para permitir que os spins, que foram excitados, relaxem ao seu estado de equilíbrio. Uma das formas de diminuir este intervalo de tempo é através do aumento da relaxação longitudinal, que explora o facto da eficiência de relaxação spin-rede de  $^1H$  poder ser aumentada se os prótons na sua vizinhança não forem perturbados pela sequência de pulsos, podendo por isso receber energia através de interações dipolo-dipolo ou por processos de permuta [6].

Em conclusão, a aquisição de espectros de RMN (multidimensionais) de uma forma mais rápida possibilita a aplicação desta técnica a proteínas não estruturadas (por apresentarem grande número de ressonâncias sobrepostas) [12], a proteínas de maior massa molecular (em que devido a um maior número de sinais, se irá ter uma maior sobreposição espectral) [16], e permite ainda seguir reacções em tempo real, e obter informação sobre a cinética de reacções químicas [17, 18], ou seguir o processo de desnatura-

ção ou renaturação de proteínas em solução [19].

## 2) DETECÇÃO DIRECTA DE HETERONÚCLEOS

A elevada razão giromagnética,  $\gamma$ , dos prótons, que é responsável pela sua elevada sensibilidade também causa grandes interações dipolo-dipolo que levam a uma rápida relaxação dos núcleos. Este efeito provoca o alargamento das ressonâncias (que podem mesmo desaparecer) na vizinhança de um centro paramagnético ou em proteínas de elevada massa molecular.

O efeito do alargamento de linha devido à rápida relaxação transversa do próton em proteínas de elevada massa molecular pode ser diminuído com recurso a sequências de pulsos como TROSY (espectroscopia de relaxação transversa otimizada, *transverse relaxation-optimized spectroscopy*) [20], CRIPT (transferência de polarização induzida por relaxação-cruzada, *cross-relaxation-induced polarization transfer*) [21] ou CRINEPT (transferência de polarização correlacionada por aumento da relaxação, *cross-correlated relaxation-enhanced polarization transfer*) [22], ou através de esquemas mais elaborados de marcação isotópica, como a marcação isotópica de aminoácidos específicos, ou dos seus metilos, em que os restantes prótons da proteína se apresentam deuterados [23, 24]. Uma outra forma de diminuir este efeito, é o recurso à detecção directa de spins nucleares com uma razão giromagnética pequena, como é o caso do  $^{13}C$ .

Esta metodologia foi introduzida por John L. Markley em 1988 [25], e mais recentemente, Bertini e colaboradores desenvolveram sequências de pulsos com detecção directa de  $^{13}C$  para a identificação completa de heteronúcleos da cadeia carbonada, que podem fornecer informação sobre a estrutura e dinâmica das proteínas [26]. A detecção directa de spins nucleares de  $^{13}C$  tem sido utilizada não só em proteínas de elevada massa molecular, como é o caso por exemplo da ferritina (um dodecahedro de 22 kDa por monómero) [27], mas também na identificação de resíduos na vizinhança de um centro paramagnético [28].

Este facto deve-se à detecção directa de  $^{13}\text{C}$  não ser tão afectada pelo centro paramagnético como o  $^1\text{H}$ , devido à pequena razão giromagnética do  $^{13}\text{C}$  gerar uma diminuição nas contribuições paramagnéticas dipolares para a sua relaxação por um factor de  $(\gamma_{\text{C}}/\gamma_{\text{H}})^2$ . Uma outra aplicação destas novas sequências de pulsos é o estudo de proteínas intrinsecamente não estruturadas [29], uma vez que ao contrário do próton, o  $^{13}\text{C}$  apresenta uma maior dispersão de desvios químicos, o que soluciona o problema da grande sobreposição de sinais que se observa na frequência do  $^1\text{H}$  dos espectros

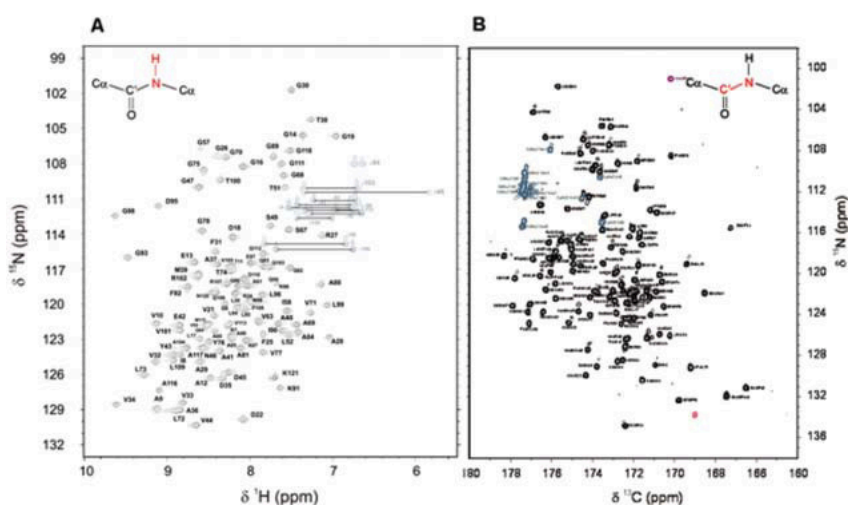
destas proteínas, mesmo sem ter de se recorrer a espectros 3D. Nesta metodologia, o espectro que correlaciona o  $^{15}\text{N}$  do grupo amida com o carbonilo da ligação peptídica, CON, é o espectro equivalente ao espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (Figura 3B), como sendo o espectro base para a identificação de todos os sistemas de spin (nomenclatura equivalente ao resíduo) da proteína e posterior identificação sequencial desses mesmos sistemas de spin. Para tal, foram concebidas uma série de experiências que estão esquematicamente representadas na Figura 4.

### 3) SONDAS PARAMAGNÉTICAS

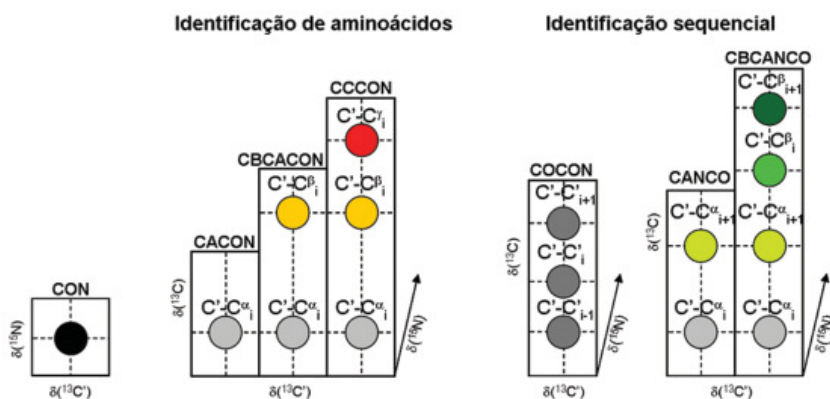
Até recentemente, a presença de um ião paramagnético nas amostras de RMN era vista como uma desvantagem, e frequentemente tentava-se substituir este ião por outro diamagnético, de forma a evitar os efeitos de alargamento de linha nas ressonâncias de núcleos na sua vizinhança. No entanto, nos últimos anos, o uso de sondas contendo metais paramagnéticos tem ganhado interesse, uma vez que podem ser usadas como uma ferramenta para a obtenção de informação estrutural em proteínas [31], e de orientação e dinâmica de complexos proteína-proteína [32] e proteína-ligando [33]. A utilização destas sondas permite a obtenção de restrições a longa-distância, através da determinação do aumento da relaxação paramagnética, de desvios de pseudocontacto e de acoplamentos dipolares residuais (RDCs) [34, 35].

O tipo de efeito que se observa depende do ião paramagnético que é utilizado nestes estudos, sendo que os desvios de pseudocontacto e os acoplamentos dipolares residuais são observados quando o ião paramagnético (a maioria dos lantanídeos,  $\text{Dy}^{3+}$ ) apresenta uma distribuição anisotrópica do spin electrónico. Os acoplamentos dipolares residuais (RDCs) são provocados pelo alinhamento induzido pelo paramagnetismo no campo magnético, e estendem-se a toda a molécula, podendo ser utilizados na definição das orientações relativas de domínios numa proteína ou de proteínas em complexos transientes, enquanto que os desvios de pseudocontacto, provocados pela interacção através do espaço com o electrão desemparelhado, podem ser observados até uma distância de 40 Å do ião paramagnético, e são proporcionais a  $1/d^3$  (sendo  $d$  a distância entre o spin nuclear e o ião paramagnético) [34].

No caso dos iões paramagnéticos que apresentam uma distribuição isotrópica de spin electrónico (ex., radicais nítrógeno, e iões  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Gd}^{3+}$ ), observa-se somente o aumento da relaxação paramagnética, que se deve à grande interacção magnética dipolar que existe entre o electrão desemparelhado num centro paramagnético e um



**Figura 3** – Espectros  $^1\text{H}$  - $^{15}\text{N}$  HSQC (A) e CON (B) da apo-Orange Protein de *Desulfovibrio gigas* Adaptado de [30]



**Figura 4** – Representação esquemática das experiências heteronucleares 2D (CON) e 3D baseadas na detecção directa de carbonos carbonilo, que podem ser usadas na identificação sequencial das ressonâncias da cadeia carbonada de proteínas. Em muitos casos somente o plano 2D das experiências 3D é adquirido. Adaptado de <http://www.cerm.unifi.it/home/research/protonlessnmr.html>.

núcleo (observável em RMN) na sua vizinhança, o que provoca um aumento da taxa de relaxação desse mesmo núcleo. Este efeito depende da distância,  $d$ , entre o núcleo e o electrão, e a sua magnitude é directamente proporcional a  $1/d^6$ , podendo ser observado até 20-35 Å dependendo do ião paramagnético que está a ser usado [36].

A utilização destas técnicas é possível quando as metaloproteínas em estudo apresentem locais de ligação a metais que podem ser substituídos por lantanídeos, como é o caso de locais de ligação a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . No entanto, têm sido desenvolvidos vários tipos de sondas paramagnéticas que se podem ligar a locais específicos da cadeia polipeptídica: i) através da ligação a um grupo tiol de um resíduo de cisteína (natural ou introduzido por mutação dirigida) que se encontre exposto à superfície da proteína, como é o caso das sondas de lantanídeos; ii) ou através da fusão, ao N- ou C-terminal da proteína, de pequenos peptídeos com afinidade para metais paramagnéticos.

Têm sido desenvolvidos outros tipos de sondas paramagnéticas em que não há a necessidade de ligação covalente entre a proteína e a sonda (radicais de nitróxido e sondas que ligam metais paramagnéticos [37]).

#### 4) UTILIZAÇÃO DE RMN NOS PROJECTOS DE GENÓMICA ESTRUTURAL

Muitos dos avanços referidos não poderiam ter tido lugar senão tivesse ocorrido uma melhoria simultânea na instrumentação, tal como o aumento da sensibilidade das crio-sondas em  $^{13}\text{C}$ , o desenvolvimento de crio-sondas (e micro crio-sondas) e pré-amplificadores, o aumento da sensibilidade das experiências de RMN através da utilização de campos magnéticos mais elevados, e a melhoria da electrónica digital da última geração dos espectrómetros de RMN.

Nomeadamente, o desenvolvimento de micro crio-sondas tem permitido a redução da quantidade de amostra a ser usada (30-200 µg num volume que pode ir de 8 a 35 µl) na aquisição de espectros para a determinação da estrutura de proteínas [38].

Estas sondas têm sido usadas nas linhas de selecção de proteínas alvo para a determinação das melhores condições de estabilidade da amostra (temperatura, soluções tampão, pH, força iónica, detergentes ou outros aditivos [39]), identificação de domínios de uma proteína mais complexa, para posteriores estudos estruturais por RMN ou cristalografia de raios-X. Nestas linhas de escrutínio é também rotina determinar o tempo de correlação da proteína de forma a determinar o seu estado de oligomerização em solução, nas condições (concentração de proteína, pH, força iónica) em que os estudos estruturais irão ser realizados.

A optimização das condições de amostra é essencial em sistemas tais como: proteínas de maior massa molecular, proteínas com vários domínios e proteínas membranares, que constituem verdadeiros desafios para estes domínios científicos emergentes [40].

Esta optimização é feita através da análise da dispersão e distribuição dos desvios químicos das ressonâncias no espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC da proteína alvo. A análise do  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC permite ainda avaliar o estado de pureza da proteína, a sua estabilidade em diferentes soluções tampão, temperaturas e para além disso contém informação sobre a dinâmica da proteína.

#### 5) METODOLOGIA SIMPLES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS PROTEÍNA-PROTEÍNA

Devido ao crescente número de genomas e de projectos de genómica estrutural, o número de estruturas de proteínas tem crescido exponencialmente, apesar da contribuição da ressonância magnética nuclear para este número ser relativamente pequena quando comparada com a da cristalografia de raios-X. No entanto, a RMN tem um papel muito mais importante na caracterização de interacções biomoleculares, por ser a única técnica que permite obter informação, em condições próximas das condições fisiológicas, sobre a estrutura, a dinâmica molecular das biomoléculas, e a termodinâmica e cinética de interacções biomoleculares.

As interacções transientes entre biomoléculas são extremamente importantes em biologia, na transferência electrónica, na transdução de sinal ou na regulação da expressão genética, pelo que a caracterização destes complexos tem ganho um interesse crescente em especial na perspectiva da Biologia de Sistemas.

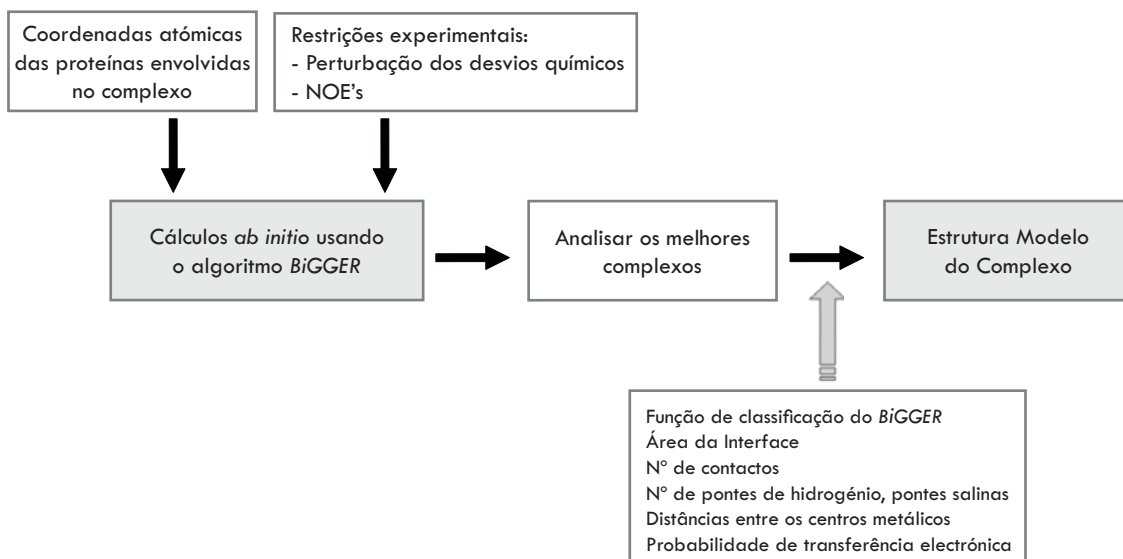
Uma das metodologias mais usadas na caracterização de interacções proteína-proteína por RMN é a perturbação dos desvios químicos, que permite o mapeamento da interface do complexo, informação esta que pode ser integrada em programas computacionais de atracamento molecular (*docking*) (como o programa BiGGER [41] ou Haddock [42]), de forma a obter-se um modelo da estrutura do complexo [43] (Figura 5). Esta metodologia tem sido muito utilizada na caracterização de complexos transientes e de baixa afinidade, como complexos de transferência electrónica [44, 45].

Uma outra metodologia é a experiência de transferência de saturação, em que uma proteína A é deuturada e marcada com  $^{15}\text{N}$ , enquanto que a outra proteína B (doadora) não é marcada [46].

Neste caso, a saturação das ressonâncias da proteína B, não marcada, leva à atenuação de sinal por mecanismos de saturação cruzada, que são observados no espectro de  $^1\text{H}$  -  $^{15}\text{N}$  HSQC da proteína A [47].

Outras metodologias usadas na caracterização de complexos transientes são os acoplamentos dipolares residuais [48] e o aumento da relaxação paramagnética [32] (anteriormente mencionados).

Neste caso, iremos ilustrar a aplicação da primeira metodologia ao complexo entre o citocromo  $c_3$ , uma proteína contendo quatro grupos hémicos (Fe-hémico hexacoordenado - octaédrico, 4 azotos da porfirina e dois ligandos axiais,  $\text{Fe}^{3+}$   $S=1/2$  e  $\text{Fe}^{2+}$   $S=0$ ), e a rubredoxina, que contém um ião ferro coordenado por quatro resíduos de cisteína (arranjo tetraédrico,  $\text{Fe}^{3+}$   $S=5/2$  e  $\text{Fe}^{2+}$   $S=2$ ). Este complexo, apesar de não ser fisiológico,



**Figura 5** – Procedimento para a obtenção de estruturas modelo de complexos proteína-proteína utilizando o BiGGER como programa de atracamento molecular

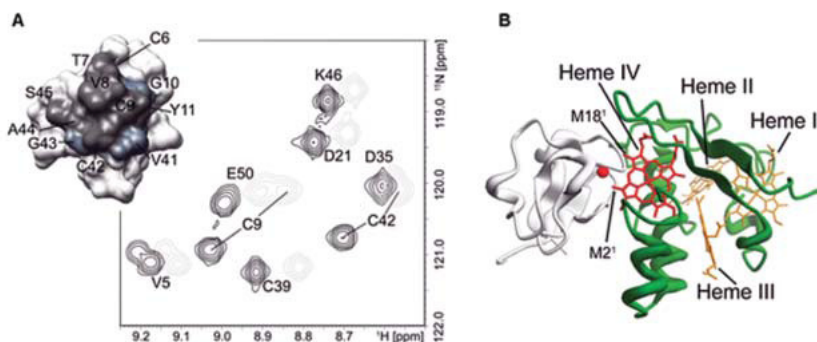
tem sido usado por nós como modelo para a aplicação de técnicas de RMN ao estudo de complexos transientes, como os complexos de transferência electrónica.

O complexo citocromo  $c_3$  –rubredoxina foi caracterizado de duas formas. Na impossibilidade de marcação isotópica do citocromo  $c_3$ , a identificação do hemo que fica na interface do complexo, foi feita através de uma titulação monitorizada por espectros  $^1\text{H}$ . O espectro  $^1\text{H}$  do citocromo apresenta 16 ressonâncias de grupos metilo dos quatro hemos, deslocadas para campo baixo devido ao efeito paramagnético do ferro (III).

No estado oxidado, a adição de rubredoxina ao citocromo  $c_3$ , provoca a relaxação selectiva de dois dos grupos metilo de um dos hemos (HemoIV).

Por outro lado, como a rubredoxina pode ser marcada isotopicamente com  $^{15}\text{N}$ , podemos identificar os resíduos da rubredoxina que estão na interface do complexo, através de uma titulação monitorizada por espectros de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC.

A informação obtida através destas duas experiências foi posteriormente usada num programa de atracamento molecular, BiGGER, obtendo-se um modelo da estrutura do complexo (Figura 6) [45].



**Figura 6** – Estudo do complexo transiente entre a rubredoxina e o citocromo  $c_3$  por RMN. **A** – Identificação da interface do complexo através de uma titulação monitorizada por  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC; **B** – Melhor modelo da estrutura do complexo obtido através de um programa de atracamento molecular, BiGGER, utilizando os dados experimentais. Adaptado da referência [45]

## NOTA

A Rede Nacional de RMN, apoiada pela FCT-MCTES dentro do quadro de Reequipamento disponibiliza instrumentos de RMN de 800 a 400 MHz onde as técnicas descritas podem ser aplicadas.

Para os leitores que se queiram iniciar na técnica de RMN sugerimos, como uma introdução às bases do método, o livro “Ressonância Magnética Nuclear – Fundamentos, Métodos e Aplicações” de Victor M.S. Gil e Carlos F.G.C. Geraldês, editado pela Fundação Calouste Gulbenkian.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FCT-MCTES todo o apoio à instrumentação e for-

mação na área de aplicações da RMN em Portugal. S.R.P. é recipiente do projecto PTDC/BIA-PRO/098882/2008.

## REFERÊNCIAS

- [1] M.W. Maciejewski, A.S. Stern, G.F. King, J.C. Hoch. in (Webb, G.A., ed.) *Modern Magnetic Resonance*, Springer Netherlands 2006, 1305-1311.
- [2] E. Lescop, P. Schanda, R. Rasia, B. Brutscher, *Journal of the American Chemical Society* **129** (2007) 2756-2757.
- [3] R. Freeman, E. Kupce, *Journal Biomolecular NMR* **27** (2003) 101-113.
- [4] E. Kupce, R. Freeman, *Journal of Magnetic Resonance* **162** (2003) 158-165.
- [5] L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **99** (2002) 15858-15862.

- [6] P. Schanda, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **55** (2009) 238-265.
- [7] A. Ross, M. Salzmann, H. Senn, *Journal of Biomolecular NMR* **10** (1997) 389-396.
- [8] M. Mobli, A.S. Stern, J.C. Hoch, *Journal Magnetic Resonance* **182** (2006) 96-105.
- [9] E. Kupce, R. Freeman, *Journal of the American Chemical Society* **126** (2004) 6429-40.
- [10] S. Hiller, F. Fiorito, K. Wuthrich, G. Wider, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **102** (2005) 10876-10881.
- [11] S. Hiller, G. Wider, K. Wuthrich, *Journal of Biomolecular NMR* **42** (2008) 179-195.
- [12] S. Hiller, C. Wasmer, G. Wider, K. Wuthrich, *Journal of the American Chemical Society* **129** (2007) 10823-10828.
- [13] P. Schanda, B. Brutscher, *Journal of Magnetic Resonance* **178** (2006) 334-339.
- [14] M. Feliz, J. Garcia, E. Aragon, M. Pons, *Journal of the American Chemical Society* **128** (2006) 7146-7147.
- [15] E. Lescop, R. Rasia, B. Brutscher, *Journal of the American Chemical Society* **130** (2008) 5014-5015.
- [16] V. Tugarinov, L.E. Kay, I. Ibraghimov, V.Y. Orekhov, *Journal of the American Chemical Society* **127** (2005) 2767-2775.
- [17] B. Shapira, A. Karton, D. Aronzon, L. Frydman, *Journal of the American Chemical Society* **126** (2004) 1262-1265.
- [18] M. Gal, M. Mishkovsky, L. Frydman, *Journal of the American Chemical Society* **128** (2006) 951-956.
- [19] P. Schanda, V. Forge, B. Brutscher, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **104** (2007) 11257-11262.
- [20] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **94** (1997) 12366-12371.
- [21] M. Goldman, *Journal of Magnetic Resonance* **60** (1984) 437-452.
- [22] R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, K. Wuthrich, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **96** (1999) 4918-4923.
- [23] R. Otten, B. Chu, K.D. Krewulak, H.J. Vogel, F.A. Mulder, *Journal of the American Chemical Society* **132** (2010) 2952-2960.
- [24] M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. Mei Ono, P. Guntert, *Nature* **440** (2006) 52-57.
- [25] B.H. Oh, W.M. Westler, P. Darba, J.L. Markley, *Science* **240** (1988) 908-911.
- [26] W. Bermel, I. Bertini, I.C. Felli, R. Kummerle, R. Pierattelli, *Journal of Magnetic Resonance* **178** (2006) 56-64.
- [27] M. Matzapetakis, P. Turano, E.C. Theil, I. Bertini, *Journal of Biomolecular NMR* **38** (2007) 237-242.
- [28] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, R. Pierattelli, *Dalton Transactions* (2008) 3782-3790.
- [29] W. Bermel, I. Bertini, I.C. Felli, Y.M. Lee, C. Luchinat, R. Pierattelli, *Journal of the American Chemical Society* **128** (2006) 3918-9.
- [30] S.R. Pauleta, A.G. Duarte, M.S. Carepo, A.S. Pereira, P. Tavares, I. Moura, J.J.G. Moura, *Biomolecular NMR Assignments* **1** (2007) 81-83.
- [31] G. Otting, *Journal of Biomolecular NMR* **42** (2008) 1-9.
- [32] G. Pintacuda, A.Y. Park, M.A. Keniry, N.E. Dixon, G. Otting, *Journal of the American Chemical Society* **128** (2006) 3696-3702.
- [33] G. Pintacuda, M. John, X.C. Su, G. Otting, *Accounts of Chemical Research* **40** (2007) 206-212.
- [34] M. Allegrozzi, I. Bertini, M.B.L. Janik, Y.M. Lee, G.H. Lin, C. Luchinat, *Journal of the American Chemical Society* **122** (2000) 4154-4161.
- [35] J.R. Tolman, J.M. Flanagan, M.A. Kennedy, J.H. Prestegard, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **92** (1995) 9279-9283.
- [36] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, R. Pierattelli, *ChemBiochem* **6** (2005) 1536-1549.
- [37] X.C. Su, K. McAndrew, T. Huber, G. Otting, *Journal of the American Chemical Society* **130** (2008) 1681-1687.
- [38] W. Peti, J. Norcross, G. Eldridge, M. O'Neil-Johnson, *Journal of the American Chemical Society* **126** (2004) 5873-5878.
- [39] Q. Zhang, R. Horst, M. Geralt, X. Ma, W.X. Hong, M.G. Finn, R.C. Stevens, K. Wuthrich, *Journal of the American Chemical Society* **130** (2008) 7357-7363.
- [40] W. Peti, R. Page, K. Moy, M. O'Neil-Johnson, I.A. Wilson, R.C. Stevens, K. Wuthrich, *Journal of Structural Functional Genomics* **6** (2005) 259-267.
- [41] P.N. Palma, L. Krippahl, J.E. Wampler, J.J.G. Moura, *Proteins* **39** (2000) 372-384.
- [42] C. Dominguez, R. Boelens, A.M. Bonvin, *Journal of the American Chemical Society* **125** (2003) 1731-1737.
- [43] X.J. Morelli, P.N. Palma, F. Guerlesquin, A.C. Rigby, *Protein Science* **10** (2001) 2131-2137.
- [44] S.R. Pauleta, A. Cooper, M. Nutley, N. Errington, S. Harding, F. Guerlesquin, C.F. Goodhew, I. Moura, J.J.G. Moura, G.W. Pettigrew, *Biochemistry* **43** (2004) 14566-14576.
- [45] R.M. Almeida, S.R. Pauleta, I. Moura, J.J.G. Moura, *Journal of Inorganic Biochemistry* **103** (2009) 1245-1253.
- [46] H. Takahashi, T. Nakanishi, K. Kami, Y. Arata, I. Shimada, *Nature Structural Biology* **7** (2000) 220-223.
- [47] S. Deep, S.C. Im, E.R. Zuiderweg, L. Waskell, *Biochemistry* **44** (2005) 10654-10668.
- [48] G.A. Mueller, W.Y. Choy, D. Yang, J.D. Forman-Kay, R.A. Venters, L.E. Kay, *Journal of Molecular Biology* **300** (2000) 197-212.

## Vá a [www.spq.pt](http://www.spq.pt)

Torne-se Sócio da Sociedade Portuguesa de Química e beneficie de:

- Pertencer a uma comunidade científica dinâmica;
- Receber o boletim "QUÍMICA";
- Descontos nos Encontros promovidos pela SPQ;
- Descontos nas publicações da SPQ;
- Protocolos assinados entre a SPQ e outras entidades;
- Participar na promoção da Química;
- Apoiar uma Sociedade Científica.