



UNICAMP

# APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR(RMN) NOS ESTUDOS ESTRUTURAIS DE CHAPERONES SECRETÓRAS E EM INTERAÇÕES PROTEÍNA-LIGANTE

Izabella Venturini Cagliari, Alessandra Prando\*, Ljubica Tasic'

Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

\*.Aluna de Pós-Graduação

## Introdução

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) é um fitopatógeno que causa a doença denominada Cancro Cítrico na maioria dos cultivos comerciais, com sérios impactos econômicos na produção de cítricos em todo o mundo. O flagelo bacteriano é responsável pela mobilidade e suas precoces interações com a célula hospedeira e é um exemplo de funcionamento motor em nível molecular.

Proteínas flagelares sintetizadas no citoplasma são designadas para exportar o aparato com o auxílio do flagelo-chaperonas específicas, e emaranhadas através do canal utilizando um processo dependente de ATP. A chaperona necessária para a exposição do FlgK do citoplasma para o aparato secretório que constituem o complexo flagelar, é FlgN. Assim, nós apresentamos as investigações estruturais sobre a chaperona Xac FlgN, XAC1990(15046.1), proteína com 110 resíduos de aminoácidos com aproximadamente 12.12 kDa, pI de 6.75; cuja função foi confirmada recentemente.

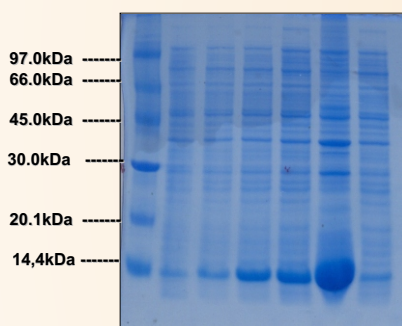
## Objetivos e Parte Experimental

Nosso trabalho consiste na purificação e caracterização estrutural da proteína XAC1990 (15046.1) através de RMN(Ressonância Magnética Nuclear). Após ser clonada em pET23a, XAC1990 foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) pLysS em meio LB, a 37°C, por 2 horas. A proteína XAC1990 foi purificada por cromatografia de troca iônica (DEAE) e no momento estamos realizando sua marcação isotópica (<sup>15</sup>N), em meio mínimo, otimizando a quantidade de rimfamincina e o tempo de indução. Neste trabalho no também pretendemos analisar as interações da XAC1990 com diversos ligantes, por exemplo, nucleotídeos ATP e ADP, pela aplicação da técnica de STD-RMN.

A Segunda parte de nosso projeto é investigar as interações da Proteína de Choque Térmico (HSP90) da laranja com diferentes drogas, incluindo Geldanamicina.

### 15% SDS-page

PM NI 1h 3h Lis Sob Pel



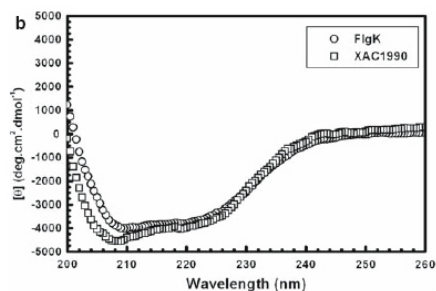
XAC1990

XAC1990

MNVNEFLQRLSDALAGERQALLEN  
DIDGLMRHTQDKLSALQALEAAMP  
AGEEERLRELAERANRANGALLARR  
RREVN<sup>W</sup>ALRHLGRTESAPSYDAKG  
QSSVLRGGRSLAVA

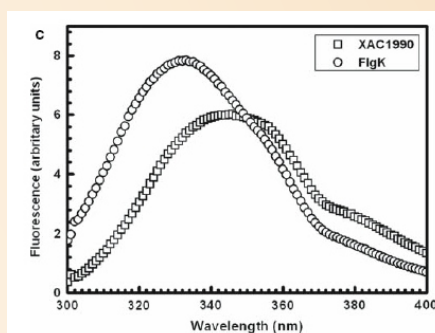
Tabela 1. Propriedades FlgN

XAC1990	
MW (Da)	12121
pI	6.75



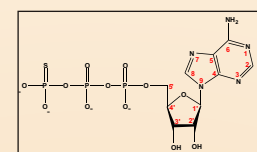
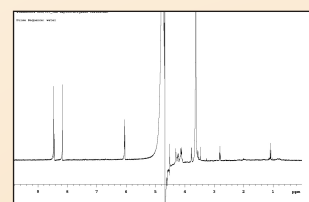
Espectro de Dicroísmo Circular: Espectro Far-UV CD de FlgKHis e XAC1990 (FlgN).

Khater, L.et. al, 2007.

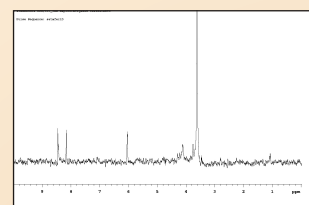
Espectro de Fluorescência do Triptofano para FlgN e FlgK  
Khater, L.et. al, 2007.

## Interações entre Proteínas e Ligantes

STD (Saturation Transference Difference) - NMR é um método baseado na transferência de magnetização de proteínas para ligantes pela saturação seletiva dos sinais de hidrogênio de uma proteína. Os hidrogênios do ligante que estão interagindo com a proteína serão saturados através da difusão de spin, o que leva a produção dos sinais no espectro de STD. Os resultados obtidos em experimentos de STD com Hsp100 (Proteína de Choque Térmico Humana) e ligantes ATP, ADP e ATPγS são mostrados abaixo. Esta proteína foi clonada e purificada pelo grupo do Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos.



ATPγS



ATPγS+Hsp100



Hsp100 – Estrutura 3D

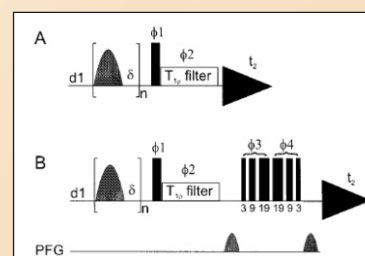
Hydrogen	STD		Control-STD		%
	δ (ppm)	Intensity (Hz)	δ (ppm)	Intensity (Hz)	
H-8	8.28	29.2904	8.29	907.363	99
H-2	7.99	27.7404	7.99	1376.31	100
H-1'	5.87	26.4242	5.86	673.891	98

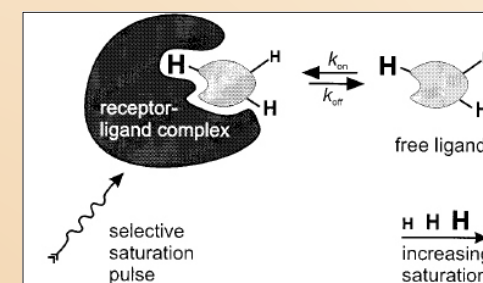
Hydrogen	STD		Control-STD		%
	δ (ppm)	Intensity (Hz)	δ (ppm)	Intensity (Hz)	
H-8	8.31	6.17261	8.31	3135.61	100
H-2	8.06	15.2951	8.06	2164.53	99
H-1'	5.94	10.3791	5.94	2119.37	99

Hydrogen	STD		Control-STD		%
	δ (ppm)	Intensity (Hz)	δ (ppm)	Intensity (Hz)	
H-8	8.38	16.3958	8.38	4351.71	100
H-2	8.14	36.9897	8.13	2970.90	100
H-1'	5.96	23.2653	5.95	2677.72	100



Sequência de Pulsos - STD-NMR



## Discussão e Conclusão

Nós esperamos que em breve melhores condições de trabalho da elucidação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear(RMN) dessa pequena proteína Xac sejam encontradas, pois FlgN é expressa e purificada em grandes quantidades, e sua concentração em tampão fosfato 100mM, pH 8, é de aproximadamente 2mM.

Em relação a segunda parte, a análise de STD-RMN confirmou a interação entre Hsp100 (Humana) e os três ligantes: ATP, ADP e ATPγS, com aproximadamente 100% de afinidade com os átomos de hidrogênio H-1' (ribose), H-8(adenosina) e H-2(adenosina).

## Referências

- Feldman, M. F et.al. FEMS Microbiology Letters 2003, 219,151.
- Khater, L.et. al. Archives Microbiology 2007, 188, 243.
- Mayer, M.; Meyer, B. Journal American Chemical Society 2001, 123, 6108.
- Bax, A.; Annual Review Biochemistry 1989, 58, 223.

## Acknowledgments

Laboratório de Química Biológica (IQ-UNICAMP)  
Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos e Thiago Carlos Cagliari