

Aplicação de RMN em análise estrutural da proteína FlgN e em estudos de interações entre proteínas e ligantes

Alessandra Prando* (PG), Ljubica Tasic* (PQ).

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp - *alessandra@iqm.unicamp.br; ljubica@iqm.unicamp.br

Ressonância Magnética Nuclear (RMN), proteínas, interações proteínas-ligantes

Introdução

As proteínas estão no centro de ação nos processos biológicos, catalisando praticamente todas as transformações moleculares que definem o metabolismo celular. Além disso, as proteínas são componentes estruturais essenciais das células e uma peça-chave para decifrar a sua função é o entendimento de sua estrutura. O estudo das interações entre proteínas ajuda a entender o funcionamento das células e a interação entre proteínas e ligantes auxilia no design de fármacos. Para estes estudos uma das duas técnicas mais empregadas é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Neste trabalho relatamos as investigações estruturais da chaperone flagellar FlgN da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, proteína de 110 resíduos de aminoácidos, pI de 6,75 e de aproximadamente 12,12 kDa. O nosso segundo alvo é a proteína Hsp90 (heat shock protein) da laranja, de aproximadamente 90 kDa, com os objetivos de definir suas interações com os três possíveis ligantes: ATP, ADP e ATP γ S. Acreditamos que estas interações são importantes em atuação de Hsp90 já que o seu papel é auxiliar enovelamento correto de várias proteínas inclusive da patogenicidade e virulência.

Resultados e Discussão

A FlgN, no vetor pET23a, foi expressa em cepa da *E.coli* BL21(DE3)pLysS em meio LB, a 37°C durante 2 h. Logo foi purificada por cromatografia de troca iônica (DEAE) e está submetida a marcação isotópica. As análises de dicroísmo circular (CD) e de fluorescência de emissão indicaram seu enovelamento correto.

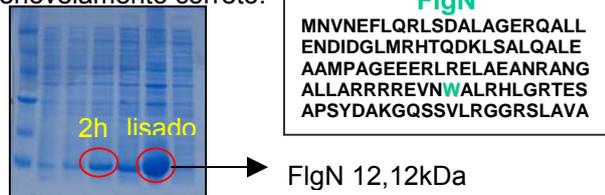


Figura 1: Gel SDS-page (15%) da expressão da FlgN da *Xac* com tamanho de 12,12 kDa (a esquerda). Esta proteína (sequência à direita) foi purificada e apresenta 60% de α -hélice (CD) e λ_{max} de 346 nm (fluorescência).

A proteína escolhida para os testes de interação proteína-ligante foi a Hsp100 em colaboração com o grupo do Prof. Carlos H. I. Ramos, e suas interações com os três ligantes foram comprovadas (Fig.2) aplicando a técnica de STD-RMN.

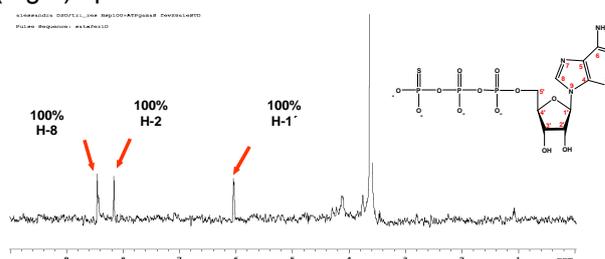


Figura 2: Espectro de STD-RMN da interação entre Hsp100 e ATP γ S. O mapa do epítipo esta em negrito e os hidrogênios estão identificados em vermelho. Os espectros de ^1H de RMN foram adquiridos no Inova 500 (Varian) e em experimentos de STD a proteína foi irradiada em 2 e 30 ppm.

Conclusões

As melhores condições de trabalho para a elucidação estrutural de pequenas proteínas (FlgN da *Xac*) por RMN estão sendo analisadas. A proteína alvo foi expressa e purificada em grandes quantidades, e a sua concentração em tampão fosfato (100 mM, pH 8), é de 2 mM. A sua marcação isotópica, com ^{15}N , também, foi executada e, em breve, esperamos elucidação da sua estrutura.

As análises de STD-RMN confirmaram a interação da proteína humana (Hsp100) com os três ligantes: ATP, ADP e ATP γ S com aproximadamente 100% de afinidade com os átomos de hidrogênio H-1' (ribose), H-8 (adenosina) e H-2 (adenosina).

Agradecimentos

FAPESP, IQ-UNICAMP, Laboratório de Química Biológica, Laboratório do Prof. Dr. Carlos H. I. (Thiago Cagliari).

1. Feldman, M. F. *et al.* *FEMS Microbiology Letters* **2003**, 219, 151.
2. Khater, L. *et al.* *Archives Microbiology* **2007**, 188, 243.
3. Mayer, M.; Meyer, B. *Journal of American Chemical Society* **2001**, 123, 6108.
4. Bax, A.; *Annual Review of Biochemistry* **1989**, 58, 223.
5. Borges, J.C.; Ramos, C.H.I. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, 452, 46.