

Estudos Estruturais e Funcionais de Transportadores do tipo ABC

Responsável: Dra. Andrea Balan

Introdução

Sistemas de transporte ABC são proteínas extremamente importantes em todos os organismos uma vez que desempenham diferentes funções relacionadas ao transporte de moléculas, incluindo o fenômeno de resistência à drogas em células cancerígenas. Em bactérias tais sistemas são constituídos por três proteínas: uma periplasmática ligadora que é responsável pela afinidade e especificidade do sistema, duas proteínas de membrana que formam o poro de passagem e duas proteínas associadas à membrana responsáveis hidrólise de ATP e liberação de energia para que o transporte ocorra. Os genomas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), bactérias patogênicas de grande interesse econômico, apresentam 4% dos genes dedicados à codificação de proteínas desta família, o que ressalta a importância da mesma nestes organismos. Apesar desta importância, muito pouco se conhece sobre tais transportadores e seu papel na fisiologia destas bactérias, bem como se existe relação dos mesmos com os mecanismos de infecção e patogênese. Nosso grupo tem como objetivo principal, identificar e caracterizar funcional e estruturalmente, quais transportadores do tipo ABC são ativados durante o crescimento bacteriano *in vitro* e *in vivo*, durante a infecção na planta.

Metodologia

Duas abordagens são usadas para a caracterização destas proteínas: a funcional e a estrutural. Todas as proteínas de interesse são produzidas em larga escala a partir de vetores de expressão regulada em células de *Escherichia coli*, e purificadas para a realização dos ensaios. Para a caracterização funcional são usados ensaios espectroscópicos como dicroísmo circular, fluorescência e ITC, na presença ou ausência de possíveis ligantes, análises de bioinformática, entre outros. Ainda são analisados os transportadores de interesse utilizando-se ensaios de proteômica, como análise em gel bi-dimensional de culturas crescidas em diferentes condições, experimentos de espectrometria de massas, RT-PCR, além de estudos de promotores ativados durante a infecção na planta através da expressão de um gene repórter como o que codifica a proteína GFP. Mutantes de *Xanthomonas* portadores de deleções em alguns genes das proteínas de interesse também são usados para ensaios de infecção na planta.

Por outro lado, os estudos estruturais visam a determinação das estruturas tri-dimensionais das proteínas para a partir destas, caracterizar as regiões de interação com substratos, regiões de interação com outras proteínas, reguladoras, e regiões que possam ser usadas como alvo para o desenvolvimento de inibidores. Para a determinação das estruturas tridimensionais usamos a cristalografia, e as análises de interações são realizadas por

modelagem molecular e experimentos de docagem, *in silico*. Para uma visão mais realista, os movimentos das proteínas durante os processos de interação com ligantes e outras proteínas são estudados por dinâmica molecular, também *in silico*.

Resultados esperados

Neste sentido, o aluno terá um excelente treinamento laboratorial, com a oportunidade de aprender diferentes técnicas de biologia molecular e proteômica, incluindo, clonagem, expressão, purificação de proteínas, realização de géis e análises proteicas, como também realizar ensaios de cristalização, difração de cristais, resolução de estruturas, usar ferramentas disponíveis na WEB para a caracterização e comparação de proteínas, e aprender a modelar proteínas e suas interações com ligantes. O aluno ainda terá a oportunidade de participar das reuniões de grupo, seminários, entrar em contato com a leitura de textos acadêmicos e artigos científicos para o desenvolvimento de relatórios, artigos, e maturidade científica.