

The background features a large, semi-transparent molecular structure. It consists of a purple ribbon representing the protein backbone, with several alpha-helices and beta-strands. This ribbon is superimposed on a light grey surface of white spheres, which likely represent a lipid bilayer or a similar membrane structure. The overall aesthetic is clean and scientific.

07/Ago | 2019

**Workshop de caracterização  
de macromoléculas**

com foco em afinidade de interações

LIVRO DE RESUMOS



## Índice

Apresentação	2
Programação	3
Resumos	4

## Apresentação

A termoforese em microescala é o movimento direcionado de partículas em um gradiente microscópico de temperatura, gerando informação sobre mudanças tanto na camada de hidratação de biomoléculas, quanto em suas estruturas e conformações. Estes efeitos são resultantes da modificação do movimento de moléculas pelo gradiente de temperatura, sendo utilizadas para a determinação de valores de afinidade de ligações entre estas biomoléculas. Esta metodologia tem sido essencial para a determinação de afinidades entre biomoléculas, sendo aplicada em diferentes contextos, revelando informações importantes sobre amostras proteicas. Neste contexto, o **Workshop de caracterização de macromoléculas com foco em afinidade de interações** focou no uso e aplicações desta tecnologia em um encontro de usuários no Brasil. Com isso, geramos uma instância na qual os usuários apresentaram suas linhas de pesquisa e criamos espaços de discussão para abordar experimentos, protocolos, conselhos e troca de experiências em geral em conjunto com a equipe da NanoTemper – Brasil e do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do LNBio.

Apesar de curto, o evento foi intenso e contou com a participação de cerca de 50 pesquisadores que utilizam a técnica. Os resumos dos trabalhos apresentados estão descritos a seguir.”

## O Workshop

O Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em parceria com NanoTemper Technologies, promoveu o **Workshop de caracterização de macromoléculas com foco em afinidade de interações**. O evento foi realizado em **07 de agosto de 2019**, no campus do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas-SP.

# Programação

## Quarta feira, dia 07 de agosto de 2019

9:00-9:40	Registro de participantes
9:40-10:10	Palavras de boas-vindas LNBio + NanoTemper Technologies, apresentação de agenda
10:10-10:40	Apresentação de Andreia Navarro – Instituto de Biociências – USP
10:40 - 11:10	Diego Antonio Leonardo Cabrejos – Instituto de Física de São Carlos (USP) “Uso de termoforese para desvendar automontagem em filamentos de septina”
11:10 -11:25	Apresentação Fernanda A. H. Batista –LNBio/CNPEM – “Interação proteína ligante: PPAR $\gamma$ -rosiglitazona”
11:25–12:00	Discussão/perguntas
12:00–12:25	Visita guiada no LNBio
12:25-13:00	Instalação de posters (Science Café)
13:00-14:00	Almoço
14:00-14:15	Apresentação Daniel Trindade
14:15-14:30	Apresentação Amanda Lais de Souza Coto
14:30-14:45	Apresentação Higor Vinicius Dias Rosa “Termo-estabilidade da interface G de septinas usando Tycho”
14:45-15:00	Apresentação Maxuel de Oliveira Andrade “Functional analysis of CsMAF1, an RNA polymerase III repressor involved in cell growth control and pathogen response in plants”
15:00-15:15	Discussão/perguntas
15:15-17:15	Sessão de posters (Science Café)
17:15 – 17:30	Palavras finais

## **Medidas de afinidade entre os receptores nucleares GR e COUP-TFII**

Izabella Luisa Tambones; Ana Carolina Migliorini Figueira  
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) - Laboratório  
Nacional de Biociências (LNBio)  
Financiamento: FAPESP

Estudos preliminares em células apontam a participação cooperativa dos receptores nucleares GR e COUP-TFII sobre a regulação do gene SMyHC3. Embora a interação entre esses receptores tenha sido relatada por meio de ensaios pull-down, pouco se sabe acerca desse heterodímero incomum e seu contexto de atuação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar e quantificar a afinidade existente entre os receptores GR e COUP-TFII. Para isso, foram conduzidos ensaios de termoforese em microescala (Monolit, Nanotemper®). Assim, utilizando o receptor COUP-TFII (40nM) marcado com marcador fluorescente de His-Tag, foi titulado GR em concentrações que partiram de 0,6 uM até 5,45 uM. Os resultados obtidos, a partir da curva de ligação observada, indicaram uma alta afinidade entre essas proteínas, com um valor de kd igual a  $60 \pm 4$  nM. Esses dados corroboram àqueles previamente relatados na literatura acerca da interação entre GR e COUP-TFII, além de revelar quantitativamente uma alta afinidade entre esses receptores. Como perspectiva a partir desses resultados, o complexo proteico GR\COUP-TFII deverá ser montado e uma ampla caracterização biofísica e estrutural será conduzida a fim de esclarecer a forma de interação entre esses receptores, até então desconhecida.

## Targeting the TBX2 transcription factor with DNA binding agents

Bianca Del B. Sahn<sup>1</sup>, Paula Rezende-Teixeira<sup>1</sup>, Evelyne A. Santos<sup>1</sup>, Paola C. Branco<sup>1</sup>, Anelize Bauermeister<sup>1,2</sup>, Serah Kimani<sup>3</sup>, Eduarda Antunes Moreira<sup>2</sup>, Renata Bisi-Alves<sup>1</sup>, Jenna Bleloch<sup>3</sup>, Muhlali Mlaza<sup>3</sup>, Paula C. Jimenez<sup>4</sup>, Norberto P. Lopes<sup>2</sup>, Glauca M. Machado-Santelli<sup>1</sup>, Sharon Prince<sup>1,3</sup>, Leticia V. Costa-Lotufo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo – SP. Brazil;

<sup>2</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP. Brazil.

<sup>3</sup>Division of Cell Biology, Department of Human Biology, University of Cape Town, Cape Town. South Africa;

<sup>4</sup>Federal University of São Paulo, Santos – SP. Brazil

Financiamento: CNPq, CAPES, FAPESP

The TBX2 transcription factor has been shown to play important roles in carcinogenesis and it was identified as a potential target for new anticancer therapies. Recently there has therefore been a substantial interest to identify molecules with TBX2-modulatory activity, but no such substance has been found so far. Here, we resort to a targeted approach based on a specialized reverse-affinity procedure, known as bioaffinity or functional chromatography, to verify the interaction of known DNA-binding natural compounds to TBX2. This assessment is followed by microscale thermophoresis analysis to determine affinity (KD), and by in vitro assays to measure TBX2 expression in cancer cells lines and whether cytotoxicity can be linked to TBX2 protein expression levels. Briefly, the TBX2-DNA-binding domain recombinant protein, obtained using high-throughput tools of structural genomics, was N-terminally linked to a resin, which, in turn, was incubated with either chromomycins A5 (CA5) and A6 (CA6), cosmomycin D and doxorubicin. After elution, bound compounds were analysed by LC-MS employing a multiple reaction monitoring (MRM) approach for relative quantification. CA5 and doxorubicin were significantly recovered from their respective protein-loaded resins. Microscale thermophoresis analysis showed a KD of 31.3  $\mu\text{M}$  for CA5, 24.4  $\mu\text{M}$  for CA6 and 23.4  $\mu\text{M}$  for doxorubicin, while reaching values above 200  $\mu\text{M}$  for cosmomycin D.

## **Septin heterocomplex structure reveals the molecular determinants at G-interface**

Rosa, H.V.D.; Leonardo, D.A; Garratt, R.C.; Araujo, A.P.U.  
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Septins are cytoskeletal proteins, which bind GTP interacting with each other through alternating interfaces, forming filaments necessary to accomplish their functions. Currently, the only heterocomplex structurally characterized, formed by human septins 2-6-7, displays very low resolution (4 Å) and cannot provides details about filament assembling. This study sought to obtain insights into the determinants of the interaction between the GTP Binding domains of the septin 2-6 complex (SEPT6G-SEPT2G). The heterocomplex was coexpressed by *E. coli* and it was co-purified in IMAC and SEC. The crystals were grown using the vapor diffusion technique. The diffraction patterns and the integrated data were obtained at the Diamond (UK). Also, thermal stability of the heterodimer was analyzed and compared to SEPT6G, using DSC. The SEPT6G-SEPT2G complex consisted of a heterodimer in the solution, also observed in the asymmetric unit obtained at 2.6 Å. Aligning the structure with the previously characterized, it was possible to visualize new interactions on the G-interface. We identified a motif connecting the lack of catalytic activity of the septin 6 to specificity and sustainment of the interface. The absence of SEPT2G as a partner of SEPT6G forming the heterodimer leads to a significant loss in thermal stability (20 °C) of the latter. These findings shed light on the molecular determinants of G-interface between septins and its physiological relevance as a core of filament assembly.

## **Aqueous media containing glycolic acid in substitution of acetic acid to prepare chitosan dispersions**

Lucas de Souza Soares, Gustavo Leite Milião, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Jane Sélia dos Reis Coimbra, Eduardo Basílio de Oliveira  
Universidade Federal de Viçosa  
Financiamento: CAPES, CNPq, Fapemig

Chitosan is a biodegradable, biocompatible, and non-toxic material obtained from crustaceans processed by seafood industries, which is used in cosmetic, pharmaceutical and medical industries. Chitosan require acid aqueous media for dispersion, and acetic acid and/or acetates have been used for this purpose. However, the nasty flavor of acetic acid cannot be adequate for technological applications. Then, chitosan dispersions containing glycolic acid were prepared, with the view to study the effects of biopolymer concentration and the type of organic acid on electrical conductivity, pH, density and rheological parameters of dispersions. Moreover,  $\zeta$  potential values of chitosan chains dispersed in acid aqueous media also were estimated. Chitosan was well-dispersed in both organic acid solutions. pH and electrical conductivity were not similar in dispersions containing acetic or glycolic acid for each chitosan concentration.  $\zeta$  potential of chitosan chains were similar for all chitosan concentrations. pH, density and consistency index were increased according biopolymer concentration was raised, and their values were not affected by the type of organic acids used (at a same chitosan concentration). Then, glycolic acid are suitable to replace acetic acid when preparing aqueous dispersions of chitosan for technological purposes.



## **Estabilização do biofármaco antileucêmico L-asparaginase utilizando líquidos iônicos derivados de colinas**

Agnes Magri, Thainá Pecorari, Jorge F. B. Pereira  
UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Financiamento: FAPESP, CNPq

Recently, Ionic Liquids (ILs) have been received attention due to their unique properties as a protein stabilizer and alternative solvents, however the mechanisms are still poorly understood. Thus, the aim of this work was to evaluate the mechanisms involved in the interaction of cholinium-based ionic liquids in aqueous solution on the structural stability and activity of a important biopharmaceutical used in treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, L-asparaginase (ASNase). All [Ch]-based compounds were capable to maintain the ASNase activity along to 6 hours, under certain concentration, but the enhance of anion chain length has a negative effect on the activity of ASNase. The IL-protein interactions were simulated, and the docking showed different anchor sites of each of the anions, which may help to understand the mechanisms of action for the reduction of activity. [Ch]Cl was the compound that maintaining the ASNase activity for 24 hours besides to enhance the enzymatic activity until 2.2-fold. The intrinsic fluorescence assays showed that the enhance of [Ch]Cl concentrations leads to enhance of fluorescence of tryptophan, however, any significative alteration on structure of ASNase were observed. The promising modulation of ASNase stability results validated the biocompatibility of cholinium-derived ILs and demonstrate the effectiveness of these compounds as stabilizing agents.

## **Estudos estruturais e funcionais do regulador de transcrição PhoB de *Xanthomonas citri***

Brenda Oliveira e Andrea Balan  
Instituto de Ciências Biomédicas - Departamento de Microbiologia - USP  
Financiamento: CAPES, CNPq e FAPESP

*Xanthomonas citri* é um fitopatógeno causador do cancro cítrico, doença que afeta especialmente laranjas, levando à perda econômica significativa para produtores, em especial exportadores de citros como o Brasil. Estudos que visam a caracterização da fisiologia do micro-organismo, identificando elementos importantes no processo de infecção e patogênese são relevantes. Em *X. citri* sistemas sensoriais para o íon fosfato são essenciais para manutenção da viabilidade celular e patogênese. O sistema dois componentes PhoR/PhoB consiste de uma proteína quinase sensora que se autofosforila na carência do íon e fosforila o seu cognato, a proteína PhoB, regulador transcricional que ativa a transcrição de genes intimamente relacionados à captação e assimilação de fosfato. No presente estudo, a proteína PhoB de *X. citri* foi expressa em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) STAR e a proteína purificada por cromatografia de afinidade seguida de exclusão molecular. Estudos biofísicos indicam mudanças estruturais decorrentes da interação com DNA bacteriano. A ativação de promotores controladores de operons relacionados aos sistemas de captação/assimilação de fosfato foi demonstrada. Estamos interessados em caracterizar a interação da PhoB com fragmentos de DNA para determinar a afinidade e especificidade da proteína, bem como resolver sua estrutura tridimensional. A metodologia abordada no curso é adequada para os nossos estudos e será de grande importância para o desenvolvimento do trabalho.

## **Desenvolvimento de nanopartículas de ouro para ser usadas como tratamento de câncer**

Wilmmer Alexander Arcos Rosero  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
Financiamento: IPEN-CNPQ

O desenvolvimento de novos materiais surge como uma alternativa ao tratamento de câncer, da combinação da nanotecnologia e a braquiterapia nasceu uma nova área de pesquisa a nanobraquiterapia a qual por méio das propriedades dos materiais nanometricos pode atingir melhores resultados na luta contra o câncer. Sendo uma nova área os questionamentos são muitos, mas aproveitando o grande avanço da nanotecnologia a nanobraquiterapia projetasse como uma área promissora e inovadora. Aproveitando a experiencia do pessoal do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR), é projetado obter nanopartículas de ouro radioativos e funcionalizar estas con distintos recobrimentos orgânicos biocompatíveis, isso com o fim de usar estar como tratamento de câncer, na nova área conhecida como nano braquiterapia.

