



Expressão, purificação e caracterização da relação estrutura/função da proteína Tah1 de Sorgo, uma planta de importância biotecnológica.

Gustavo H. Martins*, Natália G. Quel, Carlos H. I. Ramos.

Resumo

Inicialmente observado em leveduras e conservado em humanos, o complexo proteico R2TP é constituído pelas helicases Rvb1 e Rvb2 que se ligam à proteína Pih1, sendo que esta, por sua vez, se liga à proteína Tah1. Suas funções estão relacionadas à maturação da RNA polimerase 2, remodelamento da cromatina, sinalização de PIKKs, entre outras. Esses papéis são desempenhados através da associação deste complexo com a chaperona molecular Hsp90, em que o domínio TPR presente na proteína Tah1 se liga ao motivo MEEVD contido na região C-terminal da chaperona (1). Para melhor compreender as funções do R2TP, seus mecanismos de interação com outras proteínas e o envolvimento da chaperona molecular nesse sistema, o presente trabalho tem por objetivo a caracterização de parâmetros estruturais e funcionais da proteína Tah1 de *Sorghum bicolor*, com a ênfase que este complexo é estudado somente em animais e que o organismo em questão possui um elevado interesse alimentício e bioenergético.

Introdução

Proteínas são macromoléculas com diversas funções fisiológicas. Para tanto, é necessário que elas se encontrem enoveladas numa estrutura tridimensional que propicie sua estabilidade e solubilidade. Porém, o processo que leva uma cadeia polipeptídica ao seu estado nativo pode ser dificultoso devido às altas concentrações de diferentes substâncias no meio intracelular. Diante disso, a célula recorre a um sistema de qualidade proteico em que chaperonas moleculares auxiliam no correto enovelamento de outras proteínas, o que demonstra a sua importância na proteostase celular. Para ampliar e diversificar suas funções, as chaperonas podem se associar à proteínas auxiliares, as quais passam a ser denominadas de co-chaperonas. Este é o caso da associação da Hsp90 com o complexo proteico R2TP por meio da ligação envolvendo a proteína Tah1. Diante desses fatos, temos como proposta a caracterização conformacional e funcional da proteína Tah1 através da avaliação de sua estrutura secundária e também por meio da determinação de sua massa molecular/estado oligomérico em solução. Além disso, procuramos também detectar a interação proteína-proteína entre Tah1 e Pih1.

Resultados

Após processos de expressão e purificação padronizados no trabalho anterior, Tah1 (com e sem cauda de poli-histidina) teve sua estrutura secundária avaliada por espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD). Os espectros obtidos possuem perfis característicos de proteínas compostas majoritariamente por hélice- α . Entretanto, observou-se um ganho de sinal de CD em cerca de 30% para a proteína contendo cauda de poli-histidina. Tah1 teve sua massa molecular e estado oligomérico em solução caracterizados por cromatografia de exclusão molecular acoplada a detectores de espalhamento de luz e índice de refração (SEC-MALS). O pico registrado no cromatograma com massa correspondente calculada em 49,3 kDA indica que, nas condições testadas, a proteína se encontra como um monômero. A tentativa de detecção de interação proteína-proteína com Tah1 e Pih1 foi realizada em cromatografia de gel-filtração analítica com análise posterior dos picos de eluição realizada em eletroforese em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE), onde não se observou deslocamentos.

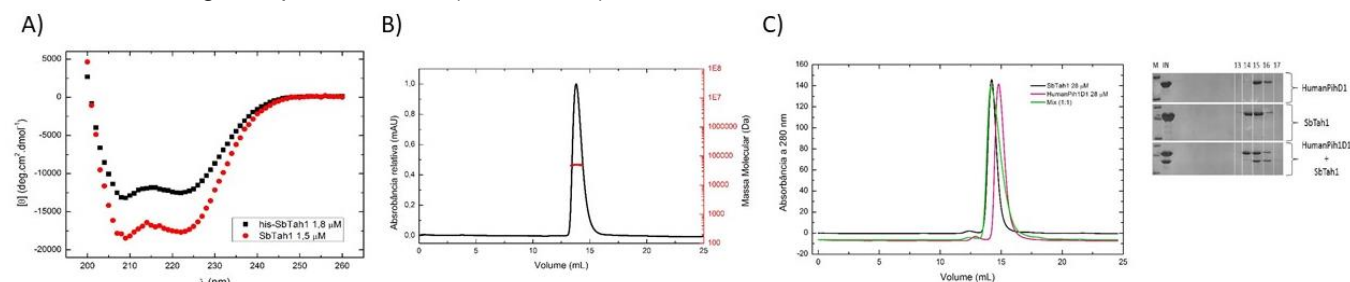


Figura 1. A) Espectros de CD para Tah1 com cauda de poli-histidina (preto) e sem cauda (vermelho). B) Caracterização da massa molecular/estado oligomérico da proteína Tah1 por SEC-MALS. C) Cromatogramas obtidos da gel-filtração analítica e análise dos volumes de eluição por SDS-PAGE para detecção de interação proteína-proteína.

Conclusões

Tah1 foi produzida estável, enovelada e com estrutura secundária composta majoritariamente em hélice- α . Nas condições testadas, Tah1 se apresenta como um monômero em solução.

Agradecimentos

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelos financiamentos; à PRP-UNICAMP pelo oferecimento do PIBIC; ao Instituto de Química por toda infraestrutura e apoio técnico e a todos os membros do Laboratório de Bioquímica do Chaperoma e Proteostase.

Referência

1. Kakiyama, Y.; Houry, W.A. The R2TP complex: discovery and functions. *Biochem. Biophys. Acta* 1823: p. 101-107, 2012.