

Introdução

As proteínas são responsáveis pela construção e manutenção das células. A realização da função biológica de uma proteína está diretamente ligada à estrutura tridimensional obtida através do processo de enovelamento protéico.

Neste contexto, proteínas específicas denominadas de chaperonas moleculares apresentam um papel essencial atuando tanto no auxílio ao enovelamento correto de algumas proteínas, como no reenovelamento sob condições de estresse e dissociação de agregados protéicos.

Essas chaperonas moleculares foram descritas inicialmente como proteínas de choque-térmico ou "heat-shock proteins" (Hsp), devido à indução de sua síntese em células submetidas a condições de estresse ou durante o desenvolvimento de doenças.

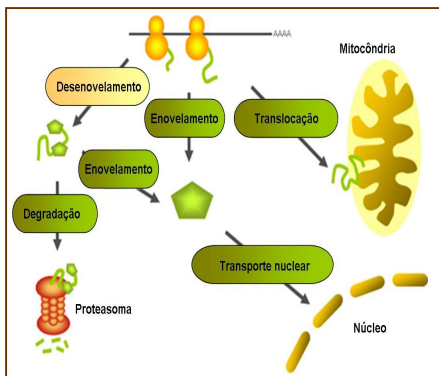


Fig. 1: Papel das chaperonas moleculares.

A Hsp90 é uma proteína modular com três domínios bem definidos: o N-terminal que contém um domínio de ligação de ATP; a porção mediana que completa o sítio ATPase e liga proteínas clientes, e o C-terminal que é o domínio de dimerização.

A expressão da Hsp90β é feita utilizando o sistema pET.

Após a expressão, segue-se a etapa de purificação das proteínas recombinantes realizando-se uma Cromatografia de afinidade.

Metodologia

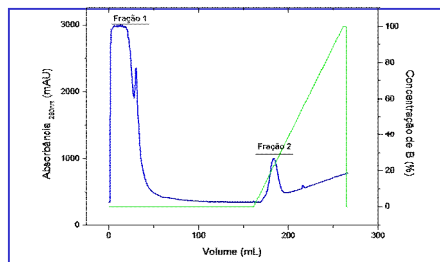


Fig. 3: Cromatograma de afinidade para o N-terminal da Hsp90β humana. Na figura a linha em azul representa a absorção medida durante a purificação, e em verde a porcentagem do tampão utilizado para a eluição da proteína recombinante.

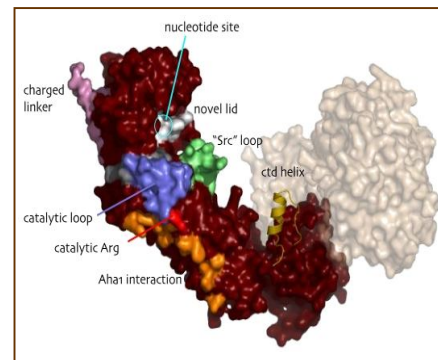


Fig. 2: Esquema ilustrativo da Chaperona Hsp 90 β humana demonstrando os três domínios

A cromatografia de afinidade mostra uma interação específica entre um grupamento (ligante) de um suporte cromatográfico (matriz ou resina) e uma ou um pequeno número de proteínas (alvo) contidas em uma mistura.

Uma estratégia comum para a purificação de proteínas recombinantes é a Cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography)

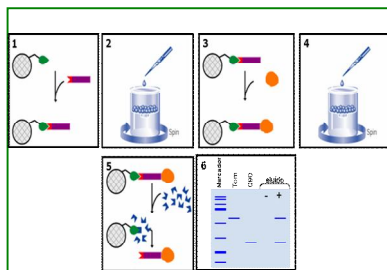


Fig. 4: Ensaio de interação por pull-down ou co-purificação. Em verde está representado o ion cobalto ligado à resina representada por esferas cinza, a proteína isca está colorida em roxo com marcação em laranja representando a cauda de poli-histidina. A proteína presa é representada em laranja nas etapas 3 e 5, e os competidores, imidazol, estão representados em azul, na etapa 5.

Resultados e Discussão

O ensaio de pull-down ou co-purificação foi aplicado no intuito de detectar a interação entre duas proteínas, utilizando como marcação e presença da cauda de poli-histidina nas proteínas recombinantes.

Para realização do experimento é preciso que seja determinada uma proteína isca, que permanecerá ligada a uma resina, e uma proteína presa, que sem essa marcação deverá ser incubada com a outra proteína afim de testar sua interação.

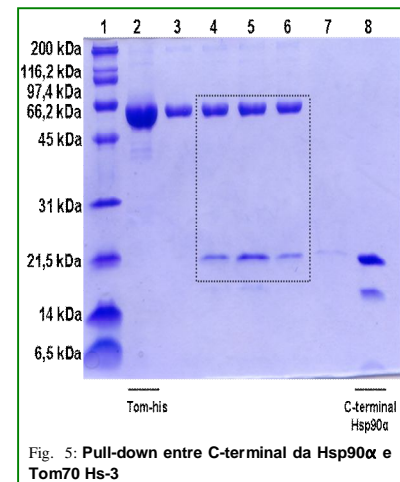


Fig. 5: Pull-down entre C-terminal da Hsp90α e Tom70 Hs-3