

Danieli C. Gonçalves, UNICAMP (Bolsista – Iniciação Científica CNPq), Lisandra M. Gava, UNICAMP e Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos (Orientador), IQ – UNICAMP.

Agências financiadoras: CNPq e FAPESP

Contato: cramos@iqm.unicamp.br

Palavras-chave: chaperonas, enovelamento proteico, estrutura-função

INTRODUÇÃO

A atividade biológica das proteínas está diretamente relacionada à sua estrutura tridimensional (nativa) adquirida através do processo de enovelamento proteico [Borges & Ramos, 2005]. Porém, a alta concentração de macromoléculas no interior celular favorece interações improdutivas que podem levar à formação de agregados com potencial citotóxico. Estes agregados são insolúveis e podem depositar-se nos tecidos causando 'doenças conformacionais' como Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jacob, entre outras [Beissinger & Buchner, 1998]. Para controlar estas ações, as células possuem mecanismos que auxiliam o enovelamento, re-enovelamento e desagregação *in vivo*, dos quais participam as chaperonas moleculares. As chaperonas foram inicialmente descritas como proteínas de choque térmico (ou *Heat Shock Proteins – HSP*) em função de sua síntese ser promovida sob condições de estresse, como o aumento da temperatura. Porém, estudos posteriores evidenciaram que as chaperonas também possuem síntese constitutiva. São classificadas em famílias de acordo com a sua massa molecular, sendo as cinco principais: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e smHsp [Borges & Ramos, 2005].

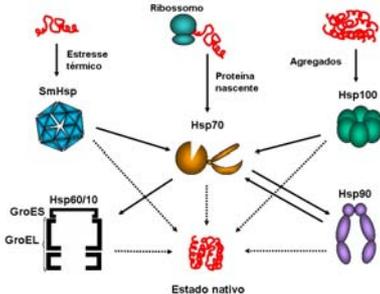
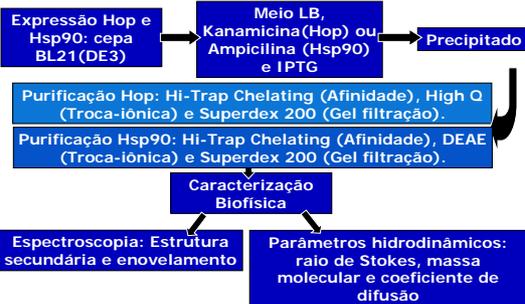


Fig. 1: Chaperonas Moleculares [modificado de Borges & Ramos, 2005]

A Hsp90 é uma chaperona molecular presente em abundância nas células, mesmo na ausência de estresse, e é de grande importância para a viabilidade dos organismos. Proteínas regulatórias, tais como receptores de hormônios esteróides, polimerases e quinases requerem a Hsp90 para atingir e/ou manter o estado nativo *in vivo*, através de uma ação conjunta com outras chaperonas e co-chaperonas. A co-chaperona Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*) atua como um mediador, apresentando à Hsp90, os substratos previamente reconhecidos pela Hsp70 (interage com C-terminal da Hsp90 e da Hsp70).

MATERIAL E MÉTODOS

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA



RESULTADOS E DISCUSSÃO

PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

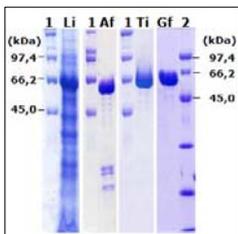


Fig. 2: SDS-PAGE 12% - Hop: Purificação com três passos cromatográficos. 1- High Molecular Mass Leader. 2- Low Molecular Mass Leader. Li- Sobrenadante da lise . Af- Após cromatografia por afinidade. Ti- Após troca-iônica. Gf- Após gel filtração.

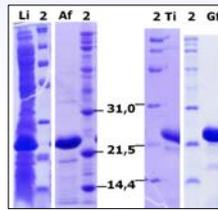


Fig. 3: SDS-PAGE 12% - Hsp90 (C-terminal): Purificação com três passos cromatográficos. 2- Low Molecular Mass Leader. Li- Sobrenadante da lise . Af- Após cromatografia por afinidade. Ti- Após troca-iônica. Gf- Após gel filtração.

ESTRUTURA SECUNDÁRIA E ESTABILIDADE TÉRMICA MONITORADAS POR DICROÍSMO CIRCULAR

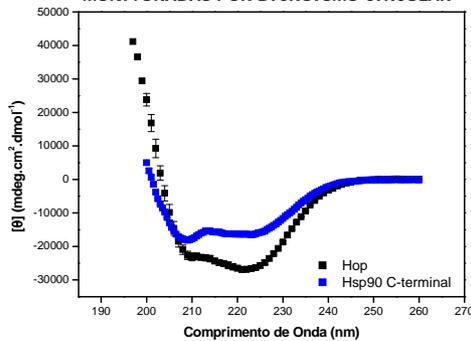


Fig. 4: Espectros Hsp90 C-terminal (azul) e Hop (preto). O perfil do espectro indica que são proteínas ricas em α-hélice. A Hsp90 C-terminal apresenta predição de 54% de α-hélice e a Hop 84% (erro ~ 8%).

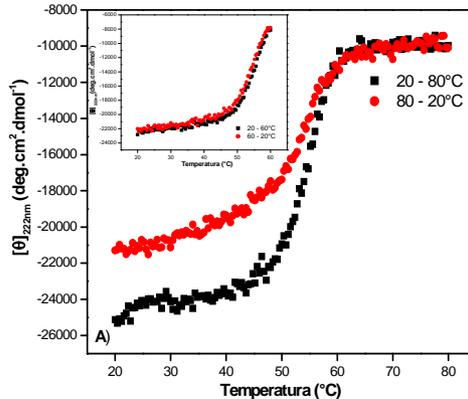


Fig. 5: Desenovelamento térmico - Hop. A) Transição sigmoide com T_m de $54 \pm 1^\circ\text{C}$. Reversibilidade de $\sim 80\%$. B) Reversibilidade próxima de 100% quando aquecida até 60°C . A Hsp90 não desenovela e permanece estável até 60°C , temperatura à partir da qual forma agregados (dados não mostrados).

FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO

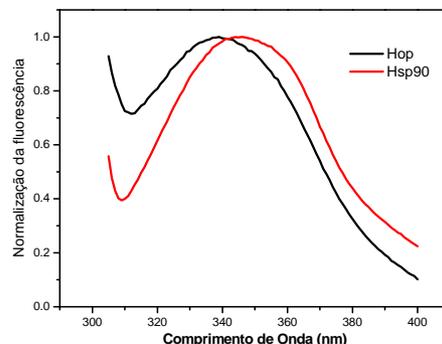


Fig. 6: Espectro de emissão de fluorescência. Hop: O triptofano está em ambiente protegido do solvente, no interior da estrutura proteica, o que caracteriza um enovelamento compacto nesta porção. Hsp90: O triptofano encontra-se em local parcialmente exposto ao solvente.

ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA E PARÂMETROS HIDRODINÂMICOS

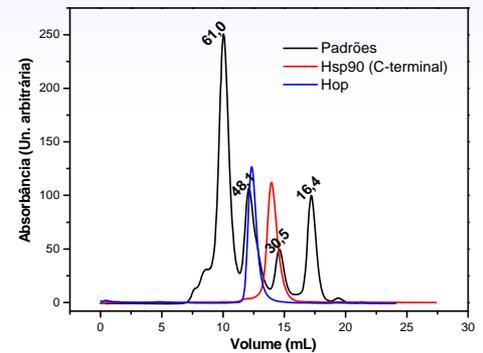


Fig. 7: Gel filtração analítica. A Hop foi eluída como uma espécie única, com raio de Stokes de $3,2 \text{ nm} \pm 0,2$. O mesmo ocorreu com a Hsp90 (C-terminal), com raio de $3,4 \pm 0,2$. As proteínas Ribonuclease A, Ovalbumina, Aldolase e Ferritina foram utilizadas como padrões.

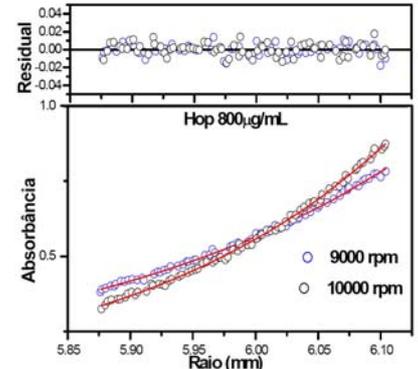


Fig. 8: Ajuste dos dados de ultracentrifugação analítica. Presença de uma espécie predominante com 66400 Da (erro = 4×10^{-5}), massa molecular da forma monomérica.

Tab. 1: Dados teóricos versus dados obtidos. Diferenças entre os raios de Stokes e coeficientes de difusão podem estar relacionados à forma da molécula.

Massa Molecular (Da)		Raio de Stokes Rs (nm)		Coeficiente de Difusão D ($\times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$)		Fator de Perrin (R/R ₀)	
Teórica (monômero)	Medido	Teórico para forma esférica (monômero)	Medido	Teórico para forma esférica (monômero)	Medido		
Hop	66460	$66400 \pm 4 \times 10^5$	$2,7$	$3,2 \pm 0,2$	$7,9$	$5,4 \pm 0,2$	$1,2$
Hsp90	21850	-----	$1,9$	$3,4 \pm 0,2$	$11,6$	$6,0 \pm 0,3$	-----

CONCLUSÕES

- Hop e Hsp90 (C-terminal) foram eficientemente purificadas (como mostrado pelo SDS-PAGE), por meio de três passos cromatográficos e com alto grau de pureza. De acordo com os espectros de dicroísmo circular e fluorescência a proteína se encontra enovelada.
- São proteínas ricas em alfa-hélice. A Hsp90 C-terminal não desenovela com o aumento da temperatura. Há agregação, que pode ser em função da exposição de regiões hidrofóbicas com o aquecimento. A Hop é parcialmente reversível se aquecida até 80°C .
- Hop está na forma monomérica e possui formato elipsóide.

REFERÊNCIAS

- BORGES, J. C. & RAMOS, C.H. I. (2005) Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept. Lett.* 12:257-261.
- BEISSINGER, M., BUCHNER, J. (1998) How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379:245-59.