

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: Hsp90, novobiocina, interação

INTRODUÇÃO

A atividade biológica das proteínas está diretamente relacionada à sua estrutura tridimensional adquirida através do processo de enovelamento protéico, no qual estão envolvidas proteínas denominadas genericamente de chaperonas moleculares [Borges & Ramos, 2005]. Estas exercem papel fundamental no controle de qualidade protéico celular, sendo expressas tanto constitutivamente como em condições de estresse. Estão envolvidas com o auxílio ao enovelamento e degradação de proteínas e, portanto, com a manutenção e modulação de várias vias celulares, vias estas dependentes da função protéica (correto enovelamento) e da disponibilidade (estabilidade e degradação) das proteínas envolvidas.

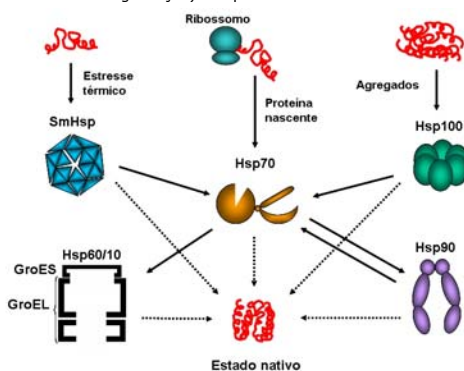


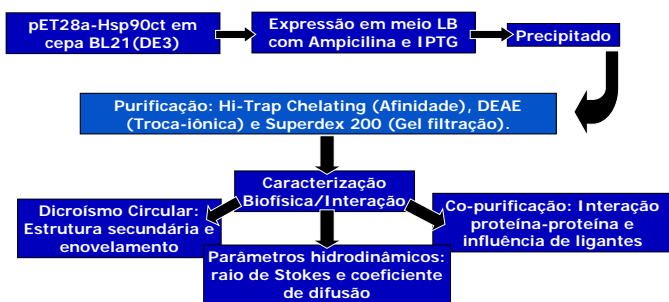
Fig. 1: Chaperonas Moleculares [modificado de Borges & Ramos, 2005]

A Hsp90 é uma chaperona molecular presente em abundância nas células, mesmo na ausência de estresse. Está envolvida na sinalização, proliferação e sobrevivência celular. Em células tumorais, muitas proteínas são dependentes da maquinaria da Hsp90 para a sua estabilidade, reenvolvimento e maturação. Assim a Hsp90 tem sido apontada como um promissor alvo para o tratamento do câncer, uma vez que a inibição da Hsp90 parece atingir somente proteínas clientes envolvidas com a manutenção do fenótipo tumoral.

Ativa na forma dimérica, o monômero da Hsp90 possui três domínios: o N-terminal, que contém um sítio de ligação de ATP, que também é capaz de ligar os inibidores geldanamicina e radicicol; o domínio central, que possui alta afinidade por co-chaperonas e proteínas clientes; e o C-terminal, que é o sítio de dimerização, também liga proteínas clientes e aloca um segundo sítio de ligação de nucleotídeo, que é capaz de ligar moléculas inibidoras como novobiocina e cisplatina.

MATERIAL E MÉTODOS

EXPRESSIONE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E FUNCIONAL



RESULTADOS E DISCUSSÃO

PURIFICAÇÃO

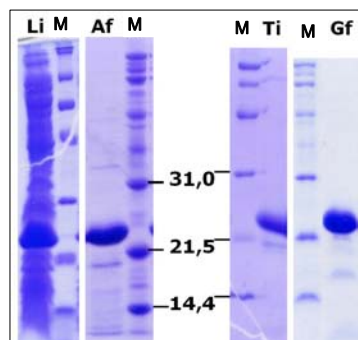


Fig. 2: SDS-PAGE 12% - Hsp90 C-terminal: Purificação com três passos cromatográficos. M- Low Molecular Mass Leader. Li- Sobrenadante da lise. Af- Após cromatografia por afinidade. Ti- Após troca-iônica. Gf- Após gel filtração.

ESTRUTURA SECUNDÁRIA - DICROÍSMO CIRCULAR

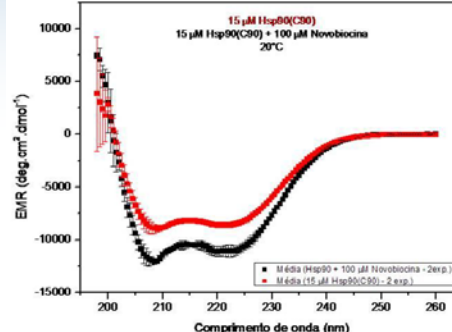


Figura 3: Espectros da Hsp90 C-terminal em presença de novobiocina. O perfil do espectro (vermelho) indica que trata-se de uma proteína com estrutura secundária predominante do tipo α -hélice. A presença de novobiocina (preto) causa modificações no sinal, indicando uma possível interação entre a Hsp90 e novobiocina.

PARÂMETROS HIDRODINÂMICOS

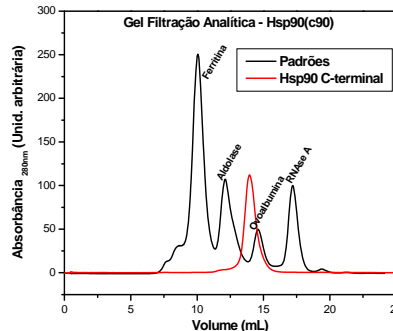


Figura 4: Gel Filtração Analítica. A Hsp90 C-terminal apresenta um raio de Stokes de $3,4 \pm 0,2$ nm. O Coeficiente de Difusão (determinado por Espalhamento Dinâmico de Luz) foi de $6,02 \cdot 10^{-7}$ cm²/s. Tais parâmetros podem ser úteis para monitorar possíveis interações com nucleotídeos e inibidores.

CO-PURIFICAÇÃO

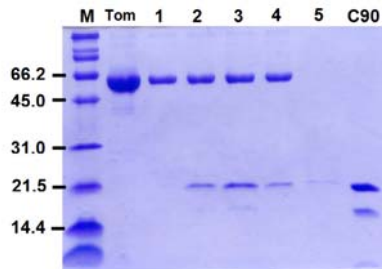


Figura 5: SDS-PAGE 12% da co-purificação. M- Padrão. Tom- Tom70 à 10 μ M. 1- Controle da proteína "presa" (Tom70). 2- Tom70:Hsp90(C90) 1:1. 3- Tom70:Hsp90(c90) 1:2. 4- Tom70:Hsp90(C90) (2:1). 5- Controle da proteína "isca". C90- Hsp90(C90) à 10 μ M. A Tom70 é um interator de Hsp90, sendo assim uma possível sonda para verificar as alterações provocadas pela presença de nucleotídeos e inibidores.

CONCLUSÕES

- A Hsp90 C-terminal foi purificada com eficiência (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 a proteína encontra-se enovelada.
- É uma proteína rica em estrutura secundária do tipo α -hélice. A presença de novobiocina parece perturbar a estrutura da proteína, como mostrado por dicroísmo circular, o que indica uma possível interação Hsp90-novobiocina.
- O teste inicial de co-purificação constatou a interação da Hsp90(C90) com a Tom70, e pode constituir uma sonda para verificar interações, assim como as medidas de Raio de Stokes e Coeficiente de Difusão.

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.

AGRADECIMENTOS