

Estudos do papel do N-terminal na conformação e função das sHsp de cana-de-açúcar

Vanesa P. M. Martins, Glaucia M. S. Pinheiro, Ana O. Tiroli Cepeda, Carlos H. I. Ramos

DEPTO. QUÍMICA ORGÂNICA, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNICAMP, Campinas, SP, 13084-862, Brasil

SAE – UNICAMP

Palavras chave: *Chaperonas – Estresse Térmico – Cana-de-Açúcar*



Introdução

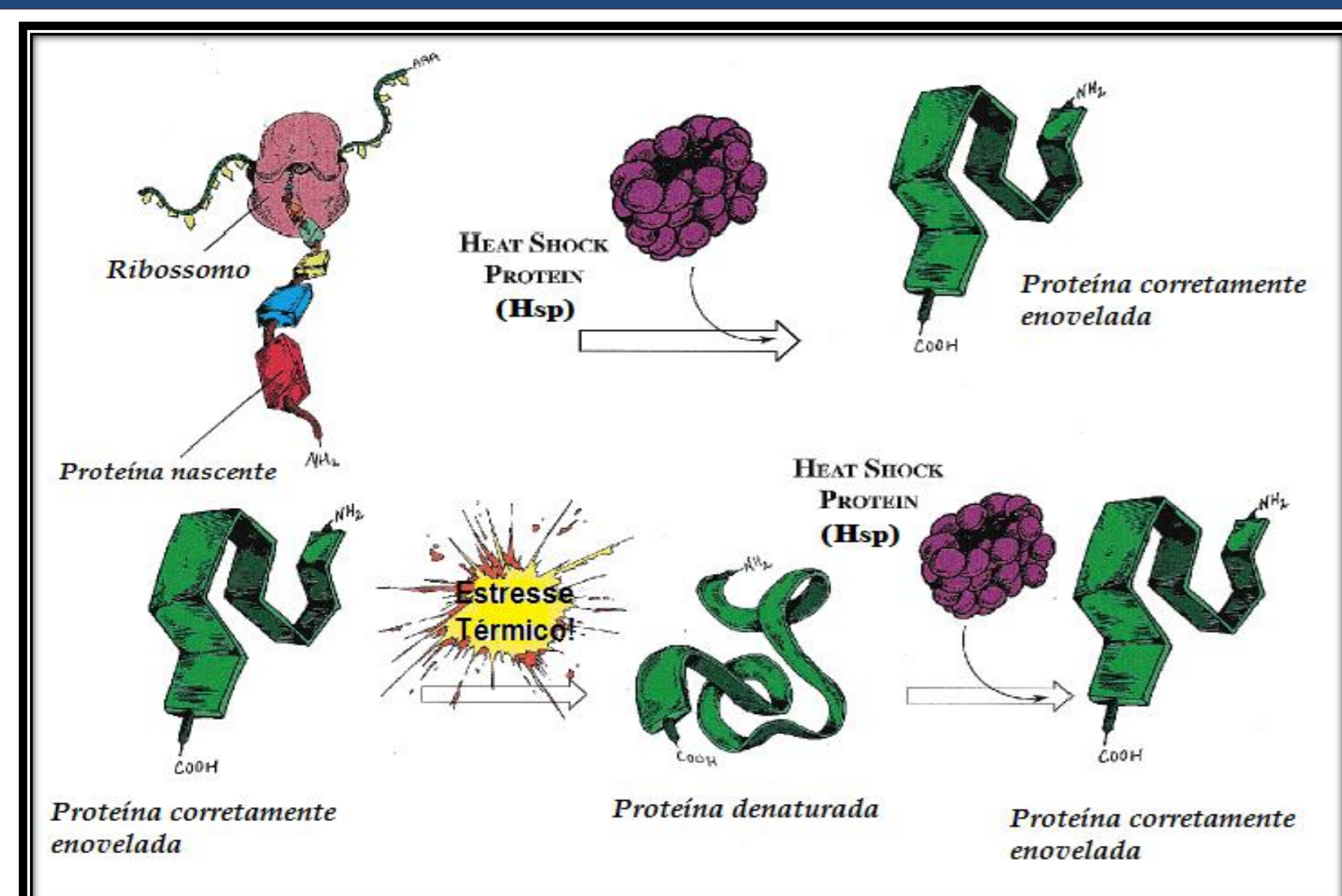


Figura 01: Ação das Chaperonas – As proteínas conhecidas como *chaperonas* atuam tanto no enovelamento de proteínas nascentes, como na estabilização e posterior reenovelamento ou degradação de proteínas parcialmente desnaturadas ou agregadas. (Adaptado de exercisephysiologist.wordpress.com) Existem várias famílias de chaperonas e neste trabalho estudamos as **SsHsp (Small Heat shock proteins de cana-de-açúcar)**.

Função Chaperona (Substrato:SsHsp)	Proteção > 90 %	Proteção 50-90%	Proteção <50%
CS + SsHsp17,2	1:2	1:1	--
CS + SsHsp17,9	1:1	--	--
MDH + SsHsp17,2	--	1:2	1:1
MDH + SsHsp17,9	--	1:1	--
Luciferase + SsHsp17,2	--	1:20	1:10
Luciferase + SsHsp17,9	--	--	1:20

Figura 02: Função chaperona – Nos concentramos no estudo sobre função de duas **small Hsp**, a SsHsp17,2 e a SsHsp17,9 de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*), sabidamente dodecaméricas. Elas possuem 75% de identidade de estrutura primária, mas interagem com substratos modelos, protegendo-os da agregação, de formas diferentes. MDH (Ímalato Desidrogenase), CS (Citrato Sintase) (Adaptado de Tiroli & Ramos, 2007).

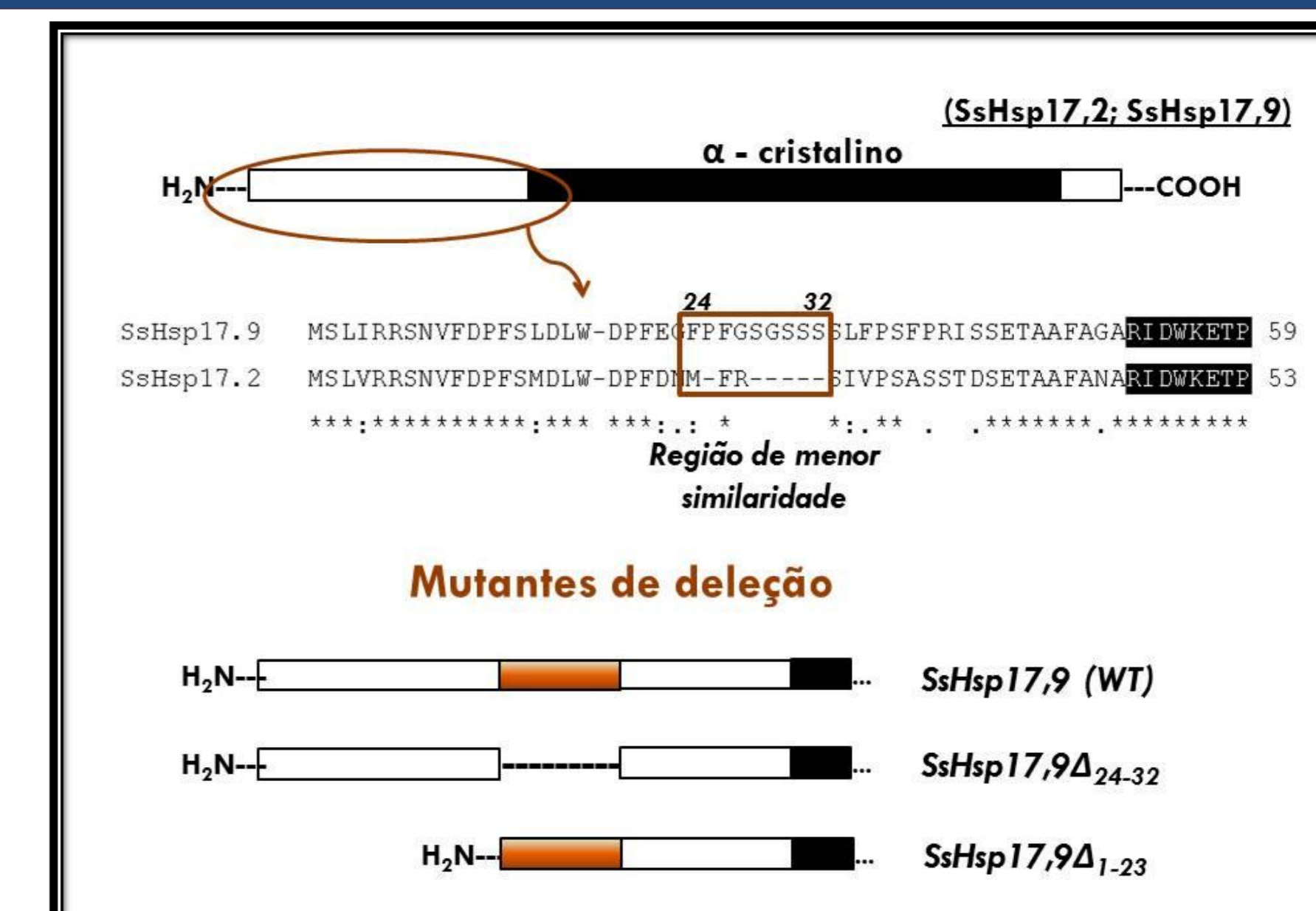


Figura 03: Mutantes de deleção - A fim de compreendermos como o *N-terminal* (região de maior variabilidade entre as **small Hsp**) influencia a função de chaperonas das SsHsp17,2 e SsHsp17,9, iniciamos o estudo com diferentes mutantes de deleção da SsHsp17,9 (primeiramente com a **SsHsp17,9Δ24-32**).

Metodologia

Expressão e purificação: O vetor pET28aSsHsp17,9Δ24-32 foi transformado na linhagem BL21 (DE3) de *Escherichia coli* para expressão heteróloga por adição 0,4 mM de IPTG a $A_{600}=1,0$. A purificação se deu por cromatografia de afinidade e de gel filtração analítica.

Desenovelamento térmico: Utilizando-se de um espectropolarímetro, acompanhamos o desenovelamento térmico da SsHsp17,9Δ24-32 em tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, entre as temperaturas de 20-90°C.

Espalhamento de Luz (Teste de proteção) – Teste de proteção contra a agregação térmica foi monitorado através de espalhamento de luz, a 45°C, utilizando as proteínas *Malato Desidrogenase* (MDH) e *Citrato Sintase* (CS) como substratos modelo.

Resultados e Discussão

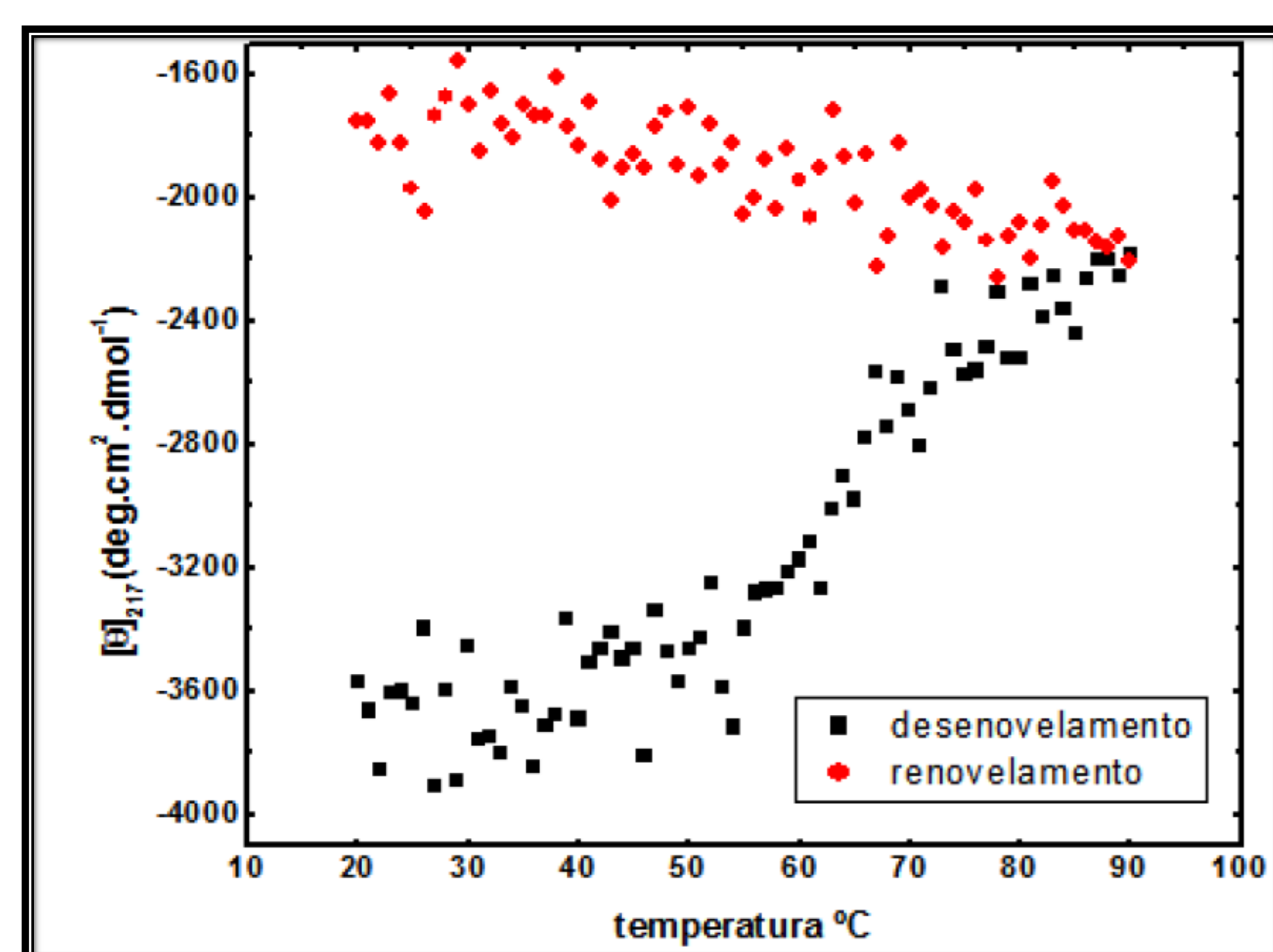


Figura 04: Desenovelamento térmico – Os resultados obtidos apontam para uma irreversibilidade do desenovelamento térmico do mutante SsHsp17,9Δ24-32. É interessante salientar que as proteínas selvagens (WT) apresentam comportamento diferente, sendo completamente reversíveis (pelo mesmo experimento).

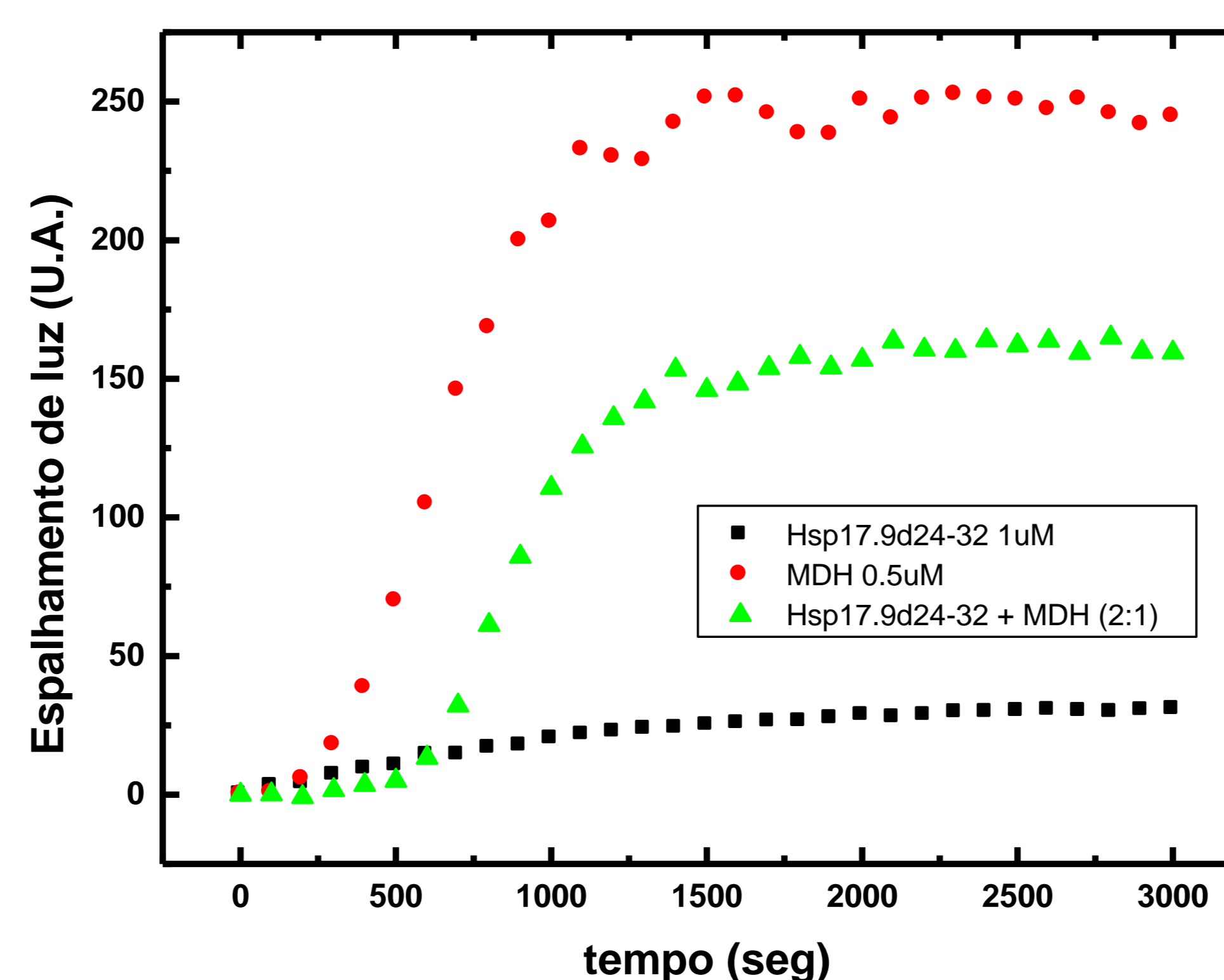
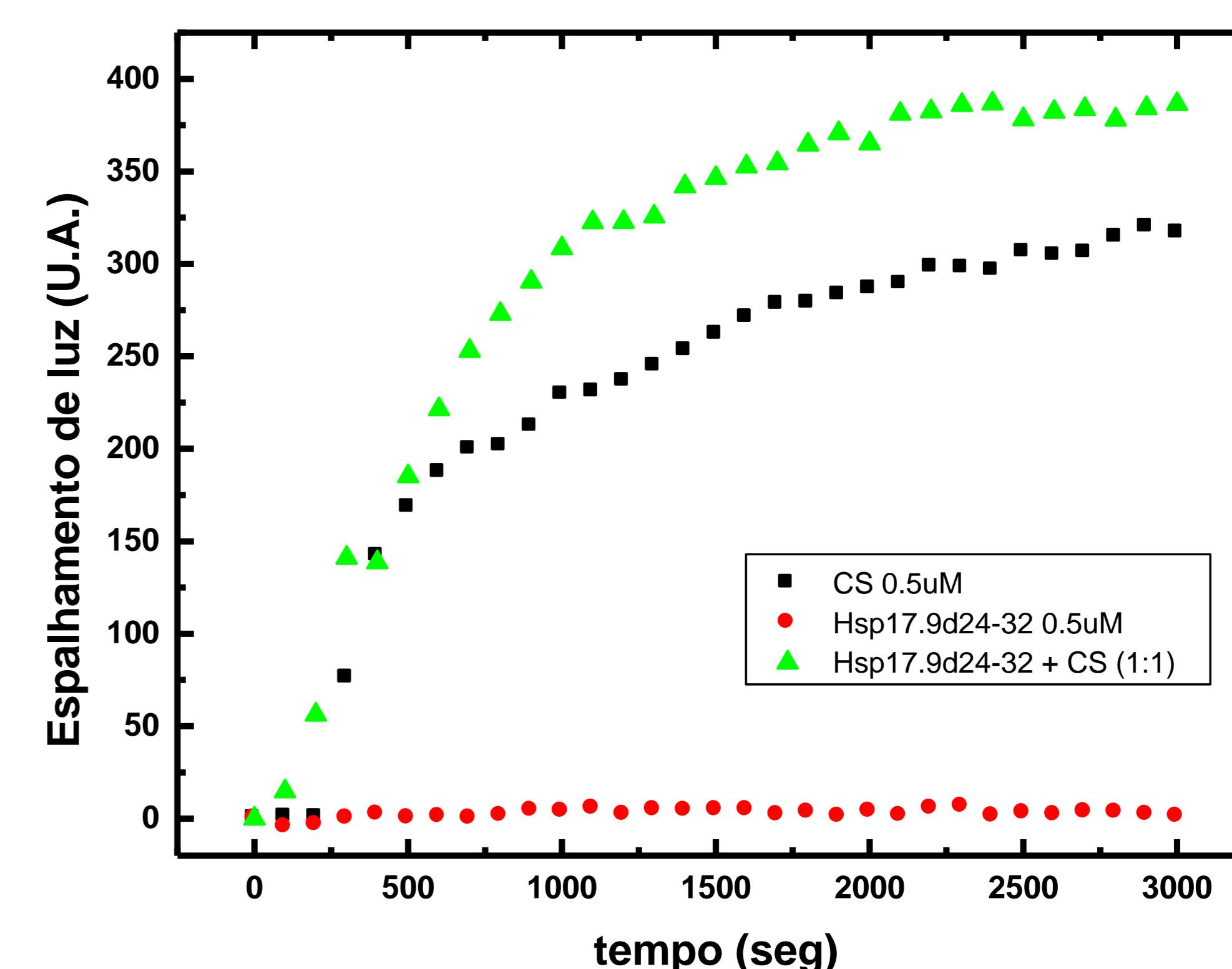


Figura 5: Espalhamento de Luz (Teste de proteção) – Nas condições testadas a SsHsp17,9Δ24-32 (1uM) foi capaz de proteger cerca de 40 % do substrato modelo MDH(0,5uM) a 45°C, (2:1). Se compararmos esse resultado com a *figura 2*, percebemos se tratar de um resultado mais próximo daquele observado para a SsHsp17,2. Em contrapartida, no teste com a CS (1:1), houve um maior espalhamento de luz quando da adição da chaperona, não sendo a SsHsp17,9Δ24-32 capaz de promover a proteção nesse caso.



Conclusões

- Os dados obtidos a partir dos testes de **Desenovelamento térmico** e **Teste de proteção** revelam que a alteração no *N-terminal* gerou significativas mudanças no comportamento da SsHsp17,9Δ24-32 em relação às proteínas selvagens, tanto em relação a estrutura (o seu desenovelamento térmico não foi reversível) quanto a função chaperona. Contudo, mais testes precisam ser realizados, principalmente sem a cauda de histidina e com os outros mutantes de deleção para que resultados mais concretos sejam alcançados.

Agradecimentos



Referências

• Tiroli, A.O.; Ramos, C.H.I.; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 818–831.