



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Thiago Vargas Seraphim

**“ESTUDOS BIOQUÍMICOS E BIOFÍSICOS DE PROTEÍNAS DE
CHOQUE TÉRMICO DA FAMÍLIA HSP40 DE CANA-DE-AÇÚCAR E
DE LEVEDURA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Thiago Vargas Seraphim
Carlos Ramos
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e Molecular,
na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos

Co-orientadora: Dra. Ana Olívia Tiroli Cepeda

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Se65e

Seraphim, Thiago Vargas
Estudos bioquímicos e biofísicos de proteínas de choque
térmico da família Hsp40 de cana-de-açúcar e de levedura.
/ Thiago Vargas Seraphim – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Carlos Henrique Inácio Ramos.
Co-orientador: Ana Olívia Tiroli Cepeda.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteínas. 2. Chaperonas moleculares. 3.
Bioquímica. 4. Biofísica. I. Ramos, Carlos Henrique
Inácio. II. Cepeda, Ana Olívia Tiroli. III. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Biochemical and biophysical studies of heat shock proteins of Hsp40 family from sugarcane and yeast.

Palavras-chave em inglês: Proteins; Molecular chaperones; Biochemistry; Biophysics.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Carlos Henrique Inácio Ramos, Jörg Kobarg, Ljubica Tasic.

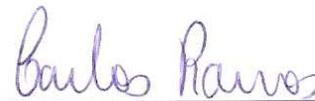
Data da defesa: 22/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 22 de fevereiro de 2011

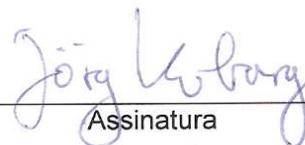
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (Orientador)



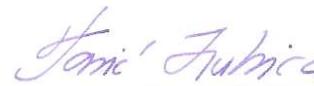
Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg



Assinatura

Profa. Dra. Ljubica Tasic



Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Prof. Dr. Fábio César Gozzo

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Estudos bioquímicos e biofísicos de proteínas de choque térmico da família Hsp40 de cana-de-açúcar e de levedura":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

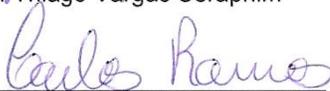
(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Química / UNICAMP, sob Protocolo(s) nº CHIR 2009-1.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



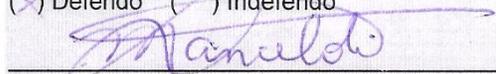
Aluno: Thiago Vargas Seraphim



Orientador: Carlos Henrique Inácio Ramos

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP



COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970 SP - BRASIL
<http://www.iqm.unicamp.br>



Solicitação/Procolo: CHIR 2009-1

Nome do aluno: Thiago Vargas Seraphim

Nível: mestrado

Período: 03/2009 – 02/2011

Nome do orientador: Carlos H. I. Ramos

Resumo:

Estudos bioquímicos e biofísicos de proteínas de choque térmico da família Hsp40 de cana-de-açúcar e de levedura.

O enovelamento protéico é essencial para a correta função biológica das proteínas. Diversas situações de estresse podem agir induzindo a formação de espécies improdutivas na via de enovelamento, como proteínas mal enoveladas e/ou até mesmo agregados protéicos. Para controlar estes eventos, há a maquinaria de chaperonas moleculares, que tem por objetivo garantir a homeostase protéica celular. As chaperonas moleculares são capazes de ligar e estabilizar um polipeptídeo, mas sem contribuir com informações para a sua conformação final. Dentro desta maquinaria, o sistema Hsp70 tem um papel central, sendo responsável por receber proteínas desenoveladas ou mal enoveladas de outras chaperonas, podendo auxiliar no reenovelamento e direcionamento para outras chaperonas moleculares ou para degradação. A Hsp70 é regulada por co-chaperonas, como a Hsp40, que é responsável pela entrega de proteínas clientes à Hsp70 e pelo estímulo de sua atividade ATPase. Este trabalho propõe a caracterização inicial de uma Hsp40 tipo I de cana-de-açúcar, dada a ausência de informações sobre o mecanismo de chaperonas moleculares nestas plantas, aliada à relevância econômica e potencial aplicação biotecnológica da cana-de-açúcar. Objetiva-se também neste projeto o estudo de uma Hsp40 tipo II de levedura e seus mutantes, a fim de complementar estudos anteriores e ajudar a compreender a relação estrutura-função destas proteínas.

O projeto de pesquisa acima descrito, a ser conduzido pelo aluno de mestrado Thiago Vargas Seraphim, recebeu autorização desta Comissão Interna de Biossegurança.

Presidente em exercício da CIBio-IQ: Carlos H. I. Ramos

cramos@iqm.unicamp.br
Fone: 55-19-3521-3144

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar, me dar os meios e a força necessária para que perseguir meus sonhos e objetivos. Obrigado por me permitir concluir mais esta etapa.

Gostaria de agradecer ao Instituto de Biologia, Instituto de Química e a UNICAMP pelo fornecimento da estrutura básica e apoio para todo o desenvolvimento do meu trabalho, sem esquecer os professores, que contribuíram de maneira substancial para minha formação, e a secretária da pós-graduação Andréia Aparecida Vigilato, pela ajuda com dúvidas, prazos e burocracias. Obrigado também a CAPES, ao CNPq, a FAPESP e ao Programa FIRCA do National Institute of Health (NIH-EUA), pelo auxílio financeiro, e ao LEC-LNBio por permitir-me utilizar de sua infra-estrutura.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Ramos pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela orientação e discussões, essenciais para que este trabalho pudesse se tornar realidade, e pelos ensinamentos não apenas relacionados ao assunto desta dissertação, mas também no que diz respeito ao desenvolvimento do pensamento científico, algo que vou levar durante toda a minha jornada acadêmica.

Ao pessoal do laboratório, meu obrigado por todo este tempo de convivência, pela troca de experiências e discussões científicas, que acrescentaram muito ao meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço aos meus amigos pessoais (e aqui incluo não só aqueles que carrego de outros tempos, mas também algumas das novas boas amizades que fiz dentro grupo de pesquisa) por sempre me apoiarem e acreditarem de alguma forma em meu potencial.

Muito obrigado a minha família, definitivamente essencial para que eu pudesse chegar até aqui. Aos meus pais, agradeço o carinho, o apoio, o esforço e a persistência, sem esquecer a paciência, para que eu pudesse estudar e por darem todas as condições necessárias para meu crescimento pessoal e intelectual. À minha irmã, obrigado pelo conforto e alegria indescritível que encontrei em seus pequenos gestos e palavras. Aos meus avós, tia e primos, obrigado por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado nesta caminhada.

Por fim e obviamente não menos importante, gostaria de agradecer a Débora, por acreditar em mim talvez mais do que eu mesmo, por me apoiar sempre, por me ouvir e me “aguentar” nos momentos de estresse, que não foram poucos durante a escrita desta dissertação. Tudo isto foi fundamental e importante para mim.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA.....	ii
BANCA EXAMINADORA.....	iii
DECLARAÇÃO DE BIOSSEGURANÇA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIÇÕES.....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. A estrutura das proteínas.....	19
1.2. O enovelamento de proteínas nas células.....	24
1.2.1. Sistema Hsp70.....	24
1.2.1.1. Hsp40.....	26
1.3. Agregados amilóides.....	31
1.4. Justificativa e resultados prévios relacionados ao estudo das Hsp40s de cana-de-açúcar e de levedura.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivos gerais.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. Sistema pET e vetores para expressão de proteínas recombinantes.....	38
3.2. Linhagens de bactérias.....	39
3.3. Transformação de bactérias.....	40
3.4. Meios de cultura.....	40

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio.....	41
3.6. Soluções tampão para purificação de proteínas.....	42
3.7. Método para concentrar proteínas.....	43
3.8. Determinação da concentração de proteínas.....	43
3.9. Análise da estrutura primária.....	44
3.10. Expressão de proteínas.....	45
3.11. Purificação de proteínas.....	45
3.12. Espectropolarimetria de dicroísmo circular.....	47
3.13. Teste de atividade chaperona.....	48
3.14. Cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz.....	48
3.15. Gel filtração analítica.....	49
3.16. Espalhamento de luz dinâmico.....	51
3.17. Estimativa da forma da proteína em solução pela determinação do fator de Perrin.....	51
3.18. Estabilidade térmica.....	52
3.19. Espectroscopia de fluorescência.....	52
3.19.1. Fluorescência de tioflavina T.....	53
3.19.2. Fluorescência de bis-ANS.....	54
3.19.3. Fluorescência do triptofano.....	55
3.19.4. Fotoapagamento do triptofano.....	56
3.19.5. Anisotropia do triptofano.....	58
3.20. Microscopia eletrônica de varredura.....	59
4. RESULTADOS.....	60
4.1. SHsp40.....	60
4.1.1. Análise da estrutura primária.....	60
4.1.2. Expressão e purificação.....	62
4.1.3. Dicroísmo circular.....	66

4.1.4. Atividade chaperona.....	67
4.1.5. Estado oligomérico.....	68
4.1.6. Gel filtração analítica, espalhamento dinâmico de luz e forma.....	69
4.1.7. Desenovelamento térmico.....	72
4.1.8. Espectroscopia de fluorescência.....	76
4.1.9. Microscopia eletrônica.....	79
4.2. Sis1 e mutantes.....	80
4.2.1. Fluorescência estática do triptofano.....	80
4.2.2. Fotoapagamento do triptofano.....	82
4.2.3. Anisotropia do triptofano.....	84
4.2.4. Cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz.....	85
5. DISCUSSÃO.....	87
5.1. SHsp40.....	87
5.1.1. A SHsp40 foi identificada como uma Hsp40 tipo I.....	87
5.1.2. A SHsp40 foi expressa e purificada enovelada.....	87
5.1.3. A SHsp40 apresentou atividade chaperona.....	88
5.1.4. A SHsp40 foi caracterizada como um dímero alongado em solução.....	88
5.1.5. O desenovelamento térmico da SHsp40 apresentou pelo menos um intermediário.....	90
5.1.6. O intermediário da SHsp40 foi caracterizado como sendo rico em folha β e parcialmente enovelado.....	91
5.1.7. A SHsp40 agregada apresentou formação de estruturas fibrilares.....	91
5.1.8. Considerações finais sobre a SHsp40.....	92
5.2. Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$	93
5.2.1. Sis1 $\Delta_{124-174}$ apresentou comportamento físico-químico semelhante a Sis1.....	93
5.2.2. A deleção de CTDI desestabilizou o dímero de Sis1.....	95

5.2.3. Considerações finais sobre a Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$	96
6. CONCLUSÕES.....	97
6.1. SHsp40.....	97
6.2. Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$	98
7. REFERÊNCIAS.....	99
8. CURRICULUM VITAE.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A estrutura tridimensional das proteínas.....	20
Figura 2. Elementos de estrutura secundária das proteínas.....	21
Figura 3. Funil tridimensional do enovelamento de proteínas.....	23
Figura 4. Esquema do ciclo da Hsp70.....	26
Figura 5. Estrutura e distribuição dos domínios nos diferentes tipos de Hsp40.....	28
Figura 6. Modelo das Hsp40s determinado por SAXS	29
Figura 7. Estrutura primária, distribuição de domínios e alinhamento das Hsp40 modelos de levedura, Sis1 e Ydj1.....	30
Figura 8. Modelo de fibrila amilóide gerado a partir de criomicroscopia eletrônica.....	33
Figura 9. Distribuição de domínios na estrutura de Sis1 selvagem e de seus mutantes Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$	36
Figura 10. Esquema ilustrativo do sistema pET.....	39
Figura 11. Diagrama de Jablonski modificado ilustrando o fenômeno de fluorescência.....	53
Figura 12. Efeito do ambiente no espectro de emissão do triptofano.....	55
Figura 13. Predição dos domínios conservados na estrutura primária da SHsp40.....	61
Figura 14. Análise do efeito da temperatura na expressão da SHsp40.....	63
Figura 15. Perfil cromatográfico de gel filtração da SHsp40.....	64
Figura 16. Análise do processo de purificação da SHsp40 por SDS-PAGE 12%.....	65
Figura 17. Caracterização da estrutura secundária da SHsp40 por dicroísmo circular.....	66
Figura 18. Verificação da atividade chaperona da SHsp40 por SDS-PAGE 12%.....	67

Figura 19. Caracterização do estado oligomérico da SHsp40 em solução por SEC-MALS.....	68
Figura 20. Perfil cromatográfico de gel filtração analítica da SHsp40.....	70
Figura 21. Estimativa do raio de Stokes da SHsp40.....	71
Figura 22. Desenovelamento térmico da SHsp40, de 20°C a 90°C, monitorado pelo sinal de dicroísmo circular a 222 nm.....	73
Figura 23. Desenovelamento térmico da SHsp40, de 20°C a 65°C, acompanhado pelo sinal de dicroísmo circular a 222 nm.....	74
Figura 24. Análise de dicroísmo circular da SHsp40 e do intermediário.....	75
Figura 25. Análise da emissão de fluorescência da tioflavina T com a SHsp40 e intermediário.....	77
Figura 26. Análise da emissão de fluorescência do bis-ANS com a SHsp40 e intermediário.....	78
Figura 27. Fotomicrografias dos agregados de SHsp40.....	79
Figura 28. Estrutura do domínio C-terminal da Hsp40 tipo II, Sis1.....	80
Figura 29. Análise comparativa da emissão de fluorescência estática do triptofano entre Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$	81
Figura 30. Gráfico do fotoapagamento do triptofano das proteínas Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$	82
Figura 31. Estudo da anisotropia do triptofano das proteínas Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$	84
Figura 32. Estudo da estabilidade da Sis1 e mutantes por cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos tampões utilizados no decorrer do trabalho.....	42
Tabela 2. Valores de ϵ obtidos para cada Hsp40 recombinante.....	44
Tabela 3. Composição e propriedades do padrão de proteínas utilizado no experimento de gel filtração analítica.....	50
Tabela 4. Resultados do alinhamento da estrutura primária da SHsp40 com a estrutura primária de proteína homóloga.....	60
Tabela 5. Alguns parâmetros físico-químicos da SHsp40 preditos pela análise de sua estrutura primária pelo programa Sednterp.....	61
Tabela 6. Propriedades hidrodinâmicas da SHsp40 obtidas por gel filtração analítica e por espalhamento dinâmico de luz.....	71
Tabela 7. Constantes de Stern-Volmer calculadas a partir dos experimentos de fotoapagamento para as proteínas Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$	83
Tabela 8. C_m da dissociação de dímeros em monômeros das proteínas Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$ determinadas cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz.....	86

LISTA DE ABREVIÇÕES

[θ]: elipticidade molar residual média, em graus.cm².dmol⁻¹.

< λ >: centro de massa espectral.

°C: graus Celsius, unidade de temperatura.

Å: Ångström, equivalente a 10⁻¹⁰ metros.

ADP: adenosina 5' difosfato.

ATP: adenosina 5' trifosfato.

bis-ANS: 8-dianilino naftaleno sulfonato de potássio.

CD: dicroísmo circular.

CD_{222 nm}: sinal de dicroísmo circular a 222 nm.

cDNA: DNA complementar.

Cys: região rica em cisteína das Hsp40s tipo I que contém os motivos CxxCxGxC.

D: coeficiente de difusão, dado em cm²/s.

Da / kDa: Dalton / quilodalton, unidades de massa molecular (1 kDa = 1000 Da).

DjA1: Hsp40 tipo I humana, membro 1.

DLN: domínio de ligação a nucleotídeo da Hsp70.

EDL: espalhamento dinâmico de luz.

DLS: domínio de ligação ao substrato da Hsp70.

DO_{600 nm}: densidade óptica a 600 nm.

DTT: ditioneitol, agente redutor.

f/f_0 : fator de Perrin

f : coeficiente friccional experimental.

f_0 : coeficiente friccional teórico de uma esfera rígida, não hidratada e de mesma massa molecular da molécula de interesse.

G/F: região rica em resíduos de glicina e fenilalanina das Hsp40s tipo I e II.

G/M: região rica em resíduos de glicina e metionina das Hsp40s tipo II.

Hdj1: Hsp40 tipo II humana, membro 1.

HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil]-etanosulfônico.

HIS₆: cauda de hexa-histidina.

HPD: motivo conservado no domínio J das Hsp40s, composto de histidina-prolina-aspartato.

Hsp40: proteína de choque-térmico de 40 kDa.

Hsp70: proteína de choque-térmico de 70 kDa.

IPTG: isopropil β-D-tiogalactosídeo.

K_{av}: coeficiente de partição.

K_{SV}: constante de Stern-Volmer.

LB: meio Luria-Bertani.

m/v: massa sobre volume.

Pi: ortofosfato inorgânico.

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila.

R_S: raio de Stokes ou raio hidrodinâmico (R_H).

SAXS: do inglês, *Small Angle X-ray Scattering*, (espalhamento de raios-X à baixo ângulo).

SHsp40: Hsp40 tipo I de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*).

SDS: dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamde gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS).

SEC-MALS: *size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering* (cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz).

Sis1: Hsp40 tipo II de levedura.

Sis1Δ₁₂₁₋₂₅₇: proteína mutante da Sis1, com deleção dos resíduos de aminoácidos da posição 121 a 257 (domínio G/M e subdomínio CTDI)

Sis1 Δ ₁₂₄₋₁₇₄: proteína mutante da Sis1, com deleção dos resíduos de aminoácidos da posição 124 a 174 (domínio G/M)

ThT: tioflavina T.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano.

tRNA: RNA transportador.

UV: ultravioleta

V: volts

VC: volume de coluna.

Ydj1: Hsp40 tipo I de levedura.

ϵ : coeficiente de extinção molar, em $M^{-1}.cm^{-1}$.

θ : elipticidade, dada em miligraus.

RESUMO

O enovelamento protéico é essencial para a correta função biológica das proteínas. A existência de um ambiente com alta concentração dos mais diferentes tipos de moléculas, dentro da célula, e de diversos tipos de situações de estresse, podem agir induzindo a formação de espécies improdutivas na via de enovelamento, como proteínas mal enoveladas e/ou até mesmo agregados protéicos. Para controlar estes eventos, há a maquinaria de chaperonas moleculares, que tem por objetivo garantir a homeostase protéica celular. As chaperonas moleculares são capazes de ligar e estabilizar um polipeptídeo, mas sem contribuir com informações para a sua conformação final. Dentro desta maquinaria, o sistema Hsp70 tem um papel central, sendo responsável por receber proteínas desenoveladas ou mal enoveladas de outras chaperonas, podendo auxiliar no reenovelamento e direcionamento para outras chaperonas moleculares ou para degradação. A Hsp70 é regulada por co-chaperonas, como a Hsp40, que é responsável pela entrega de proteínas clientes à Hsp70 e pelo estímulo da atividade ATPase, essencial para a funcionalidade da Hsp70. Este trabalho apresenta a caracterização de uma Hsp40 tipo I de cana-de-açúcar, nomeada SHsp40, e o estudo de uma Hsp40 tipo II de levedura e seus mutantes, a fim de entender a relação estrutura-função destas proteínas. A SHsp40 foi expressa em *E. coli*, purificada e obtida enovelada, como verificado por dicroísmo circular. Além disso, a SHsp40 apresentou atividade chaperona em experimentos de proteção ao substrato desenovelado e se comportou como um dímero alongado em solução, como mostrado por SEC-MALS e pela determinação do fator de Perrin. Experimentos de desenovelamento térmico monitorado pelo sinal de CD a 222 nm revelaram que a SHsp40 possui pelo menos um intermediário, e a fluorescência de tioflavina T e bis-ANS mostraram que este intermediário é rico em folhas β e parcialmente desenovelado, características de espécies na via de formação de fibrilas. A SHsp40 agregada foi examinada por microscopia eletrônica de varredura, que comprovou sua capacidade de formar de fibrilas. Este trabalho também contribuiu para o estudo de uma Hsp40 tipo II de levedura, Sis1, e seus mutantes de deleção, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$. Ensaio de fluorescência estática do triptofano, fotoapagamento e anisotropia mostraram que a deleção do domínio G/M não afetou a estrutura e hidrodinâmica de Sis1 $\Delta_{124-174}$ em relação à proteína selvagem. Estudos de estabilidade destas proteínas, realizado anteriormente em nosso grupo de pesquisa e complementado neste trabalho pelo uso da técnica de SEC-MALS, mostrou que Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ foram mais estáveis que Sis1 $\Delta_{121-257}$, mutante que o domínio G/M e subdomínio CTDI estão ausentes.

ABSTRACT

Correct protein folding is essential for proper protein biological function. There is a crowded environment and many types of molecules inside the cell and a variety of external stresses can act inducing unproductive species, as unfolded and/or misfolded proteins and even protein aggregates. To control these undesired events and ensures the protein homeostasis there is a molecular chaperone machinery. Molecular chaperones are able to bind and stabilize polypeptides but with no contributions for their final conformations. Inside this machinery, the Hsp70 system has a central role and is responsible to receive unfolded or misfolded proteins from other chaperones, helping in protein refolding and delivering the clients to other chaperones and even protein targeting for degradation. Hsp70 is regulated by its co-chaperones, such as Hsp40, which is responsible to client proteins deliver to Hsp70 and stimulation of its ATPase activity, essential processes for Hsp70 function. This work presents a sugarcane type I Hsp40 characterization, named SHsp40, and studies of an yeast type II Hsp40 and its mutants in order to understand the structure-function relationship of these proteins. The SHsp40 was expressed in *E. coli*, purified and obtained folded, as verified by circular dichroism. Furthermore, SHsp40 presented chaperone activity in unfolded substrate protection experiments and behaved as an elongated dimer in solution, as shown by SEC-MALS and estimated by Perrin factor. Thermal-induced unfolding experiments monitored by CD signal at 222 nm revealed that SHsp40 has at least one intermediate which is populated and tioflavin T and bis-ANS fluorescence showed that this intermediate is β sheet-rich and partially folded, such as intermediate species in the fibril formation pathway. The aggregated SHsp40 was examined by scanning electron microscopy, wich proved its ability to fibril formation. This work also contributed for the study of an yeast type II Hsp40, Sis1, and its deletion mutants, Sis1 $\Delta_{124-174}$ and Sis1 $\Delta_{121-257}$. Steady-state tryptophan fluorescence, quenching and anisotropy assays showed that the G/M domain deletion did not affect the structure and hydrodynamic properties of Sis1 $\Delta_{124-174}$ in relation to the wild type protein. Stability studies of these proteins, previously performed in our research group and complemented in this work by using the SEC-MALS technique, showed that Sis1 and Sis1 $\Delta_{124-174}$ were more stable than Sis1 $\Delta_{121-257}$, a mutant with the G/M domain and CTDI subdomain absents.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A estrutura das proteínas

As proteínas são responsáveis por muitas funções biológicas nos organismos e estão entre as macromoléculas mais abundantes e diversificadas da célula (Alberts *et al.*, 2002). Entre exemplos de proteínas de diversas funções biológicas, temos as enzimas, responsáveis por catalisar praticamente todas as reações químicas que envolvam moléculas orgânicas; as proteínas transportadoras, que ligam moléculas específicas transportadas de um órgão para outro, como a hemoglobina que transporta o oxigênio do pulmão até os demais tecidos; as proteínas que trabalham na contração, que capacitam células e organismos a mudarem de forma e se deslocarem no meio; as proteínas estruturais, as quais fornecem sustentação e resistência, como o colágeno das cartilagens e dos tendões; as proteínas de defesa, como os anticorpos, que são capazes de reconhecer e neutralizar agentes exógenos; as proteínas reguladoras, hormônios protéicos como a insulina, que regula o metabolismo de carboidratos (Lehninger *et al.*, 2004). Todas essas proteínas, com suas propriedades e funções diversas, são construídas a partir de variações do mesmo grupo de 20 aminoácidos, e cada uma apresenta sua estrutura espacial definida, diretamente relacionada com sua função desempenhada. A seqüência de aminoácidos determina os tipos de interações possíveis entre as cadeias laterais, as quais apresentam características de carga, volume e reatividade com água muito variáveis (Lehninger *et al.*, 2004). A organização tridimensional de uma proteína pode ser descrita em níveis estruturais de complexidade crescente (Figura 1). A estrutura primária é a seqüência de aminoácidos e, como mencionada acima, é determinada geneticamente e é específica para cada proteína. A estrutura secundária descreve as estruturas regulares bidimensionais formadas por segmentos da cadeia polipeptídica, sendo determinadas principalmente por interações locais. Podem ser do tipo hélice α (Figura 2A), definida como a torção da cadeia ao redor de um eixo, mantida por ligações de hidrogênio entre a cadeia principal de um resíduo de aminoácido e do quarto resíduo subsequente, de forma que as interações apresentam-se paralelamente ao eixo da hélice e as cadeias laterais dos aminoácidos ficam projetadas para fora da hélice, pois não participam das ligações de hidrogênio (Berg *et al.*, 2002; Lehninger *et al.*, 2004). A folha β (Figura 2B) é outro tipo de estrutura secundária, também mantida por ligações de hidrogênio, mas neste caso estabelecidas entre cadeias polipeptídicas diferentes ou entre segmentos não necessariamente próximos de uma

mesma cadeia, exibindo uma conformação mais estendida que a hélice α , dispostas lado a lado, o que dá um aspecto de uma folha pregueada. As ligações de hidrogênio neste caso são perpendiculares ao eixo das cadeias e os grupos laterais dos aminoácidos ficam projetados para cima e para baixo do plano da folha pregueada (Berg *et al.*, 2002; Lehninger *et al.*, 2004). O nível seguinte é a estrutura terciária, o enovelamento da cadeia polipeptídica por interações de regiões com estrutura regular (hélice α ou folha β) ou de regiões sem estrutura definida, permitindo a aproximação e a interação de regiões distantes (interações não locais) na seqüência polipeptídica, através de ligações não-covalentes, principalmente entre as cadeias laterais dos aminoácidos (Lehninger *et al.*, 2004). Por fim, a estrutura quaternária descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas, também chamadas de subunidades, formando uma proteína funcional oligomérica, mantida por ligações, em geral, não-covalentes entre as subunidades (Lehninger *et al.*, 2004).

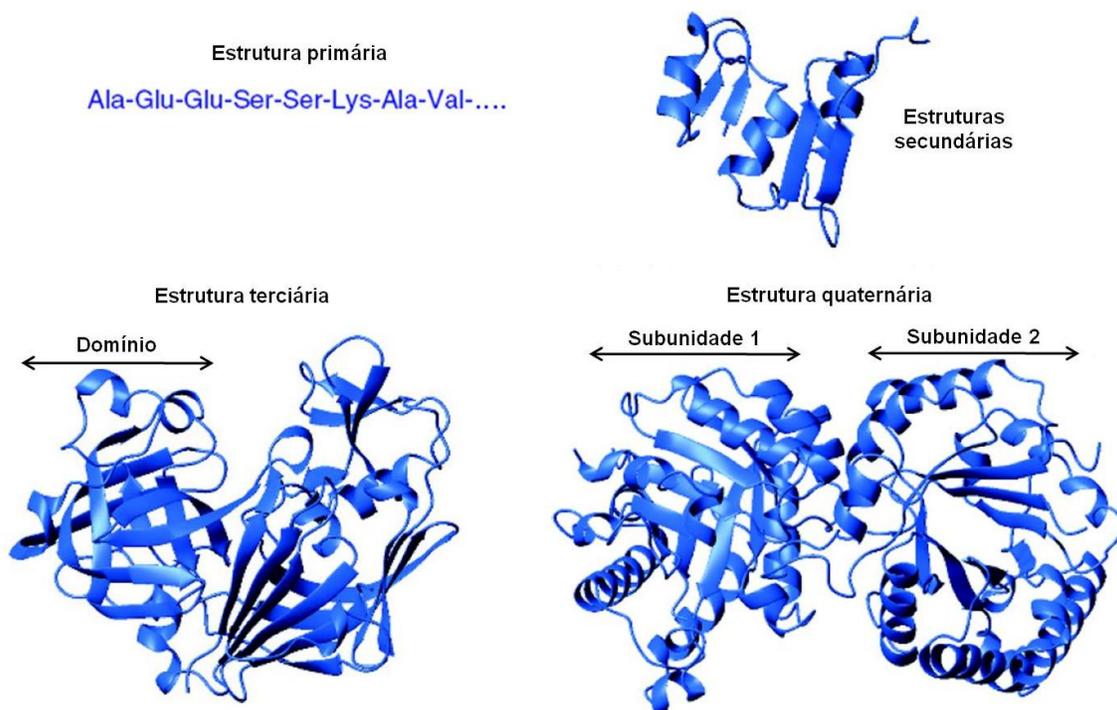


Figura 1. A estrutura tridimensional das proteínas. Os níveis estruturais no processo de enovelamento protéico são classificados de acordo com sua complexidade, em níveis crescentes. A estrutura primária é formada única e exclusivamente pela seqüência de aminoácidos da proteína, enquanto que a estrutura secundária constitui-se, principalmente, de elementos estruturais denominados hélice α e folhas β , formados por interações locais entre os resíduos de aminoácidos. A estrutura terciária é formada pela relação entre regiões de estrutura regular, podendo porções distantes da cadeia interagirem. Por fim, a estrutura quaternária é formada pela interação de diferentes subunidades para formar uma unidade protéica ativa. Modificado de Withford, 2005.

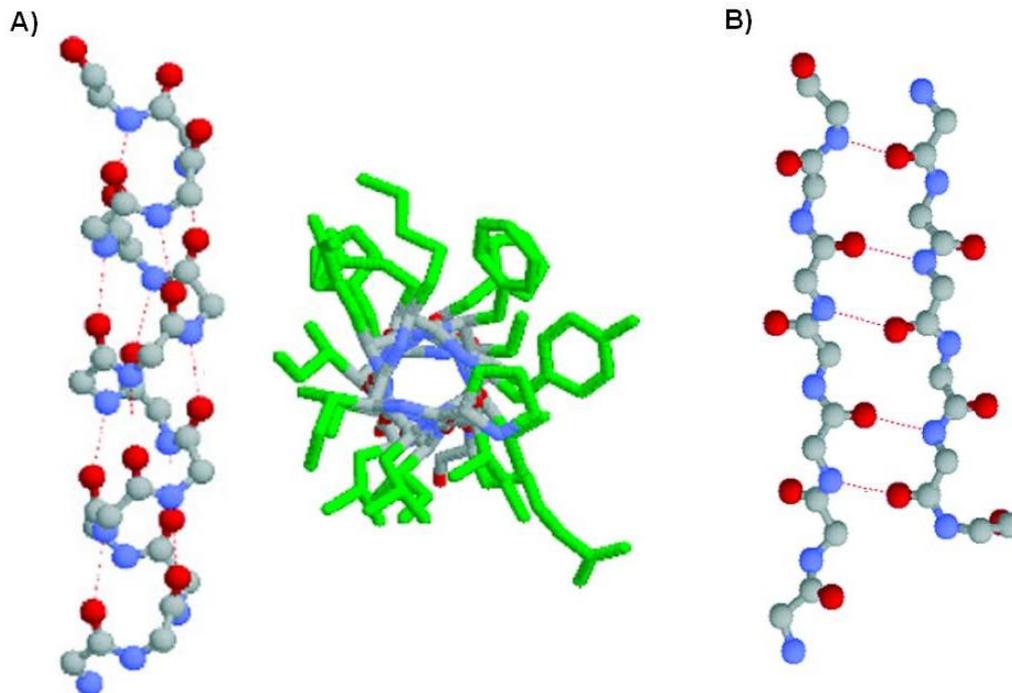


Figura 2. Elementos de estrutura secundária das proteínas. A) À esquerda, vista lateral da hélice α , onde as ligações de hidrogênio são mostradas em linhas pontilhadas. À direita, vista superior da hélice α mostrando a disposição das cadeias laterais (em verde) dos resíduos aminoácidos. B) Estrutura do tipo folha β destacando as ligações de hidrogênio por linhas pontilhadas. Notar a alternância das cadeias laterais dos aminoácidos, que numa visão tridimensional ficariam posicionados acima e abaixo em relação à cadeia principal. Modificado de Withford, 2005.

O processo que leva uma proteína até a sua estrutura tridimensional, passando por todos os passos citados, chama-se enovelamento. Christian Anfinsen, ao estudar o problema da desnaturação de proteínas como um processo reversível sob condições apropriadas, propôs que a estrutura tridimensional nativa de uma proteína corresponde ao mínimo global de energia. Em outras palavras, ele propôs que a estrutura nativa é determinada termodinamicamente, sendo constatado que a cadeia polipeptídica abandona ou retorna facilmente à conformação nativa se as condições do solvente (ambiente) se afastam ou se aproximam das fisiológicas, concluindo que a estrutura nativa é determinada unicamente pela seqüência de aminoácidos da sua cadeia e pelas condições físico-químicas do meio solvente (Harber & Anfisen, 1962; Micheletti *et al.*, 1999). Portanto, a simples troca de um aminoácido na seqüência de uma proteína pode, em muitos casos, ter conseqüências patológicas, como a simples troca de um ácido

glutâmico por uma valina na cadeia β da hemoglobina, provocando a anemia falciforme (Ingram, 1957). Entretanto, como uma cadeia polipeptídica se enovela até sua estrutura correta ainda não é bem estabelecido. Os primeiros trabalhos sugeriram um modelo do tipo dois estados (Lumry & Biltonen, 1966; Tanford, 1968; Pohl, 1969), ou seja, uma proteína só existiria no estado enovelado ou desenovelado. Levinthal (1969) mostrou que o enovelamento de proteínas não deve ocorrer através de uma busca randômica por todo o espaço conformacional, pois levaria um tempo astronômico para uma proteína, mesmo pequena, tentar todas as suas conformações possíveis. Ele sugere então que a proteína percorre um caminho de enovelamento bem definido, composto por estados intermediários que levam até o estado nativo. Mais tarde, no entanto, alguns trabalhos com proteínas pequenas não identificaram a presença de intermediários na via de enovelamento (Jackson & Fersht, 1991; Otzen *et al.*, 1994), mostrando que eles não devem ser um requisito necessário para o enovelamento de todas as proteínas, embora a ausência de intermediários nunca tenha sido provada. Já outras proteínas tiveram seus intermediários da via de enovelamento isolados e caracterizados (Griko *et al.*, 1988; Jennings & Wright, 1993; Ramos *et al.*, 2004). De acordo com Ptitsyn (1991), o enovelamento através de intermediários pode ser dividido em três passos: 1) formação muito rápida de estruturas secundárias; 2) formação do intermediário (glóbulo compacto com estrutura secundária definida, mas sem estrutura terciária rígida); 3) formação da estrutura nativa, responsável pela função.

Em 1995, Baldwin propôs uma nova visão para o enovelamento de proteínas, baseada em teorias de mecânica estatística e estudos de simulação do enovelamento protéico (Bryngelson & Wolynes, 1987; Shakhnovich *et al.*, 1991; Dill *et al.*, 1993). Neste modelo, o processo de enovelamento é visto como um funil tridimensional (Figura 3). No topo do funil temos um grande número de conformações com alta energia, representando o estado desenovelado, e o enovelamento se dá com o afunilamento estrutural e energético, quando o número de conformações possíveis e a energia livre da molécula vão diminuindo até a proteína alcançar o estado nativo, aquele de menor energia livre. Essa nova visão sugere que as proteínas podem percorrer diversos caminhos possíveis para se enovelar, o que explica porque as proteínas geralmente são resistentes às mutações (exceto aquelas mutações que rompem interações essenciais para a manutenção da estrutura nativa), já que quando uma mutação bloqueia uma rota de enovelamento, a proteína pode seguir um caminho alternativo para chegar ao seu estado nativo (Radford *et al.*, 1992). O funil pode ser liso, no caso de enovelamento do tipo dois

estados; ou rugoso, quando apresenta intermediários. Os intermediários são mínimos locais de energia e existe uma discussão se eles desaceleram o enovelamento, pois existiriam vias mais rápidas até o estado nativo (Radford *et al.*, 1992; Sosnick *et al.* 1994), ou se a presença de alguns intermediários poderia acelerar o enovelamento (Wagner & Kiefhaber, 1999). Ainda, algumas vias de enovelamento em um funil podem levar a um vale de baixa energia, superior ao do estado nativo e com uma barreira energética muito alta, prendendo a proteína nessa conformação não nativa, como acontece na formação de agregados irreversíveis e fibrilas amilóides.

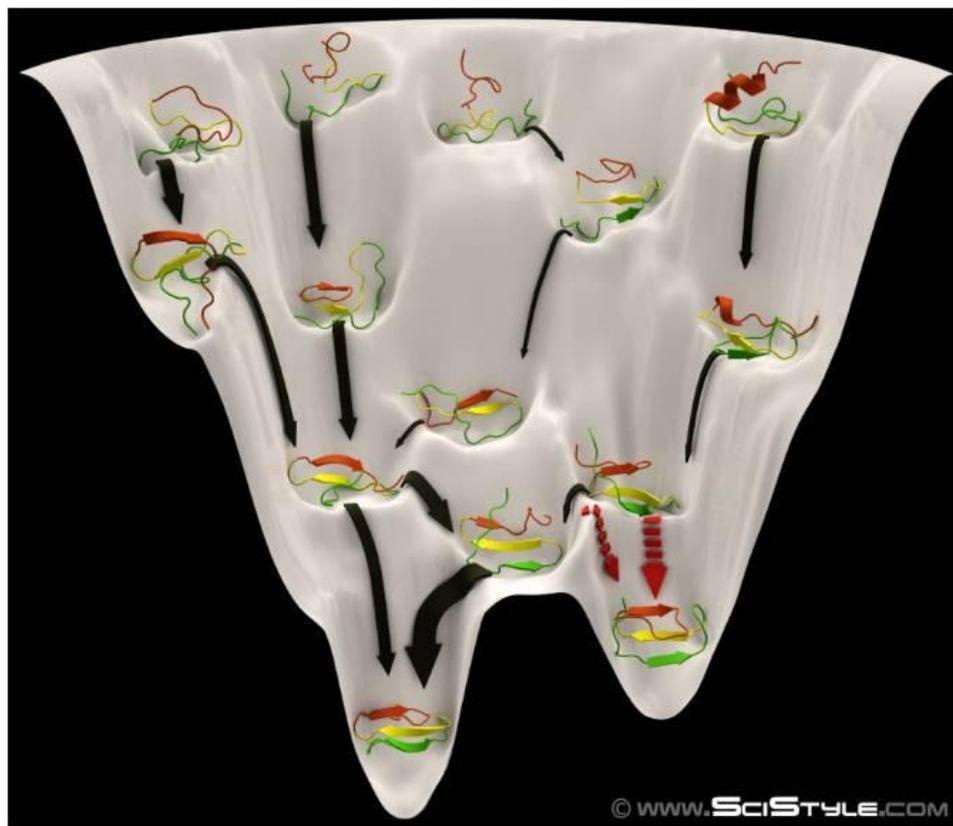


Figura 3. Funil tridimensional do enovelamento de proteínas. No topo do funil, onde a energia livre é maior, há maior número de conformações que podem ser adotadas pela proteína. No entanto, conforme o polipeptídeo vai se enovelando, no modelo de dois estados ou através de intermediários, o número de conformações possíveis diminui concomitante à diminuição da energia livre. Por fim, a estrutura nativa de uma proteína corresponde a conformação de menor energia livre, a extremidade esquerda inferior do funil. Em alguns casos, a proteína alcança uma conformação de baixa energia livre, mas não nativa (extremidade inferior direita do funil, indicada pela seta vermelha tracejada), o que pode resultar na formação de espécies improdutivas e irreversíveis devido a alta barreira energética existente para sair deste estado. Imagem retirada de <http://portfolio.scistyle.com/#296883/Protein-Folding-Funnel>.

Até alguns anos atrás, a formação de agregados era considerada um artefato quando se trabalhava com proteínas, sendo, portanto, o agregado separado da fração solúvel e descartado. Recentemente, ao se estabelecer que doenças amilóides são provocadas pelo enovelamento incorreto e agregação de proteínas que se depositam nos tecidos, é que voltou-se a atenção aos estudos de agregados protéicos (Prusiner, 1982; Thomas *et al.*, 1995; Ramos & Ferreira, 2005).

1.2. O enovelamento de proteínas nas células

O ambiente celular é extremamente complexo, contendo diversos tipos de macromoléculas cuja concentração pode chegar a 400 mg/ml (Ellis, 2001). Em um ambiente tão concentrado se faz necessário um sistema especial para impedir o enovelamento incorreto de proteínas ou associações indevidas entre proteínas parcialmente enoveladas, ou ainda para eliminar agregados irreversíveis que possam se tornar prejudiciais às células.

Existe nas células um elaborado sistema capaz de prevenir o enovelamento incorreto e a agregação de proteínas, composto pelas chaperonas moleculares (Borges & Ramos, 2005; Tirolí-Cepeda & Ramos, 2011). Chaperonas, de uma maneira geral, são proteínas que ligam e estabilizam polipeptídeos, facilitando seu enovelamento correto sem interferir na conformação protéica final (Hendrick & Hartl, 1993; Martin & Hartl, 1997; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). As chaperonas também participam da translocação de proteínas através de membranas (Hartl & Hayer-Hartl, 2002), na entrega de substratos para proteólise (Schirmer *et al.*, 1996) e na recuperação de proteínas agregadas (Sanchez & Lindquist, 1990). As chaperonas moleculares também são chamadas de proteínas de choque-térmico ou Hsp (do inglês, *heat shock protein*), pois sua síntese é aumentada em células submetidas ao estresse térmico. Atualmente, já é estabelecido que estas proteínas respondem também à outros tipos de estresses e muitas delas são expressas constitutivamente (Lindquist & Craig, 1988).

1.2.1. Sistema Hsp70

O sistema Hsp70, essencial em muitos processos celulares, é composto basicamente por três famílias de proteínas: Hsp70, ou DnaK em *E. coli*, e suas co-chaperonas, Hsp40, ou DnaJ em *E. coli*, e GrpE, um fator de troca de nucleotídeos necessário para as Hsp70s de origem procariótica e a Hsp70 mitocondrial (Hartl, 1996). As Hsp70s, com o auxílio de suas co-chaperonas, ligam peptídeos nascentes nos

ribossomos, prevenindo o enovelamento incorreto ou a agregação; auxiliam no processo de translocação de proteínas do citosol para a mitocôndria e retículo endoplasmático; previnem agregação induzida por situações de estresse; recuperam agregados ou os transportam para proteólise (Mayer *et al.*, 2001; Hendrick *et al.*, 1993). Enfim, o sistema Hsp70 pode ser considerado um pivô central que recebe e distribui os substratos (proteínas em via de enovelamento, mal enoveladas ou agregadas) entre as demais famílias de chaperonas moleculares (Borges & Ramos, 2005). As Hsp70s possuem massa molecular de cerca de 70 kDa e são divididas em dois domínios: o domínio de ligação ao nucleotídeo ATP/ADP (DLN), de aproximadamente 45 kDa, com atividade ATPase; e o domínio de ligação ao substrato (DLS), de aproximadamente 25 kDa, capaz de interagir com seqüências de aminoácidos hidrofóbicos.

Estas proteínas podem ainda ser divididas em três subfamílias, de acordo com as propriedades de dissociação de nucleotídeos:

-DnaK: possui alta afinidade por nucleotídeos, necessitando da co-chaperone GrpE para a troca de ADP por ATP. São as Hsp70s procarióticas ou de organelas eucarióticas (Brehmer *et al.*, 2001).

-Hsc70: apresenta uma constante de dissociação por ADP+Pi vinte vezes maior do que a DnaK. Estão presentes no citoplasma de eucariotos e apresentam síntese constitutiva (Brehmer *et al.*, 2001).

-HscA: apresenta uma constante de dissociação por ADP+Pi 700 vezes maior do que a da DnaK e é menos conservada. Pode ser encontrada em procariotos e eucariotos (Brehmer *et al.*, 2001).

O funcionamento do sistema Hsp70 pode ser descrito por um ciclo (Mayer *et al.*, 2001), como mostra a figura 4. O DLS apresenta baixa afinidade por substrato quando o DLN está ligado ao ATP. O substrato, transportado pela Hsp40, liga-se ao DLS e as interação do substrato e da Hsp40 estimulam, concomitantemente, a atividade ATPase da Hsp70 (Laufen *et al.*, 1999). O DLN, ligado ao ADP, provoca mudanças conformacionais no DLS, que passa a ter alta afinidade pelo substrato (Mayer *et al.*, 2001). Algumas Hsp70s, nesta etapa, necessitam de outra co-chaperona para trocar o ADP do DLN por outro ATP, disponibilizando a Hsp70 para um novo ciclo, como é o caso da ação da GrpE sobre a DnaK em *E. coli* (Liberek *et al.*, 1991).

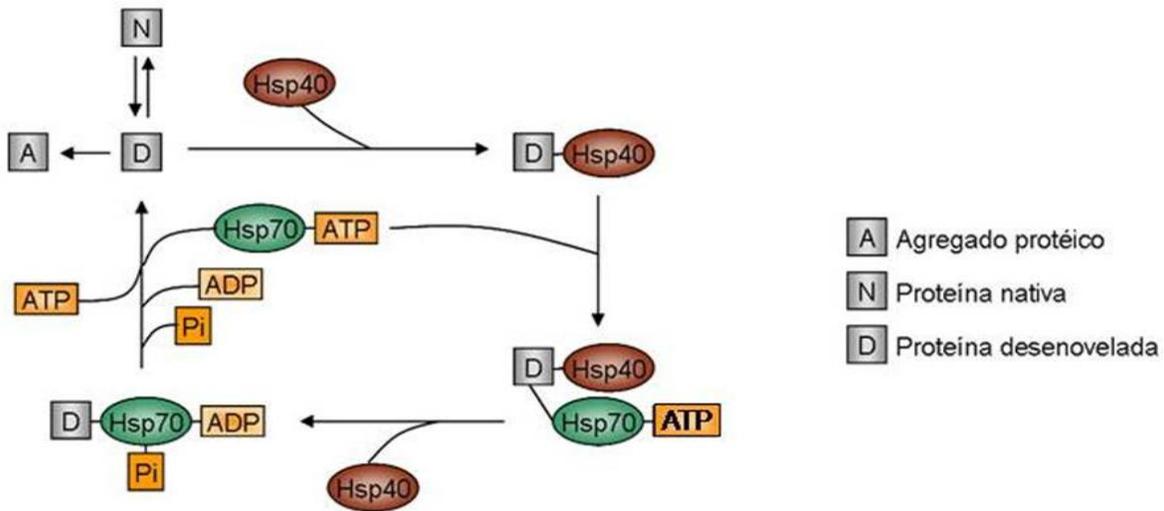


Figura 4. Esquema do ciclo da Hsp70. A proteína desenovelada (D) é ligada à Hsp40, que por sua vez interage com a Hsp70 ligada ao ATP, concomitantemente à entrega do substrato para a Hsp70. Deste modo, a atividade ATPase da Hsp70 é estimulada. Após a conversão de ATP para ADP + Pi pela Hsp70, a co-chaperona Hsp40 se desliga do complexo. A Hsp70 atua no enovelamento da proteína cliente e, através de fatores que estimulam a troca de ADP por ATP, volta a sua forma inicial (ligada a ATP) para iniciar um novo ciclo. Modificado de Cyr, 2008.

1.2.1.1. Hsp40

As Hsp40s são proteínas de aproximadamente 40 kDa e definidas pela presença de um domínio altamente conservado, o domínio J, com cerca de 70 resíduos de aminoácidos, formando quatro hélices nomeadas de hélices I até IV (Hill *et al.*, 1995). Entre as hélices II e III existe uma alça com a seqüência histidina/prolina/ácido aspártico (HPD) altamente conservada (Qian *et al.*, 1996), essencial para a interação com a Hsp70 (Greene *et al.*, 1998). As Hsp40s são consideradas co-chaperonas das Hsp70s pela capacidade de ligar substratos e entregá-los à Hsp70, bem como estimular sua atividade ATPase.

A família de proteínas Hsp40 é bastante diversa e uma categorização bastante aceita propõe a divisão em três grupos (figura 5), baseado na composição dos domínios (Cheetham & Caplan, 1998). As Hsp40s do tipo I apresentam, além do domínio J, uma região desestruturada e rica em glicinas e fenilalaninas, que parece funcionar como uma dobradiça entre o domínio J e o domínio rico em cisteínas. Este último é formado por quatro repetições do motivo CxxCxGxC, onde x representa qualquer resíduo de aminoácido, e se enovela de maneira dependente de zinco, ligando um íon zinco a cada

dois motivos (Szabo *et al.*, 1996; Banecki *et al.*, 1996). Por fim, há o domínio C-terminal, formado basicamente por folhas β e responsável pela dimerização da proteína e interação da chaperona com o substrato, assim como o domínio rico em cisteínas (Li *et al.*, 2003). Este domínio C-terminal pode ser dividido nos subdomínios C-terminal I (CTDI) e II (CTDII). As Hsp40s do tipo II não apresentam o domínio rico em cisteínas, possuindo em seu lugar uma região rica em resíduos de glicina e metionina. Por último, Hsp40s do tipo III apresentam apenas o domínio J, sem posição definida. Hsp40s dos tipos I e II se comportam como dímeros, mas diferenças na composição de domínios fazem com que o posicionamento relativo dos domínios J seja distinto, como mostra a figura 6 (Borges *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008). Ainda, as regiões centrais das Hsp40 tipo I e II são responsáveis por controlar a distribuição espacial do domínio J e a especificidade funcional aos substratos para cada tipo de Hsp40, como mostrado por Ramos *et al.* (2008) e Fan *et al.* (2004) em experimentos com mutantes de permutação dos domínios das Hsp40s. Quando a região central de Sis1 (Figura 7), uma Hsp40 tipo II de levedura, é substituída pela região central de Ydj1 (Figura 7), uma Hsp40 tipo I de levedura, a posição relativa dos domínios J do dímero é semelhante àquela encontrada para Ydj1 selvagem (Figura 6B), assim como a atividade funcional. De igual maneira, quando a região central de Ydj1 é substituída pela região central de Sis1, a distribuição espacial dos domínios J e a atividade funcional são muito parecidas com aquelas encontradas para Sis1 selvagem (Figura 6B).

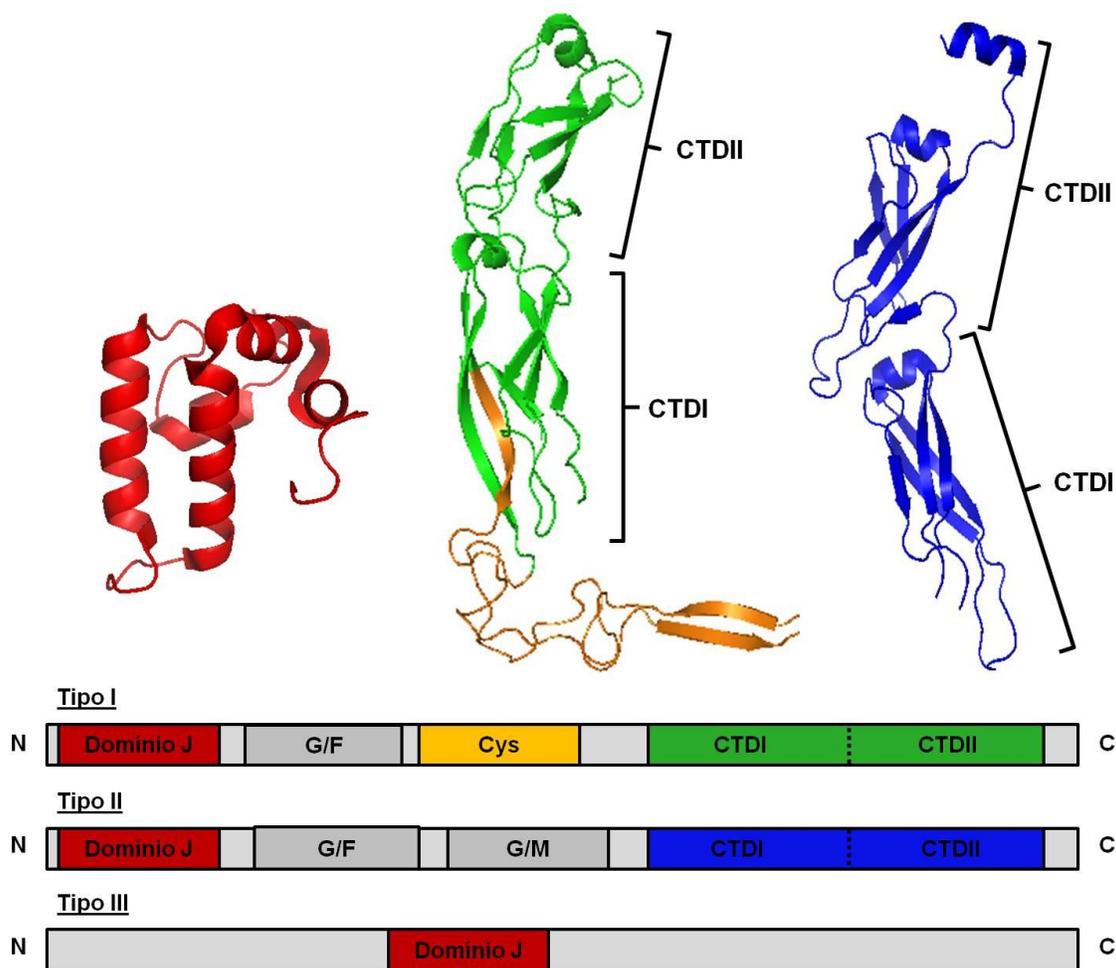


Figura 5. Estrutura e distribuição dos domínios nos diferentes tipos de Hsp40. As Hsp40s do tipo I e II apresentam um domínio J no N-terminal (em vermelho, ver estrutura), uma região desestruturada e rica em aminoácidos glicina e fenilalanina (G/F, em cinza) e um domínio C-terminal de dimerização e ligação ao substrato (estruturas em verde, para o tipo I, e em azul, para o tipo II), que pode ser dividido nos subdomínios I e II, ou CTDI e CTDII, respectivamente. As Hsp40s do tipo I contém uma região rica em cisteína (Cys, estrutura em amarelo), com os motivos CxxCxGxC, diferentemente das Hsp40s tipo II que possuem uma região rica em glicinas e metioninas (G/M, em cinza). As Hsp40s do tipo III apresentam o domínio J localizado em qualquer parte da cadeia polipeptídica. (PDB - Domínio J Sis1: 2O37; C-terminal e região rica em cisteínas da Ydj1: 1NLT; C-terminal da Hdj1: 2QLD).

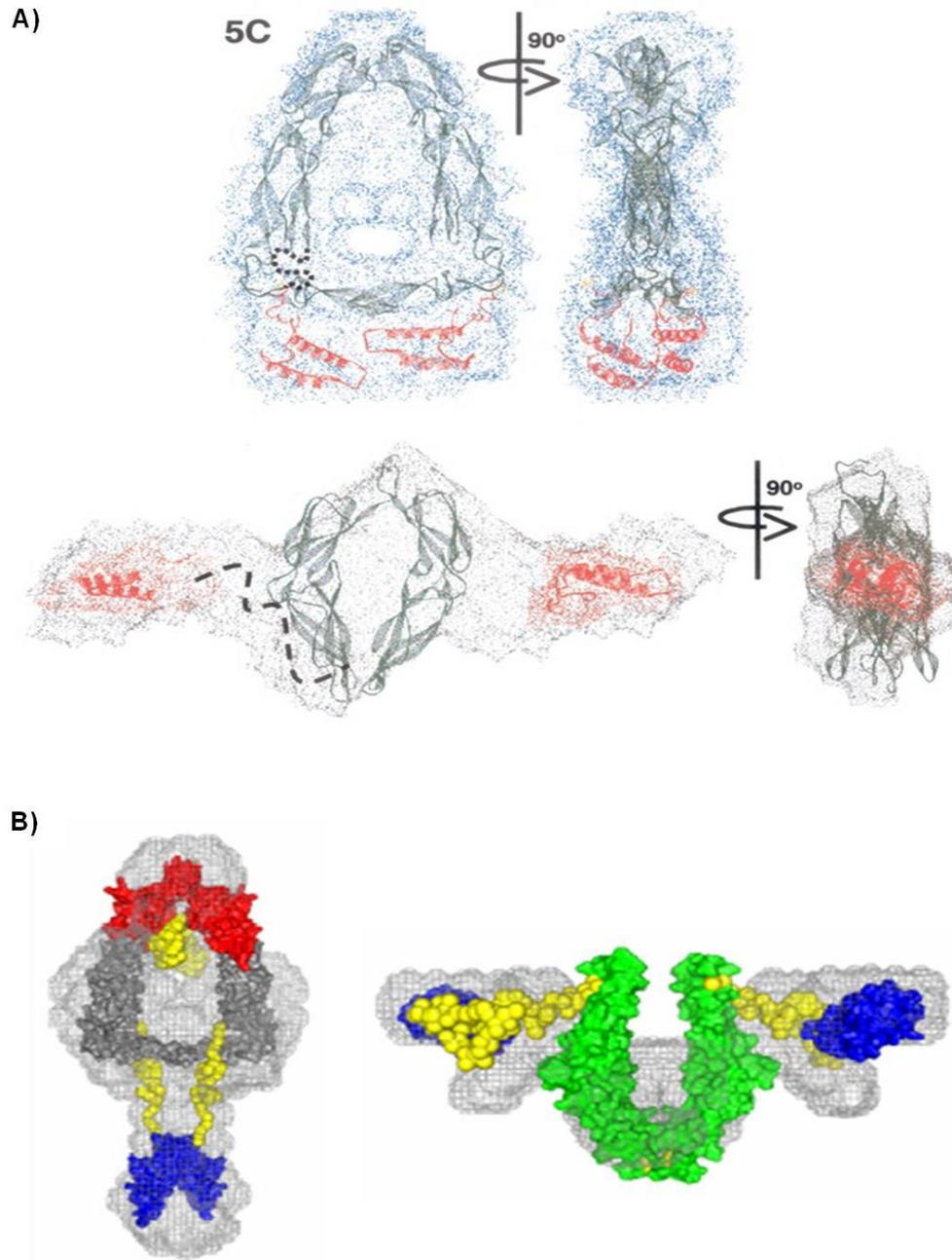


Figura 6. Modelo das Hsp40s determinado por SAXS. A) Modelo do envelope de Hsp40s humanas do tipo I (acima) e II (abaixo). Em vermelho está destacado o domínio J. B) Envelopes das Hsp40s de levedura do tipo I, Ydj1 (à esquerda), e do tipo II, Sis1 (à direita), onde o domínio J está em azul. Notar a distinta localização espacial do domínio J, que é diferente entre os dois tipos de Hsp40, mas conservado nas proteínas de diferentes organismos. Modificado de Borges *et al.*, 2005 e Ramos *et al.*, 2008.

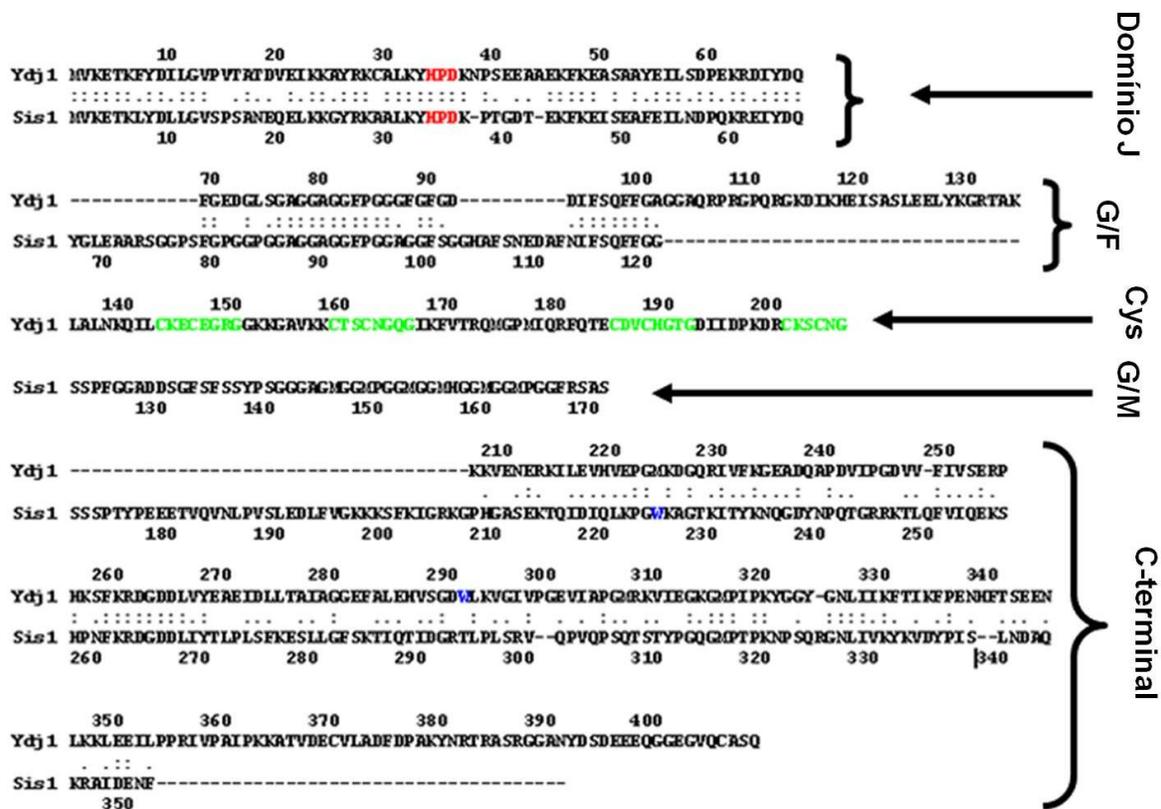


Figura 7. Estrutura primária, distribuição de domínios e alinhamento das Hsp40s modelos de levedura, Sis1 e Ydj1. As chaperonas moleculares Hsp40 de levedura, Ydj1 e Sis1 (representantes das Hsp40s do tipo I e do tipo II, respectivamente) apresentam diferenças em suas estruturas primárias, que podem ser visualizadas em detalhes no alinhamento. Os módulos centrais na estrutura primária destas proteínas, compreendidos pelo domínio rico em cisteína, em Ydj1, domínio G/M, em Sis1, e subdomínio CTDI para ambas as proteínas, parecem responsáveis pela posição espacial relativa do domínio J e especificidade pelo substrato dentre estes dois diferentes tipos de Hsp40, como mostrado por Fan *et al.* (2004) e Ramos *et al.* (2008). Em vermelho, motivo HPD do domínio J; em verde, motivos CxxCxGxC da região rica em resíduos de cisteína; e em azul, resíduos de triptofano encontrados na estrutura primária das proteínas. Modificado de Ramos *et al.*, 2008.

As Hsp40s tipo II trabalham de uma maneira dependente da Hsp70, no entanto há evidências de que as Hsp40s tipo I podem funcionar como chaperonas por si só, graças à presença do domínio de ligação ao zinco (Langer *et al.*, 1992; Cyr, 1995; Prip-Buus *et al.*, 1996). Embora o enovelamento não ocorra na ausência de Hsp70 (Szabo *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1995), essas Hsp40 são capazes de manter o substrato em uma conformação capaz de ser reenovelado, e por isso é considerada uma “holdase”, ou seja, ligam

peptídeos parcialmente enovelados, prevenindo a agregação, mas sem auxiliar no reenovelamento. As chaperonas do tipo “holdases” são, geralmente, independentes de ATP e entregam o substrato para chaperonas do tipo “foldases” ou para o sistema proteolítico (Beissinger & Buchner, 1998). A atividade de reenovelamento é realizada pelas chaperonas do tipo “foldases”, que funcionam de maneira dependente de ATP, como por exemplo, a família Hsp70 (Beissinger & Buchner, 1998).

A família das Hsp40 é muito mais numerosa e diversa em estrutura e função do que a família das Hsp70 e membros dessa última estão geralmente co-localizados com múltiplos membros das Hsp40. Assim, uma única forma de Hsp70 pode interagir com diferentes tipos de Hsp40, gerando pares específicos Hsp70:Hsp40 com diferentes atividades e em locais distintos na célula (Caplan *et al.*, 1992; Ungermann *et al.*, 1994; Meacham *et al.*, 1999; Gall *et al.*, 2000). De uma maneira geral, as Hsp40 agem como um fator de seleção de substratos para as Hsp70 (Rudiger *et al.*, 2001).

1.3. Agregados amilóides

O termo amilóide foi utilizado pela primeira vez por Rudolph Virchow, em 1854, devido à capacidade do material se corar em azul quando tratado com iodo, semelhante ao que acontece com o amido vegetal. Cinco anos mais tarde, Friedreich e Kekule mostraram que aquele material amilóide era composto por proteínas e não por carboidratos. Somente em 1980, Glenner demonstrou a presença de fibrilas de proteínas com estrutura em folha beta pregueada, estabelecendo o conceito de beta-fibriloses.

As fibrilas compartilham características estruturais (Sunde & Blake, 1997) e mecanismos de toxicidade (Caughey & Lansbury, 2003). São longas, não ramificadas, compostas por folhas β orientadas perpendicularmente ao eixo da fibra (Sunde & Blake, 1997; Jiménez *et al.*, 1999; Petkova *et al.*, 2002), como mostra a figura 8. Tal organização estrutural faz com que as fibrilas amilóides liguem corantes específicos, como vermelho de Congo (Cohen, 1965) e tioflavina T (Vassar & Culling, 1959), além de um padrão de difração de raios-X característico, no qual se pode observar duas reflexões, sendo uma centrada aproximadamente em 4,7 Å (com poucas variações), indicativa da distância entre as ligações de hidrogênio que ocorrem entre as fitas- β de cada folha- β (Bonar *et al.*, 1969); e outra mais difusa, centrada aproximadamente em 9,5-11 Å, indicativa da distância entre as folhas- β que compõem a fibrila amilóide (Sunde *et al.*, 1997), e que pode variar de acordo com a composição das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da proteína (Arnott *et al.*, 1967).

Alguns trabalhos têm sugerido que a capacidade de formar fibrilas seja uma característica de qualquer cadeia polipeptídica (Chiti *et al.*, 1999). Embora as propriedades de formação de fibrila pareçam genéricas, a propensão com que cada cadeia polipeptídica venha a se converter em tal estrutura varia muito dependendo das características físico-químicas do polipeptídeo, como distribuição de cargas, hidrofobicidade e estrutura secundária preferencial (DuBay *et al.*, 2004; Linding *et al.*, 2004), e também das condições às quais a proteína é submetida. Situações como baixo pH (Lai *et al.*, 1996) ou alto (Correa & Ramos, 2009), aumento de temperatura (Krebs, 2000) ou adição de baixas concentrações de denaturantes químicos (Higurashi *et al.*, 2005) levam uma proteína até um estado parcialmente desenovelado, aumentando a chance de interações não nativas.

A amiloidogênese é um processo típico de nucleação, como acontece na cristalização, ou seja, apresenta uma fase lag, provavelmente porque a associação inicial das cadeias polipeptídicas é um processo energeticamente desfavorável. Mas, uma vez formado um núcleo ou um oligômero, a adição de novos polipeptídeos é termodinamicamente favorável, tornando essa segunda fase mais rápida (Bader *et al.* 2006). Portanto, a fase lag pode ser eliminada pela adição de fibrilas pré-formadas à solução, mecanismo que recebe o nome de semeadura (Harper & Lansbury, 1997), assim como acontece no processo de cristalização. Mais especificamente, a primeira fase do processo amiloidogênico envolve a formação de oligômeros solúveis semelhantes a micelas quando vistos por microscopia eletrônica e são chamados de agregados pré-fibrilares.

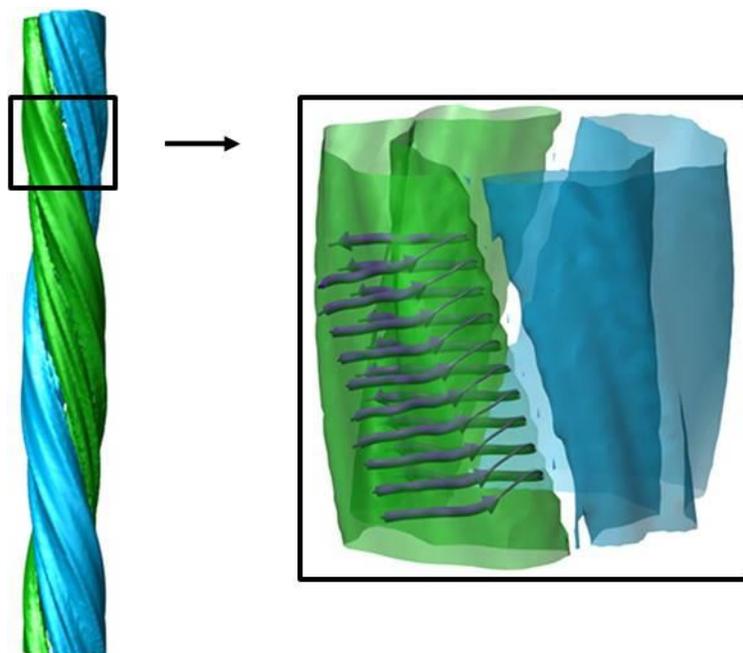


Figura 8. Modelo de fibrila amilóide gerado a partir de criomicroscopia eletrônica. À esquerda, modelo de uma fibrila amilóide madura construído a partir do mapa de densidade obtido por criomicroscopia eletrônica. À direita, ampliação do modelo de fibrila amilóide mostrando a disposição das folhas β na estrutura da fibra. Notar as folhas β orientadas perpendicularmente e se torcendo em relação ao eixo da fibrila. (Modificado de Zhang *et al.*, 2009)

1.4. Justificativa e resultados prévios relacionados ao estudo das Hsp40s de cana-de-açúcar e de levedura.

Primeiramente, propomos neste trabalho a caracterização inédita de uma Hsp40 de cana-de-açúcar. Plantas são organismos sésseis que são acometidos por uma ampla variedade de estresses (térmico, hídrico, químico, etc.), os quais podem agir induzindo o enovelamento incorreto, desenovelamento e agregação protéica. Sendo assim, o entendimento do mecanismo das chaperonas moleculares nestes organismos torna-se importante e interessante. O estudo de chaperonas moleculares em cana-de-açúcar, em especial da família Hsp40, pode ser justificado pela importância destas proteínas. Em 2001, Borges *et al.* observaram que 1,8% dos genes expressos em cana-de-açúcar codificam para chaperonas moleculares e deste total, 43% são respectivos à Hsp70 e co-chaperonas, como a Hsp40) e pelo valor econômico e biotecnológico que o organismo em questão possui, além da ausência de trabalhos relativos a chaperonas moleculares, em especial o sistema Hsp70-Hsp40, em cana-de-açúcar.

Segundo, neste trabalho também é proposta a continuação de um estudo da relação estrutura-função de chaperonas moleculares de levedura, no caso uma Hsp40 tipo II, nomeada Sis1 (Figura 9). Sis1 é uma proteína essencial, sendo que a deleção do gene *sis1* é letal para a levedura. No entanto, alguns polipeptídios truncados têm a capacidade de complementar este fenótipo: o domínio J de Sis1 conectado ao domínio G/F e mutantes de Sis1 onde o domínio G/F foi deletado, mas o domínio G/M mantido (Yan & Craig, 1999). Como citado anteriormente e aqui descrito em mais detalhes, em 2004, Fan *et al.* estudaram dois mutantes de permutação da Hsp40 de levedura: o primeiro, chamado SYS, formado pelos domínios J e G/F da Sis1 (S), domínio rico em resíduos de cisteína e subdomínio CTDI da Ydj1 (Y), e CTDII da Sis1 (S); já o segundo mutante, YSY, possuía os domínios J e G/F da Ydj1 (Y), o domínios G/M e o subdomínio CTDI da Sis1 (S) e o subdomínio CTDII da Ydj1 (Y). Interessantemente, estes mutantes apresentaram suas atividades chaperona de Hsp40 trocadas, ou seja, SYS assemelhou-se à Ydj1 e YSY à Sis1, sugerindo que as regiões centrais dos tipos I e II de Hsp40 controlam a especificidade destas chaperonas moleculares aos seus substratos. Em 2008, Ramos *et al.* mostraram que nestes mutantes quiméricos os módulos centrais na estrutura das Hsp40s de levedura são responsáveis pelas diferentes localizações espaciais dos domínios J entre as Hsp40s tipo I e II.

Para entender melhor a relevância das regiões centrais na estrutura-função das Hsp40s tipo II, dois mutantes de deleção de Sis1 foram construídos (Figura 9): Sis1 $\Delta_{124-174}$, que possui a deleção do domínio G/M, e Sis1 $\Delta_{121-257}$, o qual tem o domínio G/M e subdomínio CTDI ausentes. Resultados anteriores não publicados, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa e por meio de comunicação pessoal com outros grupos colaboradores, revelaram algumas características estruturais e funcionais destes mutantes comparados a proteína Sis1 selvagem. As deleções do domínio G/M e domínio G/M + subdomínio CTDI diminuíram, aproximadamente, em 50% a habilidade de Sis1 ligar proteínas clientes, enquanto que a interação do domínio J com a Hsp70 parece não ter sofrido efeito. A ligação de Sis1 a Hsp70 também foi testada e a deleção do domínio G/M parece não ter causado efeito nesta interação. Já a deleção do domínio G/M + subdomínio CTDI aboliu cerca de 50% da interação Sis1-Hsp70. Em ensaios para avaliar o reenovelamento da luciferase desnaturada, Sis1 $\Delta_{124-174}$ perdeu 40% de sua habilidade de auxiliar a Hsp70 no reenovelamento. No mutante Sis1 $\Delta_{121-257}$, a habilidade de cooperar com a Hsp70 foi ausente. Em conjunto, estes resultados sugerem que: 1) a deleção do domínio G/M de Sis1 afeta a sua habilidade de ligar a luciferase desnaturada, mas não tem efeito na

regulação da atividade ATPase da Hsp70, sugerindo que o domínio J mantém sua correta conformação e funcionalidade; 2) o domínio G/M e o subdomínio CTDI executam papéis essenciais na seleção do substrato e entrega para a Hsp70. A ausência da região G/M e CTDI poderia afetar a interação de Sis1 com o substrato e/ou a estrutura de Sis1 $\Delta_{121-257}$ é menor que Sis1, prejudicando sua interação com a Hsp70 e posterior transferência do substrato; 3) o domínio G/M pode estar envolvido na ligação do substrato e/ou na transferência para a Hsp70, pois localiza-se adjacente a fenda hidrofóbica no subdomínio CTDI e é rico em resíduos de metionina, um aminoácido que possui cadeia lateral hidrofóbica, o que pode auxiliar na formação de um sítio funcional de ligação ao substrato. Em relação à estrutura, as proteínas mutantes apresentaram-se bem enoveladas, diméricas e com médio grau de empacotamento, assim como Sis1. Modelos de baixa resolução obtidos para Sis1 e mutantes mostraram que a deleção do domínio G/M somente ou com a ausência do subdomínio CTDI causaram pequeno impacto na estrutura geral de Sis1. No entanto, estes domínios centrais são importantes para a ligação ao substrato e manutenção do domínio J em posições relativas específicas. Em experimentos de estabilidade térmica, Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ apresentaram perfis de desenovelamento muito similares, ambas com duas transições sobrepostas. Este resultado poderia ser esperado, visto que a proteína mutante difere da selvagem pela ausência de 50 resíduos de aminoácidos, a região G/M, na porção central da estrutura primária de Sis1. Em contraste, observaram-se para Sis1 $\Delta_{121-257}$, uma proteína estruturalmente mais distinta de Sis1, duas transições bem separadas. Em estudos utilizando dicroísmo circular como sonda e um agente químico como desnaturante, Sis1 $\Delta_{121-257}$ desenovelou em menor concentração de uréia que Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$. Experimentos de ultracentrifugação analítica mostraram que Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, em resposta a concentrações crescentes de uréia, apresentaram efeitos similares em seus coeficientes de sedimentação, ao passo que Sis1 $\Delta_{121-257}$ foi diferente. Variações no coeficiente de sedimentação podem ser relacionadas a mudanças conformacionais causadas por ligantes, temperatura, pH e mudanças no estado oligomérico das proteínas, entre outros. Como a uréia é um agente desnaturante, estes resultados sugeriram que dímeros de Sis1 $\Delta_{121-257}$ sofreram dissociação em monômeros em concentrações menores de uréia que Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$. Com o intuito de gerar dados para corroborar com os experimentos de ultracentrifugação analítica e para identificar possíveis diferenças estruturais entre Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, um mutante com características

muito similares àquelas da proteína selvagem, propomos utilizar outras técnicas biofísicas para enriquecer o estudo da relação estrutura-função desta Hsp40 tipo II de levedura.

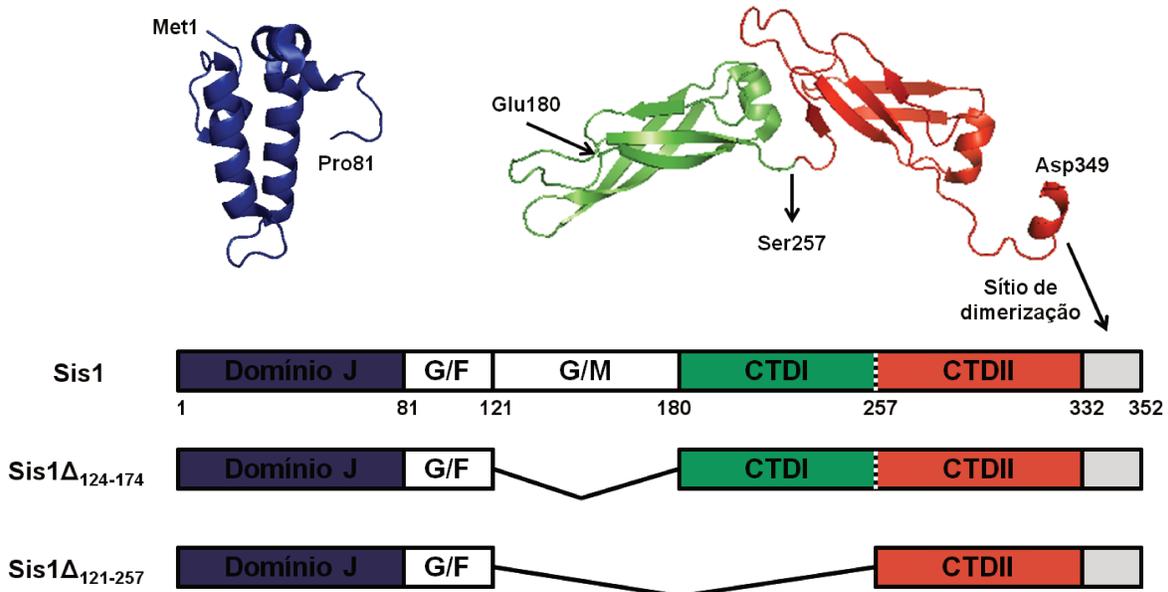


Figura 9. Distribuição de domínios na estrutura de Sis1 selvagem e de seus mutantes Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$. Para o estudo da relação estrutura-função de Sis1, uma Hsp40 tipo II de levedura, foram construídos dois mutantes de deleção: Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$. O primeiro mutante possui uma deleção de 50 resíduos de aminoácidos, correspondentes ao domínio (G/M), enquanto que o segundo mutante possui 130 resíduos de aminoácidos, respectivos ao G/M e ao subdomínio CTDI do C-terminal, deletados. A estrutura cristalográfica do domínio J (azul; PDB: 2O37) e domínio C-terminal (PDB: 1C3G), subdomínios CTDI (verde) e CTDII (vermelho), bem como os resíduos de aminoácidos de início e término de cada domínio na estrutura primária de Sis1, são mostrados. Os domínios G/F e G/M não possuem estrutura cristalográfica resolvida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Caracterizar e estudar a relação estrutura-função das chaperonas moleculares Hsp40 por meio de técnicas de biologia molecular, bioquímica e biofísica molecular. Para isto, uma Hsp40 de cana-de-açúcar (SHsp40) e uma Hsp40 de levedura, Sis1, incluindo seus mutantes de deleção, foram utilizadas neste trabalho.

2.2. Objetivos específicos

A primeira parte deste trabalho se resume na caracterização inicial de uma Hsp40 de cana-de-açúcar, identificada pela primeira vez em nosso grupo e cujo o presente trabalho caracterizou como sendo do tipo I. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- A partir de ferramentas de bioinformática, determinar a qual tipo de Hsp40 a SHsp40 pertence.
- Realizar a expressão heteróloga e purificar a proteína recombinante.
- Analisar a atividade chaperona da SHsp40.
- Caracterizar o estado oligomérico, forma e estabilidade desta proteína por meio de técnicas espectroscópicas e hidrodinâmicas.

A segunda parte deste trabalho dedicou-se a complementar os estudos de uma Hsp40 tipo II de levedura (Sis1) e seus mutantes de deleção, cuja caracterização inicial, descrita acima, foi realizada em nosso grupo de pesquisa e por grupos colaboradores. Neste contexto, as metas estabelecidas foram:

- Complementar o estudo relativo à conformação da Sis1 selvagem e seu mutante $Sis1\Delta_{124-174}$ para identificar possíveis diferenças estruturais causadas pela deleção do domínio G/M.
- Estudar a estabilidade da proteína selvagem (Sis1) e de seus mutantes, $Sis1\Delta_{124-174}$ e $Sis1\Delta_{121-257}$, analisando o estado oligomérico das proteínas em diferentes concentrações de agente desnaturante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sistema pET e vetores para expressão de proteínas recombinantes

Para a produção de proteínas recombinantes, foi utilizado o sistema pET (Studier *et al.*, 1990). Para tanto, os cDNAs de interesse foram inseridos em vetores de expressão que estão sob o controle do sistema T7, no qual o cDNA de interesse é clonado sob o controle do promotor T7, como mostra a figura 10. Devido a alta especificidade deste promotor, a expressão do cDNA de interesse somente irá ocorrer quando a T7 RNA polimerase do vírus DE3 estiver presente. As cepas de *E. coli* BL21 (DE3) possuem, integradas em seu cromossomo, o prófago do bacteriófago DE3, que é lisogênico. No prófago, a expressão da T7 RNA polimerase (gene 1 da T7) está sob o controle do promotor lacUV5 do operon *lac*, que é mantido reprimido na presença de glicose e na ausência de 1,6-alolactose, indutor natural e derivado da lactose. O produto do gene *lac I*, repressor que, quando ligado ao operador *lac o* (presente no prófago DE3 e no vetor), impede a expressão da T7 RNA polimerase e da proteína de interesse. Entretanto, quando é acrescentado IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo), um análogo da 1,6-alolactose, o repressor se desliga do operador e permite a expressão da T7 RNA polimerase do bacteriófago DE3 e sua atividade de transcrição em cima do cDNA de interesse clonado em vetor pET. Como a RNA polimerase do bacteriófago tem uma eficiência cinco vezes maior do que a da bactéria, a proteína de interesse é produzida em grande quantidade, sendo a maquinaria de síntese protéica bacteriana praticamente toda recrutada para tal finalidade.

O gene que codifica para a SHsp40 foi clonado em vetor pET28a, que permite que a proteína de interesse seja expressa fusionada a uma cauda de hexa-histidina (HIS₆) em seu N-terminal para facilitar a purificação. Esta cauda de hexa-histidina é composta por 20 aminoácidos (MGSSHHHHHSSGLVPRGSH) e apresenta um sítio de clivagem para a protease trombina, para casos em que a cauda necessite ser removida.

Os genes codificantes para Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$ foram clonados em vetor pET11a e fornecidas pelo colaborador do grupo, da universidade da Carolina do Norte. Este vetor foi utilizado para expressar as proteínas recombinantes sem que houvesse fusão de qualquer sequência de aminoácidos àquelas das proteínas.

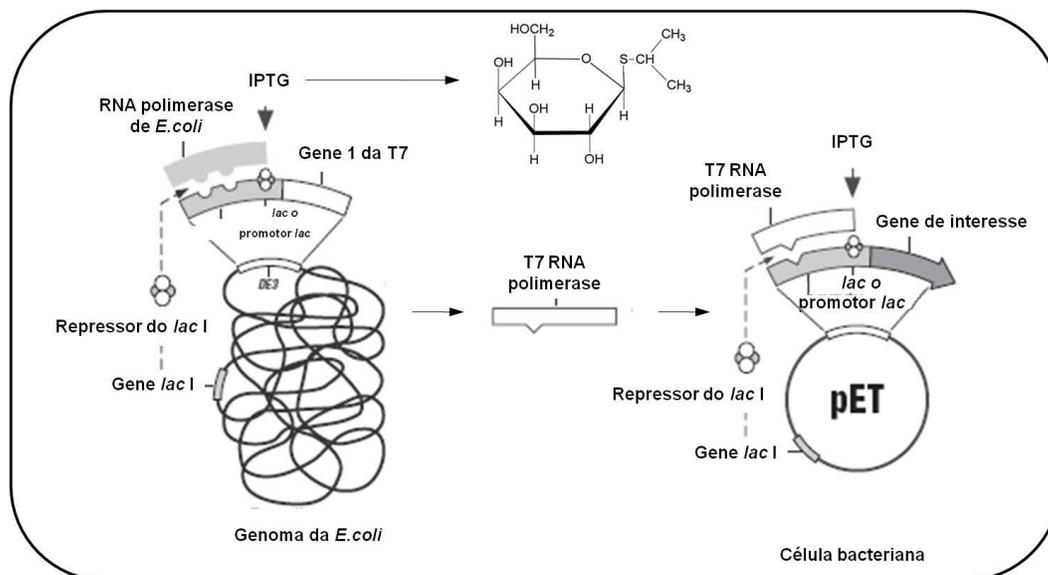


Figura 10. Esquema ilustrativo do sistema pET. No cromossomo da célula bacteriana *E. coli* BI21(DE3) está integrado o gene da T7 RNA polimerase (gene 1 da T7) do bacteriófago DE3, controlado pelo promotor lacUV5 do operon *lac o*, e o gene *lac I*, cujo produto inibe o promotor do *lac o*. No vetor pET, o cDNA de interesse é mantido sob controle do promotor T7 dentro do operador *lac o*, que é também regulado pelo produto do gene *lac I*. Quando adicionado IPTG ao meio de cultura da bactéria, o produto do gene *lac I* é inibido, se desligando do promotor do operador *lac o*, presente tanto no cromossomo quanto no vetor pET, permitindo a expressão da T7 RNA polimerase viral, que se liga ao seu promotor presente no vetor pET realizando a expressão da proteína de interesse codificada pelo cDNA clonado. Ilustração modificada do manual do sistema pET (Novagen).

3.2. Linhagens de bactérias

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas as seguintes linhagens de *E. coli*:

DH5 α (Hanahan, 1983) (Invitrogen) – Destinada a multiplicação e manutenção de vetores plasmidiais.

BI21(DE3) (Stratagene) – Usada para expressão de proteínas recombinantes, esta linhagem apresenta a deleção da protease *lon* e da protease de membrana externa *ompT*, que geralmente degradam proteínas durante a purificação (Grodberg & Dunn, 1988). Outra característica da linhagem é o gene que codifica para a enzima T7 RNA polimerase, controlado pelo promotor lacUV5 que responde à adição de IPTG. O sistema permite altos

níveis de expressão de proteína cujo respectivo cDNA está clonado em vetor que apresenta o promotor T7.

BI21(DE3) pLysS (Stratagene) – Apresenta as mesmas características da linhagem BI21(DE3), porém possui, adicionalmente, a expressão aumentada da lisozima T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase, eliminando a expressão basal de genes sob o controle do promotor T7 (Zhang & Studier, 1997). Esta linhagem, resistente a cloranfenicol, é útil para a expressão de proteínas tóxicas para a bactéria.

BI21(DE3) pRARE (Novagen) – Semelhante a BI21(DE3), porém apresenta o plasmídio pRARE que, além de conferir resistência a cloranfenicol à bactéria, codifica tRNAs para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA, que são raramente usados em *E.coli*.

3.3. Transformação de bactérias

Para amplificação dos vetores plasmidiais, bem como para a utilização destes vetores nos procedimentos de expressão de proteínas recombinantes, foram utilizadas as diferentes linhagens de *E.coli* descritas. Independente da linhagem, as bactérias receberam os plasmídios, ou seja, foram transformadas, seguindo o procedimento de transformação por choque térmico do laboratório. O protocolo consistiu em incubar em gelo, por 30 minutos, a suspensão de bactérias competentes com o plasmídio desejado e posterior submissão das bactérias ao choque térmico na temperatura de 42°C, por 1 minuto e 30 segundos. Uma nova incubação das bactérias em gelo foi realizada, por cerca de 1 minuto, e 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) adicionado às bactérias, que foram incubadas em mesa agitadora (37°C, 200 ciclos/minuto) por 1 hora. Em seguida, espalhou-se 100 µL da suspensão de bactérias em placa de meio sólido LB/Ágar, que foram incubadas por 16-18 horas em estufa a 37°C para crescimento dos microrganismos.

3.4. Meios de cultura

As preparações e cultivos das bactérias foram realizados em meio de cultura Luria-Bertani (LB). A composição dos meio LB sólido e líquido, bem como os passos onde foram utilizados, seguem descritos abaixo.

Meio LB líquido: Utilizado para culturas de bactérias com finalidade de amplificar o DNA plasmidial de interesse e para indução da expressão de proteínas recombinantes.

Composição:

1% de peptona bacteriológica (m/v)

0,5% de extrato de levedura (m/v)

1% de cloreto de sódio (m/v)

Água ultra-pura

Meio LB-Ágar (sólido): Utilizado para o crescimento de bactérias em placa, geralmente após procedimentos de transformação.

Composição:

1,5% de Ágar bacteriológico (m/v)

1% de peptona bacteriológica (m/v)

0,5% de extrato de levedura (m/v)

1% de cloreto de sódio (m/v)

Água ultra-pura

Aos meios de cultura, quando necessário a seleção de bactérias com plasmídeo contendo o cDNA da proteína de interesse, foram adicionados antibióticos nas concentrações de 25 µg/mL para canamicina e 50 µg/mL para cloranfenicol e ampicilina.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio

O SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), é uma importante técnica eletroforética de separação baseada na filtração em gel e na migração de proteínas carregadas frente a um campo elétrico (Nelson & Cox, 2004; Voet & Voet, 2006). Esta separação se dá em uma malha de poliacrilamida e geralmente utiliza o forte detergente aniônico SDS, um agente redutor e calor para desnaturar proteínas (Sambrook *et al.*, 1989). Os polipeptídeos ligam-se ao SDS independente da sequência, em uma proporção de 1,4 g de detergente para 1 g de proteína, e tornam-se negativamente carregados, sendo separados quase que exclusivamente pelas suas massas, com proteínas de massas menores migrando mais rápido que proteínas maiores (Sambrook *et al.*, 1989; Nelson & Cox, 2004). Após a eletroforese, o corante azul de coomassie, que se liga aos resíduos básicos de arginina,

lisina e histidina das proteínas, mas não ao gel, é utilizado para a visualização do resultado (Nelson & Cox, 2004).

Para a realização do SDS-PAGE, as amostras de proteínas foram diluídas em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 100 mM de DTT, 2% de SDS, 0,1% de azul de bromofenol e 10% de glicerol) e fervidas por 5 minutos. Estas amostras, assim como um padrão composto de proteínas com respectivas massas moleculares conhecidas, foram aplicados em gel de empilhamento (5%) seguido de um gel de separação com concentração de 10% ou 12% da mistura acrilamida 29% / bis-acrilamida 1%, dependendo da faixa de separação desejada. Para a corrida, foi utilizado o tampão 25 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM de glicina e 0,1% de SDS em cuba de eletroforese, com voltagem constante de 200 volts. Ao término da eletroforese, o gel foi corado em solução 0,25% de azul de coomassie R250 diluído em etanol, ácido acético e água, na respectiva proporção de 5:1:15 (v/v/v), e descorado em solução de etanol, ácido acético e água (proporção 3:2:35, v/v/v).

3.6. Soluções tampão para purificação de proteínas

Durante o desenvolvimento deste trabalho, diferentes tampões foram utilizados para a purificação das proteínas recombinantes produzidas. Abaixo (Tabela 1) seguem os nomes e composições dos tampões.

Tabela 1. Composição dos tampões utilizados no decorrer do trabalho.

Tampão	Composição
A	25 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 500 mM NaCl + 20 mM Imidazol
B	25 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 500 mM NaCl + 500 mM Imidazol
C	20 mM HEPES (pH 7,5) + 20 mM NaCl
D	20 mM HEPES (pH 7,5) + 500 mM NaCl
E	25 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 500 mM NaCl

3.7. Método para concentrar proteínas

Para aumentar a concentração de proteínas foram utilizados filtros Amicon Ultra (Millipore), com membrana seletiva para 50 kDa. Basicamente, este método de concentração se baseia na filtração da amostra, onde toda partícula maior que 50 kDa, quando submetida à centrifugação, é retida, e as menores passam através da membrana para um reservatório.

3.8. Determinação da concentração de proteínas

Para a medida de concentração das proteínas produzidas, foi utilizado o método de Pace *et al.* (1995), modificado de Edelchoch (1967), e que é baseado na estimativa do coeficiente de extinção molar através de uma equação (Equação 1) construída a partir de 116 valores de ϵ obtidos para 80 proteínas em 6M de hidrocloreto de guanidina. É importante ressaltar que estes valores são para proteínas nativas, em água ou tampão, e para absorvâncias medidas a 280 nm.

$$\epsilon (280)(M^{-1} cm^{-1}) = (\#Tryptofano)(5.500) + (\#Tirosina)(1.490) + (\#Cistina)(125)$$

(Equação 1)

onde $\epsilon (280)(M^{-1} cm^{-1})$ é o coeficiente de extinção molar na unidade $M^{-1} cm^{-1}$ para uma proteína cuja absorvância foi medida a 280 nm, e # é correspondente a quantidade de cada resíduo especificado.

Partindo da estrutura primária de cada proteína estudada neste trabalho, foi possível determinar o número de resíduos de triptofano, tirosina e prováveis cistinas para os cálculos dos respectivos coeficientes de extinção molar (Tabela 2). A contagem dos resíduos de aminoácido e o cálculo do ϵ foi realizada com o programa Sednterp (www.jphilo.mailway.com/download.htm).

Tabela 2. Valores de ϵ obtidos para cada Hsp40 recombinante.

Proteína	#Tryptofano	#Tirosina	#Cistina	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
SHsp40	0	11	6	17.140
Sis1	1	13	0	24.870
Sis1 $\Delta_{124-174}$	1	12	0	23.380
Sis1 $\Delta_{121-257}$	0	9	0	13.410

Para estimar a concentração de proteínas, mediu-se a absorbância a 280 nm para uma determinada amostra e, com o ϵ e caminhos óptico da cubeta conhecidos, aplicou-se a equação de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times l \times C$$

(Equação 2)

onde A é a leitura de absorbância a 280 nm, l é o comprimento do caminho óptico em cm, que foi sempre 1 cm, e C é a concentração de proteínas em mol/L. No caso de amostras previamente diluídas, a concentração final foi multiplicada pelo fator de diluição. É importante ressaltar que todas as medidas foram realizadas respeitando os limites de absorbância de 0,1 a 1,0 e os respectivos brancos de cada amostra foram subtraídos antes dos cálculos de concentração.

3.9. Análise da estrutura primária

A sequência de nucleotídeos do DNA codificante para a proteína de interesse foi traduzida para sua respectiva sequência de aminoácidos através do programa Translate Tool (<http://br.expasy.org/tools/dna.html>). Para realizar o alinhamento desta sequência com as de outras proteínas homólogas e assim verificar a identidade e regiões conservadas entre as diferentes proteínas, foi empregado o programa Align (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align). A busca de sequências polipeptídicas homólogas à da proteína de interesse foi feita no banco de dados Protein, que reúne uma vasta coleção de sequências de aminoácidos de diversas proteínas e se encontra disponível na página da internet do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein). Com a análise do alinhamento, valores de similaridade e identidade entre as diferentes sequências

polipeptídicas foram gerados, permitindo comparar as proteínas e agrupá-las de acordo com suas respectivas homologias.

A predição de alguns parâmetros físico-químicos das proteínas foi auxiliada pelo programa Sednterp (www.jphilo.maiway.com/download.htm).

3.10. Expressão de proteínas

Para a expressão das proteínas recombinantes, o vetor de expressão contendo o DNA codificante para a respectiva proteína de interesse foi inserido dentro da bactéria *E.coli*. A seleção dos clones transformantes foi realizada em placa de LB-Ágar, contendo os antibióticos compatíveis com as marcas de resistência condicionadas pelos vetores bacterianos. Dentre as colônias que cresceram, uma foi inoculada em meio líquido LB + antibióticos, posteriormente incubado a 37°C em mesa agitadora (200 ciclos/minuto), por 16-18 horas. Um novo inóculo em meio LB + antibióticos, a partir de 2% em volume da cultura anterior, foi preparado e as bactérias foram novamente crescidas a 37°C, em mesa agitadora (200 ciclos/minuto), até DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8. A temperatura ótima de expressão foi ajustada e a indução da produção da proteína recombinante foi realizada com 0,5 mM de IPTG, durante 4 horas. Após este período, a cultura foi centrifugada (3.200 x g / 15 minutos / 4°C) e o sedimento de bactérias foi armazenado a -20°C.

Na expressão da SHsp40 foi empregada a linhagem BI21(DE3) pRARE de *E.coli*, que foi cultivada em meio contendo os antibióticos cloranfenicol e canamicina, nas concentrações estipuladas no tópico respectivo aos meios de cultura. A indução da expressão de proteínas realizada a 25°C.

Já no caso das proteínas Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$, a linhagem de *E.coli* usada foi a BI21(DE3) pLysS, como descrito em Ramos *et al.* (2008), e os antibióticos utilizados nos meios de cultura foram cloranfenicol e ampicilina. A temperatura para indução da expressão de proteínas foi de 30°C.

3.11. Purificação de proteínas

Na purificação das proteínas recombinantes foram empregadas três técnicas cromatográficas: a afinidade, a troca iônica e a exclusão molecular. Com exceção da cromatografia de afinidade, todas as etapas foram executadas com auxílio do equipamento Äkta FPLC (GE Life Sciences), que monitorou o fluxo da fase móvel, a pressão e a absorbância a 280 nm das frações eluídas. A cromatografia de afinidade foi

realizada em coluna HisTrap de 5 mL, contendo a resina Ni Sepharose (GE Life Sciences), utilizando uma seringa como bomba de injeção. A resina utilizada na coluna para troca iônica foi a HighS Support (Bio-Rad), com fluxo máximo de 6 mL/minuto e pressão limite de 1,0 MPa. Já para a exclusão molecular, a resina empregada na coluna foi a Superdex 200, sendo o fluxo máximo de corrida 2,5 mL/minuto e a pressão limite de 0,5 MPa. Ao final de cada processo, a purificação foi inspecionada por SDS-PAGE.

Basicamente, as metodologias para purificação foram as seguintes:

Cromatografia de afinidade: 1) injeção do extrato celular bacteriano em coluna previamente equilibrada com 5 VC de tampão de lavagem; 2) remoção das proteínas não ligadas com 8VC de tampão de lavagem; 3) eluição das proteínas que se ligaram à resina com 5 VC de tampão de eluição.

Cromatografia de troca iônica: 1) injeção do lisado bacteriano em coluna já equilibrada com 4 VC de tampão de lavagem; 2) remoção das proteínas não ligadas com 2 VC de tampão de lavagem; 3) eluição das proteínas ligadas na resina em um gradiente de 20 VC de 0 a 100% de tampão de eluição.

Cromatografia de exclusão molecular: 1) injeção da proteína previamente purificada por alguma das técnicas anteriores em coluna equilibrada com 1VC de tampão de lavagem; 2) eluição das proteínas em uma corrida de 1 VC de tampão de lavagem.

No caso da SHsp40, foram realizadas as etapas cromatográficas de afinidade e exclusão molecular. Para o passo de cromatografia de afinidade, o tampão de lavagem foi o A e o de eluição foi o B. Na cromatografia de exclusão molecular, utilizou-se o tampão E. Já as proteínas Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$ foram inicialmente purificadas por troca iônica, onde o tampão de lavagem empregado foi o C e o de eluição o D, seguida pela cromatografia de exclusão molecular. Nesta última, o tampão de lavagem foi o E.

Para a preparação do lisado bacteriano, as células que expressaram a proteína recombinante de interesse foram ressuspensas em tampão (20 mL/litro de indução) e incubadas por 30 minutos em gelo com 30 μ g/mL de lisozima e 5 unidades de DNase RQ1 (Promega). Em seguida, as bactérias foram lisadas por pulsos de 8 segundos de sonicação até tempo total de 2 minutos, com intervalos regulares de 45 segundos, e centrifugadas a 16.000 x g por 15 minutos. Separou-se o sedimento do sobrenadante, que foi filtrado em filtro de 0,45 μ m, e submetido à purificação.

Os tampões onde as células foram ressuspensas para a lise foram o A, para a SHsp40, e o C, para Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$.

3.12. Espectropolarimetria de dicroísmo circular

A espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) é baseada na interação de moléculas quirais com a luz circularmente polarizada, a qual apresenta um componente circularmente polarizado a esquerda e outro circularmente polarizado a direita. Esta interação é responsável pelo sinal de dicroísmo circular, que pode ser definido como uma diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda (Fasman, 1996; Corrêa & Ramos, 2009). Esta técnica não-destrutiva, utilizada como uma sonda global de estrutura secundária, requer pequenas quantidades de amostra e diversas variáveis podem ser utilizadas, como pH, temperatura e adição de ligantes. O resultado da leitura de uma amostra é medida em miligraus e, para proteínas, este resultado deve ser convertido para elipticidade molar residual média, a qual pode ser obtida pela seguinte equação (Fasman, 1996; Ramos, 2008b; Corrêa & Ramos, 2009):

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times MM}{C \times l \times n}$$

(Equação 3)

onde θ é o sinal de CD em miligraus, MM é a massa molecular em Daltons, C é a concentração em mg/mL da proteína, l é o caminho óptico em centímetros, e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína. A elipticidade molar residual média, expressa em $\text{graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, é uma forma frequente de se expressar os resultados e os permite serem comparados com outros resultados obtidos de lotes distintos de uma proteína e leituras feitas em equipamentos e laboratórios diferentes (Corrêa & Ramos, 2009).

Os espectros de dicroísmo circular foram coletados em espectropolarímetro J-715 (Jasco) acoplado a um sistema interno de controle de temperatura (*Peltier Type Control System PFD 425S* – Jasco). Foram utilizadas cubetas com caminho óptico de 0,1 cm e concentração de proteínas suficiente para atingir um máximo de sinal de, ao menos, -20 miligraus. Todas as medidas, tanto do tampão quanto da proteína, foram acumuladas ao menos 20 vezes, e sempre respeitaram a voltagem máxima de 700 volts na fotomultiplicadora, a fim de obter uma boa relação sinal-ruído e evitar danos ao equipamento. Os espectros do tampão foram subtraídos dos espectros da proteína, que só então foram normalizados para elipticidade molar residual média.

Os espectros de dicroísmo circular em UV distante da SHsp40 foram obtidos de 260 nm até 205 nm, com velocidade de leitura de 50 nm/minuto e tempo de resposta de 4 segundos. A temperatura das coletas foi sempre mantida constante, a 20°C, e a concentração de proteínas utilizada foi de 10 µM.

3.13. Teste de atividade chaperona

A atividade da proteína foi testada verificando a capacidade da chaperona, fusionada a uma cauda de hexa-histidina, ligar um substrato desenovelado, no caso a luciferase de *Luciola mingrelica* (Sigma). O experimento, modificado de Borges *et al.* (2005), foi realizado conforme aqui descrito. Em microtubo, com volume final de 50 µL, foram misturados 10 µM de chaperona, 2 µM de luciferase e 5 mM de β-mercaptoetanol em tampão E. A amostra foi incubada a 42°C por 10 minutos, resfriada a temperatura ambiente, centrifugada por 10 minutos a 16.000 x g e o sobrenadante foi separado. Em 50 µL de resina Talon (Clontech) a 50%, previamente lavada com água ultra-pura e equilibrada com tampão E contendo 5 mM de β-mercaptoetanol, foram adicionados os 50 µL de sobrenadante reservados e a mistura foi incubada por 1 hora, com leve agitação à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a amostra por 1 minuto a 10.000 x g, o sobrenadante foi removido, e a resina lavada três vezes com 75 µL de tampão E contendo 5 mM β-mercaptoetanol e 15 mM de imidazol. A eluição das proteínas ligadas à resina foi realizada com 100 µL de tampão E contendo 5 mM β-Mercaptoetanol e 150 mM de imidazol. A fim de remover a resina, centrifugou-se a amostra por 1 minuto a 10.000 x g e, cuidadosamente, o sobrenadante foi retirado. As proteínas foram precipitadas com acetona a 80% e, somente após a remoção do solvente e ressuspensão do precipitado, foi realizado o SDS-PAGE. O controle do experimento foi feito seguindo o mesmo protocolo, porém sem a adição de chaperona.

3.14. Cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz

A técnica de cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz (SEC-MALS) é uma técnica que combina a separação de moléculas pelos seus respectivos raios hidrodinâmicos com informações obtidas acerca do espalhamento de luz para determinar a massa molecular absoluta. A intensidade de luz espalhada por uma molécula é proporcional a massa do sistema, sendo assim se o

índice de refração e a concentração da molécula são conhecidos, a medida direta do espalhamento de luz determina a massa molecular (Wyatt, 1993).

Os experimentos de SEC-MALS foram realizados em coluna Tricorn Superdex 200 10/300 GL de 24 mL (GE Life Sciences) acoplada ao equipamento miniDAWN TREOS (Wyatt Technologies), que possui três detectores de espalhamento de luz, posicionados nos respectivos ângulos de 41°, 90° e 131° em relação à célula da amostra. Tanto a coluna quanto o miniDAWN TREOS foram conectados a um sistema Äkta FPLC (GE Life Sciences), que monitorou o fluxo da corrida (0,5 mL/minuto), a pressão (máximo de 1,0 MPa) e absorbância a 280 nm durante todo o processo. Os experimentos de SEC-MALS só se iniciaram após a coluna ter sido equilibrada com, ao menos, 1 VC de tampão e a leitura do detector de espalhamento de luz à 90°C acusar valores inferiores a 0,02 V. Na execução do experimentos foram injetados na coluna 250 µL de amostra de proteínas, centrifugadas por 15 minutos a 16.000 x g e filtradas em 0,22 µM. A normalização, integração e tratamento dos dados de espalhamento de luz e de absorbância a 280 nm foram realizadas com auxílio do programa ASTRA (Wyatt Technologies).

Para determinação da massa molecular da SHsp40, foram utilizadas amostras de 50 µM de proteína e o tampão empregado na corrida foi o E. As proteínas Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$ foram utilizadas nas respectivas concentrações de 120 µM, 100 µM e 150 µM e o tampão empregado nos experimentos foi o E, com concentrações crescentes de uréia (0 a 5 M, aumentando de 1 em 1 M). Com os valores de massa molecular destas últimas proteínas foi construído um gráfico de massa molecular em função da concentração de uréia e um ajuste sigmoidal dos pontos no gráfico foi executado.

3.15. Gel filtração analítica

A gel filtração analítica é uma técnica cromatográfica usada para separar moléculas de acordo com seu volume hidrodinâmico, definido pelo raio de Stokes ou hidrodinâmico. A coluna de gel filtração é composta por uma matriz de polímeros com porosidade de diferentes tamanhos, sendo que as moléculas de menores volumes hidrodinâmicos apresentam um caminho maior a percorrer quando passam pela coluna, já que entram nos poros da matriz mais frequentemente do que as moléculas de volumes hidrodinâmicos maiores (Kunji *et al.*, 2008). A partir dos dados gerados por esta técnica, o coeficiente de partição de uma proteína pode ser determinado, e o raio de Stokes estimado (Tiroli & Ramos, 2007).

Para os experimentos de gel filtração analítica foi utilizada a coluna de Tricorn Superdex 200 10/300 GL de 24 mL (GE Life Sciences) conectada ao sistema Äkta FPLC (GE Life Sciences), que monitorou o fluxo da corrida (0,5 mL/minuto), pressão (máximo de 1,0 MPa) e absorvância a 280 nm. A coluna foi equilibrada previamente com 1 VC de tampão E e todas as corridas do experimento foram realizadas em 1 VC do mesmo tampão. O volume de amostra injetado na coluna foi de 100 µL. Para determinar o volume vazio da coluna foi utilizado 2 mg/mL de azul de dextran e como padrão foi utilizada uma mistura de proteínas com massa e raio de Stokes bem estabelecidos (Tabela 3).

A corrida de gel filtração analítica da SHsp40 foi realizada com 20 µM de proteína, centrifugada (16.000 x g / 10 minutos / 4°C) e filtrada em 0,22 µm.

Tabela 3. Composição e propriedades do padrão de proteínas utilizado no experimento de gel filtração analítica.

Proteína	MM (Da)	Raio de Stokes (Å)	Concentração (mg/mL)
Ferritina	440,0	61,0	1,2
Aldolase	158,0	48,1	4,0
Ovoalbumina	43,0	30,5	3,0
Ribonuclease A	13,7	16,4	3,5

Para o cálculo do raio de Stokes, primeiramente foram determinados os coeficientes de partição para as proteínas do padrão e para a proteína de interesse, segundo a fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

(Equação 4)

onde K_{av} é o coeficiente de partição, V_e é o volume de eluição da proteína de interesse, V_o é o volume vazio da coluna e V_c é o volume da coluna. Com o coeficiente de partição dos padrões, construiu-se um gráfico de raio de Stokes em função de $(-\log K_{av})^{1/2}$ e, a partir do ajuste linear dos pontos do gráfico obteve-se uma equação da reta, utilizada para estimar o raio de Stokes da proteína de interesse.

3.16. Espalhamento dinâmico de luz

O espalhamento dinâmico de luz (EDL) é um método espectroscópico para a determinação do coeficiente de difusão de partículas em solução (Bloomfield, 1981; Lomakin *et al.*, 2005). Esta técnica mede as flutuações na intensidade da luz que vem de uma amostra irradiada por um laser. Estas flutuações contêm informações sobre a natureza física das partículas em solução na amostra (Lomakin *et al.*, 2005). Em mais detalhes, a luz é espalhada por flutuações no índice de refração e, em uma solução de macromoléculas estas flutuações são associadas com a diferença de polarização entre o soluto e o solvente. O espalhamento varia em tempo devido aos movimentos translacionais, rotacionais e internos das partículas. Estes movimentos podem ser causados pela difusão Browniana, por campos aplicados externamente, ou por processos biológicos (Bloomfield, 1981). O princípio do EDL reside na medição da correlação entre o tempo e as flutuações na intensidade da luz espalhada e, da análise destas informações, a reconstrução da dinâmica das moléculas (Lomakin *et al.*, 2005).

As medidas de espalhamento dinâmico de luz (EDL) foram realizadas no equipamento DynaPro-MS800 (Protein Solutions), capaz de detectar o espalhamento de luz a 90° e equipado com controle de temperatura no porta-amostra. Os experimentos foram feitos a 20°C e os coeficientes de difusão das amostras foram determinados por 250 medidas, cada uma com tempo de coleta de 10 segundos.

Para a SHsp40, nos experimentos de espalhamento dinâmico de luz, foram utilizados 10 µM de proteína em tampão E.

3.17. Estimativa da forma da proteína em solução pela determinação do fator de Perrin

O fator de Perrin está relacionado diretamente com a forma da proteína em solução, sendo definido como a razão do coeficiente friccional da proteína (f) pelo coeficiente friccional de uma esfera não hidratada de mesma massa que a proteína de interesse (f_0). Quanto mais próximo de 1 é o valor de f/f_0 , mais próximo de uma esfera, ou mais globular e compacta, é a macromolécula.

Para calcular o fator de Perrin, foram utilizados os dados de raio de Stokes e de coeficiente de difusão, obtidos a partir dos experimentos de gel filtração analítica e espalhamento dinâmico de luz, respectivamente, validados por meio da equação de

Stokes-Einstein (Equação 5). Com o cálculo da razão f/f_0 (equação 6), obteve-se o valor referente ao fator de Perrin da proteína de interesse.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_s}$$

(Equação 5)

onde D é o coeficiente de difusão translacional, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade do solvente e R_s é o raio de Stokes estimado para a proteína de interesse.

$$\frac{f}{f_0} = \frac{6\pi\eta R_s}{6\pi\eta \left(\frac{3MV_{\text{bar}}}{4\pi N}\right)^{\frac{1}{3}}}$$

(Equação 6)

onde M é a massa molecular, V_{bar} é o volume parcial específico e N é o número de Avogadro.

3.18. Estabilidade térmica

O estudo da estabilidade foi realizado a partir de experimentos de desenovelamento térmico da proteína acompanhado pelo sinal de dicroísmo circular a 222 nm. A temperatura aumentou gradualmente na velocidade de 1°C/minuto, de 20°C até 65°C ou 90°C, e as coletas dos dados de elipticidade ocorreram a cada 0,5°C. O resfriamento das amostras de proteína de 90°C ou 65°C a 20°C ocorreu na mesma velocidade do aquecimento. Os dados gerados foram normalizados para elipticidade molar residual média pela equação 3, conforme descrito na seção 3.12.

Nos experimentos de desenovelamento térmico da SHsp40 foram utilizados 10 μM de proteína.

3.19. Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência pode ser descrita como sendo um fenômeno onde o elétron, no estado fundamental, absorve energia, passando para um estado de singleto excitado e

que, ao retornar ao seu estado fundamental, emite um fóton (Lakowicz, 1999). Todo este processo de absorção e emissão que ocorre no fenômeno de fluorescência pode ser resumido pelo diagrama de Jablonski (Figura 11).

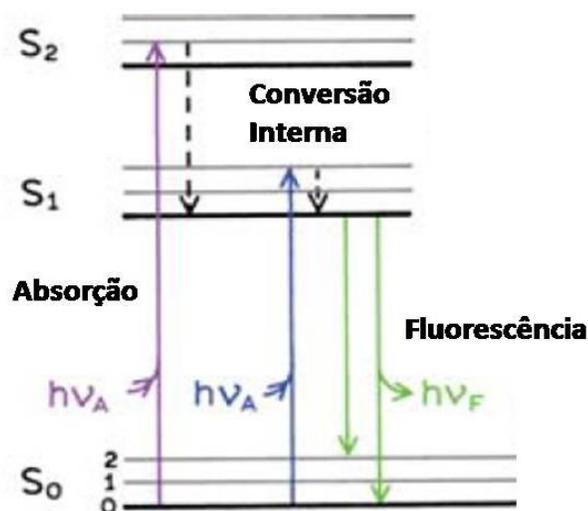


Figura 11. Diagrama de Jablonski modificado ilustrando o fenômeno de fluorescência. O elétron no estado fundamental S_0 absorve energia, indo para um estado excitado do tipo singlete, que pode ser S_1 ou S_2 . Após este acontecimento o elétron decai para o estado excitado singlete de menor energia dentro de S_1 , sendo esta perda de energia denominada conversão interna. Em seguida o elétron retorna ao seu estado fundamental, emitindo um fóton. Cada linha nos estados S_0 , S_1 e S_2 representa um nível de energia vibracional (Lakowicz, 2006). A fluorescência é considerada uma técnica mais sensível que a absorbância, possibilitando detecção em menores concentrações e sendo algumas vezes sensível ao ambiente, o que a torna uma boa sonda para o estudo de ambientes locais (Hammes, 2005; figura modificada de Lakowicz, 2006).

3.19.1. Fluorescência de tioflavina T

A fluorescência de ThT é um teste clássico para identificação de fibrilas amilóides. Essa sonda aumenta sua intensidade de fluorescência, quando ligada de maneira a ficar intercalada nas folhas- β das fibrilas amilóides (Naiki *et al.*, 1989). O aumento da fluorescência de ThT, ligada às fibrilas amilóides, ocorre em função do seu dipolo excitável se alinhar paralelamente ao eixo dessas estruturas. Essa ligação ocorre aparentemente através de canais ao longo das folhas- β , podendo, portanto, a ligação de ThT variar conforme a disposição das folhas- β (Krebs *et al.*, 2005).

O espectrofluorímetro SLM2 Aminco Bowman foi utilizado nos experimentos de fluorescência de tioflavina T. As cubetas usadas foram sempre de 1 cm x 0,2 cm de

caminho óptico, o comprimento de onda de excitação de 450 nm, a varredura da emissão de fluorescência de 475 nm a 550 nm, com velocidade de 1nm/segundo, e voltagem máxima de 800 volts na fotomultiplicadora. Os valores da emissão de fluorescência do branco e das amostras contendo proteína foram acumulados 3 vezes e, na análise dos dados, as intensidades de emissão fluorescência do branco foram subtraídas das intensidades da amostra. Todos os dados foram normalizados numa escala de 0 a 1.

Nos ensaios realizados com a SHsp40 e intermediário, a concentração de proteínas utilizada foi de 2 μ M e a de ThT de 20 μ M, sendo que a mistura foi incubada por ao menos 5 minutos antes da leitura no equipamento. A temperatura foi mantida constante a 20°C, as fendas de excitação e emissão de fluorescência empregadas foram de 16 mm e a voltagem na fotomultiplicadora foi ajustada para 750 volts.

3.19.2. Fluorescência de bis-ANS

Os ensaios de ligação de bis-ANS, uma sonda que é virtualmente não-fluorescente em meio aquoso ou na presença de proteínas bem compactas, mas capaz de emitir fluorescência quando associada a estruturas parcialmente enoveladas (Stryer, 1965), foram executados em espectrofluorímetro SLM2 Aminco Bowman (Thermos Scientific). Foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm x 0,2 cm de caminho óptico e, para excitação do bis-ANS foi usado o comprimento de onda de 365 nm. Para a leitura da emissão da fluorescência do bis-ANS, foram realizadas leituras da emissão de fluorescência na faixa de 450 nm a 550 nm, com velocidade de 1 nm/segundo. A voltagem máxima aplicada na fotomultiplicadora foi de 800 volts. Todas as leituras de emissão de fluorescência foram acumuladas três vezes e na análise dos dados, as intensidades de emissão de fluorescência do branco foram subtraídas das intensidades da amostra. O resultado final foi normalizado em escala de 0 a 1.

Para verificar a superfície exposta ao solvente da SHsp40, foram utilizados 2 μ M de proteína e 12 μ M de bis-ANS (proporção de 1 de proteína para 6 de bis-ANS). Todas as medidas foram feitas a 20°C, com fendas de 4 mm e 8 mm, respectivamente, para excitação e emissão de fluorescência da amostra. A voltagem da fotomultiplicadora foi configurada para 700 volts.

3.19.3. Fluorescência do triptofano

A maioria das proteínas apresenta resíduos de aminoácidos que são intrinsecamente fluorescentes, como a tirosina, fenilalanina e triptofano, sendo este último o mais utilizado (Royer, 2006). O espectro do triptofano deve refletir o ambiente médio deste resíduo. Para um triptofano em um ambiente completamente apolar observa-se uma emissão voltada para o azul, já em um ambiente polar a emissão muda para comprimentos de onda maiores (Figura 12) (Lakowicz, 1999). Esta característica torna a fluorescência do triptofano potencialmente útil como sonda para estrutura e dinâmica protéica (Millar, 1996). Além disso, as proteínas tendem a possuir quantidades menores de triptofano do que de tirosina e fenilalanina e muitas delas apresentam um único resíduo triptofanil, o que facilita consideravelmente a interpretação dos dados de fluorescência (Millar, 1996; Royer, 2006).

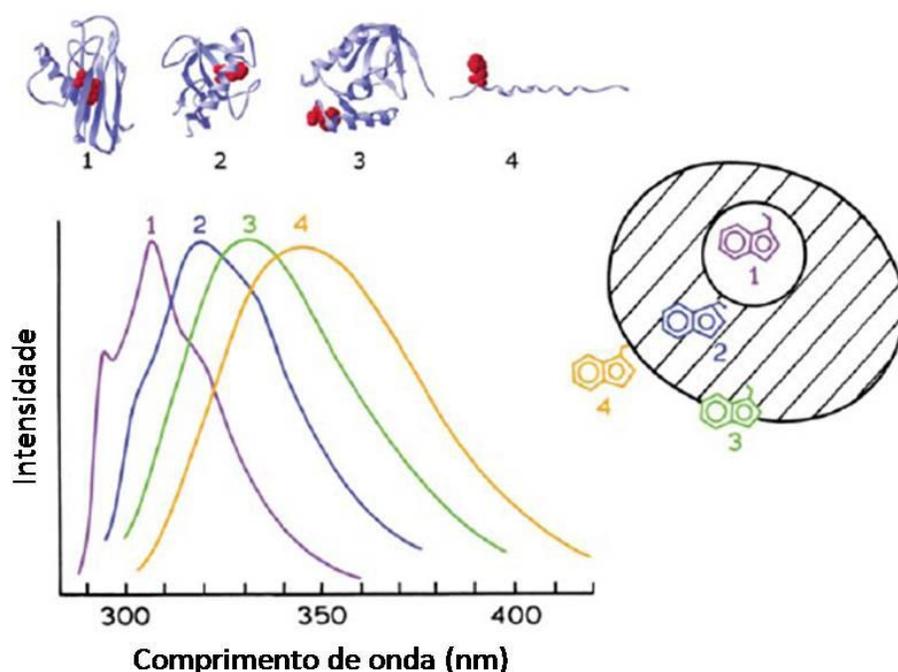


Figura 12. Efeito do ambiente no espectro de emissão do triptofano. O espectro de emissão do triptofano reflete o ambiente em que este se encontra, observando-se uma mudança para a região do vermelho quanto mais polar é o seu ambiente. (Modificado de Lakowicz, 2006).

Utilizando o fluorômetro ISS K2, os resíduos de triptofano das proteínas foram excitados com comprimento de onda de 295 nm em cubetas de 1 cm x 0,2 cm e as coletas da emissão de fluorescência realizadas na faixa de 300 a 400 nm, com velocidade

de leitura de 1 nm/segundo. Foram feitas 3 acumulações de cada amostra testada e, na análise dos dados, a emissão de fluorescência do branco foi subtraída da emissão de fluorescência da proteína e os valores finais normalizados em escala de 0 a 1.

O centro de massa espectral para os espectros de fluorescência do triptofano foram calculados a partir da seguinte equação:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i}$$

(Equação 7)

onde $\langle \lambda \rangle$ é o centro de massa espectral, λ_i é cada comprimento de onda medido e F_i é a intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ_i (Silva *et al.*, 1986).

As medidas de fluorescência intrínseca do triptofano foram realizadas para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ e utilizaram 5 μ M de proteína. Foram utilizadas fendas de excitação e emissão de 0,5 mm e a temperatura foi ajustada para 25°C.

3.19.4. Fotoapagamento do triptofano

O fotoapagamento se refere a qualquer processo que diminui a intensidade de fluorescência de uma amostra e diversas interações moleculares podem ser responsáveis por isto, como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e fotoapagamento por colisão. A necessidade do contato molecular para o fotoapagamento resulta em diversas aplicações para esta técnica, como por exemplo, a análise da acessibilidade de fluoróforos ao agente fotoapagador (Lakowicz, 2006). A acessibilidade e consequente sensibilidade de um fluoróforo ao agente fotoapagador pode ser expressa como constante de Stern-Volmer (K_{SV}). Um fluoróforo enterrado no interior de uma macromolécula, geralmente, é inacessível a fotoapagadores solúveis em água, portanto o valor de K_{SV} é menor. De maneira contrária, fluoróforos expostos na superfície de macromoléculas são mais susceptíveis, apresentando maiores o valor de K_{SV} (Lakowicz, 2006). Ainda, o fotoapagamento pode ocorrer de dois modos: colisional e estático. O primeiro é resultante de um processo dinâmico de encontro entre o agente fotoapagador e do fluoróforo no estado excitado, o que resulta na volta do último ao estado fundamental. Já o segundo resulta da formação de um complexo entre o agente fotapagador e o fluoróforo, que

quando excitado retorna imediatamente ao estado fundamental, sem emissão de fóton (Lakowicz, 2002; Lakowicz, 2006). Os fotoapagamentos estático e dinâmico podem ser distinguidos pelas suas diferentes dependências da temperatura. Maiores temperaturas resultam em maior difusão e taxas mais altas de fotoapagamento por colisão, enquanto que no fotoapagamento estático, altas temperaturas provocam dissociação dos complexos, resultando em uma menor taxa de fotoapagamento (Lakowicz, 2006).

Os experimentos de fotoapagamento foram realizados no fluorímetro AmincoBowman SL2 em cubetas de quartzo com 1 cm x 0,2 cm de caminho óptico. O triptofano das proteínas foi excitado em comprimento de onda de 295 nm e a emissão de fluorescência destes resíduos de aminoácidos coletada em comprimento de onda compatível com o máximo de emissão de fluorescência da amostra. A voltagem empregada na fotomultiplicadora não excedeu 800 volts. Na execução do experimento, foram utilizadas concentrações fixas de proteína e concentrações crescentes de acrilamida, o agente fotoapagador. As leituras no equipamento foram realizadas em triplicata e se deu da seguinte maneira: 1) amostra de proteína sem acrilamida; 2) proteína com 0,02 M de acrilamida; 3) proteína com 0,04 M de acrilamida; 4) proteína com 0,06 M de acrilamida; 5) proteína com 0,08 M de acrilamida; e 6) proteína com 0,1 M de acrilamida. Para determinar se o mecanismo de fotoapagamento era estático ou dinâmico, foram realizadas todas estas medidas em temperaturas controladas de 25°C e 40°C.

Com a obtenção dos dados de emissão de fluorescência do resíduo triptofanil da proteína, foi construído um gráfico de F_0/F , onde F_0 é a emissão de fluorescência do triptofano sem o agente fotoapagador e F com o agente fotoapagador, em função da concentração do agente fotoapagador, a acrilamida. A partir dos pontos obtidos, realizou-se um ajuste utilizando a equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q]$$

(Equação 8)

onde K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, que indica a susceptibilidade do triptofano ao agente fotoapagador, e $[Q]$ é a concentração do agente fotoapagador (Lakowicz, 2006). Para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, estes experimentos utilizaram a concentração de 5 μ M de proteína. Na excitação do triptofano da amostra, foi empregada a fenda de 4 nm e o

comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência foi de 343 nm (fenda de 8 nm). A voltagem na fotomultiplicadora foi de 745 volts.

3.19.5. Anisotropia do triptofano

Sistemas biológicos mostram movimentações específicas, rotações globais e dinâmicas locais, que dependem da estrutura de cada sistema, sendo a luz polarizada uma boa ferramenta para evidenciar estes diferentes tipos de rotações as quais uma molécula pode ser submetida (Albani, 2004). No estudo da dinâmica, é importante fotoselecionar algumas moléculas, e isto pode ser realizado excitando um determinado fluoróforo com luz polarizada e captando a fluorescência emitida em um sistema polarizado. A absorção de luz de um fluoróforo depende da orientação do seu dipolo no estado fundamental em relação à luz de excitação polarizada, ou seja, fluoróforos com dipolos perpendiculares à luz de excitação não absorvem, enquanto que aqueles com dipolos paralelos absorvem (Albani, 2004; Lakowicz, 2006; Parson, 2007). A luz emitida é medida através de um polarizador (Albani, 2004).

Quando a emissão de fluorescência é paralela à excitação, a intensidade medida é chamada $I_{||}$. Já, se a emissão é perpendicular à luz de excitação, a intensidade é denominada I_{\perp} (Albani, 2004; Hof *et al.*, 2005). A polarização da luz e a anisotropia podem ser obtidas de acordo com as seguintes equações:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}$$

(Equação 9)

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

(Equação 10)

onde P e r significam, respectivamente, polarização e anisotropia. A polarização e anisotropia contêm a mesma informação, mas a anisotropia é preferida devido à sua normalização em relação à intensidade de luz total ($I_T = I_{||} + 2 I_{\perp}$) (Lakowicz, 2006).

Considerando a definição de polarização e anisotropia, fluoróforos livres em solução ou ligados a macromoléculas menores apresentam maiores movimentações e

possuem baixa polarização / anisotropia, enquanto que fluoróforos ligados a grandes macromoléculas tem polarização / anisotropia aumentada (Albani, 2004).

Nos experimentos de anisotropia do triptofano, foi utilizado o fluorômetro ISS K2, configurado para excitar o triptofano nos comprimentos de onda de 280 a 300 nm e coletar a emissão de fluorescência em comprimento de onda compatível com o máximo de emissão de fluorescência da amostra. As medidas, realizadas em cubetas de quartzo de 1 cm x 0,2 cm, foram feitas com o uso de polarizadores a 0° e 90°, tanto para a luz de excitação quanto para a de emissão, acumuladas 10 vezes e os dados obtidos utilizados para a construção de um gráfico de anisotropia em função do comprimento de onda de excitação. Nos experimentos de anisotropia, as concentrações de Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ utilizadas foram de 5 μ M, em temperatura de 25°C, com fenda de excitação de 1 mm e de emissão, a 343 nm, de 2 mm.

3.20. Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no equipamento JEOL JSM-6360LV. Todas as amostras foram dialisadas exaustivamente contra água ultrapura e a concentração de proteínas utilizada foi de 10 μ M. Na preparação do material, 5 μ L de proteínas foram gotejados em lamínulas de vidro, secos, revestidos por ouro e visualizados em microscópio eletrônico. Este experimento foi executado como serviço por um técnico em microscopia do Instituto de Química da UNICAMP e, portanto, apresentam-se poucos detalhes sobre sua execução.

4. RESULTADOS

4.1. SHsp40

4.1.1. Análise da estrutura primária

A estrutura primária da SHsp40, obtida a partir da tradução do gene que codifica para a proteína, foi alinhada com a estrutura primária das chaperonas homólogas DjA1 e Ydj1, representantes do tipo I de Hsp40, e Hdj1 e Sis1, representantes do tipo II de Hsp40 (Tabela 4). Com base nos resultados, foi realizada a identificação de domínios comuns às Hsp40s na SHsp40 (Figura 13). Com auxílio do programa Sednterp, os parâmetros físico-químicos da SHsp40 foram preditos a partir de sua estrutura primária (Tabela 5).

Tabela 4. Resultados do alinhamento da estrutura primária da SHsp40 com a estrutura primária de proteína homólogas.

	Hsp40	
	Tipo I	Tipo II
Humano	DjA1	Hdj1
<i>Identidade</i>	51%	28%
<i>Similaridade</i>	68%	41%
Levedura	Ydj1	Sis1
<i>Identidade</i>	44%	26%
<i>Similaridade</i>	59%	35%

Em vermelho, tipo de Hsp40 a qual pertence a SHsp40, baseado em valores de identidade e similaridade.

10 20 30 40 50 60
 MASMFGRAPKKSNDNTKYEILGVPKASASQDDLKAYRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAQAYE
 70 80 90 100 110 120
 VLSDEPKREIYDQYGEDALKEGMGGGAHVDPFDIFSSFFGPSFGGGGSSRGRRRQRGEDV
 130 140 150 160 170 180
 VHPLKVSLEDLYNGTSSKLSLSRNVLCSKCKGKGSKSGASMRCPCGCGSGMKVTIRQLGPSM
 190 200 210 220 230 240
 IQQMQQPCNECKGTGESINEKDRCPGCKGEKVVQEKKVLEVHVVEKGMQHNQKITFPGEADEA
 250 260 270 280 290 300 310
 PDTVTGDIVFVLQOKDHSKFKRKGEDLFYEHTLSLSTEALCGFQFVLTHLDNRQLLIKSNPGE
 320 330 340 350 360 370
 VVKPDQFKAINDEGMPIYQRPFMKGKLYIHFTVEFPDSLAPPEQCKALEAVLPPRSSSKLTDM
 380 390 400 410 420
 EIDECEETTMHVDVNNIEEEMRRKQAHAAQEAEEEDDEMPGGAQRVQCAQQ

Figura 13. Predição dos domínios conservados na estrutura primária da SHsp40. A sequência de aminoácidos da SHsp40, determinada a partir da tradução do gene que codifica para a proteína, foi realizada com auxílio do programa Translate Tool. Com o alinhamento da estrutura primária da SHsp40 com a estrutura primária de chaperonas homólogas, de humano e levedura, a identificação dos domínios de Hsp40 na SHsp40 foi realizada. Em verde, o domínio J (motivo HPD sublinhado); em vermelho, o domínio rico em glicina e fenilalanina; em amarelo, o domínio rico em cisteínas, com os motivos CxCxGxC sublinhados (X é respectivo, geralmente, a um resíduo carregado ou polar, enquanto C e G são cisteínas e glicinas); e em preto, o domínio C-terminal.

Tabela 5. Alguns parâmetros físico-químicos da SHsp40 preditos pela análise de sua estrutura primária pelo programa Sednterp.

Massa molecular	pI	Coefficiente de extinção molar	Volume parcial específico (Vbar)
49094,52 Da	6,8	17.140 M ⁻¹ .cm ⁻¹	0,7257 mL/g

Parâmetros preditos para a proteína fusionada à cauda de histidina.

4.1.2. Expressão e purificação

Na a expressão da SHsp40 recombinante, foram avaliadas as linhagens BI21(DE3), BI21(DE3) pLysS e BI21(DE3) pRARE de *E.coli*. A única que foi apta a produzir a SHsp40 foi a BI21(DE3) pRARE (figura não mostrada). Para determinar a melhor condição de expressão de proteínas, as temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C foram testadas. O resultado, mostrado na figura 14, sugere que em todas as temperaturas o rendimento foi semelhante.

A purificação da SHsp40 foi realizada em dois passos, uma cromatografia de afinidade, utilizada para isolar a SHsp40 da grande maioria dos contaminantes advindos da *E.coli*, e uma cromatografia de exclusão molecular (Figura 15), empregada para a separação da proteína nativa de contaminantes remanescentes, e de espécies protéicas agregadas. Todas as etapas foram acompanhadas por SDS-PAGE, como pode ser visualizado na figura 16.

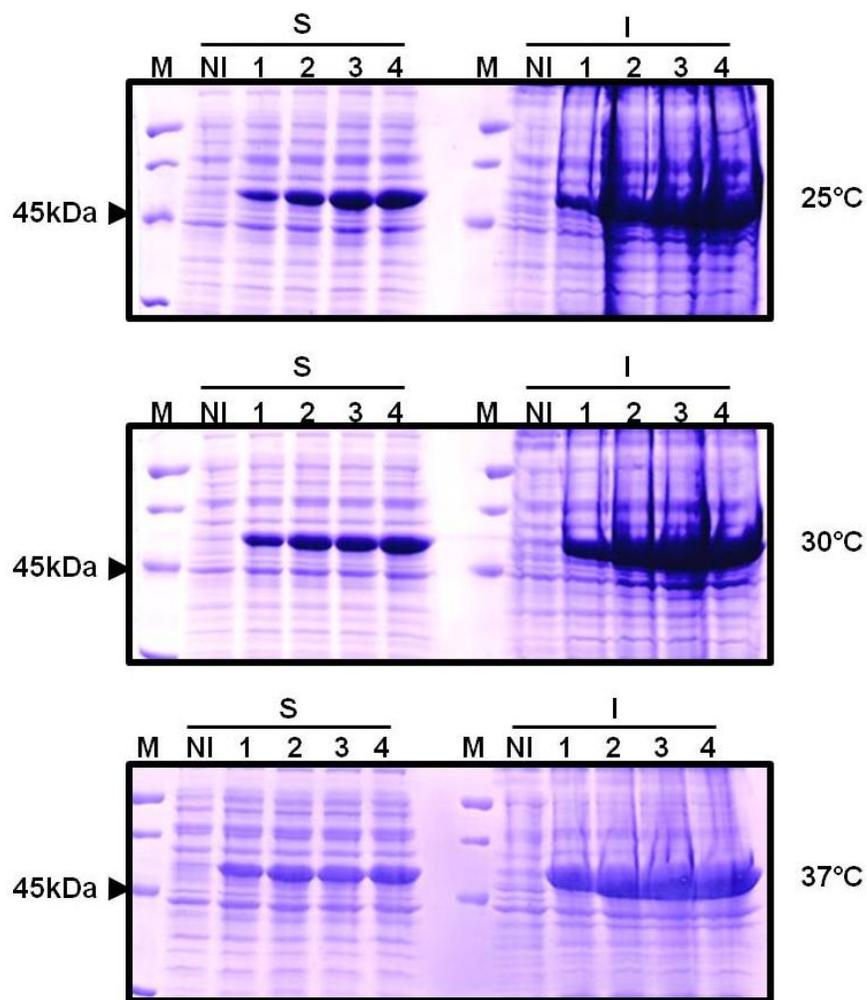


Figura 14. Análise do efeito da temperatura na expressão da SHsp40. A expressão da SHsp40 recombinante foi realizada em *E.coli* BI21(DE3) pRARE em três diferentes temperaturas: 25°C, 30°C e 37°C. Para acompanhar com detalhe todo o processo de expressão de proteínas, em cada temperatura foram coletadas alíquotas das culturas antes da indução e de hora em hora após a adição de IPTG. As amostras foram centrifugadas, as células bacterianas lisadas e sobrenadantes e sedimentos submetidos a um SDS-PAGE. Embora os rendimentos das expressões de proteínas nas temperaturas testadas tenham sido semelhantes, a temperatura escolhida para padronização da expressão foi 25°C. M: padrão de massa molecular (banda referente a 45 kDa indicada pela cabeça de seta à direita); S: fração solúvel; I: fração insolúvel; NI: lisado bacteriano antes da indução da expressão de proteínas; 1 a 4: lisados bacterianos após 1, 2, 3 e 4 horas da indução de expressão da SHsp40 recombinante.

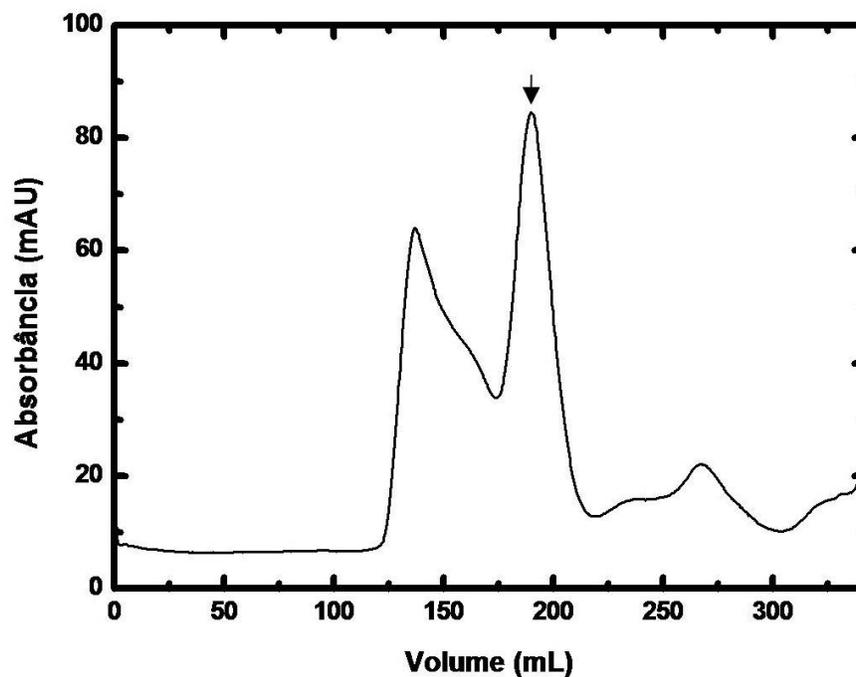


Figura 15. Perfil cromatográfico de gel filtração da SHsp40. A SHsp40, previamente purificada por cromatografia de afinidade, foi submetida a uma cromatografia de gel filtração para ser separada de contaminantes e agregados protéicos. Todas as frações da purificação foram inspecionadas por SDS-PAGE e o pico indicado pela seta foi identificado como a SHsp40 pura.

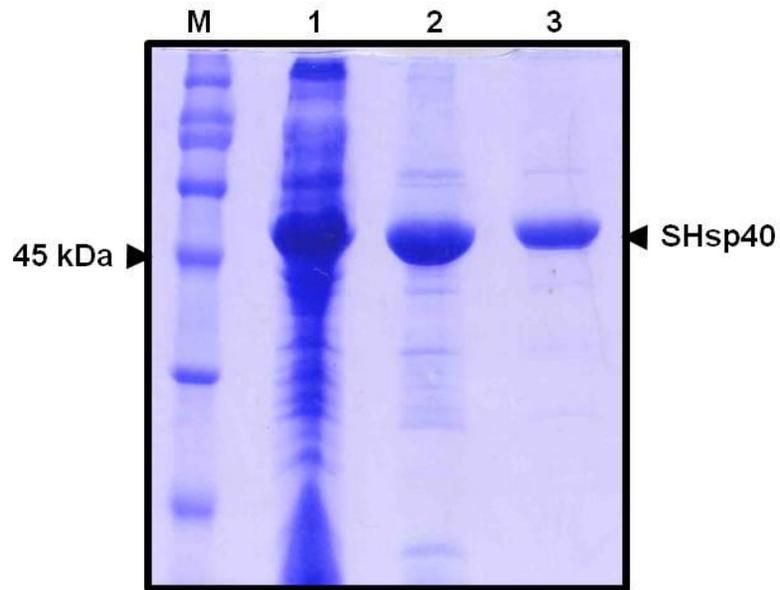


Figura 16. Análise do processo de purificação da SHsp40 por SDS-PAGE 12%. A SHsp40 foi expressa fusionada a uma cauda de hexa-histidina em seu N-terminal em cepa BI21(DE3)pRARE de *E. coli*, para auxiliar no processo de purificação por cromatografia de afinidade seguida por gel filtração. A pureza da proteína após a purificação foi considerada maior que 95%. M: padrão de massa molecular (massa de 45 kDa indicada pela cabeça de seta); 1: SHsp40 expressa em *E. coli*; 2: SHsp40 após a purificação por cromatografia de afinidade; 3: SHsp40 após a purificação por gel filtração.

4.1.3. Dicroísmo circular

Ensaio de dicroísmo circular foram realizados para verificar se a SHsp40 obtida estava enovelada e para caracterizar sua estrutura secundária. Os resultados mostraram uma proteína com estrutura composta tanto por hélices α quanto por folhas β . (Figura 17).

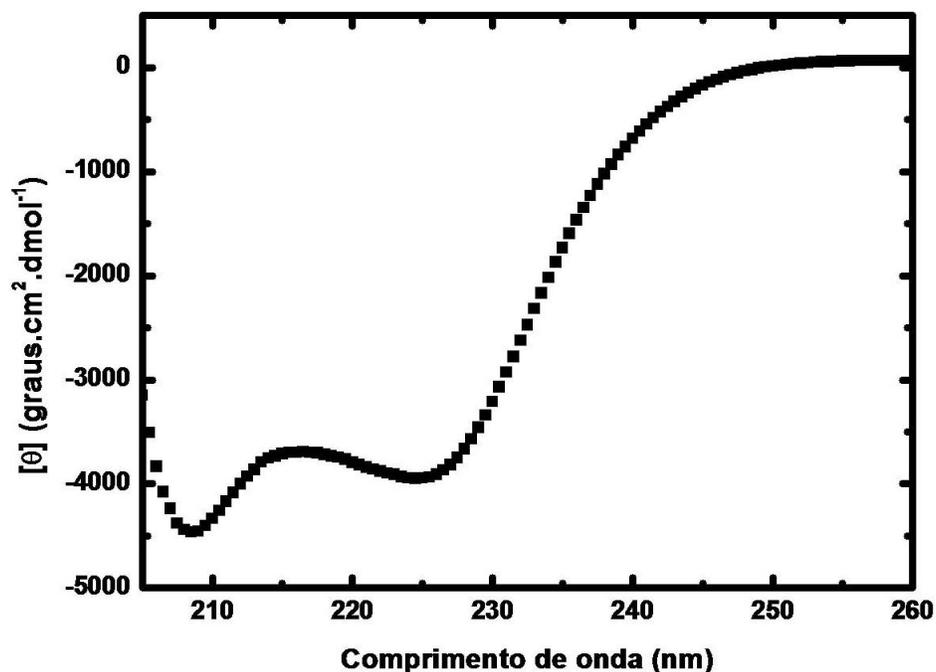


Figura 17. Caracterização da estrutura secundária da SHsp40 por dicroísmo circular. O espectro de dicroísmo circular da SHsp40 foi medido de 205 a 260 nm em tampão Tris 25 mM (pH 7,5) contendo 500 mM de NaCl a 20°C e em cubeta de caminho óptico de 0,1 cm. O espectro do tampão foi subtraído do espectro da proteína e os dados foram normalizados para elipticidade molar residual média. O espectro da SHsp40 foi compatível com o de proteínas contendo estrutura composta por hélices α e folhas β .

4.1.4. Atividade chaperona

A atividade chaperona da SHsp40 foi verificada pela sua capacidade de ligar e proteger da agregação um substrato desenovelado, a luciferase. O resultado destes experimentos (figura 18) mostra que a SHsp40 foi capaz de ligar a luciferase desenovelada e apresentou atividade chaperona protetiva.

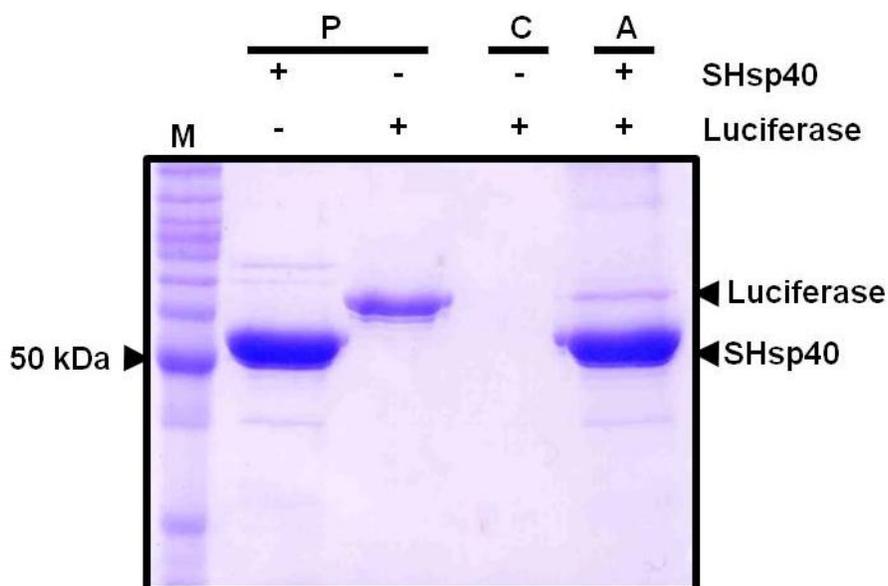


Figura 18. Verificação da atividade chaperona da SHsp40 por SDS-PAGE 12%. A SHsp40 fusionada à cauda de hexa-histidina (10 μ M) foi incubada com 2 μ M de luciferase a 42°C. Em seguida, a amostra foi centrifugada para separação de agregados protéicos e incubada com resina de afinidade Talon, que foi posteriormente lavada exaustivamente para remoção de proteínas não ligadas ou ligadas inespecificamente. A SHsp40 e, conseqüentemente, as proteínas ligadas pela chaperona foram eluídas e o resultado foi verificado por SDS-PAGE 12%. Como controle, foi realizado o ensaio com a luciferase apenas. No gel de poliacrilamida foi possível analisar que, juntamente com a SHsp40, a luciferase foi eluída. Já no controle, a banda respectiva a luciferase não apareceu. Este resultado indica a atividade chaperona protetiva da SHsp40 em relação à luciferase desenovelada. M: padrão de massa molecular, onde 50 kDa está indicado pela cabeça de seta à esquerda; P: controle da quantidade de proteína utilizada nos ensaios; C: amostra controle, com luciferase apenas; A: amostra para verificação da atividade chaperona, com SHsp40 e luciferase. À direita, as cabeças de seta indicam as bandas respectivas à luciferase e à SHsp40.

4.1.5. Estado oligomérico

Para estudar o estado oligomérico da SHsp40 em solução, foi empregada a técnica de cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz. O resultado (figura 19) indicou uma massa molecular de 99 kDa para a SHsp40, o que foi correspondente a um dímero.

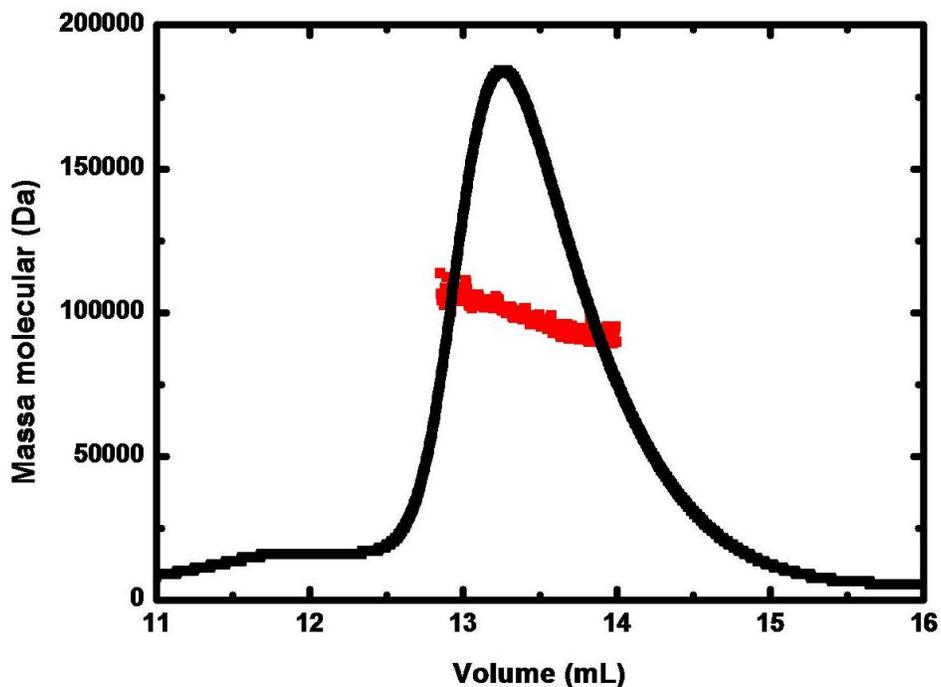


Figura 19. Caracterização do estado oligomérico da SHsp40 em solução por SEC-MALS. A massa molecular da SHsp40 foi determinada pela técnica de cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento do luz. A partir da coleta dados de espalhamento de luz e do perfil cromatográfico da proteína, gerou-se um gráfico da distribuição das massas moleculares medidas (quadrados vermelhos) em função do volume de eluição da SHsp40 na coluna de exclusão molecular (quadrados pretos). A massa molecular determinada foi de 99 kDa, que correspondeu a um dímero.

4.1.6. Gel filtração analítica, espalhamento dinâmico de luz e forma

Para estimar o formato assumido pela SHsp40 em solução foram primeiramente estabelecidos os valores do raio de Stokes e do coeficiente de difusão da SHsp40. O raio de Stokes, estimado pela análise dos dados de gel filtração analítica (figuras 20 e 21), foi de $50 \pm 1 \text{ \AA}$ e o coeficiente de difusão, diretamente medido por espalhamento dinâmico de luz, resultou em um valor de $4,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. O raio de Stokes teórico para a SHsp40, calculado pela equação de Stokes-Einstein e empregando o coeficiente de difusão medido para a proteína, foi de 49 \AA , enquanto que o coeficiente de difusão teórico, calculado pela mesma equação, mas utilizando o raio de Stokes estimado, foi de $4,04 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Todos os dados foram coerentes e podem ser visualizados na tabela 6.

O fator de Perrin da SHsp40 foi utilizado para estimar a forma da proteína em solução e o cálculo da razão f/f_0 resultou em um valor de 1,6, que foi compatível com uma molécula de formato alongado.

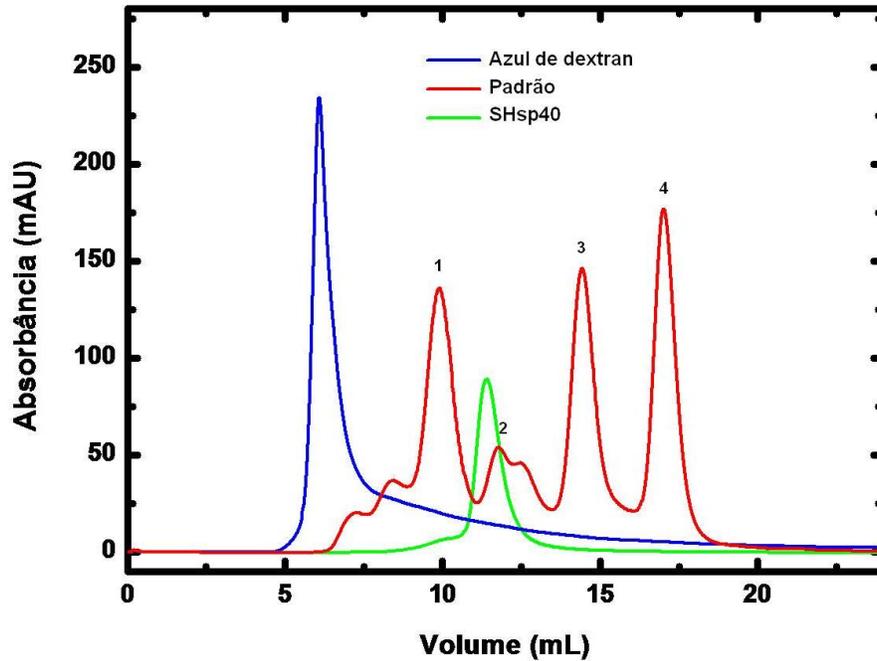


Figura 20. Perfil cromatográfico de gel filtração analítica da SHsp40. Os valores de volume de eluição das proteínas e do azul de dextran na gel filtração analítica foram utilizados para o cálculo do coeficiente de partição (K_{av}) das proteínas e posterior estimativa do raio de Stokes da SHsp40. Para tanto, foram realizadas corridas com azul de dextran (curva em azul), para determinar o volume vazio da coluna; com o padrão de proteínas com massas moleculares e raios de Stokes conhecidos (curva em vermelho); e com a SHsp40 (curva em verde). 1) Ferritina, 2) Aldolase, 3) Ovalbumina, e 4) Ribonuclease A.

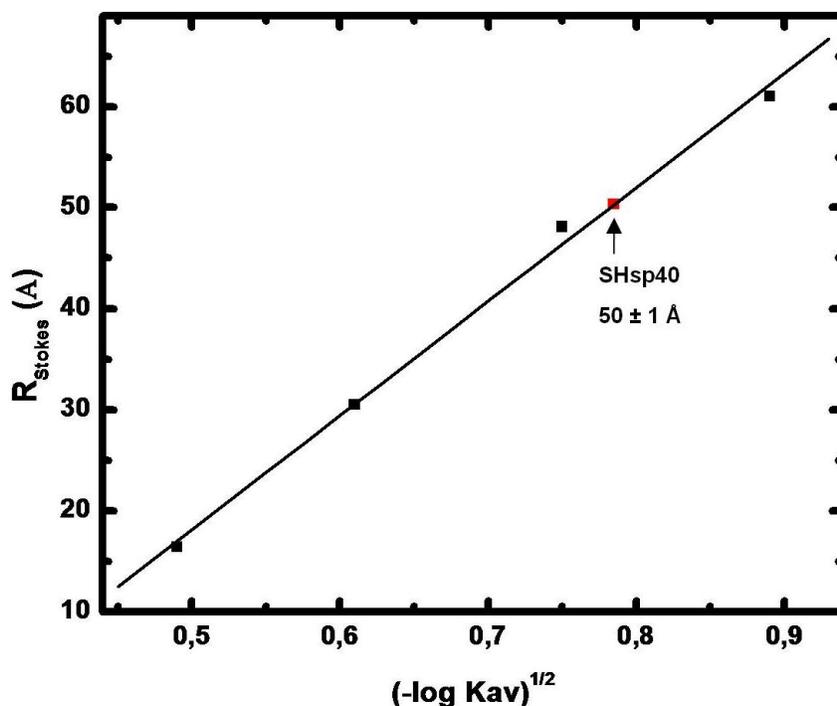


Figura 21. Estimativa do raio de Stokes da SHsp40. Um gráfico de raio de Stokes em função de $(-\log K_{av})^{1/2}$ foi construído para as proteínas do padrão da gel filtração analítica (quadrados pretos) e um ajuste linear dos pontos (reta preta) foi realizado. Com a equação da reta gerada, o raio de Stokes da SHsp40 foi estimado (quadrado vermelho), sendo $50 \pm 1 \text{ \AA}$ o seu valor.

Tabela 6. Propriedades hidrodinâmicas da SHsp40 obtidas por gel filtração analítica e por espalhamento dinâmico de luz.

	Raio de Stokes	Coefficiente de difusão
Gel filtração analítica	$50 \pm 1 \text{ \AA}$	$4,0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$
Espalhamento dinâmico de luz	49 \AA	$4,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$

Em vermelho, valores teóricos calculados a partir da equação de Stokes-Einsten.

4.1.7. Desenovelamento térmico

A estabilidade da SHsp40 foi investigada por desenovelamento térmico acompanhado pelo sinal de dicroísmo circular a 222 nm. A proteína foi aquecida de 20°C a 90°C e o sinal de CD a 222 nm permaneceu estável até 50°C, aumentando em magnitude a partir desta temperatura até 65°C. Em seguida, o sinal de CD a 222 nm diminuiu em magnitude e, ao resfriar a amostra de 90°C a 20°C, não retornou ao seu valor inicial (figura 22). Quando a proteína foi aquecida de 20°C a 65°C, o sinal de CD a 222 nm foi estável até 50°C e aumentou em magnitude até 65°C, porém quando a proteína foi resfriada de 65°C a 20°C, o ganho na magnitude do sinal de CD permaneceu (figura 23). O espectro de dicroísmo circular desta espécie, chamada intermediário, foi medido e apresentou formato diferente do espectro de CD da SHsp40 nativa (Figura 24).

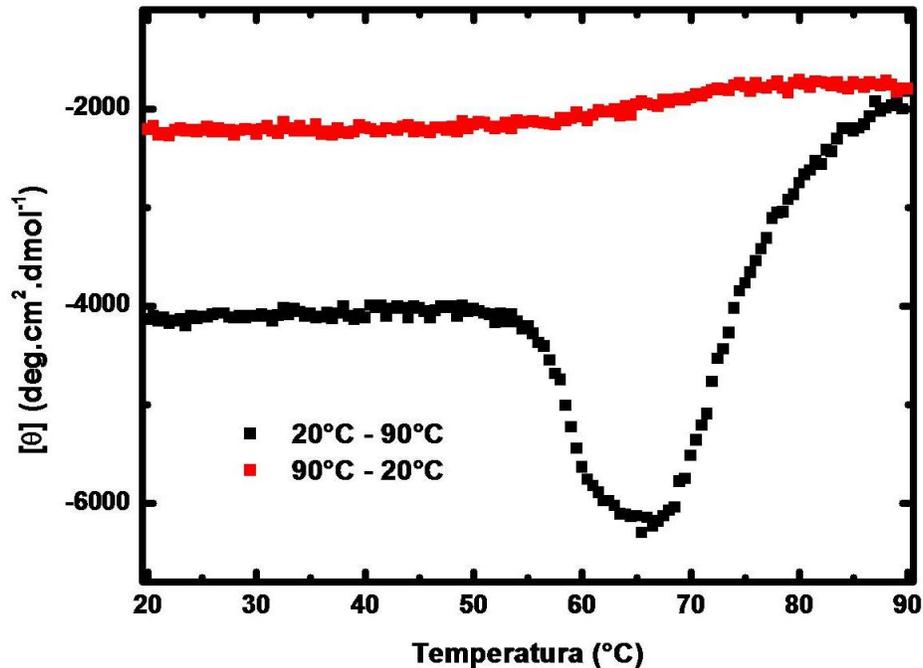


Figura 22. Desenovelamento térmico da SHsp40, de 20°C a 90°C, monitorado pelo sinal de dicroísmo circular a 222 nm. Em cubeta de 0,1 cm de caminho óptico, a SHsp40 foi aquecida de 20°C até 90°C (quadrados pretos), na velocidade de 1°C/minuto. Até 50°C, o sinal de CD a 222 nm permaneceu estável, porém após esta temperatura o sinal de CD aumentou em magnitude, onde alcançou seu máximo a 65°C. Em seguida, o sinal de CD a 222 nm apresentou uma diminuição de magnitude e, ao resfriar a SHsp40 de 90°C a 20°C (quadrados vermelhos), a 1°C/minuto, o sinal não retornou ao seu valor inicial. Estes resultados indicaram que a SHsp40 sofreu alteração em sua estrutura secundária e agregou irreversivelmente após 65°C. À região de aumento da magnitude do sinal de dicroísmo circular a 222 nm, deu-se o nome de intermediário.

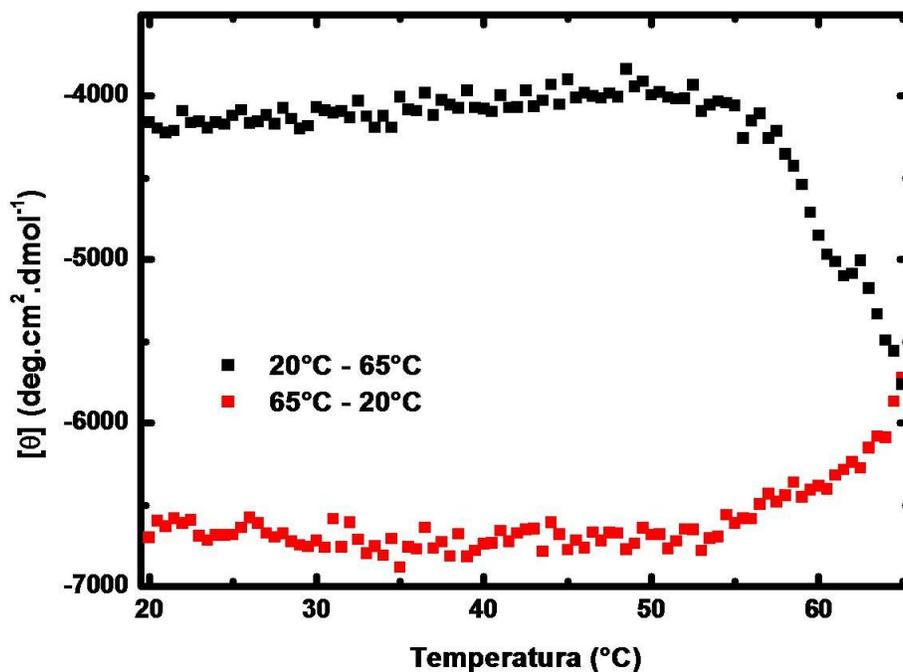


Figura 23. Desenovelamento térmico da SHsp40, de 20°C a 65°C, acompanhado pelo sinal de dicroísmo circular a 222 nm. A SHsp40, em cubeta de 0,1 cm de caminho óptico, foi aquecida de 20°C a 65°C (quadrado pretos) na velocidade de 1°C/minuto. Até 50°C, o sinal de CD a 222 nm praticamente não se alterou, aumentando em magnitude a partir deste ponto até 65°C. Quando a proteína foi resfriada de 65°C a 20°C (quadrados vermelhos) o sinal de dicroísmo circular continuou aumentando até 50°C e permaneceu estável até 20°C, não retornando ao seu valor inicial. A esta espécie ou mistura de espécies estáveis da SHsp40, nomeou-se intermediário.

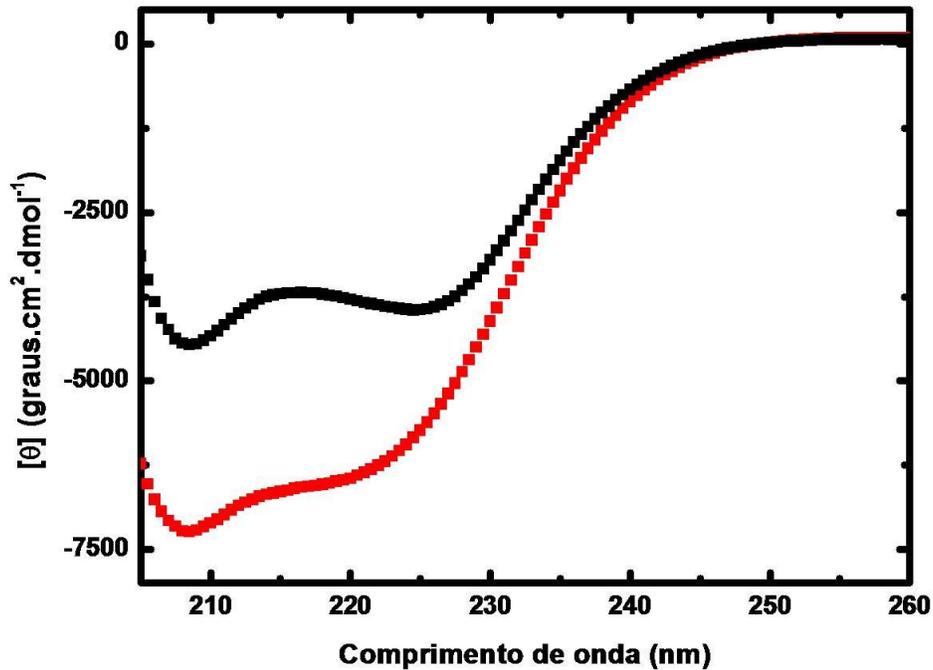


Figura 24. Análise de dicroísmo circular da SHsp40 e do intermediário. Os espectros de dicroísmo circular da SHsp40 (quadrados pretos) e do intermediário (quadrados vermelhos) em tampão Tris 25 mM (pH 7,5) com 500 mM de NaCl, foram medidos de 205 a 260 nm em cubeta de 0,1 cm de caminho óptico, a 20°C. O espectro do tampão foi subtraído dos espectros de proteína e o resultado normalizado para elipticidade molar residual média. O formato do espectro de CD do intermediário foi claramente diferente daquele da proteína nativa, se assemelhando a espectros de proteínas ricas em folhas β .

4.1.8. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada como ferramenta para estudar a natureza do intermediário da SHsp40, onde foram verificadas a ligação de tioflavina T e a ligação de bis-ANS em relação à proteína nativa. A tioflavina T apresentou uma emissão de fluorescência maior quando em presença do intermediário do que quando em presença da SHsp40 nativa (figura 25).

As proporções de bis-ANS e proteína foram determinadas pela titulação da SHsp40 e do intermediário com quantidades crescentes de bis-ANS até o ponto onde a adição de bis-ANS não acarretou mais o aumento na intensidade de fluorescência emitida. A proporção de proteína:bis-ANS definida, tanto para a SHsp40 nativa quanto para o intermediário, foi de 1:6 (figura não mostrada). Utilizando esta proporção, a emissão de fluorescência do bis-ANS foi maior quando incubado com o intermediário do que quando incubado com a proteína nativa (figura 26).

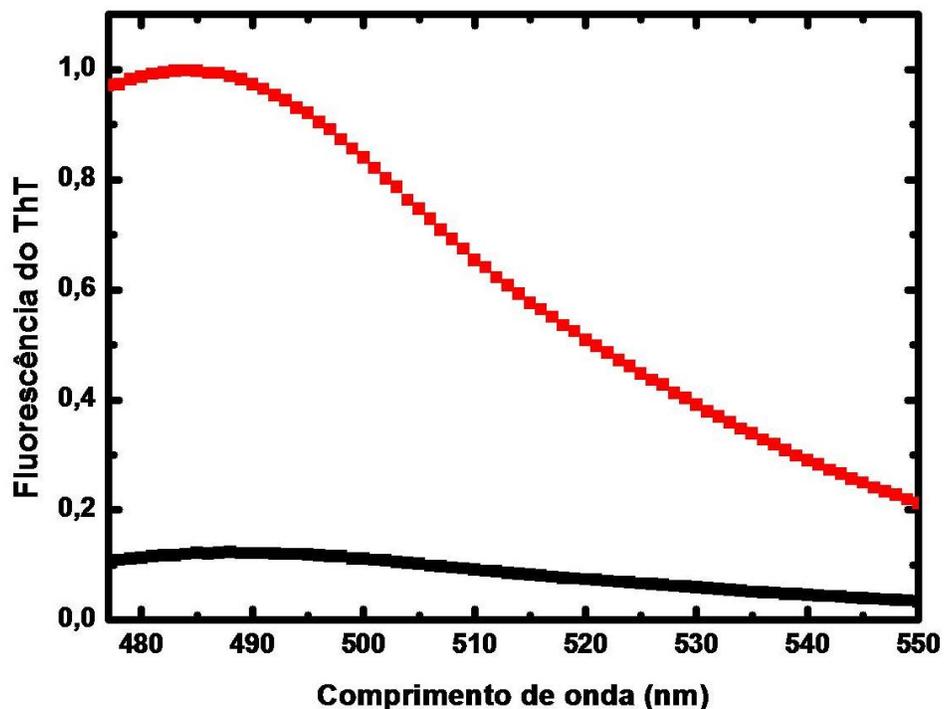


Figura 25. Análise da emissão de fluorescência da tioflavina T com a SHsp40 e intermediário. O espectro de emissão de fluorescência da tioflavina T foi medido em cubeta de 1 cm de caminho óptico, de 475 à 550 nm, a 20°C. A emissão de fluorescência do ThT foi maior quando em presença do intermediário da SHsp40 (quadrados vermelhos) do que com a proteína nativa (quadrados pretos). O espectro do ThT em solução foi subtraído dos espectros do ThT incubado com as proteínas e os dados foram normalizados na escala de 0 a 1. O resultado sugeriu que o intermediário da SHsp40 apresentou maior conteúdo de folhas β do que a proteína nativa.

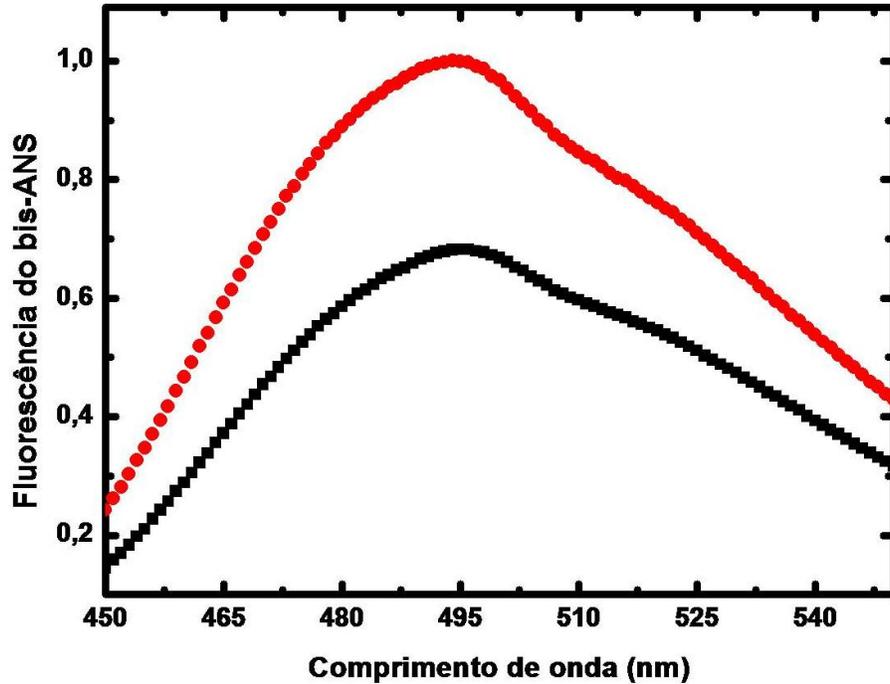


Figura 26. Análise da emissão de fluorescência do bis-ANS com a SHsp40 e intermediário. Em cubeta de 1 cm de caminho óptico, a 20°C, o espectro de emissão de fluorescência de bis-ANS foi medido de 450 a 550 nm. O bis-ANS incubado com a SHsp40 nativa (quadrados pretos) emitiu fluorescência com menos intensidade que o bis-ANS incubado com o intermediário (quadrados vermelhos). O espectro do bis-ANS em solução foi subtraído dos espectros do bis-ANS com as proteínas e os dados foram normalizados em escala de 0 a 1. Este resultado mostrou que a superfície exposta ao solvente era maior no intermediário do que na SHsp40 nativa.

4.1.9. Microscopia eletrônica

A análise das espécies agregadas da SHsp40 foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. As fotomicrografias obtidas mostraram a presença de estruturas fibrilares formadas pela SHsp40 (Figura 27).

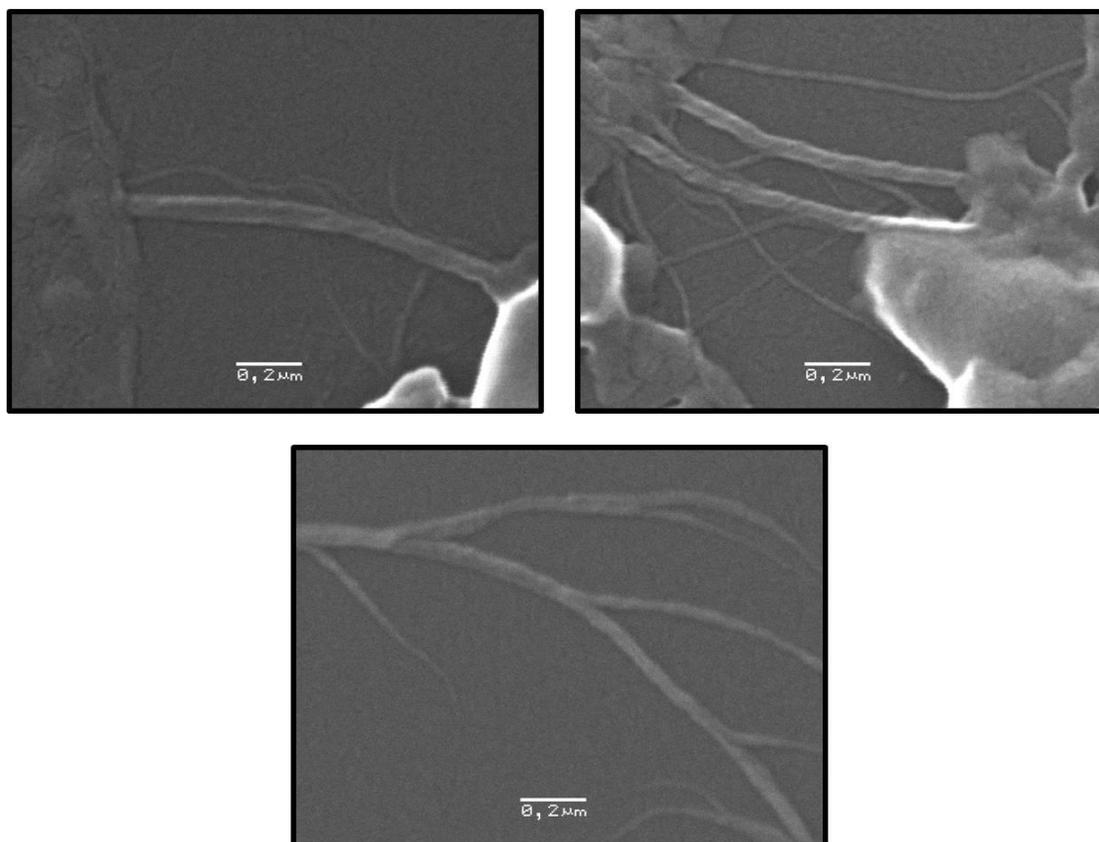


Figura 27. Fotomicrografias dos agregados de SHsp40. As fotomicrografias das espécies agregadas da SHsp40 foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura. A proteína, dialisada exaustivamente contra água ultra-pura, foi seca em lamínula de vidro e revestida por ouro, sendo então submetida à microscopia. As imagens mostraram que entre agregados amorfos existiam estruturas fibrilares formadas pela SHsp40.

4.2. Sis1 e mutantes

4.2.1. Fluorescência estática do triptofano

A fluorescência estática do triptofano foi utilizada para investigar alterações locais na região do domínio C-terminal (figura 28) de $Sis1\Delta_{124-174}$, que poderiam ter sido causadas em decorrência da deleção de 50 resíduos de aminoácidos da região rica em glicinas e metioninas. Os espectros de fluorescência estática do triptofano de Sis1 e $Sis1\Delta_{124-174}$ (figura 29) foram muito semelhantes e ambos apresentaram um centro de massa espectral de 343 nm.

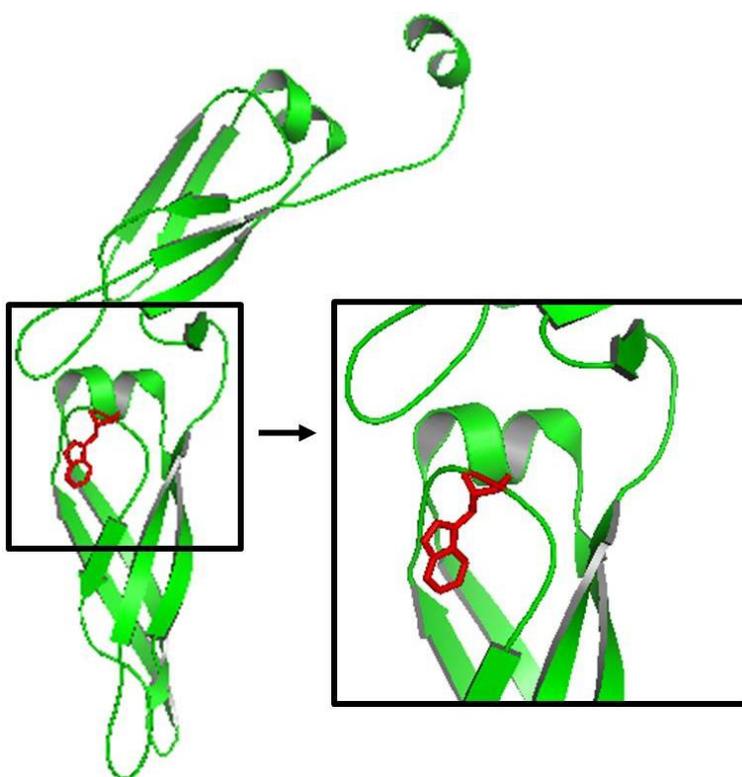


Figura 28. Estrutura do domínio C-terminal da Hsp40 tipo II, Sis1. O domínio C-terminal de Sis1 apresenta dois subdomínios com enovelamento similar, CTDI e CTDII, ambos formados por hélices α e folhas β , embora esta última seja mais pronunciada. O resíduo de triptofano, localizado próximo a interface destes dois subdomínios, foi utilizado como sonda para a verificação de possíveis alterações na estrutura do C-terminal de Sis1 causadas pela deleção da região rica em glicinas e metioninas.

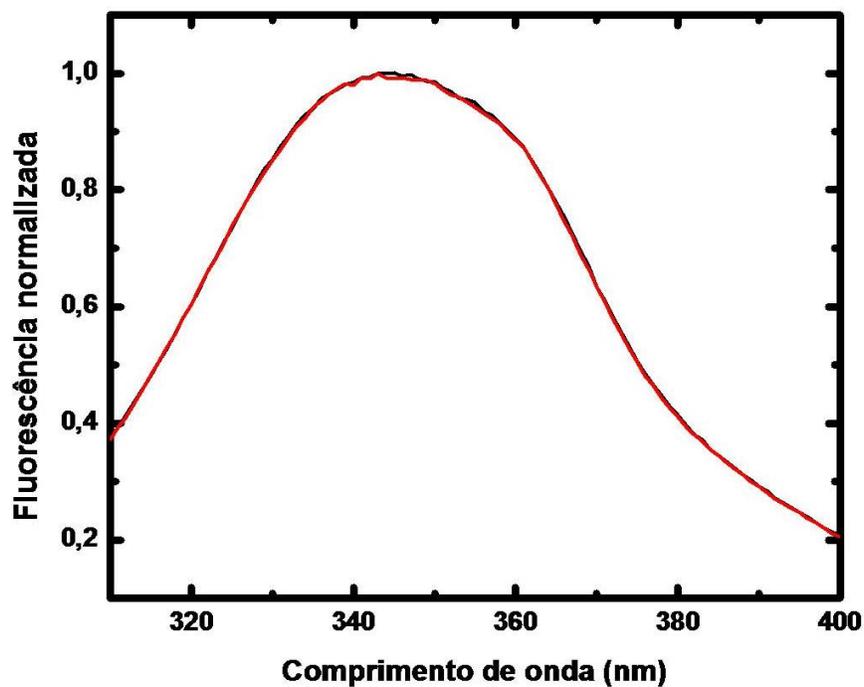


Figura 29. Análise comparativa da emissão de fluorescência estática do triptofano entre Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$. Os espectros de emissão de fluorescência estática do triptofano foram medidos de 300 a 400 nm, em cubeta de 1 cm de caminho óptico e a 25°C. Os dados de emissão de fluorescência do branco foram subtraídos dos dados de emissão de fluorescência das proteínas e o resultado final normalizado em escala de 0 a 1. O centro de massa espectral calculado para os espectros de fluorescência de ambas as proteínas (Sis1, em preto, e Sis1 $\Delta_{124-174}$, em vermelho) foi de 343 nm, o que indicou que o ambiente local do resíduo triptofanil não foi alterado na proteína mutante, Sis1 $\Delta_{124-174}$, em comparação à proteína selvagem, Sis1.

4.2.2. Fotoapagamento do triptofano

A detecção de prováveis alterações locais no C-terminal de Sis1 $\Delta_{124-174}$, em comparação com Sis1, foi mais bem estudada pelo fotoapagamento do triptofano. O grupo fotoapagador utilizado foi a acrilamida e os experimentos foram realizados a 25°C e 40°C. Os resultados, visualizados na figura 30 e tabela 7, mostraram que o processo de fotoapagamento realizado foi dinâmico e os valores da constante de Stern-Volmer determinados foram $10,8 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$ e $14,1 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$, respectivamente a 20°C e 40°C, para Sis1, e $10,1 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$ e $13,1 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$, respectivamente a 20°C e 40°C, para Sis1 $\Delta_{124-174}$.

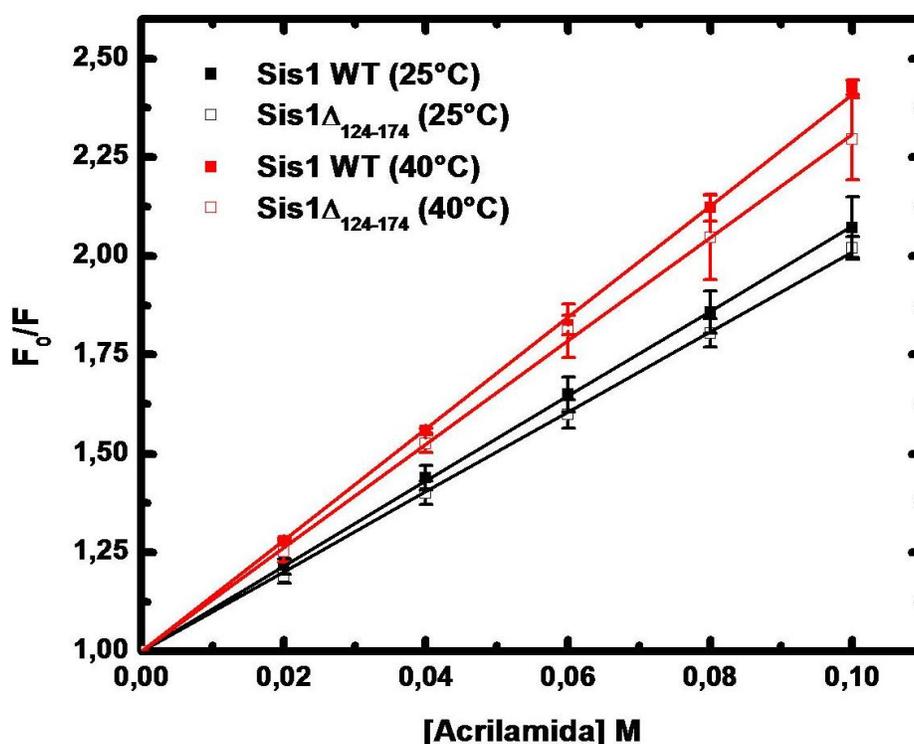


Figura 30. Gráfico do fotoapagamento do triptofano das proteínas Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$. O fotoapagamento de Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ foi realizado utilizando a acrilamida como agente fotoapagador. As medidas da emissão de fluorescência do triptofano foram feitas a 343 nm, a 20°C e a 40°C, em cubetas com 1 cm de caminho óptico. Os valores de emissão de fluorescência da acrilamida em solução nas diferentes concentrações usadas foram subtraídos das respectivas amostras de proteínas. A partir do ajuste dos pontos do gráfico F_0/F em função da concentração de acrilamida, utilizando a equação de Stern-Volmer, as constantes de Stern-Volmer foram determinadas.

Tabela 7. Constantes de Stern-Volmer calculadas a partir dos experimentos de fotoapagamento para as proteínas Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$.

Proteína	Constante de Stern-Volmer (M^{-1})	
	25°C	40°C
Sis1	10,8 \pm 0,1	14,1 \pm 0,1
Sis1 $\Delta_{124-174}$	10,1 \pm 0,1	13,1 \pm 0,1

4.2.3. Anisotropia do triptofano

A anisotropia foi utilizada para investigar diferenças na polarização dos resíduos de triptofano de Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, o que reflete a difusão rotacional destas proteínas em solução. O resultado, mostrado na figura 31, sugeriu que os resíduos triptofanil das duas proteínas, selvagem e mutante, se comportaram de maneira muito similar em relação à polarizabilidade, o que conseqüentemente indica uma taxa de difusão rotacional muito semelhante para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$.

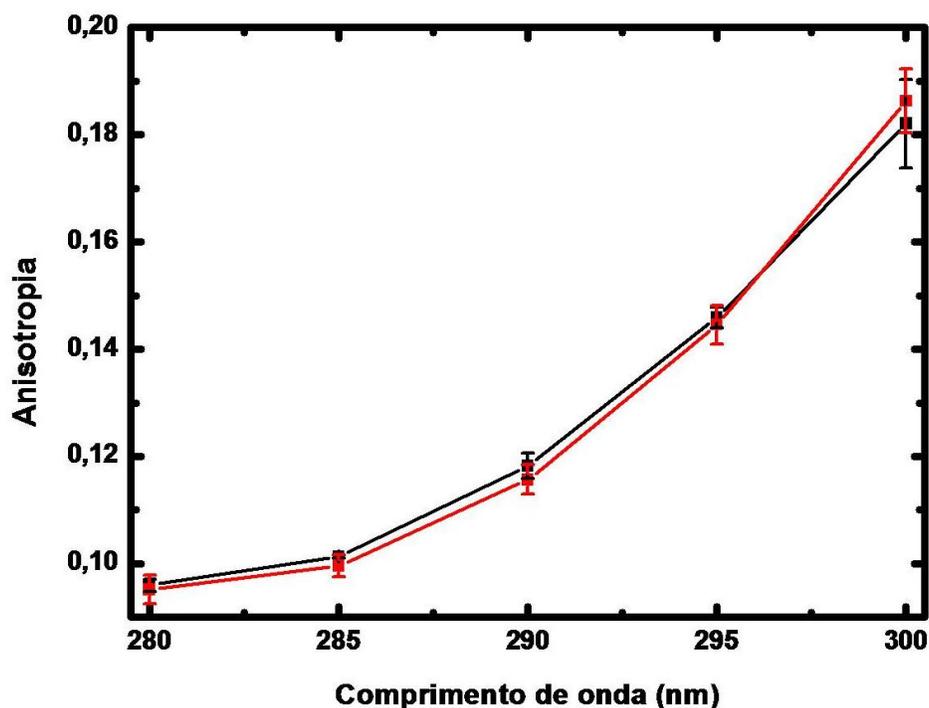


Figura 31. Estudo da anisotropia do triptofano das proteínas Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$. Os experimentos de anisotropia com as proteínas Sis1 (quadrados e linha pretos) e Sis1 $\Delta_{124-174}$ (quadrados e linha vermelhos), foram realizados com a excitação do triptofano por luz polarizada (0° e 90°) de 280 a 300 nm, medidas da emissão de fluorescência polarizada (0° e 90°) a 343 nm, a 25°C e com cubetas de 1 cm de caminho óptico. Os resultados de anisotropia do triptofano sugeriram semelhante difusão rotacional destas proteínas em solução.

4.2.4. Cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz

Os experimentos de cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz foram realizados para estudar a estabilidade da proteína Sis1 e as alterações na estabilidade dos mutantes Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$. A determinação da massa molecular das proteínas foi feita em condições nativas e desnaturantes (1 a 5 M de uréia). Os resultados (figura 32 e tabela 8) revelaram que Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$ se comportaram como dímeros em condições nativas, porém Sis1 $\Delta_{121-257}$, em 3 M de uréia, e Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, em 5 M de uréia, se comportaram como monômeros.

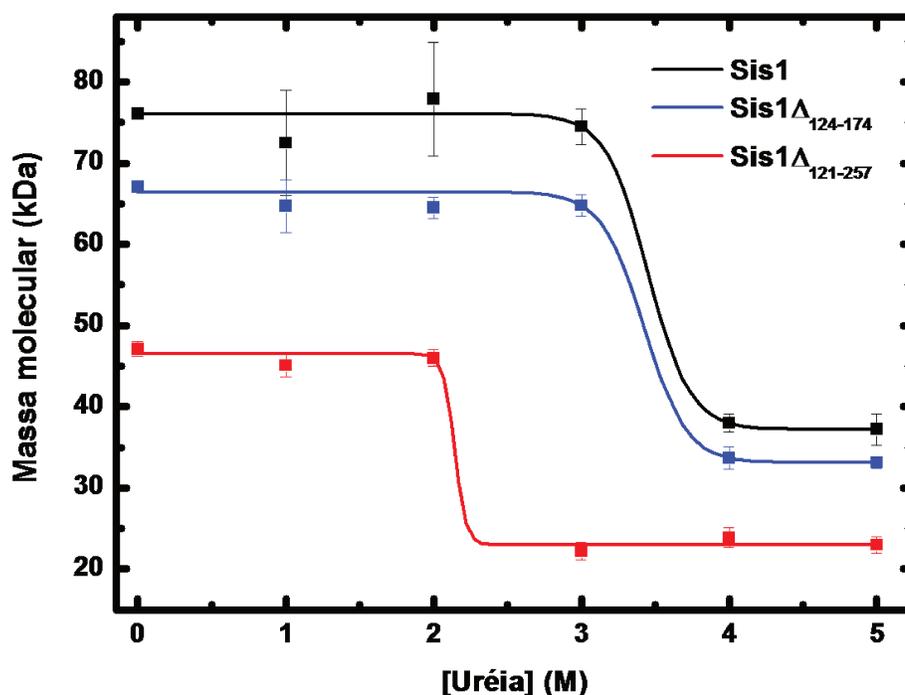


Figura 32. Estudo da estabilidade da Sis1 e mutantes por cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz. Para o estudo da estabilidade de Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$, a técnica de SEC-MALS foi empregada na determinação da massa molecular das proteínas em condições nativas e desnaturantes. O gráfico de massa molecular em função da concentração de uréia foi construído e o ajuste sigmoidal dos pontos resultou em um C_m , ou seja, contração de uréia onde há 50% das espécies como dímero e 50% como monômeros, de 3,5 e 3,4 para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, respectivamente, e 2,1 para Sis1 $\Delta_{121-257}$. Este resultado indicou uma menor estabilidade de Sis1 $\Delta_{121-257}$ em relação à Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$.

Tabela 8. C_m da dissociação de dímeros em monômeros das proteínas Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$ determinadas cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz.

Proteína	C_m (M)
Sis1	3,5
Sis1 $\Delta_{124-174}$	3,4
Sis1 $\Delta_{121-257}$	2,1

C_m : concentração de uréia onde 50% das espécies se encontram diméricas e 50% monoméricas.

5. DISCUSSÃO

5.1. SHsp40

Nesta seção são discutidos os dados referentes à caracterização da SHsp40 e comparação com proteínas homólogas já estudadas, além do estudo da estabilidade térmica desta proteína.

5.1.1. A SHsp40 foi identificada como uma Hsp40 tipo I

A análise da estrutura primária da SHsp40 mostrou que esta co-chaperona pertence a subfamília das Hsp40s do tipo I, baseado em sua identidade com proteínas homólogas de humano (DjA1) e levedura (Ydj1). A distribuição de domínios na estrutura da proteína de interesse foi compatível com aquelas mostradas por trabalhos anteriores, como Tsai & Douglas (1996), Lu & Cyr (1998) e Ramos *et al.*(2008).

5.1.2. A SHsp40 foi expressa e purificada enovelada

A expressão da SHsp40 recombinante foi realizada em *E.coli*, e a purificação realizada através de métodos cromatográficos bem estabelecidos para estas proteínas (Borges *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008). Na cromatografia de afinidade, a SHsp40 fusionada à cauda de hexa-histidina ligou na resina de afinidade a metal e foi isolada de grande parte dos contaminantes advindos da *E.coli*, embora não todos e nem de espécies agregadas da própria SHsp40. Esta separação da SHsp40 nativa de proteínas indesejadas foi realizada com sucesso pela cromatografia de gel filtração, onde as espécies de maior peso molecular que a proteína de interesse eluíram próximo ao volume vazio da coluna e as espécies de menor peso molecular, após a eluição da SHsp40. Com a execução deste protocolo de purificação, a pureza alcançada para a SHsp40 foi considerada satisfatória para a realização dos estudos bioquímicos e biofísicos.

O espectro de dicroísmo circular no UV distante da SHsp40 pura mostrou-se compatível com o espectro de uma proteína enovelada que possui tanto estruturas de hélice α quanto de folhas β , e com valores semelhantes àqueles de uma Hsp40 humana do tipo I, DjA1 (Borges *et al.*, 2005), mas diferentes daqueles de uma Hsp40 do tipo I de levedura, Ydj1 (Ramos *et al.*, 2008), haja vista a porcentagem de identidade e similaridade maior da SHsp40 para com DjA1 que com Ydj1. Em suma, a Hsp40 tipo I de cana-de-açúcar foi produzida e purificada com rendimento e pureza considerados

satisfatórios, e sua estrutura secundária foi coerente quando comparada àquela de uma Hsp40 tipo I humana bem estudada.

5.1.3. A SHsp40 apresentou atividade chaperona

Proteínas com função de chaperona formam complexos transientes, mas estáveis, com polipeptídeos desenovelados, suprimindo a agregação protéica (Cyr, 1995). A capacidade da SHsp40 de ligar à luciferase desenovelada e formar complexos estáveis foi realizada segundo descrito em Borges *et al.* (2005), onde chaperona e luciferase foram incubadas juntas a 42°C, temperatura na qual a luciferase desenovelou. Após a remoção de agregados, a mistura de proteínas foi incubada juntamente com a resina de afinidade, onde a SHsp40 fusionada à cauda de hexa-histidina, mas não a luciferase, se ligou. Caso a atividade de chaperona fosse presente, o complexo SHsp40-luciferase deveria ser formado e as duas proteínas deveriam eluir juntas da resina, e foi exatamente isto o que aconteceu no experimento realizado, a SHsp40 e a luciferase co-eluíram.

Estudos bioquímicos com Hsp40s do tipo I, como a DnaJ de *E.coli*, a Hdj2 de humano e a Ydj1 de levedura demonstraram que a estas proteínas funcionam de maneira independente da Hsp70 para suprimir a agregação protéica, enquanto que Hsp40s do tipo II, como a Hdj1 de humano e a Sis1 de levedura, são menos eficientes como chaperonas e são dependentes da Hsp70 para suprimir a agregação de proteínas (Cyr, 1995; Minami *et al.*, 1996; Lu & Cyr, 1998; Langer *et al.*, 2002). Estes relatos dão suporte aos nossos resultados, que mostraram não só que a SHsp40 apresenta atividade chaperona, mas que esta atividade é compatível com as de Hsp40s do tipo I de diferentes organismos.

5.1.4. A SHsp40 foi caracterizada como um dímero alongado em solução

Recentes trabalhos relativos às Hsp40s de humano e de levedura, tanto do tipo I quanto do tipo II, revelaram importantes aspectos relativos à estrutura e forma destas proteínas. A resolução e modelagem das estruturas do domínio C-terminal e da região rica em cisteínas da Hsp40 tipo I de levedura, Ydj1, e do domínio C-terminal de Sis1 e Hdj1, Hsp40s tipo II, respectivamente de levedura e de humano, mostraram que estas proteínas se comportam como homodímeros alongados, constituídos por monômeros que se dispõem paralelamente de modo a formar uma fenda central. Apesar destas semelhanças, as Hsp40s tipo I apresentam um formato que lembra um sino, onde as

regiões ricas em cisteínas se enovelam de tal modo a formar motivos dedos de zinco, que são a base deste “sino”, enquanto que Hsp40s do tipo II se assemelham à letra U (Sha *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2008). Estudos dos modelos de envelope das Hsp40s tipo I e II inteiras, realizados por Borges e colaboradores, em 2005, e por Ramos e colaboradores, em 2008, mostraram que as posições relativas dos domínios J destas proteínas são distintas e que a localização espacial deste domínio é controlada pelos módulos centrais dos domínios C-terminal das Hsp40s tipo I e II.

Para verificar o comportamento da SHsp40 em relação ao seu estado oligomérico funcional e formato adquirido em solução, foram realizados experimentos de SEC-MALS, para determinação da massa molecular da proteína em solução, e gel filtração analítica e EDL, para validação dos dados experimentais e estimativa da forma da proteína em solução. Inicialmente, os experimentos de SEC-MALS revelaram a massa molecular da SHsp40, que foi de, aproximadamente, 99 kDa. A partir da composição de aminoácidos da SHsp40, a massa molecular estimada pelo programa Sednterp foi de 49 kDa. Estes resultados mostraram claramente que a unidade funcional da SHsp40 em solução é um dímero, compatível com o que se conhece sobre Hsp40s do tipo I homólogas (Borges *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008).

Nos experimentos de gel filtração analítica, foi estimado um raio de Stokes de 50 ± 1 Å para a SHsp40 e calculado um coeficiente de difusão teórico, através da equação de Stokes-Einstein (equação 5), de $4,0 \times 10^{-7}$ cm²/s. Este valor concordou com os dados experimentais de EDL, que mediram um coeficiente de difusão de $4,2 \times 10^{-7}$ cm²/s, resultado próximo do obtido para a Hsp40 tipo I humana, DjA1, o qual o coeficiente de difusão, determinado por ultracentrifugação analítica, foi de $4,5 \times 10^{-7}$ cm²/s (Borges *et al.*, 2005). O raio de Stokes teórico calculado pela equação de Stokes-Einstein, utilizando o coeficiente de difusão medido por EDL, foi de 49 Å, próximo ao raio estimado na gel filtração analítica. Como visto, todos estes valores se suportaram e foram suficientes para validar o dado referente ao raio hidrodinâmico da SHsp40.

Para a estimativa do formato da SHsp40, foi realizado o cálculo do fator de Perrin (equação 6), ou fator de forma, determinado a partir de f/f_0 , definido por ser a razão entre o fator friccional da proteína (f) e o fator friccional de uma esfera rígida, não hidratada e de mesma massa molecular que a proteína de interesse (f_0). O valor obtido foi 1,6, o que sugeriu que a SHsp40 seria uma proteína com formato alongado. Resultado semelhante foi obtido para uma Hsp40 tipo I de humano, DjA1, no trabalho de Borges *et al.* (2005), embora a forma tenha sido determinada por uma diferente metodologia. É interessante

ressaltar que este formato alongado é compatível com de estruturas cristalográficas de Hsp40s truncadas disponíveis, como a Ydj1 (Figura 5) e Sis1 (Figura 9), ambas de levedura, e Hdj1 humana (Figura 5) (Hu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2003). Modelos de Hsp40s inteiras gerados a partir de experimentos de SAXS com as proteínas DjA1 e Hdj1, de humanos (figura 6A), e Ydj1 e Sis1, de levedura (Figura 6B), também concordam com a forma alongada estimada para a SHsp40 (Borges *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008).

5.1.5. O desenovelamento térmico da SHsp40 apresentou pelo menos um intermediário

No estudo de estabilidade térmica da SHsp40, realizaram-se experimentos de desenovelamento térmico acompanhados pelo sinal de CD a 222 nm (Corrêa & Ramos, 2009). No perfil obtido para a SHsp40, alguns pontos principais puderam ser destacados, sendo eles: 1) O sinal de CD a 222nm não mudou até 50°C, o que sugere que, aparentemente, a estrutura secundária da proteína permaneceu conservada ou, ao menos, sem mudanças detectáveis por esta técnica; 2) A partir de 50°C, o sinal de CD a 222nm começou a aumentar em magnitude até 65°C. Esta evidência sugeriu que a estrutura secundária da SHsp40 mudou, porém neste ponto não foi possível tirar maiores conclusões acerca de quais tipos de mudanças ocorreram; 3) Após 65°C, o sinal de CD a 222 nm diminuiu em magnitude e a proteína agregou. Esta agregação se mostrou irreversível nas condições aqui testadas, uma vez que o sinal de CD a 222 nm não foi recuperado, mesmo com a diminuição da temperatura. O perfil de desenovelamento induzido por calor indicou que há pelo menos um intermediário nesta via, e que esta espécie, ou conjunto de espécies, pode ser isolada, uma vez que o sinal de CD a 222 nm da proteína aquecida até 65°C não reverteu àquele inicial à 20°C. Este fato possibilitou a obtenção de espectros de dicroísmo circular desta espécie e o resultado mostrou que o formato do espectro, antes compatível com uma proteína com estruturas hélice α e folha β (mínimos em 224 e 208 nm), foi alterado para um perfil condizente com um onde há predominância de folhas β (mínimo em 218 nm).

5.1.6. O intermediário da SHsp40 foi caracterizado como sendo rico em folha β e parcialmente enovelado

A partir do isolamento do intermediário da SHsp40 e da evidência de que esta espécie pudesse apresentar uma estrutura com maior conteúdo de folha β do que a proteína nativa, foram realizados experimentos de fluorescência de tioflavina T. O ThT apresentou maior fluorescência quando ligado ao intermediário da SHsp40 do que quando ligado à proteína nativa, confirmando a hipótese que surgiu a partir da comparação dos espectros de CD entre a proteína nativa e o intermediário, pois o ThT é uma molécula que se liga à espécies protéicas que contém alto conteúdo de folhas β dispostas de maneira organizada.

Outra abordagem realizada na investigação deste intermediário foi a fluorescência de bis-ANS, uma molécula virtualmente não fluorescente em ambiente aquoso ou na presença de proteínas com estruturas compactas, mas fluorescente quando ligada a regiões hidrofóbicas expostas. Assim como o ThT, o bis-ANS apresentou maior fluorescência quando incubado com a espécie intermediária da SHsp40 do que com a proteína nativa. Este resultado sugeriu que uma maior extensão de superfície hidrofóbica exposta ao solvente esteve presente no intermediário da SHsp40, dispondo potenciais sítios de ligação para o bis-ANS.

5.1.7. A SHsp40 agregada apresentou formação de estruturas fibrilares

Espécies solúveis e ricas em folhas β dispostas de maneira organizada são algumas características da formação de fibrilas, e neste caso, como o intermediário apresentou-se solúvel e parcialmente enovelado, foi suposto que esta espécie poderia estar em vias de formar agregados fibrilares. Para testar a hipótese da SHsp40 possuir espécies fibrilares em seu estado agregado, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura. A proteína, quando dialisada exaustivamente contra água, agregou e estas amostras foram analisadas. Como podem ser vistas na seção resultados, foram encontradas estruturas fibrilares em meio aos agregados de SHsp40, o que confirmou a hipótese de que a proteína é capaz de formar estruturas em forma de fibrila. Além disso, as fibrilas parecem ser comuns às espécies agregadas da SHsp40, pois podem ser formadas de maneiras distintas: 1) Pela remoção do sal, que foi determinante para a agregação da SHsp40 preparada para microscopia; 2) Pelo aquecimento da SHsp40 que,

baseado em evidências experimentais anteriores, parece seguir o mesmo destino na formação de fibrilas.

A formação de fibrilas amilóides ocorre quando estruturas protéicas nativas são desestabilizadas em condições que favorecem a formação de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, dentro da cadeia polipeptídica. Em 1999, Chiti e colaboradores sugeriram que a formação de fibrilas amilóides não é restrita apenas a um pequeno número de proteínas, mas é uma propriedade comum a muitas, senão a todas, cadeias polipeptídicas em condições apropriadas. Ainda que a formação de fibrilas pareça ser genérica, a capacidade de uma sequência polipeptídica de se converter neste tipo de estrutura depende muito das características físico-químicas da proteína e das condições que a mesma é submetida (DuBay *et al.*, 2004; Linding *et al.*, 2004). O fato da SHsp40, uma chaperona, ser capaz de formar estruturas fibrilares *in vitro* parece controverso quando relacionada à função desta proteína. Porém, as características físico-químicas do meio celular onde a proteína se encontra são diferentes daquelas do ambiente *in vitro*, o que pode ser determinante para a formação de estruturas fibrilares pela SHsp40 *in vivo*.

5.1.8. Considerações finais sobre a SHsp40

No programa SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tags Project*), 1,8% dos genes expressos foram identificados como chaperonas moleculares. Deste total, 43% foram relacionados à Hsp70 e co-chaperonas, como a Hsp40 (Borges *et al.*, 2001). Considerando a variedade de estresses (químico, hídrico, térmico, etc.) enfrentada, que podem contribuir para o enovelamento incorreto, desenovelamento e agregação de proteínas, o sistema de chaperonas moleculares torna-se essencial para a homeostase protéica e viabilidade destes organismos. Dada a relevância econômica da cana-de-açúcar e sua aplicação biotecnológica, somado com a ausência de informações sobre mecanismo das chaperonas moleculares nestas plantas, torna-se interessante e importante estudar e entender este sistema. As Hsp40s de humano e de levedura são bem estudadas, no entanto não existem trabalhos referentes à Hsp40s em cana-de-açúcar. Neste trabalho nós apresentamos a primeira caracterização de uma Hsp40 de cana-de-açúcar, identificada como sendo do tipo I e possuindo todos os domínios compatíveis com aqueles de proteínas homólogas já bem estudadas (Lu & Cyr, 1998; Borges *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008). A proteína, expressa de forma heteróloga em *E.coli*, foi purificada e obtida enovelada, como visto pelo espectro de dicroísmo circular,

característico de proteínas com estruturas mistas de hélice α e folha β . Além disso, a SHsp40 apresentou atividade chaperona compatível com Hsp40s do tipo I, e se comportou como um dímero alongado em solução. Estes resultados corroboram com dados os obtidos nos trabalhos de Borges *et al.* (2005) e Ramos *et al.* (2008) e sugerem que o mecanismo de ação destas proteínas, baseado em sua estrutura, seja conservado entre os diferentes reinos.

Em experimentos de desenovelamento térmico acompanhado por CD a 222 nm, a SHsp40 apresentou a presença de ao menos um intermediário, solúvel e estável. Este intermediário apresentou um espectro de dicroísmo circular diferente da proteína nativa, com perfil característico de folhas β . A investigação desta espécie por fluorescência de tioflavina T confirmou um maior conteúdo de folhas β organizadas do que a SHsp40 nativa, assim como a fluorescência de bis-ANS revelou que o intermediário é parcialmente enovelado. Estas evidências geraram a hipótese da SHsp40 ser capaz de formar estruturas fibrilares, que foi confirmada mais tarde pela observação de fibrilas em agregados de SHsp40 por microscopia eletrônica de varredura.

5.2. Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$

Abaixo, os resultados obtidos neste trabalho para Sis1 e seus mutantes de deleção, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$, são apresentados e discutidos em conjunto com os dados obtidos anteriormente, pelo nosso grupo ou por colaboradores, sobre a estrutura-função destas Hsp40s tipo II de levedura.

5.2.1. Sis1 $\Delta_{124-174}$ apresentou comportamento físico-químico semelhante a Sis1

Em estudos não publicados desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa e por colaboradores, observou-se que um dos mutantes de deleção de Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$, apresentou perfil termodinâmico de desenovelamento muito semelhantes àquele da proteína Sis1 selvagem. Estes resultados foram obtidos tanto por calorimetria de varredura diferencial (desenovelamento térmico) quanto por dicroísmo circular (desenovelamento químico) e sugerem que a região deletada, correspondente ao domínio G/M, é desestruturada e não contribui para a estrutura e estabilidade e da proteína. Dados estruturais de baixa resolução, obtidos por SAXS, revelaram que a deleção do domínio G/M parece ter causado pouco impacto a estrutura geral de Sis1. Apesar de estes estudos indicarem que Sis1 $\Delta_{124-174}$ apresenta um comportamento muito semelhante ao da proteína selvagem, faltavam informações a respeito de alterações estruturais mais

localizadas causadas pela deleção, como na região próxima a interface dos subdomínios CTDI e CTDII do domínio C-terminal de Sis1, e sobre alterações na hidrodinâmica da proteína. Para detectar estas possíveis diferenças entre Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ empregou-se a espectroscopia de fluorescência, utilizando o triptofano como fluoróforo e sonda local.

Em uma primeira abordagem, a emissão de fluorescência estática do triptofano foi medida. Resíduos de triptofano, quando expostos ao solvente, apresentam emissão de fluorescência próxima a 350 nm e, quando enterrados em regiões hidrofóbicas de uma proteína, emitem fluorescência mais próxima do azul, cerca de 320 nm. Em situações onde os resíduos de triptofano estão parcialmente expostos a um ambiente polar, há a tendência de emissão de fluorescência em faixas intermediárias, próximas a 330 e 340 nm. O espectro de fluorescência do triptofano medido para Sis1 $\Delta_{124-174}$ foi igual àquele obtido para Sis1, ambos com centro de massa espectral de 343 nm, o que indicou que os resíduos de triptofano das duas proteínas estão parcialmente expostos ao solvente.

Posteriormente, foi utilizado um método mais sensível para detectar alterações sofridas no ambiente do triptofano, o fotoapagamento, que por ser dinâmico é capaz de fornecer informações acerca de quão susceptível ao agente fotoapagador o fluoróforo está. O resultado é expresso como constante de Stern-Volmer, sendo que quanto maior o valor da constante, maior a susceptibilidade do triptofano ao agente fotoapagador. Nestes experimentos foram determinados, a 25°C, constantes de Stern-Volmer de $10,8 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$ para Sis1 e $10,1 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$ para Sis1 $\Delta_{124-174}$, valores muito semelhantes e que indicaram que o domínio C-terminal, mais especificamente na região próxima ao contato entre os subdomínios CTDI e CTDII onde o resíduo triptofanil se encontra (Figura 26), não sofreu significativa alteração em consequência da deleção do domínio G/M. Os experimentos realizados a 40°C indicaram constantes de Stern-Volmer de $14,1 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$ e $13,1 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$ para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, respectivamente. O aumento do valor da constante devido à elevação de temperatura, que aumenta energia das moléculas em solução e suas taxas de colisão com o triptofano, confirmou que o processo de fotoapagamento ocorrido foi dinâmico e não estático, onde o aumento de temperatura leva a uma diminuição na constante de Stern-Volmer, devido a maior taxa de dissociação dos complexos formados pelo fluoróforo e o agente fotoapagador.

Outra abordagem utilizada para averiguar as diferenças entre Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, mas desta vez em relação à hidrodinâmica destas proteínas, foi a anisotropia do triptofano. Este método utiliza a excitação e emissão de fluorescência do triptofano, através de polarizadores de luz posicionados a 0° e a 90°, para obter informações a

respeito da difusão rotacional da proteína em solução. Os valores de anisotropia para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, frente a diferentes comprimentos de onda de excitação, indicaram que a proteína selvagem e a mutante se comportaram de maneira muito semelhante. Este resultado sugeriu que, apesar da deleção dos 50 resíduos de aminoácidos em Sis1 $\Delta_{124-174}$, possivelmente os domínios se arranjaram de maneira a não alterar a hidrodinâmica da proteína.

5.2.2. A deleção de CTDI desestabilizou o dímero de Sis1

Assim como fora mencionado anteriormente na seção de introdução, o mutante Sis1 $\Delta_{121-257}$, o qual teve 136 resíduos deletados, o que inclui o domínio G/M e subdomínio CTDI, apresentou perfil termodinâmico de desenovelamento distinto de Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, sendo menos estável. Ainda, em experimentos de ultracentrifugação analítica com concentrações crescentes de uréia (de 0 a 5 M), Sis1 $\Delta_{121-257}$ sofreu efeito em seu coeficiente de sedimentação em concentração de uréia menor do que para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$. Estes efeitos no coeficiente de sedimentação podem ser causados por diversos fatores, sendo mudança de estado oligomérico um destes. Em uma descrição mais detalhada, os coeficientes de sedimentação de Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ permaneceram inalterados até 2 M de uréia, sofrendo a partir deste ponto um decaimento contínuo, que foi estabilizado próximo a 5 M de uréia. Já Sis1 $\Delta_{121-257}$ apresentou mudanças em seu coeficiente de sedimentação logo em 1 M de uréia, seguido de um decaimento e relativa estabilização em 3 M de uréia. Um gráfico do coeficiente de sedimentação em função da concentração de agente desnaturante foi construído e as curvas resultantes para todas as proteínas apresentaram formato sigmoide, gerando valores de C_m de 3,4 M e 3,5 M de uréia, respectivamente para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, e 2,1 M de uréia para Sis1 $\Delta_{121-257}$. Sendo assim, foi proposto que Sis1 $\Delta_{121-257}$ sofreria dissociação de dímeros em monômeros em concentrações menores de uréia que Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$. Para verificar se os efeitos observados nos coeficientes de sedimentação das proteínas eram reflexos do estado oligomérico das mesmas, a massa molecular de Sis1 e mutantes foram determinadas em condições nativas e desnaturantes, através de experimentos de cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz. Pela composição de aminoácidos, as massas moleculares calculadas para dímeros das proteínas em questão foram: Sis1 – 75,2 kDa; Sis1 $\Delta_{124-174}$ – 66,1 kDa; e Sis1 $\Delta_{121-257}$ – 46,8 kDa. Pela técnica de SEC-MALS foram determinadas, para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, massas moleculares correspondentes a dímeros até 3 M de uréia e, a partir de 4 M de uréia,

correspondentes a monômeros. Em contraste, Sis1 $\Delta_{121-257}$ se comportou como dímero até 2 M de uréia, se dissociando em monômeros em concentrações superiores de uréia. O tratamento destes dados gerou valores de C_m compatíveis com os obtidos por ultracentrifugação analítica (ver acima), sendo 3,5 M e 3,4 M de uréia para Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$, respectivamente, e 2,1 M de uréia para Sis1 $\Delta_{121-257}$. Com estes resultados foi possível concluir que a mudança de estado oligomérico das proteínas, de dímeros para monômeros, é responsável pela alteração nos coeficientes de sedimentação das proteínas estudadas. Ainda, estes experimentos reforçaram o proposto de que a deleção do domínio G/M não altera a estabilidade de Sis1, tampouco interfere em seu estado oligomérico, enquanto que as deleções do domínio G/M e subdomínio CTDI, apesar de permitirem a dimerização da proteína, diminuem a estabilidade de Sis1.

5.2.3. Considerações finais sobre a Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$

Na literatura há informações sobre as funções isoladas dos domínios que constituem as Hsp40s, com exceção da região rica em glicinas e metioninas (G/M). O domínio J é responsável por interagir com a Hsp70 e estimular sua atividade ATPase, enquanto que o domínio C-terminal está envolvido na dimerização e no reconhecimento do substrato (Cyr *et al.*, 1994; Sha *et al.*, 2000). A região rica em G/F parece estar envolvida na diferença de especificidade de substratos para os diferentes tipos de Hsp40s (Yan & Craig, 1999). No entanto, são poucos os estudos que dizem respeito à estrutura-função destes domínios e seus papéis na manutenção da estrutura protéica das Hsp40s. Juntos, os dados obtidos anteriormente em nosso grupo de pesquisa, por colaboradores e neste trabalho, apresentam potencial para ampliar a compreensão da relação estrutura-função das Hsp40s. A deleção do domínio G/M de Sis1 indicou que esta região parece estar envolvida no auxílio ao reconhecimento de substratos, além de ser desestruturada e não contribuir para a estabilidade de Sis1. O subdomínio CTDI mostrou-se crítico para a função de chaperona de Sis1, visto que sua deleção afetou principalmente a atuação deste sistema no reenovelamento de substratos desenovelados ou mal enovelados. Além disso, foi observado que a deleção do subdomínio CTDI afetou a estabilidade de Sis1. É proposto que no domínio C-terminal, na interface entre os subdomínios CTDI e CTDII, exista contatos entre resíduos de aminoácidos que sejam essenciais para a manutenção da estabilidade de Sis1. Ademais, estes contatos parecem também serem importantes na manutenção do estado oligomérico desta Hsp40, já que na ausência de CTDI a proteína se dissocia em monômeros mais facilmente que a proteína selvagem. Até então, esta

função da manutenção da dimerização das Hsp40s era atribuída somente ao subdomínio CTDII.

6. CONCLUSÕES

6.1. SHsp40

- A análise da sequência primária mostrou que a proteína é uma Hsp40 tipo I.
- A chaperona, expressa em *E.coli*, foi purificada com ótimo rendimento, enovelada e funcional, como indicou o espectro de CD característico de proteínas que possuem hélice α e folha β , e pelo teste de atividade chaperona.
- Em solução, a proteína se comportou como um dímero com formato alongado, como visto nos experimentos de SEC-MALS e estimado pelo cálculo do fator de Perrin.
- Nos experimentos de desenovelamento térmico monitorado por CD a 222 nm, o sinal de CD permaneceu estável até 50°C, em seguida aumentando em magnitude até 65°C, o que indica a existência de ao menos um intermediário no desenovelamento. Acima de 65°C, a proteína agregou irreversivelmente.
- O espectro de CD do intermediário foi diferente daquele da proteína nativa.
- Um maior conteúdo de folhas β , possivelmente dispostas de maneira organizada, parecem constituir o intermediário, que ligou mais tioflavina T que a proteína nativa. Os experimentos de fluorescência de bis-ANS também sugerem que o intermediário é uma espécie parcialmente enovelada, com maior superfície exposta ao solvente que a proteína nativa.
- O comportamento do intermediário, com maior conteúdo de folhas β e parcialmente enovelado, levaram a hipótese de que o desenovelamento da proteína em questão poderia apresentar uma estrutura solúvel em vias de formar de agregados fibrilares.
- Entre as espécies agregadas, os experimentos de microscopia eletrônica de varredura mostraram haver estruturas semelhantes a fibrilas.

6.2. Sis1, Sis1 $\Delta_{124-174}$ e Sis1 $\Delta_{121-257}$

- As proteínas, tanto selvagem quanto mutantes, foram produzidas e purificadas com bom rendimento, como descrito por Ramos *et al.* (2008).
- Quando utilizada a técnica de fluorescência estática do triptofano, não foram observadas diferenças em relação ao ambiente do triptofano da Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ que possivelmente poderiam ter sido causadas pela deleção dos 50 resíduos de aminoácidos correspondente ao domínio G/M. Além disso, quando estudado por fotoapagamento dinâmico, a suscetibilidade dos resíduos de triptofano ao agente fotoapagador, expressa como constante de Stern-Volmer, foi semelhante para a proteína selvagem e mutante, sugerindo que possíveis alterações no domínio C-terminal, mais especificamente na região próxima a interface entre os subdomínios CTDI e CTDII, não foram significativas.
- As proteínas Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ apresentaram comportamentos hidrodinâmicos similares, como visto nos experimentos de anisotropia do triptofano, sugerindo que a disposição espacial dos domínios em Sis1, mesmo com a deleção do domínio G/M, permaneceu semelhante.
- Sis1 e Sis1 $\Delta_{124-174}$ se comportaram como dímeros até 3 M de uréia, se dissociando em monômeros em concentrações superiores (Cm de 3,5 M e 3,4 M, respectivamente), enquanto que Sis1 $\Delta_{121-257}$ se comportou como dímero até 2 M de uréia (Cm de 2,1 M de uréia). Assim, é possível concluir que o domínio G/M não contribui para estabilidade de Sis1, em contraste com o observado na deleção do subdomínio CTDI. É proposto que na interface deste com o subdomínio CTDII exista contatos entre resíduos de aminoácidos que ajudem a estabilizar a estrutura de Sis1, e que a deleção de CTDI foi responsável por romper estes contatos, diminuindo a estabilidade da proteína.

7. REFERÊNCIAS

- Albani, J.R. (2004). Structure and dynamics of macromolecules: absorption and fluorescence studies. 1ª edição, editor Elsevier.
- Alberts, D., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (2002). Molecular Biology of the cell, 4th edition. Garland Publishing, New York.
- Haber, E. & Anfinsen, C.B. (1962). Side chain interactions governing the pairing of half-cystine residues in ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 237: 1839-1844.
- Arnott, S., Dover, S.D. & Elliott, A. (1967). Structure of beta-poly-L-alanine: refined atomic co-ordinates for an anti-parallel beta-pleated sheet. *J. Mol. Biol.* 30 (1): 201-208.
- Bader, R., Bamford, R., Zurdo, J., Luisi, B. F. & Dobson, C. M. (2006). Probing the mechanism of amyloidogenesis through a tandem repeat of the PI3-SH3 domain suggests a generic model for protein aggregation and fibril formation. *J. Mol. Biol.* 356: 189-208.
- Baldwin, R. L. (1995). The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view. *J. Biomol. NMR* 5: 103-109.
- Banecki, B., Liberek, K., Wall, D., Wawrzynow, A., Georgopoulos, C., Bertoli, E., Tanfani, F. & Zylicz, M. (1996). Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* 271: 14840-14848.
- Beissinger M., & Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379: 245–259.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2002). Biochemistry. W. H. Freeman and Co., New York.
- Bloomfield, V.A. (1981). Quasi-elastic light scattering applications in biochemistry and biology. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering.* 10, 421-450.
- Bonar, L., Cohen, A.S. & Skinner, M. (1969). Characterization of the amyloid fibril as a cross-beta protein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131 (4): 1373-1375.
- Borges, J. C. & Ramos, C. H. (2005). Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept. Lett.* 12: 257-261.
- Borges, J. C., Fischer, H., Craievich, A. F., Ramos, C. H. (2005). Low resolution structural study of two human HSP40 chaperones in solution. DJA1 from subfamily A and DJB4 from subfamily B have different quaternary structures. *J. Biol. Chem.* 280: 13671-13681.

- Borges, J. C., Peixoto, M. C, & Ramos, C. H. I. (2001). Molecular Chaperone Genes in the Sugarcane Expressed Sequence Database (SUCEST), *Gen. Mol. Biol.* 24: 85-92.
- Brehmer, D., Rudiger, S., Gassler, C. S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M. P. & Bukau, B. (2001). Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struct. Biol.* 8: 427-432.
- Bryngelson, J. D. & Wolynes, P. G. (1987). Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. USA* 84: 7524-7528.
- Caplan, A. J., Cyr, D. M. & Douglas, M. G. (1992). YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* 71: 1143-1155.
- Caughey, B. & Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 267-298.
- Cheetham, M. E. & Caplan, A. J. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* 3: 28-36.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson, C. M. (1999). Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3590-3594.
- Cohen, A. S. (1965). The constitution and genesis of amyloid. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 4: 159-243.
- Corrêa, D.H.A. & Ramos, C.H.I. (2009). The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research.* 3 (5): 164-173.
- Corrêa, D.H.A. & Ramos, C.H.I. (2009). Insights on the structure of amyloid fibrils from site-directed mutagenesis. *Prot. Pept. Lett.* 16 (12): 1519-1525.
- Cyr, D.M. (1995). Cooperation of the molecular chaperone Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation. *FEBS Letters.* 359: 129-132.
- Cyr, D.M. (2008). Swapping nucleotides, tuning Hsp70. *Cell.* 133: 945-947.
- Cyr, D.M., Langer, T., Douglas, G.M. (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* 19 (4): 176-181.
- Dill, K. A., Fiebig, K. M. & Chan, H. S. (1993). Cooperativity in protein-folding kinetics. *Proc. Natl. Acad. USA* 90: 1942-1946.

- Dobson, C. M. (2006). Protein aggregation and its consequences for human disease. *Protein Pept. Lett.* 13: 219-227.
- DuBay, K. F., Pawar, A. P., Chiti, F., Zurdo, J., Dobson, C. M. & Vendruscolo, M. (2004). Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. *J. Mol. Biol.* 341: 1317-1326.
- Ellis, R. J. (2001). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 114-119.
- Fan, C.Y., Lee, S., Ren, H.Y. & Cyr, D.M. (2004). Exchangeable chaperone modules contribute to specification of type I and type II Hsp40 cellular function. *Mol. Biol. Cell.* 15: 761-773.
- Fändrich, M. & Dobson, C. M. (2002). The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* 21: 5682-5690.
- Fändrich, M., Fletcher, M. A. & Dobson, C. M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410: 165-166.
- Fasman, G.D. (1996) Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, 1ª edição, editora Plenum Press Publisher.
- Friedrich, N. & Kekule, A. (1859). Zur amyloidfrage. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 16:50.
- Gall, W. E, Higginbotham, M. A., Chen, C., Ingram, M. F., Cyr, D. M. & Graham, D. R. (2000). The auxilin-like phosphoprotein Swa2p is required for clathrin function in yeast. *Curr. Biol.* 10: 1349-1358.
- Glenner, G. G. (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: The beta-fibrilloses. *N. Engl. J. Med.* 302: 1283-1292.
- Goedert, M. (2004). Tau protein and neurodegeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15:45-49.
- Greene, M. K., Maskos, K & Landry, S. J. (1998). Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6108-6013.
- Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y. & Kutysenko, V. P. (1988). Thermodynamic of the apomyoglobin structure. *J. Mol. Biol.* 202: 127-138.
- Grodberg J. & Dunn, J.J. (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.*, 170 (3): 1245-1253.
- Hammes, G.G. (2005) Spectroscopy for the biological sciences. Wiley 1ªedição.

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580.
- Harper, J. D. & Lansbury, P. T. Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 385-407.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579.
- Hendrick, J. P. & Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 349-384.
- Hendrick, J. P., Langer, T., Davis, T. A., Hartl, F. U. & Wiedmann, M. (1993). Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10216-10220.
- Higurashi, T., Yagi, H., Mizobata, T. & Kawata, Y. (2005). Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness. *J. Mol. Biol.* 351: 1057-1069.
- Hill, R. B., Flanagan, J. M. & Prestegard, J. H. (1995). ¹H and ¹⁵N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of *Escherichia coli* DnaJ (1-78). *Biochemistry* 34: 5587-5596.
- Hirschfield, G. M. (2004). Amyloidosis: a clinico-pathophysiological synopsis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15: 39-44.
- Hof, M., Hutterer, R. & Fidler, R. (2005). Fluorescence spectroscopy in biology: Advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells. 1^a edição, editora Springer.
- Hu, J., Wu, Y., Li, J., Fu, Z & Sha, B. (2008). The crystal structure of the putative peptide-binding fragment from the human Hsp40 protein Hdj1. *BMC Struct. Biol.* 8: 3.
- Ingram, V. M. (1957). Gene mutations in human hemoglobin: the chemical differences between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 180: 326-328.
- Jackson, S. E., & Fersht, A. R. (1991). Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry* 29: 10428-35.
- Jennings, P. A. & Wright, P. E. (1993). Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science* 262: 892-896.

- Jiménez, J. L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M. & Saibil, H. R. (1999). Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* 18: 815-821.
- Kagan, B. L., Azimov, R. & Azimova, R. (2004). Amyloid peptide channels. *J. Membr. Biol.* 202: 1-10.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. & Ito, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331: 53053-2.
- Krebs, M. R., Wilkins, D. K., Chung, E. W., Pitkeathly, M. C., Chamberlain, A. K., Zurdo, J., Robinson, C. C. & Dobson, C. M. (2000). Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain. *J. Mol. Biol.* 300: 541-549.
- Krebs, M.R., Bromley, E.H. & Donald, A.M. (2005). The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. *J. Struct. Biol.* 149 (1): 30-37.
- Kunji, E.R.S., Harding, M., Butler, P.J.G. & Akamine, P. (2008). Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography. *Methods*, 46, 62-72.
- Lai, Z., Colón, W. & Kelly, J. W. (1996) The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. *Biochemistry* 35: 6470-6482.
- Lakowicz, J. R. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. 2^a edição, editora Springer.
- Lakowicz, J. R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. 3^a edição, editora Springer.
- Lakowicz, J.R. (2002). Topics in Fluorescence Spectroscopy (Vol. 2). 1^a edição, Kluwer Academic Publishers.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. & Hartl, F. U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356: 683-689.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K. & Hartl, F.U. (2002). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*. 356 (6371): 683-689.

- Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T. & Lansbury, P. T. Jr. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418: 291.
- Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. & Bukau, B. (1999). Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5452-5457.
- Levinthal, C. (1969). How to fold graciously? In *Proceedings of Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems Meeting*. p. 22-24.
- Levy, E. J., McCarty, J., Bukau, B. & Chirico, W. J. (1995). Conserved ATPase and luciferase refolding activities between bacteria and yeast Hsp70 chaperones and modulators. *FEBS Lett.* 368: 435-440.
- Li, J., Qian, X. & Sha, B. (2003). The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate. *Structure* 11: 1475-1483.
- Li, J., Wu, Y., Qian, X. & Sha, B. (2006). Crystal structure of Sis1 peptide-binding fragment and Hsp70 Ssa1 C-terminal complex. *Biochem. J.* 398 (3): 353-360.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. & Zylicz, M. (1991). *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2874-2878.
- Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F. & Serrano, L. (2004). A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J. Mol. Biol.* 342: 345-353.
- Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.
- Lomakin, A., Teplow, D.B. & Benedek, G.B. (2005). Quasielastic light scattering for protein assembly studies. Editado por Sigurdsson, E.M. Editado por Sigurdsson, E.M. *Methods in molecular biology*, vol. 299: Amyloid proteins: Methods and protocols. Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
- Lu, Z. & Cyr, D.M. (1998). Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the Hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1. *J. Biol. Chem.* 273 (43): 27824-27830.
- Lu, Z. & Cyr, D.M. (1998). The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273 (10): 5970-5978.
- Lumry, R. & Biltonen, R. (1966). Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4: 917-944.

- Martin, J. & Hartl, F. U. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 41-52.
- Mayer, M. P., Brehmer, D., Gassler, C. S. & Bukau, B. (2001). Hsp70 chaperone machines. *Adv. Protein Chem.* 59: 1-44.
- Meacham, G. C., Lu, Z., King, S., Sorscher, E., Tousson, A. & Cyr, D. M. (1999). The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* 18: 1492-1505.
- Micheletti, C., Maritan, A. & Banavar, J.R. (1999). A comparative study of existing and new design techniques for protein models. *J. Chem. Phys.* 110 (19): 9730-9738.
- Millar, D.P. (1996) Time-resolved fluorescence spectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology.* 6: 637-642.
- Minami, Y., Höhfeld, J., Ohtsuka, K., & Hartl, F.U. (1996). Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog , Hsp40. *J. Biol. Chem.* 271 (32): 19617-19624.
- Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem.* 177 (2): 244-249.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2004) *Lehninger principles of biochemistry.* 4th edition, W.H. Freeman.
- Otzen, D. E., Itzhaki, L. S., elMasry, N. F., Jackson, S. E. & Fersht, A. R. (1994). Structure of the transition state for the folding/unfolding of the barley chymotrypsin inhibitor 2 and its implications for mechanisms of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10422-10425.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science.* 4:2411-2423.
- Parson, W.W. (2007). *Modern optical spectroscopy.* 1^a edição, editora Springer.
- Pepys, M. B. (1995) in *The Oxford Textbook of Medicine* (Weatherall, D. J., Ledingham, J. G. and Warrel, D. A., Eds.) 1512-1524. Oxford University Press, Oxford.
- Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F. & Tycko, R. (2002). A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 16742-16747.

- Pohl, F. M. (1969). On the kinetics of structural transition I of some pancreatic proteins. *FEBS Lett.* 3: 60-64.
- Polverino de Laureto, P., Taddei, N., Frare, E., Capanni, C., Costantini, S., Zurdo, J., Chiti, F., Dobson, C. M. & Fontana, A. (2003). Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis. *J. Mol. Biol.* 334: 129-141.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047.
- Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I. & Fuller, F. (1988). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331: 525-527.
- Prip-Buus, C., Westerman, B., Schmitt, M., Langer, T., Neupert, W. & Schwarz, E. (1996). Role of the mitochondrial DnaJ homologue, Mdj1p, in the prevention of heat-induced protein aggregation. *FEBS Lett.* 380: 142-146.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 216: 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522.
- Ptitsyn, O. B. (1991). How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *FEBS Lett.* 285: 176-181.
- Qian, Y. Q., Patel, D., Hartl, F. U. & McColl, D. J. (1996). Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J. Mol. Biol.* 260: 224-235.
- Radford, S. E., Dobson, C. M. & Evans, P. A. (1992). The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. *Nature* 358: 302-307.
- Ramos, C. H. & Ferreira, S. T. (2005). Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. *Protein Pept. Lett.* 12: 213-222.
- Ramos, C. H. I., Lima, M. V. Jr., Silva, S. L., Borin, P. F., Regis, W. C., & Santoro, M. M. (2004). Stability and folding studies of the N-domain of troponin C. Evidence for the formation of an intermediate. *Arch. Biochem. Biophys.* 427: 135-142.

- Ramos, C.H.I, Oliveira, C.L.P., Yang-Fan, C., Torriani, I.L. & Cyr, D.M. (2008) Conserved central domains control the quaternary structure of type I and type II Hsp40 molecular chaperones. *J. Mol. Biol.* 383 (1): 155-166.
- Ramos, C.H.I. (2008b) Dicroísmo circular para a análise da conformação de proteínas: uma visão prática. *A arte da caracterização e separação de proteínas*. Fortaleza: RDS gráfica e editora Ltda, v. 1, p. -.
- Royer, C.A. (2006) Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem. Rev.* 106: 1769-1784.
- Rudiger, S., Schneider-Mergener, J. & Bukau, B. (2001). Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* 20: 1042-1050.
- Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, M. K. & Hartl, F. U. (2002). Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16412-16418.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press (Ed.). New York, United State of America.
- Sanchez, Y. & Lindquist, S. L. (2000). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248: 1112-1115.
- Sha, B., Lee, S., Cyr, D.M. (2000). The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1. *Structure.* 8 (8): 799-807.
- Shakhnovich, E., Farztdinov, G., Gutin, A. M & Karplus, M. (1991). Protein folding bottlenecks: A lattice Monte Carlo simulation. *Phys. Rev. Lett.* 67: 1665-1668.
- Shirmer, E. C., Glover, J. R., Siger, M. A. & Lindquist, S. (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 21: 289-296.
- Silva, J.L., Miles, E.W. & Weber, G. (1986). Pressure dissociation and conformational drift of the β -dimer of tryptophan synthase. *Biochemistry.* 25: 5780–5786.
- Sosnick, T. R., Mayne, L., Hiller, R. & Englander, S. W. (1994). The barriers in protein folding. *Nat. Struct. Biol.* 1: 149-156.
- Stryer, L. (1965) The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* **13**: 482-495.

- Studier, W. F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.
- Sunde, M. & Blake, C. (1997). The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.* 50:123-159.
- Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B. & Blake, C.C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol.Biol.* 273 (3): 729-739.
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F. U. & Flanagan, J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.* 15: 408-417.
- Szabo, A., Langer, T., Schroder, H., Flanagan, J., Bukau, B. & Hartl, F. U., (1994). The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. USA* 91: 10345-10349.
- Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Adv. Prot. Chem.* 23: 123-282.
- Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F. & Neve, R. L. (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331: 528-530.
- Thomas, P. J., Qu, B. H. & Pedersen, P. L. (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* 20:456-459.
- Tiroli, A.O. & Ramos, C.H.I. (2007) Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane. Involvement of a specific region located at the N-terminus with substrate specificity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 39: 818-831.
- Tiroli-Cepeda, A.O. & Ramos, C.H.I. (2011). Heat causes oligomeric disassembly and increases the chaperone activity of small heat shock proteins from sugarcane. *Plant Physiol. Biochem.* 48 (2-3): 108-116.
- Tsai, J. & Douglas, M.G. (1996). A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J. Biol. Chem.* 271 (16): 9347-9354.
- Ungermann, C., Neupert, W. & Cyr, D. M. (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* 266: 1250-1253.
- Vassar, P. S. & Culling, C. F. (1959). Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch. Pathol.* 68: 487-498.
- Voet, D. & Voet, J.G. (2006) Bioquímica. 3ª edição, Editora Artmed.

- Wagner, C. & Kiefhaber, T. (1999). Intermediates can accelerate protein folding. *Proc. Natl. Acad. USA*. 96: 6716-6721.
- Willard, H. F. (1993). The needle found!!! Trinucleotide repeat expansion in the Huntington's disease gene. *Hum. Mol. Genet.* 2: 497-498.
- Withford, D. (2005). *Proteins: Structure and Function*. John Wiley & Sons, England.
- Wyatt, P. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*. 272: 1-40.
- Yan, W. & Craig, E.A. (1999). The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol. Cell. Biol.* 19 (11): 7751-7758.
- Zhang, X. & Studier, F.W. (1997). Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme. *J. Biol. Chem.* 269 (1): 10-27.
- Zhang, R., Hu, X., Khant, H., Ludtke, S.J., Chiu, W., Schmid, M.F., Frieden, C., Lee, J.M. (2009). Interprotofilaments interactions between Alzheimer's A β_{1-42} peptides in amyloid fibrils revealed by cryoEM. *Proc. Natl. Acad. USA*. 106 (12): 4653-4658.

8. CURRICULUM VITAE

Thiago Vargas Seraphim

e-mail: tvs0604@gmail.com

Formação acadêmica:

- **Mestrado em Biologia Funcional e Molecular** (Área de concentração: Bioquímica)
Universidade Estadual de Campinas
- **Graduação em Ciências Biológicas** – Licenciatura e Bacharelado
Pontifícia Universidade Católica de Campinas
- **Curso técnico em Bioquímica**
Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado

Formação complementar:

- (2009) **Lab Training on Advanced Fluorescence Techniques (25 horas)** -
Universidade Federal do Rio de Janeiro
- (2008) **Expressão Heteróloga de Proteínas (6 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*
- (2008) **Enovelamento de Proteínas: Mecanismos e Conseqüências Médicas (6 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*

- (2007) **O Telômero e Seu Papel no Câncer e Envelhecimento (4 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*
- (2007) **Bases do Melhoramento Genético (34 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*
- (2006) **Citogenética de Anuros (4 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*
- (2006) **Evolução Humana (4 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*
- (2006) **Tecnologia Aplicada à Pesquisa Científica Biológica (34 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*
- (2006) **Imunologia: A Guerra Dentro de Nós (17 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*
- (2006) **Espectrometria de Absorção Atômica e ICP/OES (8 horas)** - *T&E Analítica Comércio e Análises Químicas Ltda.*
- (2005) **ABC da Busca Bibliográfica: Internet no Trabalho Científico (34 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*
- (2005) **Citogenética e Genética Molecular (10 horas)** - *Pontifícia Universidade Católica de Campinas*

Atuação Profissional:

- **Mestrado em Biologia Funcional e Molecular**
Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos
Universidade Estadual de Campinas
- **Programa de Estágio Docente C**
Supervisionado pela Prof. Dra. Eneida de Paula
Disciplina Morfofisiologia Humana I (Módulo Bioquímica)
Universidade Estadual de Campinas
- **Iniciação Científica**
Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin
Laboratório Nacional de Biociências (antigo CeBiME-LNLS)
- **Estágio de Nível Técnico**
T&E Analítica Comércio e Análises Químicas Ltda.

Idiomas:

- **Inglês:** Compreende Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente e Fala Razoavelmente.

Produção Bibliográfica:

Artigos Científicos

- Nakahira, M., Macedo, J.N.A., Seraphim, T.V., Cavalcante, N., Souza, T.A.C.B., Damalio, J.C.P., Reyes, L.F., Assman, E.M., Alborghetti, M.R., Garrat, R.C., Araujo, A.P.U., Zanchin, N.I.T., Barbosa, J.A.R.G. & Kobarg, J. (2010) **A draft of the human septin interactome**. *PLoS One*, 5 (11) : e13799.

Trabalhos Publicados em Anais de Congresso

- Seraphim, T.V., Tiroli-Cepeda, A.O. & Ramos, C.H.I. **Biochemical and Biophysical Studies of a Novel Type I Hsp40 Molecular Chaperone from Sugarcane**. *3rd International Workshop on Spectroscopy for Biology*, 2010.
- Seraphim, T.V. & Zanchin, N.I.T. **Identification of proteins interacting with human septins 3 and 9**. *XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB)*, 2008.
- Seraphim, T.V. & Zanchin, N.I.T. **Identification of proteins interacting with human septins 3 and 9**. *18^a Reunião Anual do Usuários do LNLS*, 2008.

Participação em Eventos:

- (2010) **39^a Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biológicas da PUC-Campinas**. *Avaliador na Mostra de Trabalhos de Conclusão de Curso e Práticas Integradas*.
- (2010) **3rd International Workshop on Spectroscopy for Biology**. *Apresentação de painel e apresentação oral: Biochemical and Biophysical Studies of a Novel Type I Hsp40 Molecular Chaperone from Sugarcane*.
- (2009) **IV CeBiME/LNLS Structural Molecular Biology Workshop: Techniques, Tools and Development in Protein Crystallization**.
- (2009) **2nd South American Workshop on Advanced Fluorescence Techniques: From Spectroscopy to Microscopy**.
- (2008) **18^a Reunião Anual dos Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron**. *Apresentação de painel: Identification of proteins interacting with human septins 3 and 9*.

- (2008) **XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB).** *Apresentação do painel: Identification of proteins interacting with human septins 3 and 9.*
- (2008) **Congresso Interno de Iniciação Científica CNPq/PIBIC.** *Apresentação oral: Identificação de proteínas que interagem com as septinas humanas 3 e 9.*
- (2008) **XXXVII Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biológicas da PUC-Campinas.**
- (2007) **17ª Reunião Anual dos Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.**
- (2007) **Congresso Interno de Iniciação Científica CNPq/PIBIC.** *Apresentação oral: Análise das interações das septinas humanas 3 e 9.*
- (2007) **XXXVI Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biológicas da PUC-Campinas.**
- (2006) **XXXV Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biológicas da PUC-Campinas.**
- (2005) **XXXIV Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biológicas da PUC-Campinas.**