

VIVIANE CRISTINA HEINZEN DA SILVA

**“Caracterização estrutural e funcional das chaperonas Hsp100 e Hsp90
de *Saccharum* spp. (cana-de-açúcar)”.**

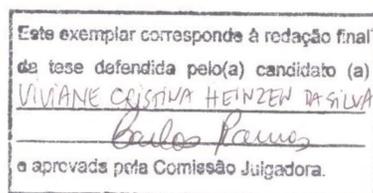
**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

VIVIANE CRISTINA HEINZEN DA SILVA

**“Caracterização estrutural e funcional das chaperonas Hsp100 e Hsp90 de
Saccharum spp. (cana-de-açúcar)”.**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Si38c Silva, Viviane Cristina Heinzen da, 1984-
Caracterização estrutural e funcional das chaperonas
Hsp100 e Hsp90 de *Saccharum* spp. (cana-de-açúcar) /
Viviane Cristina Heinzen da Silva. – Campinas, SP: [s.n.],
2013.

Orientador: Carlos Henrique Inácio Ramos.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Chaperonas moleculares. 2. Proteínas de choque
térmico HSP90. 3. Proteínas de choque térmico
HSP100. 4. Cana-de-açúcar. I. Ramos, Carlos
Henrique Inacio. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Structural and functional characterization of the Hsp90 and Hsp100
chaperones from *Saccharum* spp. (sugarcane)

Palavras-chave em Inglês:

Molecular chaperones
HSP90 Heat-shock proteins
HSP100 Heat-shock proteins
Sugarcane

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Henrique Inácio Ramos [Orientador]
Leandro Ramos Souza Barbosa
Ana Paula Ulian de Araujo
Flavio Henrique da Silva
Ana Olívia Tiroli Cepeda

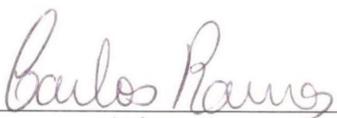
Data da defesa: 25-04-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

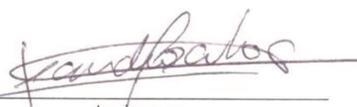
Campinas, 25 de abril de 2013

BANCA EXAMINADORA

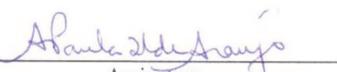
Prof. Dr. **Carlos Henrique Inácio Ramos** (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. **Leandro Ramos Souza Barbosa**


Assinatura

Profa. Dra. **Ana Paula Ulian de Araújo**


Assinatura

Prof. Dr. **Flavio Henrique da Silva**


Assinatura

Dra. **Ana Olivia Tiroli Cepeda**


Assinatura

Dr. **Celso Eduardo Benedetti**

Assinatura

Prof. Dr. **Hiroshi Aoyama**

Assinatura

Prof. Dr. **Mário Tyago Murakami**

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "**Caracterização estrutural e funcional das chaperonas Hsp100 e Hsp90 de *Saccharum spp. (cana-de-açúcar)***":

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

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. **CHIR 2009-2**, Instituição: IQ/Unicamp.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** 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.*

Viviane Cristina Heuzen de Silva
Aluno: (nome completo)

Paulo Rocco
Orientador: (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Marcelo

Carimbo e assinatura

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos a oportunidade, orientação, a supervisão dos experimentos, relatórios e demais trabalhos científicos. Agradeço ainda, o acesso ao conhecimento de diversas técnicas experimentais, as discussões científicas e todo apoio necessário para o bom transcorrer desta tese.

À Coordenação, professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Departamento de Bioquímica (Instituto de Biologia-UNICAMP) que possibilitaram a realização deste trabalho. Agradeço também a oportunidade de participar do Programa de Estágio Docente (PED) como parte de minha formação para o exercício de ensino-pesquisa, e aos professores que me orientaram durante os estágios: Profa. Dr. Ana Maria de Lima Azeredo-Spin e Prof. Dr. Eduardo Galembeck.

Ao Instituto de Química da Unicamp, pelas instalações do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Laboratório Institucional de Manipulação de OGMs, e Laboratório Institucional de Espectroscopia e Dicroísmo Circular.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), instalações do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pela excelente infra-estrutura e equipe técnica, onde parte dos experimentos foram realizados.

Ao professor Dr. Paulo Arruda pela concessão de material de cana-de-açúcar, e ao projeto SUCEST pela disponibilização de seqüências.

Ao professor Dr. Claudio Akio Masuda pela receptibilidade, ensinamentos e concessão de cepas de leveduras.

Aos colaboradores que muito contribuíram para a realização deste trabalho: professor Dr. Júlio César Borges e Dr. Thiago Carlos Cagliari que iniciaram e bem encaminharam este trabalho; professora Dra. Ljubica Tasic e Dra. Alessandra Prando pelo apoio, atenção e dedicação; professor Dr. Fábio Cezar Gozzo, pela oportunidade, apoio e valiosas discussões científicas, igualmente compartilhadas pela dedicada Tatiani Brenelli de Lima.

Aos professores que participaram da banca de minha qualificação: Prof. Dr. Jörg Kobarg, Prof. Dr. Cláudio C. Werneck, e Dra. Ana Olivia Tiroli-Cepeda, pela atenção e sugestões para melhoria desta tese.

Agradeço a todos os integrantes do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos pela interação durante estes 4 anos. Pelo apoio técnico e ótima convivência: à Bárbara Leite, Michelle Alexandrino, Jéssica Brenda, Mariana Peres, Claudia Maria, Aline Coelho, Vanessa Sylvestrin. Aos companheiros de pesquisa, que muito contribuíram por meio de discussões científicas e compartilhamento de experiências: Daniel Corrêa, Ana Olivia, Yuri Mendonça, Letícia Zanphorlin, Glaucia Squizato, Bárbara Peres, João Paulo, Herbert Barbosa, e Bruna Maciel (praticamente integrante do grupo também). Meu agradecimento muito especial à Melissa Regina Fessel, à Danieli Cristina Gonçalves, e ao David Zachary Mokry pelos inúmeros protocolos, ensinamentos, e pelo grande apoio (e sempre imediato!).

À CAPES, que financiou diretamente a realização deste projeto com a concessão da bolsa de doutorado; e às demais agências de fomento e outros financiamentos: FAPESP, CNPq, FUNCAMP, INCT-INBEB.

Agradeço com carinho aos amigos de todas as horas: Alexandre Ventura, Ana Blanco, Douglas Frabetti, Marcel Esteves, Nanci Gardim, Iara Bolson, Stella Ferraz, que por esse período ouviram tanto falar das “*lavaduras*” e das “*vaictérias*”!

Em especial, agradeço a Deus e a minha querida família. Aos meus pais Luiz da Silva e Terezinha Heinzen da Silva, que sempre me incentivaram nos estudos, aguentaram a distância, e principalmente, representam meu exemplo a ser seguido pelo caminho da honestidade, paciência e amor, o verdadeiro “doutorado da vida”. Agradeço aos meus irmãos Evandro Luiz e Fernando Henrique, e ao querido Ewerton Luiz, que sempre me deram o apoio incondicional, amizade e carinho. Aos demais familiares, pelo carinho e incentivo.

Muito obrigada.

Viviane Cristina Heinzen da Silva

RESUMO

As chaperonas moleculares estão envolvidas na manutenção da homeostase celular, auxiliando no correto enovelamento de proteínas, e conseqüentemente em sua funcionalidade. Duas famílias de chaperonas moleculares participam de pontos-chave neste sistema. Uma delas é a Hsp100 que tem papel importante na desagregação de proteínas; a outra é a Hsp90 que tem o papel de auxiliar no enovelamento, ativação, e na translocação de proteínas regulatórias e sinalizadoras. Neste trabalho foram caracterizadas as chaperonas Hsp100 e Hsp90 de cana-de-açúcar, denominadas SHsp101 e SsHsp90, respectivamente, cuja expressão em níveis basais foi detectada em tecido foliar. As proteínas recombinantes foram produzidas em *Escherichia coli*, de maneira solúvel, e após purificação apresentaram-se enoveladas. A SHsp101 foi obtida como um hexâmero em solução, apresentando capacidade de ligar nucleotídeos ATP e ADP, e de hidrolisar o ATP de maneira alostérica com cooperatividade positiva; mas não foi capaz de hidrolisar o ADP, que por sua vez mostrou-se inibidor da atividade ATPásica. A SHsp101 exibiu atividades de proteção do substrato luciferase contra agregação induzida por alta temperatura e de desagregação e reenovelamento da proteína-modelo GFP_{uv}, na presença de ATP e ATP λ S. Análises de complementação *in vivo* revelaram que a superexpressão heteróloga de SHsp101 em cepas de levedura mutantes nulo de *hsp104*, aumentou a termotolerância a 53°C, proporcionando um aumento de 80 vezes na sobrevivência das leveduras. A SsHsp90, apresentou-se dimérica em solução, com características estruturais e conformacionais (modelo tridimensional gerado por modelagem comparativa e validado por meio de análises de ligação cruzada acoplada à espectrometria de massas) semelhantes à homólogas de outros organismos. A SsHsp90 apresentou atividade chaperona de proteção contra agregação da proteína-modelo citrato sintase desnaturada por choque térmico. As informações acerca da expressão, estrutura, e função de SHsp101 e SsHsp90 obtidas neste trabalho, contribuem para um melhor entendimento destas famílias de chaperonas moleculares, particularmente em plantas, que por serem organismos sésseis, estão mais expostos às condições adversas do ambiente.

ABSTRACT

Molecular chaperones are involved in the maintenance of cellular homeostasis by promoting the correct folding of proteins, and consequently, ensuring their functionality. Two families of molecular chaperones participate at key points in this system. The first is Hsp90, which assists in protein refolding, activation, and the trafficking of regulatory and signaling proteins, while the second is Hsp100, which has an important role in protein disaggregation. In this study, the Hsp90 and Hsp100 proteins from sugarcane were characterized, denoted as SsHsp90 and SHsp101, respectively, and their basal level of expression was detected in leaf tissue. In addition, both were produced by *Escherichia coli* as soluble form and then they were purified in a folded state. The SHsp101 was obtained folded as hexamer in solution and showed capacity of bind both ATP and ADP, but could only hydrolyze ATP in an allosteric manner with positive cooperativity. In fact, the presence of ADP had an inhibitory effect on the ATPase activity. SHsp101 exhibited protection against aggregation of luciferase, and showed a disaggregation and refolding activity of *GFPuv* in the presence ATP and ATP λ S. *In vivo* complementation analysis revealed that heterologous overexpression of SHsp101 in a null *hsp104* yeast strain correlated with an 80 fold increase in yeast survival at 53°C. The dimer obtained for SsHsp90 had similar structural and conformational characteristics compared to other Hsp90 homologues, and was compatible with a three-dimensional model generated by comparative modeling, which was validated by cross-linking coupled to mass spectrometry. The SsHsp90 protected against thermal aggregation of citrate synthase. Taken together, the information about the expression, structure, and function of SHsp101 and SsHsp90 obtained in this study contribute to a better understanding of these molecular chaperone protein families, particularly in plants, which are sessile organisms and more exposed to adverse environmental conditions.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å: Angstrom (1×10^{-10} metros);

A: Absorbância

ADP: adenosina 5' di-fosfato;

Amp^r: ampicilina;

AMPPNP: adenosina 5'-(β,γ -imido)trifosfato (análogo do ATP);

atm: unidade de pressão atmosférica;

ATP: adenosina 5' tri-fosfato;

°C: graus Celsius;

CD: dicroísmo circular;

cDNA: DNA complementar;

ClpB: subclasse de proteína da família Hsp100 presente em bactéria;

Cryo-EM: *Cryo-Electron Microscopy* (criomicroscopia eletrônica);

CS: Citrato Sintase;

D: coeficiente de difusão;

$D_{20,w}^0$: coeficiente de difusão em água e na temperatura de 20 °C;

$D_{20,w}$: coeficiente de difusão em água, na temperatura de 20 °C extrapolado para concentração zero de proteína;

Da: Dalton;

Deg: grau (degree);

DLN1: domínio de ligação ao nucleotídeo localizado no N-terminal da Hsp104/ClpB;

DLN2: domínio de ligação ao nucleotídeo C-terminal da Hsp104/ClpB;

DLS: Espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering);

DNA: ácido desoxirribonucléico;

dNTPs: 5' trifosfato de 2' desoxiribonucleotídeo;

DTT: ditioneitol;

EDTA: Ácido etilenodiamino-tetra-acético;

EMR: elipticidade molar residual;

EST: etiqueta de seqüência expressa (*Expressed Sequence Tag*);

f: coeficiente friccional;

f_0/f : razão friccional ou fator de Perrin;

FRET: transferência de energia por ressonância

GA: geldanamicina;

GFPuv: variante da proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*) com emissão de fluorescência quando excitada por luz ultravioleta;

GdnCl: cloreto de guanidina;

HSF: fator de transcrição de choque térmico (*Heat Shock Factor*);

Hsp: proteína de choque térmico (*Heat Shock Protein*);

Hsp90: proteína de choque térmico de 90 kDa;

Hsp100: proteína de choque térmico de 100 kDa;

Hsp101: subclasse de proteína da família Hsp100 presente em plantas;

Hsp104: subclasse de proteína da família Hsp100 presente em levedura;

HSR: resposta ao estresse (*Heat Shock Response*);

Hsp40: proteína de choque térmico de 40 kDa;

Hsp70: proteína de choque térmico de 70 kDa;

Hsp75/Trap1: Hsp90 homóloga mitocondrial;

Hsp90: proteína de choque térmico de 90 kDa;

Hsp90 α : Hsp90 homóloga citosólica induzida por estresse;

Hsp90 β : Hsp90 homóloga citosólica constitutiva;

HtpG: Hsp90 ortóloga de bactéria;

IPTG: isopropiltiol- β -D-galactosídeo;

kDa: quiloDalton ($1,66 \times 10^{-21}$ g);

Kan^r: Canamicina;

l: comprimento do caminho óptico;

L: litro;

LDH: lactato desidrogenase;

MD: domínio intermediário;

min: minutos;

MM: massa molecular;

M: molar;

mM: milimolar;

MOPS: Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico;

n: número de resíduos de aminoácidos da proteína;

NADH/H⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida;

NBD: domínio de ligação ao nucleotídeo;

NLS: sinal de localização nuclear;

nm: nanômetro (10^{-9} metros);

PCR: reação em cadeia da DNA polimerase;

PDB: banco de dados de proteínas;

PEP: fosfoenolpiruvato de sódio hidratado

PK: piruvatoquinase

RNA_m: RNA mensageiro;

s: segundos;

S: Svedberg (10^{-13} segundos);

SAXS: Espalhamento de raios X à baixos ângulos

SDS: dodecil-sulfato de sódio;

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS;

SEC-MALS: gel filtração acoplada a espalhamento de luz em multi-ângulos;

SE: Sedimentação em Equilíbrio;

smHsp: proteína de choque-térmico da família *Small*;

SUCEST: projeto de sequenciamento de EST de cana-de-açúcar;

TClpB: proteína de choque térmico da família Hsp100, subclasse ClpB de *Thermus thermophilus*;

TPR: tetratricopeptídeo;

Trp: triptofano;

UCA: ultracentrifugação analítica;

U.A.: unidade arbitrária;

VS: velocidade de sedimentação;

v:v: volume:volume;

λ : comprimento de onda;

θ : elipticidade;

$[\theta]$: elipticidade molar residual;

ϵ : coeficiente de absorvância molar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS	1
1.2 CHAPERONAS MOLECULARES	5
1.3 A IMPORTÂNCIA DAS CHAPERONAS EM PLANTAS	9
1.4 OBJETIVOS	11
1.4.1 OBJETIVOS GERAIS	11
1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PCR E SEQUENCIAMENTO	12
2.2 PLASMÍDEOS	13
2.3 BACTÉRIAS E LEVEDURAS	14
2.3.1 Meios de cultura para propagação de <i>E. coli</i>	14
2.3.1.1 Meio LB (Luria Bertani) (Sambrook et al., 1989)	14
2.3.2 Meios de cultura e soluções para propagação de <i>S. cerevisiae</i>	15
2.3.2.1 Meio completo YPDA (Sherman, 2002)	15
2.3.2.2 Meio sintético completo SC – Ura (Sherman, 2002)	15
2.3.2.3 Meio sintético completo SC Galactose –Ura (Sherman, 2002)	15
2.3.2.4 Meio sintético SD (Sherman, 2002)	15
2.3.2.5 Meio sintético SD Galactose (Sherman, 2002)	16
2.3.2.6 Mistura de aminoácidos sem uracila (Sherman, 2002)	16
2.4 TAMPÕES E SOLUÇÕES PARA EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> COM SHSP101	16
2.5 TÉCNICAS DE CLONAGEM MOLECULAR	17
2.5.1 Isolamento de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	17
2.5.2 Purificação de fragmentos de DNA	18
2.5.3 Clonagem de vetor de levedura	18
2.5.4 Isolamento de DNA plasmidial de levedura	19
2.6 ANÁLISES DE ATIVIDADE <i>IN VIVO</i> DE SHSP101	20
2.6.1 Condições de crescimento de levedura	20
2.6.2 Análise de termotolerância	20
2.7 ANÁLISES DE ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DE SHSP101	21
2.7.1 Expressão em <i>E. coli</i> e purificação das proteínas recombinantes	21
2.7.2 Determinação da Concentração de Proteínas	22
2.7.3 Ensaio de Atividade Enzimática ATPásica	23
2.7.4 Experimentos de espalhamento de luz	25
2.7.5 Experimentos de desagregação da GFP inativada termicamente	25
3 CAPÍTULO HSP100	27
3.1 A CLASSE DE PROTEÍNAS HSP100/CLPB	27
3.1.1 Arquitetura das proteínas Hsp104/ClpB	30
3.1.2 Estado oligomérico	33
3.1.3 Atividade ATPásica	34

3.1.4 Atividade desagregase	36
3.1.5 Hsp100/ClpB em plantas	40
PARTE I.....	43
3.2 ARTIGO CIENTÍFICO: A HSP101 DE CANA-DE-AÇÚCAR É UMA PROTEÍNA HEXAMÉRICA QUE LIGA NUCLEOTÍDEOS.....	43
PARTE II.....	69
3.3 A HSP101 DE CANA-DE-AÇÚCAR E SUA ATIVIDADE ATPÁSICA E DE TERMOTOLERÂNCIA	69
3.3.1 Resultados	70
3.3.1.1 Atividade ATPásica da SHsp101.....	70
3.3.1.1.2 Influência de outros agentes na atividade ATPásica da SHsp101	71
3.3.1.1.3 Influência da concentração de ATP na atividade da SHsp101	73
3.3.1.1.4 Inibição pelo ADP	73
3.3.1.2 Ensaio de proteção contra agregação da luciferase desnaturada termicamente.....	78
3.3.1.3 Ensaio de reativação da GFP desnaturada térmicamente	79
3.3.1.4 Termotolerância de levedura expressando SHsp101.....	80
3.3.1.5 Alinhamento das sequências das proteínas Hsp100/ClpB	82
3.4 DISCUSSÃO.....	85
3.4.1 Parte I: A Hsp101 de cana-de-açúcar é uma proteína hexamérica que liga nucleotídeos.....	85
3.4.2 Parte II: A Hsp101 de cana-de-açúcar e sua atividade ATPásica e de termotolerância.....	87
4 CAPÍTULO HSP90	93
4.1 A FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS HSP90	93
4.1.1 Hsp90 em plantas.....	99
4.2 ARTIGO CIENTÍFICO: CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL E FUNCIONAL DE HSP90 DE CANA-DE-AÇÚCAR.	101
4.3 DISCUSSÃO: CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL E FUNCIONAL DE HSP90 DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	128
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	133
6 REFERÊNCIAS	137

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos para PCR e clonagem em vetor de expressão pRS316GU em levedura	12
Tabela 2: Oligonucleotídeos para o sequenciamento da SHsp101	12
Tabela 3: Plasmídeos	13
Tabela 4: Bactérias e Leveduras	14
Tabela 5: Representantes da família de proteínas Hsp100/ClpB.....	29
Tabela 6: Constantes enzimáticas derivadas da equação de Hill.....	77
Tabela 7: Representantes da Família Hsp90	95
Figura 1: Ilustração do funil de energia do enovelamento e agregação proteicos.....	3
Figura 2: Agregados proteicos.....	5
Figura 3: Participação das chaperonas em diferentes processos celulares.....	8
Figura 4: Organização dos domínios em proteínas da família Hsp100/Clp.	28
Figura 5: Organização estrutural de Hsp100/ClpB.	31
Figura 6: Modelo de desagregação pela Hsp100/ClpB.	40
Figura 7: Cinética da atividade ATPásica da SHsp101.	70
Figura 8: Efeito da temperatura na atividade ATPase da SHsp101.....	72
Figura 9: Efeito do etanol e do cloreto de guanidina na atividade ATPásica da SHsp101.	72
Figura 10: Atividade ATPásica da SHsp101 dependente de concentração de ATP.....	73
Figura 11: Inibição da atividade ATPásica da SHsp101 por ADP.	74
Figura 12: Atividade ATPásica da SHsp101 dependente de concentração de ATP na presença de sistema regenerador de ATP.....	76
Figura 13: Cinética de hidrólise de ATP pela SHsp101.	77
Figura 14: Atividade chaperona de SHsp101 na proteção contra agregação da luciferase desnaturada por choque térmico a 42°C..	78
Figura 15: Reativação da GFP pela SHsp101	80
Figura 16: Expressão de SHsp101 complementa fenótipo de termotolerância em levedura nocaute <i>hsp104</i>	81
Figura 17: Sobrevivência ao choque de 53°C por 20 minutos.	82
Figura 18: Alinhamento múltiplo de seqüências de proteínas Hsp100/ClpB	84
Figura 19: A rede de interação da proteína Hsp90 citosólica humana	94
Figura 20: Estruturas da Hsp90.	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enovelamento de proteínas

As proteínas são polímeros formados por uma sequência definida de aminoácidos, correspondendo às macromoléculas biológicas mais complexas e versáteis quando analisadas sob o ponto de vista estrutural (Nelson e Cox, 2008). Suas sequências de aminoácidos lineares adotam uma estrutura tridimensional característica, também denominada de estrutura nativa ou enovelamento proteico. O enovelamento proteico é mantido, principalmente, por interações não-covalentes entre cadeias laterais de aminoácidos, onde as estruturas secundárias (hélices alfa, folhas beta e voltas), terciária (arranjo tridimensional) e quaternária se encontram completamente definidas (Wegele et al., 2004; Ramos e Ferreira, 2005). Esta estrutura é essencial para sua estabilidade e atividade biológica, existindo algumas exceções de proteínas intrinsecamente desenoveladas que são funcionais (Tompa, 2005; Dyson e Wright, 2005).

As teorias sobre a habilidade das proteínas de se enovelarem *de novo* para seu estado nativo e funcional foram inicialmente baseadas no trabalho pioneiro de Anfinsen e colaboradores, onde se postulou que a estrutura nativa de uma proteína seria o estado termodinamicamente mais estável e de menor energia e que seu enovelamento depende apenas da sequência de aminoácidos e das condições da solução onde a proteína se encontra (Anfinsen et al., 1961; Anfinsen, 1973). Na mesma década, Cyrus Levinthal demonstrou que o número de possíveis conformações que uma dada cadeia polipeptídica pode alcançar é tão grande, que mesmo a busca por conformações nativas possíveis de uma pequena proteína exigiria um tempo infinitamente longo (Levinthal, 1969; revisto em Dobson, 2003). A enorme diferença entre o tempo calculado, assumindo essa busca randômica pela conformação nativa, e o tempo real observado experimentalmente para o enovelamento proteico ficou conhecida como *paradoxo de Levinthal*.

Atualmente sabe-se que o processo de enovelamento proteico é descrito por modelos termodinâmicos baseados na busca por um estado de mínimo de energia livre, único e específico para cada polipeptídeo (modelo do *funil de enovelamento*, Figura 1). O processo de enovelamento depende do ambiente onde a proteína se encontra e é determinado por propriedades termodinâmicas e de cinética de reações em cadeia (Dill e Chan, 1997; Dobson e Karplus, 1999; Galzitskaya et al., 2001; Jahn e Radford, 2005).

In vivo o processo de enovelamento proteico é mais complexo, pois mais fatores devem ser levados em consideração, apesar dos princípios fundamentais discutidos anteriormente serem universais. Dentro das células, o enovelamento proteico deve ser mais rápido, ocorrendo em minutos ou segundos, em contraste do que ocorre em alguns protocolos *in vitro* que requerem horas ou dias. Além disso, o enovelamento se inicia quando a proteína ainda está sendo sintetizada no ribossomo, e em um ambiente denso de moléculas tais como outras proteínas, DNA, carboidratos, íons, etc. Este ambiente desfavorável a interações produtivas favorece a formação de intermediários da proteína nativa ou proteínas instáveis, fortemente susceptíveis a mudanças do ambiente celular, podendo levar a formação de agregados proteicos por meio de exposição ao solvente dos resíduos que, no estado nativo, estariam internalizados (Frydman e Hartl, 1996; Agash e Hartl, 2000; Turner e Varshavsky, 2000; Goodsell, 1991; Fersht e Gaggett, 2002).

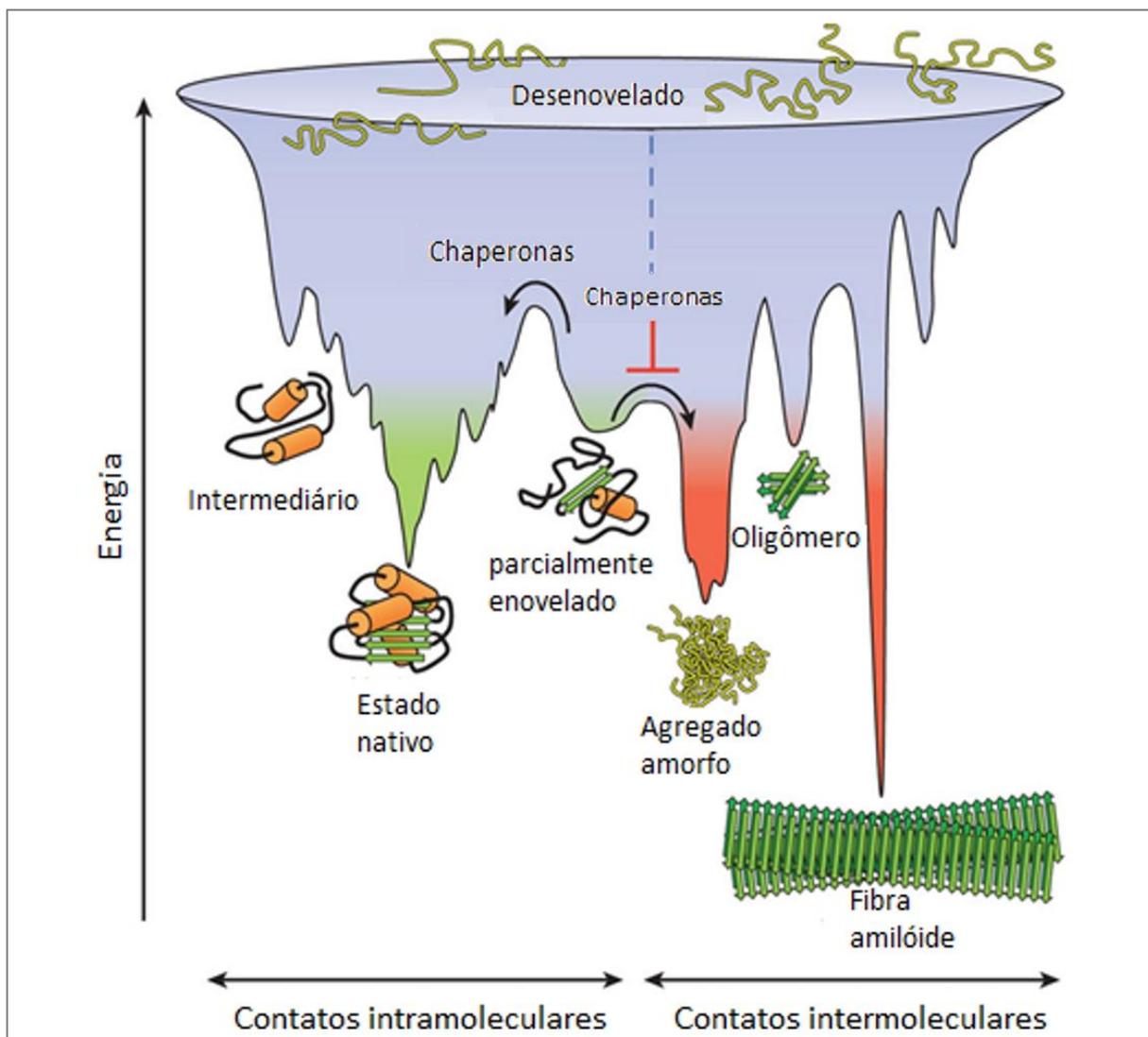


Figura 1: Ilustração do funil de energia do enovelamento e agregação proteicos.

A figura ilustra a rugosidade da superfície do funil (*landscape*) que representa a multiplicidade de estados conformacionais que a cadeia polipeptídica pode assumir por meio de formação de contatos intra-moleculares que levam à formação da estrutura nativa (em verde), com menor energia livre e menor entropia em relação ao estado desenovelado (topo do funil). A rugosidade do funil indica que para alcançar a conformação nativa, a proteína passa por estados intermediários. Em alguns casos, podem ser formados intermediários com energia livre tão baixa que a proteína fica presa neste estado não sendo capaz de atingir, sozinha, seu estado nativo (estado parcialmente enovelado). *In vivo* os passos para que a proteína atinja seu estado nativo são acelerados por chaperonas moleculares (ver a seguir no ítem 1.2). Os intermediários ou as proteínas nativas destabilizadas (estado parcialmente enovelado) podem desviar a rota produtiva e levar ao aparecimento de agregados de contatos inter-moleculares, resultando em formação de agregados amorfos, oligômeros tóxicos ou fibras amilóides ordenadas (estas últimas altamente estáveis, representando um novo mínimo de energia). Esta rota improdutiva é normalmente prevenida pelas chaperonas moleculares. Adaptado de Hartl et al., 2011.

Agregados proteicos (Figura 2) podem exibir uma variabilidade de estruturas, o que pode ser visto em microscopia eletrônica, dependendo da natureza da proteína envolvida e das condições de estresse que levaram à agregação (Kawai-Noma et al., 2010; Wang et al., 2010b). Agregados induzidos por choque térmico apresentam uma estrutura desordenada ou amorfa causada pela co-agregação de uma diversidade de espécies de proteínas desenoveladas (Tyedmers et al., 2010). Em contraste, um conjunto mais limitado de proteínas formam agregados estruturalmente organizados, denominados amilóides. Agregados amilóides são compostos por estruturas ricas em folhas beta que, empilhadas, formam uma estrutura altamente estável: as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos de fitas beta adjacentes se intercalam e interagem entre si por ligações de hidrogênio, gerando uma interface livre de água (Nelson et al., 2005), onde as fitas beta individuais estão arranjadas de forma perpendicular ao eixo da fibra, espaçadas pela distância de 4,7-4,8 Å (Chiti e Dobson, 2006, Figura 2).

Um subgrupo de proteínas amiloidogênicas são os príons (termo derivado da expressão em inglês “**proteinaceous infectious particle**”), capaz de assumir ao menos duas conformações, uma nativa e outra agregada. A estrutura agregada é rica em folhas beta e capaz de induzir mudança conformacional de outras proteínas nativas, possui alta resistência à degradação causada por proteases e alta insolubilidade, mesmo na presença de detergentes como SDS (Prusiner, 1998). Todas estas características dos diversos tipos de agregados os tornam tóxicos para as células, originando muitas doenças, entre elas as conhecidas como amiloidoses, geralmente neurodegenerativas no caso de organismos humanos, como: Alzheimer, Parkinson, Huntington, amiloidose sistêmica senil, polineuropatia familiar amiloidótica (Westermarck et al., 1990; Ghiso et al., 1994; Kelly, 1996); as priônicas responsáveis pelas doenças chamadas Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) em mamíferos (Prusiner, 1998), como as síndromes de insônia familiar fatal e a de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, e a encefalopatia espongiforme bovina (mal da vaca louca) (Johnson, 2005).

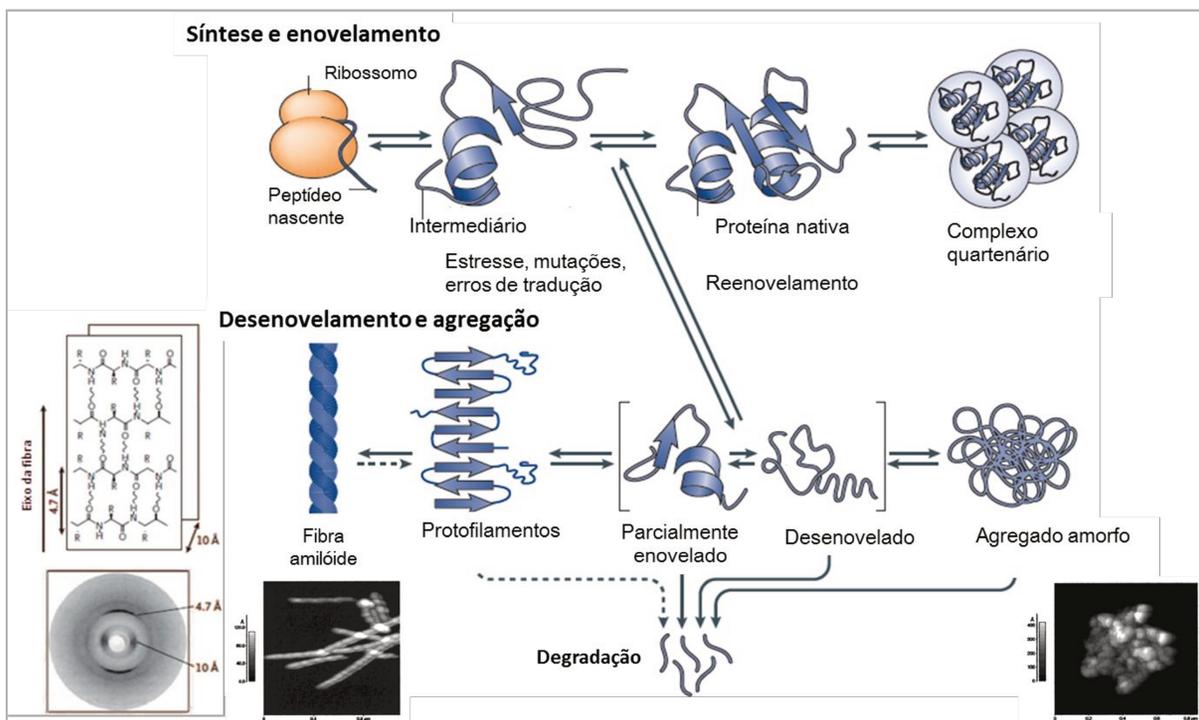


Figura 2: Agregados proteicos.

A proteína desde sua síntese no ribossomo e passagem por diferentes intermediários até sua estrutura nativa. Intermediários desenovelados podem ser reenovelados em sua estrutura nativa ou podem ser degradados por diferentes rotas celulares (conforme detalhado adiante no item 1.2) para prevenir o acúmulo de agregados proteicos. Agregados proteicos podem ser formados, por exemplo, quando ocorre falha do sistema de controle de qualidade celular e por condições contínuas de estresse que levam ao acúmulo de proteínas aberrantes. Quando formados, os agregados podem variar em diferentes graus de estrutura, ocorrendo desde agregados desordenados (amorfos) até espécies de protofilamentos que dão origem às estruturas altamente ordenadas de fibras amilóides. No canto esquerdo está representada a estrutura de fibra amilóide rica em folhas beta com assinatura característica na difração de raios X com as distâncias entre as fitas e entre as folhas de 4,7 e 10 Å, respectivamente. Abaixo, imagens obtidas de microscopia de força atômica (retirado de Khurana et al., 2001): canto esquerdo - fibras amilóides; canto direito - depósito de agregados amorfos. Setas contínuas indicam um processo que pode incluir vários passos; setas tracejadas indicam um processo que praticamente não ocorre dentro das células. Adaptado de Tyedmers et al., 2010 e Merlini e Bellotti 2003.

1.2 Chaperonas moleculares

As células desenvolveram uma variedade de estratégias para prevenir essa agregação massiva, por meio de proteínas auxiliares altamente conservadas: as catalisadoras de enovelamento e as *chaperonas* moleculares. Catalisadoras de

enovelamento compreendem proteínas que catalisam os passos limitantes da velocidade de enovelamento proteico, tais como as proteínas dissulfetoisomerases - PDIs (Darby et al., 1994) e peptidil-prolil isomerases – PPIases (Frand et al., 2000). As *chaperonas* moleculares são uma família de proteínas que reconhecem outras proteínas não nativas e seletivamente se ligam a elas, principalmente por suas regiões hidrofóbicas expostas ao solvente. As chaperonas não têm a capacidade de aumentar a taxa de enovelamento de passos individuais do enovelamento proteico, mas de aumentar a eficiência do processo como um todo sem modificar a estrutura nativa final (Figura 1 e 3; Laskey et al., 1978; Hendrick e Hartl, 1993; Fink, 1999; Lund e Ellis, 2008; Dobson, 2003). Além disso, chaperonas auxiliam na prevenção do desenovelamento proteico, na associação/dissociação de proteínas e outras macromoléculas biológicas, no transporte de proteínas para compartimentos sub-celulares específicos, no controle de conformações ativas/inativas, e/ou direcionamento para a degradação (Figura 3).

Uma intervenção ativa no processo de enovelamento requer energia e o ATP é usado pela maioria das chaperonas para seu funcionamento eficiente (Borges e Ramos, 2005; Welch e Brown, 1996; Heinrichs 2010). Algumas classes de chaperonas moleculares têm ainda a capacidade de solubilizar certos agregados (discutidas a seguir no item 3 capítulo Hsp100), uma poderosa característica que pode ser utilizada em terapias contra doenças causadas por proteínas mal enoveladas (Ramos e Ferreira 2005; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2011). Desta maneira, as chaperonas são fundamentais para a manutenção da homeostase celular. A Figura 3 demonstra um esquema exemplificado de como as chaperonas moleculares atuam no controle da qualidade celular.

A principal família de chaperonas moleculares compreende as proteínas de choque térmico, designadas HSP (*heat shock proteins*). Essas proteínas são classificadas conforme sua massa molecular em kDa, e podem ter sub-famílias de acordo com a localização celular, função e padrão de expressão. As cinco principais famílias são Hsp70, Hsp60/Hsp10, Hsp90, Hsp100 e a proteína de choque térmico de baixa massa molecular ou smHsp (Figura 3, Borges e Ramos, 2005; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2011). As proteínas de choque térmico receberam inicialmente esta

denominação por ter sido observada sua síntese em grande quantidade após uma breve exposição das células a temperatura elevada, resultando em um sistema de retroalimentação que respondia a qualquer aumento de proteínas erroneamente enoveladas (Ritossa, 1962, 1996; Tissiere et al., 1974). Contudo, estudos posteriores evidenciaram que as chaperonas também respondem a outros tipos de estresses além da temperatura e podem apresentar síntese constitutiva, sendo importantes na manutenção da homeostase celular em condições ótimas e adversas (Lindquist e Craig, 1988). Atualmente, sabe-se que algumas chaperonas não são HSP e vice-versa, tratando-se de classes de proteínas sobrepostas funcionalmente, mas não idênticas (Lund e Ellis, 2008).

Nas condições em que proteínas incorretamente enoveladas se acumulam nas células eucarióticas, começa uma resposta ao estresse, ou *HSR* (do inglês *heat shock response*). Esta se inicia pela ativação de um fator específico de transcrição, chamado HSF-1 (*Heat Shock Factor* ou fator do choque térmico), que está presente na célula normal como um monômero inativo. Em resposta ao estresse metabólico, rapidamente sofre trimerização, tornando possível sua ligação imediata a uma sequência de nucleotídeos, chamada de HSE (*Heat Shock Element*, ou elemento do choque térmico), localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSPs, o que resulta em alto nível de transcrição dos genes do choque térmico (Sorger, 1991; Mager e Kruijff, 1995; Åkerfelt et al., 2010). Há um crescente interesse pelo entendimento de como esse sistema de regulação molecular atua, bem como a respeito dos processos de enovelamento proteico e o controle do complexo formado por chaperonas moleculares e o sistema de proteólise, os quais são responsáveis pela manutenção da qualidade celular. Tratam-se de alvos de grande valor médico e biotecnológico, visto que o processo de enovelamento, assim como a manutenção e perda da estrutura nativa de proteínas, estão relacionados à ocorrência de diversas doenças (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2011; Wolfe e Cyr, 2011) e seu estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas terapias (com a possibilidade de prevenir e/ou desfazer o enovelamento incorreto e a agregação de proteínas relacionadas a doenças humanas e

de animais domesticados e comercializados), bem como produtos que possibilitem a geração de plantas mais resistentes ou tolerantes aos diversos tipos de estresse.

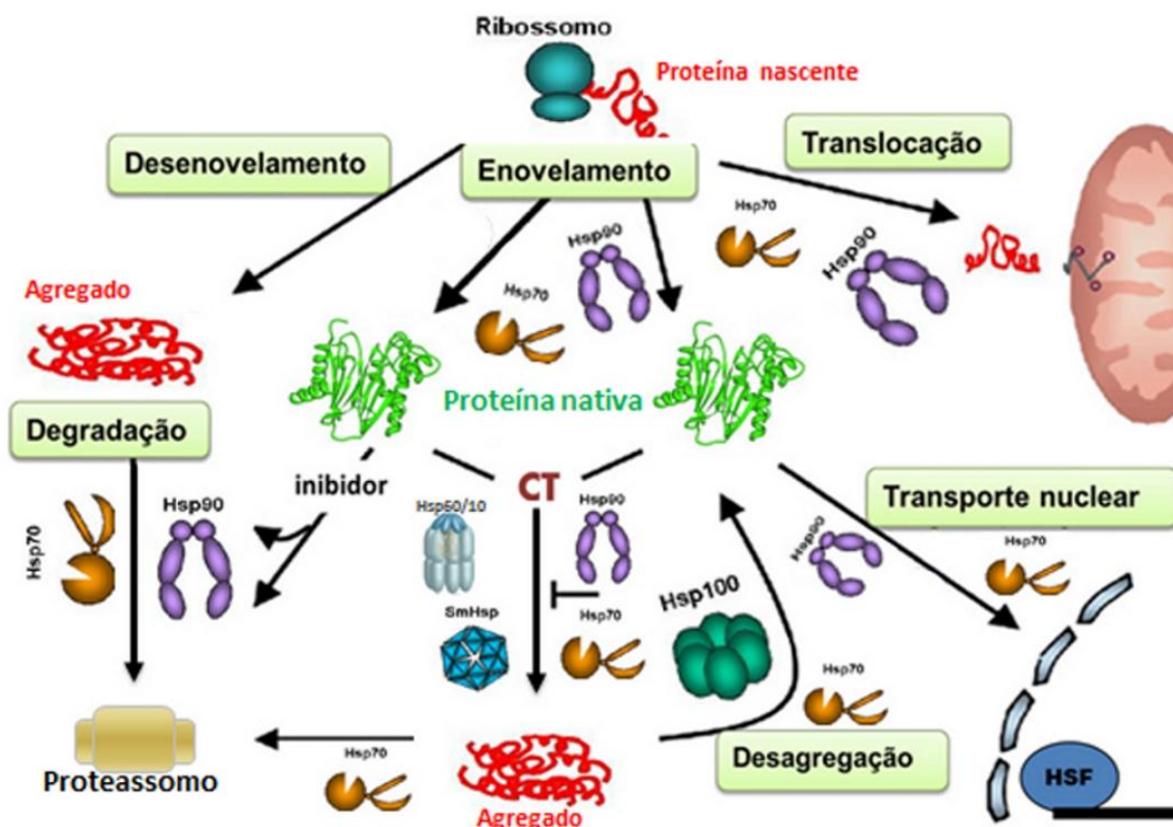


Figura 3: Participação das chaperonas em diferentes processos celulares.

Proteínas recém-sintetizadas, incorretamente enoveladas, e aquelas cuja conformação correta foi alterada por diversos tipos de estresses metabólicos, como choque térmico (CT), são reconhecidas por chaperonas moleculares que auxiliam no seu correto enovelamento e proteção contra formação de agregados tóxicos, translocação através de membranas intracelulares, importação e exportação nuclear e desagregação de proteínas mal enoveladas. Inibidores causam a liberação das proteínas clientes, resultando na proteólise via proteossomo. As principais chaperonas moleculares classificadas como proteínas de choque térmico, estão representadas. O fator de transcrição responsável pela resposta ao estresse (HSF) também está indicado na figura. Adaptado de: Mosser e Morimoto, 2004; Borges e Ramos, 2005.

1.3 A importância das chaperonas em plantas

Os vegetais, por serem sésseis estão mais expostos às condições de estresses bióticos (como ataques de patógenos) e abióticos, tais como condições extremas de temperatura, osmótico e hídrico. Esses agentes são responsáveis por consideráveis perdas econômicas no setor agrícola, que, além disso, podem ser potencialmente agravadas pelos efeitos das recentes mudanças climáticas globais. A imobilidade das plantas limita a gama de respostas comportamentais às condições adversas do meio ambiente, sendo necessárias respostas fisiológicas específicas que correspondem a uma combinação de eventos moleculares. Uma importante e bem definida habilidade das plantas é em relação à resposta ao estresse de altas temperaturas, por meio de aclimatização e resistência a temperaturas normalmente letais (Vierling, 1991). Esse fenômeno é referido como termotolerância adquirida, e ocorre também em outros organismos, como resultado de uma breve exposição em temperaturas subletais. Por exemplo, muitas espécies de plantas não sobrevivem à exposição direta a 45°C por um período de poucas horas, mas são capazes de sobreviver à mesma exposição se a temperatura for aumentada gradativamente até 45°C (em laboratório este pré-tratamento deve ter a duração de duas horas ou menos para os organismos vegetais), mimetizando as mudanças de temperatura que ocorrem naturalmente ao longo de um dia, o que indica que a termotolerância adquirida deve refletir um mecanismo geral que contribui tanto para a homeostase do metabolismo diário, (a termotolerância adquirida diminui drasticamente após algumas horas, e praticamente acaba após 24 h do pré-tratamento) quanto durante todo ciclo de vida das plantas (Hong e Vierling, 2000; Burke et al., 2000). Nos trópicos semiáridos, algumas gramíneas podem experimentar temperaturas de até 55°C no solo (Peacock et al., 1993). Compreender como esses eventos são ativados/desativados e como interagem entre si é essencial para o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos que possibilitem a geração de plantas mais resistentes/tolerantes a estresses (Wang et al., 2004).

A cana-de-açúcar, organismo de estudo do presente trabalho, vem recebendo particular atenção com relação à obtenção de cultivares resistentes aos diversos tipos

de estresses. É uma das mais importantes plantas de clima tropical e subtropical, com grande impacto sobre a economia do Brasil, já que está relacionada principalmente com a produção de açúcar como fonte de energia e etanol como combustível alternativo em veículos nacionais e para exportação (FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations – www.fao.org; Inman-Bamber et al., 2011; Vettore et al., 2003). Os fatores críticos que conferem tolerância a altas temperaturas em plantas superiores são ainda pouco compreendidos. As chaperonas moleculares são fortes candidatos a essa função por serem capazes de prevenir o enovelamento incorreto e a agregação de proteínas e também por estarem envolvidas no processo de desagregação e clivagem de proteínas incorretamente enoveladas e tóxicas para o organismo (Borges e Ramos, 2005). Vários estudos têm correlacionado a indução de proteínas Hsps com estresse térmico em plantas (Queitsch et al., 2000). Em cana-de-açúcar, cerca de 2% de todos os genes expressos são de chaperonas moleculares (Borges et al., 2001; Borges et al., 2006). A elevada expressão de genes que codificam chaperonas moleculares em plantas demonstra a importância destas moléculas para os vegetais.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivos gerais

Estudar características estruturais e funcionais das chaperonas moleculares Hsp100 e Hsp90 de cana-de-açúcar, como elas interagem com substratos e mediadores, no intuito de compreender suas funções e mecanismos de regulação de sua atividade.

1.4.1 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar a conformação da Hsp100 e Hsp90, aplicando técnicas de gel filtração acoplada a espalhamento de luz em multi-ângulos (SEC-MALS), e de ligação cruzada acoplada à espectrometria de massas (Hsp90).
- 2) Investigar a expressão das proteínas Hsp100 e Hsp90 no organismo objeto de estudo, a cana-de-açúcar.
- 3) Investigar as funções das proteínas Hsp100 e Hsp90 avaliando suas atividades chaperonas, bem como as atividades ATPásica e de complementação de fenótipo de termotolerância em levedura mutante nulo de *hsp104* (Hsp100).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Oligonucleotídeos para PCR e sequenciamento

Tabela 1: Oligonucleotídeos para PCR e clonagem em vetor de expressão pRS316GU em levedura

<i>Primer</i>	<i>Template de DNA</i>	<i>Sequencia 5' → 3'</i>
SHsp101_Fwd	pET28a-Hsp100	CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTG ATATCGAATTCATGAATCCGGACAACCTTC ACCCA
SHsp101_Rev	pET28a-Hsp100	CTTAACCCAACTGCACAGAACAAAAACC CTAGTGGATCCTCACTCCTCGTCCATGC CGT
Hsp104_Fwd	pGALSc104(WT) ^a	CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAG CTTGATATCGAATTCATGAACGAC CAAACGCAATTTAC
Hsp104_Rev	pGALSc104(WT) ^a	CTTAACCCAACTGCACAGAACAAA AACCCCTAGTGGATCCTTAATCTAG GTCATCATCAA

^aLindquist, S. (Cambridge, MA, USA)

Tabela 2: Oligonucleotídeos para o sequenciamento da SHsp101

<i>Primer</i>	<i>Sequencia 5' → 3'</i>	<i>Referência</i>
SEQ100A (5')	ACGGCGCTGATCAAGGCCAT	Cagliari, 2009
SEQ100B (5')	CGCGGAGCCGAGCGTGCCCG	Cagliari, 2009
SEQ100C (5')	CGACCGGTGTGGGCAAGACC	Cagliari, 2009
Pws15_Seq_FOR	ACTGCATAACCACTTTAA	Este trabalho
Pws15_Seq_REV	TAGGGCGAATTGGAGCTC	Este trabalho

2.2 Plasmídeos

Os plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Plasmídeos

Plasmídeos	Características	Fonte/Referência
pET28a-Hsp100	Kan ^r . Expressão em <i>E. coli</i> da proteína HsHsp101 com 6 resíduos de histidina no N-terminal. Promotor T7.	Cagliari, 2009
pET28a-GFPuv	Kan ^r . Expressão em <i>E. coli</i> da proteína GFPuv com 6 resíduos de histidina no N-terminal. Promotor T7.	Borges, J C, não publicado
pRS316GU	Amp ^r . Promotor <i>Gal</i> , Replicação CEN, Marcador auxotrófico <i>ura3</i> . Sistema <i>S.cerevisiae</i>	Schmidt, W. (Sikorski et al., 1989)
pGALSc104(WT)	Contém o cDNA da <i>hsp104</i> de levedura	Lindquist, S., Cambridge, MA, USA
pGalCen_SHsp101	Amp ^r . Expressão da proteína SHsp101 em <i>S.cerevisiae</i> . Promotor <i>Gal</i> , Replicação CEN, Marcador auxotrófico <i>ura3</i> .	Este trabalho
pGalCen_Hsp104	Amp ^r . Expressão da proteína Hsp104 em <i>S.cerevisiae</i> . Promotor <i>Gal</i> , Replicação CEN, Marcador auxotrófico <i>ura3</i> .	Este trabalho

2.3 Bactérias e leveduras

A estirpe de bactéria e as cepas de leveduras que foram utilizadas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Bactérias e Leveduras

Cepa	Genótipo/Fenótipo	Fonte/ Referência
<i>E. coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	(INVITROGEN)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB - mB -) <i>gal dcm</i> (DE3)	(INVITROGEN)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pRARE	BL21(DE3) contendo contém plasmídeo codificante de <i>argU, argW, argX, glyT, ileX, leuW, metT, proL, thrT, thrU</i> and <i>tyrU</i> . Gam^f	(Novagen)
<i>S. cerevisiae</i> BY4741(wt)	<i>MATα hisΔ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	C.A.Masuda, Univ. Fed. do Rio de Janeiro, RJ, Brasil
<i>S. cerevisiae</i> Δ <i>hsp104</i>	<i>MATα hisΔ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hsp104Δ</i>	C.A.Masuda, Univ. Fed. do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

2.3.1 Meios de cultura para propagação de *E.coli*

2.3.1.1 Meio LB (*Luria Bertani*) (*Sambrook et al., 1989*)

O meio LB (Sambrook et al., 1989) tem a seguinte composição: 5g/L extrato de levedura; 10g/L cloreto de sódio; 10g/L triptona.

O pH foi ajustado para 7,0 utilizando NaOH 5mol/L. Para o preparo do meio sólido (LA) foi adicionado 1,5% (p/v) de ágar. O meio LB foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. Foi acrescentado solução de antibiótico a 100 mg/mL, previamente esterelizadas por filtração e estocadas a -20°C, na proporção de 1:1000.

2.3.2 Meios de cultura e soluções para propagação de *S. cerevisiae*

Todos os meios de cultura de propagação de *S. cerevisiae* foram esterelizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos.

Quando necessário o preparo dos meios de cultura, descritos nos sub-itens 2.3.2.1, 2.3.2.2 e 2.3.2.4, na forma sólida, foram acrescentados 20 g de ágar por litro.

2.3.2.1 Meio completo YPDA (Sherman, 2002)

O meio YPDA tem a seguinte composição: 10 g/L Extrato de levedura; 20 g/L Peptona Bacteriológica; 20 g/L Glicose; 0,04 g/L Adenina.

2.3.2.2 Meio sintético completo SC – Ura (Sherman, 2002)

O meio SC tem a seguinte composição: 1,7 g/L de YNB – Base Nitrogenada de Levedura (sem aminoácidos); 20 g/L Glicose; 0,69 g/L Mistura de aminoácidos (item 1.3.2.5).

2.3.2.3 Meio sintético completo SC Galactose –Ura (Sherman, 2002)

O meio SC Galactose tem a mesma composição do meio SC com adição de 20 g/L Galactose ao invés de glicose.

2.3.2.4 Meio sintético SD (Sherman, 2002)

O meio SD His, Leu, Met, Ura tem a seguinte composição: 1,7 g/L de YNB – Base Nitrogenada de Levedura (sem aminoácidos); 20 g/L Glicose; 0,030 g/L Histidina; 0,030 g/L Leucina; 0,030 g/L Metionina; 0,030 g/L Uracila. Quando necessária a seleção de cepas transformadas com plasmídeo contendo marcador *ura3*, o aminoácido uracila não foi adicionado ao meio (SD –Ura).

2.3.2.5 Meio sintético SD Galactose (Sherman, 2002)

O meio SD Galactose tem a mesma composição do meio SD com adição de 20 g/L Galactose ao invés de glicose. Quando necessária a seleção de cepas transformadas com plasmídeo contendo marcador *ura3*, o aminoácido uracila não foi adicionado ao meio (SD Galactose –Ura)

2.3.2.6 Mistura de aminoácidos sem uracila (Sherman, 2002)

A mistura de aminoácidas utilizada para o preparo do meio SC e SC Galactose tem a seguinte composição: 0,2 g Adenina; 0,2 g Arginina; 0,2 g Histidina; 0,3 g Isoleucina; 1 g Leucina; 0,3 g Lisina; 0,2 g Metionina; 0,5 g Fenilalanina; 2 g Treonina; 0,2 g Triptofano; 0,3 g Tirosina; 1,5 g Valina.

2.4 Tampões e soluções para experimentos *in vitro* com SHsp101

Todos os tampões e soluções foram preparados em água bidestilada (ddH₂O) e filtrados em filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro.

Tampão de lise bacteriana	50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 1 mM EDTA
Tampão de purificação e armazenamento da SHsp101	25 mM Tris-HCl pH 7,5 250 mM NaCl β-mercaptoetanol
Tampões de purificação da GFP _{uv} TA	Tris-HCl 50 mM pH7,4, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM e glicerol 1%
TB	Tris-HCl 50 mM pH7,4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM e glicerol 1%

Tampão de inativação da GFP	Tris-HCl 25mM pH 7,5 NaCl 150 mM
Tampão de ensaio de reativação da GFP desnaturada	Tris-HCl 25mM, pH 7,5, KCl 100mM MgCl ₂ 20 mM DTT 5 mM EDTA 0,1 mM Glicerol 10% (v/v)
Tampão de ensaio de proteção e desagregação da luciferase desnaturada	25 mM Tris-HCl pH 7,5 250mM NaCl
Tampão de ensaio da atividade ATPásica	Tris-HCl pH 7,5 50 mM KCl 150 mM MgCl ₂ 5 mM
Solução de verde malaquita para ensaio da atividade ATPásica	Molibdato de Amônio 4,2% (w/v) em HCl 4 M : Verde Malaquita 0,045% (w/v) (1:3) Tween 20 (0,01% v/v) adicionado no momento do uso

2.5 Técnicas de clonagem molecular

Todo material e soluções utilizadas para propagação de microrganismos e análises de biologia molecular foram esterilizadas antes do uso. Os protocolos utilizados como eletroforese de DNA, digestão por enzimas de restrição, crescimento bacteriano e transformação bacteriana seguiram os procedimentos padrões descritos por Sambrook e Russel (2001).

2.5.1 Isolamento de DNA plasmidial de *E. coli*

A linhagem de *E. coli* DH5 α foi utilizada para amplificação de plasmídeos. O isolamento de DNA plasmidial foi conduzido utilizando kit de extração conforme instruções do fabricante (QIAprep®, Qiagen).

2.5.2 Purificação de fragmentos de DNA

Fragmentos de DNA gerados por restrição ou por PCR (Mullis et al., 1989) usando termociclador Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems), foram purificados com a utilização de kit de purificação de produtos de PCR (QIAquick®, Qiagen), conforme instruções do fabricante. Quando necessário os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese de DNA (Sambrook et al., 2001). As bandas correspondentes aos produtos desejados foram marcadas com brometo de etídeo e identificadas com auxílio de transiluminador UV e retiradas do gel com o auxílio de bisturi. A extração do DNA do gel foi realizada com o kit QIAquick seguindo protocolo do fabricante (Qiagen).

2.5.3 Clonagem de vetor de levedura

O cDNA codificante de SHsp101 (Hsp100 de cana-de-açúcar) e Hsp104 de levedura foram clonados em vetor de expressão em levedura para os estudos *in vivo* (esta tese, Tabela 3). O cDNA da SHsp101 e da Hsp104 foram amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos universal e reverso (Tabela 1) contendo regiões de alinhamento com o inserto e com o vetor de expressão pRS316GU (Tabela 3). Foi utilizado como molde para a amplificação do inserto de interesse, o plasmídeo contendo o cDNA da SHsp101 previamente clonado, e o plasmídeo contendo o cDNA da Hsp104 pGALSc104 (WT) (Tabela 3). O vetor de clonagem pRS316GU possui um promotor de GAL1 para superexpressão em levedura induzido por galactose, origem de replicação CEN (amplificação de cópia única nas células de levedura) e o marcador auxotrófico *ura3* (que permite a produção de uracila e seleção das cepas contendo o plasmídeo). Para obtenção de clones em vetor de expressão de levedura contendo os genes de interesse, foi utilizado o método de recombinação descrito por Oldenburg e colaboradores (1997). Uma vez amplificados os insertos contendo regiões adjacentes homólogas ao vetor de clonagem pRS316GU, os mesmos foram introduzidos na levedura selvagem BY4741 (Tabela

4) pelo método de transformação descrito por Elble (1992) juntamente com o vetor pRS316GU linearizado por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XmaI*, para que a recombinação ocorresse *in vivo*. A seleção inicial das células de levedura contendo os plasmídeos recombinantes foi feita em meio de cultura sólido completo sem adição do aminoácido uracila (SC – Ura, item 1.3.2.2). Uma vez que a cepa utilizada na recombinação possui o gene *ura3* deletado, e um vetor linear não é propagado corretamente na levedura, apenas as células de leveduras contendo plasmídeo recombinante e com o marcador auxotrófico *ura3* cresceram. Posteriormente, a confirmação dos recombinantes foi feita após a purificação dos plasmídeos transformados (item 2.5.4) e sequenciamento dos mesmos.

2.5.4 Isolamento de DNA plasmidial de levedura

Para o isolamento de DNA plasmidial de cepas de levedura transformadas, os tampões utilizados foram provenientes do kit de extração de DNA plasmidial de bactéria (QIAprep®, Qiagen), uma adaptação do protocolo de Robzyk e Kassir (1992). Uma colônia da cepa BY4741 recombinante foi inoculada em 5 mL de meio seletivo sem uracila, crescida por 48 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm e com aeração. Em seguida, as células foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, e removido o sobrenadante. As células foram lavadas com 1 mL de ddH₂O estéril, seguida de incubação por 10 minutos com 1mL de solução fresca e estéril de DTT a 10 mM, centrifugação por 1 minuto a 12000 rpm e remoção do sobrenadante. Nesta etapa as células foram congeladas a -20°C por 20 minutos. Após congelamento, as células foram resuspensas em 250 µL de tampão P1 contendo RNase A, seguido da adição de 250 µL de tampão P2. Foram adicionados 250 µL de pérolas de vidro (425-600 microns, G8772 Sigma), agitado em *vortex* durante 2 minutos (30 segundos de agitação seguido de 1 minuto em gelo). Foram adicionados 350 µL tampão N3 e agitado brevemente em *vortex*, seguido de incubação por 5 minutos em gelo, e centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante contendo DNA

plasmidial foi aplicado na coluna de purificação do kit Quiagen. Após centrifugação breve para ligação do DNA à coluna, a mesma foi lavada com 500 μ L de tampão PB, seguido de lavagem com tampão PE. Para eluição do DNA plasmidial, 35 μ L de tampão EB foram adicionados à coluna, centrifugado por 1 minuto a 12000 rpm. Todo material foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* (Sambrook e Russel, 2001) para amplificação do DNA plasmidial de levedura.

2.6 Análises de atividade *in vivo* de SHsp101

2.6.1 Condições de crescimento de levedura

As cepas utilizadas neste trabalho, BY4741 e $\Delta hsp104$ (listadas na Tabela 4) foram crescidas a 30°C, sob agitação de 200 rpm quando em meio líquido. Foram utilizados os meios rico (YPDA) ou sintético contendo glicose como fonte de carbono (SC ou SD) sem o aminoácido apropriado, no caso a uracila, para garantir a manutenção do plasmídeo (em cepas transformadas).

2.6.2 Análise de termotolerância

Para a análise da capacidade das células sobreviverem a 53°C, as cepas BY4741 e $\Delta Hsp104$ foram crescidas durante 4 dias a 23°C sob agitação de 200 rpm, em meio líquido sintético contendo galactose como indutor (SD Galactose) sem o aminoácido uracila, para garantir a manutenção do plasmídeo nas cepas transformadas; ou com uracila quando crescidas cepas selvagens e mutantes não transformados. O número de células foi mensurado por absorbância em espectrofotometro, e diluído (quando necessário) para $A_{600nm} = 0,6$. As culturas foram transferidas a 37°C e mantidas por 40 minutos (Sanchez et al., 1992), em seguida alíquotas de 0,5 mL foram mantidas em gelo (controle). As alíquotas restantes foram incubadas a 53°C durante 20 minutos, e depois colocadas em gelo por cinco minutos. Diluições seriadas de ambas as amostras, controle e submetidas ao choque térmico,

foram preparadas e 2,5 μ L de cada suspensão de levedura foram espotadas em placas de meio SD para determinar o número de unidades formadoras de colônias após 2-4 dias de crescimento a 30°C.

2.7 Análises de atividade *in vitro* de SHsp101

2.7.1 Expressão em *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes

A expressão e purificação da proteína Hsp100 de cana-de-açúcar foram realizadas conforme descrito no manuscrito do Capítulo HSP100, Parte I, item 2.1. Para os testes de atividade de desagregação, a proteína recombinante GFPuv (variante da proteína verde fluorescente otimizada para emitir o máximo de fluorescência quando excitada por luz ultra-violeta), foi obtida por meio de expressão em células de *E. coli* BL21 pRARE, transformadas com os plasmídeos pET28a-GFPuv. Culturas de células transformadas foram crescidas em meio LB, contendo 30 μ g/mL de Kanamicina e 34 μ g/mL de Cloranfenicol, a 37°C sob agitação de 120 rpm durante 16 horas. Para a expressão em 1L de cultura, a pré-cultura foi inoculada na proporção 1/100 e crescida a 37°C sob agitação até A_{600nm} de 0,6-0,7. Neste momento foi adicionado IPTG (isopropiltiol- β -D-galactosídeo) na concentração final 0,5 mM e deixado crescer por mais 3 horas. A cultura foi centrifugada a 2500 g por 5 minutos a 4°C. As células foram ressuspendidas em 15 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 1mM EDTA) e incubadas com 5 U de DNase (GIBCO BRL) e 30 μ g/mL de lisozima (Sigma) por 30 minutos em gelo. A lise foi feita por sonicação (Fisher Scientific Sonic Dismembrator) com 6 ciclos de 15 s e 1 min de intervalo no gelo. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 4000 rpm por 30 min a 4°C para a separação das frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel utilizada na purificação foi filtrada em filtro Millipore 0,45 μ m.

Para purificação da proteína recombinantes GFPuv, fusionadas a uma cauda de poli-histidina (Borges,J.C., comunicação pessoal), foi realizado um único passo cromatográfico, utilizando cromatografia por afinidade em coluna *Hitrap[®] Chelating*

(Amershan) de 5 mL, previamente carregada com níquel – de acordo com o protocolo do fabricante. O processo de purificação foi feito com a coluna de afinidade acoplada ao sistema de FPLC ('Fast Protein Liquid Chromatography') *ÅKTA FPLC* (Amershan Pharmacia Biotech). A coluna foi equilibrada com 3 VC (volume de coluna) de tampão TA (Tris-HCl 50 mM pH7,4, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM e glicerol 1%), em seguida 15 mL de extrato livre de células contendo a proteína GFPuv diluída em tampão de lise foram aplicados na coluna. A coluna foi lavada com 4 VC de tampão TA, seguido de 2 VC de tampão TA contendo 15% de tampão TB (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM e glicerol 1%). A eluição da proteína de fusão foi feita com 3 VC de um gradiente linear entre o tampão TA e TB (correspondendo à concentrações crescentes de 300 mM a 500 mM de imidazol). Todo o processo foi realizado com monitoramento constante da absorbância a 280 nm, em fluxo de 1 mL/min. Após a coleta de frações de 5 mL, as proteínas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As frações de interesse foram dialisadas contra tampão de inativação da GFPuv, ver item 1.4 (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) e armazenadas em freezer -20°C.

2.7.2 Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada espectroscopicamente utilizando o método descrito por Edelhock (1967) com modificações (Ramos, 2004). Os coeficientes de absorbância molar das proteínas foram calculados em tampão fosfato de sódio 20mM (pH 6,5), e Gdn-Cl 6 M, utilizando a seguinte equação:

$$\varepsilon_{280}(\text{proteína}) = n_{\text{Trp}} \times \varepsilon_{\text{Trp}} + n_{\text{Tyr}} \times \varepsilon_{\text{Tyr}} + n_{\text{S-S}} \times \varepsilon_{\text{S-S}} \quad [\text{Equação 1}]$$

Onde ε_{280} é o coeficiente de absorbância molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) da proteína de interesse a 280nm; n_{Trp} – o número de triptofanos da proteína; n_{Tyr} – o número de tirosinas e $n_{\text{S-S}}$ o número de ligações de dissulfeto; ε_{Trp} , ε_{Tyr} e $\varepsilon_{\text{S-S}}$ são os coeficientes de

absorbância molar do triptofano, da tirosina e da ponte de dissulfeto, respectivamente. Os valores de ϵ_{Trp} , ϵ_{Tyr} e $\epsilon_{\text{S-S}}$ a 280nm correspondem a 5690, 1280 e 125, respectivamente. As medidas foram corrigidas por diluições das amostras, e o cálculo das concentrações de proteínas foi realizado utilizando a equação de Beer–Lambert:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad [\text{Equação 2}]$$

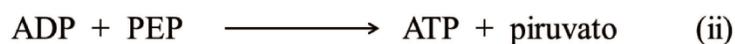
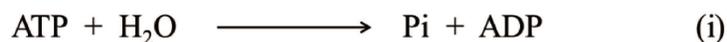
Na qual, A é a absorbância a 280 nm; ϵ é o coeficiente de absorbância molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); l , comprimento do caminho ótico (cm) e C é a concentração molar (mol/L). Os coeficientes de absorbância molar de Hsp100 de cana-de-açúcar e GFP μv correspondem a $3,083 \times 10^4$ e $2,1150 \times 10^4$, respectivamente. Para os cálculos, as proteínas foram consideradas monoméricas.

2.7.3 Ensaio de Atividade Enzimática ATPásica

A atividade enzimática de SHsp101 foi determinada utilizando o Método de Verde Malaquita (Lanzetta et al., 1979) com adaptações. O preparo da solução Verde Malaquita foi baseado no protocolo de Harder e colaboradores (1994). As reações foram feitas a 37°C (exceto para a curva de temperatura) em 25 μL em tampão (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, KCl 150 mM, MgCl_2 5 mM), com 1,6 μg de SHsp101 (correspondendo a 0,6 μM em 25 μL de reação) e incubadas por até 180 minutos. As concentrações de ATP utilizadas estão descritas no texto e legendas. Foram adicionados 200 μL de solução Verde Malaquita, e após 1 minuto em temperatura ambiente, foi adicionado 75 μL de ácido cítrico a 34% (para prevenir a hidrólise inespecífica do ATP em meio ácido da solução de Verde Malaquita, Lanzetta et al., 1979). Após 30 minutos, foi monitorada a formação do fosfato inorgânico (Pi) por meio de leitura em espectrofotômetro a 620 nm (o complexo formado entre molibdato de amônio, verde malaquita e Pi, é estável por mais de 2 horas). O branco continha todos os reagentes exceto a SHsp101. Controles contendo todos os reagentes incluindo a

SHsp101 exceto substrato também foram realizados para garantir que não havia traços de fosfato inorgânico na solução da enzima purificada. A curva padrão foi realizada pela diluição de KH_2PO_4 no mesmo tampão e componentes de reação (menos a SHsp101 e ATP), na faixa de 1 a 12 nmol de fosfato inorgânico, em 25 μL . Todas as reações foram feitas em triplicata.

Para as análises de cinética enzimática foram utilizadas concentrações de ATP de 0 a 7 mM nas mesmas condições previamente descritas. Comparativamente, foram realizadas análises de cinética contendo sistema regenerador de ATP (Equação 3), na presença de PEP (fosfo(enol)piruvato de sódio hidratado, Sigma) e PK (piruvatoquinase tipo III, Sigma) conforme descrito por Kodama e colaboradores (1986), nas concentrações de 2 mM e 2 U/mL, respectivamente (baseado em Norby, 1988). Para avaliar a hidrólise de ATP em função da concentração de substrato, foram utilizadas as equações de Michaelis-Menten (Equação 4) e de Hill para catálise enzimática cooperativa (Equação 5, Segel, 1993). Todos os dados foram analisados com o programa OriginPro versão 8.0 (OriginLab Corporation).



Reações catalisadas por: (i) SHsp101
(ii) Piruvato Quinase

[Equação 3]

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad [\text{Equação 4}]$$

Onde v_0 é a velocidade inicial da reação; V_{\max} é a velocidade máxima possível; $[S]$ é a concentração do substrato em mM, e K_m corresponde à constante de Michaelis-Menten, em mM.

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]^{n_H}}{K_M'^{n_H} + [S]^{n_H}} \quad \text{[Equação 5]}$$

Onde n_H é a constante de Hill (quando $H = 1$ a equação é reduzida para o modelo de Michaelis-Menten); K_M' é a concentração de substrato para a qual a enzima está semi-saturada e em que a velocidade é metade de V_{\max} .

2.7.4 Experimentos de espalhamento de luz

A atividade chaperona de proteção da luciferase contra a agregação por choque térmico foi mensurada por espalhamento de luz. Para tanto 0,5 μM de Luciferase de vaga-lume (Sigma) foi aquecida a 42°C em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 NaCl 250 mM. Foi adicionado 1 μM de Hsp100 de cana-de-açúcar, ou BSA como controle, no início ou após 15 min de aquecimento e agregação da luciferase. O volume final da reação foi de 450 μL em cubeta de quartzo de 1 cm e caminho óptico de 2 mm. O efeito da chaperona sobre a luciferase desnaturada por alta temperatura foi monitorada por espalhamento de luz a 320 nm, com a abertura para passagem de luz de 2 nm, em função do tempo, utilizando um fluorímetro Aminco Bowman® Series 2 (SLM-AMINCO) equipado com banho de água circulante.

2.7.5 Experimentos de desagregação da GFP inativada termicamente

GFP $_{uv}$ na concentração de 2 mg/mL foi termicamente inativada em tampão de inativação (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) por incubação durante 15 min a 85°C em alíquotas de 5 μL . Após inativação térmica a GFP $_{uv}$ foi congelada em nitrogênio

líquido e mantida em freezer -20°C. A reação de desagregação foi realizada a 25°C em cubeta de quartzo de 1 cm contendo 450 µL de volume final em tampão de reativação (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 5 mM, EDTA 0,1 mM, Glicerol 10% (v/v)). Na reação de reativação, as concentrações utilizadas foram: 0,5 µM de GFP_{uv}, 1 µM de Hsp100, 4 mM de ATP ou ATP_γS, e 4 mM de nucleotídeos totais contendo a mistura de ATP e ATP_γS nas proporções 1:1 (2 mM : 2 mM) e 3:1 (3 mM : 1 mM). O aumento da fluorescência de GFP_{uv} foi medido em espectrofluorímetro Varian (modelo Varian Cary Eclipse) com excitação a 395 nm (abertura de 5 nm) e emissão a 510 nm (abertura de 10nm). A fluorescência da GFP_{uv} nativa detectada a 510 nm foi utilizada como controle positivo para o cálculo dos valores de reativação.

3 CAPÍTULO HSP100

3.1 A Classe de proteínas Hsp100/ClpB

Membros da família de chaperonas moleculares Hsp100/Clp (do inglês *Caseinolytic protease*) possuem massa molecular de cerca de 100 kDa e pertencem à superfamília AAA⁺ (do inglês *ATPases Associated with various cellular Activities*). Como outras AAA⁺ - ATPases, membros desta família possuem características estruturais, como a presença de um ou dois domínios de ligação ao nucleotídeo (NBDs), sequências consenso de motivos “Walker A” e “Walker B”, um motivo de “dedo de arginina” e as regiões “Sensor-1” e “Sensor-2” (Figura 5A; Ammelburg et al., 2006; Hanson e Whiteheart, 2005; Tucker e Sallai, 2007). A família das proteínas Hsp100/Clp é dividida em duas classes (Figura 4) com distintas funções enzimáticas: as proteínas da classe I contêm dois domínios NBD por monômero (como por exemplo as proteínas ClpA, ClpB/Hsp104, ClpC, ClpD); já membros da classe II (ClpM, N, X e Y, HslU) apresentam apenas um domínio NBD por monômero (Parsell et al., 1994a; Schirmer et al. 1996; Schirmer et al., 1998; Martin et al., 2005). A maioria dos membros desta família tem sua função associada a elementos proteolíticos e a energia derivada do ATP é utilizada para translocar o substrato para a protease associada visando sua degradação. Este sistema deu origem ao nome Clp (pronuncia-se ‘Clip’ em inglês) para esta família de proteínas cujos membros, inicialmente, foram identificados como sendo induzidos por altas temperaturas, em complexos de proteases dependentes de ATP capazes de hidrolizar caseína (Hwang et al., 1987; Katayama-Fujimura et al., 1987). Estudos subsequentes mostraram que o sistema Clp pode hidrolizar outras proteínas e peptídeos em sua forma agregada e não agregada (Laskowska et al., 1996). Este é o caso das proteínas ClpA, ClpC, ClpX e HslU (Martin et al., 2005; Msadek et al., 1994; Schirmer et al., 1996; Schlieker et al., 2005). Em contraste, a ClpB bacteriana e seus homólogos de levedura Hsp104 citosólica e Hsp78 mitocondrial, bem como a homóloga de planta Hsp101, atuam como ATPases independentes de proteases, com função de

desagregadoras de proteínas e de ressolubilização, de maneira não destrutiva (Schirmer et al., 1996; Doyle e Wickner, 2009; Glover e Lindquist, 1998; Goloubinoff et al., 1999;. Mogk et al., 1999;. Motohashi et al., 1999).

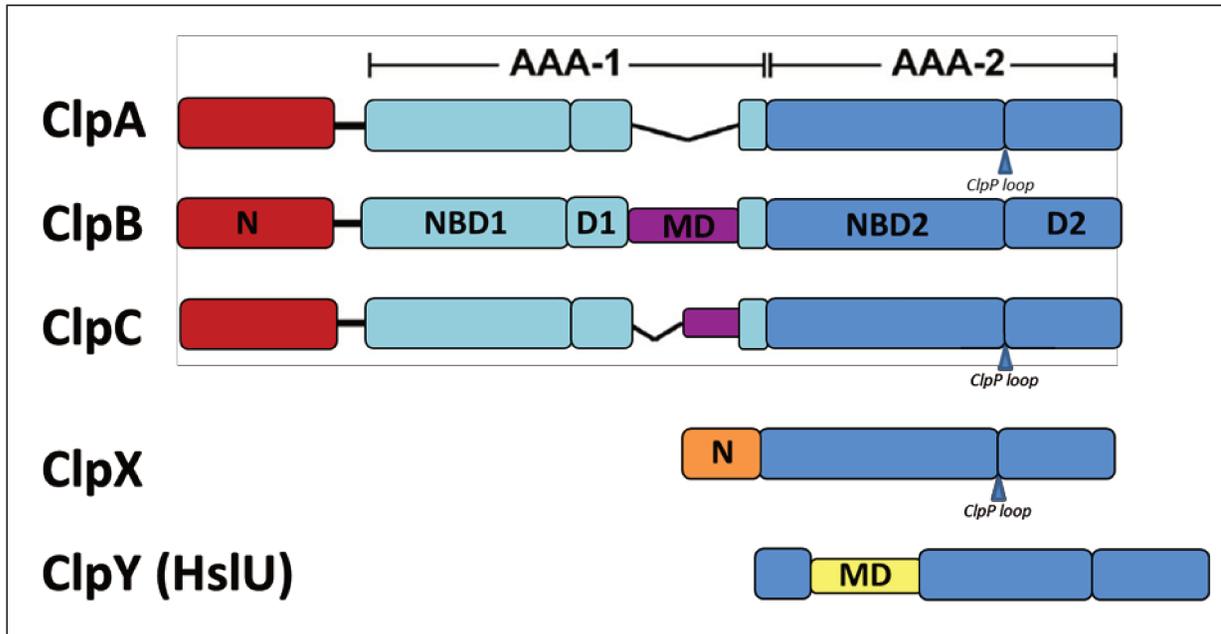


Figura 4: Organização dos domínios em proteínas da família Hsp100/Clp.

O domínio N-terminal (N) está representado pela cor vermelha, o NBD1 e o pequeno domínio D1 está em ciano, o domínio intermediário (MD) está em roxo e o NBD2 e o pequeno domínio D2, ou C-terminal, em azul. Os domínios N-terminal e MD das proteínas Clp da classe II são pouco conservados em relação à classe I e estão representados por cores diferentes. O motivo estrutural *ClpP loop*, presente em ClpA e ClpX, facilita a interação com proteases, para a degradação de proteínas mal enoveladas. Adaptado de Lee et al., 2003; Lee et al., 2004; Maurizi e Xia 2004.

As proteínas desagregases, representadas pelas bem estudadas isoformas de bactéria e levedura, ClpB e Hsp104, atuam juntamente com a chaperona Hsp70 e sua co-chaperona Hsp40, conferindo tolerância térmica a leveduras e bactérias, por meio de ressolubilização de agregados amorfos induzidos por estresse, restaurando as proteínas à sua estrutura nativa e funcional (Parsell et al., 1994a; Glover e Lindquist, 1998; Zolkiewski, 2006). Adicionalmente, a Hsp104 sozinha é capaz de remodelar agregados amilóides. Esta atividade governa a herança de prions em levedura, onde, diferentemente do que ocorre nos mamíferos, prions podem conferir vantagens

seletivas, que só são possíveis mediante a atividade catalizada pela Hsp104 (Shorter e Lindquist, 2005; Sweeny e Shorter, 2008; DiSalvo et al., 2011; Satpute-Krishnan et al., 2007; Halfmann e Lindquist, 2010; Shorter, 2010).

Hsp100/ClpB são encontradas no citoplasma, mitocôndria, e cloroplasto de procariotos, alguns protistas, fungos e plantas, mas não em animais (Tabela 5). Isto sugere que estas proteínas especializadas em desagregação são requeridas por organismos com limitada capacidade de mobilização, incapazes de escapar de condições adversas, como altas temperaturas (Shorter, 2008). Hsp100/ClpB de plantas são os únicos representantes de eucariotos superiores conhecidos, e ainda pouco se sabe a respeito de sua estrutura/função (ver a seguir no item 3.1.5).

Tabela 5: Representantes da família de proteínas Hsp100/ClpB

Nome	Organismo	Localização	Referência	identidade em relação à Hsp100 de cana-de-açúcar
ClpB	<i>Escherichia coli</i>	Citoplasma	Squires et al., 1991	52%
Hsp104	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Citoplasma	Sanchez e Lindquist, 1990	45%
Hsp78	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitocôndria	Leonhardt et al., 1993	51%
Hsp101, ClpB1 (ClpB-Cyt)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma	Lee et al., 2006; Singh e Grover, 2010	84%
ClpB3 (ClpB-C)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cloroplasto	Lee et al., 2006; Singh e Grover, 2010	51%
ClpB4 (ClpB-M)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mitocôndria	Lee et al., 2006; Singh e Grover, 2010	49%

3.1.1 Arquitetura das proteínas Hsp104/ClpB

Quanto à estrutura da Hsp104/ClpB, cada monômero contém um domínio N-terminal, dois domínios AAA+ de ligação ao nucleotídeo (NBD1 e NBD2), e um domínio intermediário (MD) formado por motivos “coil-coil” anti-paralelos inseridos no final do NBD1, chamado de “junção”, que separa os dois domínios de ligação ao nucleotídeo. A “junção” é o que caracteriza esta classe como chaperonas desagregases dentro da família Hsp100/Clp - Figura 4 (Schirmer et al., 1996; Doyle e Wickner, 2009; Parsell et al., 2002; Barnett et al., 2000; Cashikar et al., 2002; Lee et al., 2003). Adicionalmente, Hsp104 contém uma pequena extensão C-terminal, ausente em ClpB. A estrutura terciária cristalográfica do monômero de ClpB (Figura 5B) da eubactéria termofílica *Thermus thermophilus* (TClpB) foi obtida a uma resolução de 3,0 Å na presença do nucleotídeo AMPPNP (análogo da adenosina trifosfato – ATP) (Lee et al., 2003).

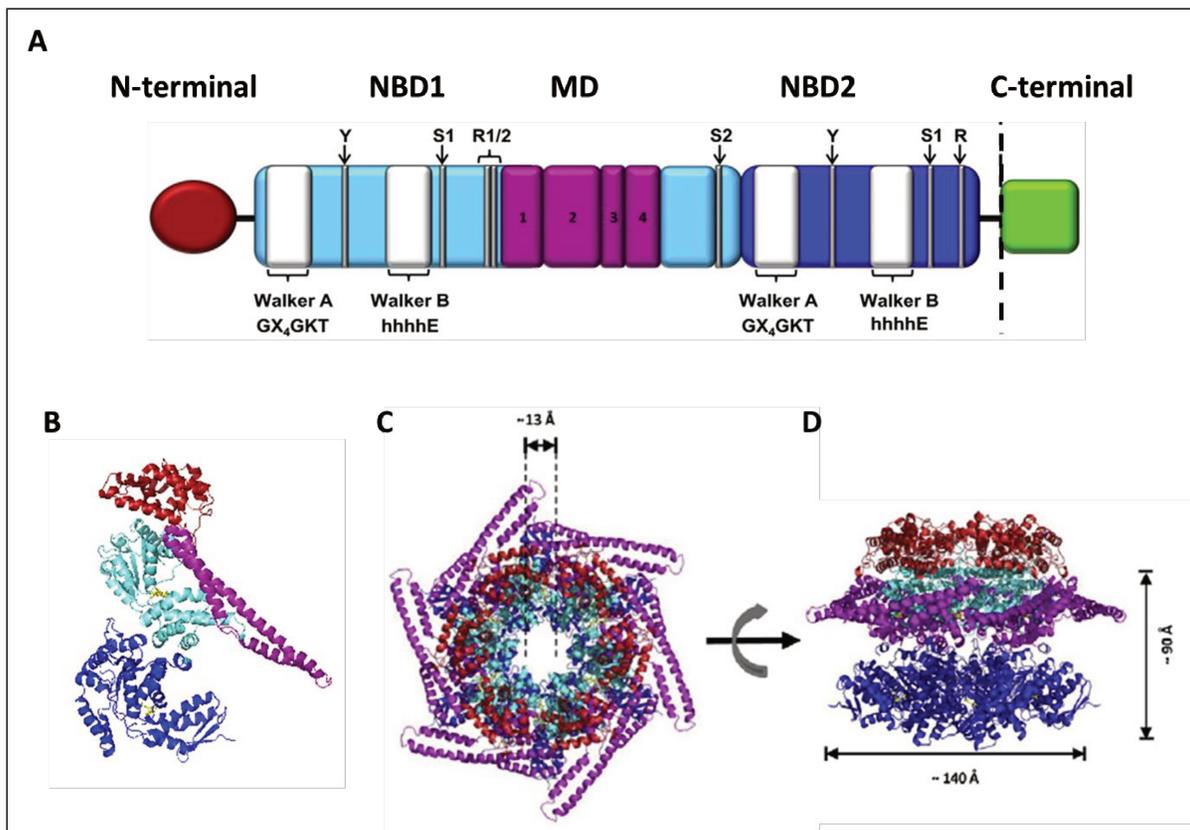


Figura 5: Organização estrutural de Hsp100/ClpB.

(A) Esquema representativo da organização estrutural com os domínios identificados com cores diferentes e indicados acima da figura. O domínio C-terminal destacado em verde é rico em resíduos carregados negativamente e está presente apenas em eucariotos. A posição de resíduos importantes incluindo as tirosinas (Y) no interior das voltas do poro do hexâmero, envolvidos na atividade de desagregação (ver adiante no item 3.1.4); o Sensor-1, os motivos S1 e S2, a posição do “dedo de arginina” (R), a posição e as sequências dos motivos Walker A e B (X é qualquer resíduo e h é qualquer resíduo hidrofóbico) envolvidos na atividade ATPásica. (B) Estrutura de raio-X do monômero de TC1pB (1QVR, Lee et al 2003) complexado com o nucleotídeo AMP-PNP destacado em amarelo no NBD1 e NBD2. Os domínios foram coloridos conforme indicação da figura A. Figura foi gerada usando o programa Pymol (DeLano, 2004). (C) Modelo do hexâmero da TC1pB complexado com AMP-PNP visto de cima, baseado no envelope gerado por Cryo-EM, no qual se distinguem duas camadas, formadas pelos domínios NBD-1 (anel superior) e NBD-2 (anel inferior), as quais circundam um poro axial com diâmetro de aproximadamente 13 Å (D) Modelo do hexâmero da TC1pB visto lateralmente. Adaptado de Hodson et al., 2012.

Os domínios NBDs são considerados unidades motoras centrais comuns em AAA+ - ATPases, uma vez que cada NBD pode ligar e hidrolisar ATP. Estruturalmente, cada NBD é seguido por sub-domínios, também referidos como D1 e D2. As mutações no interior das regiões conservadas destes módulos AAA+ afetam a ligação/hidrólise de

nucleotídeos, o estado oligomérico da proteína ou interferem na atividade de desagregação (Hodson et al., 2012).

O domínio N-terminal que corresponde à região menos conservada nesta classe de desagregases, também possui estrutura similar ao N-terminal de ClpB de *E.coli* (EClpB) isolado e com estrutura resolvida por cristalografia (Li et al., 2003). É um domínio móvel que apresenta função de especificidade ao substrato (Barnett et al., 2005) e na propagação de prions em levedura (Beinker et al., 2002; Hung e Masison 2006; Mogk et al., 2003a). Entretanto, sua presença não é absolutamente requerida para a termotolerância (Beinker et al., 2002; Mogk et al., 2003a).

O domínio intermediário MD é um *coil-coil* que define a classe Hsp100/ClpB, pois embora outras proteínas da família Hsp100 possuam um domínio intermediário, apenas a subclasse ClpB apresenta atividade desagregase (Doyle et al., 2007; Desantis e Shorter, 2012, Figura 4). A identidade deste domínio entre os homólogos TClpB, EClpB e Hsp104 é cerca de 35%. O *coil-coil* é formado por quatro hélices alfa antiparalelas, estabilizadas por interações do tipo “ziper de leucina” que formam uma estrutura flexível inserida no C-terminal do NBD1. Na reconstrução de Cryo-EM da estrutura de TClpB, o MD foi atribuído a saliências expostas do hexâmero (Lee et al., 2003, Figura 5B,C). Estudos de *cross-linking* e de mutagênese no MD revelaram sua mobilidade na presença de diferentes nucleotídeos e seu papel essencial na atividade de desagregação de proteínas por meio de controle do ciclo ATPásico da Hsp104/ClpB e da mediação da cooperação com Hsp70 (Desantis e Shorter, 2012; Haslberger et al., 2007; Watanabe et al., 2005).

Hsp104 contém uma extensão C-terminal, ausente em ClpB, rica em resíduos carregados negativamente, implicada na oligomerização e na interação com co-chaperonas que contêm domínio TPR (ver adiante no Capítulo Hsp90) mas que não é requerida para termotolerância (Parsell et al., 1991; Bösl et al., 2006; Abbas-Terki et al., 2001; Mackay et al., 2008).

3.1.2 Estado oligomérico

Assim como outras proteínas da super-família AAA+-ATPase, Hsp104/ClpB é capaz de formar homo-hexâmeros com estrutura similar a dois anéis (Figura 5C,D), como foi demonstrado por técnicas de *cross-linking*, ultracentrifugação analítica e eletromicroscopia (Parsell et al., 1994a; Bösl et al., 2005). Utilizando dados da estrutura cristalográfica de TClpB (Lee et al., 2003), um modelo hexamérico foi construído a partir da estrutura cristalográfica do monômero em um mapa de densidade por Cryo-EM. A estrutura cristalográfica de alta resolução obtida recentemente para ClpC, única proteína da classe que também contém o domínio intermediário MD, mas bem menor que ClpB (Wang et al., 2011a), também foi utilizada nos modelos gerados por Cryo-EM (Figura 5C,D). Foi demonstrado que ClpB e Hsp104 apresentam estruturas tridimensionais semelhantes (Lee et al., 2010), porém possuem algumas diferenças funcionais (discutidas a seguir no item 3.1.3) (Tripton et al., 2008; Shorter e Lindquist, 2004; Abbas-Terki et al., 2001; Moosavi et al., 2010). Há ainda algumas controvérsias a respeito da estrutura hexamérica, quanto ao arranjo dos domínios de ligação ao nucleotídeo e à posição do domínio intermediário MD, especificamente se estão localizados no interior ou para fora do anel (Lee et al., 2003, 2007, 2010; Wendler et al., 2007, 2009; Hodson et al., 2012).

As estruturas quaternárias de ClpB e Hsp104 parecem ser dinâmicas: estudos biofísicos demonstraram uma polidispersão, com misturas de monômeros, hexâmeros, heptâmeros e outras espécies intermediárias, dependendo das condições do ambiente onde a proteína se encontrava, tais como força iônica, temperatura, concentração da proteína e de nucleotídeos (Akoev et al., 2004; del Castillo et al., 2011; Kim et al., 2000; Watanabe et al., 2002; Zolkiewski et al., 1999; Parsell et al., 1994a; Hattendorf et al., 2002; Schirmer et al., 1998; Schirmer et al., 2001; Tkach et al., 2004). As condições próximas às fisiológicas parecem contribuir para a formação do hexâmero.

Quanto à influência dos domínios no estado oligomérico de ClpB/Hsp104, os domínios de ligação ao nucleotídeo NBD1 e NBD2 atuam de maneira oposta em bactéria e levedura. Os dois domínios ficam localizados na interface de subunidades adjacentes no hexâmero de ClpB e Hsp104, com estruturas tridimensionais

semelhantes, mas com diferentes funções: NBD1 é crítico para a hexamerização de ClpB (Mogk et al., 2003a), já para Hsp104 é o NBD2 que está envolvido com a oligomerização (Parsell et al., 1994a; Schirmer et al., 1998; Schirmer et al., 2001). O NBD1 é o domínio que mais contribui para a atividade ATPásica de Hsp104 (Parsell et al., 1994a; Schirmer et al., 1998; Schirmer et al., 2001) enquanto que ambos os domínios contribuem para a atividade ATPásica basal de ClpB (Mogk et al., 2003a). Estas diferentes funções dos dois domínios de ligação ao nucleotídeo em relação à oligomerização e à atividade de hidrólise do ATP específicos para ClpB e Hsp104, embora as proteínas inteiras de ambos homólogos tenham funções gerais semelhantes, ainda precisa ser melhor elucidada. O domínio intermediário MD, bem como o C-terminal de Hsp104 e o D2 de ClpB também parecem ser essenciais para a oligomerização, como observado em experimentos de mutação e deleção (Barnett et al., 2000; Lum et al., 2004; Mackay et al., 2008; Watanabe et al., 2009).

O estado hexamérico parece ser a espécie funcional de ClpB/Hsp104, uma vez que mutantes defeituosos na oligomerização não possuem atividade ATPásica aparente, têm sua atividade de desagregação diminuída, e são incapazes de complementar o fenótipo de termotolerância de leveduras com mutação nula do gene *hsp104* (Parsell et al., 1994b; Glover et al., 1998; Schirmer et al., 1998; Mogk et al., 2003a; Doyle et al., 2007).

3.1.3 Atividade ATPásica

A atividade ATPásica da Hsp100/ClpB de levedura e bactéria vem sendo extensivamente estudada para a compreensão do ciclo de atividade destas proteínas, principalmente no que se refere à possibilidade de ser a responsável por mudanças conformacionais na proteína, necessárias para sua atividade de desagregação, um mecanismo que ainda não está bem elucidado. Neste contexto, a Hsp104 de levedura foi melhor caracterizada do que ClpB de bactéria e será tomada como modelo para descrição neste ítem. Não existe até o momento, informação a respeito da atividade

ATPásica de Hsp101/ClpB de plantas, os únicos representantes desta classe de proteínas pertencentes aos eucariotos superiores.

O complexo sistema de hidrólise do ATP adotado por estas proteínas envolve interações alostéricas no hexâmero. Desta maneira, similarmente ao equilíbrio de oligomerização, a atividade ATPásica de Hsp104 é fortemente dependente das condições do ensaio, como força iônica e conteúdo de nucleotídeos (Schirmer et al., 1998). A relação entre estado oligomérico e a comunicação entre os dois NBDs foi demonstrada por mutação no NBD2, ocasionando desoligomerização (Schirmer et al., 1998) e por mutação no NBD1 levando a alteração no *turnover* de hidrólise do ATP (Franzmann et al., 2011). Vários mutantes já foram construídos para a identificação da função de cada componente dos NBDs (revisado por Hodson et al., 2012). Mutações que afetam a hidrólise do ATP, mas não a sua ligação, foram muito importantes nestas caracterizações, que sugerem uma atividade de hidrólise de menos de 1% realizado pelo NBD2 e uma alta afinidade por nucleotídeos (Schirmer et al., 1998; Hattendorf et al., 2002a). É assumido que o sítio de hidrólise está predominantemente no NBD1 de Hsp104 (Schirmer et al., 1998) e que é fortemente estimulado pela formação do oligômero, que por sua vez é induzido pela ligação de nucleotídeo ao NBD2. Comparativamente, ClpB de bactéria apresenta um *turnover* de hidrólise de ATP menor que Hsp104 e, aparentemente, com igual distribuição entre os domínios NBD1 e NBD2 (del Castillo et al., 2010; Mogk et al., 2003a; Woo et al., 1992). Ao contrário do que ocorre com Hsp104, em ClpB, NBD1 é o responsável pela oligomerização dependente de ligação ao ATP. A inibição da ligação ao nucleotídeo no NBD1 leva a diminuição da maior parte da atividade ATPásica, sugerindo que a atividade remanescente é do NBD2 e está vinculada ao estado oligomérico; enquanto que a inibição da hidrólise pelo NBD2 estimula a atividade ATPásica do NBD1, reforçando a evidência de que a organização funcional parece ser invertida em ClpB com relação a Hsp104 (Mogk et al., 2003a; Watanabe et al., 2002).

Essa dependência de atividade hidrolítica com o estado oligomérico também foi relatada para outras proteínas Clps (Schlee et al., 2001; Mogk et al., 2003a; Fernandez-Higuero et al., 2011; Werbeck et al., 2011), e análises estruturais corroboram a

explicação do mecanismo. Assim como em ClpB, os sítios de ligação ao nucleotídeo estão localizados na interface das subunidades adjacentes dos anéis do hexâmero e resíduos das duas subunidades são requeridos para gerar o completo sítio de ligação ao ATP (Bochtler et al., 2000; Guo et al., 2002; Lee et al., 2003). Portanto, a ligação ao nucleotídeo e a atividade de hidrólise do ATP por Hsp104 ou outras Clps é um evento intermolecular, e provavelmente não pode ocorrer no monômero. O arranjo dos NBDs de cada anel do hexâmero está implicado na ligação e/ou hidrólise do ATP, influenciando as subunidades adjacentes, levando a uma regulação alostérica interprotômeros, conforme analisado em estudos de cinética dos dois NBDs (Hattendorf et al., 2002a; Hattendorf et al., 2002b; Shaupp et al., 2007; Franzmann et al., 2011).

A atividade ATPásica regulada pela comunicação entre as subunidades do hexâmero também parece ser influenciada pelo domínio intermediário MD, cuja dinâmica de movimentos mostrou-se ser dependente de ligação a nucleotídeos (Lee et al., 2003, 2007). Evidências de seu envolvimento na comunicação inter-domínios foram observadas em experimentos de mutação ou deleção de regiões do MD de Hsp104, TClpB e EClpB (Cashikar et al., 2002; Mogk et al., 2003a; Watanabe et al., 2005).

A atividade ATPásica de Hsp104 e ClpB é ainda estimulada pela adição de substratos análogos, como a caseína (Mogk et al., 2003a; Schaupp et al., 2007; Watanabe et al., 2002). No caso da Hsp104, este estímulo parece ser movido pelo aumento da hidrólise do ATP no NBD2, sem influenciar o NBD1. Ao limitar a hidrólise do ATP por ClpB e Hsp104, parece haver uma forte ligação ao substrato, enquanto que ao aumentar o *turnover* de hidrólise do ATP parece haver a dissociação de substratos (Schaupp et al., 2007; Weibezahn et al., 2003). A correlação de ligação e liberação do substrato com a atividade ATPásica parece ser um mecanismo importante na translocação do peptídeo ao longo do poro do hexâmero, mas ainda pouco compreendido (Biter et al., 2012; Fernandez-Higuero et al., 2011).

3.1.4 Atividade desagregase

A capacidade das proteínas Hsp104/ClpB em solubilizar proteínas agregadas, as tornam cruciais, nos organismos que as possuem, para a tolerância ao estresse celular

(Figura 6; Parsell et al., 1994b; Queitsch et al., 2000; Sanchez e Lindquist, 1990; Schmitt et al., 1996; Squires et al., 1991).

A natureza dos substratos proteicos desta classe de chaperonas, que compreende agregados amorfos e amilóides, cuja estrutura varia conforme as condições de ensaio ou da célula após um estresse (ver item 1.1), é um fator que dificulta o estudo dos mecanismos de desagregação pela Hsp104/ClpB. A complexidade do pleno entendimento do fenômeno aumenta levando-se em consideração a participação do sistema Hsp70 na recuperação final da proteína nativa (ver adiante). O modelo atual do modo de atuação desses sistemas durante a desagregação é o de atividade de translocamento através do poro central do hexâmero de Hsp104/ClpB, baseado no conhecido modelo de proteínas da mesma família como as proteases ClpA e ClpX, capazes de translocar peptídeos desenovelados através de seu poro central (Singh et al., 2000). Contudo, Hsp104/ClpB tem uma menor eficiência em desenovelar as proteínas para translocar pelo poro, mas é capaz de reconhecer e translocar proteínas contendo porções enoveladas, sendo desta forma mais eficiente na recuperação de agregados mistos, conforme demonstrado por Haslberger e colaboradores (2008) em experimentos utilizando proteínas de fusão contendo domínios nativos e domínios desenovelados. Uma vez que o poro de Hsp104/ClpB é muito estreito (13-16 Å, Figura 5C; Lee et al., 2007; Hodson et al., 2012) para translocar uma proteína enovelada, o complexo sofreria uma mudança e uma possível desoligomerização do hexâmero durante a passagem do substrato pelo poro, um processo ainda pouco compreendido (Biter et al., 2012). Outro mecanismo proposto para contornar esse fator limitante do tamanho do poro é “modelo do pé-de-cabra”. Neste modelo, a Hsp104/ClpB seria capaz de desfazer grandes agregados em menores. Proteínas dos agregados menores seriam subsequentemente desenoveladas em colaboração com o sistema Hsp70, antes da translocação pelo poro (Tessarz et al., 2008; Weibezahn et al., 2004), e após a translocação do substrato desenovelado o sistema Hsp70/Hsp40 seria novamente requerido, para o reenovelamento da proteína resgatada do agregado. Ainda no “modelo do pé-de-cabra” a região MD exposta na superfície do hexâmero seria a responsável pela interação com os agregados e a

pequena mudança conformacional do NBD1 devido à hidrólise do ATP provavelmente promoveria o movimento do MD para ocorrer a desagregação, como uma alavanca (Bem-Zvi et al., 2001; Glover e Tkach 2001; Lee et al., 2003, Desantis e Shorter, 2012; Seyffer et al., 2012). Independentemente do modelo proposto, sabe-se até o momento que a atividade de desagregação por Hsp104/ClpB é modulada por perturbação de seu estado oligomérico (Biter et al., 2012), pela hidrólise de ATP e sua regulação alostérica promovendo a interação entre os protômeros do hexâmero (Franzman et al., 2011) e pela participação do domínio MD no processo de desagregação, possivelmente interagindo com o substrato e/ou outras chaperonas e co-chaperonas (revisado em Desantis e Shorter 2012).

O envolvimento do sistema Hsp70 (que compreende Hsp70, Hsp40 e um fator de troca de nucleotídeo) em conjunto com Hsp104 e ClpB no processo de desagregação de agregados amorfos foi observado *in vitro* e também *in vivo* por análises de complementação em levedura e bactéria *nocautes* para os genes em questão (Parsell et al., 1994b; Glover e Lindquist, 1998; Mogk et al., 1999; Goloubinoff et al., 1999; Sanchez et al., 1993; Vogel et al., 1995) e a interação parece ser espécie-específica: Hsp104 é incapaz de recuperar agregados amorfos na presença do sistema Hsp70 de *E.coli* (DnaK-DnaJ-GrpE), e o mesmo ocorre com ClpB em relação ao sistema de *S.cerevisiae* (Glover e Lindquist, 1998; Krzewska et al., 2001; Schlee et al., 2004). Quimeras de Hsp104 e ClpB, contendo o MD trocados entre as espécies, corroboram essa seletividade (Miot et al., 2011; Sielaff e Tsai, 2010). Outra função do sistema Hsp70/40 é auxiliar na atividade de recuperação de agregados de natureza amilóide mediada por Hsp104 (Shorter e Lindquist, 2008; Sweeny e Shorter, 2008; Bianco et al., 2008; Tipton et al., 2008; Higurashi et al., 2008), embora Hsp104 apresente *in vitro* a capacidade de remodelar certos agregados amilóides de forma independente do sistema Hsp70 (Desantis e Shorter, 2012). Outra contradição em relação a dependência do sistema Hsp70 por Hsp104/ClpB é quanto a atuação no desenovelamento dos peptídeos agregados antes do translocamento pelo poro do hexâmero de Hsp104/ClpB (descritos acima). Há evidências de que Hsp104/ClpB apresenta atividade de desenovelamento do substrato antes do translocamento independente de Hsp70/40

(Doyle et al., 2007a; Schaupp et al., 2007). Além disso, a presença do sistema Hsp70 para recuperar agregados amorfos pode ser substituída pela adição de misturas específicas de ATP:ATPγS (3:1 para Hsp104 e 1:1 para ClpB), ou por meio de mutações sítio dirigidas nos domínios NBD1 e NBD2 (Doyle et al., 2007a,b; Franzmann et al., 2011; Schaupp et al., 2007; Hoskins et al., 2009). A presença de nucleotídeo de hidrólise lenta (ATPγS) sugere que uma das funções do sistema Hsp70 seria estabilizar a interação com o substrato, dando tempo suficiente para que o mesmo seja reconhecido, e possa ser translocado através do poro. Já Seyffer e colaboradores (2012) demonstraram uma relação direta da ligação de DnaK com a quimera ClpB-V (ClpB contendo o domínio N-terminal de ClpV, representante da ClpB da linhagem patogênica *Vibrio cholerae*, capaz de eficientemente desenovelar polímeros para passagem pelo poro). A interação com DnaK levou ao aumento da atividade ATPásica e da passagem do substrato pelo poro do complexo formado pela quimera. Além da Hsp70, as proteínas de choque térmico de pequena massa molecular (sHsps), como a Hsp26 de levedura, também contribuem com a renaturação de peptídeos por Hsp104/ClpB, aumentando sua atividade de desagregação (Mogk et al., 2003b; Cashikar et al., 2005; Haslbeck et al., 2005). Dessa maneira, a regulação do processo de desagregação por Hsp104/ClpB em conjunto com o sistema Hsp70 e sHsps ainda precisa ser melhor elucidada.

Dessa maneira, os modelos propostos para descrever o processo de desagregação pela Hsp104/ClpB através do translocamento pelo poro do hexâmero (Figura 6) está de acordo com muitos dados publicados, embora seu modo de atuação juntamente com o sistema Hsp70 ainda não tenha sido completamente determinado. Além disso, a interação física direta de todo o complexo Hsp104/70/40/26 ainda não foi caracterizada, tão pouco se sabe a respeito do processo de desagregação por Hsp101 de plantas, suas interações e especificidades. A falta de informação relacionada a esta família de proteínas vegetais, bem como a possibilidade da utilização de desagregases para a solubilização de agregados relacionados a doenças causadas por enovelamento incorreto de proteínas, por exemplo, torna o presente estudo de grande importância biotecnológica.

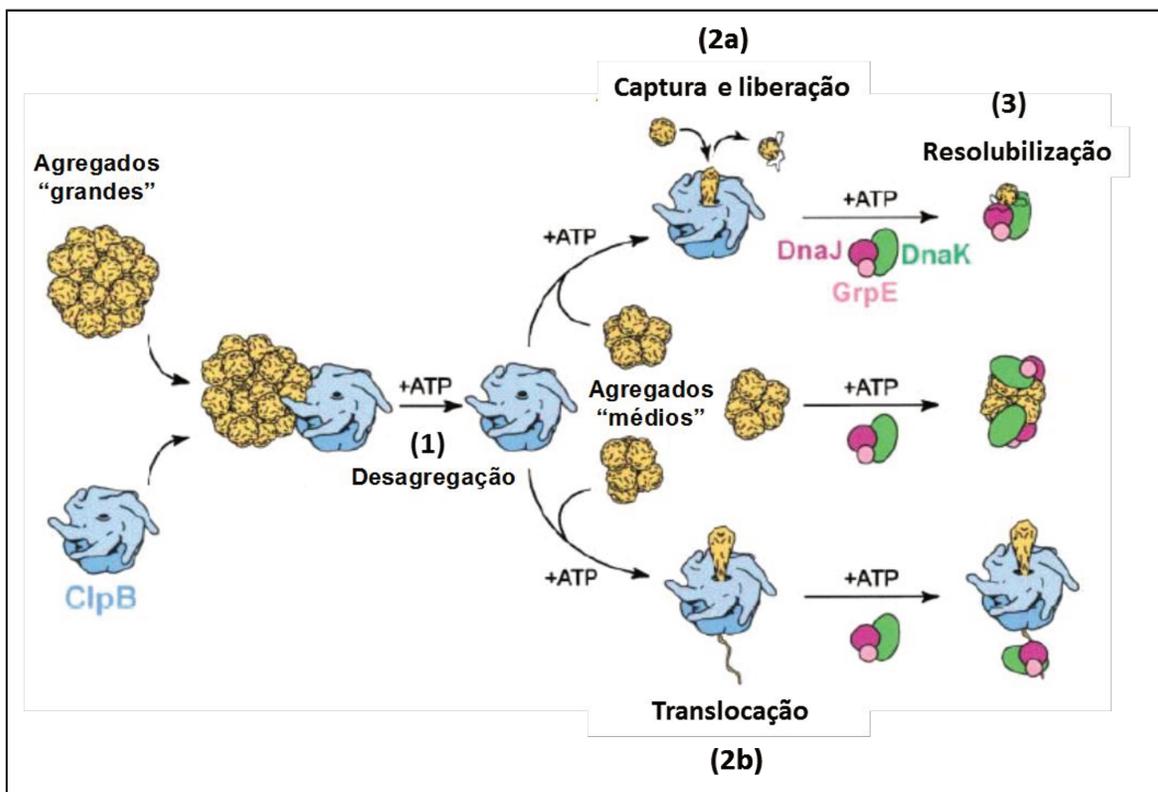


Figura 6: Modelo de desagregação pela Hsp100/ClpB.

Modelo do “pé-de-cabra” (1) em que a Hsp100/ClpB interage com grandes agregados proteicos por meio de reconhecimento do domínio MD e, a partir da hidrólise de ATP, promove a desagregação dos mesmos transformando-os em agregados “médios”. (2a e 2b). Estes agregados médios podem ser reconhecidos diretamente pelo sistema Hsp70 (DnaK, DnaJ e GrpE), ou entrar na cavidade do hexâmero da Hsp100/ClpB, onde talvez possam ser resolubilizados pelo mecanismo de “captura e liberação” (2a) ou pelo mecanismo de translocação (2b). No mecanismo “2a”, a proteína é submetida a ciclos de captura e liberação por parte da chaperona, até que os motivos estruturais da proteína, reconhecidos pela chaperona, mudem de conformação. No mecanismo “2b” a cadeia polipeptídica desenovelada é translocada através do poro central do hexâmero da Hsp100/ClpB. Após a translocação do substrato pelo poro, o sistema Hsp70 seria novamente requerido, para o reenovelamento da proteína resgatada do agregado (3). Adaptado de Lee et al., 2003.

3.1.5 Hsp100/ClpB em plantas

Em análise de banco de dados de sequências expressas em cana-de-açúcar (SUCEST- projeto de sequenciamento de EST de cana-de-açúcar) foi verificado que codificantes para a família Hsp100 são modestamente expressos neste organismo. Os resultados mostraram a presença de oito potenciais genes da classe I, com alta

identidade com ClpA, B e C, e nenhuma para ClpD (Borges et al., 2001; Borges et al., 2006), enquanto outros organismos vegetais que já tiveram seu genoma completamente sequenciado, como *Arabidopsis thaliana* e arroz *Oryza sativa*, possuem uma isoforma de proteína ClpB/Hsp100 para cada localidade celular: citoplasma, mitocôndria e cloroplasto (Tabela 5). Já a dicotiledônia *Populus trichocarpa* possui além destas isoformas, uma cloroplasmática a mais (Lee et al., 1994; Singh et al., 2010). Uma vez que a maioria das pesquisas sobre proteínas vegetais da família ClpB/Hsp100 foi realizada somente em duas espécies modelo, *A. thaliana* e *O. sativa*, o presente estudo de uma Hsp100 de cana-de-açúcar visa contribuir para aumentar a informação a respeito desta importante família de proteínas, o que é inédito no que diz respeito à expressão e relação estrutura/função destas proteínas neste organismo.

As proteínas ClpB/Hsp100 de plantas, assim como sua correspondente em levedura, são induzidas por choque térmico. Análises de transcrição/expressão demonstraram que proteínas Hsp100 citoplasmáticas são induzidas por choque térmico em *Arabidopsis*, milho, tabaco e trigo (revisado em Singh e Grover 2010) e também há indícios de que haja indução por estresse hídrico e por tratamento hormonal com ácido abscísico (ABA) (Shen et al., 2003, Pareek et al., 1995; Lee et al., 2006). Além da regulação por estresse, transcritos/proteínas de Hsp100 citoplasmáticas parecem ser controladas em diferentes estágios do desenvolvimento vegetal, uma vez que já foi demonstrado seus níveis constitutivos em tecidos embrionários e de sementes de arroz (Queitsch et al., 2000; Singla et al., 1998), e um alto nível de expressão em pendão e embrião de milho (Young et al., 2001b), e grãos de pólen de tomate (Pressman et al., 2007). A Hsp100 citoplasmática pode ainda ser induzida em resposta a infecção, conforme analisado em *Arabidopsis* (Carr et al., 2006).

Baseado em análises filogenéticas, alguns autores dividem a subclasse ClpB/Hsp100 de plantas em dois grandes grupos: o grupo de localização citosólica/nuclear, e o grupo de localização organelar (Lee et al., 2006). Embora o sinal de localização nuclear (NLS) (Robbins et al., 1991) de Hsp100 seja conservado em todos homólogos vegetais (Nieto-Sotelo et al., 2002), até o momento, a localização nuclear de Hsp100 ainda não foi observada experimentalmente de maneira direta

nestes organismos (Nieto-Sotelo et al., 2002, Lee et al., 2006, Singh e Grover 2010), destacando a importância de mais estudos para melhor compreensão da função de Hsp100 em vegetais.

Quanto à função desempenhada por Hsp100 de plantas, homólogos em *Arabidopsis*, soja, trigo e tabaco, podem, pelo menos parcialmente, restaurar a termotolerância de células de levedura que tiveram deleção no gene para Hsp104 (Lee et al., 1994; Schirmer et al., 1994; Wells et al., 1998; Agarwal et al., 2003). Uma evidência direta da importância de Hsp100 de *Arabidopsis* e de arroz na termotolerância de *Arabidopsis* também foi demonstrada por Queitsche colaboradores (2000) e Katiyar-Agarwal e colaboradores (2003), enquanto que a isoforma de cloroplasto mostrou-se essencial para o desenvolvimento desta organela e para a viabilidade de sementes (Lee et al., 2006). Mutantes de *Arabidopsis* expressando ClpB/Hsp100 com alterações pontuais em sua sequência de aminoácidos ou mutações em sua região promotora, acarretando em diminuição de sua expressão, resultaram em redução de termotolerância e alteração no desenvolvimento e na germinação de sementes (revisado em Singh e Grover 2010). Ainda, análises genéticas mostraram que, em *Arabidopsis*, a ClpB/Hsp100 interage com proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (sHsp) resolubilizando agregados proteicos após o estresse térmico (Lee et al., 2005).

Embora a Hsp100/ClpB esteja envolvida na desagregação de proteínas, até o momento nenhum substrato celular foi identificado em plantas, tampouco existem evidências diretas *in vivo* de que Hsp100 de planta atue com função desagregase. Contudo, a Hsp100/ClpB citosólica é a única representante HSP cujo envolvimento direto na termotolerância de plantas foi evidenciado (Queitsch et al., 2000; Larkindale et al., 2005). Além disso, parece que as plantas são os únicos eucariotos superiores conhecidos capazes de expressar uma proteína Hsp100 citoplasmática (Lee et al., 2006), o que pode ser devido à necessidade de adaptação às diversas condições de estresses ambientais à que são submetidas comparando-se com os demais organismos eucariotos superiores. Tal fenômeno reforça a importância de mais estudos sobre estas proteínas, que podem apresentar características intrínsecas ao reino vegetal.

PARTE I

3.2 Artigo científico: A Hsp101 de cana-de-açúcar é uma proteína hexamérica que liga nucleotídeos

Os resultados apresentados neste manuscrito mostram o primeiro relato a cerca de características estruturais e de expressão de uma proteína Hsp100 da subclasse ClpB de cana-de-açúcar. Proteínas desta classe são importantes para a sobrevivência de bactérias, leveduras e plantas sob condições de estresse, devido a sua capacidade de desagregar proteínas e restaurar suas funções. Embora as plantas sejam os únicos representantes de eucariotos superiores que possuem Hsp100/ClpB, há pouca informação a cerca destas proteínas e é possível que apresentem características exclusivas às plantas, sendo necessários mais estudos de sua estrutura/função. Este trabalho apresenta a clonagem e purificação da Hsp100/ClpB de cana-de-açúcar, denominada SHsp101. A proteína foi obtida pura e no estado hexamérico, com capacidade de ligar nucleotídeos ATP, ADP e o análogo de hidrólise lenta $ATP\lambda S$, apresentando características semelhantes às ortólogas de levedura e bactérias. Foi observada sua expressão em tecido foliar de cana-de-açúcar, o primeiro relato de expressão não induzida por estresse de Hsp100/ClpB em tecido foliar de plantas. As informações estruturais, funcionais e de expressão de SHsp101, geradas neste trabalho, contribuem para um melhor entendimento desta classe de proteínas em plantas.

ARTIGO CIENTÍFICO:

Sugarcane Hsp101 is a hexameric chaperone that binds nucleotides

Artigo científico publicado em:

International Journal of Biological Macromolecules 49 (2011) 1022– 1030

THIAGO C. CAGLIARI¹, VIVIANE C.H. DA SILVA*, JÚLIO C. BORGES, ALESSANDRA PRANDO, LJUBICA TASIC, CARLOS H.I. RAMOS

* Esses autores contribuíram igualmente para o trabalho

¹Institute of Chemistry and ²Institute of Biology, University of Campinas-UNICAMP. P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. ³ Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP, 13560-970, Brazil. ⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimag em.

*To whom correspondence should be addressed: CHIR: cramos@iqm.unicamp.br Phone 55-19-3521-3144 – FAX: 55-19-3521-3023

Abbreviations: AUC, analytical ultracentrifugation; CD, circular dichroism; Hsp, heat shock protein; STD-NMR, saturation transfer difference NMR.

Keywords: Hsp101, sugarcane, protein folding, molecular chaperone, heat shock protein, AAA+ protein, analytical ultracentrifugation, STD-NMR

Abstract

The Clp/Hsp100 AAA+ chaperone family is involved in recovering aggregated proteins and little is known about other orthologs of the well studied ClpB from *Escherichia coli* and Hsp104 from *Saccharomyces cerevisiae*. Plant Hsp101 is a good model for understanding the relationship between the structure and function of Hsp100 proteins and to investigate the role of these chaperones in disaggregation processes. Here, we present the cloning and purification of a sugarcane ortholog, SHsp101, which is expressed in sugarcane cells and is a folded hexamer that is capable of binding nucleotides. Thus SHsp101 has the structural and functional characteristics of the Clp/Hsp100 AAA+ family.

1. Introduction

Protein misfolding and aggregation play important roles in many pathologies. Heterologous expression of genes sometimes generates inclusion bodies. Failure in proper folding results in a loss of biological function or even the formation of aggregated species, which may be harmful to the organism by developing into conformational diseases related to more than 40 pathologies [1,2]. To avoid either misfolding or its destructive consequences, cells have developed a complex quality control system involving molecular chaperones that is devoted to maintaining protein homeostasis [3,4].

Molecular chaperones are usually referred to as heat shock proteins (Hsps) and are named according to the molecular mass of the monomer protein (for example, the 70 kDa heat shock protein, Hsp70, and the 100 kDa heat shock protein, Hsp100) [4,5]. Chaperones from the Clp/Hsp100 family are ring-shaped AAA+ (ATPase associated with diverse cellular activities) proteins. ClpB from *Escherichia coli* and its eukaryotic homolog Hsp104 from yeast *Saccharomyces cerevisiae* are the most studied [5-7]. ClpB and Hsp104 have the extraordinary ability to solubilize aggregated proteins with the help of the Hsp70 system. Hsp100s are hexameric chaperones that are formed by an amino-terminal domain and two nucleotide-binding domains, NBD or AAA+ domains, which are connected by a linker named the M-domain in the case of ClpB and Hsp104, but not

other Clp proteins (Figure 1A). Analogs of these proteins are present in bacteria, fungi, plants and mitochondria but are missing in metazoa.

Although not lethal when absent, the presence of Hsp104 and ClpB largely increases survival under stress conditions. Neither ClpB nor Hsp104 alone are capable of disaggregating proteins, but cells lacking *clpb* or *hsp104* are incompetent at eliminating aggregated proteins formed under heat shock conditions [8-10]. Hsp100 proteins cooperate with other chaperones to aid in protein folding. Efficient protein disaggregation and reactivation in *E. coli* is only achieved when ClpB, DnaK, DnaJ and GrpE are present [9,10]. Another partner, small Hsp, participates by binding partially unfolded proteins, thereby not allowing the formation of oligomeric aggregates. Hsp70 and Hsp100 facilitate the solubilization of these proteins [11-14]. Thus, the role of Hsp100 is highly specific because disaggregation only occurs in the presence of Hsp70 from the same species.

The molecular mechanism for this disaggregation activity is unknown. Although very important for protein homeostasis, little is known about other orthologs of ClpB/Hsp104 [15]. Plant Hsp101 is a good candidate to be explored for understanding the relationship between the structure and function of Clp/Hsp100 proteins and to investigate the role of these chaperones in disaggregation processes. For instance, although Hsp101 can complement the thermotolerance defect in yeast caused by deleting the *hsp104* gene [16,17], it cannot interact with Hsp104 indicating that the domains of the proteins diverged [18]. Therefore, a deep understanding of the relationship between structure and function in Hsp101 may help to identify key elements which are indispensable for chaperones with disaggregation properties to function.

The importance of Clp/Hsp100 proteins for plants and for biotechnology purposes is based on their key role in thermotolerance [15]. Due to its high similarity to the *A. thaliana* homolog, as sugarcane ortholog, SHsp101, was cloned and purified. Its biophysical parameters, its ability to bind nucleotides and its presence in sugarcane cells were also investigated. The results showed that sugarcane SHsp101 has the structural and functional characteristics of the Clp/Hsp100 AAA+ family.

2. Materials and Methods

2.1 Cloning, expression and purification

cDNA libraries were from sugarcane cultivars, which were hybrids derived from the crossing of *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum* [19]. The cDNA coding for sugarcane Hsp101 (GenBank accession number JN106048) was inserted into the expression vector pET28a (Novagen) by polymerase chain reaction (PCR), generating the vector pET28aSHsp101 that was then transformed into the BL21 pRARE *Escherichia coli* strain. Cells were grown at 37 °C in Luria-Bertani media (LB) containing 0.3 µg/mL of kanamycin, and the expression of the 6-His-tagged protein was induced with 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). After 4 hrs, the cells were harvested and disrupted by sonication in the presence of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, and 1 mM EDTA, and the lysate was centrifuged at 18,000g for 30 min. The soluble fraction was loaded onto a 5 mL Hitrap™ Chelating HP column for affinity chromatography and then onto a Hiloal 26/60 Superdex 200 prep-grade column for size exclusion chromatography in the presence of 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, and 1 mM 2- β-mercaptoethanol. Chromatography purification was performed using an Äkta FPLC (GE Biosciences), and the fractions were analyzed by 10% SDS-PAGE. Protein concentrations were determined either by the Edelhock method [20] or by the Bradford protein assay [21] using a kit (Bio-Rad). A model of SHsp101 based on the crystal structure of *Thermus thermopiles* ClpB (gi:38492937, PDB entry number 1QVR) [7], which shares 50% identity with sugarcane Hsp101, was generated using 3D-JIGSAW [22].

2.2 Spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra were recorded with a JASCO model J-810 CD spectropolarimeter equipped with a thermoelectric sample temperature controller (Peltier system) following standard procedures [23]. Data were collected from 260 to 200 nm, averaged at least three times, using cuvettes with a 1 mm pathlength and 2 µM protein

in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, and 1 mM β -mercaptoethanol. Data was analyzed with both Spectra Manager® (Jasco) and Origin® 7.5 (OriginLab). Emission fluorescence spectra were recorded on an Aminco Bowman® Series 2 (SLM-AMINCO) fluorimeter using quartz cells with 10 mm x 10 mm optical path length. Protein concentrations of 2 μ M in the same buffer described for CD experiments were used. Emission fluorescence spectra of tryptophan were obtained with excitation at 295 nm (bandpass of 4 nm) and with emission from 305 to 420 nm (bandpass of 8 nm) and analyzed either by their maxima wavelength or by their center of spectral mass ($\langle\lambda\rangle$) as described by the equation below:

$$\langle\lambda\rangle = \left(\sum \lambda_i F_i \right) / \left(\sum F_i \right) \quad \text{[Equation 1]}$$

where λ_i is the wavelength and F_i is the fluorescence intensity at λ_i . Spectroscopy experiments were performed in the absence and presence of 200 μ M MgATP.

2.3 Protein Extraction and Immunoblotting

Plant material (leaf tissue) from *Saccharum officinarum* cultivar IAC 93-3046 was homogenized in a mortar and pestle with two volumes (w/v) of 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA and protease inhibitors (1 μ M E64, 1 μ M leupeptin, 150 nM aprotinin, 500 μ M AEBSF (CALBIOCHEM®), and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride). After centrifugation at 2500g for 30 min, 15 μ g of the supernatant was separated by 10% SDS-PAGE, electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Millipore), and stained with Ponceau S (Sigma-Aldrich). The membranes were blocked for 1 h with TBS-T (Tris-buffered saline containing 0.03% Tween-20) supplemented with 1% BSA and then incubated with polyclonal sugarcane Hsp101 antiserum (anti-SHsp101) for 2 h (1:500 dilution). After 3 washes with TBS-T, the membranes were incubated for 1 h with the secondary antibody (anti-rabbit IgG coupled to alkaline phosphatase, Bio-Rad) and detection was performed using an Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad). All experiments were performed at room temperature.

2.4 Dynamic light scattering, analytical ultracentrifugation and SEC-MALS

For the dynamic light scattering (DLS), analytical ultracentrifugation (AUC) and size exclusion chromatography with multi-angle light scattering (SEC-MALS) experiments, 300 to 2000 $\mu\text{g/ml}$ SHsp101 was tested in 25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 250 mM NaCl and 1 mM Beta-mercaptoethanol in the absence or presence of 200 μM nucleotides. SednTerp software (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>) was used to calculate the density ($\rho = 1.00923 \text{ g/mL}$) and viscosity ($\eta = 1.0321 \times 10^{-2} \text{ poise}$) of the buffer and the protein partial specific volume ($V_{\text{bar}} = 0.7384 \text{ mL/g}$).

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed using a *DynaPro-MS/X* (Protein Solutions) instrument controlled by DynamicsTM v.6.2.05 software. Samples were equilibrated at 20°C for approximately 20 min and then submitted to approximately 300 measurements (10s each). The DLS experiments were conducted to determine the experimental diffusion coefficient D at each protein concentration. Each value was extrapolated to standard conditions (temperature of 20°C and in water, $D_{20,W}$). The values of $D_{20,W}$ were plotted versus protein concentration to determine the value of zero by extrapolation, $D^0_{20,W}$, which is a unique property of the macromolecule because it should avoid interference from the solvent and high protein concentrations.

Analytical ultracentrifugation experiments were performed using a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge using an AN-60Ti rotor at 20°C and analyzed as described elsewhere [24-26]. Sedimentation experiments were conducted from 3000 to 16000 rpm with data acquisition at 279 nm. Sedimentation velocity analysis was performed using the software Sedfit [27-29] to calculate the sedimentation coefficient, s . As described above for the DLS experiments, each value of s was extrapolated to standard conditions (temperature of 20°C and in water, $s_{20,W}$). The values of $s_{20,W}$ were plotted versus protein concentration to determine the value of zero by extrapolation, $s^0_{20,W}$, which is a unique property of the macromolecule because it should avoid interference from the solvent and high protein concentrations. The molecular mass (M) of a protein can be estimated from s and D by the following equation:

$$M = \frac{sRT}{D(1 - V_{bar}\rho_f)} \quad [\text{Equation 2}]$$

where R is the gas constant, T is the absolute temperature and f is the frictional coefficient.

Equilibrium sedimentation analyses involved fitting an absorbance model *versus* the cell radius data using nonlinear regression. Distribution of the protein along the cell, which was obtained in the equilibrium sedimentation experiments, was fit with the following equation [30]:

$$C = C_0 e^{\left[\frac{M(1 - V_{bar}\rho)\omega^2(r^2 - r_0^2)}{2RT} \right]} \quad [\text{Equation 3}]$$

where C is the protein concentration at radial position r , C_0 is the protein concentration at radial position r_0 and ω is the centrifugal angular velocity.

Multi-angle laser light-scattering coupled with size exclusion chromatography (SEC-MALLS) was used to analyze the distribution of the masses of purified SHsp101. Data analyses were performed by chromatographic separation of 160 μM protein using a 1 cm x 60 cm Superdex 200 (GE Healthcare) column at room temperature with a flow rate of 0.5 mL/min. The experiments were performed continuously on the column eluate as it passed through a DAWN EOS System (Wyatt Technology Corp, USA), and the data were analyzed using the Astra software package (version 5.3.4.14).

2.5 Saturation-transfer difference (STD) and NMR analyses

Purified SHsp101 (120 μM) and nucleotides (81 mM ATP, 80 mM ADP and 46 mM ATP γ S) were prepared in 10 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0 with a protein to ligand molar ratio of 1:100. The sample contained a total volume of 600 μL and was completed with D₂O. All NMR spectra were recorded on a 500 MHz Varian INOVA spectrometer equipped with a 5 mm Tri-Res probe operating at a hydrogen frequency of 499.89 MHz at 298 K without sample spinning. The residual HDO signal was used as the internal reference (set at 4.70 ppm). The 1D STD NMR experiments employed the pulse

sequence PRESAT, Water package from Varian to suppress the residual HDO signal. A spin-lock filter with a strength of 2 kHz and duration of 10 ms was applied to suppress the protein background. On-resonance irradiation of the protein was performed at a chemical shift of 0.0 ppm and the off-resonance frequency was set at 30.0 ppm where no protein signals are present. A train of selective Gaussian-shaped pulses (50 ms) with a power level of 32 Hz for the corresponding square shape was applied for saturation. The number of selective pulses (n) determined the presaturation period. The standard value was 58 pulses, leading to a total length of the saturation train of 3 s. Spectra were subtracted internally via phase cycling after every scan to minimize artifacts arising from temperature and magnetic field instability. The length of the spin-lock pulse was set to 40 ms. The 1D STD NMR spectra were acquired with 1024 scans and 2 s relaxation delay, and the free induction decay (FID) was acquired over 14,402 complex data points covering a spectral width of 12001.2 Hz. NMR spectra were multiplied by an exponential line-broadening function of 1 Hz and zero-filled by a factor of two prior to Fourier transformation. Spectral processing was performed on a Sun workstation using VnmrJ software (Varian package).

The $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ heteronuclear correlation (HETCOR) analysis was performed by dissolving 5.0 mg of ATP γ S in 40 μL of D $_2$ O (as the control) or by dissolving 2.5 mg of ATP γ S into 20 μL of SHsp101 (stock solution: 120 μL) in 20 μL of D $_2$ O. The HETCOR spectra were acquired with 1024 scans and 1.5 s relaxation delays, and the free induction decay (FID) was acquired over 4096 complex data points covering a spectral width of 26324.4 Hz. A 500 MHz Varian INOVA spectrometer equipped with a nanoprobe was used, operating at a carbon frequency of 125.71 MHz at 298 K.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Pure and folded Sugarcane SHsp101 was produced

Members of the ring-shaped Clp/Hsp100 AAA+ family capable of reverting protein aggregation have been identified in several organisms such as bacteria (*Escherichia coli*

ClpB [11,31] and *Thermus thermophilus* ClpB [32]) fungi (*Sacharomicies cerevisiae* Hsp104 [33]) and plants (*Arabidopsis thaliana* [16,17]). The presence of a gene coding for an Hsp100 protein in sugarcane was determined by sequencing and annotating sugarcane ESTs [34]. To characterize the protein encoded by this gene, we cloned and sequenced the entire cDNA encoding for sugarcane Hsp101, SHsp101 (Figure 1B). The cDNA was cloned into a pET28a vector for expression as a His-tagged construct. SHsp101 has 912 residues and a predicted molecular mass of 100.9 kDa for the monomer (Figure 1B). This protein was named SHsp101 because it is 84% identical to AtHsp101 from *Arabidopsis thaliana* (Figure S1). Due to the His-tag tail, the recombinant monomeric construct has a predicted molecular mass of 103.1 kDa (Figure 1B). A model for the structure of SHsp101 (Figure 1C) was prepared based on the crystal structure of *Thermus thermophilus* ClpB (PDB entry number 1QVR) [7], which shares 50% identity with sugarcane Hsp101. The middle domain (M-domain) forms a coiled coil that is inserted between the NBD1 and NBD2 domains and points away from the body of the chaperone, forming propeller blades in the hexameric model [5,7]. The NBD domains bind nucleotides. The two tryptophans, whose emitted fluorescence was studied (see below), are highlighted in red.

Approximately 50% of the expressed SHsp101 was soluble in the supernatant of the cell lysate, as determined by densitometric quantification of the bands in Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gels (Figure 2). The recombinant fused protein was purified using a HiTrap Chelating affinity column (Amershan Pharmacia Biotech) followed by a HiLoad Superdex 200 pg 26/60 molecular exclusion column (Amershan Pharmacia Biotech). In the first step of purification, SHsp101 was approximately 85% pure (Figure 2, lane 2; Table 1). After gel filtration, the protein was approximately 98% pure (Figure 2, lane 3). The yield of the recombinant SHsp101 was approximately 42 mg/L of culture (Table 1; Table 1), as measured by both the Bradford method and the absorbance at 280 nm.

The circular dichroism (CD) spectrum (Figure 3A), which had minima at 208 and 222 nm with signals of approximately -17000 and -15000 deg cm² dmol⁻¹, respectively, indicative of an α -helical protein (Table 2), revealed that the expressed sugarcane

Hsp101 was folded. The amount of helix predicted from the signal at 222 nm [23] was approximately 40%, which is in good agreement with the ClpB homologs [7,35]. SHsp101 was also studied by CD in the presence and absence of both ADP and ATP. However, the spectra in the presence of nucleotides were undistinguishable from that in the absence of nucleotides (data not shown).

Emission fluorescence spectroscopy of Trp can be used to gain information about the environment surrounding this residue because of its sensitivity to the polarity of the environment. SHsp101 contains two Trp residues, which are both located in the second nucleotide-binding domain (Figure 1B and C). The emitted fluorescence spectrum of the protein under native conditions exhibited maximum intensity at approximately 351 nm with a spectral center of mass at approximately 357 nm (Figure 3B and Table 2). Under denaturing conditions (6M Gdm-Cl), the emitted fluorescence spectrum of SHsp101 was of approximately three times less intense with a maximum intensity at approximately 356 nm and a center of mass at approximately 361 nm (Figure 3B). Because both Trps contributed to the emitted spectrum, at least one Trp is at least partially buried in the interior of the protein. As shown by CD spectroscopy, the presence of either ADP or ATP did not cause any relevant modification in the emitted fluorescence spectrum (data not shown).

3.2. Sugarcane Hsp101 is a hexamer that binds nucleotides

The oligomerization state is crucial for proteins from the Clp/Hsp100 AAA+ family. Oligomerization into hexamers is essential for function and to form the characteristic quaternary structure of a ring with an axial pore or channel [7,36-38]. To characterize the oligomeric state of SHsp101, a series of hydrodynamic experiments were conducted. First, analytical ultracentrifugation (AUC) sedimentation equilibrium of SHsp101 was carried out to obtain direct information on the oligomeric state of the protein. The molecular mass of a sedimenting particle is derived independently of the sedimentation and diffusion coefficients and is obtained by fitting the concentration distribution of the macromolecules at equilibrium. Figure 4A shows that the best fit for the SHsp101

sedimentation equilibrium data was to a single species with a molecular mass of 620 ± 20 kDa (Figure 4A and Table 2), which is in good agreement with an expected value of 618 kDa predicted for the hexameric species (Table 2). Values of the sedimentation coefficient $s_{20,W}^0$ (Figure 4B, top) and diffusion coefficient $D_{20,W}^0$ (Figure 4b, bottom) of 15.2 S and 2.4×10^{-7} cm²/s, respectively, were determined by extrapolation. These results agreed well with those of $s_{20,W} = 16$ -17S for ClpB [34,38] and $s \sim 16$ S and $D = 2.5 \times 10^{-7}$ cm²/s for Hsp104 [37]. The values of $s_{20,W}^0$ and $D_{20,W}^0$ were used in Equation 2 (see Material and Methods) to estimate a molecular mass of 611 kDa for SHsp101 (Table 2). Multi-angle laser light-scattering in conjunction with size exclusion chromatography (SEC-MALLS) experiments were used to determine the molecular mass and oligomeric state of SHsp101. Figure 4C shows a plot of the calculated molecular masses versus the elution time for the selected scattering peaks, which correspond to the UV-monitored elution peaks. An average molecular mass of 619 ± 6 kDa was obtained (Figure 4C and Table 2), confirming that SHsp101 is a single species with the molecular mass of a hexamer. The masses measured by AUC and SEC-MALS experiments are equal to that predicted for a hexameric species, which is in good agreement with data obtained for other Clp/Hsp100 proteins such as *E. coli* [39] and *T. thermophilus* [7] ClpBs and yeast Hsp104 [36,37].

The AUC experiments were also performed in the presence of both ADP and ATP nucleotides without any measurable change in the oligomeric state of the protein. An oligomeric state that is independent of nucleotide binding has been shown for Hsp104 [40] but not for ClpB [36]. In addition to that, because both the sedimentation (s) and diffusion (D) coefficients are in very good agreement with those measured for other members of Clp/Hsp100 family [35,37,39], they likely share at least some global quaternary structure similarity. The values obtained for the hydrodynamic coefficients and molecular masses can be used to provide insight on the shape of the protein by the so-called Perrin or shape factor F [41]. The frictional coefficient for a rigid sphere having an identical volume as the molecule of interest (f_0) and the frictional coefficient (f) are obtained from measurements via the Stokes equation [42]. The closer the Perrin factor (f/f_0 ratio) is to 1, the more spherical the protein is. Our results indicate that SHsp101

has a Perrin factor of approximately 1.6, which is in good agreement with the values predicted for Hsp104 [37] and CLpB [43]. This analysis may have some limitations because high flexibility and mobility are characteristics of proteins belonging to the Clp/Hsp100 family [43].

Because ADP or ADP appear not to have measurable effects on the secondary structure, on the environment of the Trp residues or on the oligomeric state of SHsp101, we next investigated the interaction of the nucleotides with the protein with a saturation transfer difference (STD) NMR experiments, which are capable of detecting weak binding with great sensitivity [44]. The STD experiments for protein-ligand systems are based on magnetization transfer from protein to ligands and rely upon the difference between two experiments: on-resonance and off-resonance. The signal of the protein is first saturated by a train of selective pulses in a range where only protein signals exist. When a protein becomes saturated, ligands that are in exchange between bound and free forms become saturated when bound to the protein. This mechanism happens *via* spin diffusion, a process where the saturation propagates across the hydrogens in a protein by H-H intramolecular dipolar interactions. The saturation transfer to the ligands occurs through intermolecular cross relaxation at the protein-ligand interface. Because of the long T_1 (relaxation time), these ligands remain in a saturated state when they are free. The off-resonance experiment consists of an identical pulse train but in a range where there are not protein or ligands signals. By subtraction of these two spectra, the obtained spectrum contains only the hydrogen signals belonging to molecules that bind to the protein. Resonance signals from nonbinders do not show up in the difference spectrum. Also, the degree of saturation of the individual hydrogens of a small ligand molecule reflects their proximity with the protein surface [45].

The STD experiments showed that nucleotides (ATP and ADP) bind to SHsp101. The STD NMR spectra for SHsp101 with ATP γ S, ATP, and ADP showed very similar profiles (data not shown). Figure 5A shows the spectrum obtained for Hsp100/ATP γ S, which is similar to the other nucleotide interactions. The observed signals were attributed to the following hydrogen atoms: purine H-8 and H-2 and ribose H-1'. These experiments all allowed for group epitope mapping (GEM) with values around 100%.

The STD NMR experiments provided evidence for the SHsp101-nucleotide interaction with only three interacting hydrogen atoms.

To specify the interactions between the adenosine nucleotides and SHsp101, the heteronuclear correlations between carbon and hydrogen atoms of the ligand in the absence and presence of the chaperone were compared. The NMR HETCOR experiments required the use of a nanoprobe due the low sample amount. Because of the possible ATPase activity of Hsp101, only non-hydrolyzable ATP γ S was monitored, as shown on Fig.5B. All of the purine carbon atom signals, C₀5, C8, C₀4, C₀6 and C2, and only C1' and C2' of the ribofuranose showed different chemical shifts upon binding. The H-2 and H-8 hydrogen signals showed more pronounced chemical shift changes (Table S1). In conclusion, SHsp100 binds to ATP, ATP γ S and ADP by associating with their adenosine and partly interacting with the ribose moieties and three hydrogens H-2, H-8 and H-1' were most affected by binding to SHsp100. Changes in the chemical shifts of carbons C-2', C1', C2, C₀-4, C₀-5, C₀-6, and C-8 were also observed. Therefore, the phosphate ATP γ S region does not appear to interact with the protein. Because the quaternary carbon atoms are not directly hydrogen bonded (because these carbon atoms are bound to four other carbons or atoms), their chemical shift changes were not observed in the HETCOR experiments. However, the $\delta^{13}\text{C}$ chemical shifts were changed, as shown in Table 1 for C₀-4, C₀-5 and C₀-6.

ATP is very important to the function of Clp/Hsp100 proteins as the ability to disrupt protein aggregates depends on nucleotide binding and hydrolysis [5]. Although both nucleotide binding sites, NBD1 and NBD2, are essential for function, they appear to play different roles. For example, NBD1 seems to be necessary for substrate binding whereas NBD2 is not [37]. Also, an asymmetric ATPase activity between the domains seems to be an essential feature for substrate remodeling [46]. Our results revealed that SHsp101 binds nucleotides and the effects caused by this binding will be further investigated.

3.3. Sugarcane expresses Hsp101

The presence of mRNA encoding for SHsp101 was confirmed by the EST sugarcane genome project [34,47]. Herein, we aimed to determine if the SHsp101 protein is normally expressed in sugarcane cells. Serum against the purified recombinant SHsp101 was used in western blotting analysis to assess the presence of SHsp101 in sugarcane cell extracts. SDS-PAGE was loaded with recombinant SHsp101 in one lane and protein extracts from leaf tissues of sugarcane without further treatment in another lane. After running, the gel was incubated with serum against recombinant SHsp101 (Fig. 6). The recombinant SHsp101 was labeled as expected; additionally, a protein with an identical molecular mass was observed in the sugarcane extract, strongly indicating that SHsp101 is expressed in sugarcane. The aforementioned findings open up the possibility of further investigations. For instance one should ask whether the expression of SHsp101 is highly increased when sugarcane is under stress conditions. Additionally, yeast Hsp104 is involved in the propagation of the prion factor under non-stresses conditions [48] but little is known about the function of Clp/Hsp100 proteins in plants when these organisms are not stressed.

4. Conclusions

Clp/Hsp100 AAA+ proteins are potentially key players for improving the expression of heterologous proteins in bacterial cells and also in therapeutic strategies against conformational diseases. Although these chaperones are important for biotechnological and medical purposes, little is known on their mechanism of substrate binding and remodeling and why they are absent in the cytosol of metazoan cells. Studies of other orthologs may help to add information to what is already known about ClpB and Hsp104. Here, one of these orthologs, sugarcane Hsp101, was characterized, confirming that this protein belongs to the Clp/Hsp100 AAA+ family and will help provide information on the relationship between the structure and function for these proteins. The initial cloning and characterization of this protein reported provided basic

information on the function of SHsp101, such as nucleotide binding and expression. This information may help to unravel the functions of Clp/Hsp100 proteins. Further functional studies are underway and will be published in the near future.

Acknowledgements

We thank Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo(FAPESP), Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento(MCT/CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for grants and fellowships. We thank Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) for the use of the LEC-LNBio facility.

References

- [1] C.H.I. Ramos, S.T. Ferreira, *Protein Pept. Lett.* 12 (2005) 213–222.
- [2] L.M. Luheshi, D.C. Crowther, C.M. Dobson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 25–31.
- [3] B. Bukau, J. Weissman, A. Horwich, *Cell* 125 (2006) 443–451.
- [4] A. Tiroli-Cepeda, C.H.I. Ramos, *Protein Pept. Lett.* 18 (2011) 101–109.
- [5] S.M. Doyle, S. Wickner, *Trends Biochem. Sci.* 34 (2008) 40–48.
- [6] J.R. Glover, S. Lindquist, *Cell* 94 (1998) 73–82.
- [7] S. Lee, M.E. Sowa, Y.H. Watanabe, P.B. Sigler, W. Chiu, M. Yoshida, et al., *Cell* 117(2003) 229–240.
- [8] D.A. Parsell, A.S. Kowal, M.A. Singer, S. Lindquist, *Nature* 373 (1994) 475–478.
- [9] A. Mogk, T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rüdiger, D. Röder, H. Langen, et al., *EMBO J.* 18 (1999) 6934–6949.
- [10] M. Zolkiewski, *J. Biol. Chem.* 274. (1999) 28083–28086.
- [11] P. Goloubinoff, A. Mogk, A.P.B. Zvi, T. Tomoyasu, B. Bukau, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96 (1999) 13732–13737.

- [12] A. Mogk, C. Schlieker, C. Strub, W. Rist, J. Weibezahn, B. Bukau, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17615–17624.
- [13] M. Haslbeck, A. Miess, T. Stromer, S. Walter, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 23861–23868.
- [14] K. Liberek, A. Lewandowska, S. Zietkiewicz, *EMBO J.* 27 (2008) 328–335.
- [15] A. Singh, A. Grover, *Plant Mol. Biol.* 74 (2010) 395–404.
- [16] Y.-R.J. Lee, R.T. Nagao, J.L. Key, *Plant Cell* 6 (1994) 1889–1897.
- [17] E.C. Schirmer, S.E. Lindquist, E. Vierling, *Plant Cell* 6 (1994) 1899–1909.
- [18] D.R. Gallie, D. Fortner, J. Peng, D. Puthoff, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39617–39626.
- [19] A.L. Vettore, F.R. da Silva, E.L. Kemper, P. Arruda, *Genet. Mol. Biol.* 24 (2001) 1–7.
- [20] H. Edelhock, *Biochemistry* 6 (1967) 1948–1954.
- [21] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [22] P.A. Bates, L.A. Kelley, R.M. McCallum, M.J. Stenberg, *Proteins* 5 (2001) 39–46.
- [23] D.H.A. Correa, C.H.I. Ramos, *African J. Biochem. Res.* 3 (2009) 164–173.
- [24] S.E. Harding, D.J. Winzor, in: S.E. Harding, B.Z. Chowdhry (Eds.), *Protein–Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry: Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 2001, pp. 105–135.
- [25] D.J. Winzor, S.E. Harding, in: S.E. Harding, B.Z. Chowdhry (Eds.), *Protein–Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry: Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 2001, pp. 74–104.
- [26] J.C. Borges, C.H.I. Ramos, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1276–1285.
- [27] P. Schuck, *Biophys. J.* 78 (2000) 1606–1619.
- [28] P. Schuck, M.A. Perugini, N.R. Gonzales, G.J. Howlett, D. Schubert, *Biophys. J.* 82(2002) 1096–1111.
- [29] P. Schuck, *Anal. Biochem.* 320 (2003) 104–124.

- [30] M.L. Johnson, J.J. Correia, D.A. Yphantis, H.R. Halvorson, *Biophys. J.* 36 (1981) 575–588.
- [31] C.L. Squires, S. Pedersen, B.M. Ross, C. Squires, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 4254–4262.
- [32] K. Motohashi, Y. Watanabe, M. Yohda, M. Yoshida, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 7184–7189.
- [33] Y. Sanchez, S. Lindquist, *Science* 248 (1990) 1112–1115.
- [34] J.C. Borges, M.C. Peroto, C.H.I. Ramos, *Gen. Mol. Biol.* 24 (2001) 85–92.
- [35] M.E. Barnett, A. Zolkiewska, M. Zolkiewski, *J Biol Chem.* 275 (2000) 37565–37571.
- [36] S. Lee, M.E. Sowa, Y.H. Watanabe, P.B. Sigler, W. Chiu, M. Yoshida, et al., *J. Struct.Biol.* 146 (2004) 99–105.
- [37] B. Bösl, V. Grimminger, S. Walter, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 38170–38176.
- [38] P. Wendler, J. Shorter, D. Snead, C. Plisson, D.K. Clare, S. Lindquist, et al., *Mol. Cell.* 34 (2009) 81–92.
- [39] M. Zolkiewski, M. Kessel, A. Ginsburg, M.R. Maurizi, *Protein Sci.* 8 (1999) 1899–1903.
- [40] D.A. Parsell, A.S. Kowal, S. Lindquist, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 4480–4487.
- [41] C.R. Cantor, P.R. Schimmel, Size and shape of macromolecules, in: L.W. McCombs (Ed.), *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*, W.H. Freeman and Company, New York, 1980, .539-590.
- [42] D.C. Teller, E. Swanson, C. De Haen, *Methods Enzymol.* 61 (1979) 103–124.
- [43] S. Zietkiewicz, M.J. Slusarz, R. Slusarz, K. Liberek, S. Rodziewicz-Motowidlo, *Biopolymers* 93 (2010) 47–60.
- [44] H. Huang, J. Milojevik, G. Melacini, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 5795–5802.
- [45] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int.* 42 (2003) 864–890.
- [46] S.M. Doyle, J. Shorter, M. Zolkiewski, J.R. Hoskins, S. Lindquist, S. Wickner, *Nat.Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 114–122.

- [47] J.C. Borges, T.C. Cagliari, C.H.I. Ramos, J. Plant Physiol. 164 (2007) 505–513.
- [48] Y.O. Chernoff, S.L. Lindquist, B. Ono, S.G. Inge-Vechtomov, S.W. Liebman, Science 268 (1995) 880–884.
- [49] W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA, 2002.

Figure captions

Fig. 1: A) Schematic diagram of Hsp100 chaperone structure. Proteins from the Clp/Hsp100 family are composed of an N-terminal domain, an M (middle) domain, and two tandem AAA+ domains (nucleotide-binding domains, NBD). **B) Nucleotide and amino acid sequence of sugarcane Hsp101, SHsp101.** SHsp101 has 912 residues and a predicted molecular mass of 100.9 kDa for the monomer. In the nucleotide sequence, the start and stop codons are in italics. In the amino acid sequence, the two tryptophan residues (positions 545 and 823) are underlined. For purification purposes, a MGSSHHHHHSSGLVPRGSH tag was added to the N-terminus (not shown). **C) Model for the sugarcane Hsp101 monomer.** The model is based on the crystal structure of *Thermus thermophilus* ClpB (PDB entry number 1QVR) [7], which has approximately 50% identity with sugarcane Hsp101. Secondary structure elements are shown as in a ribbon diagram, and the two tryptophan residues are depicted as sticks in red. The model was generated using 3D-JIGSAW [23], and the figure was made using PyMOL Viewer [49]. The Ramachandran graph of the model indicated that 90.1% residues are found in the most favored regions.

Fig.2. SHsp101 purification followed by SDS-PAGE. Mr, molecular mass marker (masses in kDa on the left); lane 1, soluble fraction from bacterial lyses; lane 2, from the affinity chromatography step; lane 3, from the gel filtration chromatography step. The arrow indicates the purified SHsp101.

Fig. 3. Spectroscopic measurements indicate that the produced SHsp101 was folded. Experiments were performed in a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl and 1 mM 2- β -mercaptoethanol at 25°C. **A) Circular dichroism.** Residual molar ellipticity $[\theta]$ was measured from 200 to 260 nm, with minima observed at 208 and 222 nm with a signal of approximately -17000 and -15000 deg cm² dmol⁻¹, respectively, indicative of an alpha helical protein. The amount of helix predicted from the signal at 222 nm [21] is approximately 40 %. **B) Emission fluorescence.** Sugarcane Hsp101 (closed circle) and sugarcane Hsp101 in the presence of 6 M guanidinium chloride (open circle) emitted fluorescence spectra, which were measured with excitation at 295 nm and emission from 305 to 420 nm. A.U., arbitrary units.

Fig. 4. SHsp101 is a hexamer. Experiments were performed in a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl and 1 mM 2- β -mercaptoethanol. **A) Analytical ultracentrifugation sedimentation equilibrium.** The sedimentation equilibrium analyses were performed from 0.3 to 1 mg/mL and the best fit was determined by the randomness of the distribution of the residuals and by minimization of the variation of the variance. The figure shows the best fit of the experimental data at 3000 rpm at 20°C to a molecular mass of 620 \pm 20 kDa. Additional data

and fitting are shown in the Supplemental Material (Fig. S2). All data agree with a molecular mass of 620 ± 20 kDa and have a variance of approximately 10^{-5} . **B) Apparent sedimentation coefficient $s_{20,W}$** (top) and **apparent diffusion coefficient $D_{20,W}$** (bottom) as a function of protein concentration. The values of $s_{20,W}^0$ and $D_{20,W}^0$ were determined by extrapolation to be 15.2 S and 2.4×10^{-7} cm²/s, respectively. A molecular mass of 611 kDa was calculated for SHsp101 using these values (from Equation 2; see Materials and Methods). **C) SEC-MALLS.** The protein was analyzed using a MALLS detector during elution with size exclusion chromatography, and the major peak presented a polydispersity of 1.1 ± 0.2 % and an average molecular mass of 619 ± 6 kDa.

Fig. 5. SHsp101 binds nucleotides. A) STD NMR spectrum. The STD NMR spectrum of a sample containing ATP γ S (1 mM) and SHsp101 (10 μ M) showed three interacting hydrogen atoms and that the signals for H-1', H-2 and H-8 were $\sim 100\%$ saturated. The ligand-interacting hydrogen atoms of the ATP γ S ribbon structure are shown in white. The same was observed in other two cases (SHsp101 with ATP or ADP). **B) HETCOR NMR spectra:** a) ATP γ S free and b) ATP γ S in the presence of SHsp101. The ATP γ S signals, which are correlations $\{^{13}\text{C}, ^1\text{H}\}$ that changed when in contact with the protein (SHsp101), are circled.

Fig. 6. SHsp101 is expressed in sugarcane. SHsp101 was detected in sugarcane extracts (leaf) by immunoblotting. Lane 1: purified recombinant sugarcane SHsp101 (35 ng). Lane 2: buffer alone, control. Lane 3: protein extract (15 μ g) from sugarcane leaf. The proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The blot was probed with an antiserum (1:500) anti-recombinant SHsp101, and the immunological complex was detected with AP-conjugated anti-rabbit IgG (BioRad).

Table list

Table 1. Purification summary of SHsp101 per 1 L of culture.

Purification Step	Total protein ^{a,b} (mg)	SHsp101 ^b (mg)	Yield (%)	Purity (%)
Soluble lysate	280	143	100	51
Affinity chromatography	113	96	67	85
Size exclusion chromatography	43	42	29	98

Errors are less than 4%. ^a3 g of cells from 1 L of culture were lysed by sonication. ^bSHsp101 concentration was determined by the absorbance at 280 nm, and the total protein concentration was measured with the Bradford protein assay (see Material and Methods).

Figure 2

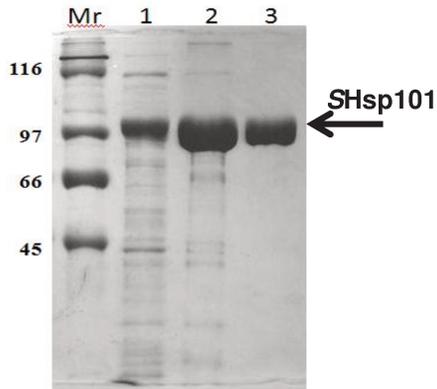


Figure 6

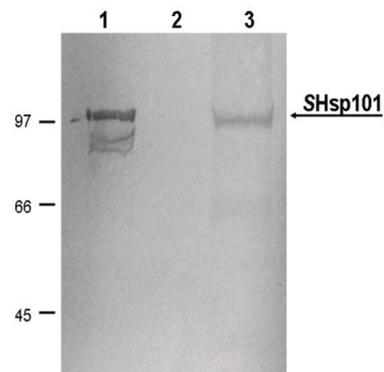


Figure 3A

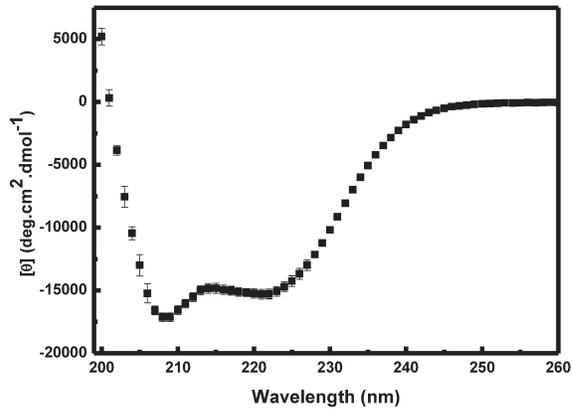


Figure 3B

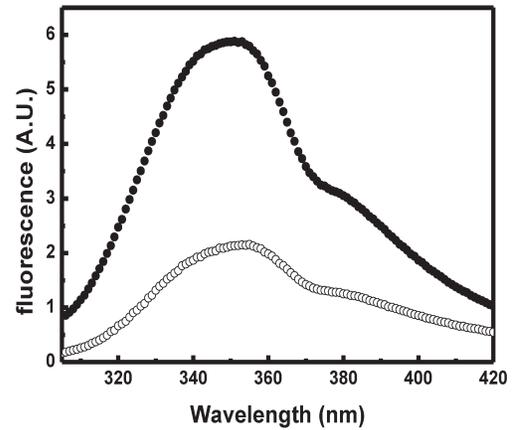


Figure 4A

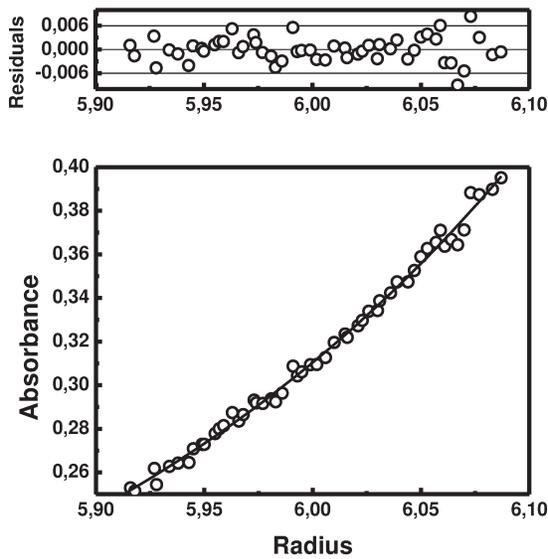


Figure 4B

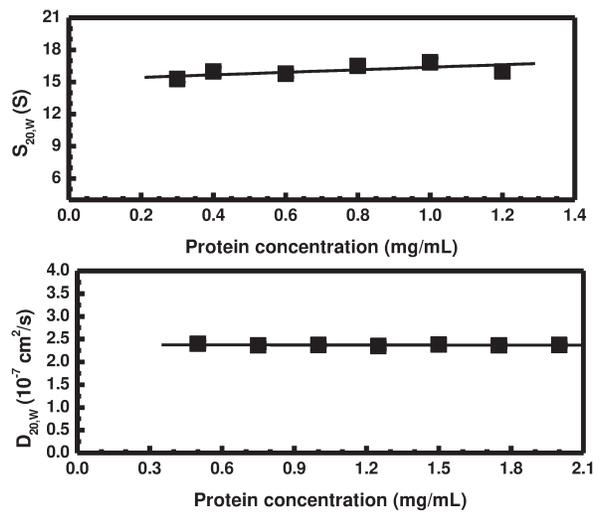


Figure 4C

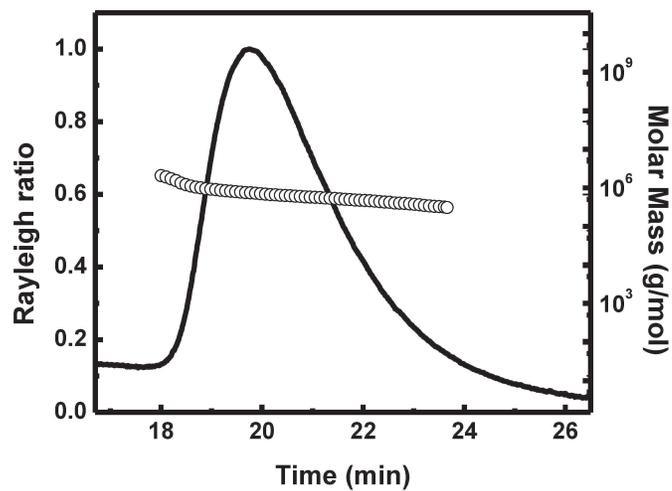


Figure 5A

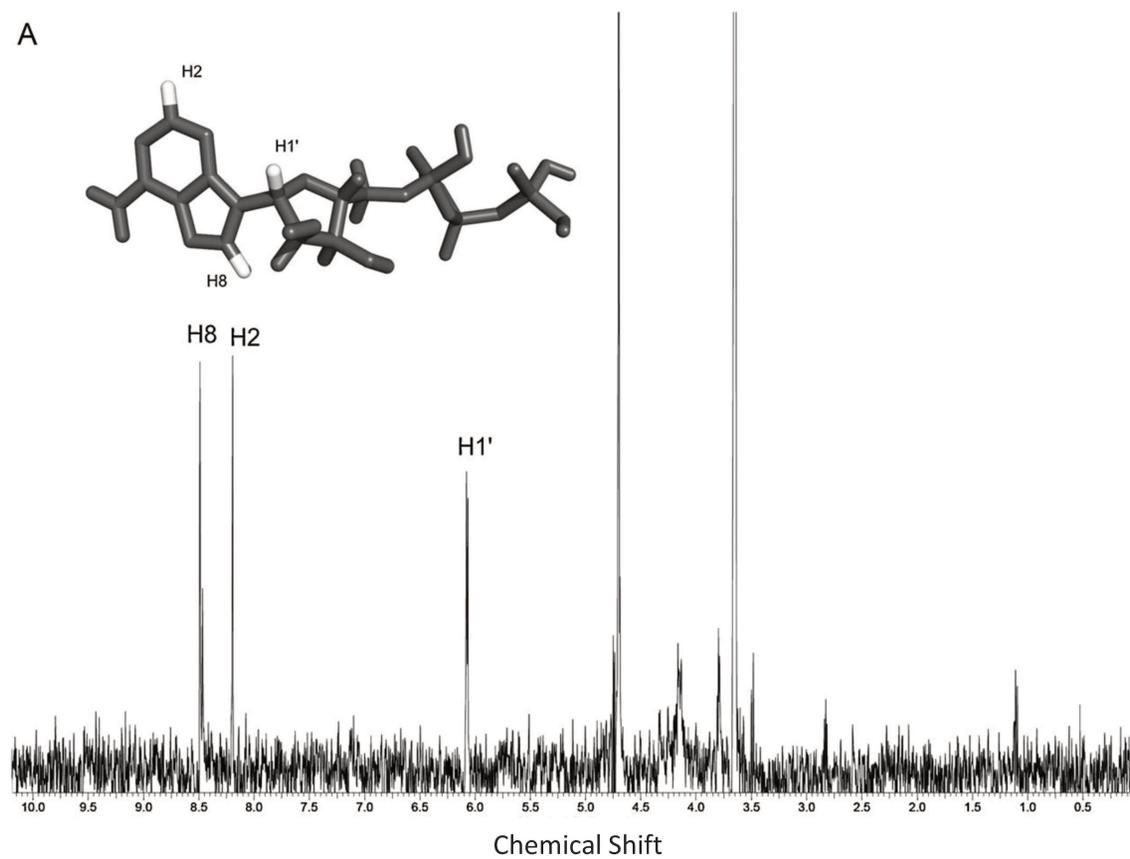


Figure 5B

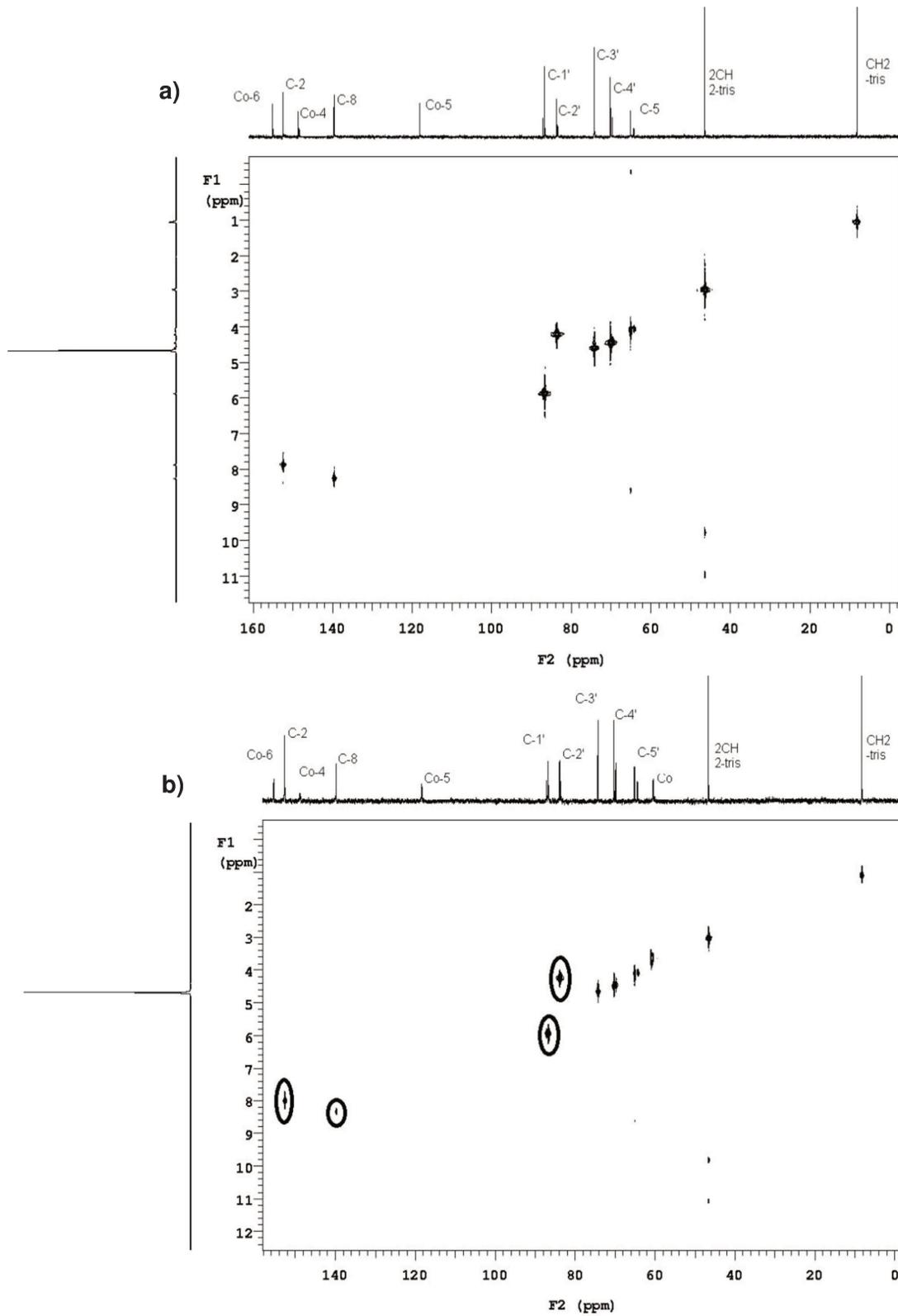


Fig. S1: Sequence alignment of sugarcane Hsp101 of SHsp101 with *A. thaliana* Hsp101(AT_Hsp101) (gi:18410584). Proteins are 84 % identical.

```

S_Hsp101      MNPDNFTHKTNELVAAHEEAASEAGHAQLTPLHLAALVADKGGILRQAITGASGGDGAA 60
AT_Hsp101    MNPDKFTHKTNETIATAHELAVNAGHAQFTPLHLGALISDPTGIFPQAISSAGGEN--A 58
              **:*:*****:.*:*** * :*****:*****.*:* ** : **:*.* : *

S_Hsp101      GDSFERVLSKALKKLPSSPPDPSVPASTALIKAIRRAQSAQKRGDSHLAVDQLLLGLL 120
AT_Hsp101    AQSAERVINQALKKLPSSPPDDIPASSSLIKVIRRAQAAQKSRGDTHLAVDQLIMGLL 118
              .* * ** :.*:*****:*****:***:.*.*****:.*.***:*****:.***

S_Hsp101      EDSQISDCLKEAGVSAARVRAELEKLRGGGRVRESASGDTNFQALKTYGRDLVEQAGKL 180
AT_Hsp101    EDSQIRDLLNEVGVATARVKSEVEKLRGKGGKVESASGDTNFQALKTYGRDLVEQAGKL 178
              ***** * *:*.*:***:.*:***** * :.*:*****:*****:*****

S_Hsp101      DPVIGRDEEIRRVVILSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQRIVRGDVPNSLLDVRL 240
AT_Hsp101    DPVIGRDEEIRRVVILSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQRIVKGDVPNSLTDVRL 238
              *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

S_Hsp101      IALDMGALVAGAKYRGEFEERLKSVLKEVEEAEGKVFILFIDEIHLVLGAGRTEGSM DAN 300
AT_Hsp101    ISLDMGALVAGAKYRGEFEERLKSVLKEVEDAEGKVFILFIDEIHLVLGAGKTEGSM DAN 298
              *.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

S_Hsp101      LFKPMLARGQLRCIGATLEEYRKYVEKDAAFERRFQQVFVAEPPSVPDTISILRGLKEKY 360
AT_Hsp101    LFKPMLARGQLRCIGATLEEYRKYVEKDAAFERRFQQVFVAEPPSVPDTISILRGLKEKY 358
              *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

S_Hsp101      EGHGVRIQDRALVVAQLSARYIMGRHLPDKAIDLVDACANVRVQLDSQPEEIDNLER 420
AT_Hsp101    EGHGVRIQDRALINAAQLSARYITGRHLPDKAIDLVDACANVRVQLDSQPEEIDNLER 418
              *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

S_Hsp101      KRIQLEVELHALEREKDKASKARLVEVKELDDLDRDKLQPLTMKYRKEKERIDEIRK LKQ 480
AT_Hsp101    KRMQLEIELHALEREKDKASKARLIEVRKELDDLDRDKLQPLTMKYRKEKERIDEIRRLKQ 478
              **:*.*:*****:*****:***:*****:*****:*****:*****:***

S_Hsp101      RREELQFTLQEAERRMDLARVADLKYGALQEIDAIAKLESETG-ENLMLTETVGP EQIA 539
AT_Hsp101    KREELMFSLQEAERRYDLARAADLRYGAIQEVESAIAQLEGTSSSEENVMLTENVGPEHIA 538
              :*** * :***** * ** :***:***:***:***:***:***:***:***:***

S_Hsp101      EVVSRWTGIPVTRLGQNDKERLVGLADRLHQRVVGQTEAVNAVAEAVLRSKAGLRPQQS 599
AT_Hsp101    EVVSRWTGIPVTRLGQNEKERLIGLADRLHQRVVGQNAVNAVSEAILRSRAGLRPQQP 598
              *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

S_Hsp101      TGSFLLGPTGVGKTELAKAFAEQLFDENLLVRLIDMSEYMEQHSVARLIGAPPGYV GHE 659
AT_Hsp101    TGSFLLGPTGVGKTELAKALAEQLFDENLLVRLIDMSEYMEQHSVSR LIGAPPGYV GHE 658
              *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

S_Hsp101      EGGQLTEQVRRRPYSVILFDEVEKAHVAVFNTLLQVLDGRLTDGQGRVDFRNTVIIMT 719
AT_Hsp101    EGGQLTEAVRRRPYCVILFDEVEKAHVAVFNTLLQVLDGRLTDGQGRVDFRNSVIIMT 718
              ***** * ***** :*****:*****:*****:*****:*****:*****

S_Hsp101      SNLGAEHLLAGMVGKNSMKVARDLVMQEVRRHFPELLNRLDEIVIFDPLSHEQLRKVAR 779
AT_Hsp101    SNLGAEHLLAGLTGKVTMEVARDCVMREVRKHFPELLNRLDEIVVFDPLSHDQLRKVAR 778
              *****:.* * :*** * * :*****:*****:*****:*****:*****

S_Hsp101      LQMKDVAVRLAERGIALAVTDAALDIILSLSYDPVYGARPIRRWIEKRVVTQLSKMLIQE 839
AT_Hsp101    LQMKDVAVRLAERGVAVTDAALDYILAESYDPVYGARPIRRWMEKRVVTQLSKMVVRE 838
              *****:***** * :*****:*****:***:***:*****:***

S_Hsp101      EIDENCTVYIDAAPAKDELAYRVDRSGGLVNAETGLKSDILIQVPNDAVRSDAAQAVK KM 899
AT_Hsp101    EIDENSTVYIDAG--AGDLVYRVE--SGGLVDASTGKKSVDLIHIANGPKRSDAAQAVK KM 895
              *****:***** . :.*:***:*****:.* ** * ** :*:*:***:*****

S_Hsp101      RIMEEDEDGMDEE--- 912
AT_Hsp101    RIEEIEDDDNEEMIED 911
** * :.* :*
    
```

Fig. S2. Analytical ultracentrifugation sedimentation equilibrium. The sedimentation equilibrium analyses were performed from 0.3 to 1 mg/mL and the best fit was determined by the randomness of the distribution of the residuals and by minimization of the variation of the variance. All data agree with a molecular mass of 616 ± 21 kDa and have variance from 0.73×10^{-5} to 1.01×10^{-5} .

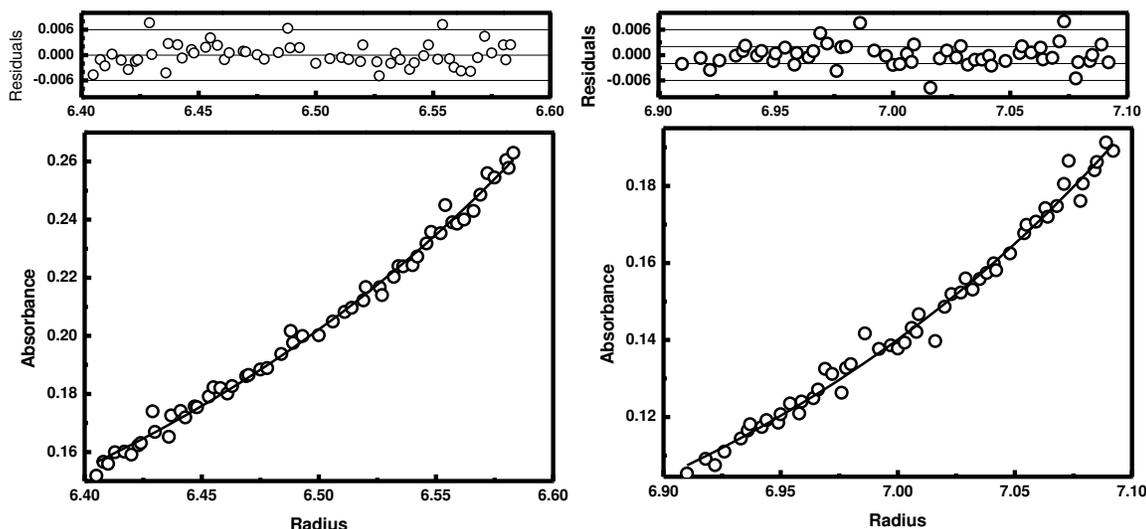


Table S1: Chemicals shifts for correlated carbon and hydrogen atoms of ATP γ S in the absence and in the presence of Hsp100.

	HETCOR: ATP γ S		HETCOR: ATP γ S + Hsp100	
	Carbon (ppm)	Hydrogen (ppm)	Carbon (ppm)	Hydrogen (ppm)
CH ₂ -Tris	8.1	1.0	8.2	1.1
2CH ₂ -Tris	46.4	2.9	46.6	3.0
C0-Tris	-----	-----	60.4	3.5
C-5'	65.0	4.1	65.1	4.1
C-4'	70.1	4.2	70.2	4.2
C-3'	74.2	4.4	74.2	4.4
C-2'	83.6	4.6	83.8	4.5
C-1'	86.6	5.9	86.7	5.9
C0-5	118.0	-----	118.3	-----
C-8	139.6	8.2	139.8	8.0
C0-4	148.6	-----	148.8	-----
C0-6	155.0	-----	155.4	-----
C-2	152.4	7.8	152.6	8.3

PARTE II

3.3 A Hsp101 de cana-de-açúcar e sua atividade ATPásica e de termotolerância

Nesta parte do trabalho foi realizada a caracterização da atividade ATPásica da SHsp101, uma vez que a capacidade de hidrólise do ATP por esta subclasse de chaperonas vem sendo extensivamente estudada para a compreensão do ciclo de atividade destas proteínas, principalmente no que se refere à sua relação com a atividade de desagregação, um mecanismo extremamente importante e que ainda não está bem elucidado. Neste contexto, também foi analisada a capacidade de desagregação da SHsp101 na presença e na ausência de nucleotídeos. Não existe, até o momento, relatos na literatura da caracterização das atividades, ATPásica e de desagregação *in vitro* para Hsp100/ClpB de plantas. Desta forma, a caracterização da SHsp101 deve contribuir para o entendimento da função desempenhada por esta subclasse de proteínas em organismos eucariotos superiores. Além disso, o fato de plantas serem organismos sésseis e terem a necessidade de se adaptar a condições adversas do meio ambiente, deve resultar em características intrínsecas de Hsp100/ClpB. Por fim, foi avaliado a capacidade da SHsp101 de termotolerância através de testes *in vivo* de complementação em levedura.

3.3.1 Resultados

3.3.1.1 Atividade ATPásica da SHsp101

Inicialmente foi avaliada a capacidade de hidrólise do ATP pela SHsp101 através da quantificação de fosfato inorgânico (Pi) produzido ao longo do tempo de incubação a 37°C, na presença de 1,6 µg (0,6 µM) de proteína (Figura 7). Durante os primeiros 30 minutos, a velocidade da reação aumenta rapidamente, indicando a formação do produto. Após 1h de reação a atividade da enzima tem sua velocidade estabilizada, sem aumentos significativos até 3 h.

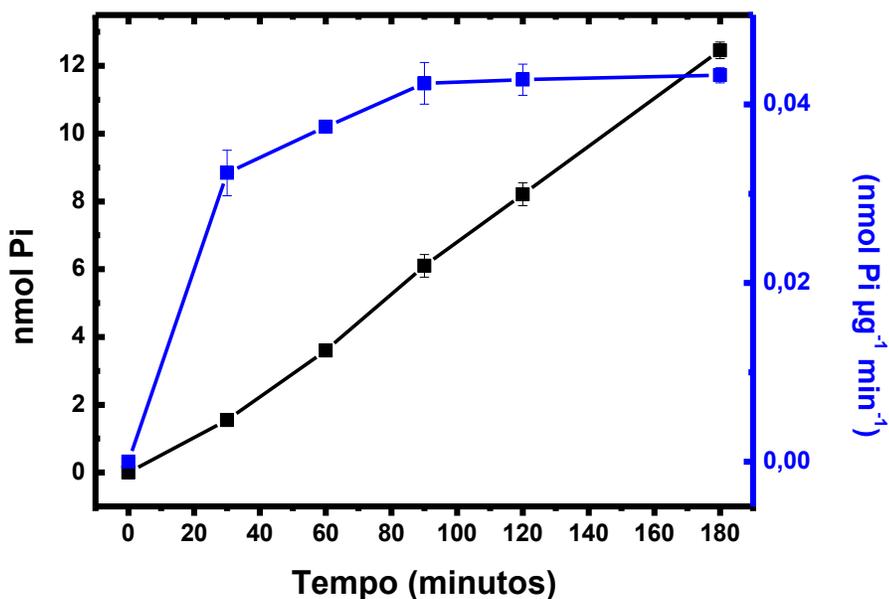


Figura 7: Cinética da atividade ATPásica da SHsp101.

A reação foi realizada na presença de 5 mM de ATP e 0,6 µM de SHsp101, a 37°C. A formação de fosfato inorgânico foi mensurada pelo método de Verde Malaquita (materiais e métodos).

O efeito de diferentes nucleotídeos também foi testado para caracterizar a atividade ATPásica da SHsp101. Os nucleotídeos ADP e AMP não foram hidrolisados

pela SHsp101, corroborando dados obtidos anteriormente para Hsp104 e ClpB (Schimer et al 1998; Woo et al 1992).

3.3.1.1.2 Influência de outros agentes na atividade ATPásica da SHsp101

Uma vez que a Hsp104 de levedura promove sobrevivência após exposição a estresses extremos como altas temperaturas ou altas concentrações de etanol, e a função de ambos os domínios de ligação ao nucleotídeo são requeridas para a tolerância ao estresse (Parsellet al., 1991), foi analisado como a temperatura e o etanol poderiam afetar a atividade ATPásica da SHsp101 (Figuras 8 e 9A). Além disso, foi testado o efeito do agente desnaturante cloreto de guanidina (GdnCl) na atividade ATPásica da SHsp101 (Figura 9B), uma vez que tem sido reportado que GdnHCl reduz a atividade ATPásica de Hsp104 e promove/estabiliza sua oligomerização, e que estes efeitos devem estar relacionados com o processo de desagregação e de cura de prions pela Hsp104 e ClpB (Novicki et al., 2012). A atividade ATPásica da SHsp101 aumentou com incrementos de temperatura, até atingir um máximo de atividade, a 55°C, decaindo em seguida (Figura 8). O etanol inibiu a atividade ATPase da SHsp101 em todas as concentrações testadas, eliminando completamente a atividade quando na concentração de 20% (Figura 9A). O sal caotrópico e agente desnaturante GdnCl inibiu a atividade ATPásica da SHsp101 em até 30% na baixa concentração de 8 mM (Figura 9B). Nowicki e colaboradores (2012) mostraram que Hsp104 apresentou uma redução de 7X em sua atividade ATPásica. Já a atividade ATPásica da ClpB de bactéria é ativada pelo GdnCl (Nowicki et al., 2012).

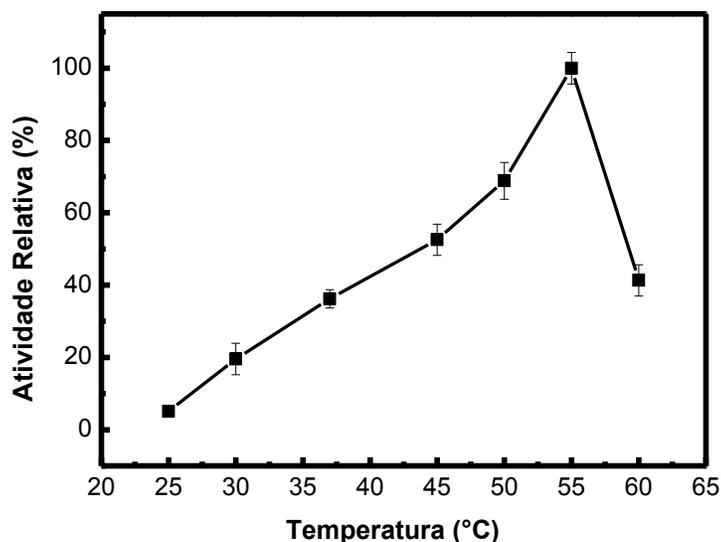


Figura 8: Efeito da temperatura na atividade ATPase da SHsp101.

A reação foi realizada na presença de 2 mM de ATP e 0,6 μ M de SHsp101. A formação de fosfato inorgânico foi determinada após 180 minutos de reação. (foi considerado 100% a atividade em 55°C, correspondendo a 0,04 nmol Pi μ g⁻¹ min⁻¹)

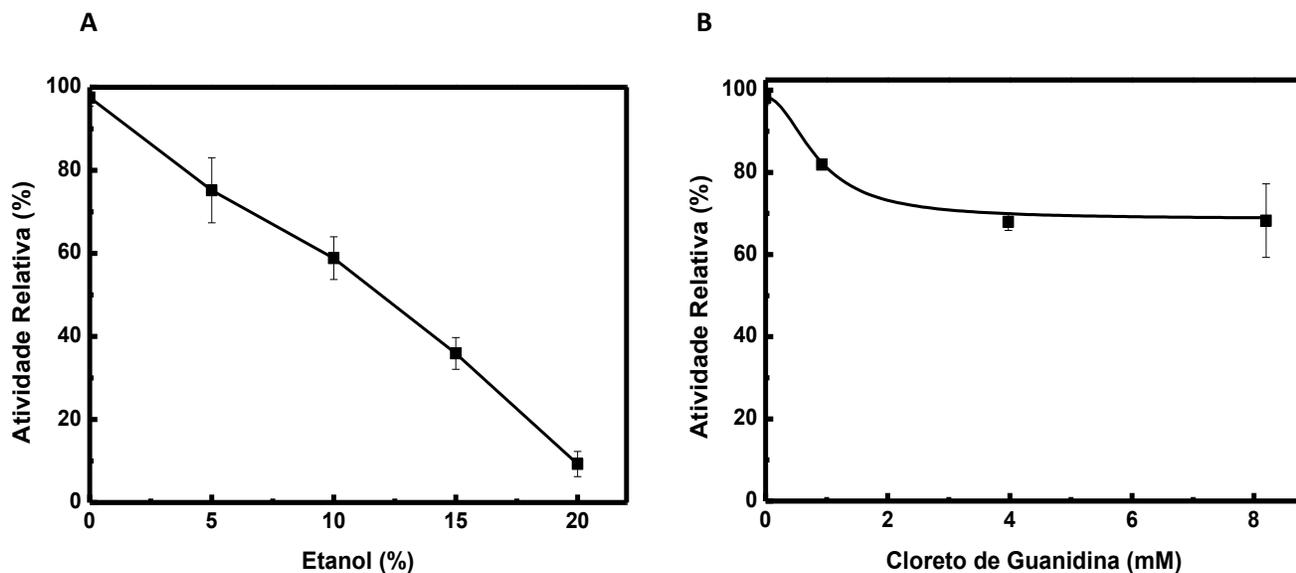


Figura 9: Efeito do etanol e do cloreto de guanidina na atividade ATPásica da SHsp101.

A reação foi realizada na presença de 0,6 μ M de SHsp101 e 4 mM de ATP. A formação de fosfato inorgânico foi determinada após 180 minutos de reação a 37°C. Os gráficos A e B representam a porcentagem de atividade em relação aos controles com ausência de etanol e cloreto de guanidina, respectivamente (100%, correspondendo a 0,023 nmol de Pi formado μ g⁻¹ min⁻¹).

3.3.1.1.3 Influência da concentração de ATP na atividade da SHsp101

Uma análise inicial da influência da concentração de ATP na atividade da SHsp101 mostrou que a enzima não apresenta perfil de cinética de Michaelis-Menten, uma vez que a curva de atividade *versus* concentração de substrato não se comporta como uma hipérbole (Figura 10). Além disso, SHsp101 teve sua atividade hidrolítica inibida em altas concentrações de ATP, sugerindo uma possível inibição pelo produto e/ou pelo substrato.

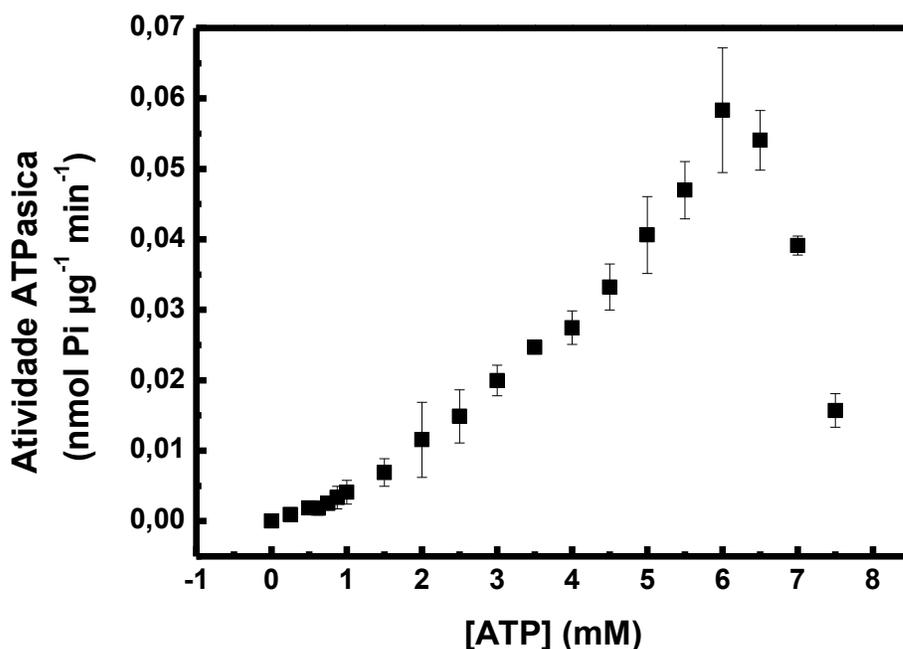


Figura 10: Atividade ATPásica da SHsp101 dependente de concentração de ATP.

A reação foi realizada na presença de concentrações crescentes de ATP e 0,6 µM de SHsp101 a 37°C. A formação de fosfato inorgânico após 180 minutos de reação foi mensurada pelo método de Verde Malaquita (materiais e métodos).

3.3.1.1.4 Inibição pelo ADP

A forte inibição da atividade ATPásica por ADP foi reportada para Hsp104 (Schirmer et al 1998) e ClpB (Woo et al 1992). Para avaliar se o ADP seria capaz de

inibir a atividade ATPásica de SHsp101, os valores de hidrólise do ATP foram determinados na presença de 5 mM inicial de substrato e concentrações crescentes de ADP. A Figura 11 mostra que há inibição de 50% da atividade ATPásica da SHsp101 na presença de 0,25 mM de ADP, e 100% de inibição com 1 mM de ADP, valores semelhantes aos encontrados para a proteína relacionada ClpC de cianobactéria (Andersson et al 2006), enquanto que para Hsp104 ocorre inibição de 85% na presença de uma concentração maior de ADP, a 5 mM (Schimer et al 1998).

A capacidade de inibição por AMP também foi testada. O AMP a 5 mM não inibiu a atividade ATPásica da SHsp101 (resultados não mostrados). Comparativamente, AMP a 5 mM inibiu apenas 10% da atividade ATPásica de Hsp104 de levedura (Schimer et al 1998).

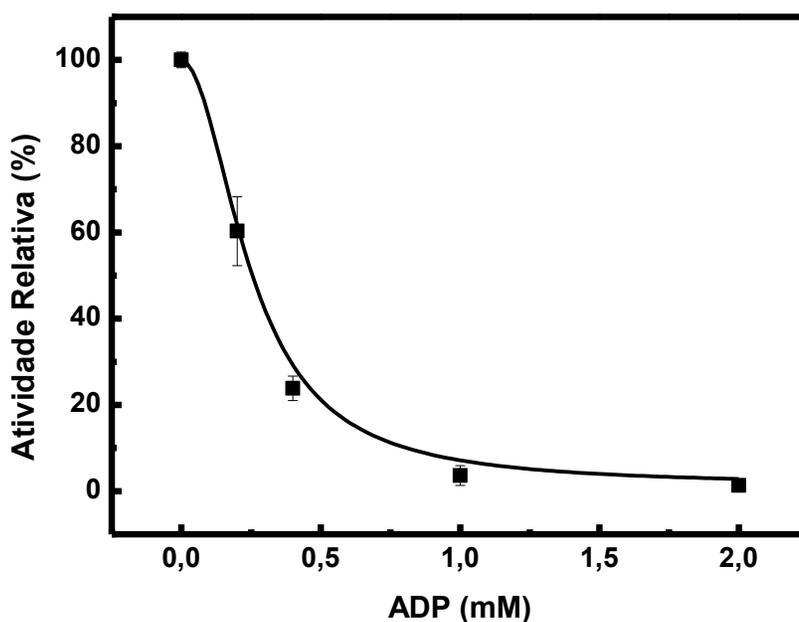


Figura 11: Inibição da atividade ATPásica da SHsp101 por ADP.

A atividade de hidrólise do ATP a 5 mM inicial, foi realizada na presença de concentrações crescentes de ADP e 0,6 μM de SHsp101 incubados a 37°C durante 180 minutos. O gráfico representa a porcentagem de atividade na ausência de ADP (100%, correspondendo a 0,05 $\text{nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$).

Com os resultados obtidos pela dependência da concentração de ATP na atividade ATPásica da SHsp101 (Figura 10), foi possível calcular o número de moléculas de Pi liberadas após a hidrólise do ATP pela SHsp101, e conseqüentemente, a quantidade de ADP geradas (uma vez que a SHsp101 não utiliza ADP como substrato (item 3.3.1.1)). Quando incubada a 37°C durante 180 minutos com 6,5 mM de ATP inicial, a SHsp101 foi capaz gerar 15 nmol de Pi ou ADP. O aumento da concentração de ATP para 7,5 mM inicial, ocasionou uma queda de 70% da atividade ATPásica da SHsp101. Para ocorrer uma inibição por ADP desta proporção seria necessária a presença de cerca de 0,4 mM de ADP (Figura 11), indicando que o perfil de hidrólise de ATP observado na Figura 10 aparentemente não sofreu influência apenas da inibição pelo ADP gerado, mas também pelo aumento na concentração de ATP.

Com a finalidade de evitar o problema de inibição da SHsp101 por acúmulo de ADP e manter as concentrações de ATP em níveis constantes, sendo possível desta maneira avaliar com maior segurança o efeito de inibição observado na Figura 10, foram feitas reações na presença de um sistema regenerador de ATP dependente de PEP e PK (ver materiais e métodos). A Figura 12 mostra que de fato a SHsp101 não apresenta cinética michaeliana, e em concentrações de até 3 mM de ATP o perfil de hidrólise em função do substrato se comporta como uma curva sigmóide. A SHsp101 teve sua atividade ATPásica inibida, agora a partir de 3,5 mM de ATP, que deve ser considerada como a concentração real de ATP no experimento, e não a concentração inicial como na reação sem sistema regenerador de ATP (Figura 10). Este resultado indica que altas concentrações de ATP, além da presença de ADP, regulam a atividade ATPásica da SHsp101, uma vez que com sistema regenerador não há acúmulo de ADP.

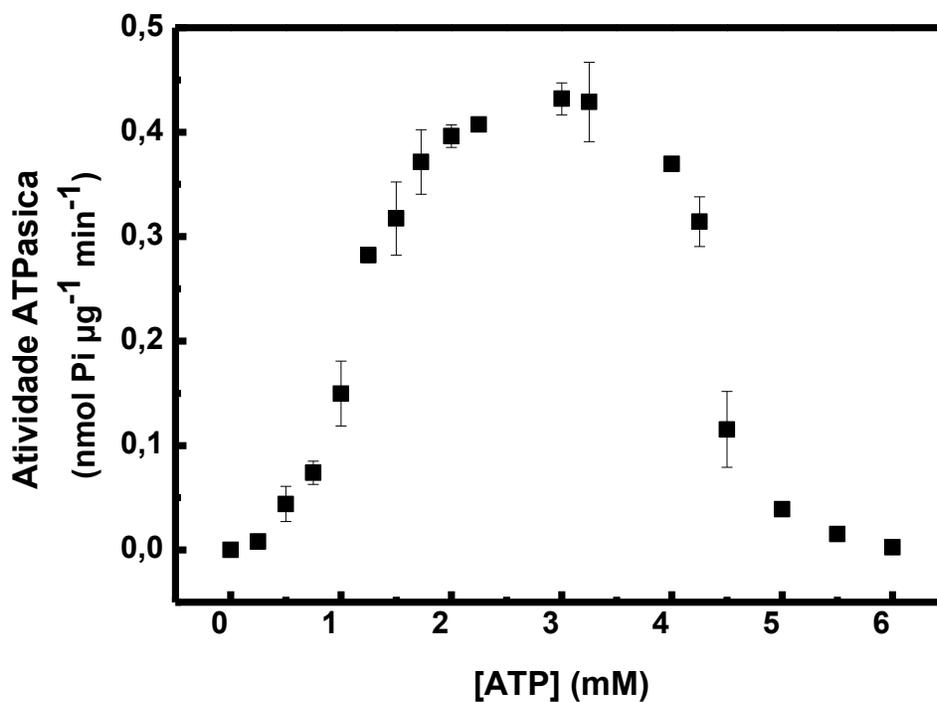


Figura 12: Atividade ATPásica da SHsp101 dependente de concentração de ATP na presença de sistema regenerador de ATP.

A reação foi realizada na presença de sistema regenerador de ATP (contendo PEP e PK) e 0,6 μM de SHsp101 (materiais e métodos). A formação de fosfato inorgânico foi medida após 180 minutos de reação a 37°C.

Os valores de hidrólise de até 3 mM de ATP (Figura 13, a seguir) foram utilizados para obtenção das constantes apresentadas na Tabela 6, utilizando a equação de Hill para catálise enzimática cooperativa, com auxílio do programa OriginPro versão 8.0 (materiais e métodos).

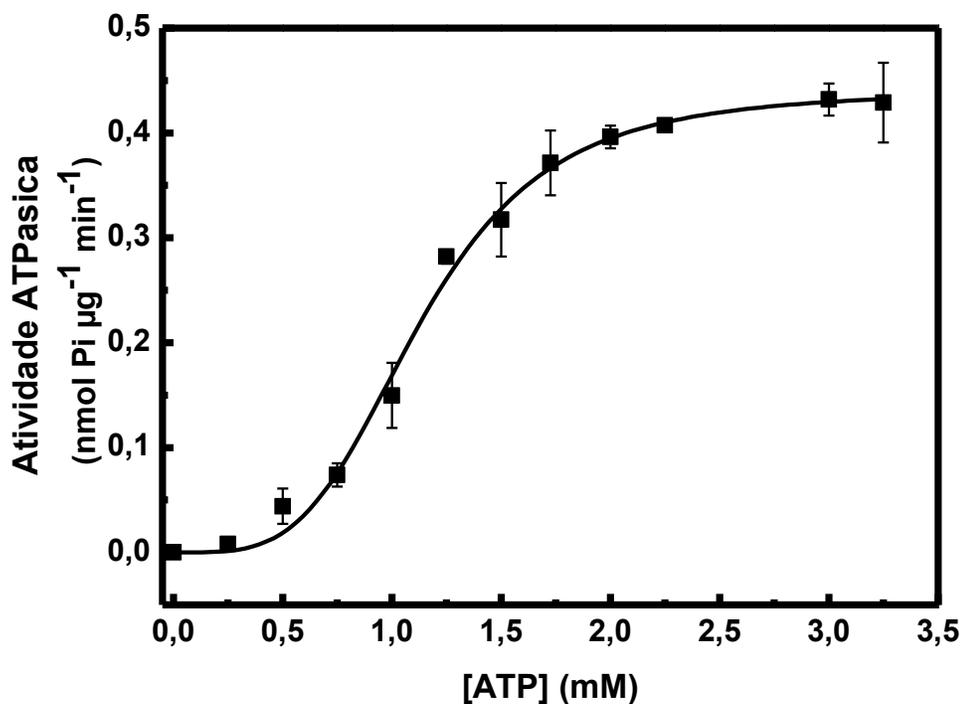


Figura 13: Cinética de hidrólise de ATP pela SHsp101.

A reação foi realizada na presença de sistema regenerador de ATP (contendo PEP e PK) e 0,6 μM de SHsp101 (materiais e métodos). A formação de fosfato inorgânico foi medida após 180 minutos de reação a 37°C. Os valores foram ajustados pela equação de Hill utilizando o programa OriginPro versão 8.0.

Tabela 6: Constantes enzimáticas derivadas da equação de Hill.

Um coeficiente de Hill $h=1$ reduz a equação à de Michaelis-Menten; $h<1$ significa cooperatividade negativa, e $h>1$ significa cooperatividade positiva (Segel, 1993). K'_M : é a concentração de substrato para a qual a enzima está semi-saturada e em que a velocidade é metade de $V_{\text{máx}}$.

Proteína	K'_M (mM)	$V_{\text{máx}}$ (nmol μg^{-1} min $^{-1}$)	Coeficiente de Hill h
SHsp101	1,13	0,44	3,8

3.3.1.2 Ensaio de proteção contra agregação da luciferase desnaturada termicamente

Com a finalidade de verificar a atividade de SHsp101 de proteção contra agregação protéica induzida por choque térmico, a proteína luciferase foi utilizada como modelo de substrato proteico em ensaio de espalhamento de luz (Figura 14). Quando aquecida a 42°C, a proteína luciferase forma agregados insolúveis que podem ser detectados por espalhamento de luz a 320 nm. Como pode ser observado na Figura 12, a proteína SHsp101 foi eficiente em inibir a agregação da luciferase induzida por choque térmico *in vitro*, quando presente na proporção molar 2:1 (SHsp101 a 1 μ M, Luciferase a 0,5 μ M). A adição de BSA, empregada como controle ao invés de SHsp101, não alterou o perfil de agregação da luciferase e, sozinha, não apresenta aumento de espalhamento de luz (resultados não mostrados).

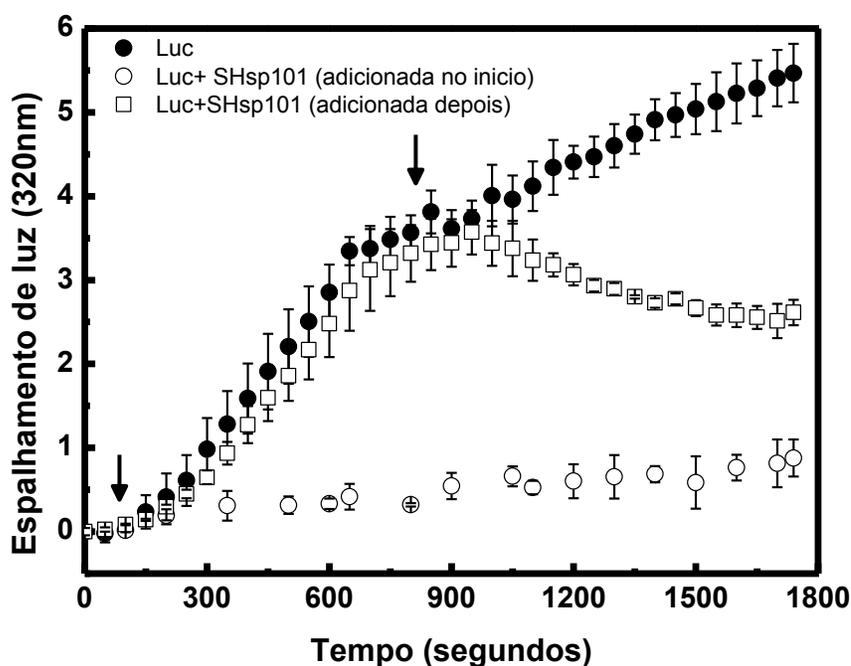


Figura 14: Atividade chaperona de SHsp101 na proteção contra agregação da luciferase desnaturada por choque térmico a 42°C.

A proteína luciferase (Luc; 0,5 μ M, tampão Tris-HCl 25mM pH 7,4, NaCl 250mM) foi submetida a agregação a 42°C na ausência (círculo fechado) ou na presença de SHsp101 a 1 μ M, adicionada no início da reação e antes da agregação da luciferase (círculo aberto), ou após 900 segundos de agregação da luciferase (quadrado aberto), conforme indicado pelas flechas. O espalhamento de luz foi mensurado a 320 nm.

3.3.1.3 Ensaio de reativação da GFP desnaturada térmicamente

No intuito de avaliar a atividade de desagregação e resolubilização pela SHsp101, foram realizados testes com a proteína GFP_{uv} desnaturada por temperatura a 85°C. A proteína GFP_{uv} foi utilizada nos ensaios por possuir grupo cromóforo enterrado em sua estrutura nativa, capaz de emitir fluorescência quando excitado com luz ultravioleta. Desta maneira, em condições de inativação da GFP_{uv}, a fluorescência não é detectada. A fluorescência da GFP_{uv} nativa detectada a 510 nm foi utilizada como controle positivo para o cálculo dos valores de reativação.

Conforme esperado, a GFP_{uv} desnaturada apresentou diminuição de fluorescência após desnaturação, em relação à proteína nativa (resultado não mostrado). Foi observado um aumento de aproximadamente 5 vezes na intensidade da fluorescência da GFP_{uv} desnaturada (correspondendo a 3% da fluorescência da proteína nativa), após incubação de até 3 horas em tampão contendo SHsp101 e a mistura de ATP e ATP_λS na proporção de 2:2 mM. Uma proporção 3:1 mM de ATP e ATP_λS também foi testada, e não houve diferença em relação à atividade na presença da proporção 2:2 mM, apresentada na Figura 15. A incubação com SHsp101 sem nucleotídeos e na presença de ATP ou ATP_λS separadamente (4 mM), não promoveu aumento da fluorescência da GFP_{uv} desnaturada.

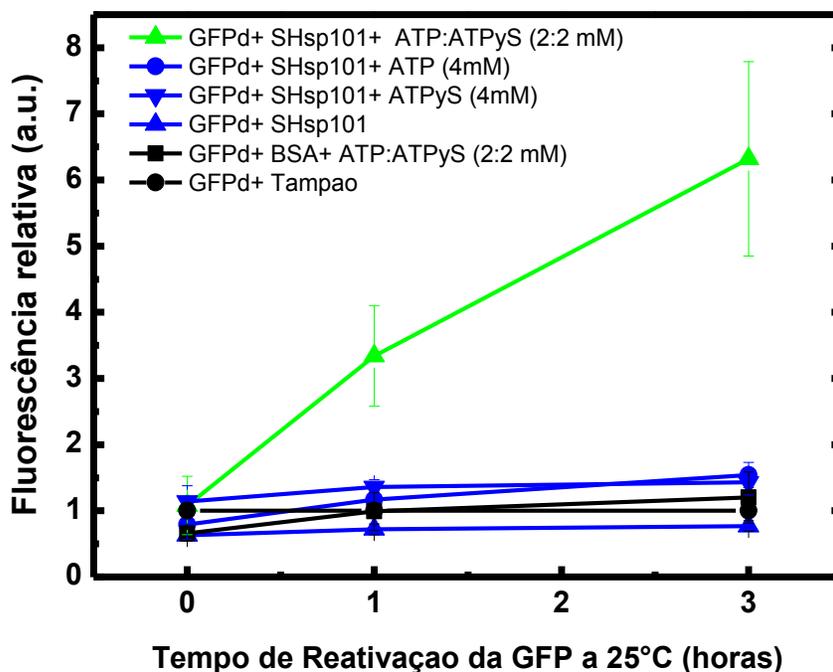


Figura 15: Reativação da GFP pela SHsp101

GFP ν foi inativada termicamente a 85°C (GPFd). A reação de reativação foi conduzida a 25°C, na ausência ou na presença de 4 mM total de nucleotídeos e 0,5 μ M de SHsp101 ou BSA. A fluorescência da GFP ν nativa, agregada, ou reativada foi mensurada com excitação a 395nm e emissão em 510 nm. (U.A, unidades arbitrárias).

Uma vez que foi observada uma maior atividade ATPásica da SHsp101 a 55°C (Figura 8), este ensaio também foi conduzido nesta temperatura. Contudo, nesta condição de ensaio foi observado o mesmo resultado apresentado na Figura 15 (dados não apresentados), mostrando que é funcional também a 55°C.

3.3.1.4 Termotolerância de levedura expressando SHsp101

Para determinar se SHsp101 era capaz de restaurar a função de termotolerância em levedura mutante nulo para o gene homólogo *hsp104*, cepas expressando SHsp101, ou Hsp104 utilizada como controle positivo (materiais e métodos, Tabela 3), foram comparadas em análise de complementação. Em análise qualitativa (Figura 16)

pode-se observar que as cepas expressando Hsp104 ou SHsp101 sob indução de galactose apresentaram termotolerância em níveis até superiores que células selvagens. A SHsp101 promoveu um nível considerável de termotolerância. A contagem das células sobreviventes mostrou que cepas $\Delta hsp104$ expressando SHsp101 submetidas ao choque de 53°C por 20 minutos, apresentaram um aumento de 80 vezes o número de sobreviventes em relação às cepas $\Delta hsp104$ que não expressam SHsp101 ($\Delta hsp104$ + Vetor) (dados não mostrados). Em cepas $\Delta hsp104$ expressando SHsp101 submetidas ao choque de 53°C, a taxa de sobrevivência foi de 34% em relação às cepas correspondentes não submetidas ao choque de 53°C (placas controle); já as cepas $\Delta hsp104$ expressando Hsp104 submetidas ao mesmo tratamento apresentaram 77% de sobrevivência (Figura 17).

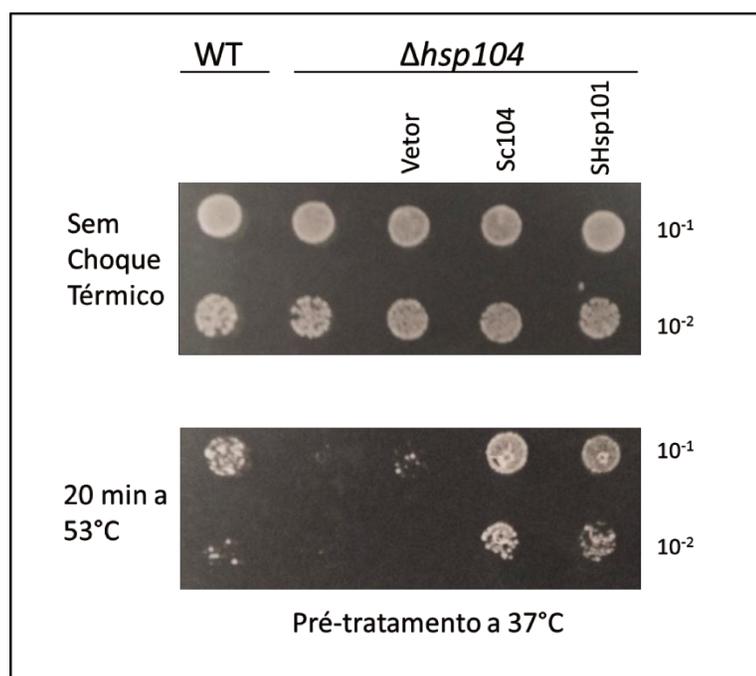


Figura 16: Expressão de SHsp101 complementa fenótipo de termotolerância em levedura nocaute *hsp104*.

Cepas $\Delta hsp104$ foram transformadas com plasmídeo de regulação por galactose, contendo a sequência para expressão de SHsp101, Hsp104, ou o Vetor vazio. As cepas foram submetidas ao pré-tratamento de 37°C durante 40 minutos, e espotadas no meio sólido como controle (Sem Choque Térmico) ou submetidas ao choque de 53°C por 20 minutos. As diluições das células, indicadas na figura, foram espotadas (2,5 μ L) em placas de meio SD+Ura e crescidas durante 3 dias a 30°C.

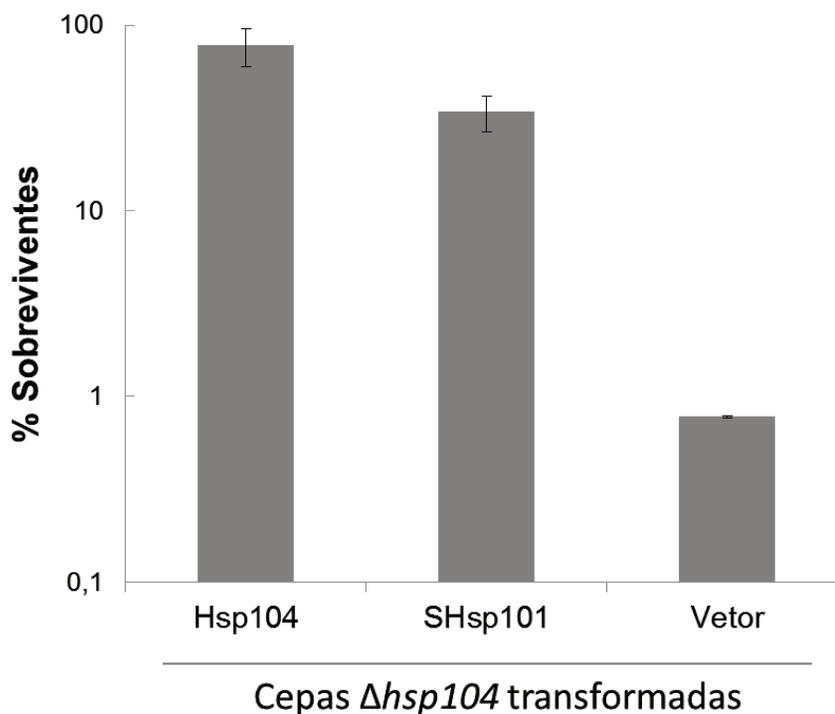


Figura 17: Sobrevivência ao choque de 53°C por 20 minutos.

Três cepas $\Delta hsp104$ transformadas independentemente para cada plasmídeo (Hsp104, SHsp101 ou Vetor pRS316GU vazio, indicados na figura) foram crescidas como descrito na Figura 16. A média de sobrevivência e os desvios padrões foram expressos em porcentagem de sobrevivência obtidas em culturas que receberam o pré-tratamento a 37°C mas não foram expostos a 53°C (100%). Gráfico de escala logarítmica.

3.3.1.5 Alinhamento das sequências das proteínas Hsp100/ClpB

Com a finalidade de auxiliar na análise das diferentes atividades comparadas neste trabalho (discutidas no ítem 3.4.2) foi realizado um alinhamento das sequências de aminoácidos da SHsp101 de cana-de-açúcar e das isoformas citoplasmáticas de *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, e de *E. coli*, conforme ilustrado na Figura 18.

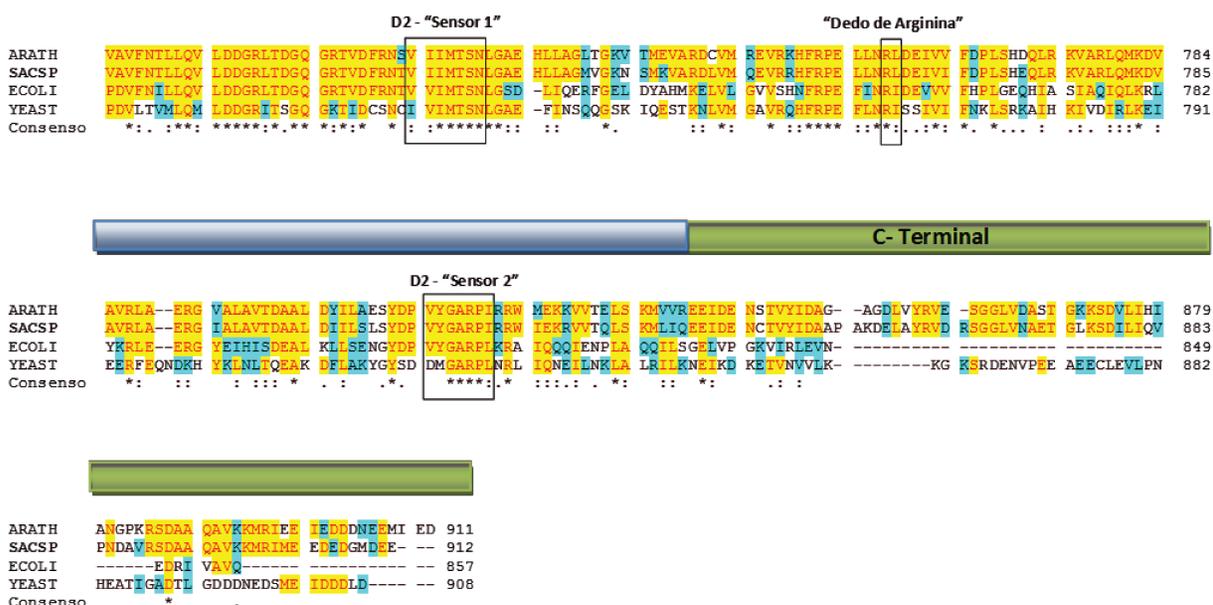


Figura 18: Alinhamento múltiplo de seqüências de proteínas Hsp100/ClpB. O alinhamento foi gerado pelo programa ClustalW (Thompson et al., 1994). (*) indica aminoácidos idênticos em todas as proteínas comparadas (destacados em vermelho com fundo amarelo); (:) indica uma substituição conservada (destacados com fundo azul); (•) indica substituição semi-conservada; (-) indica espaços criados pelo programa a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as seqüências. Os domínios estão divididos por barras coloridas e identificadas acima das seqüências, e os resíduos conhecidamente envolvidos com a ligação e hidrólise de nucleotídeos estão marcados dentro de quadros. A organização dos domínios e a localização das seqüências dos motivos das proteínas Hsp100/ClpB foram preditas por comparação com a estrutura resolvida de ClpA (Guo et al., 2002) e ClpB (Lee et al., 2003). ARATH: *Arabidopsis thaliana* (número de acesso no GenBank P42730); SACSP: *Sachharum* spp. (JN106048); ECOLI: *Escherichia coli* (P63284); YEAST: *Saccharomyces cerevisiae* (P31539).

3.4 Discussão

3.4.1 Parte I: A Hsp101 de cana-de-açúcar é uma proteína hexamérica que liga nucleotídeos

A proteína de cana-de-açúcar Hsp100 foi denominada SHsp101 por ter sido obtida a partir de biblioteca de cDNA de cultivares híbridos *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum* (Vettore et al., 2001) e por possuir uma massa molecular predita de 100,9 kDa, baseado em sua estrutura primária. Os domínios que caracterizam a classe I - subclasse ClpB, estão presentes na SHsp101 nas seguintes posições de aminoácidos: N-terminal (1-162); domínio de ligação ao nucleotídeo 1 (NBD1) (162-341), “pequeno domínio D1” contendo o domínio intermediário MD (341-555); domínio de ligação ao nucleotídeo 2 (NBD2) (555-766); “pequeno domínio D2” (766-860); e o domínio C-terminal (860-912) ausente em procariotos. Os domínios podem ser observados no modelo tridimensional proteína SHsp101, baseado em modelagem comparativa. O modelo gerado a partir da sequência de aminoácidos da SHsp101 e da estrutura cristalográfica da proteína homóloga TClpB (*T. thermophilus*) (PDB: 1QVR) que possui uma resolução de 3 Å, apresentou boa qualidade em termos de ângulos torcionais e distâncias entre átomos, resultando em 90,1% dos resíduos em regiões favorecidas.

A SHsp101 apresentou estrutura secundária similar às homólogas já estudadas (Barnett et al., 2000; Lee et al., 2003) e a presença dos nucleotídeos ATP e ADP (proporção molar de proteína em relação ao nucleotídeo 1:100) não alterou o espectro de dicroísmo circular (resultados não apresentados).

A análise dos espectros de fluorescência dos dois resíduos de Trp da SHsp101 revelou um máximo de intensidade de emissão em 351nm e um centro de massa espectral em 357 nm, valores muito próximo aos verificados para triptofanos livres em solução quando na presença de cloreto de guanidina 6M, 356 nm e 361nm, respectivamente, sugerindo que pelo menos parte destes resíduos estão em um ambiente apolar, no interior da proteína enovelada.

A massa molecular e o estado oligomérico da SHsp101 foram analisados por meio de experimentos de sedimentação em equilíbrio (SE) e gel filtração acoplada a

espalhamento de luz em multi-ângulos (SEC-MALS). Em ambos os experimentos a SHsp101 foi encontrada como uma única espécie de massa molecular estimada em 620 ± 20 kDa e 619 ± 6 kDa, respectivamente, que está de acordo com a massa molecular (MM) teórica predita de 618 kDa para o hexâmero da proteína. As massas mensuradas por SE e SEC-MALS corroboram os dados obtidos para as proteínas da família ClpB/Hsp100 observados em *E. coli* (Zolkiewski et al., 1999), *T. thermophilus* (Lee et al., 2003, Lee et al., 2004) e *S. cerevisiae* (Bösl et al., 2005).

A presença dos nucleotídeos ADP e ATP não promoveram mudanças no estado oligomérico da SHsp101, conforme mensurado por experimentos de SE e de velocidade de sedimentação (VS). Uma independência da ligação de nucleotídeos no estado de oligomerização foi demonstrada para Hsp104 (Parsell et al., 1994a), mas não pra ClpB (Lee et al., 2004; Akoev et al., 2004).

Os valores obtidos pelas análises hidrodinâmicas foram utilizados para calcular o fator de Perrin, que é informativo sobre a forma das moléculas. O fator de Perrin é a razão do coeficiente friccional medido (f) pelo coeficiente friccional para uma esfera hipotética (f_0), cujo raio hipotético é calculado a partir da massa molecular. Nesse sentido, o fator de Perrin (f/f_0) fornece informação sobre a forma da molécula: quanto mais próximo de 1, mais esférica ou globular. O f/f_0 calculado para a SHsp101 foi de 1,6, corroborando os valores preditos para Hsp104 (Bösl et al., 2005) e ClpB (Zietkiewicz et al., 2010).

Ensaio de imunodeteção foram realizados com a utilização de anticorpo policlonal específico para SHsp101, produzido neste trabalho, com a finalidade de identificar a presença da proteína SHsp101 no organismo de origem, a cana-de-açúcar. Foi detectada por “immunoblotting”, em tecido foliar, uma banda definida, com massa molecular aparente esperada para o monômero de 100 kDa, indicando a expressão da SHsp101 sob condições controladas de crescimento da cana-de-açúcar (sem indução de estresse). Antes deste trabalho, a única informação sobre a expressão de Hsp100 de cana-de-açúcar era proveniente de banco de dados de ESTs, onde havia sido verificado baixos níveis de expressão de fragmentos de cDNA hipoteticamente codificantes de Hsp100 (Borges et al., 2007). A transcrição/expressão de proteínas

Hsp100 de plantas tem sido observada principalmente em condições de estresse térmico, somente em alguns casos observou-se expressão constitutiva nos estágios iniciais de desenvolvimento vegetal (revisado em Singh e Grover, 2010). Análises de níveis de transcritos mostraram que, sob condições ideais de crescimento, o RNAm de Hsp100 citoplasmática de *Arabidopsis* e de milho é quase indetectável (Hong e Vierling, 2001; Nieto-Sotelo et al., 2002).

3.4.2 Parte II: A Hsp101 de cana-de-açúcar e sua atividade ATPásica e de termotolerância

A SHsp101 apresentou atividade ATPásica, não sendo capaz de hidrolisar outros nucleosídeos di e tri-fosfatados (ADP e AMP (item 3.3.1.1). Schirmer e colaboradores (1998) e Woo e colaboradores (1992) observaram esta mesma característica para Hsp104 e ClpB. SHsp101 apresentou baixa atividade em temperatura ambiente, sendo aumentada com a elevação da temperatura: a cada 10°C, a atividade específica praticamente duplicou até 55°C, onde a SHsp101 apresentou máxima atividade nas condições do ensaio. Alta atividade ATPásica em temperaturas elevadas também foi observadas para ClpC e ClpD de *A. thaliana* (55°C e 42°C, Rosano et al., 2011). Em leveduras, a Hsp104 está relacionada com a capacidade de auxiliar na promoção de termotolerância do organismo e apresenta atividade ótima a 43°C (Schirmer et al 1998). Da mesma forma, SHsp101 de cana-de-açúcar apresentou atividade de termotolerância *in vivo* em alta temperatura (53°C), conforme discutido adiante.

Em leveduras, o etanol, assim como a temperatura, são importantes para a termotolerância (Sanchez et al., 1992; Parsell et al., 1991). Em organismos vegetais, porém, ainda é desconhecido o efeito do acúmulo de etanol. Neste trabalho mostramos que a atividade ATPásica de SHsp101 é fortemente inibida a partir de 5% de etanol, apresentando atividade inversamente proporcional à concentração de álcool no meio reacional. Contudo, a SHsp101 apresentou uma maior resistência ao etanol quando comparada à Hsp104 (Schirmer et al., 1998): a Hsp104 de levedura teve 75% de sua atividade inibida na presença de 10% de etanol, enquanto que a SHsp101 apresentou a mesma inibição na presença de concentrações próximas a 20% de etanol. Outro agente que afeta a atividade ATPásica de SHsp101, mesmo em concentrações muito baixas (2

mM) é o desnaturante cloreto de guanidina GdnCl. Este efeito também foi observado para Hsp104, enquanto que ClpB é estimulada por GdnCl (Grimminger et al., 2004; Nowicki et al., 2012). Grimminger e colaboradores (2004) haviam demonstrado que a guanidina seletivamente se liga ao sítio de ligação ao nucleotídeo no hexâmero da Hsp104 e aumenta a afinidade da chaperona por ATP, promovendo ou estabilizando sua oligomerização, mas levando à inibição da atividade ATPásica que não foi causada, portanto, pela desnaturação da proteína na presença de GdnCl. Também já foi demonstrado que a presença de GdnCl em meio de cultura de células de levedura leva à perda de propagação de prions, um fenômeno denominado cura de prions (Tuite et al 1981). Há indicativos de que GdnCl não afeta as proteínas do prion, mas a Hsp104, bloqueando a atividade de desagregação da Hsp104 *in vivo* e reduzindo a termotolerância de leveduras. Além disso, células de levedura tratadas com GdnCl e células deficientes em Hsp104 apresentam o mesmo fenótipo em relação a propagação de prions (Ferreira et al 2001; Jung e Masison 2001), reforçando a importância de se compreender a ação deste agente na atividade da Hsp100/ClpB.

A SHsp101 apresentou atividade ATPásica com cinética diferente da classicamente descrita por Michaelis-Menten, mas com cooperatividade, assim como descrito para Hsp104 (Franzmann et al., 2011) e ClpB (Mogk et al 2003a). A homóloga Hsp104 selvagem e a proteína mutante Hsp104 E285Q de levedura apresentam coeficiente de Hill = 1,2 e Hill = 3, respectivamente (Schaupp et al., 2007). O coeficiente de Hill é um valor empírico, onde $h = 1$ reduz a equação à de Michaelis-Menten, uma vez que cinéticas que apresentam perfil de hipérbole não possuem expoente sigmóide, já coeficientes de Hill diferentes de 1 indicam que a enzima apresenta cooperatividade (Hill, 1910; Segel, 1993). Um índice de cooperatividade, R, pode ser definido como sendo a razão entre: a concentração de substrato na qual a velocidade é 90% de $V_{m\acute{a}x}$, e a concentração de substrato que apresenta uma velocidade de 10% de $V_{m\acute{a}x}$ (Koshland et al., 1966). Este índice tem uma relação direta com o expoente da equação de Hill, e portanto uma enzima que apresenta $R = 81$ segue a cinética michaeliana, já enzimas com índice $R < 81$, como é o caso da SHsp101, apresentam cooperatividade positiva. Neste contexto, é sugerido um alto grau de acoplamento entre

os domínios NBD1 e NBD2 da SHsp101, havendo uma transição entre um estado de baixa afinidade que existe em condições de baixa concentração de substrato, e um estado de alta afinidade em concentração maiores de substrato, até a saturação.

A SHsp101 teve a atividade ATPásica inibida por ADP. De fato a SHsp101 interage com ADP, conforme observado nos experimentos de STD-NMR (parte I deste capítulo), mas não o hidrolisa (item 3.3.1.1), sugerindo que a SHsp101 funciona como uma máquina molecular regulada negativamente possivelmente para evitar desperdício de ATP. A inibição total da atividade ATPásica da SHsp101 ocorreu com 1 mM de ADP, enquanto que para Hsp104 ocorre inibição de 85% na presença de uma concentração 5x maior de ADP (Schirmer et al., 1998).

A análise da influência de concentrações de ATP na atividade ATPásica da SHsp101 realizada na presença de sistema regenerador de ATP, revelou que mesmo em condições onde não há acúmulo de ADP ocorre a inibição drástica em altas concentrações de ATP. Efeito similar de inibição por concentrações de ATP acima de 2 mM foi observado apenas em mutantes do domínio NBD1 (K212T e K212E) de ClpB de *E. coli* (Kim et al., 1998). Esta característica pode estar relacionada com uma possível desoligomerização da enzima em altas concentrações de ATP (Kim et al., 2000; Barnett et al., 2002), um fenômeno que poderá ser explorado em análises espectroscópicas que gerem informações a cerca da estrutura terciária e quaternária da SHsp101.

Os parâmetros cinéticos de afinidade por ATP e atividade específica da SHsp101 ($K_M = 1,15$ mM e $V_{máx} = 0,44$ nmol μg^{-1} min $^{-1}$) foram consideravelmente semelhantes aos obtidos para ClpB de *E. coli* que apresenta $K_M = 1,1$ mM e $V_{máx} = 0,8$ nmol μg^{-1} min $^{-1}$ (Woo et al., 1992) e para a sub-classe ClpC2 de *A. thaliana* que apresenta $K_M = 1,42$ mM e $V_{máx} = 0,62$ nmol μg^{-1} min $^{-1}$ (Rosano et al., 2011) cuja identidade com SHsp101 é de 47%. Contudo, os parâmetros foram diferentes para Hsp104 de levedura que apresenta menor afinidade $K_M = 5$ mM, e maior velocidade máxima $V_{máx} = 2$ nmol μg^{-1} min $^{-1}$ (Schirmer et al., 1998).

Neste trabalho foi demonstrado que SHsp101 apresenta uma atividade chaperona de proteção de substrato contra inativação térmica e agregação. Curiosamente, foi relatado que, ao contrário de outras chaperonas, homólogos de

Hsp100 foram incapazes de impedir a agregação de proteínas desnaturadas (Glover e Lindquist, 1998). Esta atividade *in vitro* incomum de Hsp100 foi relatada apenas para ClpB da bactéria gram-positiva halofílica *Tetragenococcus halophilus* (Sugimoto et al., 2006). Foi verificado que a atividade de ClpB de *T. halophilus* de proteção contra agregação de lactato desidrogenase, enolase e proteínas de extrato de *E. coli* submetidas a choque térmico na ausência de ATP, estava relacionada com mudanças estruturais da chaperona em condições de estresse, como a dissociação das espécies hexaméricas em dímeros e monômeros. Sugimoto e colaboradores (2006) sugerem que, nestas condições, as espécies diméricas e monoméricas parecem expor as regiões hidrofóbicas e sítios de interação ao substrato antes escondidos dentro do anel hexamérico. Os autores especulam que esta atividade intrínseca de outras chaperonas possa ocorrer neste organismo para compensar a insuficiência de atividade do sistema Hsp70, cuja atividade foi inferior ao sistema de *E. coli*. Os resultados de atividade da SHsp101 de proteção contra agregação de luciferase obtidos no presente trabalho podem também ter uma relação entre estrutura e função desta chaperona de cana-de-açúcar em condições de estresse, o que poderá ser estudado futuramente.

A atividade de desagregação de proteínas por ClpB/Hsp104 tem sido alvo de muitos estudos, contudo não foi caracterizada *in vitro* para estas chaperonas de organismos vegetais, únicos representantes eucarioto-superiores que conhecidamente as possuem. A SHsp101 sozinha, na presença de ATP ou de ATP_γS a 4 mM, não foi capaz de reativar a proteína GFP_{uv} desnaturada termicamente. Entretanto, a SHsp101 promoveu um aumento de aproximadamente 3-5 vezes na intensidade da fluorescência da GFP_{uv} desnaturada, após incubação de 3 horas em tampão contendo SHsp101 e a mistura de ATP e ATP_γS nas proporções equimolares 1:1 e 3:1, correspondendo a uma recuperação de cerca de 5% da fluorescência de GFP_{uv} desnaturada, quando comparada com a fluorescência de GFP_{uv} nativa. Este dado sugere uma possível associação entre a atividade de desagregação da SHsp101 e sua atividade ATPásica de maneira regulada, uma vez que além do ATP é necessária a presença do análogo de hidrólise lenta do ATP para a atividade de desagregação. De forma análoga ao que ocorre com Hsp104 de levedura (revisado por Hodson et al., 2012) o ATP_γS que,

sozinho, não é capaz de promover a atividade de desagregação pela SHsp101, pode estabilizar o oligômero ao se ligar em um dos domínios NBDs da SHsp101 de hidrólise lenta, justificando a necessidade de sua presença no meio reacional para a atividade referida. Em concordância com estes resultados, estudos *in vitro* de reativação de agregados proteicos demonstraram que as chaperonas ClpB e Hsp104 sozinhas ou na presença de ATP ou ATP_γS, separadamente, não são suficientes para promover a completa resolubilização de proteínas agregadas. Doyle e colaboradores (2007b) observaram um aumento da fluorescência da GFP desnaturada termicamente de cerca de 120 vezes quando incubada durante 80 minutos com ClpB contendo a mistura de ATP e ATP_γS na proporção de 1:1, ou Hsp104 contendo a mistura de nucleotídeos na proporção de 3:1. A baixa atividade de reativação apresentada pela SHsp101 possivelmente pode estar relacionada com o fato da SHsp101 se tratar de uma desagregase, e conforme descrito no referido “modelo do pé-de-cabra”, a SHsp101 poderia apenas ter a capacidade de desfazer grandes agregados em agregados menores. As proteínas presentes nesta porção menor seriam subsequentemente desenoveladas em colaboração com o sistema Hsp70, antes da translocação pelo poro (Tessarz et al., 2008; Weibezahn et al., 2004), e após a translocação do substrato desenovelado o sistema Hsp70/Hsp40 seria novamente requerido, para o reenovelamento da proteína resgatada do agregado. De fato, a presença simultânea de Hsp70 e co-chaperonas é requerida para uma maior eficiência na desagregação e resolubilização pela ClpB e Hsp104, bem como pelo reconhecimento de uma maior variedade de substratos (Doyle et al., 2007a; Doyle et al., 2007b; Glover e Lindquist, 1998; Goloubinoff et al., 1999; Zolkiewski, 2006; Zietkiewicz et al 2004; Motohashi et al., 1999). Alguns trabalhos evidenciaram ainda a necessidade da presença de smHsps para a reativação de certos agregados por Hsp100 (Haslbeck et al., 2005; Lee et al 2005). Desta maneira, não existe um consenso se é relevante para a célula a baixa atividade da ClpB/Hsp100 de resolubilizar uma gama limitada de substratos, na ausência do sistema Hsp70 e outras chaperonas, uma vez que esta atividade foi observada apenas sob condições diferentes das fisiológicas (presença de misturas de ATP/ATP_γS) e *in vitro*.

Tem sido proposto que características estruturais tais como tamanho do agregado proteico e propriedades conformacionais de polipeptídeos desenhados, como o conteúdo de estruturas- β , por exemplo, sejam determinantes para o reconhecimento e atividade de ClpB/Hsp104 (Zietkiewicz et al., 2006; Lewandowska et al., 2007; Mogk *et al.*, 2008). A futura caracterização dos agregados de GFP_{uv} obtidos no ensaio do presente trabalho também poderá contribuir para a compreensão da diferença na atividade de desagregação e reativação apresentada pela SHsp101. Além disso, poderão ser realizados ensaios que monitorem a atividade de desagregação pela SHsp101 (por meio de análises do tamanho e quantidade de agregados antes e após a incubação da SHsp101), e não somente o passo final de resolubilização do substrato, o qual muito provavelmente necessite do sistema Hsp70 de cana-de-açúcar para ocorrer. Assim, a atividade de resolubilização do substrato também deverá ser monitorada na presença do sistema Hsp70 e de smHsp de cana-de-açúcar.

Análises de complementação *in vivo* revelaram que a superexpressão heteróloga de SHsp101 em levedura mutante nulo de *hsp104* ($\Delta hsp104$), aumentou a termotolerância a 53°C. Embora não tenha sido tão eficaz quanto o controle positivo (células expressando a proteína Hsp104), a superexpressão de SHsp101 em cepas $\Delta hsp104$ proporcionou um aumento significativo da sobrevivência: cerca de 80 vezes em relação àquelas que não expressam SHsp101 ($\Delta hsp104$ + Vetor); e uma taxa de sobrevivência de 34% em relação às cepas que não foram submetidas ao choque de 53°C por 20 minutos. Uma complementação parcial e semelhante à apresentada neste trabalho foi observada com emprego de proteínas homólogas de outras espécies vegetais, como *Arabidopsis*, tabaco, trigo e soja, as quais promoveram um aumento de sobrevivência de 20 a 100 vezes em relação às cepas $\Delta hsp104$ que não expressavam a proteína Hsp100 (Lee et al., 1994; Schirmer et al., 1994; Wells et al., 1998). O efeito de complementação parcial pelas homólogas de vegetais provavelmente é devido a identidade e similaridade com relação à Hsp104 (cerca de 40% e 60%, respectivamente) e por serem as proteínas comparadas provenientes de meios celulares diferentes (leveduras e plantas).

4 CAPÍTULO HSP90

4.1 A família das proteínas Hsp90

As proteínas de choque térmico da família Hsp90 – *Heat Shock Protein 90 kDa* – são altamente conservadas, presentes em bactérias e em eucariotos, mas, aparentemente, ausente em *Archae* (Borkovich et al., 1989 ; Csermely et al., 1998; Young et al., 2001a; Wegele et al., 2004; Taipale et al., 2010). A Hsp90 é uma chaperona abundante, representa 1 a 2% do total de proteínas citosólicas na ausência de estresse (Lai et al., 1984), tendo sua síntese aumentada quando em situações de choque de elevada temperatura (Meng et al., 1993) ou baixa temperatura (Krishna et al., 1995) e outros estímulos de estado patológico de células como em isquemia, infecções, doenças auto-imunes e câncer (Csermely et al., 1998; Salminen et al., 2011; Cowen et al., 2005; Yuan et al., 2012; Wang et al., 2010a). Hsp90 é uma proteína essencial para a viabilidade dos organismos eucariotos em quaisquer condições, uma vez que pelo menos uma isoforma é necessária para a sobrevivência destes organismos (com exceção ao reino vegetal que apresenta algumas particularidades, descritas a seguir no item 4.1.1), enquanto, em bactéria, a ortóloga é dispensável quando o organismo não está sob condições de estresse (Borkovich et al., 1989; Versteeg et al., 1999; Johnson 2012; Kadota e Shirasu, 2012).

A Hsp90 atua na manutenção da conformação, regulação e no tráfego de uma variedade de proteínas, denominadas proteínas clientes (ou substrato). Mais de duzentas proteínas clientes de Hsp90 já foram identificadas em mamíferos como dependentes direta ou indiretamente da chaperona para o desempenho de suas funções celulares (Figura 19; Echeverría et al., 2011; ver lista atualizada em <http://picard.ch>), incluindo fatores de transcrição, proteínas quinases, receptores hormonais, e outras classes, sendo muitas delas envolvidas em transdução de sinais e em epigenética, portanto, extremamente importante para o ciclo celular, apoptose, e respostas adaptativas a situações de estresse. Algumas destas funções são

desreguladas no câncer, tornando a Hsp90 um potencial alvo para terapias (Figura 19; Mayer e Bukau, 1999; Young et al., 2001a; Pearl e Prodromou, 2006; McClellan et al., 2007; Li et al., 2011; Da Silva e Ramos, 2012). Estas funções são auxiliadas por co-chaperonas, que atuam recrutando diferentes proteínas clientes para a Hsp90, e regulando seu ciclo conformacional e de hidrólise de ATP, importante para o controle do enovelamento de proteínas clientes (vere detalhes adiante, Krukenberg et al., 2011). A necessidade de co-chaperonas varia dependendo das diferentes espécies e proteínas clientes (Sreedhar et al., 2004; Pearl e Prodromou, 2006).

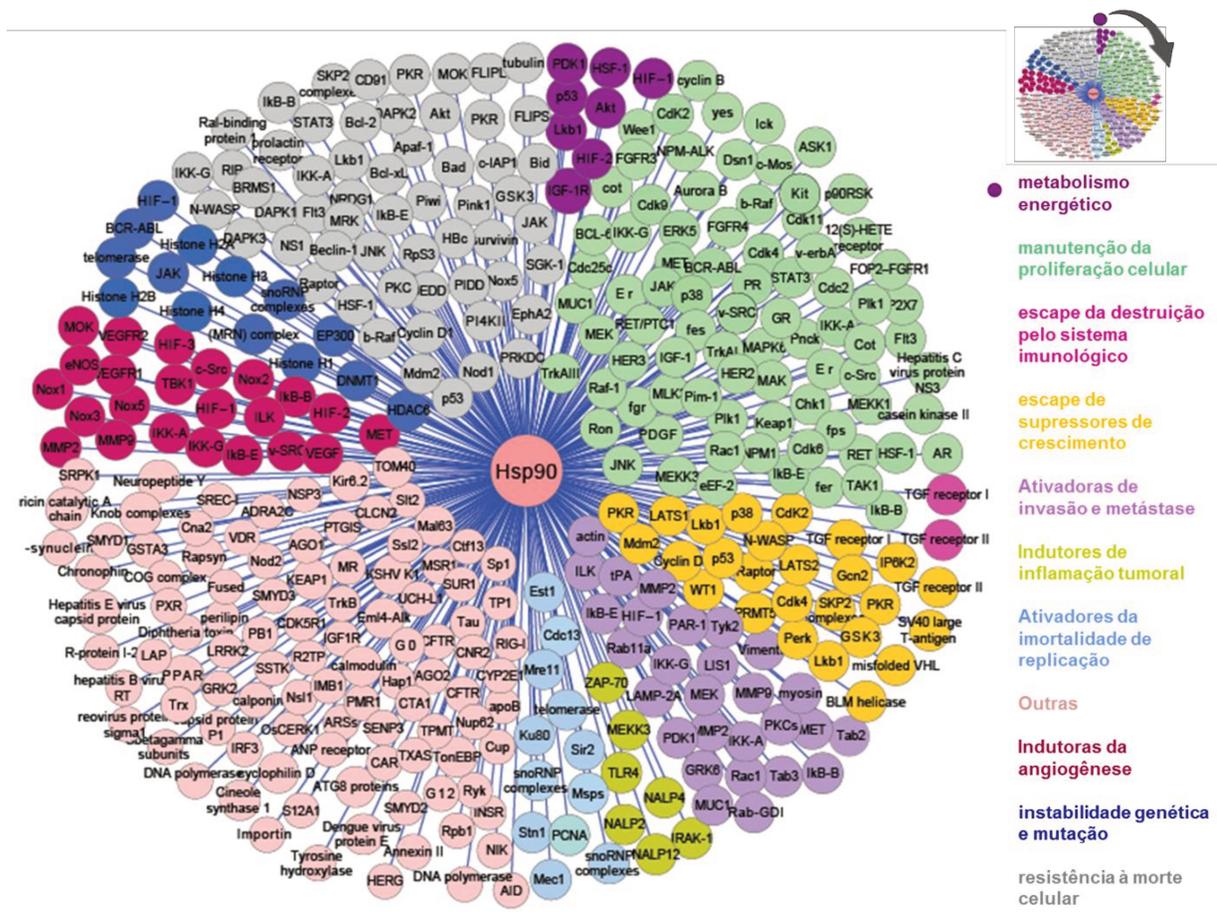


Figura 19: A rede de interação da proteína Hsp90 citosólica humana.

A Hsp90 é essencial para a estabilização e função de muitas proteínas clientes oncogênicas. Proteínas clientes envolvidas em modificações fisiológicas celulares específicas estão agrupadas por colorações diferentes, para destacar o papel da Hsp90 na ativação de proteínas desreguladas nas células cancerosas. Adaptado de Da Silva e Ramos, 2012.

Quatro tipos de proteínas homólogas de Hsp90 ocorrem em eucariotos superiores: Hsp90 citosólica; mitocondrial Trap1 (*tumor necrosis factor receptor-associated protein 1*); de retículo endoplasmático Grp94 (*94 kDa glucose-regulated protein*) e de cloroplasto Hsp90C (Sreedhar et al., 2004; Johnson, 2012). Os genes que codificam membros da família Hsp90 (Tabela 7) foram submetidos a múltiplos eventos de duplicação, durante a evolução, e alguns homólogos parecem ter sido perdidos em algumas espécies: muitas bactérias possuem apenas uma proteína Hsp90, a HtpG (*High temperature protein G*); protistas, fungos a maioria dos eucariotos superiores do reino animal apresentam pelo menos duas isoformas citoplasmáticas, com exceção de *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* que contêm apenas um gene codificante para Hsp90 citosólica; já os eucariotos superiores do reino vegetal apresentam em geral quatro genes codificantes para Hsp90 citoplasmática (Chen et al., 2006; Johnson 2012).

Tabela 7: Representantes da Família Hsp90

Nome	Organismo	Localização	Referencia
HtpG	<i>Eschericia coli</i>	Citoplasma	Bardwell e Craig, 1987
Hsp75/TRAP-1	Humana	Mitocôndria	Song et al 1995; Chen et al., 1996
Hsp90α, Hsp90β	Humana	Citoplasma	Farrelly e Finkelstein, 1984
Grp94 (endoplasmin, gp9)	Humana	Retículo endoplasmático	Kulomaa et al., 1986; Sorger e Pelham, 1987
Hsp82, Hsc82	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Citoplasma	Borkovich et al., 1989
AtHsp90-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma	Krishna e Gloor 2001
AtHsp90-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma	Krishna e Gloor 2001
AtHsp90-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma	Krishna e Gloor 2001
AtHsp90-4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma	Krishna e Gloor 2001
AtHsp90-5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cloroplasto	Krishna e Gloor 2001
AtHsp90-6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mitocôndria	Krishna e Gloor 2001
AtHsp90-7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Retículo endoplasmático	Krishna e Gloor 2001

A Hsp90 se comporta essencialmente como homodímero, sendo cada monômero dividido em três domínios estruturais (Figura 20). O domínio N-terminal possui um sítio de ligação a nucleotídeo altamente conservado, com aproximadamente 30 kDa, responsável por uma fraca atividade ATPásica, que promove amplas mudanças conformacionais na Hsp90, mediando uma série de ciclos de associação-dissociação com as proteínas clientes (Cunningham et al., 2008). O domínio N-terminal está conectado a um domínio central (de aproximadamente 35 kDa) por meio de uma região desestruturada, altamente carregada (Stebbins et al., 1997; Pearl e Prodromou, 2006). Essa região é variável, em tamanho e composição, entre as espécies e isoformas, é ausente na Hsp75/Trap1 (homóloga mitocondrial) e em procariotos (Bardwell e Craig, 1987; Song et al., 1995; Chen e Smith, 1998). A função dessa região carregada ainda não está bem estabelecida, mas parece contribuir para a flexibilidade da proteína e pode estar envolvida na modulação da atividade chaperona da Hsp90 (Scheibel et al., 1999; Hainzl et al., 2009; Tsutsumi et al. 2012). O domínio central é considerado a principal região de interação com suas proteínas clientes. O domínio C-terminal tem aproximadamente 20 kDa, é responsável pela dimerização da Hsp90 e contém o motivo MEEVD, responsável pela interação com co-chaperonas e algumas clientes que o domínio TPR (*tetratricopeptide repeat*) (Minami et al., 1994; Pearl e Prodromou, 2000; Wegele et al., 2004). A dimerização da Hsp90 é essencial para o desempenho de sua atividade biológica (Scheufler et al., 2000; Brinker et al., 2002; Onuoha et al., 2008).

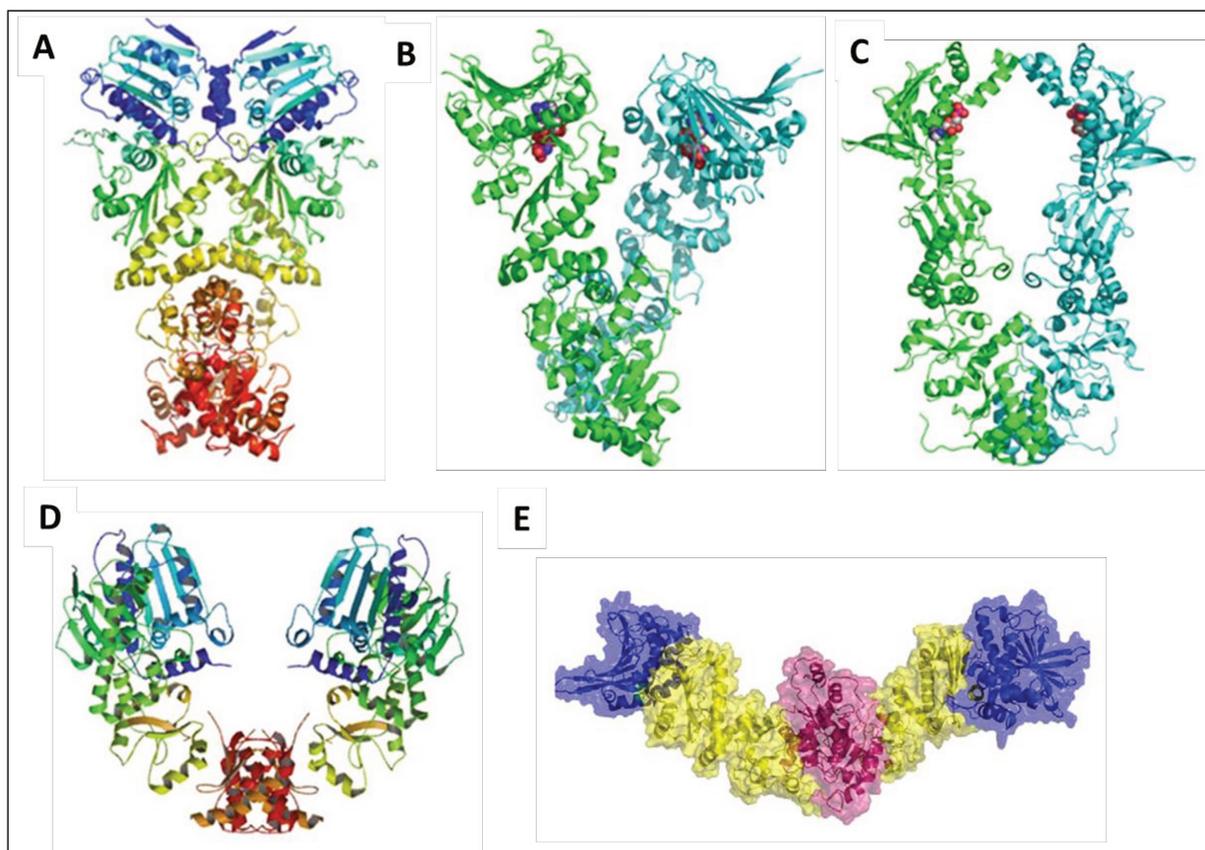


Figura 20: Estruturas da Hsp90.

(A) Estrutura cristalográfica mostrando a conformação fechada da Hsp90 de levedura complexada com AMPPNP e a co-chaperona p23/Sba1 (complexo não mostrado, Ali et al., 2006); (B) Estrutura cristalográfica da Grp94 de mamífero em sua “conformação em V” na presença de AMPPNP (Dollins et al., 2007); (C) Estrutura cristalográfica da HtpG de bactéria em sua conformação semi-fechada na presença de ADP (Schiau et al., 2006); (D) Estrutura cristalográfica da Apo HtpG na sua conformação aberta (Schiau et al 2006); (E) Estrutura em solução, por SAX, da Apo HtpG apresentando uma conformação estendida (Krukenberg et al., 2008). Os domínios estão identificados por cores: em azul, o N-terminal; em amarelo, o domínio central; e em rosa, o domínio C-terminal. As duas cadeias do homodímero da Hsp90 de levedura na sua conformação fechada (A) e da Apo Hsp90 de bactéria na sua conformação aberta (D) estão coloridas de acordo com os domínios: N-terminal em azul escuro e claro, domínio central em verde e amarelo, domínio C-terminal em alaranjado e vermelho. As duas cadeias do homodímero de HtpG na conformação “V” e semi-fechada estão coloridos em verde e azul claro e os ligantes AMPPNP e ADP estão destacados (B e C). Adaptado de Jackson, 2012; Dixit e Verkhivker, 2012.

A dinâmica conformacional relacionada com a atividade ATPásica da Hsp90 proporciona uma complexa regulação da chaperona e tem sido alvo de estudos terapêuticos para o controle da atividade da proteína. (Krukenberg et al., 2011; Jackson, 2012). Inibidores da região N-terminal, tais como geldanamicina, resverastrol e novobiocina, entre outros (Gava e Ramos, 2009), impedem o ciclo dependente de ligação ao nucleotídeo, estabilizando Hsp90 em uma conformação “aberta”, caracterizada por ligação fraca ao substrato, o que resulta na proteólise do mesmo, via maquinaria ubiquitina-proteossomo (Imamura et al., 1998; Bender et al., 1999; McClellan et al., 2005; Cornell et al., 2001; Kudrat et al., 2010). Estes dados têm sido apoiados por estudos estruturais e bioquímicos utilizando cristalografia e espalhamento de raios X à baixos ângulos (SAXS) onde foram observadas diferentes conformações da Hsp90 de diversos organismos na presença e ausência de nucleotídeos (Figura 20). Contudo, análises de mutação, *cross-linking* e microscopia eletrônica em bactéria, levedura e humanos (Vaughan et al., 2009, Southworth et al., 2008) têm revelado que as conformações abertas e fechadas podem coexistir durante um equilíbrio dinâmico na presença e ausência de nucleotídeos nestas espécies. Além disso, experimentos utilizando a técnica de FRET (Mickler et al., 2009; Hessling et al., 2009) demonstraram que a flutuação entre o estado aberto e fechado da Hsp90 de levedura deve ser fracamente acoplada à hidrólise do ATP. Coletivamente, estes estudos sugerem que o ciclo ATPásico da Hsp90 não seria o fator determinante que antecede as mudanças conformacionais, mas um regulador do equilíbrio entre estados conformacionais pré-existent e funcionalmente relevantes (Dixit e Verkhivker 2012).

Além da ligação e hidrólise de ATP, outros fatores influenciam na modulação da Hsp90 como, por exemplo, a ligação de co-chaperonas ao N-terminal podendo levar à uma mudança conformacional, sem deslocar a ligação ao nucleotídeo (Phillips et al., 2007). Além disso, modificações pós-traducionais como S-nitrosilação, fosforilação, ubiquitinação e acetilação também desempenham um papel importante na regulação da atividade Hsp90, modulando especificamente a interação entre a Hsp90 e algumas proteínas clientes (Scroggins e Neckers, 2007; Wandinger et al., 2008; Trepel et al., 2010; Da Silva e Ramos, 2012).

4.1.1 Hsp90 em plantas

As proteínas da família Hsp90 de cana-de-açúcar representam 10% de todo o conteúdo de chaperonas moleculares expressos por este organismo. Foram identificados 4 *clusters* codificando Hsp90, podendo expressar até 9 proteínas diferentes (Borges et al., 2001; Borges et al., 2006). As proteínas Hsp90 são encontradas em diferentes localizações celulares nas plantas. Por exemplo, em *Arabidopsis* existem quatro isoformas citosólicas (Hsp90.1, Hsp90.2, Hsp90.3, Hsp90.4), uma de cloroplasto (Hsp90.5), uma de mitocôndria (Hsp90.6) e uma de retículo endoplasmático (Hsp90.7) (Krishna e Gloor, 2001). Em cana-de-açúcar, ESTs relacionados a família Hsp90 foram encontrados em todos os tecidos estudados (Borges et al., 2006), o que destaca a importância destas proteínas para o organismo como um todo. A expressão das diferentes isoformas de Hsp90 de plantas, em geral, é regulada nos diferentes estágios vegetais (Koning et al., 1992; Marrs et al., 1993; Krishna et al., 1995; Reddy et al., 1998), em resposta ao estresse de baixa temperatura (Nogueira et al., 2003; Krishna et al., 1995), transições de claro/escuro (Felsheim e Das, 1992) e mediada por regulador de crescimento hormonal (Dhaubhadel et al., 1999). A expressão constitutiva de isoformas citoplasmáticas de Hsp90 de *Arabidopsis* também já foi demonstrada (Yabe et al., 1994). Os níveis de expressão de Hsp90 em plantas parecem ser finamente regulados e são críticos para o desempenho das diversas funções apresentadas por estas proteínas, dentre as quais destacam-se: a termotolerância e resistência a doenças (Vierling, 1991; Sangster e Queitsch, 2005; Lu et al., 2003; Kanzaki et al., 2003; Wang et al., 2004; Kadota e Shirasu 2012); resposta ao estresse salino e osmótico (Song et al., 2009); manutenção da função de receptores de hormônios esteróides vegetais (relacionados com tolerância a estresse abiótico, crescimento vegetal e desenvolvimento de raízes) (Divi et al., 2010).; desenvolvimento vegetal (Queitsch et al., 2002). Uma vez que muitas co-chaperonas conhecidamente interatoras de Hsp90 em leveduras e mamíferos, também estão presentes em plantas, como por exemplo p23, Aha1, Hop/Sti1, FKBP e PP5, muito provavelmente elas

também estão envolvidas nestes processos em plantas (revisado em Kadota e Shirasu, 2012).

Diferentemente do que ocorre para os demais organismos eucariotos, mutantes nulos de Hsp90 citosólicas individuais de *Arabidopsis* não apresentam um fenótipo morfológico evidente (Hubert et al., 2003). Já duas isoformas organelares apresentam efeito no desenvolvimento de plantas: Hsp90 de cloroplasto de *A. thaliana* contendo uma alteração de aminoácido apresenta defeitos pleiotrópicos, incluindo defeitos na biogênese de cloroplastos (Cao et al., 2003), e um mutante de Hsp90 de retículo endoplasmático afeta a manutenção do meristema apical (Ishiguro et al., 2002). O progresso do maior entendimento das funções de Hsp90 de plantas tem sido dificultado, principalmente, devido a redundância de Hsp90 citosólica vegetal (Hubert et al., 2003). Considerando o modelo de estudo vegetal *Arabidopsis*, a construção de mutantes nulos para todas as isoformas de Hsp90 citoplasmáticas de expressão constitutiva é um desafio, ficando os estudos quase que praticamente restritos a ensaios de silenciamento com RNA de interferência e com inibidores gerais da atividade ATPásica de Hsp90, que geralmente são sensíveis a luz, limitando as análises. A inativação parcial de mais de uma isoforma com o uso de RNA de interferência, ou a inibição das isoformas por meio de adição do inibidor geldanamicina, resultou em anomalias morfológicas como alteração foliar, crescimento anormal de raízes, alteração no acúmulo de pigmentação, tempo de floração atrasada e reduzido número de sementes, entre outros (Sangster et al., 2007; Queitsch et al., 2002). A atividade reduzida de Hsp90.2 comprometeu o fechamento de estômatos e a sinalização fisiológica dependente de ABA em *Arabidopsis* (Clément et al., 2011). Em trigo também foi evidenciado um efeito no crescimento de sementes e na resposta de hipersensibilidade resultante do silenciamento de Hsp90 citosólica (Wang et al., 2011b). Em suma, a Hsp90 exerce efeitos globais sobre a capacidade de resposta ambiental de plantas frente a muitos estímulos diferentes (Sangster et al., 2008; Queitsch et al., 2002), configurando um importante alvo de estudos para uma maior compreensão destes processos.

4.2 Artigo científico: caracterização conformacional e funcional de Hsp90 de cana-de-açúcar.

Os resultados apresentados neste manuscrito reportam pela primeira vez a clonagem e expressão de uma proteína de choque térmico de 90 kDa de cana-de-açúcar predita citosólica, SsHsp90. A proteína foi obtida em seu estado dimérico em solução, com alto conteúdo de estrutura secundária do tipo hélice alfa, e resíduos de triptofano no interior da proteína enovelada. O modelo tridimensional gerado por modelagem comparativa foi validado com o auxílio de restrições de dados de ligações cruzadas internas entre resíduos de lisina da SsHsp90 acoplado à análises por espectrometria de massas, e apresentou propriedades conformacionais muito semelhantes às obtidas experimentalmente e às homólogas de diferentes organismos. A função da SsHsp90 também foi avaliada, apresentando uma atividade eficiente de proteção contra agregação de proteína-modelo desnaturada por choque térmico. Foi detectada a sua expressão em tecido foliar de cana-de-açúcar não induzida por estresse, o que indica sua importância para este organismo na manutenção da homeostase.

ARTIGO CIENTÍFICO:

Conformational and functional studies of a cytosolic 90 kDa heat shock protein Hsp90 from sugarcane

Artigo científico publicado em:

Plant Physiology and Biochemistry 68 (2013) 16–22

VIVIANE C.H. DA SILVA^{A,B#}, THIAGO C. CAGLIARI^{A,B#}, TATIANI B. LIMA^A, FÁBIO C. GOZZO^A, CARLOS H.I. RAMOS^{A,C*}

Esses autores contribuíram igualmente para o trabalho

^AInstitute of Chemistry and ^BInstitute of Biology, University of Campinas-UNICAMP.P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. ^CInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem.

*To whom correspondence should be addressed: CHIR: cramos@iqm.unicamp.br Phone 55-19-3521-3096 – FAX: 55-19-3521-3023

Abbreviations: CD, circular dichroism; D, deuterium; DSS, disuccinimidyl suberate; DLS, dynamic light scattering; H, hydrogen; MS, mass spectrometry; SEC/MALS, size exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering; SsHsp90, *Saccharum* sp. (sugarcane) 90 kDa heat shock protein.

Keywords: Hsp90, sugarcane, protein folding, molecular chaperone, heat shock protein.

Abstract

Hsp90s are involved in several cellular processes, such as signaling, proteostasis, epigenetics, differentiation and stress defense. Although Hsp90s from different organisms are highly similar, they usually have small variations in conformation and function. Thus, the characterization of different Hsp90s is important to gain insight into the structure-function relationship that makes these chaperones key regulators in protein homeostasis. This work describes the characterization of a cytosolic Hsp90 from sugarcane and its comparison with Hsp90s from other plants. Previous expressed sequence tag (EST) studies in *Saccharum* spp. (sugarcane) predicted the presence of an mRNA coding for a cytosolic Hsp90. The corresponding cDNA was cloned, and the recombinant protein was purified and its conformation and function characterized. The structural conformation of Hsp90 was assessed by chemical cross-linking and hydrogen/deuterium exchange using mass spectrometry and hydrodynamic assays, which revealed regions accessible to solvent and that Hsp90 is an elongated dimer in solution. The *in vivo* expression of Hsp90 in sugarcane leaves was confirmed by western blot, and *in vitro* functional characterization indicated that sugarcane Hsp90 has strong chaperone activity.

1. Introduction

Molecular chaperones and heat shock proteins such as Hsp90 are produced by the cell in order to cope with various forms of cellular stress [1]. In addition, Hsp90 is not only involved in this stress response, but is also important in many regulatory processes, and is a highly conserved, ubiquitous molecular chaperone [2]. The important functions of Hsp90 have been demonstrated by its central role in many cellular processes, such as signaling, proteostasis, epigenetics, differentiation and development, and by the large number of protein partners with which it interacts [3e6]. Hsp90s are homodimers of approximately 160 kDa in which each monomer has three structural domains [7]. The N-terminal domain contains the ATP binding site responsible for its intrinsic ATPase activity [8]. The middle domain is connected to the N-terminal domain through a highly charged linker region that is considered to be a major site of interaction with client

proteins [9,10]. The C-terminal domain contains the dimerization interface and a conserved C-terminal MEEVD motif that is responsible for interaction with tetratricopeptide repeat domain-containing co-chaperones [11,12].

The critical factors that confer stress tolerance in higher plants are still poorly understood, but molecular chaperones likely play a large role in the plant damage control machinery. Accordingly, the Hsp90 system is of particular interest in plants because, as sessile organisms, they are exposed to environmental conditions, such as drought and large osmotic and temperature variations, and thus require physiological responses triggered by the perception of stress [13]. In fact, high expression of cytosolic forms of Hsp90 appears to be very important for protection against biotic and abiotic stresses in plants [13].

Although the quaternary structure of Hsp90 appears to be well conserved among several species, its functionality is not [2,14]. Thus, characterizing Hsp90s from different organisms is a valid strategy for accumulating essential information toward the understanding of this chaperone's mechanism of action. A general strategy to tackle the relationship between structure and function in proteins is to study members of the same protein family, as this may provide clues for identifying important regions in the protein for biological function or interaction with ligands. To gain knowledge about the Hsp90 family, we have cloned and expressed Hsp90 from sugarcane hybrids derived from *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*, which are crop plants with significant agronomic importance, and characterized this protein using biophysical tools. The results show that SsHsp90 has similar structural and functional characteristics of homologous Hsp90 proteins. We also demonstrate that SsHsp90 from sugarcane is constitutively expressed and is able to prevent protein aggregation, suggesting the importance of Hsp90 in sugarcane and adding to the general knowledge of this important family of chaperones.

2. Results and Discussion

2.1. Protein purification

The cDNA coding for *Saccharum* spp. (sugarcane) Hsp90, SsHsp90, was cloned and sequenced (nucleotide and amino acid sequences are shown in Fig. S1). The amino acid sequence of SsHsp90 aligned with that of *Arabidopsis thaliana* AtHsp90.3 is shown in Fig. 1. Amino acid identities with yeast; the dicots *A. thaliana* and *Citrus sinensis*; and the monocots *Zea mays*, *Oryza sativa* and *Sorghum bicolor* are shown in Table 1. Due to a high similarity with cytosolic Hsp90s from plants, a low similarity with organellar isoforms and a lack of a predicted organelle-specific N-terminal transit peptide sequence, the SsHsp90 studied here was labeled as a cytosolic Hsp90 chaperone.

After protein expression, approximately 50% of the recombinant SsHsp90 was soluble in the supernatant of the cell lysate (data not shown). After the first step of purification SsHsp90 was approximately 66% pure, and after gel filtration, it was more than 95% pure (Supplementary data, Fig. S2 and Table S1). Table S1 shows the yield and purity for every step of the purification process.

The folded state of the purified recombinant SsHsp90 was investigated using spectroscopic tools and by examining its oligomeric state. Circular dichroism (CD) analysis indicated that SsHsp90 was a predominantly α -helical protein, as indicated by its far-UV spectrum with minima at approximately 208 nm and 222 nm (Fig. 2A). Analysis of the CD signal at 222 nm predicted an approximately 34% α -helical content. This prediction is in good agreement with the α -helical content of other Hsp90 homologs for which CD and/or structural information is available [15e19]. Additionally, the secondary structure of SsHsp90 was stable at temperatures up to 90°C, as there was no change in the CD signal at 222 nm from 20°C to 90°C (data not shown). The same has been shown for an Hsp90 from *C. sinensis* [19], supporting the hypothesis that Hsp90 chaperones are critical for cellular stress response and/or tolerance in plants and, thus, would have high stability against stressors such as rising temperature.

The folded state of the protein was also investigated using the fluorescence of tryptophan (Fig. 2B) because SsHsp90 has seven tryptophan residues distributed throughout the protein (Fig. 1). This experiment was performed in both the absence and

presence of 6 M guanidinium chloride (Gdm-Cl) (Fig. 2B) to gain further insight into the environment of the Trp residues in the native protein. Native SsHsp90 had a maximum wavelength of 335 ± 1 nm and a spectral center of mass of 344 ± 1 nm, and these values changed to 353 ± 1 nm and 357 ± 1 nm, respectively, when the protein was unfolded by Gdm-Cl (Fig. 2B). Because the spectrum represents the sum of the emitted fluorescence from the Trp residues, we conclude that the majority of the Trp residues were at least partially buried in the native protein. As expected, under denaturing conditions, all Trp residues were exposed to the solvent. Urea-induced unfolding of SsHsp90 was followed by circular dichroism at 222 nm (a probe of secondary structure) and by the fluorescence of tryptophan (a probe of tertiary structure), with urea concentrations of approximately 4.5 M and 4.0 M, respectively, at the midpoint of the transition (Fig. S3). These results are in good agreement with a well-folded structure since the loss of the tertiary structure preceded that of the secondary structure, and both unfolding profiles were cooperative [for review see Ref. [20]].

The molecular mass of SsHsp90 was investigated by size exclusion chromatography combined with multi-angle static light scattering (SEC-MALS) (Fig. 2C), a technique that provides a precise determination of molecular mass independent of molecular shape or hydrodynamic parameters. Fig. 2C shows a plot of the calculated molecular masses versus the elution volume for the selected scattering peaks, which correspond to the UV-monitored elution peaks. An average molecular mass of 172 ± 2 kDa was obtained, confirming that SsHsp90 is a single species with the molecular mass of a dimer. Oligomerization into dimers is essential for the function of Hsp90s, as a mutant unable to form dimers is unable to rescue yeast knockout strains in which both cytosolic hsp90 genes are deleted [21]. In conclusion, recombinant SsHsp90 was purified in a folded state as a dimer in solution.

2.2. Conformational characterization

To further characterize the conformation of SsHsp90, the protein was subjected to a chemical reaction with disuccinimidyl suberate; this reaction results in the cross-linking of two Lys residues that are up to 24 Å away ($C\alpha$ distances) from each other [22]. After

trypsin digestion and peptide analysis by LC-MS/MS, a map of the crosslinked lysines was generated (Fig. S4A). This map was used to provide constraints for generating a model of the structure of monomeric SsHsp90 using crystal structures of known Hsp90s (see Materials and methods). The chosen model was the one that had the best fit for both the cross-linking distance constraints and the Ramachandran diagram as shown in Fig. 3A. Fig. 3B shows the structural model for the dimeric SsHsp90, which was in good agreement with those of other cytosolic Hsp90s [7]. In the dimeric SsHsp90 structure, approximately half of the tryptophan residues were buried in the structure, whereas the other half was at least partially exposed to the solvent, a result that agrees well with that of the fluorescence investigation performed here (see above). Information about ‘dead-end’ lysines and hydrogen/deuterium (H/D) exchange followed by mass spectrometry were used to validate the model showed in Fig. 3B. ‘Dead-end’ lysines are those that are exposed to the solvent and thus react with DSS but without generating cross-linking (Fig. 3B and S4B) and the H/D exchange profile gives information about the rate of solvent exposition of regions in the protein (see a H/D exchange map as a function of time in Fig. S4C1-5). The model for SsHsp90 suggested that this protein was highly similar to the crystal structure from yeast Hsp90 (PDB 2CG9), which is not surprising as they share high identity (Table 1). However, despite their high identity, human Hsp90 contains a region, comprised by residues 95e123, with a different secondary structure and in a different position when compared to the structure of yeast or sugarcane Hsp90 (see Fig. 3C for a superposition of SsHsp90 and cytosolic human Hsp90). Although the identity in this region is high, about 86%, the difference may be related to the fact that cytosolic human Hsp90 (PDB 1BYQ) was crystallized in the presence of ADP while yeast Hsp90 (PDB 2CG9) was crystallized in the presence of AMP-PNP. In favor of this hypothesis is the fact that Hsp90s from *Plasmodium falciparum* (PDB 3K60) and *Leishmania major* (PDB 3U67), that were both crystallized in the presence of ADP, had similar structures compared to the human Hsp90 (Fig. 3C). H/D exchange experiments were also helpful in giving information about protein flexibility and Fig. 3D shows the regions in SsHsp90 with noticeable flexibility. In Fig. 3D, regions with higher deuterium incorporation are shown in red and correspond to the charged linker and middle domains that have

important roles in binding co-chaperones and client proteins [7,9]. These results add important information toward the understanding of the mechanism of action of Hsp90s.

To further support the model generated for the conformation of SsHsp90, the hydrodynamic properties of the model were analyzed using the software Hydropro and compared to those measured for the purified protein. The diffusion coefficient D of SsHsp90 measured by DLS (Dynamic Light Scattering) was approximately $3.2 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ (data not shown), indicating a hydrodynamic radius R_H of approximately 66 Å [23,24]. These results are in very good agreement with those that were experimentally obtained for sweet orange Hsp90 (CsHsp90): $3.3 \times 10^7 \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ and 62 Å, respectively. The hydrodynamic parameters predicted for the dimeric structural model generated for SsHsp90 (Fig. 3B) were also in good agreement with those measured for the chaperone in solution. The dimeric structural model had a diffusion coefficient D of approximately $3.8 \times 10^7 \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ and a hydrodynamic radius R_H of approximately 55 Å (data not shown). The differences between the measured and predicted parameters can be explained by characteristics of proteins in solution, such as, in this case, interconversions between the 'closed' and 'open' states of the dimer [7] and/or by the thickness of the solvation layer of polypeptides in solution [24].

2.3. Functional characterization

The presence of a gene coding for an Hsp90 protein in sugarcane as determined by sequencing and annotating sugarcane ESTs [25,26]. The gene was cloned and the recombinant protein expressed in a folded state as described above. To investigate whether SsHsp90 was normally expressed in sugarcane cells, a western blot assay using an antiserum against CsHsp90 (90% identical to SsHsp90; [19]) was used to investigate protein extracts from the leaf tissues of sugarcane (Fig. 4). Positive (purified recombinant protein) and negative (buffer alone) controls were added, and a protein with a molecular mass identical to that of recombinant SsHsp90 was observed in the sugarcane extract, characteristic of several Hsp90 chaperones, including bovine, yeast and *C. sinensis* Hsp90 [19,31]. CS alone aggregated at 47°C, as previously reported [30], while SsHsp90 did not (Fig. 5), as expected from its high thermal stability, which

was discussed above. Bovine serum albumin, a generic protein control, did not protect CS from aggregation, whereas the presence of SsHsp90 did confer protection (Fig. 5). Two dimers of SsHsp90 per monomer of CS fully protected against aggregation, a result similar to those previously reported for sweet orange [19], bovine and yeast [31] cytosolic Hsp90s but much higher than those previously reported for Hsp90s from bacterium [31] and human endoplasmic reticulum [32]. It is important to compare the chaperone function of Hsp90 from different organisms using the same substrate because the thermal and conformational stability of the client protein determines the extent of interaction [33]. However, it is noteworthy that, different from cytosolic homologs, the oligomerization of both bacterium and endoplasmic reticulum Hsp90s are much less pronounced and they may have different conformational cycles ([7] and references therein).

3. Materials and Methods

3.1. Cloning, expression and purification

cDNA libraries were generated from hybrid sugarcane cultivars that were derived from the crossing of *S. officinarum* and *S. spontaneum* [34]. These cultivars have higher yields and are moreresistant to biotic and abiotic stresses than *S. officinarum*. The cDNA coding for sugarcane Hsp90 (GenBank accession number JX992841) was inserted into the expression vector pET28a (Novagen) by sub-cloning the PCR amplified fragment cut with the enzymes NdeI and EcoRI into the PET28a vector linearized with the same restriction enzymes. The sequences of the primers used for amplification of sugarcane Hsp90 were GTCTCGCCACATATGGCCTCG (forward) and CTCGGGGAATTCTTAGTCGAC (reverse). The resultant vector, pET28aSsHsp90, was then transformed into BL21pLysS Escherichia coli. Cells were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) media containing 30 mg/mL of kanamycin and 34 mg/mL of chloramphenicol, and the expression of the 6-His-tagged protein was induced with 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h, after which the cells were

harvested and disrupted by sonication in the presence of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl and 1 mM EDTA. The resulting lysate was centrifuged at 18,000 g for 30 min, and the soluble fraction was loaded onto a 5 mL Hitrap™ Chelating HP column for affinity chromatography. Next, the sample containing the protein was loaded onto a Hiload 26/60 Superdex 200 prep-grade column for size exclusion chromatography in the presence of 25 mM Tris-HCl pH 7.5 and 150 mM NaCl. Chromatography purification steps were performed using an Äkta FPLC (GE Biosciences), and the fractions were analyzed by 10% SDS-PAGE. Protein samples were stored at -80°C, and concentrations were determined by either the Edelhock method [35] or the Bradford protein assay [36] using a commercial kit (Bio-Rad).

3.2 Spectroscopic analysis

Unless stated otherwise, experiments were conducted with 2-3 μM protein in buffer (25mM Tris-HCl (pH 7.5) and 150mM NaCl) in the absence or presence of urea or guanidinium chloride (see figure captions) at 20°C, and the results of at least three experiments were averaged. Circular dichroism (CD) spectra were recorded with a JASCO model J-810 CD spectropolarimeter and a thermoelectric sample temperature controller (Peltier system) following standard procedures [reviewed in Ref. [37]]. Data were collected from 260 to 200 nm using cuvettes with a 1 mm path length. Emission fluorescence spectra were recorded on an Aminco Bowman® Series 2 (SLM-AMINCO) fluorimeter using quartz cells with a 10 mm x 10 mm optical path length with excitation at 295 nm (bandpass of 4 nm) and emission from 305 to 420 nm (bandpass of 8 nm). Fluorescence spectra were analyzed using either their wavelength maxima or by their center of spectral mass (λ), as described by the equation below:

$$\langle \lambda \rangle = \left(\sum \lambda_i F_i \right) / \left(\sum F_i \right) \quad \text{[Equation 1]}$$

where λ_i is the wavelength and F_i is the fluorescence intensity at λ_i .

3.3 Hydrodynamic analyses

All analyses were performed in buffer containing 25mM Tris-Cl (pH 7.5) and 150 mM NaCl. Multi-angle laser light-scattering coupled with size exclusion chromatography (SEC-MALLS) was used to analyze the mass distributions of the purified SsHsp90. Data analyses were performed by chromatographic separation of 1200 mg/mL of protein using a 1 cm x 30 cm Superdex 200 (GE Healthcare) column at room temperature with a flow rate of 0.5 mL/min by the Astra software package (version 6) supplied in a miniDAWN™ TREOS® System connected in series to an Optilab® rEX refractive index detector (Wyatt Technology Corp, USA). Molecular mass calculations were performed assuming a refractive index increment (dn/dc) value of 0.1850 mL/g. Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed using a DynaPro-MS/X (Protein Solutions) instrument controlled by Dynamics™ v.6.2.05 software. Protein samples (300-1200 mg/mL) were equilibrated at 20°C for approximately 20 min and then subjected to approximately 300 measurements (10 s each). DLS experiments were conducted to determine the experimental translational diffusion coefficient D at each protein concentration. Each value was extrapolated to standard conditions (20°C in water, $D_{20,W}$). The values of $D_{20,W}$ were plotted versus protein concentration to determine the value of zero by extrapolation, $D_{20,W}^0$ which is a unique property of the macromolecule because it should avoid interference from the solvent and from high protein concentrations [reviewed in 24]. Additionally, D can be used to calculate the hydrodynamic, or Stokes, radius from the Stokes-Einstein relationship:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad \text{[Equation 2]}$$

where T is the temperature, k_B is the Boltzmann constant, and R_H is the hydrodynamic radius. Buffer density ($\rho = 1.00442$ g/mL) and viscosity ($\eta = 1.0165 \times 10^{-2}$ poise) and the protein partial specific volume ($V_{bar} = 0.7389$ mL/g) were calculated by the SednTerp software (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>).

3.4. Cross-linking, mass spectroscopy assays and modeling

Cross-linking reactions were performed as previously described [22]. Briefly, SsHsp90 was incubated with disuccinimidyl suberate, DSS (1:50 ratio) in 50mM phosphate buffer (pH 7.5) for 2 h at room temperature. Then, the reaction was quenched with Tris buffer (pH 7.6), and the cross-linked protein was digested by trypsin in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) for 17 h (37°C). Peptides were fractionated using an oasis cartridge and eluted with different concentrations of acetonitrile and analyses were performed by LCMS/MS using a Synapt mass spectrometer (Waters Co.). Crosslinked peptides were identified by using Crux-for-Xlinks [38] and Xlink-Identifier [39] software followed by manual validation. The digestion profile was used to identify cross-linked lysines, indicating that they were within 24Å of each other (C α distances). These constraints, together with the crystal structures of Hsp90s from *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 2CG9), *L. major* (3HJC) and *P. falciparum* (3K60), were used to model a structure for SsHsp90 using comparative modeling that combined the programs Modeller [40] i-Tasser [41], Swiss Prot [42] and Mholline (<http://www.mholline.incc.br>). The model was validated by the cross-linking constraints, by the disposition in the Ramachandran diagram using Procheck [43] and by its hydrodynamic parameters using Hydropro [44].

3.5. Hydrogen/deuterium exchange assay

The hydrogen/deuterium exchange reaction was initiated by a 15-fold dilution of the SsHsp90 protein (100 pmol/uL in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 150 mM sodium chloride and 1% glycerol) with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 1% glycerol, D₂O, at room temperature [45]. At determined times (0-120 min), samples were collected and the reaction quenched by doubling the volume with a quenching buffer (20 mM guanidine hydrochloride, 0.8% formic acid, 20 mM tris-2-carboxyethyl-phosphine, pH 2.5, in H₂O), which reduced the pH to 2.5 [46,47]. Quenched samples were immediately injected into a nanoAcQUITY UPLC System with HDX Technology coupled to SYNAPT G1-S HDMS (Waters Corporation, USA) with electrospray ionization and lockmass correction (using phosphoric acid). Online digestion was

performed using an immobilized pepsin column, 2.0 x 30 mm (Applied Biosystems, USA) for 3 min in H₂O at a flow rate of 40 mL/min and at 15 °C. Peptides from digestion were trapped and desalted online using an ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 mm VanGuard Pre-column (Waters) at 0°C. Trapped peptides were then eluted into an ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 mm, 1 mm x 100 mm column (Waters) at 0°C and separated with a 10 min linear acetonitrile gradient (10-40%) containing 0.1% formic acid at a flow rate of 40 mL/min. All mass spectra were acquired in MS^E mode over the *m/z* range of 50-2000 [47].

3.6. Western blotting

Plant material (leaf tissue) from hybrids derived from the crossing of *S. officinarum* and *S. spontaneum* was homogenized using a mortar and pestle, and phenol-extracted proteins were obtained as described by Delaplace et al. [48]. For the Western blot analysis, SDS-PAGE proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (Millipore) and stained with Ponceau S (Sigma-Aldrich). The membranes were blocked for 1 h with TBS-T (Tris-buffered saline containing 0.03% Tween-20) supplemented with 1% BSA and then incubated with polyclonal *C. sinensis* Hsp90 antiserum (anti-CsHsp90; see Ref. [19]) for 2 h (1:100 dilution). After three washes with TBS-T, the membranes were incubated for 1 h with the secondary antibody (anti-mouse IgG coupled to alkaline phosphatase, Bio-Rad) and detection was performed using an Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad). All processes were performed at room temperature.

3.7. Chaperone activity

Porcine mitochondrial citrate synthase (CS) at 100 nM was incubated with different amounts of SsHsp90 (see figure caption for details) in 40 mM Hepes buffer (pH 7.5) in a final volume of 0.350 mL. The effect of SsHsp90 on the thermally induced denaturation of CS was monitored by light scattering at 360 nm using an Aminco Bowman[®] Series 2 (SLM-AMINCO) fluorimeter with the temperature adjusted to 47°C as a function of time. Negative controls were performed without citrate synthase or Hsp90.

As a control, SsHsp90 was replaced with bovine serum albumin (BSA). The average of at least three independent experiments was used to build each profile curve.

4. Conclusion

Here, we have presented the cloning and purification of SsHsp90, a cytosolic Hsp90 chaperone from sugarcane. The purified recombinant chaperone has all the characteristics of a well-folded protein and is a dimer with a highly ordered structure, as indicated by its high content of both secondary structure and buried tryptophans that unfold in a cooperative manner. Data regarding internal constraints generated from lysine cross-linking were used to generate a 3-dimensional model of SsHsp90 that had conformational parameters similar to the crystal structure from yeast Hsp90, which is not surprising as they share high identity. H/D exchange experiments showed that the charged linker and middle domains, which have important roles in binding co-chaperones and client proteins, were the most flexible regions in SsHsp90. Finally, the functional role of SsHsp90 was assessed as deemed by its chaperone activity and constitutive expression in sugarcane leaves. In conclusion, this work presents strong evidence that a well-folded cytosolic Hsp90 with strong chaperone activity is constitutively expressed in sugarcane.

Acknowledgements

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and fellowships and CNPEM-LNBio for the use of facilities. We thank Dr. David Z. Mokry for critical Reading.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.015>.

References

- [1] A. Tiroli-Cepeda, C.H.I. Ramos, An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis, *Protein Pept. Lett.* 18 (2011) 101-109.
- [2] B. Chen, D. Zhong, A. Monteiro, Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms, *BMC Genomics* 7 (2006) 156.
- [3] R. Zhao, M. Davey, Y.C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili, W.A. Houry, Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone, *Cell* 120 (2005) 715-727.
- [4] A.J. McClellan, Y. Xia, A.M. Deutschbauer, R.W. Davis, M. Gerstein, J. Frydman, Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches, *Cell* 131 (2007) 121-135.
- [5] T. Makhnevych, W.A. Houry, The role of Hsp90 in protein complex assembly, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2011) 674-682.
- [6] V.C. da Silva, C.H.I. Ramos, The network interaction of human 90 kDa heat shock protein Hsp90: a target for cancer therapeutics, *J. Proteomics* 75 (2012) 2790-2802.
- [7] S.E. Jackson, Hsp90: structure and function, *Top. Curr. Chem.* (2012), http://dx.doi.org/10.1007/128_2012_356.
- [8] W.M.J. Obermann, H. Sondermann, A.A. Russo, N.P. Pavletich, F.U. Hartl, In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 901-910.
- [9] S. Matsumoto, E. Tanaka, T.K. Nemoto, T. Ono, T. Takagi, J. Imai, Y. Kimura, I. Yahara, T. Kobayakawa, T. Ayuse, K. Oi, A. Mizuno, Interaction between the N-terminal and middle regions is essential for the in vivo function of HSP90 molecular chaperone, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 34959-34966.
- [10] P. Hawle, M. Siepmann, A. Harst, M. Siderius, H.P. Reusch, W.M. Obermann, The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins, *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 8358-8395.
- [11] C. Ratzke, M. Mickler, B. Hellenkamp, J. Buchner, T. Hugel, Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 16101-16106.
- [12] C. Prodromou, G. Siligardi, R. O'Brien, D.N. Woolfson, L. Regan, B. Panaretou, J.E. Ladbury, P.W. Piper, L.H. Pearl, Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones, *EMBO J.* 18 (1999) 754-762.

- [13] T.A. Sangster, C. Queitsch, The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity, *Curr. Opin. Plant Biol.* 8 (2005) 86-92.
- [14] C. Ratzke, M.N.T. Nguyen, M.P. Mayer, T. Hugel, From a ratchet mechanism to random fluctuations evolution of Hsp90's mechanochemical cycle, *J. Mol. Biol.* 423 (2012) 462-471.
- [15] M.M. Ali, S.M. Roe, C.K. Vaughan, P. Meyer, B. Panaretou, P.W. Piper, C. Prodromou, L.H. Pearl, Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex, *Nature* 440 (2006) 1013-1017.
- [16] A.K. Shiau, S.F. Harris, D.R. Southworth, D.A. Agard, Structural analysis of *E. coli* hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements, *Cell* 127 (2006) 329-340.
- [17] D.E. Dollins, J.J. Warren, R.M. Immormino, D.T. Gewirth, Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones, *Mol. Cell.* 28 (2007) 41-56.
- [18] M.P. Mayer, Gymnastics of molecular chaperones, *Mol. Cell.* 39 (2010) 321-331.
- [19] Y.A. Mendonça, C.H.I. Ramos, Cloning, purification and characterization of a 90kDa heat shock protein from *Citrus sinensis* (sweet orange), *Plant Physiol. Biochem.* 50 (2012) 87-94.
- [20] C.H.I. Ramos, S.T. Ferreira, Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases, *Protein Pept. Lett.* 12 (2005) 213-222.
- [21] Y. Minami, Y. Kimura, H. Kawasaki, K. Suzuki, I. Yahara, The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 1459-1464.
- [22] A.H. Iglesias, L.F. Santos, F.C. Gozzo, Identification of cross-linked peptides by high-resolution precursor ion scan, *Anal. Chem.* 82 (2010) 909-916.
- [23] J.C. Borges, C.H.I. Ramos, Analysis of molecular targets of *Mycobacterium tuberculosis* by analytical ultracentrifugation, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1276-1285.
- [24] C.R. Cantor, P.R. Schimmel, Size and shape of macromolecules, in: L.W. McCombs (Ed.), *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*, W.H. Freeman and Company, New York, 1980, pp. 539-590.
- [25] J.C. Borges, M.C. Peroto, C.H.I. Ramos, Molecular chaperone genes in the sugarcane expressed sequence database (SUCEST), *Gen. Mol. Biol.* 24 (2001) 85-92.
- [26] J.C. Borges, T.C. Cagliari, C.H.I. Ramos, Expression and variability of molecular chaperones in the sugarcane expressome, *J. Plant Physiol.* 164 (2007) 505-513.

- [27] A.S. Viridi, A. Thakur, S. Dutt, S. Kumar, P. Singh, A sorghum 85 kDa heat stressmodulated protein shows calmodulin-binding properties and cross-reactivity to anti-*Neurospora crassa* Hsp 80 antibodies, *FEBS Lett.* 583 (2009) 767-770.
- [28] N. Yabe, T. Takahashi, Y. Komeda, Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* Hsp90-family gene HSP81, *Plant Cell. Physiol.* 35 (1994) 1207-1219.
- [29] T.A. Sangster, A. Bahrami, A. Wilczek, E. Watanabe, K. Schellenberg, C. McLellan, A. Kelley, S.W. Kong, C. Queitsch, S. Lindquist, Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels, *PLoS One* 2 (2007) e648.
- [30] J. Buchner, H. Grallert, U. Jakob, Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein, *Methods Enzymol.* 290 (1998) 323-338.
- [31] U. Jakob, H. Lilie, I. Meyer, J. Buchner, Transient interaction of hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase implications for heat shock in vivo, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7288-7294.
- [32] K.A. Krukenberg, D.R. Southworth, T.O. Street, D.A. Agard, pH-dependent conformational changes in bacterial Hsp90 reveal a Grp94-like conformation at pH 6 that is highly active in suppression of citrate synthase aggregation, *J. Mol. Biol.* 390 (2009) 278-291.
- [33] M. Taipale, I. Krykbaeva, M. Koeva, C. Kayatekin, K.D. Westover, G.I. Karras, S. Lindquist, Quantitative analysis of hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition, *Cell* 150 (2012) 987-1001.
- [34] A.L. Vettore, F.R. da Silva, E.L. Kemper, P. Arruda, The libraries that made SUCEST, *Genet. Mol. Biol.* 24 (2001) 1-7.
- [35] H. Edelhock, Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in protein, *Biochemistry* 6 (1967) 1948-1954.
- [36] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [37] D.H.A. Correa, C.H.I. Ramos, The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function, *Afr. J. Biochem. Res.* 3 (2009) 164-173.
- [38] S. McIlwain, P. Draghicescu, P. Singh, D.R. Goodlett, W.S. Noble, Detecting cross-linked peptides by searching against a database of cross-linked peptide pairs, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 2488-2495.

- [39] X. Du, S.M. Chowdhury, N. Manes, S. Wu, U. Mayer-Cumblidge, J. Adkins, G.A. Anderson, R.D. Smith, Xlink-identifier: an automated data analysis platform for confident identifications of chemically cross-linked peptides using tandem mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 10 (2010) 923-931.
- [40] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779-815.
- [41] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinforma.* 9 (2008) 40.
- [42] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucl. Acids Res.* 31 (2003) 3381-3385.
- [43] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst* 26 (1993) 283-291.
- [44] A. Ortega, D. Amoros, J. García de la Torre, Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic and residue-level models, *Biophys. J.* 101 (2011) 892-898.
- [45] T.F. Wales, J.R. Engen, Partial unfolding of diverse SH3 domains on a wide timescale, *J. Mol. Biol.* 357 (2006) 1592-1604.
- [46] J.R. Engen, Analysis of protein complexes with hydrogen exchange and mass spectrometry, *Analyst* 128 (2003) 623-628.
- [47] H. Wei, J. Ahn, Y.Q. Yu, A. Tyimiak, J.R. Engen, G. Chen, Using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry to study conformational changes in granulocyte colony stimulating factor upon PEGylation, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 23 (2012) 498-504.
- [48] P. Delaplace, F. van der Wal, J.F. Dierick, J.H. Cordewener, M.L. Fauconnier, P. du Jardin, A.H. America, Potato tuber proteomics: comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins, *Proteomics* 6 (2006) 6494-6497.

Figure captions

Fig. 1. Sequence alignment of sugarcane Hsp90 (SsHsp90) and Arabidopsis thaliana Hsp90 (AtHsp90). The amino acid sequences of SsHsp90 (JX992841) and Hsp90.3 (BAB09283) from *A. thaliana*, a plant model organism, are aligned, indicating 92% identity (see Table 1). N-terminal domain, orange; M domain, pink; C-terminal domain, blue. Tryptophans in SsHsp90 are underlined in red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 2. SsHsp90 was purified in a folded state as a dimer in solution. Experiments were performed in a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 150 mM NaCl at 25°C. A) Circular dichroism. Residual molar ellipticity $[\theta]$ was measured from 205 to 250 nm. The spectrum indicated that SsHsp90 was folded and had approximately 34% α -helical content. B) Emission fluorescence. Spectra of SsHsp90 in the absence (closed square) and presence (open circle) of 6 M Gdm-Cl. Excitation was at 295 nm, and emission was from 305 to 420 nm. Native SsHsp90 had a maximum wavelength of 335 ± 1 nm and a spectral center of mass of 344 ± 1 nm. In the presence of 6 M Gdm-Cl, SsHsp90 had a maximum wavelength of 353 ± 1 nm and a spectral center of mass of 357 ± 1 nm. A.U., arbitrary units. C) SEC-MALLS. The graph shows the absorbance at 280 nm profile (closed symbols) and the molecular mass distributions (open symbols) per elution volume unit (mL). The measured molecular mass was 172 ± 2 kDa, which is in good agreement with that calculated from the sequence (protein β His-tag) for the dimer: 164.6 kDa. The major peak had a polydispersity of $1.010 \pm 1.7\%$.

Fig. 3. SsHsp90 structure from cross-linking and modeling. A) Model based on a multiple alignment with crystal structures of known Hsp90s (see Materials and methods). The model presents spatial distances of the cross-link constraints in blue. B) Dimer, built as described in A, showing Trp residues in blue. Three of the seven Trp residues in each monomer appear to be exposed to the solvent. 'Dead-end' lysines exposed to the solvent are indicated in red. C) Crystal structures of the N-domain of Hsp90s from yeast (PDB ID:2CG9, green), human (PDB ID:1BYQ, purple), *P. falciparum* (PDB ID:3K60, yellow) and *L. major* (PDB ID: 3U67, blue) superimposed with the model generated for sugarcane Hsp90 (red). Colors indicate regions comprising residues 95-123 (107-135 in human) from each structure. D) Regions in SsHsp90 with higher deuterium incorporation are shown in red. These regions correspond to the following peptides: 188-239, 259-291, 297-309, 313-343, 347-353, 382-395, 399-446 and 452-464. See Supplementary data S4C for more details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 4. SsHsp90 is expressed in sugarcane. Samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Left. SDS-PAGE (10%) stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular mass standard. For clarity, molecular masses in kDa are shown on the left. Lane 2, purified SsHsp90. Lane 3, plant extracts. Right. Immunoblotting. Lane 1, purified recombinant SsHsp90 (1.4 mg). Lane 2, buffer alone (control). Lane 3, protein extract (54 mg) from sugarcane leaf. For clarity, an arrow identifying the expected position of SsHsp90 is shown on the right. The blot was probed with an anti-CsHsp90 antiserum (1:100) (Materials and methods), and the immune complex was detected with AP-conjugated anti-mouse IgG (BioRad).

Fig. 5. Chaperone activity of SsHsp90. Citrate synthase (CS, 100 nM) was incubated at 47°C in the absence (filled diamond) or presence of 100 (filled circle) or 200 (open circle) nM SsHsp90 (dimer) as a function of time. Bovine serum albumin (BSA, 100 nM; open diamond) was used as a negative control. SsHsp90, but not BSA, protected CS from aggregation.

Fig. 2A

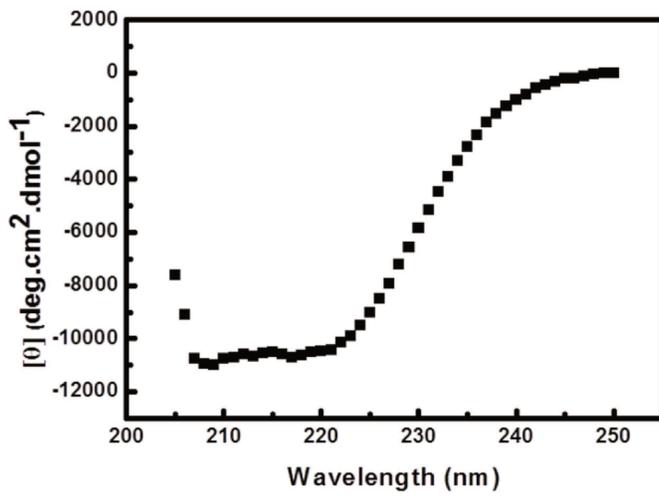


Fig. 2B

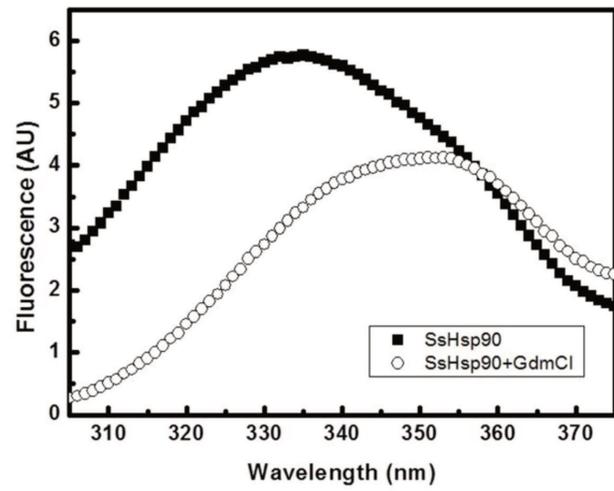


Fig. 2C

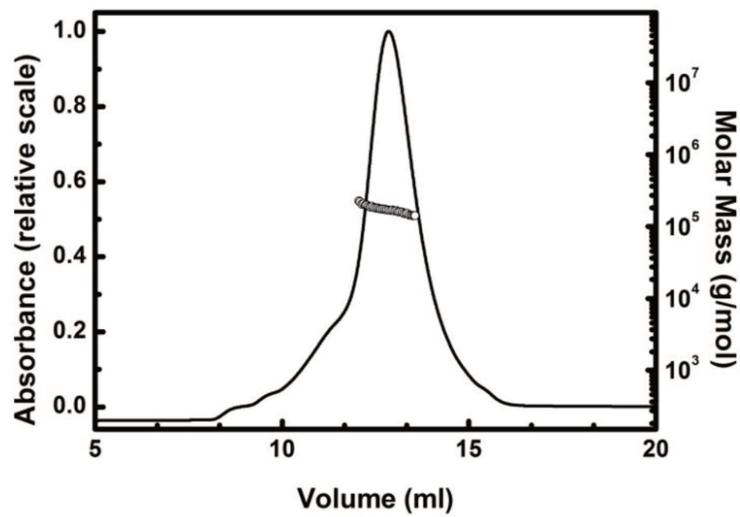


Fig.3

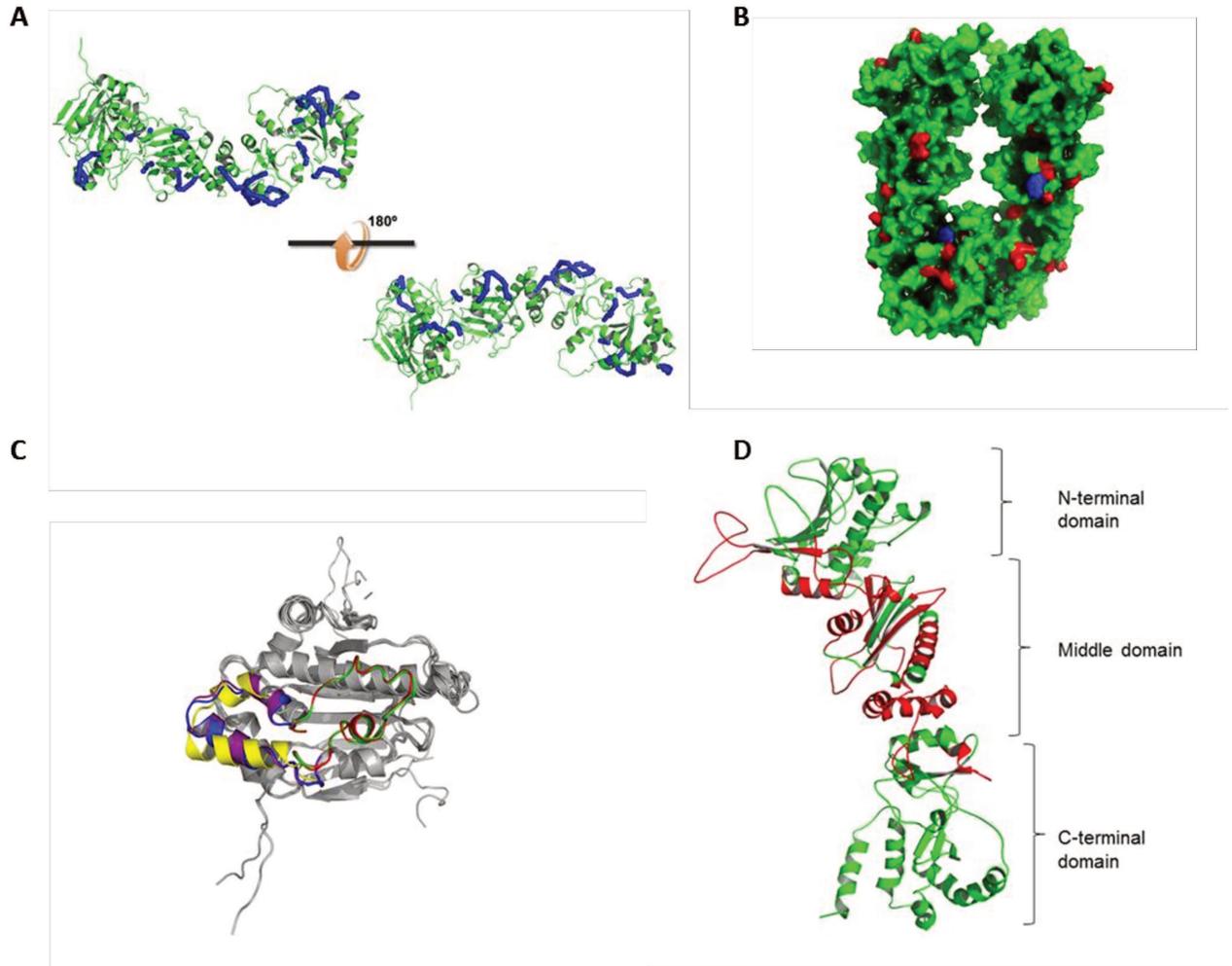


Fig. 4

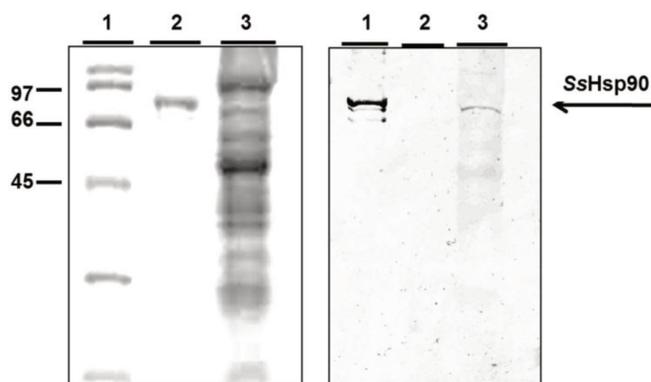
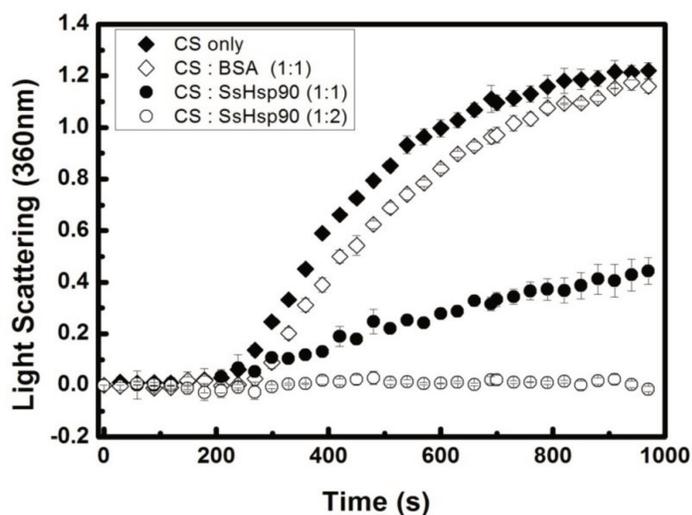


Fig. 5



Supplementary material

Table S1. Purification summary of SsHsp90 per 1 L of culture.

Purification Step	Total protein ^{a,b} (mg)	SsHsp90 ^b (mg)	Purity (%)
Soluble lysate	267	131	49
Affinity chromatography	52	34	66
Size chromatography	26	25	96

Errors are less than 4%. ^aApproximately 3 g of cells (1 L of culture) was lysed by sonication. ^bSsHsp90 concentration was determined by the absorbance at 280 nm, and the total protein concentration was measured by the Bradford protein assay (see Materials and Methods).

Fig. S1. Nucleotide and amino acid sequence of SsHsp90. The GenBank accession number for the cDNA coding for sugarcane Hsp90 is JX992841. SsHsp90 has 698 residues and a predicted molecular mass of 80.1 kDa. Tryptophan residues (seven) are underlined. For purification purposes, a MGSSHHHHHSSGLVPRGSH tag was added to the N-terminus (not shown). N-terminal domain, gray; M domain, inside black squares; C-terminal domain, gray with white letters. The amino acid sequence in black and italic letters, corresponds to the charged and unstructured linker region.

```

ATGGCCTCGGAGACGGAGACGTTTCGCCTTCCAGGCGGAGATCAACCAGCTGCTCTCGCTCATCATCAACACCTTCTACTCCAACAAGGAGATCTTCTCAGGGAGCTCATCTCCAACCTCC 120
M A S E T E T F A F Q A E I N Q L L S L I I N T F Y S N K E I F L R E L I S N S 40
TCCGATGCCTTGGACAAGATCAGGTTTCGAGAGCCTGACTGACAAGAGCAAGTGGATGCCAGCCAGAGCTGTTCATCCACATGTCCCTGACAAGGCCAACACAGCTGACCATCATT 240
S D A L D K I R F E S L T D K S K L D A Q P E L F I H I V P D K A N N T L T I I 80
GACAGTGGCATTGGTATGACCAAGTCGGACCTTGTGAACAACCTTGGTACCATTGCCCGGTCCGGCAGCAAGGAGTTTCATGGAGGCGTGGCTGCCGGTGTGACGTGCCATGATTGGC 360
D S G I G M T K S D L V N N L G T I A R S G T K E F M E A L A A G A D V S M I G 120
CAGTTTGGTGTGGTTCCTACTCGGCCTATCTTGTGCTGAGAGGGTGTGTGACCACCAAGCACAACGATGATGAGCAGTACGTGTGGAGTCTCAGGCTGGTGGCTCCCTCACTGTG 480
Q F G V G F Y S A Y L V A E R V V V T T K H N D D E Q Y V W E S Q A G G S F T V 160
ACACGTGATCCTTGGGAGCAGCTTGGCAGGGTACCAAGGTGACCCCTCAAGTATGATCAGTTGGAGTACCTTGGAGGCGCCGCTGAAGGATCAAGAAGCATTCA 600
T R D T S G E Q L G R G T K V T L Y L K D D Q L E Y L E E R R L K D L I K K H S 200
GAGTTCATCAGCTACCCAATCTCTCTCTGGACTGAGAAGACTACTGAGAAGAAATTTCTGATGATGAAGATGAGGAAGATAAGAAGGATGAGGAGGGCAAGGTTGAGGATGTTGACGAG 720
E F I S Y P I S L W T E K T T E K E I S D D E D E D K K D E E G K V E D V D E 240
GAGAAGGAAGAAAAGGAGAAGAAAAGAAAGAAATCAAGGAGGTTTCTCATGAGTGGCAGTTGGTGCACAAGCAGAAGCAATCTGGATGAGGAAGCCTGAGGAGATCACCAAGGAAGAG 840
E K E E K E K K K K K I K E V S H E W Q L V D K Q K P I W M R K P E E I T K E E 280
TATGCTGCTTCTACBAGAGCTTGACCAATGACTGGGAGGAGCATCTTCCGCTGAAGCACTTCTCTGTTGAGGGTCAAGTTCAGGCTGTCTCTTTGTGCCAABAGAGGGCCCC 960
Y A A F Y K S L T N D W E E H L A V K H F S V E G Q L E F K A V L F V P K R A P 320
TTTGACCTCTTTGACACCAGGAAGAAGCTGAACAACATCAAGCTCTATGTGCCCGCTGTCTTCATCATGGACAACCTGCGAGGAGCTTATCCCTGAGTGGCTGAGCTTTGTCAAGGGCATT 1080
F D L F D T R K K L N N I K L Y V R R V F I M D N C E E L I P E W L S F V K G I 360
GTTGACTCTGAGGATCTCCCCCTCAACATCTCCCGTGAAGCCCTCCAGCAGAACAAGATCCTCAAGTTCATCCGCAAGAACCTTGTCAAGAAGTGCATCGAGCTGTTCTTTGAGATGCT 1200
V D S E D L P L N I S R E T L Q Q N K I L K V I R K N L V K K C I E L F F E I A 400
GAGAACAAGGAGGACTACAACAAGTTCTATGAGGCTTCTCCAGAACCTCAAGCTTGGCATCCACGAGGACTCCACCACAGGACCAAGATTGCTGAGCTCTTGAGGTACCACTCCACC 1320
E N K E D Y N K F Y E A F S K N L K L G I H E D S T N R T K I A E L L R Y H S T 440
AAGAGTGGAGATGAGCTGACCAAGCCTGAAGGACTATGTGACGAGGATGAAGGAGGCGCAGAATGACATCTACTACATCACTGGTGAGAGCAAGAAGGCTGTGGAGAAGCTCCCGTTCCTT 1440
K S G D E L T S L K D Y V T R M K E G Q N D I Y Y I T G E S K K A V E N S P F L 480
GAGAAGCTGAAGAAGAAGGCTACGAAGTTCTGTACATGGTGGATGCCATTGATGAGTATGCTATTGGCCAGCTGAAGGAGTTTGGAGGCAAGAAGCTCGTCTCTGCCACCAAGGAGGGC 1560
E K L K K K G Y E V L Y M V D A I D E Y A I G Q L K E F E G K K L V S A T K E G 520
CTGAAGCTTGATGAGAGCGAGGACGAGAAGAAGAAAAGGAGAGCTCAAGGAGAAGTTTCGAGGGCCTCTGCAAGGTGATCAAGGAGGTGCTGGGCGACAAGGTGGAGAGGTGGTGGTC 1680
L K L D E S E D E K K K K E E L K E K F E G L C K V I K E V L G D K V E K V V V 560
TCTGACCGTGTGGTGGACTCCCCCTGCTGCCTCGTCACGGGTGAGTACGGCTGGACTGCTAACATGGAGAGGATCATGAAGGCCAGGCGCTCAGGGACTCCAGCATGTCTGGGTACATG 1800
S D R V V D S P C C L V T G E Y G W T A N M E R I M K A Q A L R D S S M S G Y M 600
TCTCCAAGAAGACGATGGAGATCAACCTGAGAACGCCATCATGGAGGAGCTGCGCAAGCGTGCAGGAGGCGCAAGAAGCACAAGTCTGTCAAGGACCTTGTGATGCTGTGTCGAG 1920
S S K K T M E I N P E N A I M E E L R R K R A E A D K N D K S V K D L V M L L F E 640
ACGGCGCTGCTCACCTCTGGCTTCAGCTTCGACGACCCCAACACCTTCGGCAGCCCATCCACCGCATGCTCAAGCTGGGCTGAGCATCGATGAGGACGAGGCCCTGAGGCTGACACC 2040
T A L L T S G F S L D D P N T F G S P I H R M L K L G L S I D E D E A P E A D T 680
GACATGCCCTCTGGAGGACGACCTGGCGAGAGCAAGATGGAGGAGTCTGACTAA 2097
D M P P L E D D A G E S K M E E V D * 698
    
```

Fig. S2. SsHsp90 purification followed by SDS-PAGE. Mr, molecular mass marker (masses in kDa on the left); lane 1, soluble fraction from bacterial lysates; lane 2, sample purified by affinity chromatography; lane 3, sample purified by filtration chromatography. The arrow indicates SsHsp90 that was more than 92% pure and purified with a yield of approximately 25 mg/L of culture (see Table S1).

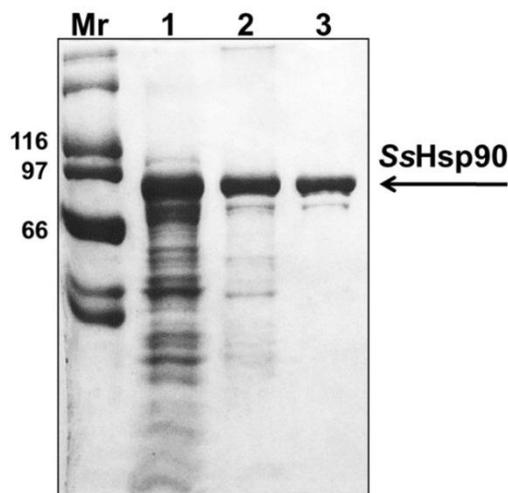


Fig. S3. Urea-induced unfolding. Urea-induced unfolding of SsHsp90 was followed by circular dichroism at 222 nm (closed square) and by fluorescence of tryptophan (open circle). Each curve is the average of three experiments, and errors are less than 3%. The urea concentrations at the midpoint of the transition were 4.0 M for fluorescence and 4.5 M for CD.

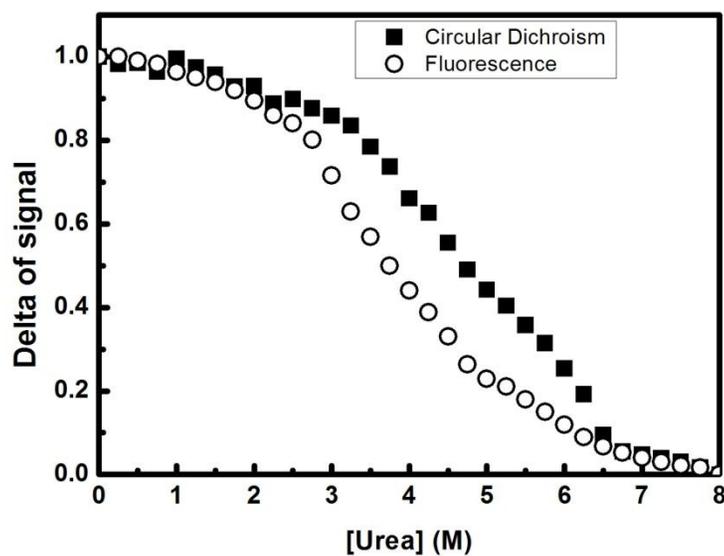


Fig. S4 A). Profile of cross-linked lysines. SsHsp90 was subjected to a chemical reaction between disuccinimidyl suberate and Lys residues. This reaction allowed two Lys residues up to 24 Å away from each other to become cross-linked. The map of cross-linked lysines was generated after trypsin digestion and peptide analysis by LC-MS/MS. **B)** Trp residues in blue and 'dead-end' lysines exposed to the solvent are indicated in red. **C)** H/D exchange map as a function of time.

Fig. S4A

MASETETFAF QAEINQLLSL IINTFYNSKE IFLRELISNS SDALDKIRFE
 SLTDKSKLDA QPELFIHIVP DKANNTLTII DSGIGMTKSD LVNNLGTIAR
 SGTKEFMEAL AAGADVSMIG QFGVGFYSAY LVAERVVTT KHNDDEQYVW
 ESQAGGSFTV TRDTSGEQLG RGTKVTLYLK DDQLEYLEER RLKDLIKKHS
 EFISYPISLW TEKTTEKEIS DDEDEEDKKD EEGKVEDVDE EKEEKEKKEK
 KIKEVSHEWQ LVDKQKPIWM RKPEEITKEE YAAFYKSLTN DWEEHLAVKH
 FSVEGQLEFK AVLFVPKRAP FDLFDTRKKL NNIKLYVRRV FIMDNCEELI
 PEWLSFVKGI VDSIDLPLNI SRETLOQNKI LKVIRKNLVK KCIELFFEIA
 ENKEDYNKFY EAFSKNLKLG IHEDSTNRTK IAELLYRHST KSGDELTSLK
 DYVTRMKEGQ NDIYYITGES KKAVENTPFL EKLKKGGEV LYMVDAIDEY
 AIGQLKEFEG KKLVSATKEG LKLDESEDEK KKKEELKEKF EGLCKVIKEV
 LGDKVEKVVV SDRVVDSPCC LVTGEYGWTA NMERIMKAQA LRDSSMSGYM
 SSKKTMEINP ENAIMEELRK RAEADKNDKS VKDLVMLLFE TALLTSGFSL
 DDPNTFGSPI HRMLKLGLSI DEDEAPEADT DMPPLEDDAG ESKMEEVD

Fig. S4B

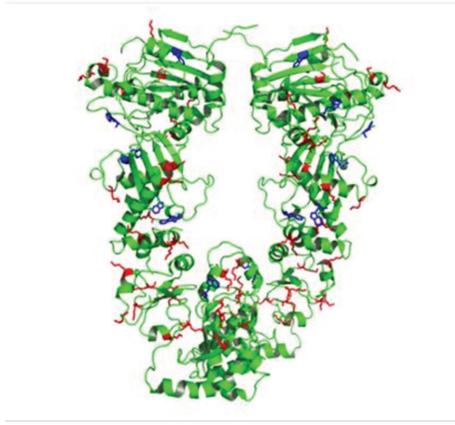


Fig. S4C1

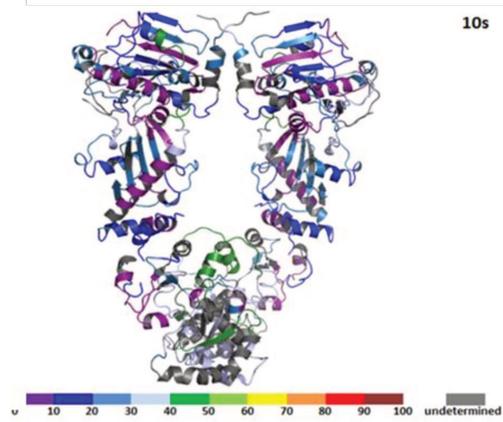


Fig. S4C2

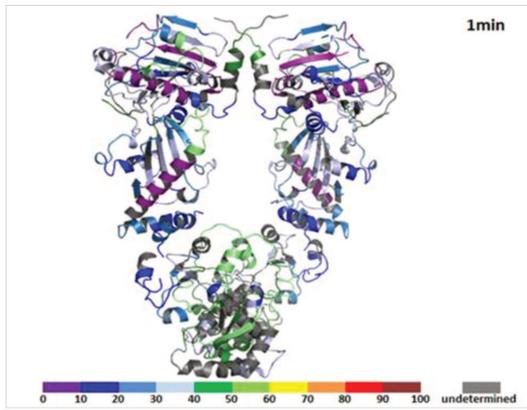


Fig. S4C3

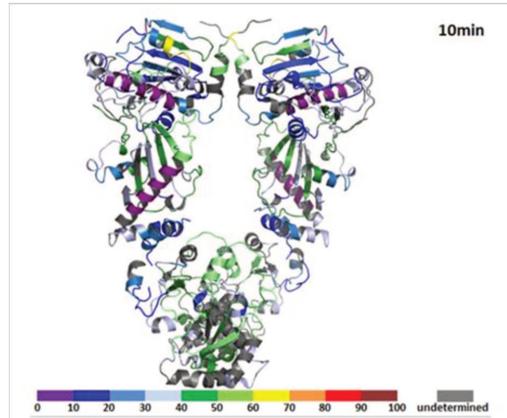


Fig. S4C4

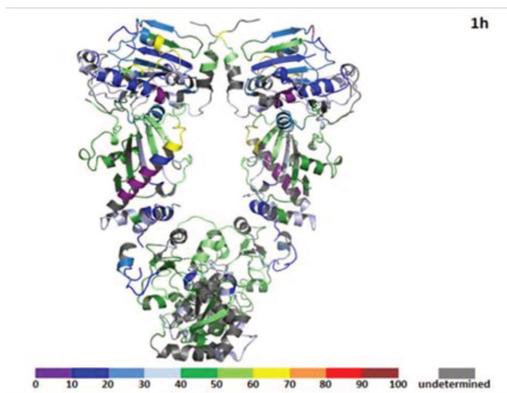
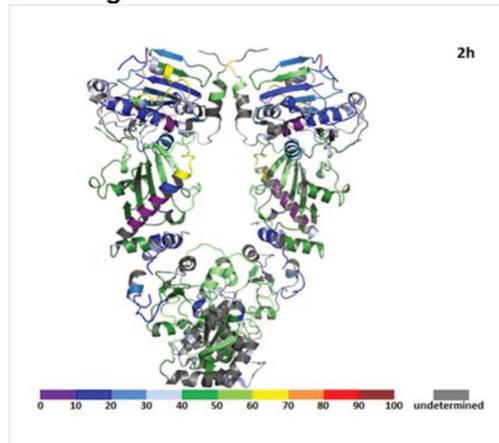


Fig. S4C5



4.3 Discussão: Caracterização conformacional e funcional de Hsp90 de cana-de-açúcar

A proteína Hsp90 de cana-de-açúcar foi denominada SsHsp90 por ter sido igualmente obtida a partir de biblioteca de cDNA de cultivares híbridos *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Vettore et al., 2001) e com base na nomenclatura atual desta família de chaperonas em plantas (Krishna e Gloor). A SsHsp90 apresentou estrutura secundária similar à Hsp90 da dicotiledônea *Citrus sinensis* e das três homólogas que já tiveram sua estrutura cristalográfica resolvida, Hsp90 de *Saccharomyces cerevisiae*, a paróloga de retículo endoplasmático GRP94 de *Canis lupus familiaris*, e a HtpG de *E.coli* (Mendonça e Ramos 2012; Mayer 2010; Ali et al., 2006; Dollins et al., 2007, Shiau et al., 2006). Adicionalmente, a SsHsp90 mostrou-se bastante estável com o aumento da temperatura, não perdendo estrutura secundária, acompanhada por sinal de CD a 222nm, após aquecimento até 90°C (Cagliari, 2009), sugerindo uma função de resposta ao estresse pela SsHsp90 no organismo vegetal e sua alta estabilidade frente ao aumento de temperatura.

O estado oligomérico das proteínas da família Hsp90 é essencial para o desempenho de suas funções (Minami et al., 1994). Experimentos de SEC-MALS mostraram que a SsHsp90 migra como um dímero de massa molecular de 172 kDa, estando de acordo como a massa molecular (MM) teórica predita de 164,6 kDa para o dímero da proteína contendo cauda de histidina, e corroborando dados obtidos para as proteínas homólogas como a de *C. sinensis* e *S. cerevisiae* (Mendonça e Ramos 2012).

Visando contribuir com informações a respeito de características conformacionais da Hsp90, uma vez que até o momento a maioria dos dados estruturais sobre esta família de proteínas tem sido restrito aos domínios isolados, devido à sua grande dimensão e ao grau de flexibilidade conformacional, foram realizadas análises de ligação cruzada acoplado à espectrometria de massas. A ligação cruzada é uma modificação química onde as cadeias laterais de dois aminoácidos na superfície da proteína que estejam espacialmente próximas são ligadas covalentemente por meio de um agente de ligação cruzada. O mapeamento das ligações cruzadas com distâncias

topológicas de até 24 Å, correspondente à distância máxima da cadeia espaçadora do agente de ligação cruzada utilizado, suberato de disuccinimidila (DSS), e a determinação de sítios de acessibilidade ao solvente, permitiram validar, juntamente com mapas de Ramachandram (Ramachandran et al 1963) um modelo tridimensional da SsHsp90 gerado pelo software Modeller (Sali e Blundell 1993). O modelo do dímero foi utilizado para o cálculo de parâmetros hidrodinâmicos utilizando o programa de predição Hydropro10 (Ortega et al., 2011), resultando em valores de coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico muito semelhante aos obtidos experimentalmente neste trabalho para SsHsp90, e para a homóloga de laranja (Mendonça e Ramos, 2012), considerando as características da proteína em solução, tais como sua flexibilidade e mudanças conformacionais como estado fechado e aberto do dímero (Jackson, 2012), e a camada de solvatação da proteína em solução (Cantor e Schimmel, 1980).

Para verificar se a proteína citosólica SsHsp90 estava sendo expressa no organismo de origem, ensaios de imunodeteção foram realizados com a utilização de anticorpo policlonal produzido anteriormente para Hsp90 de laranja cuja identidade com SHsp90 é de 93% (Mendonça e Ramos, 2011). Foi detectada uma banda definida por “immunoblotting”, com massa molecular aparente esperada de 90kDa, indicando a expressão da SsHsp90 em tecido foliar da cana-de-açúcar, sob condições controladas de crescimento (sem indução de estresse). A presença de RNAm de Hsp90 citoplasmática de cana-de-açúcar havia sido reportada, correspondendo a 4 *clusters* codificantes de Hsp90, podendo expressar até 9 proteínas diferentes (Borges et al., 2001; Borges et al., 2007). ESTs relacionadas à família Hsp90 foram encontradas em todos os tecidos estudados no projeto SUCEST, destacando a importância destas proteínas para cana-de-açúcar (Borges et al., 2001; Borges et al., 2007). Ainda em cana-de-açúcar, transcritos de Hsp90 foram encontrados em plântulas submetidas ao choque de baixa temperatura a 0°C (Nogueira et al., 2003). Comparativamente ao resultado obtido no presente estudo, uma expressão constitutiva de Hsp90 também ocorre na gramínea *Sorghum bicolor* (Virdi et al., 2009), e na dicotiledônia *C. sinensis* (Mendonça e Ramos 2012). Em *A. thaliana*, transcritos da isoforma Hsp90-3, que apresenta a maior identidade de aminoácidos em relação a Hsp90 de cana-de-açúcar

(Tabela 1 do item 4.2), foram detectados em todo organismo, com maior abundância em raiz e flores (Yabe et al., 1994), sendo que os níveis de transcritos apresentam-se moderadamente aumentados após tratamento hormonal, na presença de metais pesados, choque osmótico, e choque térmico (Milioni e Hatzopoulos, 1997). A proteína ortóloga HtpG de procarioto também apresenta expressão constitutiva, sendo muito baixa em condições normais de crescimento, e elevada após choque térmico e outras situações de estresse (Mason et al., 1999). Proteínas da família Hsp90 de mamíferos são abundantes em condições normais, reforçando a hipótese que a proteína desempenha uma importante função nestes organismos (Bardwell e Craig, 1988; Lai et al., 1984; Buchner, 1999).

Plantas em geral apresentam isoformas da proteína Hsp90 com alta similaridade ($90\pm 5\%$) (Sangster et al., 2008; Queitsch et al., 2002), entretanto, a diversidade de expressão e localização subcelular indicam uma variedade de mecanismos moleculares para o desempenho de suas funções. Testes de complementação de fenótipo de levedura revelaram diferenças funcionais entre isoformas de Hsp90 de *A. thaliana* frente aos estresses osmótico, oxidativo, e térmico (Song et al., 2010; Xu et al., 2010). A resposta e resistência a patógenos também indicam diferenças funcionais entre as isoformas e espécies vegetais (Kanzaki et al., 2003; Lu et al., 2003; Sangster et al., 2007; revisado em Kadota e Shirasu 2012). Análises diretas da função de Hsp90 em planta foram realizadas em *A. thaliana* superexpressando Hsp90, e foi observado um aumento de sensibilidade ao sal e estresse hídrico nestes transgênicos (Song et al., 2009). Também foi demonstrado que a superexpressão de Hsp90 de arroz foi importante para termotolerância de *E. coli* (Liu et al 2009). Recentemente foi observado um fenótipo de alteração nos níveis de transcritos de proteínas relacionadas a resposta imune e fotossíntese em *A. thaliana* transgênicas de Hsp90. Estes transgênicos também exibiram diferenças nos estágios iniciais do desenvolvimento em relação ao controle, e uma maior susceptibilidade a alta temperatura (Gonçalves, 2012). Todos estes dados indicam o papel fundamental da Hsp90 na manutenção da homeostase do organismo vegetal, uma vez que alterações de sua expressão/inativação afetam várias vias ou fenótipos em plantas, sendo seus níveis críticos para respostas frente ao estresse. No

presente trabalho, com o intuito de investigar a função da SsHsp90 de proteção contra agregação protéica induzida por alta temperatura, a proteína citrato sintase (CS) foi utilizada como modelo de substrato em ensaios *in vitro*. A SsHsp90 apresentou uma eficiência semelhante à encontrada para homólogas citosólicas de laranja, de levedura, bovina, e do parasita *Leishmania braziliensis* (Mendonça et al., 2012; Jakob et al., 1995; Silva et al., 2003), mas superior à bacteriana (Jakob et al., 1995) e a de retículo endoplasmático humana (Krukenberg et al., 2009), cuja identidade com as isoformas citosólicas é em média inferior a 40% (Fig. S5). A SsHsp90 mostrou-se resistente a 47°C, não sendo agregada nesta temperatura, conforme esperado pela sua estabilidade térmica até 90°C (discutido acima). A adição de albumina bovina sérica no lugar da SsHsp90, não ocasionou alteração na cinética de agregação da CS, mostrando que o efeito observado de estabilização na presença de Hsp90 não se tratava de um artefato experimental. Em relação ao domínio da Hsp90 envolvido na atividade de proteção contra agregação da CS, existem divergências entre as espécies estudadas, havendo a possibilidade de existirem 2 sítios de ligação ao substrato na Hsp90: no C-terminal e no N-terminal; e que a ligação ao substrato pela Hsp90 varia entre os diferentes organismos e entre os diferentes substratos e grau de desenovelamento (Young et al., 1997). A Hsp90 alfa humana (Yamada et al., 2003) e a Hsp90 de levedura (Scheibel et al., 1998; Wayne e Bolon, 2010) requerem o domínio C-terminal para proteger a citrato sintase contra a agregação. Contudo, Silva e colaboradores (2013) demonstraram que a Hsp90 sem o domínio C-terminal de *Leishmania braziliensis* apresentou atividade de proteção contra agregação da CS. Já a sequência da região carregada e desestruturada entre o N-terminal e o domínio central, parece influenciar na modulação da atividade chaperona da Hsp90, uma vez que foi observada sua contribuição para a flexibilidade da proteína levando à mudanças conformacionais da Hsp90 (Meyer et al., 2003, Wayne e Bolon, 2010; Tsutsumi et al., 2012). As diferenças na atividade proteção contra agregação da CS comparadas entre as isoformas citoplasmáticas em relação à bacteriana e organelar humana (acima discutidas) podem estar relacionadas com diferentes mudanças conformacionais destas proteínas (formas mais estendidas ou compactas do dímero), conforme observado em HtpG de *E. coli* selvagem e mutantes

(Krukenbergt et al., 2009). Desta maneira, faz-se necessário um mapeamento da sequência presente no domínio de interação entre SsHsp90 e o substrato CS, como um modelo de modo de atuação da Hsp90, e que poderá ser realizado como uma próxima etapa deste trabalho, por meio de análises de ligação cruzada acoplada à espectrometria de massas.

As proteínas Hsp90 de plantas ainda foram pouco caracterizadas, contudo um interesse particular em estudos com membros desta família em organismos vegetais está relacionado com seu importante envolvimento na resistência contra patógenos e estresses térmico e hídrico, visando o desenvolvimento de cultivares mais resistentes. A Hsp90 de cana-de-açúcar é um alvo importante e a caracterização realizada neste trabalho pode contribuir com informações para novas possibilidades de aplicações biotecnológicas.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. *Hsp100 de cana-de-açúcar*

- A proteína SHsp101 teve seu estado oligomérico determinado como um hexâmero em solução, com massa molecular estimada em 620 kDa e com parâmetros hidrodinâmicos semelhantes aos das proteínas homólogas de outros organismos.
- A SHsp101 apresentou 100% de saturação de sinal de hidrogênio (STD-NMR) por meio de transferência de magnetização da proteína para os ligantes ADP, ATP e o análogo de hidrólise lenta ATP γ S, demonstrando a interação da SHsp101 com os referidos nucleotídeos.
- Foi detectada a expressão da SHsp101 em tecido foliar de cana-de-açúcar sob condições controladas de crescimento (sem indução de estresse).
- A SHsp101 apresentou atividade ATPásica, sendo máxima, nas condições de ensaio testadas, a 55°C.
- A SHsp101 apresentou especificidade de hidrólise pelo ATP, não sendo capaz de hidrolisar ADP e AMP.
- A atividade ATPásica da SHsp101 foi inibida completamente pelo etanol a 20%, e parcialmente por baixas concentrações (2 mM) de cloreto de guanidina.
- A atividade ATPásica da SHsp101 analisada em diferentes concentrações de ATP, apresentou uma cinética diferente de Michaelis-Menten, sendo inibida em altas concentrações de ATP.
- A SHsp101 teve a atividade ATPásica inibida por ADP, mas não o suficiente para causar a drástica inibição observada em altas concentrações de ATP, uma vez

que em reação contendo sistema regenerador do ATP, e conseqüentemente ausência do acúmulo de ADP, a forte inibição continuou ocorrendo.

- Na presença de sistema regenerador de ATP, a atividade ATPásica da SHsp101 apresentou um perfil sigmoidal característico de cooperatividade positiva sendo o coeficiente de Hill = 3,8; $V_{máx} = 0,44 \text{ nmol Pi } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$; e um $K'_M = 1,5 \text{ mM}$ de ATP.
- A SHsp101 exibiu uma atividade chaperona de proteção do substrato-modelo luciferase contra agregação, independente de ATP.
- A SHsp101 apresentou atividade de desagregação e reativação do substrato-modelo GFP λ uv, promovendo um aumento de aproximadamente 5 vezes na intensidade da fluorescência da GFP λ uv desnaturada, dependente da presença simultânea de ATP e ATP λ S na proporção equimolar de 1:1, sugerindo uma possível relação da atividade de desagregação com a atividade ATPásica de maneira regulada.
- Análises de complementação *in vivo* revelaram que a superexpressão heteróloga de SHsp101 em levedura mutante nulo de *hsp104*, aumentou a termotolerância da cepa submetida a 53°C, proporcionando um aumento significativo da sobrevivência das leveduras: cerca de 80 vezes, correspondendo a uma taxa de sobrevivência de 34%.

2. Hsp90 de cana-de-açúcar

- A proteína SsHsp90 teve seu estado oligomérico determinado como um dímero em solução, com massa molecular (MM) estimada em 172 kDa, que está de acordo como a MM teórica predita de 164,6 kDa para o dímero da proteína contendo cauda de histidina.

- Análises de ligação cruzada acoplada à espectrometria de massas geraram dados de conformação e de sítios de acessibilidade ao solvente que puderam corroborar a validação de modelos de estruturas tridimensionais da SsHsp90 gerados utilizando-se programas de predição de estrutura de proteínas por modelagem comparativa. O modelo validado da SsHsp90 apresentou parâmetros conformacionais preditos semelhantes aos encontrados experimentalmente, considerando as características da proteína em solução.
- A SsHsp90 apresentou atividade chaperona eficiente de proteção contra agregação da proteína-modelo citrato sintase (CS) desnaturada por choque térmico, mostrando uma proteção de 100% quando em proporções equimolares de 1:2 (CS:SsHsp90), e 70% quando na proporção 1:1.
- A expressão da SsHsp90 em tecido foliar de cana-de-açúcar crescida em condições controladas (sem indução de estresse) foi detectada.

Este trabalho relata características conformacionais e funcionais de duas importantes chaperonas moleculares de cana-de-açúcar, as proteínas de choque térmico Hsp100 e Hsp90. Os resultados obtidos contribuem para um melhor entendimento acerca destas famílias de proteínas de organismos vegetais, um tema ainda pouco investigado até o momento. Além disso, contribui com informações para o desenvolvimento de novas tecnologias com aplicações médicas e biotecnológicas, tais como a possibilidade de prevenir e/ou desfazer o enovelamento incorreto e a agregação de proteínas relacionadas a doenças humanas e de animais domesticados, bem como produtos que possibilitem a geração de plantas mais resistentes ou tolerantes aos diversos tipos de estresse.

A identificação da expressão constitutiva destas proteínas no organismo de origem e a determinação de suas atividades chaperonas em condições de altas temperaturas sugerem uma grande importância destas proteínas para a cana-de-açúcar tanto em condições normais como em situações de estresse. As informações referentes

ao estado oligomérico e conformação destas proteínas é fundamental para a compreensão de suas funções.

A caracterização funcional da SHsp101 poderá avançar por meio de análises futuras, tais como: análise estrutural e mutacional dos domínios desta proteína, especialmente os domínios de ligação ao nucleotídeo NBD1 e NBD2; análise da atividade desagregase na presença de sistema auxiliar de desagregação Hsp70/40/smHsp de cana-de-açúcar, bem como a caracterização da interação deste complexo; análises que relacionem a atividade ATPásica com a atividade chaperona, um processo ainda não elucidado completamente; e análises da capacidade de desagregação e cura de prions de levedura pela SHsp101, um efeito desconhecido para estas proteínas de organismos vegetais.

A função de Hsp90 de cana-de-açúcar poderá ser estudada por meio de análises *in vivo* de complementação de levedura mutante nulo para *hsp82*. Além disso, a busca por proteínas interatoras de cana-de-açúcar, principalmente proteínas-chave envolvidas com resposta aos diversos tipos de estresse, bem como o mapeamento das interações por meio de análises de ligação cruzada acoplada à espectrometria de massas, poderá ser de grande importância para a compreensão dos mecanismos de defesa em plantas.

6 REFERÊNCIAS

- Abbas-Terki, T.; Donze, O.; Briand, P.A.; Picard, D., (2001). Hsp104 interacts with Hsp90 cochaperones in respiring yeast. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7569–7575.
- Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Sahi, C.; Gallie, D.R.; Grover, A. (2001). *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperones*, 6, 219-224.
- Agarwal, M.; Sahi, C.; Katiyar-Agarwal, S.; Agarwal, S.; Young, T.; Gallie, D.R.; Sharma, V.M.; Ganesan, K.; Grover, A. (2003) Molecular characterization of rice hsp101: complementation of yeast hsp104 mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. *Plant Mol Biol* 51:543–553
- Agashe, V.R.; Hartl, F.U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 11, 15-25.
- Åkerfelt, M.; Morimoto, R.I.; Sistonen, L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 545–555.
- Akoev, V., Gogol, E.P., Barnett, M.E., Zolkiewski, M. (2004) Nucleotide-induced switch in oligomerization of the AAA(+) ATPase ClpB. *Prot. Sci.* 13, 567–574.
- Ali, M.M.; Roe, S.M.; Vaughan, C.K.; Meyer, P.; Panaretou, B.; Piper, P. W., Prodromou, C., and Pearl, L. (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440: 1013–1017.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schafer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Ammelburg, M.; Frickey, T.; Lupas, A. N. (2006). Classification of AAA+ proteins. *J. Struct. Biol.* 156, 2–11.
- Andersson, F.I.; Blakytyn, R.; Kirstein, J.; Turgay, K.; Bukau, B.; Mogk, A.; Clarke, A. K. (2006). Cyanobacterial ClpC/HSP100 protein displays intrinsic chaperone activity. *J Biol Chem* 281, 5468–5475.
- Anfinsen, C. B. E.; Haber, M.; Sela, M; White, F.H. (1961). Kinetics of Formation of Native Ribonuclease During Oxidation of Reduced Polypeptide Chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47, 1309-&.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles That Govern Folding of Protein Chains. *Science* 181:223-230.

- Bardwell, J. C. A.; Craig, E. A. (1987). Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5177–5181.
- Bardwell, J. C. A.; Craig, E. A. (1988). Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* 7, 2977-2983.
- Barnett, M.E.; Zolkiewska, A.; Zolkiewski, M. (2000). Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 275, 37565–37571.
- Barnett, M.E.; Zolkiewski, M. (2002). Site-Directed Mutagenesis of Conserved Charged Amino Acid Residues in ClpB from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 41, 11277-11283.
- Barnett, M.E.; Nagy, M.; Kedzierska, S.; Zolkiewski, M. (2005). The amino-terminal domain of ClpB supports binding to strongly aggregated proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 34940–34945.
- Beinker, P.; Schlee, S.; Groemping, Y.; Seidel, R.; Reinstein, J. (2002). The N terminus of ClpB from *Thermus thermophilus* is not essential for the chaperone activity. *J. Biol. Chem.* 277, 47160–47166.
- Ben-Zvi, A.P.; Goloubinoff, P. (2001). Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.*, 135, 84-93.
- Bender, A. T., Silverstein, A. M., Demady, D. R., Kanelakis, K. C., Noguchi, S., Pratt, W. B., and Osawa, Y. (1999). Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 1472-1478.
- Biter, A.B.; Lee, S.; Sung, N.; Tsai, F.T.F. (2012). Structural basis for intersubunit signaling in a protein disaggregating machine. *PNAS PNASvol.* 109,12515-12520.
- Bösl, B.; Grimminger, V.; Walter, S. (2006). The molecular chaperone Hsp104—a molecular machine for protein disaggregation, *J. Struct. Biol.* 156, 139–148.
- Bösl, B.; Grimminger, V.; Wakter, S. (2005). Substrate binding to the molecular chaperone Hsp104 and its regulation by nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 280, 38170-38176.
- Borges, J.C.; Peroto, M.C.; Ramos, C.H.I. (2001). Molecular Chaperone Genes in the Sugarcane Expressed Sequence Database (SUCEST). *Gen. Mol. Biol.*, v. 24, p. 85-92.
- Borges, J. C.; Ramos, C. H. I. (2005). Protein folding assisted by chaperones. *Protein and Peptide Letters* 12:257-261.
- Borges, J.C.; Cagliari, T.C.; Ramos, C.H. (2007). Expression and variability of molecular chaperones in the sugarcane expressome. *J Plant Physiol.* 164: 505-513.

- Bochtler, M.; Hartmann, C.; Song, H.K.; Bourenkov, G.P.; Bartunik, H.D.; Huber, R. (2000). The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU–HslV, *Nature* 403 800–805.
- Borkovich, K. A.; Farrelly, F. W.; Finkelstein, D. B.; Taulien, J.; Lindquist, S. (1989). Hsp82 Is An Essential Protein That Is Required in Higher Concentrations for Growth of Cells at Higher Temperatures. *Molecular and Cellular Biology* 9:3919-3930.
- Brinker, A.; Scheufler, C.; Von der Mülbe, F.; Fleckenstein, B.; Herrmann, C.; Jung, G., Moarefi, I.; Hartl, F. U. (2002). Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD- recognition in Hsp70-Hop-Hsp90 complexes. *J. Biol. Chem.* 277, 19265-19275.
- Buchner, J.; Bose, S.; Mayr, C.; Jacob, U. (1998). Purification and characterization of prokaryotic and eukaryotic Hsp90. *Methods Enzymol.* 290, 409-418.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co.: a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 24: 136–141.
- Burke, J.J.; O’Mahony, P.J.; Oliver, M.J. (2000). Isolation of Arabidopsis mutants lacking components of acquired thermotolerance. *Plant Physiology*, 123, 575-588.
- Cagliari, T.C. (2009). Análise da expressão de chaperonas moleculares em plantas e clonagem, purificação e caracterização inicial das proteínas Hsp100 e Hsp90 de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular). Universidade Estadual de Campinas (Trabalho não publicado).
- Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. (1980). Size and shape of macromolecules. *In* Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. L.W. McCombs, editor. W. H. Freeman and Company, New York. 539–590.
- Cao, D.; Froehlich, J.E.; Zhang, H.; Cheng, C.L. (2003). The chlorate-resistant and photomorphogenesis-defective mutant cr88 encodes a chloroplast-targeted HSP90, *Plant. J.* 33,107–118.
- Carr, T.; Wang, Y.; Huang, Z.; Yeakley, J.M.; Fan, J.B.; Whitham, S.A. (2006). Tobamovirus infection is independent of HSP101 mRNA induction and protein expression. *Virus Res.* 121, 33–41.
- Cashikar, A.G.; Duennwald, M., Lindquist, S.L. (2005). A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J. Biol. Chem.*, 280, 23869-23875.
- Cashikar, A.G.; Schirmer, E.C.; Hattendorf, D.A.; Glover, J.R.; Ramakrishnan, M.S.; Ware, D.M.; Lindquist, S.L. (2002). Defining a pathway of communication from the C-terminal peptide binding domain to the N-terminal ATPase domain in a AAA protein, *Mol. Cell* 9, 751–760.

- Chen, B.; Zhong, D.; Monteiro, A. (2006). Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms, *BMC Genomics* 7 156.
- Chen, C. F.; Chen, Y.; Dai, K.; Chen, P. L.; Riley, D. J.; Lee, W. H. (1996). A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol. Cell. Biol.* 16: 4691–4699.
- Chen, S. Y.; Smith, D. F. (1998). Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry* 273, 35194-35200.
- Chiti, F.; Dobson, C.M.; (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333–366.
- Clément, M.; Leonhardt, N.; Droillard, M. J.; Reiter, I.; Montillet, J. L.; Genty, B.; Laurière, C.; Nussaume, L.; Noël, L. D. (2011). The cytosolic/nuclear Hsc70 and Hsp90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156, 1481-1492.
- Connell, P.; Ballinger, C. A.; Jiang, J.; Wu, Y.; Thompson, L. J.; Hohfeld, J.; Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* 3, 93-96.
- Cowen, L. E.; Lindquist, S. (2005). Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309, 2185-2189.
- Csermely, P.; Schnaider, T.; Soti, C.; Prohaszka, Z.; Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: Structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* 79:129-168.
- Cunningham, C. N.; Krukenberg, K. A.; Agard, D. A. (2008). Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90. *Journal of Biological Chemistry* 283, 21170-21178.
- Da Silva, V. C.H.; Ramos, C. H.I. (2012). The network interaction of the human cytosolic 90 kDa heat shock protein Hsp90: A target for cancer therapeutics. *Journal of Proteomics.* 75, 2790-2802.
- Darby, N.J.; Freedman, R.B.; Creighton, T.E. (1994). Dissecting the mechanism of protein disulfide isomerase: catalysis of disulfide bond formation in a model peptide. *Biochemistry*, 33, 7937-7947.
- Del Castillo, U.; Alfonso, C.; Acebron, S.P.; Martos, A.; Moro, F.; Rivas, G.; Muga, A. (2011). A quantitative analysis of the effect of nucleotides and the M domain on the association equilibrium of ClpB. *Biochemistry* 50, 1991–2003.

- Del Castillo, U.; Fernandez-Higuero, J.A.; Perez-Acebron, S.; Moro, F.; Muga, A. (2010). Nucleotide utilization requirements that render ClpB active as a chaperone. *FEBS Lett.* 584, 929–934.
- Desantis, M.E.; Shorter, J. (2012). The elusive middle domain of Hsp104 and ClpB: Location and function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 29–39.
- Dhaubhadel, S.; Chaudhary S.; Dobinson, K. F.; Krishna, P. (1999). Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Molecular Biology* 40: 333-342.
- Dill, K.A.; Chan, H.S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.*, 4, 10-19
- DiSalvo, S.; Derdowski, A.; Pezza, J.A.; Serio, T.R. (2011). Dominant prion mutants induce curing through pathways that promote chaperone-mediated disaggregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 486–492.
- Dixit, A.; Verkhivker, G. M. (2012). Probing molecular mechanisms of the Hsp90 chaperone: biophysical modeling identifies key regulators of functional dynamics. *PLoS ONE* 7, e37605.
- Divi, U.K.; Rahman, T.; Krishna, P. (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol.* 19;10:151.
- Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884-890.
- Dobson, C.M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 329-332.
- Doyle, S.M.; Wickner, S. (2009). Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem. Sci.* 34, 40–48.
- Doyle, S.M., Hoskins, J.R., Wickner, S., (2007a). Collaboration between the ClpB AAA+ remodeling protein and the DnaK chaperone system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 11138–11144.
- Doyle, S.M.; Shorter, J.; Zolkiewski, M.; Hoskins, J.R.; Lindquist, S.; Wickner, S. (2007b). Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein remodeling activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 114–122.
- Dollins, D.E.; Warren, J.J.; Immormino, R.M.; Gewirth, D.T. (2007). Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol Cell* 28, 41–56.

- Dyson, H. J.; Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6,197-208.
- Echeverría, P. C.; Bernthaler, A.; Dupuis, P.; Mayer, B.; Picard, D. (2011). An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the Hsp90 molecular chaperone machine. *PLoS ONE* 6, e26044.
- Edelhock, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in protein *Biochemistry* 6, 1948–1954.
- Elble, R. (1992). A simple efficient procedure for transformation of yeast. *Biotechniques*, v.13, p. 18-20.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300, 1005-1016.
- Farrelly, F. W.; Finkelstein, D. B. (1984). Complete sequence of the heat shock-inducible hsp90 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 259, 5745–5751.
- Felsheim R.F.; Das, A. (1992). Structure and expression of a heat-shock protein 83 gene of *Pharbitis nil*. *Plant Physiol* 100, 1764–1771.
- Fernandez-Higuero, J.A.; Acebron, S.P.; Taneva, S.G.; del Castillo, U.; Moro, F.; et al. (2011). Allosteric communication between the nucleotide binding domains of caseinolytic peptidase B. *J. Biol. Chem.* 286, 25547–25555.
- Ferreira, P.C.; Ness, F.; Edwards, S.R.; Cox, B.S.; Tuite, M.F. (2001). The elimination of the yeast [PSI⁺] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Mol. Microbiol.*, 40, 1357-1369.
- Fersht, A.R.; Daggett, V. (2002). Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell*, 108, 573-582.
- Fink, A. L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 79:425-449.
- Frand, A.R.; Cuozzo, J.W.; Kaiser, C.A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.*, 10, 203-210.
- Franzmann, T.M.; Czekalla, A.; Walter, S.G. (2011). Regulatory circuits of the AAA⁺ disaggregase Hsp104. *J. Biol. Chem.* 286, 17992–18001.
- Frydman, J.; Hartl, F.U. (1996). Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science*, 272, 1497-1502.

- Galzitskaya, O.V.; Ivankov, D.N.; Finkelstein, A.V. (2001). Folding nuclei in proteins. *FEBS Lett.*, 489, 113-118.
- Gava, L.; Ramos, C.H.I. (2009). Human 90 kDa heat shock protein Hsp90 as a target for cancer therapeutics. *Curr. Chem. Biol.* 3, 330-341.
- Ghiso, J.; Wisniewski, T.; Frangione, B. (1994). Unifying features of systemic and cerebral amyloidoses. *Mol. Neurobiol.*, 8, 49-64.
- Glover, J.R.; Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73–82.
- Glover, J.R.; Tkach, J.M. (2001). Crowbars and ratchets: hsp100 chaperones as tools in reversing protein aggregation. *Biochem. Cell Biol.*, 79, 557-568.
- Gonçalves, D.C. (2012). Estudos iniciais de interações da Hsp90 através da caracterização funcional de um transgênico e biofísica de uma co-chaperona. Dissertação (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular). Universidade Estadual de Campinas (Trabalho não publicado).
- Goodsell, D.S. (1991). Inside a living cell. *Trends Biochem.Sci.*, 16, 203-206.
- Goloubinoff, P.; Mogk, A.; Zvi, A.P.; Tomoyasu, T.; Bukau, B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732–13737.
- Guo, F.; Maurizi, M.R.; Esser, L.; Xia, D. (2002). Crystal structure of ClpA, a Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J. Biol. Chem.*, 277, 4673-46752.
- Hainzl, O.; Lapina, M. C.; Buchner, J.; Richter, K. (2009). The Charged Linker Region Is an Important Regulator of Hsp90 Function. *Journal of Biological Chemistry* 284, 22559-22567.
- Halfmann, R.; Lindquist, S. (2010). Epigenetics in the extreme: prions and the inheritance of environmentally acquired traits, *Science* 330, 629–632.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-74
- Hanson, P.I.; Whiteheart, S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 519–529.
- Harder, K.W. ; Owen, P.; Wong, L. K.; Aebersold, R.; Clark- Lewis, I.; Jirik, F.R. (1994). Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. *Biochem. J.*, 298, 395-401.

- Hartl, F.U.; Bracher, A; Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324-32.
- Haslbeck, M.; Miess, A.; Stromer, T.; Walter, S.; Buchner, J. (2005). Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J. Biol. Chem.*, 280, 23861-23868.
- Haslberger, T.; Weibezahn, J.; Zahn, R.; Lee, S.; Tsai, F.T.F.; et al. (2007). M domains couple the ClpB threading motor with the DnaK chaperone activity. *Mol. Cell* 25, 247–260.
- Haslberger, T.; Zdanowicz, A.; Brand, I.; Kirstein, J.; Turgay, K.; et al. (2008). Protein disaggregation by the AAA+ chaperone ClpB involves partial threading of looped polypeptide segments. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 641–650.
- Hattendorf, D.A.; Lindquist, S.L. (2002a). Analysis of the AAA sensor-2 motif in the C-terminal ATPase domain of Hsp104 with a site-specific fluorescent probe of nucleotide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2732–2737.
- Hattendorf, D.A.; Lindquist, S.L. (2002b). Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *EMBO J.* 21, 12–21.
- Hendrick, J. P.; Hartl, F. U. (1993). Molecular Chaperone Functions of Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Biochemistry* 62, 349-384.
- Heinrichs, A. (2010). Protein folding: Dual chaperone function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 312.
- Hessling, M.; Richter, K.; Buchner, J. (2009). Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 16: 287–293.
- Higurashi, T.; Hines, J.K.; Sahi, C.; Aron, R.; Craig, E.A. (2008). Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16596–16601.
- Hill, A.V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* 40, iv–vii.
- Hong, S.W.; Vierling, E. (2000). Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4392-4397.
- Hong, S.W.; Vierling, E. (2001). Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.* 27, 25–35.

- Hodson, S.; Marshall, J.J.; Burston, S.G. (2012). Mapping the road to recovery: The ClpB/Hsp104 molecular chaperone. *Journal of Structural Biology*, 179, 161–171.
- Hoskins, J.R.; Doyle, S.M.; Wickner, S. (2009). Coupling ATP utilization to protein remodeling by ClpB, a hexameric AAA+ protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22233–22238.
- Hung, G.C.; Masison, D.C. (2006). N-terminal domain of yeast Hsp104 chaperone is dispensable for thermotolerance and prion propagation but necessary for curing prions by Hsp104 overexpression. *Genetics* 173, 611–620.
- Hwang, B.J.; Park, W.J.; Chung, C.H.; Goldberg, A.L. (1987). *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. *Proc Natl Acad Sci* 84, 5550-5554.
- Hubert, D.A.; Tornero, P.; Belkhadir, Y.; Krishna, P.; Takahashi, A.; et al. (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *Embo J* 22: 5679–5689.
- Yamada, S.; Ono, T.; Mizuno, A.; Nemoto, T.K. (2003). A hydrophobic segment within the C-terminal domain is essential for both client-binding and dimer formation of the HSP90-family molecular chaperone. *Eur. J. Biochem.* 270, 146–154.
- Imamura, T.; Haruta, T.; Takata, Y.; Usui, I.; Iwata, M.; Ishihara, H.; Ishiki, M.; Ishibashi, O.; Ueno, E.; Sasaoka, T. et al. (1998). Involvement of heat shock protein 90 in the degradation of mutant insulin receptors by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 273, 11183-11188.
- Inman-Bamber, G.; Jackson, P.; Bourgault, M. Genetic Adjustment to Changing Climates: Sugarcane, in: S.S. Yadav, R.J. Redden, J. L. Hartfield, H. Lotze-Campen, A.E. Hall (Eds.), *Crop Adaptation to Climate Change*, John Wiley & Sons, Ltda, 2011, pp 439-447.
- Ishiguro, S.; Watanabe, Y.; Ito, N.; Nonaka, H.; Takeda, N. et al. (2002). SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *Embo J* 21: 898–908.
- Jackson S.E. (2012). Hsp90: Structure and Function. *Top Curr Chem.* DOI: 10.1007/128_2012_356
- Jahn, T.R.; Radford, S.E. (2005). The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.*, 272, 5962-5970.
- Jakob, U.; Lilie, H.; Meyer, I.; Buchner, J. (1995). Transient interaction of hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase - implications for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 7288-7294.

- Johnson, J. L. (2012). Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 607-613.
- Johnson, R. T. (2005). Prion diseases. *Lancet Neurology* 4, 635-642.
- Jung, G.; Masison, D.C. (2001). Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity in vivo: a possible explanation for its effect in curing yeast prions. *Curr. Microbiol.*, 43, 7-10.
- Kadota, Y.; Shirasu, K. (2012). The HSP90 complex of plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 689-697.
- Kanzaki, H.; Saitoh, H.; Ito, A.; Fujisawa, S.; Kamoun, S.; Katou, S.; Yoshioka, H.; Terauchi, R. (2003). Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* 4, 383-391.
- Katiyar-Agarwal, S.; Agarwal, M., Grover, A. (2003). Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101. *Plant Mol Biol* 51, 677-686
- Kawai, R.; Fujita, K.; Iwahashi, H.; Komatsu, Y. (1999). Direct evidence for the intracellular localization of Hsp104 in *Saccharomyces cerevisiae* by immunoelectron microscopy. *Cell Stress Chaperones* 4, 46-53.
- Kawai-Noma, S.; Pack, C.G.; Kojidani, T.; Asakawa, H.; Hiraoka, Y.; Kinjo, M.; Haraguchi, T.; Taguchi, H.; Hirata, A. (2010). In vivo evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. *J. Cell Biol.* 190, 223-231.
- Keeler, S.J.; Boettger, C.M.; Haynes, J.G.; Kuches, K.A.; Johnson, M.M.; Thureen, D.L.; Keeler, C.L.Jr; Kitto, S.L. (2000). Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean. *Plant Physiol.* 123, 1121-1132.
- Kelly, J.W. (1996). Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 6, 11-17.
- Kim, K.II.; Woo, K.M.; Seong, I.S.; Lee, Z-W., Baek, S.H.; Chung, C.H. (1998). Mutational analysis of the two ATP-binding sites in ClpB, a heat shock protein with protein-activated ATPase activity in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 333, 671-676.
- Kim, K.I.; Cheong, G.W.; Park, S.C.; Ha, J.S.; Woo, K.M.; et al. (2000). Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 303, 655-666.
- Kodama, T.; Fukui, K.; Kometani, K. (1986). The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate. *J. Biochem.* 99, 1465-1472.

- Koshland, J.R.; Nemethy, G.; Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in protein containing subunits. *Biochemistry*. 5, 365-385.
- Krishna, P.; Sacco, M.; Cherutti, J.F.; Hill, S. (1995). Cold-induced accumulation of Hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 107, 915–923.
- Krukenberg, K.A.; Forster, F.; Rice, L.M.; Sali, A.; Agard, D.A. (2008) Multiple conformations of *E. coli* Hsp90 in solution: insights into the conformational dynamics of Hsp90. *Structure* 16: 755–765.
- Krukenberg, K. A.; Street, T. O.; Lavery, L. A.; Agard, D. A. (2011). Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Quarterly Reviews of Biophysics* 44, 229-255.
- Krishna, P.; Gloor, G. (2001). The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 6, 238-246.
- Krukenberg, K. A.; Southworth, D. R.; Street, T. O.; Agard, D. A. (2009). pH-dependent conformational changes in bacterial Hsp90 reveal a Grp94-like conformation at pH 6 that is highly active in suppression of citrate synthase aggregation. *J. Mol. Biol.* 390, 278-291.
- Krzewska, J.; Langer, T.; Liberek, K. (2001). Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding. *FEBS Lett.* 489, 92–96.
- Kulomaa, M. S.; Weigel, N. L.; Kleinsek, D. A.; Beattie, W. G.; Conneely, O. M.; March, C.; Zarucki-Schulz, T.; Schrader, W. T.; O'Malley, B. W. (1986). Amino acid sequence of a chicken heat shock protein derived from the complementary DNA nucleotide sequence. *Biochemistry* 25, 6244–6251.
- Khurana, R.; Gillespie, J.R.; Talapatra, A.; Minert, L.J.; Ionescu-Zanetti, C.; Millett, I; Fink A.L. (2001). Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* 40, 3525-35.
- Kundrat, L.; Regan, L. (2010). Balance between folding and degradation for Hsp90-dependent client proteins: a key role for CHIP. *Biochem.*49, 7428-7438.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. *Nature*, 227, 680-685.
- Lai, B.-T.; Chin, N. W.; Stanek, A. E.; Keh, W.; Lanks, K. W. (1984). Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2802-2810.
- Lanzetta, P. A.; Alvarez, L. V.; Reinach, P. S.; Candia, O. A. (1979). An Improved Assay for Nanomole Amounts of Inorganic Phosphate. *Anal.Biochem.*100, 95–97.

- Larkindale, J.; Mishkind, M.; Vierling, E. (2005). Plant responses to high temperature. *In* Plant abiotic stress. Matthew, A.J.; Hasegawa, P.M., eds. Blackwell Publishing, 100-144.
- Laskey, R.A.; Honda, B.M.; Mills, A.D.; Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275, 416-420.
- Laskowska, E.; Kuczynska-Wisnik, D.; Skorko-Glonek, J.; Taylor, A. (1996). Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. *Molecular Microbiology*, 22, 555-571.
- Lee, S.; Sowa, M.E.; Choi, J.-M.; Tsai, F.T.F. (2004). The ClpB/Hsp104 molecular chaperone—a protein disaggregating machine. *Struct. Biol.* 146, 99–105.
- Lee, S.; Sowa, M.E.; Watanabe, Y.H.; Sigler, P.B.; Chiu, W.; et al. (2003). The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* 115, 229–240.
- Lee, S.; Sielaff, B.; Lee, J.; Tsai, F.T. (2010). CryoEM structure of Hsp104 and its mechanistic implication for protein disaggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 8135–8140.
- Lee, Y.-R., J.; Nagao, R.T.; Key, J. (1994). A Soybean 101-kDa Heat Shock Protein Complements a Yeast *HSP104* Deletion Mutant in Acquiring Thermotolerance. *The Plant Cell*, 6, 1889-1897
- Lee, S.; Choi, J.-M.; Tsai, F.T.F. (2007). Visualizing the ATPase cycle in a protein disaggregating machine: structural basis for substrate binding by ClpB. *Mol. Cell* 25, 261–271.
- Lee, U.; Rioflorida, I.; Hong, S.-W.; Larkindale, J.; Waters, E.R.; Vierling E. (2006). The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J.*, 49, 115-127.
- Lee, U.; Wie, C. Escobar, M.; Williams, B.; Hong, S.-W.; Vierling, E. (2005). Genetic Analysis Reveals Domain Interactions of Arabidopsis Hsp100/ClpB and Cooperation with the Small Heat Shock Protein Chaperone System. *The Plant Cell.*, 17, 559-571.
- Leonhardt SA; Fearson, K.; Danese, P.N.; Mason, T.L. (1993). HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol Cell Biol* 13, 6304-13
- Levinthal, C. In: DeBrunner, J.T.P.; Munck, E. (Eds.). *How to fold gracefully.* (1969), Monticello, IL, USA. Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of

- a meeting held at Allerton House, University of Illinois Press. p. 22-24. Disponível em: <http://www-miller.ch.cam.ac.uk/levinthal/levinthal.html>. Acesso em: 17 Dez 2012.
- Lewandowska, A.; Matuszewska, M.; Liberek, K. (2007). Conformational Properties of Aggregated Polypeptides Determine ClpB-dependence in the Disaggregation Process. *JMB*, 371, 800-811.
- Li, J.; Sha, B. (2003). Crystal structure of the *E. coli* Hsp100 ClpB N-terminal domain, *Structure (Camb)* 11, 323–328.
- Li, J.; Richter, K.; Buchner, J. (2011). Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 61-66.
- Lindquist, S.; Craig, E.A. (1988). The Heat-Shock Proteins. *A. Rev. of Genet.* 22, 631-677.
- Liu, D.; Lu, Z.; Mao, Z.; Liu, S. (2009). Enhanced thermotolerance of *E. coli* by expressed OsHsp90 from rice (*Oryza sativa* L.). *Curr. Microbiol.* 58, 129-133.
- Lo Bianco, C.; Shorter, J.; Ragulier, E.; Lashuel, H.; Iwatsubo, T. Lindquist, S.; Aebischer, P. (2008). Hsp104 antagonizes alpha-synuclein aggregation and reduces dopaminergic degeneration in a rat model of Parkinson disease, *J. Clin. Investig.* 118, 3087–3097.
- Lu, R.; Malcuit, I.; Moffett, P.; Ruiz, M. T.; Peart, J.; Wu, A. J.; Rathjen, J. P.; Bendahmane, A.; Day, L.; Baulcombe, D. C. (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 22, 5690-5699.
- Lund, P. A.; R. J. Ellis. (2008). The chaperone function: meanings and myths. In *The Biology of Extracellular Molecular Chaperones*. Chadwick, D.J.; Goode, J. editors. London. 23-44.
- Lum, R.; Tkach, J.M.; Vierling, E.; Glover, J.R. (2004). Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. *J. Biol. Chem.* 279, 29139–29146.
- Mackay, R.G.; Helsen, C.W.; Tkach, J.M.; Glover, J.R. (2008). The C-terminal extension of *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 plays a role in oligomer assembly. *Biochemistry* 47, 1918–1927.
- Mager, W.H.; Kruijff, A.J.J. (1995). Stress-Induced Transcriptional Activation. *Microbiol. Rev.*, 59, 506-531.
- Marrs, K.A.; Casey, E.S.; Capitant, S.A.; Bouchard, R.A.; Dietrich, P.S.; Mettler, I.J.; Sinibaldi, R.M. (1993). Characterization of two maize HSP90 heat shock protein

- genes: expression during heat shock, embryogenesis and pollen development. *Dev Genet* 14, 27–41.
- Mason, C.A.; Dunner, J.; Indra, P.; Colangelo, T. (1999). Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl Environ Microbiol* 65, 3433–3440.
- Mayer, M.P. (2010). Gymnastics of molecular chaperones, *Mol. Cell* 39, 321-331.
- McClellan, A. J.; Scott, M. D.; Frydman, J. (2005). Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell* 121, 739-748.
- Martin, A.; Baker, T.A.; Sauer, R.T. (2005). Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* 437, 1115–1120.
- Maurizi, M.R.; Xia, D. (2004). Protein Binding and Disruption by Clp/Hsp100 Chaperones. *Structure*, 12, 175-183.
- Mayer, M. P.; Bukau, B. (1999). Molecular chaperones: The busy life of Hsp90. *Current Biology* 9, R322-R325.
- McClellan, A. J.; Xia, Y.; Deutschbauer, A. M.; Davis, R. W.; Gerstein, M.; Frydman, J. (2007). Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131, 121-135.
- Mendonça, Y.A.; Ramos, C.H. I. (2012). Cloning, purification and characterization of a 90kDa heat shock protein from *Citrus sinensis* (sweet orange). *Plant Physiol Biochem*, 50, 87-94.
- Merlini, G.; Bellotti, V. (2003). Molecular mechanisms of amyloidosis. *New England Journal of Medicine* 349, 583-596.
- Meyer, P.; Prodromou, C.; Hu, B.; Vaughan, C.; Roe, S. M.; Panaretou, B.; Piper, P. W.; Pearl, L. H. (2003). Structural and functional analysis of the middle segment of Hsp90: Implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol. Cell* 11, 647-658.
- Mickler, M.; Hessling, M.; Ratzke, C.; Buchner, J.; Hugel, T. (2009) The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol* 16, 281–286.
- Milioni, D.; Hatzopoulos, P. (1997). Genomic organization of *Hsp90* gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 35, 955–961.
- Minami, Y.; Kimura, Y.; Kawasaki, H.; Suzuki, K.; Yahara, I. (1994). The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1459-1464.

- Miot, M.; Reidy, M.; Doyle, S.M.; Hoskins, J.R.; Johnston, D.M.; et al. (2011). Species-specific collaboration of heat shock proteins (Hsp) 70 and 100 in thermotolerance and protein disaggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 6915–6920.
- Mogk, A.; Haslberger, T.; Tessarz, P.; Bukau, B. (2008). Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control. *Biochem. Soc. Transact.*, 36, 120-125.
- Mogk, A.; Schlieker, C.; Strub, C.; Rist, W.; Weibezahn, J.; et al. (2003a). Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *J. Biol. Chem.* 278, 17615–17624.
- Mogk, A.; Schlieker, C.; Friedrich, K.L.; Schönfeld, H.-J.; Vierling, E.; Bukau, B. (2003b). Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.* 278, 31033–31042.
- Mogk, A.; Tomoyasu, T.; Goloubinoff, P.; Rudiger, S.; Roder, D.; et al. (1999). Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J* 18, 6934–6949.
- Moosavi, B.; Wongwigkarn, J.; Tuite, M.F. (2010) Hsp70/Hsp90 co-chaperones are required for efficient Hsp104-mediated elimination of the yeast [PSI^Δpp] prion but not for prion propagation. *Yeast* 27, 167–179.
- Motohashi, K.; Watanabe, Y.; Yohda, M.; Yoshida, M. (1999). Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7184–7189.
- Mosser, D.D.; Morimoto, R. (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 23, 2907-2918.
- Nair, R.; Rost, B. (2005). Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. *Journal of Molecular Biology.*, 348, 85-100.
- Nakai, K.; Kanehisa, M. (1991). Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria. *Proteins*, 11, 95-110.
- Nemoto, T.K.; Ono, T.; Tanaka, K. (2001). Substrate-binding characteristics of proteins in the 90 kDa heat shock protein family. *Biochem. J.* 354, 663-670.
- Nieto-Sotelo, J.; Martinez, L.M.; Ponce, G.; Cassab, G.I.; Alagon, A.; Meeley, R.B.; Ribaut, J.M.; Yang, R. (2002). Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant. Cell.*, 14, 1621–1633.

- Nogueira, F.T.S.; De Rosa Jr., V. E.; Menossi, M; Ulian, E.C.; Arruda, P. (2003). RNA Expression Profiles and Data Mining of Sugarcane Response to Low Temperature. *Plant Physiology*, 132, 1811–1824
- Norby, J.G., (1988). Coupled Assay of Na⁺,K⁺-ATPase Activity. *Methods in Enzymology*, 156, 116-119.
- Nowicki, L.; Leżnicki, P.; Morawiec, E. Litwińczuk, N.; Liberek, K. (2012). Role of a conserved aspartic acid in nucleotide binding domain 1 (NBD1) of Hsp100 chaperones in their activities. *Cell Stress and Chaperones* 17, 361–373.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry* 5th ed. New York, NY, USA: W.H. Freeman & Co., 2008, 1294 p., ISBN-139: 78-0-7167-7108.
- Nelson, R.; Sawaya, M.R.; Balbirnie, M.; Madsen, A.O.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773-778.
- Oldenburg, K.R.; Vo, K.T.; Michaelis, S.; Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Research*, 25, 451-452.
- Onuoha, S. C.; Couistock, E. T.; Grossmann, J. G.; Jackson, S. E. (2008). Structural studies on the co-chaperone hop and its complexes with Hsp90. *Journal of Molecular Biology* 379, 732-744.
- Ortega, A.; Amoros, D.; García de la Torre, J. (2011). Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic and residue-level models. *Biophysical Journal* 101, 892-898.
- Paeckok, J.M.; Soman, P.; Jayachandram, R.; Rani, A.U.; Howarth, C.J.; Thomas, A. (1993). Effects of high soil surface temperature on seedling survival in pearl millet. *Experimental Agriculture* 29, 215-225.
- Pareek, A.; Singla, S.L.; Grover, A. (1995). Immunological evidence for accumulation of two high-molecular-weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high temperature stress in diverse plant genera. *Plant Mol Biol* 29, 293–301.
- Parsell, D.A.; Kowal, A.S.; Lindquist, S. (1994a). *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J. Biol. Chem.*, 269, 4480-4487.
- Parsell, D.A.; Kowal, A.S.; Singer, M.A.; Lindquist, S. (1994b). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* 372, 475–478.

- Parsell, D.A.; Sanchez, Y.; Stitzel, J.D.; Lindquist, S. (1991). Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites, *Nature* 353, 270–273.
- Pearl, L. H.; Prodromou, C. (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr.Opin.Struct. Biol.* 10, 46-51.
- Pearl, L. H.; Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual Review of Biochemistry* 75, 271-294.
- Phillips J.J.; Yao Z.P.; Zhang, W.; McLaughlin, S.; Laue, E.D., et al. (2007) Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90 in complexes with a co-chaperone and anticancer drugs. *J Mol Biol* 372, 1189–1203.
- Pressman, E.; Shaked, R.; Firon, N. (2007) Tomato response to heat stress: focus on pollen grains. *Plant Stress* 1, 216–227
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13363-13383.
- Queitsch, C.; Sangster, T.A.; Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417, 618–624.
- Queitsch, C.; Hong, S-W.; Vierling, E.; Lindquist, S. (2000). Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 12, 479–492.
- Ramachandran, G.N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology* 7: 95–9.
- Ramos, C. H. I. (2004). A spectroscopic-based laboratory course for protein conformational studies. *Biochem. Mol. Biol. Edu.*, 32, 31-34.
- Ramos, C. H. I.; S. T. Ferreira. (2005). Protein folding, misfolding and aggregation: Evolving concepts and conformational diseases. *Protein and Peptide Letters* 12, 213-222.
- Reddy, R.K.; Chaudhary, S.; Patil, P.; Krishna, P. (1998). The 90 kDa heat shock protein (Hsp90) is expressed throughout *Brassica napus* seed development and germination. *Plant Sci* 131, 131–137.
- Robbins, J.; Dilworth, S.M.; Laskey, R.A.; Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequences. *Cell* 64, 615–623.
- Rosano, G.L.; Bruch, E.M.; Ceccarelli, E.A. (2011). Insights into the CLP/HSP100 Chaperone System from Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *JBC*, 286, 29671-29680.

- Kassir Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* 20, 3790.
- Ritossa, F. (1962). New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and Dnp in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573.
- Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress & Chaperones* 1,97-98.
- Sali, A.; Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815.
- Salminen, A.; Ojala, J.; Kaarniranta, K.; Hiltunen, M.; Soininen, H. (2011). Hsp90 regulates tau pathology through co-chaperone complexes in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 93, 99-110.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, Y.; Taulien, J.; Borkovich, K.A.; Lindquist, S. (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO Journal*, 11, 2357-2364.
- Samll, I.; Peeters, N.; Legeai, F.; Lurin, C., 2004. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, 4, 1581–1590.
- Sanchez, Y.; Lindquist, S.L. (1990). HSP104 required for induced thermotolerance, *Science* 248, 1112–1115.
- Sanchez, Y.; Parsell, D.A.; Taulien, J.; Vogel, J.L.; Craig, E.A.; Lindquist, S. (1993). Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70, *J. Bacteriol.* 175, 6484–6491.
- Sangster, T. A.; Bahrami, A.; Wilczek, A.; Watanabe, E.; Schellenberg, K.; McLellan, C.; Kelley, A.; Kong, S. W.; Queitsch, C.; Lindquist, S. (2007). Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels. *PLoS ONE* 2, e648.
- Sangster, T.A.; Queitsch, C. (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 86-92.
- Sangster, T.A.; Salathia, N.; Undurraga, S.; Milo, R.; Schellenberg, K.; Lindquist, S.; Queitsch, C. (2008). HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2963–2968.

- Satpute-Krishnan, P.; Langseth, S.X.; Serio, T.R. (2007). Hsp104-dependent remodeling of prion complexes mediates protein-only inheritance, *PLoS Biol.* 5, e24
- Scroggins, B. T.; L. Neckers. (2007). Post-translational modification of heat-shock protein 90: impact on chaperone function. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2,1403-1414.
- Schirmer, E.C.; Glover, J.R.; Singer, M.A.; Lindquist, S. (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 21, 289–296.
- Schirmer, E.C.; Ware, D.M.; Queitsch, C.; Kowal, A.S.; Lindquist, S.L. (2001). Subunit interactions influence the biochemical and biological properties of Hsp104, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 914–919.
- Schirmer, E.C.; Queitsch, C.; Kowal, A.S.; Parsell, D.A.; Lindquist, S. (1998). The ATPase activity of Hsp104, effects of environmental conditions and mutations. *J. Biol.Chem.* 273, 15546–15552.
- Schirmer E.C.; Lindquist S., Vierling E. (1994). Na Arabidopsis Heat Shock Protein Complements a Thermotolerance Defect in Yeast. *The Plant Cell*, 6, 1899-1909.
- Schaupp, A.; Marcinowski, M.; Grimminger, V.; Bösl, B.; Walter, S. (2007). Processing of proteins by the molecular chaperone Hsp104. *J. Mol. Biol.* 370, 674–686.
- Schlee, S.; Groemping, Y.; Herde, P.; Seidel, R.; Reinstein, J. (2001). The chaperone function of ClpB from *Thermus thermophilus* depends on allosteric interactions of its two ATP-binding sites. *J. Mol. Biol.* 306, 889–899.
- Schlee, S.; Beinker, P.; Akhrymuk, A.; Reinstein, J. (2004). A chaperone network for the resolubilization of protein aggregates: direct interaction of ClpB and DnaK. *J. Mol. Biol.* 336, 275–285.
- Schmitt, M.; Neupert, W.; Langer, T. (1996). The molecular chaperone Hsp78 confers compartment-specific thermotolerance to mitochondria. *J. Cell Biol.* 134, 1375–1386.
- Scheibel, T.; Siegmund, H. I.; Jaenicke, R.; Ganz, P.; Lilie, H.; Buchner, J. (1999). The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1297-1302.
- Scheibel, T.; Weikl, T.; Buchner, J. (1998). Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,1495–9.
- Scheufler, C.; Brinker, A.; Bourenkov, G.; Pegoraro, S.; Moroder, L.; Bartunik, H.; Hartl, F.U.; Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210.

- Segel, I.H. (1993). *Enzyme Kinetics*. Wiley & Sons, New York.
- Seyffer, F.; Kummer, E.; Oguchi, Y.; Winkler, J.; Kumar, M.; Zahn, R.; Sourjik, V.; Bukau, B.; Mogk, A. (2012). Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 1347–1355.
- Shen G.A.; Pang, Y.Z.; Lin, C.F.; Wei, C.; Qian, X.Y.; Jiang, L.Z.; Du, X.L.; Li, K.G.; Attia, K.; Yang, J.S., (2003). Cloning and characterization of a novel Hsp100/Clp gene (osClpD) from *Oryza sativa*. *DNA Seq* 14, 285–293.
- Sielaff, B.; Tsai, F.T.; (2010). The M-domain controls Hsp104 protein remodeling activity in an Hsp70/Hsp40-dependent manner. *J. Mol. Biol.* 402, 30–37.
- Silva, K.P.; Seraphim, T.V.; Borges J.C. (2013). Structural and functional studies of *Leishmania braziliensis* Hsp90. *Biochimica et Biophysica Acta* 1834, 351–361.
- Singh, S.K.; Grimaud, R.; Hoskins, J.R.; Wickner, S.; Maurizi, M.R. (2000). Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 8898-8903.
- Singh, A.; Singh, U.; Mittal, D.; Grover, A., (2010). Genome-wide analysis of rice ClpB/HSP100, ClpC and ClpD genes. *BMC Genomics*, 11, 95.
- Singh, A.; Grover, A. (2010). Plant Hsp100/ClpB-like proteins: poorly-analyzed cousins of yeast ClpB machine *Plant Mol. Biol.*, 74, 395–404.
- Singla, S.L.; Pareek, A.; Kush, A.K.; Grover, A. (1998). Distribution patterns of 104 kDa stress-associated protein in rice. *Plant Mol Biol* 37, 911–919
- Southworth, D.R.; Agard, D.A. (2008). Species-dependent ensembles of conserved conformational states define the Hsp90 chaperone ATPase cycle. *Mol Cell* 32, 631–640.
- Sorger, P.K. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, 65, 363-366.
- Song, H.; Fan, P.; Shi, W.; Zhao, R.; Li, Y. (2010). Expression of five AtHsp90 genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals functional differences of AtHsp90s under abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 167, 1172-1178.
- Song, H.; Zhao, R.; Fan, P.; Wang, X.; Chen, X.; Li, Y. (2009). Overexpression of AtHsp90.2, AtHsp90.5 and AtHsp90.7 in *Arabidopsis thaliana* enhances plant sensitivity to salt and drought stresses. *Planta* 229, 955-964.
- Shorter, J.; Lindquist, S. (2005). Prions as adaptive conduits of memory and inheritance, *Nat. Rev. Genet.* 6, 435–450.

- Shorter, J. (2010). Emergence and natural selection of drug-resistant prions, *Mol. Biosyst.* 6, 1115–1130.
- Shorter, J. (2008). Hsp104: a weapon to combat diverse neurodegenerative disorders, *Neurosignals* 16, 63–74.
- Shorter, J.; Lindquist, S. (2004). Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science* 304, 1793–1797.
- Shorter, J.; Lindquist, S. (2008). Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions, *EMBO J.* 27, 2712–2724.
- Song, H. Y.; Dunbar, J. D.; Zhang, Y. X.; Guo, D.; Donner, D. B. (1995) Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 3574–3581.
- Sorger, P. K.; Pelham, H. R. B. (1987). The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *J. Mol. Biol.* 194, 341–344.
- Squires, C.L.; Pedersen, S.; Ross, B.M.; Squires, C. (1991). ClpB is the Escherichia coli heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* 173, 4254–4262.
- Sreedhar, A. S.; Kalmar, E.; Csermely, P.; Shen, Y. F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 562, 11-15.
- Stebbins, C. E.; Russo, A. A.; Schneider, C.; Rosen, N.; Hartl, F. U.; Pavletich, N. P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
- Shiau, A.K.; Harris, S.F.; Southworth, D.R.; Agard, D.A. (2006). Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* 127, 329–340.
- Sikorski, R.S.; Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27.
- Sherman, F. (2002). Getting Started with Yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3-41.
- Sugimoto, S.; Yoshida, H.; Mizunoe, Y.; Tsuruno, K.; Nakayama, J.; Sonomoto, K. (2006). Structural and Functional Conversion of Molecular Chaperone ClpB from the Gram-Positive Halophilic Lactic Acid Bacterium *Tetragenococcus halophilus* Mediated by ATP and Stress. *J. Bacteriol.*, 188, 8070–8078.
- Sweeny, E.A.; Shorter, J. (2008). Prion proteostasis: Hsp104 meets its supporting cast. *Prion* 2, 135–140.

- Taipale, M.; Jarosz, D. F.; Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 515-528.
- Tessarz, P.; Mogk, A.; Bukau, B. (2008). Substrate threading through the central pore of the Hsp104 chaperone as a common mechanism for protein disaggregation and prion propagation. *Mol. Microbiol.* 68, 87–97.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680.
- Tipton, K.A.; Verges, K.J.; Weissman, J.S. (2008). In vivo monitoring of the prion replication cycle reveals a critical role for Sis1 in delivering substrates to Hsp104. *Mol Cell* 32, 584–591.
- Tirolí-Cepeda, A. O.; Ramos, C. H. I. (2011). An Overview of the Role of Molecular Chaperones in Protein Homeostasis. *Protein and Peptide Letters* 18,101-109.
- Tissiere, A.; Mitchell, H. K.; Tracy, U. M. (1974). Protein-Synthesis in Salivary-Glands of *Drosophila-Melanogaster* - Relation to Chromosome Puffs. *Journal of Molecular Biology* 84,389-392.
- Tkach, J.M.; Glover, J.R. (2004). Amino acid substitutions in the C-terminal AAA+ module of Hsp104 prevent substrate recognition by disrupting oligomerization and cause high temperature inactivation, *J. Biol. Chem.*, 279, 35692–35701.
- Tkach, J.M.; Glover, J.R. (2008). Nucleocytoplasmic trafficking of the molecular chaperone Hsp104 in unstressed and heat-shocked cells. *Traffic* 9,39–56.
- Tompa, P. (2005). The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *Febs Letters* 579, 3346-3354.
- Trepel, J.; Mollapour, M.; Giaccone, G.; Neckers, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nature Reviews Cancer* 10, 537-549.
- Tsutsumi, S.; Mollapour, M.; Prodromou, C.; Lee, C. T.; Panaretou, B.; Yoshida, S.; Mayer, M. P.; Neckers, L. M. (2012). Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 2937-2942.
- Turner, G.C.; Varshavsky, A. (2000). Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo. *Science*, 289, 2117-2120.
- Tyedmers, J.; Mogk, A.; Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 777–788.

- Tuite, M.F.; Mundy, C.R.; Cox, B.S. (1981). Agents that cause a high frequency of genetic change from [*psi*⁺] to [*psi*⁻] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 98, 691-711.
- Tucker, P.A.; Sallai, L. (2007). The AAA+ superfamily – a myriad of motions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 641–652.
- Vaughan, C.K.; Piper, P.W.; Pearl, L.H.; Prodromou, C. (2009). A common conformationally coupled ATPase mechanism for yeast and human cytoplasm HSP90s. *FEBS J* 276, 199–209.
- Versteeg, S.; Mogk, A.; Schumann, W. (1999). The *Bacillus subtilis* htpG gene is not involved in thermal stress management. *Molecular and General Genetics* 261, 582-588.
- Vettore, A.L.; da Silva, F.R.; Kemper, E.L.; Arruda, P. (2001). The libraries that made SUCEST. *Genet. Mol. Biol.* 24, 1-7.
- Vogel, J.L.; Parsell, D.A.; Lindquist, S. (1995). Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. *Curr. Biol.* 5, 306–317
- Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 579–620.
- Virdi, A.S.; Thakur, A.; Dutt, S.; Kumar, S.; Singh, P. (2009). A sorghum 85 kDa heat stress-modulated protein shows calmodulin-binding properties and cross-reactivity to anti-*Neurospora crassa* Hsp 80 antibodies. *FEBS Lett.* 583, 767-70.
- Wandinger, S. K.; Richter, K.; Buchner, J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry* 283, 18473-18477.
- Wang, X.; Heuvelman, D. M.; Carroll, J. A.; Dufield, D. R.; Masferrer, J. L. (2010a). Geldanamycin-induced PCNA degradation in isolated Hsp90 complex from cancer cells. *Cancer Invest.* 28, 635-641.
- Wang, L.; Schubert, D.; Sawaya, M.R.; Eisenberg, D.; Riek, R. (2010b). Multidimensional structure-activity relationship of a protein in its aggregated states. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49, 3904–3908.
- Wang, W.; Vinocur, B.; Shoseyov, O.; Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9, 244-252.
- Wang, F.; Mei, Z.; Qi, Y.; Yan, C.; Hu, Q.; et al. (2011a). Structure and mechanism of the hexameric MecA-ClpC molecular machine. *Nature* 471, 331–335.
- Wang, G. F.; Wei, X.; Fan, R.; Zhou, H.; Wang, X.; Yu, C.; Dong, L.; Dong, Z.; Kang, Z.; Ling, H. et al. (2011b). Molecular analysis of common wheat genes encoding three

- types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance. *New Phytol.* 191, 418-431.
- Watanabe, Y.H.; Takano, M.; Yoshida, M. (2005). ATP binding to nucleotide binding domain (NBD)1 of the ClpB chaperone induces motion of the long coiled-coil, stabilizes the hexamer, and activates NBD2. *J. Biol. Chem.* 280, 24562–24567.
- Watanabe, Y.H.; Motohashi, K.; Yoshida, M. (2002). Roles of the Two ATP Binding Sites of ClpB from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 277, 5804–5809.
- Watanabe, Y.H.; Nakazaki, Y.; Suno, R.; Yoshida, M. (2009). Stability of the two wings of the coiled-coil domain of ClpB chaperone is critical for its disaggregation activity. *Biochem. J.* 421, 71–77.
- Wayne, N.; Bolon, D. N. (2010). Charge-rich regions modulate the anti-aggregation activity of Hsp90. *J. Mol. Biol.* 401, 931-939
- Wegele, H; Müller, L; Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 151, 1-44.
- Weibezahn, J.; Schlieker, C.; Bukau, B.; Mogk, A. (2003). Characterization of a trap mutant of the AAA+ chaperone ClpB. *J. Biol. Chem.* 278, 32608–32617.
- Weibezahn, J.; Tessarz, P.; Schlieker, C.; Zahn, R.; Maglica, Z.; Lee, S.; Zentgraf, H.; Weber-Ban, E.U.; Dougan, D.A.; Tsai, F.T.; Mogk, A.; Bukau, B. (2004). Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* 119, 653–665.
- Welch, W. J.; Brown, C. R. (1996). Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress & Chaperones* 1, 109-115.
- Wendler, P.; Shorter, J.; Plisson, C.; Cashikar, A.G.; Lindquist, S.; et al. (2007). Atypical AAA+ subunit packing creates an expanded cavity for disaggregation by the protein-remodeling factor Hsp104. *Cell* 131, 1366–1377.
- Wendler, P.; Shorter, J.; Snead, D.; Plisson, C.; Clare, D.K.; et al. (2009). Motor mechanism for protein threading through Hsp104. *Mol. Cell* 34, 81–92.
- Werbeck, N.D.; Zeymer, C.; Kellner, J.N.; Reinstein, J. (2011). Coupling of Oligomerization and Nucleotide Binding in the AAA+ Chaperone ClpB. *Biochemistry* 50, 899–909.
- Westermarck P.; Sletten, K.; Johansson, B.; Cornwell, G.G. (1990). Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 2843-2845.

- Woo, K.M.; Kim, K.I.; Goldberg, A.L.; Ha, D.B.; Chung, C.H. (1992). The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 20429–20434.
- Wolfe, K. J.; Cyr, D. M. (2011). Amyloid in neurodegenerative diseases: Friend or foe? *Semin Cell Dev Biol.* 22, 476-81.
- Wells, D.R.; Tanguay, R.L.; Le, H.; Gallie, D.R. (1998). HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *GENES & DEVELOPMENT* 12, 3236–3251.
- Xu, X.; Song, H.; Zhou, Z.; Shi, N.; Ying, Q.; Wang, H. (2010). Functional characterization of AtHsp90.3 in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Biotechnol. Lett.*, 32, 979-987.
- Young, J. C.; Schneider, C.; Hartl, F. U. (1997). In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett.* 418, 139-143.
- Young, J. C.; Moarefi, I.; Hartl, F. U. (2001a). Hsp90: a specialized but essential protein folding tool. *Journal of Cell Biology* 154, 267-273.
- Young, T.E.; Ling, J.; Geisler-Lee, C.J.; Tanguay, R.L.; Caldwell, C.; Gallie, D.R. (2001b). Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiol* 127, 777–791.
- Yabe, N.; Takahashi, T.; Komeda, Y. (1994). Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* Hsp90-family gene *HSP81*. *Plant Cell Physiol* 35, 1207–1219.
- Yuan, W.; Zhang, X.; Xia, X.; Sun, H. (2012). Inhibition of infectious bursal disease virus infection by artificial microRNAs targeting chicken heat-shock protein 90. *J. Gen. Virol.* 93, 876-879.
- Zolkiewski, M. (2006). A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol. Microbiol.*, 61, 1094-1100.
- Zolkiewski, M.; Kessel, M.; Ginsburg, A.; Maurizi, M.R. (1999). Nucleotide-dependent oligomerization of ClpB from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 8, 1899–1903.
- Zietkiewicz, S.; Slusarz, M.J.; Slusarz, R.; Liberek, K.; Rodziewicz-Motowidlo, S. (2010). Conformational stability of the full-atom hexameric model of the ClpB chaperone from *Escherichia coli*. *Biopolymers* 93, 47–60.
- Zietkiewicz, S.; Lewandowska, A.; Stocki, P.; Liberek, K. (2006). Hsp70 Chaperone Machine Remodels Protein Aggregates at the Initial Step of Hsp70-Hsp100-dependent Disaggregation. *J. Biol. Chem.*, 281, 7022-7029.

Zietkiewicz, S.; Krzewska, J.; Liberek, K. (2004). Successive and Synergistic Action of the Hsp70 and Hsp100 Chaperones in Protein Disaggregation. *J. Biol. Chem.* 279, 44376-83.

