

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

GLAUCIA MELINA SQUIZATO PINHEIRO DE CASTRO

Caracterização estrutural e funcional das chaperonas moleculares SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp de *Saccharum spp.* (cana-de-açúcar)

> CAMPINAS 2015

GLAUCIA MELINA SQUIZATO PINHEIRO DE CASTRO

Caracterização estrutural e funcional das chaperonas moleculares SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp de *Saccharum spp.* (cana-de-açúcar)

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências

Orientador: Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE INÁCIO RAMOS

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA GLAUCIA MELINA SQUIZATO PINHEIRO DE CASTRO E ORIENTADA PELO PROF. DR. CARLOS HENRIQUE INÁCIO RAMOS

> CAMPINAS 2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2011 / 05115-5

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Química Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

Castro, Glaucia Melina Squizato Pinheiro de, 1985-

C355c Caracterização estrutural e funcional das chaperonas moleculares SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp de Saccharum spp. (cana-de-açúcar) / Glaucia Melina Squizato Pinheiro de Castro. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

 Chaperonas moleculares . 2. Proteínas de choque térmico . 3. . 4. . 5. .
I. Ramos, Carlos Henrique Inácio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Structural and functional characterization of molecular chaperones SsHSP21.5-mt and SsHSP22.3-cp from *Saccharum spp*. (sugarcane)

Palavras-chave em inglês: Molecular chaperones Heat shock proteins Área de concentração: Química Orgânica Titulação: Doutora em Ciências Banca examinadora: Carlos Henrique Inácio Ramos [Orientador] Shaker Chuck Farah Leandro Ramos Souza Barbosa Fábio Cesar Gozzo Taicia Pacheco Fill Data de defesa: 10-12-2015 Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (Orientador)

Prof. Dr. Shaker Chuck Farah (IQ-USP)

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa (IF-USP)

Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo (IQ-UNICAMP)

Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

> Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna GLAUCIA MELINA SQUIZATO PINHEIRO DE CASTRO, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos, por ter cedido espaço em seu laboratório de pesquisa e acesso a todos os equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento deste projeto, por todo conhecimento transmitido e pela excelente orientação, desempenhada com confiança e respeito ao longo desses quatro anos.

Agradeço a FAPESP pela bolsa concedida e por todo o apoio financeiro e também ao apoio financeiro do CNPQ e Capes.

Agradeço aos meus antigos orientadores Prof. Dr. Ernani A. Basso, prof. Dr. Roberto Rittner Neto, Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoerh e Prof. Dr. Claudio F. Tormena, por fazerem parte da minha formação científica e acadêmica, pela orientação e amizade desenvolvida no decorrer desses anos.

Aos professores que ministraram as disciplinas de pós-graduação, pois contribuíram com a minha formação, e aos que participaram dos meus exames de qualificação geral e de área agradeço por todas as sugestões e correções construtivas feitas neste trabalho.

Ao Instituto de Química e a UNICAMP pela infra-estrutura e apoio científico. As secretárias da pós-graduação, aos técnicos e funcionários do IQ, principalmente a Cláudia Marteli, técnica do laboratório de espectroscopia, e aos técnicos do laboratório do Prof. Dr. Carlos Ramos, Barbara, Jéssica, Mariana, Claudia, Daiane, Nayene, Beatriz, Ana Flávia, Aline, e em especial a Annelize que além de excelente profissional se tornou uma grande amiga.

As instalações do CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) em especial ao LNBIO (Laboratório Nacional de Biociências) pela utilização dos equipamentos DLS e Ultracentrifugação analítica no LEC (Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria) e ao LNLS (Laboratório de Luz Síncrotron) pelas coletas de SAXS.

A todos os colegas de laboratório Conrado, Josielle, Izabella, Natália, Dev, David, Daniel, Barbara, Vanessa, Larissa, Danieli, Viviane, Melissa, Regina, Letícia, Ana Luíza, Clelton, Fernando e agradeço imensamente a amiga Ana Olívia, que me ajudou na adaptação no laboratório e no aprendizado das técnicas, contribuindo muito para o desenvolvimento deste projeto. Em especial agradeço novamente ao Conrado, a Josi e Anne, por terem contribuído diretamente com o desenvolvimento desta tese, lendo as dezenas de versões, fazendo excelentes sugestões e correções, pelas excelentes aulas de biologia, e também, por serem ótimos amigos.

As minhas queridas amigas Rebeca, Thaís, Cibele, Sabrina, que mesmo distante sempre me apoiaram e me ajudaram a concluir esta importante etapa.

A toda a minha família, minha mãe Roseli, meus irmãos Glauco e Clara, meu pai Laércio, a Dani, João Henrique, ao Francisco, minha avó, por todo carinho, amor, respeito, e por sempre me apoiarem e me incentivarem a realizar meus sonhos.

Ao meu marido Lucas, por sempre estar ao meu lado, pela compreensão, amizade, companhia, paciência, amor, e especialmente por respeitar minha decisão de permanecer em Campinas para realização deste doutorado. E também a sua (nossa) família, Fernanda, Rodrigo, Bia, Isa, Cristina e Geraldo, por todo apoio, respeito, e amizade.

"Na vida, não existe nada a temer, mas a entender."

Marie Curie

RESUMO

As chaperonas moleculares constituem uma família de proteínas que auxiliam na formação da estrutura nativa de polipeptídeos clientes e são capazes de prevenir o enovelamento incorreto e a agregação, sendo, portanto, essenciais na manutenção da homeostase proteica. As chaperonas da família 'small heat shock proteins' (sHsps) são expressas em diversos organismos, como bactérias, fungos, vegetais e animais, principalmente em condições de estresse térmico, contribuindo para termotolerância ao proteger proteínas da agregação. Nas plantas, as sHSPs estão presentes em todos os compartimentos celulares, o que demonstra sua importância para a célula. Devido a grande relevância biotecnológica da cana-deacúcar caracterizamos estrutural e funcionalmente duas sHSPs desta planta: a SsHSP21.5-mt de mitocôndria e a SsHSP22.3-cp de cloroplasto. Os genes dessas proteínas foram expressos em *Escherichia coli* e as proteínas recombinantes foram isoladas e purificadas, em apenas duas etapas cromatográficas, com alto teor de pureza (>95%) e em um único estado oligomérico. A análise de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência mostraram que ambas foram purificadas enoveladas, com estrutura secundária predominante do tipo folha-β. Α caracterização hidrodinâmica determinou a massa molecular, coeficiente de difusão e o raio de Stokes das proteínas em solução, revelando que ambas formam grandes oligômeros globulares em solução. No entanto, a atividade chaperona não foi equivalente entre elas, pois SsHSP22.3-cp foi mais eficiente em proteger todos os substratos modelos testados (malato desidrogenase, citrato sintase, insulina, lisozima e extrato de E. coli) quando comparada com a SsHSP21.5-mt. Estes resultados mostram que as duas sHSP estudadas neste trabalho são estruturalmente semelhantes, mas diferem na atividade chaperona testada, provavelmente devido à baixa similaridade no domínio N-terminal, responsável pela função das sHSP. Estes resultados corroboram a importância da grande diversidade de genes de chaperonas desta família em plantas para manter a homeostase proteica.

ABSTRACT

Molecular chaperones belong to a family of proteins that are essential to maintain homeostasis since they are able to assist the formation of native structure of polypeptides and also to prevent incorrect folding and aggregation. The chaperones of the family 'small heat shock proteins' (sHSPs) are expressed in several organisms such as bacteria, fungi, plants and animals, significantly under conditions of thermal stress, contributing to thermotolerance while protecting from aggregation. In plants, sHSPs are present in all cellular compartments, highlighting its importance. Due to the biotechnological relevance of sugarcane, we took to characterize structurally and functionally two os its sHSPs: the SsHSP21.5-mt from mitochondria and the SsHSP22.3-cp from chloroplast. The genes of these proteins were expressed in Escherichia coli and the recombinant proteins were isolated and purified, by two chromatographic steps, with high purity (> 95%) and in a single oligomeric state. Circular dichroism and fluorescence spectroscopy analyses showed that both proteins were folded, presenting predominantly β -sheet secondary structure. The hydrodynamic characterization determined the molecular weight, the diffusion coefficient and the Stokes radius of the proteins in solution, revealing that both chaperones form similar large oligomers in solution with spherical shapes. However, the chaperone activity was not equivalent, since SsHSP22.3-cp was most effective in protecting all substrate models (malate dehydrogenase, citrate synthase, insulin, lysozyme and extract of *E. coli*) when compared to SsHSP21.5-mt. These results showed that the two sHSPs were structurally similar, but had distinct chaperone activity, probably due to the low identity among the N-terminal domains, which are known to be involved with substrate affinity. These results confirm the importance of having great diversity of sHSP chaperones in plants for homeostasis maintenance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ângulos de torção (diedrais) da ligação peptídica.	19
Figura 2. A estrutura tridimensional das proteínas.	20
Figura 3. Funil de energia do enovelamento proteico.	22
Figura 4. Esquema de atuação das chaperonas moleculares no controle de qualidade celular.	26
Figura 5. Estrutura primária básica das sHSPs.	29
Figura 6. Diversidade nas estruturas oligoméricas das sHSPs.	31
Figura 7. Sequências de mRNA consenso codificantes das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp de cana-de-açúcar.	37
Figura 8. Mapa da região de interesse do vetor utilizado pET28a.	39
Figura 9. Alinhamento entre a SsHSP21.5-mt e a SsHSP22.3-cp.	54
Figura 10. Cladograma de similaridade de sequência de aminoácidos relacionando as proteínas sHSP21.5-mt e sHSP22.3-cp com algumas sHSP de diversos compartimentos celulares de plantas.	56
Figura 11. Análise do teste de indução para SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3- cp (B) à 37°C por SDS-PAGE (12%).	58
Figura 12. Cromatografia de afinidade da SsHSP21.5-mt	60
Figura 13. Análise do processo de purificação por cromatografia de afinidade da SsHSP21.5-mt por SDS-PAGE (12%).	61
Figura 14. Cromatografia de gel filtração da SsHSP21.5-mt	62
Figura 15. Análise do processo de purificação por cromatografia de gel filtração da SsHSP21.5-mt por SDS-PAGE (12%).	63
Figura 16. Cromatografia de afinidade da SsHSP22.3-cp.	65
Figura 17. Análise do processo de purificação por cromatografia de afinidade	66

Figura 17. Análise do processo de purificação por cromatografia de afinidade 66 da SsHSP22.3-cp por SDS-PAGE (12%).

Figura 18. Cromatografia de gel filtração da SsHSP22.3-cp.67

Figura 19. Análise do processo de purificação por cromatografia de gel filtração **68** da SsHSP22.3-cp por SDS-PAGE (12%).

Figura 20. Análise por SDS-Page (12%) do teste de clivagem da cauda de polihistidina da proteína SsHSP21.5-mt com trombina (1u / μ L) com incubação por 3h a temperatura ambiente.

Figura 21. Espectro de emissão de fluorescência da SsHSP21.5-mt (A) e 72 SsHSP22.3-cp (B) a 20ºC.

Figura 22. Caracterização da estrutura secundária da SsHSP21.5-mt e **74** SsHSP22.3-cp monitorada por dicroísmo circular na região do UV-distante.

Figura 23. Desenovelamento e renovelamento térmico da SsHSP21.5-mt (A) e **76** SsHSP22.3-cp (B), monitorado por dicroísmo circular à 217 nm.

Figura 24. Desenovelamento químico da SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3-cp **78** (B) monitorado pelo sinal de dicroísmo circular à 217 nm.

Figura 25A. Cromatografia de gel filtração analítica para determinação do raio **80** de Stokes da SsHSP21.5-mt (A e B).

Figura 25B. Cromatografia de gel filtração analítica para determinação do raio **81** de Stokes da SsHSP22.3-cp (C e D).

Figura 26. Cromatografia de gel filtração analítica para analisar o estado **82** oligomérico das proteínas em função do pH, SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3-cp (B).

Figura 27. Caracterização do estado oligomérico da SsHSP21.5-mt (A) e **84** SsHSP22.3-cp (B) em solução por SEC-MALS.

Figura 28. Teste de atividade chaperona da SsHSP21.5-mt (preto) e **88** SsHSP22.3-cp (listrado) contra o substrato modelo malato desidrogenase à 42ºC por 60 min.

Figura 29. Teste de atividade chaperona da SsHSP21.5-mt (preto) e **89** SsHSP22.3-cp (listrado) contra o substrato modelo citrato sintase à 45°C por 60 min. **Figura 30.** Teste de atividade chaperona da SsHSP21.5-mt (preto) e **90** SsHSP22.3-cp (listrado) contra o substrato modelo lisozima à 25°C.

Figura 31. Teste de atividade chaperona da SsHSP21.5-mt (preto) e **91** SsHSP22.3-cp (listrado) contra o substrato modelo insulina à 20ºC.

Figura 32. Análise por SDS-Page (12 %) da atividade chaperona das proteínas **93** SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp separadamente, contra as proteínas do extrato de *E.coli*, por 15 min à 45 °C.

Figura 33. Análise por SDS-Page (12 %) da atividade chaperona das proteínas **94** SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp misturadas, contra as proteínas provenientes do extrato de *E. coli* à 45 °C.

Figura 34. Análise por SDS-Page (12%) da solubilidade das proteínas **96** SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp na ausência e presença de sacarose 200 g / L.

Figura 35. Esquema da posição dos triptofanos nas proteínas SsHSP21.5-mt e **99** SsHSP22.3-cp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas das proteínas monoméricas**46**utilizadas como padrão no experimento de gel filtração analítica.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos das SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp**53**preditos pela análise de suas estruturas primárias pelo programa Protparam.

Tabela 3. Valores de coeficiente de extinção molar obtidos para as proteínas**55**SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp pelo método de Edelhoch.

Tabela 4. Emissão de fluorescência e centro de massa calculado para a**71**SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cpcom e sem ureia 8M.

Tabela 5. Volumes de eluição da cromatografia de gel filtração analítica das83protínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp em diferentes pHs.

Tabela 6. Parâmetros hidrodinâmicos para SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp**85**à 25°C.

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

Å: Angstrom (1x10⁻¹⁰ metros);

Abs: Absorbância;

ATP: adenosina 5' tri-fosfato;

CD: dicroísmo circular;

cDNA: DNA complementar;

Cm: concentração de uréia no ponto médio da transição;

cp: cloroplasto;

CS: Citrato Sintase;

D: coeficiente de difusão;

Deg: grau (degree);

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

DNA: ácido desoxidorribonucléico;

DTT: ditiotreitol;

EDTA: Ácido etilenodiamino-tetra-acético;

EMR: elipticidade molar residual;

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

f: coeficiente friccional;

 f_0 : coeficiente friccional teórico esperado para uma partícula esférica rígida de volume igual à molécula em estudo;

 f_0/f : razão friccional ou fator de Perrin;

Fi: intensidade de fluorescência;

GdnCI: cloreto de guanidina;

GF: gel filtração;

GFA: gel filtração analítica;

HSP: proteína de choque térmico (Heat Shock Protein);

HSP60: proteína de choque térmico de 60 kDa;

HSP70: proteína de choque térmico de 70 kDa;

HSP90: proteína de choque térmico de 90 kDa;

HSP100: proteína de choque térmico de 100 kDa;

IPTG: isopropiltiol-β-D-galactosídeo;

Can: canamicina;

I: comprimento do caminho óptico;

LB: meio de cultura Luria-Bertani;

Liz: lisozima;

MDH: malato desidrogenase;

mt: mitocôndria;

n: número de resíduos de aminoácidos da proteína;

PDB: banco de dados de proteínas;

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila;

pl: ponto isoelétrico;

RNA: ácido ribonucléico;

rpm: rotações por minuto;

Rs: raio de Stokes;

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;

sHSP: proteína de choque térmico da família das small;

SsHSP21.5.-mt: proteína de choque-térmico de 21.5 kDa da família das small de cana-de-açúcar, mitocondrial;

SsHSP22.3-cp: proteína de choque-térmico de 22.3 kDa da família das small de cana-de-açúcar, de cloroplasto;

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

Tm: temperatura no ponto médio de transição;

U.A.: unidade arbitrária;

Ve: volume de eluição;

Vc: volume total da coluna cromatográfica;

Vo: volume morto da coluna cromatográfica;

λ: comprimento de onda;

 λ_{max} : comprimento de onda máximo de fluorescência;

 $< \lambda >:$ centro de massa espectral de fluoresecência;

θ: elipticidade;

[θ]: elipticidade molar residual;

ε: coeficiente de absorbância molar.

SUMÁRIO

1. IN	TRODUÇÃO	17
1.1.	Proteínas	17
1.2.	Enovelamento protéico	21
1.3.	Chaperonas moleculares	23
1.4.	Small heat shock proteins	27
1.5.	sHSP de plantas	32
2. OE	BJETIVOS	35
2.1.	Objetivo geral	35
2.2.	Objetivos específicos	35
3. M/	ATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1.	Análise de similaridade de sequência	36
3.2.	Estratégia para obtenção dos clones	36
3.3.	Linhagens celulares	40
3.4.	Transformação e expressão	40
3.5.	Lise bacteriana	40
3.6.	Meios de cultura	41
3.7.	Purificação das proteínas recombinantes	41
3.7.1.	Cromatografia de afinidade	42
3.7.2.	Cromatografia de gel filtração	42
3.8.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	43
3.9.	Determinação da concentração de proteínas	44
3.10.	Medidas de emissão de fluorescência	44
3.11.	Caracterização do estado oligomérico	45
3.11.1	I. Gel filtração analítica	45
3.11.2	2. Cromatografia de exclusão molecular acoplada a um	47
	detector multi-ângulo de espalhamento de luz (SecMals)	
3.12.	Medidas de espalhamento de luz dinâmica (DLS)	48
3.13.	Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)	49
3.14.	Atividade chaperona	51
3.14.1	Atividade chaperona com substratos modelos	51
3.14.2	2. Atividade chaperona com extato solúvel de <i>E.coli</i>	52
4. RE	ESULTADOS	53
4.1.	Análise da estrutura primária	53
4.2.	Análise de similaridade de sequência	55
4.3.	Expressão	57
4.4.	Purificação	59
4.4.1.	Purificação da proteína SsHSP21.5-mt	59
4.4.2.	Purificação da proteína SsHSP22.3-cp	64
4.5.	Remoção da cauda de poli-histidina	69
4.6.	Medidas de emissão de fluorescência	71
4.7.	Dicroísmo circular (CD)	73

4.7.1.	Desenovelamento térmico acompanhado por	75
	dicroísmo circular	
4.7.2.	Desenovelamento induzido por uréia aompanhado	77
	por dicroísmo circular	
4.8.	Caracterização estrutural	79
4.8.1.	Gel filtração analítica	79
4.8.2.	Cromatografia de exclusão molecular acoplada a um	83
	detector multi-ângulo de espalhamento de luz	
	(SECMALS)	
4.8.3.	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	85
4.9.	Atividade chaperona	86
4.9.1.	Atividade chaperona com substratos modelos	86
4.9.2.	Atividade chaperona com extato solúvel de E.coli	92
5. DIS	SCUSSÃO	97
6. CC	NCLUSÕES	102
6.1.	Proteína SsHSP21.5-mt	102
6.2.	Proteína SsHSP22.3-cp	103
7. Co	nsiderações finais	104
8. RE	FERÊNCIAS	105
9. AN	EXOS	115
9.1.	Declaração de biossegurança	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. PROTEÍNAS

As proteínas são as macromoléculas mais importantes nas células, pois desempenham diversas funções biológicas nos organismos, executando a informação genética contida no genoma (Lehninger e col., 2004). Essas macromoléculas são formadas por sequências de aminoácidos de 20 tipos, unidos nas mais diversas possibilidades, através de ligações peptídicas. As ligações peptídicas ocorrem entre o grupo amino de um aminoácido e o grupo carboxila de outro, e devido à ressonância, tem caráter de dupla ligação. Além disso, a ligação peptídica (C-N) é planar, o que impede a rotação e restringe a conformação do peptídeo. Entretanto, as ligações que ocorrem entre o grupo amino e C α e entre o C α e a carbonila, são ligações simples, que podem rotacionar em diferentes ângulos de torções (N-C α ângulo Φ , CO-C α ângulo ψ), permitindo que as cadeias polipeptídicas assumam várias orientações (Figura 1) (Stryer, 2004).

A sequência de aminoácidos determina quais interações serão possíveis entre as cadeias laterais dos aminoácidos, e essas cadeias apresentam variações de carga, massa, volume e solubilidade (Lehninger e col., 2004). Portanto, a sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica determina a estrutura tridimensional da mesma, e esta determina sua função. Dentre as estruturas possíveis (Figura 2), as proteínas são classificadas de acordo com o nível de organização tridimensional dos aminoácidos na cadeia polipeptídica em:

- 1. Estrutura (ou Sequência) Primária: corresponde apenas a ordem da sequência de ligação dos aminoácidos em uma cadeia polipeptídica.
- 2. Estrutura Secundária: a organização espacial adquirida pela cadeia principal, não considerando as cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos, portanto, predominam interações locais. São classificadas em hélice-α, folha-β, voltas reversas e alças. As estruturas mais comumente encontradas são a do tipo hélice-α e a folha-β. As estruturas do tipo hélice-α_{i,i+4} apresentam torção da cadeia polipeptídica ao redor do eixo, devido a ligações de hidrogênio formadas entre os grupamentos NH e CO de um resíduo de aminoácido com o quarto resíduo subseqüente. Essas ligações estão dispostas paralelamente

ao eixo da hélice, ficando, portanto projetadas para fora, ou seja, perpendicular ao eixo, as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. As estruturas do tipo folha-β também são mantidas por ligações de hidrogênio entre os mesmo grupamentos, porém entre resíduos de aminoácidos mais distantes na cadeia polipeptídica. Essas ligações são perpendiculares ao eixo da cadeia principal, ficando os grupamentos das cadeias laterais projetados para cima ou para baixo do eixo.

- Estrutura Terciária: a organização tridimensional da cadeia polipeptídica completa, ou seja, considera as interações das cadeias laterais. Predominam interações não-locais.
- Estrutura Quaternária: organização espacial das subunidades e a natureza das suas ligações. Muitas proteínas são compostas por mais de uma cadeia polipeptídica, chamada de subunidade. (Stryer, 2004)

As sequências de aminoácidos da cadeia polipeptídica adotam uma estrutura tridimensional característica, também conhecida como estrutura nativa, que são formadas pelo processo de enovelamento proteico.



Figura 1. Ângulos de torção (diedrais) da ligação peptídica. (modificado de Freeman e col., 2012).

INTRODUÇÃO



Figura 2. A estrutura tridimensional das proteínas. (modificado de Voet e col., 2011).

1.2. Enovelamento protéico

O enovelamento proteico ou estrutura nativa é definido como o estado termodinamicamente mais estável, mais favorável, de menor energia livre, que uma proteína pode alcançar (Anfinsen, 1973). Este enovelamento, no qual as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias se encontram completamente definidas, é mantido principalmente por interações não covalentes entre os resíduos de aminoácidos da cadeia lateral (Lehninger e col., 2004; Ramos e Ferreira, 2005). Ele depende somente da estrutura primária e das propriedades físico-químicas do meio em que a proteína se encontra (Haber e Anfinsen, 1962). As etapas do processo de enovelamento são complexas e heterogêneas, envolvendo interações fracas como forças hidrofóbicas, pelas quais os resíduos apolares ficam, predominantemente, no interior da proteína (Hartl e col., 2011).

O processo de enovelamento foi descrito por modelos termodinâmicos, na forma de um funil (Figura 3), para explicar o caminho que as proteínas percorrem em busca de um estado de mínimo de energia livre, ou seja, sua conformação nativa, sua estrutura funcional (Anfinsen, 1973). Como o número de conformações possíveis que uma proteína pode adotar é muito grande, a busca por conformações nativas possíveis levaria um tempo infinitamente longo (Levinthal, 1969; Dobson, 2003). Como o enovelamento dentro das células ocorre rapidamente, sugere-se que cada proteína percorre um caminho definido, único e específico para cada polipeptídeo, com a formação de alguns intermediários, até atingir o seu estado de mínimo de energia (Anfinsen, 1973).

A rugosidade do funil (Figura 3) indica que para alcançar a conformação nativa, a proteína passa por estados intermediários. Estes intermediários podem ser estados parcialmente enovelados ou mal enovelados, podendo sofrer agregação, dependendo da concentração de macromoléculas do meio, uma vez que estas formas podem expor os resíduos hidrofóbicos e regiões não estruturadas ao solvente, diferentemente do que ocorre no estado nativo. Estes intermediários são determinantes no processo de enovelamento de proteínas com mais de 100 aminoácidos (~90% das proteínas celulares), as quais têm forte tendência de sofrer colapso hidrofóbico formando estruturas globulares compactas (Hartl e col., 2011).



Figura 3. Funil de energia do enovelamento proteico. No topo do funil, onde a energia livre é maior, há maior número de conformações possíveis que podem ser adotadas por uma proteína. No entanto, conforme a proteína vai se enovelando, o número de conformações possíveis diminui concomitante com a diminuição de energia livre, levando a formação das conformações de menor energia, ou seja, da proteína nativa, mas também, de espécies improdutivas, como agregados, fibrilas amilóides e ou oligômeros insolúveis, que podem ser evitados na presença de chaperonas moleculares (modificado de Hartl e col., 2011).

Em alguns casos, esses intermediários são formados com uma conformação de baixa energia, mas que não corresponde ao nível de menor energia para a conformação nativa, o que pode resultar na formação de espécies improdutivas, podendo ser irreversível devido à alta barreira energética existente entre estes estados de mínimos de energia (Hartl e col., 2011).

Ainda que a estrutura tridimensional de uma proteína esteja codificada na sua seqüência de aminoácidos, durante o enovelamento na célula, devido à alta concentração de diversas macromoléculas no meio celular como, proteínas, DNA, carboidratos etc., muitas proteínas não atingem ou não mantêm sua estrutura correta sem a assistência de outras proteínas, chamadas de chaperonas moleculares (Frydman e Hartl, 1996; Hartl, 1996).

1.3. Chaperonas moleculares

As chaperonas moleculares constituem uma família de proteínas que auxiliam na correta formação da estrutura tridimensional de proteínas clientes, sendo capazes de prevenir o enovelamento incorreto, a formação de agregados, inibir interações não produtivas e permitir que outras proteínas se enovelem mais eficientemente nas suas estruturas nativas. Juntamente com o sistema proteassoma, as chaperonas moleculares são essenciais na manutenção da homeostase proteica das células (Hendrick e Hartl, 1993; Hartl, 1996; Ramos, 2008; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2011; Borges e Ramos, 2005).

A homeostase proteica é mantida por um sistema de controle de qualidade proteico. Este sistema, controlado pelas chaperonas moleculares e pelo sistema proteassoma, garante o equilíbrio entre proteínas correta e incorretamente enoveladas e a degradação proteica. Este controle é essencial para a vida, pois o acúmulo de proteínas mal enoveladas no ambiente celular é a causa de diversas doenças neurodegenerativas (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2011; Ramos e Ferreira, 2005; Ramos, 2011).

Muitas vias do metabolismo celular, inclusive as vias apoptóticas, são reguladas por chaperonas moleculares. Estas proteínas são essenciais não apenas para o enovelamento de proteínas, mas também nos processos de translocação

INTRODUÇÃO

através de compartimentos celulares, na montagem e manutenção de complexos multiproteicos, evitando a auto-associação, e direcionando proteínas mal enoveladas para o proteassoma (Mosser e Morimoto, 2004).

Basicamente, as chaperonas moleculares interagem com outras proteínas em estado não-nativo ou parcialmente enoveladas reconhecendo sequências ou regiões hidrofóbicas expostas ao solvente, não necessitando de uma região específica de interação, um motivo ou uma sequência consenso, fato este que possibilita que as chaperonas previnam o enovelamento incorreto de diversas proteínas. O principal estado intermediário que limita o processo de enovelamento proteico permanece inalterado na presença de chaperonas (Martin e Hartl, 1993), sendo assim, essas proteínas se ligam e estabilizam polipeptídios, facilitando seu enovelamento correto sem contribuir com informações conformacionais (Hendrick e Hartl, 1993; Hartl e Hayer-Hartl, 2009).

Em geral, a síntese de chaperonas é aumentada em condições de estresse térmico, e por isso são chamadas de proteínas de choque térmico ("heat shock protein" – HSP), porém, sua síntese também é estimulada por outros tipos de estresses, e, ainda, muitas são expressas constitutivamente (Lindquist e Craig, 1988). Sob condições de estresse, diversas proteínas celulares podem se enovelar de forma incorreta, mas, com o auxílio das HSPs, essas proteínas são protegidas da agregação e encaminhadas para o correto enovelamento, mas se escaparem deste processo, as proteínas celulares poderão ser eliminadas pelo sistema proteolítico (Saibil, 2013; Martin e Hartl, 1993).

Considerando que a hipertermia pode inibir diversos processos do metabolismo celular, incluindo a replicação do DNA, transcrição, processamento de RNAm e síntese de proteínas, o fato de as chaperonas serem mais intensamente expressas quando submetidas a elevadas temperaturas, as torna fundamentais para a manutenção e sobrevivência celular (Mosser e Morimoto, 2004) fato que justifica o interesse clínico e biotecnológico no estudo das chaperonas. Isso ocorre porque estas proteínas estão envolvidas em diversos processos celulares (Figura 4) como na translocação e transporte de proteínas para compartimentos celulares, direcionando substratos para a proteólise, auxiliam no enovelamento protéico, inclusive de proteínas parcialmente enoveladas (intermediário), e ainda são capazes de desagregar agregados proteicos (Hartl e col., 2011).

INTRODUÇÃO

As HSPs são classificadas de acordo com a interação com a proteína cliente e a massa molecular do seu monômero, mesmo que muitas sejam encontradas na forma de oligômeros, nessas cinco famílias: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e sHSP (s = small) (Fink, 1999; Borges e Ramos, 2005), sendo classificadas de acordo com sua função, dependendo do tipo de interação que ocorre com as proteínas clientes, em holdases, foldases e desagregases (Figura 4).

Chaperonas do tipo holdases são proteínas independentes de ATP, que são capazes de ligar em proteínas desenoveladas ou parcialmente enoveladas, mas não são capazes de renovelá-las até o seu estado nativo. Assim, elas entregam proteínas clientes para as foldases, as quais utilizam a energia da hidrólise do ATP e renovelam as proteínas clientes (Lee e col., 1997; Rudiger e col., 2001). O processo de transferência do substrato da holdase para a foldase ainda não está bem estabelecido (Lee e Vierling, 2000). As desagregases são chaperonas dependentes de ATP que conseguem desfazer um agregado proteico e transferir a proteína parcialmente enovelada para uma holdase e/ou foldase (Glover e Lindquist, 1998).

Dessa forma, as cinco principais famílias de chaperonas diferem em estrutura e função. As HSP100 são normalmente encontradas como hexâmeros e tem função de holdases e desagregases. As HSP90 geralmente são diméricas, as HSP70 monoméricas, e as HSP60 formam heptâmeros duplos, porém, todas são funcionalmente foldases (Cagliari e col., 2011; Gava e Ramos, 2009; Tiroli-Cepeda e col., 2014; Fink, 1999; Borges e Ramos, 2005) e as sHSP são encontradas como grandes oligômeros e apresentam função holdase (Tiroli e Ramos, 2007; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010).



Figura 4. Esquema de atuação das chaperonas moleculares no controle de qualidade celular. Estão representadas as cinco principais famílias de chaperonas moleculares (roxo), as quais estão envolvidas na translocação e transporte de proteínas para compartimentos celulares, direcionando substratos para a proteólise, auxiliando no enovelamento protéico, inclusive de proteínas parcialmente enoveladas (intermediário), e ainda são capazes de desagregar agregados proteicos (modificado de Hartl e col., 2011).

1.4. Small heat shock proteins

A família das 'small heat shock proteins' (smHSP ou sHSP) são chaperonas moleculares independentes de ATP, que se ligam em proteínas parcialmente desenoveladas, mas não são capazes de renovelá-las até o seu estado nativo, e por isso, recebem a denominação de 'holdases' (Lee e col., 1997; Rudiger e col., 2001). Elas agem na prevenção da formação de agregados, ligando regiões hidrofóbicas expostas devido ao aumento da temperatura, por exemplo. Após a célula restabelecer as condições normais, o substrato é reenovelado pela ação das chaperonas do tipo 'foldases', que utilizam a energia da hidrólise do ATP. O processo de transferência do substrato da holdase para a foldase ainda não está bem estabelecido (Lee e Vierling, 2000).

As sHSPs são altamente expressas em condições de estresse térmico (Li e col., 2010), podendo impedir eficientemente a morte de bactérias *E.coli* em temperaturas elevadas (Van Montfort e col., 2001), mas também auxiliam no renovelamento de enzimas desnaturadas mesmo a temperatura ambiente (25°C) (Kim e col., 2003). São altamente induzidas em diversas condições de estresses, tais como aqueles causados por oxidação, metais pesados, patógenos (Li e col., 2010), e previnem a agregação de proteínas clientes sob estresse químico (Kim e col., 2003).

Essas proteínas estão envolvidas na regulação do estado redox (Arrigo, 2013), possuem atividade anti-apoptótica (Acunzo e col., 2012), regulam a proliferação celular (Yang e col., 2006) estabilizam o citoesqueleto (Wettstein e col., 2012) e provavelmente estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares vitais. Por serem tão importantes em variados processos celulares, não é surpreendente que, mutações nessas proteínas, mesmo que em apenas um dos aminoácidos, estejam relacionadas com diversas patologias congênitas, como, cataratas (Datskevich e col., 2012), miopatias (Benndorf e col., 2014), neuropatia motora distal hereditária e doença de Charcot-Marie-Tooth (Muranova e col., 2015). Além disso, as sHSPs são amplamente expressas em várias doenças neurodegenerativas como, câncer, isquemia, esclerose múltipla entre outras, fato este que torna as sHSPs alvos potenciais para abordagens terapêuticas e biotecnológicas (Clark e Muchowski, 2000).

INTRODUÇÃO

As sHSPs são nomeadas e caracterizadas por possuírem estruturas monoméricas com baixa massa molecular, cujas massas variam de 12 a 42 kDa (Basha e col., 2012; Horwitz, 1999; Van Montfort e col., 2001), sendo conhecidas como α Cs, ACD (α -crystallin domain), pois essa família de chaperona foi relatada pela proteína da lente dos olhos dos vertebrados (α -cristalino) há quase 25 anos (Horwitz, 1992; Jakob e col., 1993). Apresentam estrutura primária (Figura 5) composta por três domínios, um domínio central nomeado como α -cristalino (ACD) localizado entre o domínio N-terminal e o domínio C-terminal que são bastante variáveis (Waters e col., 1996; de Jong e col., 1998).

Dentre esses domínios o α -cristalino é o mais conservado nessa família, possuindo uma sequência de aproximadamente 90 aminoácidos, sendo este domínio o responsável pela caracterização das proteínas na família das sHSP (Van Montfort, 2001). O domínio α -cristalino apresenta estrutura secundária predominantemente folha- β , e interage em alguns sítios específicos formando oligômeros, que podem ser homo- ou hetero-oligômeros, formados de uma ou diversas sHSP. A formação e estrutura desses oligômeros depende da sequência dos domínios N- e C- terminal de cada sHSP (Gusev e col., 2002).

O domínio C-terminal varia em tamanho e na composição dos aminoácidos, geralmente apresenta em torno de 20 aminoácidos, sendo estruturalmente desordenado (Basha e col., 2012; Bagneris e col., 2009). O domínio N-terminal apresenta em torno de 55 aminoácidos, e tem sido mapeado como o sítio de ligação ao substrato das sHSP, apresentando estrutura secundária bastante variável, sendo encontrado como α -hélice (Basha e col., 2012; Van Montfort e col., 2001), como folha- β (Kim e col., 1998) e ainda intrinsecamente desordenado (Mani e col., 2015). Além disso, estudos relatam dados estruturais e biofísicos das interações das sHSPs com seus substratos, descrevendo os domínios N- e C-terminais, altamente divergentes, aparentemente determinantes para a função específica de cada sHSP (Van Montfort, 2001).



Figura 5. Estrutura primária básica das sHSPs. N-Terminal variável (vermelho), α -cristalino (verde) altamente conservado nessas famílias, formado principalmente de folhas- β , e C-Terminal (azul) bastante variável. Estrutura tridimensional do monômero da HSP16.9 (PDB 1GME).

Uma das características mais estudada dessa família de chaperonas é sua propensão em formar grandes estruturas multiméricas, pois estas proteínas são encontradas na sua forma nativa sempre como oligômeros que podem conter de 12 a 48 subunidades, com massa molecular variando de 200 a 800 kDa (Basha e col., 2012; Kim e col., 1998; Haley e col., 1998; Haslbeck e col., 1999; Basha e col., 2012; Berengian e col., 1997). Estudos mostram que o domínio α -cristalino é o responsável pela interação entre os monômeros, formando dímeros, que são os blocos básicos na formação dos oligômeros. E ainda que, o domínio C-terminal pode interagir com o α-cristalino do mesmo monômero ou com o de outra subunidade possibilitando a formação dos dímeros e oligômeros (Berengian e col., 1997; Bagneris e col., 2009; Hochberg e Benesch, 2014). A grande maioria das sHSPs que possuem estrutura resolvida (exemplos na Figura 6) foram encontradas como grande oligômeros em solução, os quais diferem em número de subunidades que os forma e estrutura secundária dos domínios C- e N-terminal (Van Montfort e col., 2001; Kim e col., 1998; Fleckenstein e col., 2015) mas também há alguns relatos de sHSP encontradas como dímeros em solução, como a Tsp36 de tênia (Styamler e col., 2005) e a HspB6 (Hsp20) de rato (Bagneris e col., 2009).

O estado oligomérico das sHSPs é fundamental para sua função chaperona, inclusive, estudos recentes demonstram que modificações no domínio N-terminal afetam a estrutura quaternária e consequentemente a função chaperonas das sHSPs (Mani e col., 2015). A maioria das sHSP tem sua atividade chaperona aumentada com aumento de temperatura, que pode estar relacionada com a viabilidade de regiões hidrofóbicas, o que propicia um aumento das interações hidrofóbicas entre as chaperonas e suas proteínas clientes (Lee e col., 1997). Esta propriedade foi observada para diversas sHSP, como a HSP18 de *Mycobacterium leprae* (Nandi e col., 2015), a HSP16.5 de Methanococcus jannaschii (Kim e col., 2003), a HSP16.3 de Mycobacterium tuberculoses (Fu e Chang, 2004), a HSP26 de Saccharomyces cerevisae (HasIbeck e col., 1999), α -crystalin (Das e Surewicz, 1995) e HSP27 (Lelj-Garolla e Mauk, 2006) humanas, HSP17.2 e HSP17.9 de canade-açúcar (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010), HSP16.9 de trigo (Van Montfort e col., 2001) entre outras.



Figura 6. Diversidade nas estruturas oligoméricas das sHSPs. A. HSP16.9 de *Tricticum aestivum*, composta por 12 monômeros (PDB 1GME), **B.** HSP16.5 de *Methanocaldococcus jannaschii*, composta por 24 monômeros (PDB 1SHS), **C.** Sip1 de *Caenorhabditis elegans*, composta por 32 monômeros (PDB 4YDZ). D. Tsp36 de *Taenia saginata*, dimérica, (PDB 2BOL).

Em alguns casos o aumento da atividade está relacionado com a dissociação do oligômero, como visto para as HSP17.2 e HSP17.9 de cana-de-açúcar (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010), HSP16.9 de trigo (Van Montfort e col., 2001) HSP26 de Saccharomyces cerevisae (Haslbeck e col., 1999) e α -crystalin (Das e Surewicz, 1995), mas também pode estar relacionado com a associação do oligômero, como observado para a proteína humana HSP27 (Lelj-Garolla e Mauk, 2006), porém nem todas as sHSP sofrem alterações conformacionais com aumento de temperatura (Nandi e col., 2015).

Além das dissociações dos oligômeros sob estresse térmico, algumas sHSP sofrem dissociação estrutural em meio ácido, e nessas condições sua atividade chaperona também é aumentada, provavelmente porque em menores pHs a região N-terminal pode estar mais acessível, facilitando a interação com proteínas clientes (Fleckenstein e col., 2015). Entretanto, em alguns casos as dissociações dos oligômeros podem ser prejudiciais para sHSP, como visto por Nandi e col., que na presença de altas concentrações de NaCl, ou seja, quando as interações eletrostáticas são enfraquecidas, o tamanho oligomérico, a estabilidade estrutural e a atividade chaperona são diminuídos (Nandi e col., 2015). Todos estes tipos de estresses mencionados, principalmente o estresse térmico, são facilmente sofridos pelas plantas, e prejudicam significativamente o crescimento e a fertilidade, o que justifica o interesse e a importância em estudar sHSP de plantas (Vierling, 1999).

1.5. sHSPs de plantas

Por estarem mais sujeitas ao estresse térmico, as plantas em geral expressam diversas sHSPs, e essas proteínas chegam a perfazer 2% do total de proteínas presente nas folhas nestas situações, evidenciando sua importância para o desenvolvimento à termotolerância (Vierling, 1999). Além disso, as plantas expressam muito mais sHSPs do que os demais eucariotos (Kriehuber e col., 2010), sendo que, nesse organismo a maioria das sHSPs não são sintetizadas em resposta ao estresse hídrico, anaeróbico, estresse por baixas temperaturas (hipotermia) ou por sais, indicando que a alta expressão dessas proteínas ocorre em resposta à mudanças específicas (Vierling, 1991).

A complexidade das sHSPs em plantas pode ser distinguida dos demais organismos, pelo fato de que nas plantas é possível separar essas proteínas em subfamílias, ou classes (Waters e Vierling, 1999). Essas subfamílias são classificadas de acordo com as sequências do domínio α-cristalino, pela localização nos distintos compartimentos celulares e pela função chaperona (Scharf e col., 2001; Vierling, 1999). Dessa forma existem três subfamílias (CI, CII, CIII) localizadas no compartimento citoplasmático / nuclear. Dentres essas, sabe-se que a CI é geralmente a maior subfamília de sHSP encontradas em plantas, e que a CIII, é principalmente nuclear (Siddique e col., 2008). E ainda, há subfamílias em organelas, sendo a classe IV: plastídeos (P), por exemplo, o cloroplasto (cp), a classe V: retículo endoplasmático (ER) e classe VI: mitocôndria (M) (Vierling, 1991; Lenne e col., 1995; LaFayette e col., 1996). Como mencionado, essas classes apresentam distintas funções, sendo que as sHSPs mitocondriais estão geralmente envolvidas na proteção de proteínas localizadas nessa organela que sofrem agregação com o aumento da temperatura (Chou e col., 1989; Liu e Shono, 1999; Sanmiya e col., 2004; Siddique e col., 2008), enguanto as sHSP de cloroplasto são capazes de proteger o fotosistema II sob condições de estresse (Neta-Sharir e col., 2005; Guo e col., 2007).

As sHSPs de diferentes classes, quando comparadas entre si, apresentam baixa homologia. Entretanto, proteínas dentro da mesma classe, mesmo em organismos distintos, possuem alta identidade (Vierling, 1999). Pelo menos duas das famílias citosólicas e uma de cloroplasto tem ortólogos em musgos, indicando que as sHSPs surgiram há mais de 400 milhões de anos (Basha e col., 2012).

Devido à grande importância de estudar proteínas de cana-de-açúcar, pela sua ampla aplicação biotecnológica, nosso grupo analisou os dados obtidos no Programa SUCEST (sequenciamento de ESTs de cana-de-açúcar) em busca de chaperonas moleculares, no qual aproximadamente 5% das ESTs anotadas como chaperonas pertenciam à família das sHSPs sendo que, aproximadamente 60% eram da classe I, motivo este que levou o grupo a primeiramente estudar duas sHSPs dessa classe nomeadas como SsHSP17.2 e SsHSP17.9 (Tiroli e Ramos, 2007; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010). Nestes estudos, ambas as proteínas citoplasmáticas foram clonadas, purificadas e caracterizadas estrutural e funcionalmente, sendo obtidas como dodecâmeros em solução, com massas

INTRODUÇÃO

moleculares e raio equivalente, os quais se dissociam em dímeros quando submetidos a temperaturas elevadas, e esta dissociação propicia um aumento da atividade chaperona. Entretanto, essas proteínas apresentaram função chaperona diferenciada, tendo a SsHSP17.9 maior atividade perante os substratos modelo citrato sintase e malato desidrogenase, enquanto a SsHSP17.2 teve maior atividade perante o substrato luciferase (Tiroli e Ramos, 2007; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010). Baseado nos bons resultados obtidos para as sHSP citosólicas, fomos motivados a estudar outras sHSPs, do mesmo organismo, mas de classes diferentes, a fim de compreender o motivo pelo qual as plantas expressam diversos tipos de sHSPs. Embora as sHSP de diferentes organismos já tenham sidos amplamente estudadas, nosso grupo de pesquisa é pioneiro no estudo dessas proteínas de cana-de-açúcar, devido ao seu alto interesse biotecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Ampliar os conhecimentos sobre SsHSP de organelas através de estudos bioquímicos e biofísicos de duas sHSP de cana-de-açúcar, sendo uma mitocondrial, nomeada SsHSP21.5-mt, e outra de cloroplasto, nomeada SsHSP22.3–cp.

2.2. Objetivos específicos

1. Montar estratégia para clonagem dos genes em vetores de expressão.

2. Expressar e purificar as proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp.

3. Caracterizar o estado conformacional dessas proteínas utilizando dicroísmo circular (CD), emissão de fluorescência intrínseca, gel filtração (GF), GF acoplada a espalhamento de luz (SEC-MALS) e espalhamento de luz dinâmico (DLS).

4. Investigar o efeito da temperatura na conformação e função.

5. Caracterizar a função chaperona, *in vitro*, através de experimentos de prevenção da agregação de algumas proteínas substrato-modelo e de proteínas provenientes do extrato solúvel de bactérias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise de similaridade de sequência

Com a finalidade de confirmar que as seguências de EST utilizadas neste trabalho, pertenciam de fato a chaperonas moleculares da família das 'small', realizamos análises de similaridade entre algumas das seguências de aminoácidos de sHSP de plantas já depositadas no banco de dados (NCBI: www.ncbi.gov.br) com as sHSP de cana-de-acúcar em estudo. Após os alinhamentos, construímos uma árvore de similaridade com as seguências das proteínas citoplasmáticas: SsHSP17.2 (CA119805 - cana-de-açúcar), SsHSP17.9 (CA121219 - cana-deaçúcar), TaHSP16.9 (Q41560 - trigo), AtHSP17.6 (X16076 - Arabidopsis thaliana), ZmHSP18 (QO8275 – milho), GmHSP17.5 (M11395 – soja), PsHSP17.1 (P19242 – ervilha); das proteínas mitocondriais: AtHSP23.6 (U72958 - A. thaliana), TaHSP23.5 (104107 - trigo), ZmHSP23.8 (AF035460 - milho), GmHSP23.9 (U21722 - soja) e PsHSP22 (X86222 – ervilha); e das proteínas de cloroplasto: AtHSP25.3 (P31170 -A. thaliana), TaHSP26.6 (QO0445 - trigo), PsHSP21 (PO9886 - ervilha) e GmHSP22 (PO9887). Como grupo externo utilizamos as proteínas TgHSP21 (AY756061 - Toxoplasma gondii) citoplasmática, e a TgHSP28 (AY650281 - T. gondii) mitocondrial. O software ClustalW 2.1 foi utilizado para realizar os alinhamentos dessas sequências (Larkin e col., 2007) e o software The Molecular Genetics Analysis (MEGA) versão 4.0 foi utilizado para obtenção das matrizes de similaridade e montagem dos cladogramas (Kumar e col., 2009).

3.2. Estratégia para obtenção dos clones

As sequências de mRNA consenso (Figura 7) utilizadas neste projeto, foram obtidas a partir das sequências de EST, provenientes do banco de dados do SUCEST, anotadas como sHSP de cana-de-açúcar. Ambas as sequências que codificam as proteínas em estudo foram clonadas no vetor pET28a (Figura 8), entre os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI (5'-GGATCC - 3') e *Eco*RI (5'- GAATTC - 3'), as quais foram escolhidas principalmente por não clivarem as sequências de interesse.
SsHSP21.5-mt

SsHSP22.3-cp

Figura 7. Sequências de mRNA consenso codificantes das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp de cana-de-açúcar. Estão destacados na figura a sequência de nucleotídeos que codificam as proteínas (preto), os sítios de restrição das enzimas utilizadas na estratégia de clonagem, *Bam*HI (vermelho), *Eco*RI (verde), e o 'stop codon' adicionado (azul).

O plasmídeo pET28a (Figura 8) foi escolhido pois os vetores do sistema pET são controlados pelo promotor T7 que tem alta especificidade pela T7 RNA polimerase, assim, a expressão do gene de interesse só acontecerá quando esta enzima do vírus estiver presente. O gene que codifica a T7 RNA polimerase e o gene de interesse normalmente encontram-se inibidos pelo repressor lac. Após a adição do indutor IPTG (isopropil β-D-tiogalactosídeo) análogo a lactose, o repressor se desliga dos dois operadores, tornando possível a transcrição da T7 RNA polimerase e, consequentemente, se inicia a transcrição do gene de interesse (Studier e col., 1990). Outra vantagem deste vetor é a presença de uma sequência de nucleotídeos que codifica uma cauda de poli-histidina na região N-terminal, cuja sequência de aminoácidos não tem estrutura terciária, não interfere na função proteica e facilita a purificação de proteínas. O pET28a apresenta ainda um sítio de clivagem para a protease trombina, o que possibilita a remoção dessa cauda, se necessário.

Para verificar a existência de códons raros na sequência de interesse, ou seja, códons de baixa frequência, realizamos uma análise com auxílio do software Rare Codon Analysis Tool (GenScript), e todos os códons raros existentes foram substituídos por códons de expressão eficiente em *E.coli*. A partir das estratégias descritas acima, os clones utilizados neste projeto para a expressão das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp foram sintetizados pela empresa Epochlifescience. Após a obtenção dos plasmídeos, foi realizado um sequenciamento confirmatório das sequências de interesse. Este seqüenciamento, realizado pela empresa Helixxa, foi feito com os oligonucleotídeos presentes no pET28a, nos sentido 'forward' e 'reverse' (T7 pormoter primer e T7 terminator primer), cuja sequências estão apresentadas abaixo:

T7 promotor (forward): 5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3' T7 terminator (reverse): 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3'

MATERIAIS E MÉTODOS



Figura 8. Mapa da região de interesse do vetor utilizado pET28a Estão destacados (com retângulos) a posição dos sítios das enzimas de restrição utilizadas na estratégia de clonagem, *Bam*HI e *Eco*RI, e a posição dos primers T7, das His-tag, do operador lac e do sítio para trombina (em negrito). (modificado de Novagen).

3.3. Linhagens celulares

Para manutenção e multiplicação dos vetores plasmidiais, utilizamos as cepas de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) (Hanahan, 1983).

Para expressão das proteínas recombinantes utilizamos as cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) *(Stratagene),* pois essa linhagem possui baixos níveis de produção de proteases, evitando a degradação das proteínas-alvo. Esta linhagem possui ainda o gene DE3, responsável pela síntese da T7 RNA polimerase (Studier e Moffatt, 1986).

3.4. Transformação e expressão

As bactérias da linhagem BL21 (DE3) foram transformadas, ou seja, receberam os vetores plasmidiais contendo o DNA codificante para a proteína de interesse. Essa transformação ocorreu por procedimento de choque térmico (Sambrook e Russell, 2001). Após este procedimento, semeou-se 100 μL da cultura de bactérias em uma placa de cultura contendo meio LB sólido e o antibiótico específico (canamicina) para seleção das células, assim, apenas as células contendo o vetor de interesse crescem na placa. Para crescimento das células estas placas foram incubadas por aproximadamente 15 h a 37°C. Para o procedimento de expressão, uma colônia isolada foi solubilizada em meio LB, e incubada por 15 h a 37°C, sob agitação constante (200 rpm), até atingir Abs₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. Após este período adicionamos o indutor IPTG, e expressão das proteínas de interesse foram induzidas por um período de 4 h nas temperaturas de 20°C, 30°C e 37°C sob agitação constante (200 rpm). Posteriormente, essas culturas foram centrifugadas por 15 min (4000 rpm / 4°C), e os precipitados obtidos foram armazenados a -20°C.

3.5. Lise bacteriana

Os precipitados das culturas, contendo as bactérias que expressaram as proteínas recombinantes, foram lisados em um sonicador (Sonicator – Misonix – Ultrasonic Liquid Process – Model S-4000) pelo seguinte processo:

1°- ao precipitado descongelado, em banho de gelo, foi adicionado tampão de lise (40 ml de tampão por litro de indução) contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, DNAse 5u e lisozima 30 µg / mL;

2°- a suspensão foi sonicada por 2 minutos, sendo: um pulso de 5 segundos, com intervalos de 1 minuto entre cada sonicação (30 Watts);

Após o procedimento, a suspensão foi centrifugada (13.000 rpm / 50 min / 4°C). As frações correspondentes ao material solúvel e precipitado foram analisadas por gel de poliacrilamida (ver item 3.8).

3.6. Meios de cultura

Para o crescimento das cepas bacterianas em suspensão foi utilizado o meio de cultura LB (Luria-Bertani) que contem: 10 g / L de triptona; 5 g / L de extrato de levedura e 10 g / L de NaCl, preparados em H₂O desmineralizada, com pH 7,0, autoclavados (121°C / 20 min). Para o crescimento em meio sólido (placas de cultura), foi utilizado LB suplementado com ágar (1,5 %), autoclavado (121°C / 20 min) e distribuído 15 mL por placa em câmara de fluxo laminar.

Para crescimento das bactérias com os vetores de interesse, acrescenta-se ao meio estéril o antibiótico especifico, garantindo seleção e manutenção das células transformadas. As cepas utilizadas *DH5α e BL21(DE3)* não possuem naturalmente resistência à antibiótico, mas o vetor pET28a confere resistência ao antibiótico canamicina, o qual foi adicionado ao meio na concentração final de 30 µg / mL. Nos procedimentos de transformação utilizamos o meio SOC (20 g / L de peptona; 5 g / L de extrato de levedura; 0,5 g / L de NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,01 mmol / L de MgCl₂; 0,02 mmol / L de glicose).

3.7. Purificação das proteínas recombinantes

Proteínas podem ser purificadas baseadas nas diferenças de solubilidade, tamanho, carga e afinidade de ligação específica. As proteínas em estudo foram clonadas em vetor pET28a que possui uma seqüência de DNA que codifica para 20 resíduos de aminoácidos (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH) contendo uma sequência de 6 resíduos de histidinas seguidas, comumente chamada de cauda de polihistidina. A função dessa cauda é facilitar o processo de purificação das proteínas através da cromatografia de afinidade.

3.7.1. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade baseia-se no fato de que algumas proteínas possuem afinidade diferencial por moléculas ou grupamentos químicos específicos (por exemplo, íons metálicos), que podem ser mobilizados na matriz sólida (resina) de uma coluna cromatográfica. Esta técnica é uma das mais utilizadas para purificação protéica, pois as proteínas possuem certos resíduos de aminoácidos, como imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais podem doar elétrons para o íon metálico adsorvido na matriz da coluna, retendo assim, essas proteínas na coluna. Para eluir as proteínas que interagem com a matriz da coluna, é necessário aplicar eluentes contendo reagentes químicos capazes de competir com os resíduos de aminoácidos pela ligação ao metal (Porath, 1992).

Neste trabalho foi utilizada uma coluna cromatográfica contendo o metal Ni²⁺ mobilizado na resina. Como as proteínas em estudo foram expressas contendo uma cauda de poli-histidina (6 histidinas seguidas), o anel imidazol dessas histidinas, por ligações de coordenação com o íon metálico Ni²⁺, reteve a proteína na coluna. Para eluir essas proteínas da coluna, foram utilizadas altas concentrações de imidazol. Nesta etapa cromatográfica utilizamos para ambas as proteínas os tampões: tampão A: Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 e tampão B: Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, imidazol 500 mM, pH 7,5. A coluna cromatográfica utilizada foi a 'HisTrap affinity columns (Sepharose – 5 mL)' da GE Lifescience.

3.7.2. Cromatografia de gel filtração

A cromatografia de gel filtração, também conhecida como cromatografia de exclusão de molecular, é uma técnica cromatográfica, na qual, as proteínas podem ser separadas com base na suas massas e tamanhos. A coluna cromatográfica utilizada nesta técnica é constituída por uma resina (matriz), como fase estacionária, a base de polímeros (dextran, agarose e poliacrilamida). Estas resinas apresentam pequenas esferas porosas que, ao aplicar uma solução protéica pela coluna, as

moléculas de proteínas pequenas migram pelos poros dessas esferas, migração esta que resulta em um maior caminho percorrido por estas proteínas, aumentado o tempo e volume de eluição. Enquanto que as proteínas maiores passam diretamente pela coluna, sem entrar nos pequenos poros da resina, e, portanto são eluídas primeiramente (Barth e col., 1994). A coluna cromatográfica utilizada foi a XK 26/60 de 320 mL, composta pela resina Superdex 200 (GE Lifesciences). Neste procedimento para ambas as proteínas utilizamos o tampão Tris-HCI 25 mM, NaCI 100 mM, pH 7,5, com fluxo de eluição de 2 mL / min.

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Em cada procedimento realizado analisamos pela técnica de eletroforese as amostras em gel de poliacrilamida. Esta técnica baseia-se nos princípios que, uma molécula com carga elétrica se move em um campo elétrico, porém, a velocidade e a distância de deslocamento na eletroforese dependem da força do campo elétrico, da carga e da forma da molécula. Proteínas podem ser separadas de acordo com suas massas por gel de poliacrilamida por eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), detergente capaz de desnaturar e se ligar nas proteínas desnaturadas numa razão constante, fazendo com que todas as proteínas fiquem com a mesma proporção carga/massa, sendo então separadas apenas por suas massas. (Stryer, 2004; Laemmli, 1970)

As amostras foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCI 50 mmol / L pH 6,8; DTT 100 mmol / L; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%), e submetidas, com um padrão de massa molecular, à eletroforese em SDS-PAGE, em cuba eletroforética Mini-Protean (Bio-Rad) com gel de empacotamento 5%, gel de separação 12%, e voltagem constante de 200 V por ~45 min. Os géis foram corados por 20 min em solução etanol:ácido acético:água 5 : 1 : 15 (v : v : v) e Coomassie Brilliant Blue R (Bio-Rad) 0,25% descorado е em ácido acético:etanol:água 3 : 2 : 35 (v : v : v).

3.9. Determinação da concentração de proteínas

O método utilizado para determinar a concentração das proteínas puras em solução foi o Método de Edelhoch (Edelhoch, 1967) modificado por Pace (Pace e col., 1995), método espectroscópico de absorbância (A). Os coeficientes de absorbância molar das proteínas foram calculados em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5) e Gdn-Cl 6 M, utilizando a seguinte equação:

 $\mathcal{E}_{280}(\text{proteina}) = (\mathcal{E}_{Trp.} \text{ nTrp}) + (\mathcal{E}_{Tyr.} \text{ nTyr}) + (\mathcal{E}_{S-S.} \text{ ns-s})$

Onde \mathcal{E}_{280} é o coeficiente de absorbância molar ($M^{-1}cm^{-1}$) da proteína de interesse a 280 nm; n_{Trp} , n_{Tyr} e n_{s-s} referem-se ao número de triptofanos, tirosinas e cistinas da proteína, respectivamente; \mathcal{E}_{Trp} , \mathcal{E}_{Tyr} e \mathcal{E}_{s-s} são os coeficientes de absorbância molar, cujos valores a 280 nm são 5500, 1490 e 125 $M^{-1}cm^{-1}$, respectivamente.

Com o valor de \mathcal{E}_{280} medido, calculamos as concentrações das proteínas em função das absorbâncias medidas, pois absorbância é uma função linear da concentração molar (C) de acordo com a lei Beer-Lambeert:

$$A = E \times I \times C$$

onde A é a absorbância, E o coeficiente de absorbância molar (mol / L⁻¹.cm⁻¹), I o caminho ótico (cm), e C a concentração molar (mol / L) (Pace e col., 1995).

3.10. Medidas de emissão de fluorescência

Dentre os tipos de aminoácidos que compõem as proteínas, alguns resíduos como, a tirosina (Y), fenilalanina (F) e triptofano (W), são intrinsecamente fluorescentes. O sinal de fluorescência do W é mais significativo, e seu espectro apresenta sinal de intensidade máxima de fluorescência com comprimentos de onda (λ) diferentes de acordo com a polaridade do meio que este resíduo se encontra. Quando o W está localizado no interior das proteínas enoveladas, ou seja, não exposto ao solvente, este resíduo fluoresce em λ menores (~320nm), porém quando este resíduo está na superfície protéica, ou seja, em ambiente polar, fluoresce em λ maiores (~350nm) (Lakowicz, 1999). Como a maioria das proteínas possui poucos

resíduos W, esta característica torna a fluorescência do W uma sonda para avaliar estrutura protéica (Millar, 1996).

Os experimentos de fluorescência foram realizados em um fluorímetro (Aminco Bowman Series2 – Luminescence Spectrometer) cubetas de quartzo de 1 cm x 1 cm de caminho ótico. Os espectros de emissão de fluorescência foram monitorados utilizando-se λ de excitação a 295 nm e de emissão a 330 nm, no intervalo de 300 a 400 nm. Foram utilizadas soluções de proteínas nas concentrações de 5 a 10 μ M, solubilizadas em tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. Os dados de emissão de fluorescência obtidos foram analisados pelo comprimento de onda máximo (λ máx) e pelo centro de massa espectral ($<\lambda >$), como descrito pela equação:

$$<\lambda>=(\Sigma\lambda_{i}F_{i})$$

$$(\Sigma F_{i})$$

Onde λ_i corresponde a cada $\lambda \in F_i$ à intensidade de fluorescência em λ_i .

3.11. Caracterização do estado oligomérico

As chaperonas da família das small – sHSP, quando encontradas na sua forma nativa, são sempre organizadas em oligômeros que variam de 8 a 32 subunidades (Kim e col., 1998; Haley e col., 1998; Haslbeck e col., 1999). Portanto, para caracterizar o estado oligomérico das proteínas em estudo, utilizamos diversas técnicas como: gel filtração analítica, SECMALS e DLS, pelas quais foram possíveis determinar raio de Stokes (Rs), a massa molecular e coeficiente de difusão (D) das proteínas em solução, respectivamente.

3.11.1. Gel filtração analítica

Para caracterização do raio de Stokes (Rs) das proteínas estudas, utilizamos a técnica de cromatografia de gel filtração analítica, que separa as proteínas de acordo com seu tamanho molecular, o qual, assim como o formato das proteínas influencia o volume de eluição (Ve) das proteínas. Utilizamos cinco proteínas de massa moleculares e Rs conhecidas utilizadas como padrão, sendo todas de formatos esféricos (Tabela 1). Essas proteínas foram selecionadas com o propósito de abranger toda a resolução da coluna cromatográfica utilizada, ou seja, para proteínas de até 660 kDa.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas das proteínas monoméricas utilizadas como padrões no experimento de gel filtração analítica.

Proteínas	MM (kDa)	Rs (Å)
ovoalbumina	43	30,5
conalbumina	75	47,0
aldolase	158	48,1
ferritina	440	61,0
tiroglobulina	669	85,0

Para o cálculo do Rs, primeiramente calculamos os coeficientes de partição (Kav) para as proteínas padrão e para as proteínas de interesse, segundo a fórmula:

onde Ve é o volume de eluição da proteína, Vo é o volume morto da coluna e Vc é o volume total da coluna. Com os valores de Kav de cada proteína padrão foi possível construir uma curva de calibração de Rs versus (-log Kav)^{1/2}, e assim estimar o Rs das proteínas em estudo (Tiroli e Ramos, 2007). Nos experimentos utilizamos a coluna de gel filtração analítica Tricorn Superdex 200 10/300 GL de 24 mL (GE LifeSciences) conectada ao sistema Äkta FPLC (GE LifeSciences), que monitorou absorbância a 280 nm. Foram utilizadas soluções protéicas na concentração de aproximadamente 1 mg / mL, solubilizadas no tampão Tris-HCI 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. Esta técnica também foi utilizada para avaliar o estado oligomérico das chaperonas e para determinar se estas proteínas se dissociavam em diferentes pHs. Trabalhamos com soluções protéicas em concentrações constantes, estando a SsHSP21.5-mt a 34 μ M e a SsHSP22.3-cp a 38 μ M, em soluções tamponantes com diferentes pHs (5,5 / 6,5 / 7,5 / 8,0), sempre em tampão Tris-HCI 25 mM e NaCl 100 mM.

3.11.2. Cromatografia de exclusão molecular (SEC) acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz (MALS)

Para caracterizar o estado oligomérico e a massa molecular das proteínas em estudo, aplicamos as amostras proteicas em uma coluna cromatográfica de exclusão molecular - SEC (descrito no item 3.7.2) acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz (MALS – Mini Dawn TREOS - Wyatt) e a um detector de índice de refração (IR – Optlab T-rEX - Wyatt).

Espalhamento de luz pode ser visto como uma sequência muito rápida de absorção de fótons mediante a iluminação de uma amostra e emissão quase instantânea de outro fóton. Durante o espalhamento de luz a energia absorvida pode ser liberada a partir de estados virtuais dos fótons em dois diferentes caminhos: 1. Se o fóton espalhado tiver energia/freqüência diferente do fóton absorvido (espalhamento inelástico ou Raman); 2. Se o fóton espalhado tiver a mesma energia/freqüência que o fóton absorvido (espalhamento elástico). O espalhamento de luz elástico ocorre em quase todos os fótons dispersos, sendo conhecido como Dispersão Rayleigh para dispersores menores que o comprimento de onda (λ) da luz incidente, e Dispersão Mie para dispersores na mesma faixa do λ ou maiores (Zolls e col., 2012). Nos equipamentos de espalhamento de luz elástico, como o MALS, ocorre esplhamento de luz elástico, ou Dispersão de Rayleigh (Wyatt, 1993; Zolls e col., 2012).

As técnicas de espalhamento de luz apresentam dependência angular, descrita em três princípios:

 A quantidade de luz espalhada a 0° é diretamente proporcional ao produto de massa molecular (M) e concentração molar(C).

Iespalhada α M.C. $(dn/dc)^2$

- 2. A variação da luz espalhada com o ângulo de espalhamento é proporcional ao tamanho médio da molécula (Rg).
- A razão da flutuação do espalhamento de luz é proporcional ao coeficiente de difusão (D) da molécula (item 3.12.).

Portanto, pelo princípio de espalhamento de luz, se o incremento do índice de refração (dn/dc) e a concentração da amostra são conhecidos, a medida do espalhamento de luz diretamente determinará a massa molecular (Wyatt, 1993).

No equipamento MALS a luz espalhada é medida por múltiplos ângulos para obter informações detalhadas da massa molecular especialmente para macromoléculas, cujo espalhamento não é isotrópico (Zolls e col., 2012).

A grande vantagem de combinar o MALS com cromatografia de separação é a possibilidade de calcular a massa molecular e o tamanho (Rg) de cada espécie individualmente. Com estes detectores esta técnica analisa as proteínas separadas de acordo com o seu tamanho, e através das informações da intensidade da luz espalhada, do índice de refração medido e da concentração conhecida da amostra, determina a massa molecular da proteína (Wyatt, 1993; Batista e col., 2015).

A normalização, integração e tratamento dos dados de espalhamento de luz e de absorbância a 280 nm foram realizadas com auxílio do programa ASTRA (Wyatt Technologies). Foram utilizadas soluções proteicas na concentração de aproximadamente 2 mg / mL, previamente centrifugadas (14.000 rpm / 15 min / 4ºC), solubilizadas no tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5.

3.12. Medidas de espalhamento de luz dinâmica (DLS)

A dispersão de luz dinâmica (DLS) é uma técnica que pode ser aplicada à determinação de tamanhos ou distribuição de proteínas, micelas, nanopartículas, polímeros, emulsões, entre outros. É uma técnica de dispersão de luz adequada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico de partículas com dimensões na ordem dos nanômetros. A DLS mede a intensidade de flutuação do movimento Browniano das partículas e relaciona-o com o tamanho das mesmas, através da equação de Stokes-Einstein, sendo determinado: o coeficiente de difusão translacional (D), o diâmetro hidrodinâmico, d (H). O coeficiente de difusão translacional está dependente do tamanho da partícula, da estrutura da superfície, concentração e tipo de íons do meio, o que afeta a velocidade de difusão das partículas. (Jachimska e col., 2008; Batista e col., 2015).

Os experimentos foram realizados no equipamento DynaPro-MS800, monitorados a 25ºC. A partir do coeficiente de difusão medido foi possível calcular o raio de Stokes (Rs) através da equação Stokes-Einstein (Edward, 1905).

$$D = K_{\rm B}T$$

6 π nRs

onde K_B = constante de Boltzman, η = viscosidade do tampão, obtida pelo software Sednterp (http://www.jphilo.mailway.com/dowload.htm) e T = temperatura absoluta. O experimento foi realizado em diversas concentrações proteicas entre 5 e 100 uM, a temperatura constante de 25°C, as amostras foram previamente centrifugadas (14.000 rpm / 15 min / 4°C), solubilizadas no tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5.

3.13. Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)

Esta técnica é baseada na interação de moléculas assimétricas com a luz circularmente polarizada. Esta interação é responsável pelo sinal de dicroísmo circular, que pode ser definido como a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda. Como os aminoácidos são moléculas assimétricas, e moléculas sem plano de simetria são capazes de desviar luz circularmente polarizada, esta técnica é muito utilizada como sonda global de estrutura secundária de proteínas (Corrêa e Ramos, 2009; Woody, 1995; Ramos, 2008).

Os espectros de CD de proteínas diferem de acordo com a estrutura secundária, sendo, portanto, possível distinguir estruturas do tipo hélice- α , folhas- β e 'randon coil'. O cromóforo amida (da ligação peptídica) predominante no espectro de CD abaixo de 250 nm, apresenta duas transições eletrônicas: transição $\eta \rightarrow \pi^*$ responsável pelas bandas negativas em torno de 222 nm e 217 nm, características de hélice- α e folhas- β , respectivamente; e uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, responsável pelas bandas positivas em ~190 nm e 198 nm, características de hélice- α e folhas- β , respectivamente e ainda pela banda negativa em 208 nm, característica de hélice- α (Corrêa e Ramos, 2009; Woody, 1995). Portanto, utilizamos esta técnica para caracterizar a estrutura secundária das proteínas em estudo, e ainda, para avaliar a

MATERIAIS E MÉTODOS

estabilidade térmica e química, medindo a perda de estrutura secundária com aumento de temperatura e adição de agente desnaturante, respectivamente.

Os espectros foram medidos utilizando o espectropolarímetro J-720 (JASCO), cubetas de quartzo de 5 mm, 2 mm e 1 mm de caminho óptico, dependendo da concentração protéica (5 a 20 μ M). As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5. Todas as medidas foram feitas sob fluxo (10 L / min) de nitrogênio. Os resultados são a média de pelo menos 16 espectros de 200-260 nm medidos a 20 nm / min, resposta de 1,0 nm, tendo como branco o tampão de cada proteína analisada.

Para os experimentos de desenovelamento térmico e químico, o sinal de dicroísmo circular foi medido em um único comprimento de onda (λ = 217 nm), pois ambas as proteínas em estudo apresentaram espectro de estrutura secundária do tipo folha- β . Porém, nos experimentos de desenovelamento térmico o sinal foi monitorado na faixa de temperatura de 20 a 90°C, e os experimentos de desenovelamento químico foram realizados a 20°C, e o sinal foi adquirido de soluções, nas quais a concentração protéica foi mantida constante, mas, foram adicionadas concentrações crescentes de uréia (0 a 8 M).

Os valores obtidos na leitura de CD (mdeg) foram convertidos para elipticidade molar residual ($[\theta]_{EMR}$) que é definida pela seguinte equação:

$$[\theta]_{\text{EMR}} = \frac{(\theta \times \text{MM})}{(C \times | \times n)}$$

onde θ é a elipticidade em graus (deg), MM é a massa molecular da proteína (g / mol), C é a concentração da proteína (mg / mL), I é o caminho ótico (cm) e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína em análise.

3.14. Atividade chaperona

Para estudar a atividade chaperona das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp, verificamos a capacidade que estas proteínas tem de proteger contra agregação substratos modelos e proteínas provenientes do extrato de *E.coli*.

3.14.1. Atividade chaperona com substratos modelos

Realizamos experimentos de atividade chaperona de prevenção da agregação térmica, com dois substratos modelos malato desidrogenase (MDH) à 42°C e citrato sintase (CS) à 45°C. As temperaturas experimentais foram estabelecidas de acordo com a estabilidade térmica de cada substrato modelo analisado.

E ainda, realizamos experimentos de prevenção contra agregação de dois substratos modelos insulina e lisozima, agregando estas proteínas com adição de agente redutor – ditiotreitol (DTT – 25 mM), o qual reduz ligações dissulfeto que ocorrem entre cisteínas. Cabe informar que a proteína em estudo, SsHsp21.5-mt, não apresenta nenhuma cisteína na sua sequência primária, e a SsHsp22.3-cp apresenta apenas uma cisteína.

Os experimentos foram realizados em um equipamento do tipo fluorímetro (Cary Eclypse Varian), no qual, o efeito das sHSP em estudo sobre os substratos modelos foi monitorado pela turbidez das amostras, que espalhavam luz, medida em um comprimento de onda fixo (320 nm) em função do tempo. Quando as proteínas modelos sofriam agregação, a turbidez da amostra aumentava, gerando aumento da intensidade do espalhamento de luz medido. A atividade chaperona relativa foi calculada pela porcentagem de proteção contra a gregação das proteínas modelos pela seguinte equação:

Proteção (%) =
$$100 \times (\Delta e - \Delta e_{ch})$$

Onde $\Delta e e \Delta e_{ch}$ representa o máximo de espalhamento de luz (no tempo final de reação) na ausência e presença de chaperona, respectivamente. Todas as proteínas foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5.

3.14.2. Atividade chaperona com extato solúvel de E.coli

Analisamos a capacidade que as proteínas em estudo tem de prevenir contra agregação térmica proteínas provenientes do extrato de *Escherichia coli* DH5a (Invitrogen). As cepas de *E.coli* foram crescidas em meio LB a 37 °C até atingir Abs₆₀₀ = 0,8. Após este período, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas (13.000 rpm / 2 min) e o precipitado ressuspendido em 50 µL de tampão (Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM pH 7,5), lisados por sonicação mecânica e novamente centrifugados (13.000 rpm / 2 min). A concentração de proteínas totais do extrato foi medida pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O sobrenadante foi incubado (15 min / 45 °C) na ausência e presença das chaperonas em estudo. Nessas condições, diversas proteínas provenientes do extrato de *E.coli* sofrem agregação na ausência de chaperonas, porém, algumas dessas proteínas permanecem solúveis na presença de certas chaperonas e podem ser visualisadas em gel de SDS.

4. **RESULTADOS**

4.1. Análise da estrutura primária

As duas SsHSP de organelas em estudo, a SsHSP21.5-mt da classe VI (mitocondrial), e a SsHSP22.3-cp da classe V (cloroplasto), foram nomeadas de acordo com organismo à qual pertenciam (Ss = *Saccharum spp*.), seguido da sua classificação proteica (HSP = heat shock proteins), da massa molecular do monômero (Tabela 2), e da sigla representativa da organela que foram encontradas.

Ambas foram clonadas em pET28a, plasmídeo que contêm uma sequência que codifica para uma cauda de poli-histidina (seqüência de 20 aminoácidos dentre os quais, 6 histidinas seguidas), que facilita a purificação das proteínas. Analisamos a identidade das estruturas primárias das duas SsHSPs por alinhamento com auxílio do programa Clustawl (Figura 9). A região referente à cauda de poli-histidina não foi incluída na análise de identidade.

Com auxílio do programa Protparam encontrado no portal Expasy, os parâmetros físico-químicos dessas proteínas foram preditos a partir de sua estrutura primária (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos das SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cppreditos pela análise de suas estruturas primárias pelo programa Protparam.Parâmetros preditos para a proteína não fusionada à cauda de histidina.

Proteína	Massa Molecular (Da)	№ aminoácidos	pl
SsHSP21.5-mt	21523,1	193	5,4
SsHSP22.3-cp	22361,2	200	5,0

Pela estrutura primária dessas proteínas foi possível determinar o número de resíduos de triptofanos (W), tirosinas (Y) e cistinas (C-C) existentes em cada proteína, e assim, calcular o coeficiente de extinção molar pelo método de Edelhoch (Tabela 3).

RESULTADOS

Hsp21.5 Hsp22.3	MASMTGGQQMGRGSMNTGAQLRRYEGAESEDDSVREYESRRGSRDYAVPSLFSDIFRDPF MQENRDNSVDVQVSQNGGNRQQQGNAVQRHLRRAAPLDISPFGLVDPMSPMR *: ***: * * : * : * : * : * : *
Hsp21.5 Hsp22.3	SAPQNLGRLLSLMDDFAVAAPGRAGAVRRGWNAKEDEEALHLRVDMPGLGKEHV TMRQMLDTMDRLFDDALGFPMATRRSPAATGEVRLPWDIVEDDKEVKMRFDMPGLARDEV : * *. : *:** : ::::*.****:::::*
Hsp21.5 Hsp22.3	KVWAEQNSLVIKGEGEKDSGEDEDVPPPRYSGRIELAPEVYRMDKIK KVMVEDDTLVIRGEHKKEEGADEAAEGGSGGDGWWKQRSVSSYDMRLALPDECD-KSKVR ** .*:::***:** :*:.* ** *. *: *. * *: *. * *:
Hsp21.5 Hsp22.3	AEMKNGVLKVVVPKVKEEQRKDVFQVNIE AELKNGVLLVTVPKTEVEKVIDVQVQ **:**** *.***.: *: **

Figura 9. Alinhamento entre a SsHSP21.5-mt e a SsHSP22.3-cp. O alinhamento foi realizado utilizando o programa CLUSTALW. (*) resíduos idênticos, (:) substituições conservadas, (.) substituições semi-conservadas. As proteínas apresentam 25% de identidade.

_					
	Proteína	(W)	(Y)	(S-S)	Coef. de extinção molar (ε)
-	SsHSP21.5-mt	2	5	0	18450 M ⁻¹ .cm ⁻¹
-	SsHSP22.3-cp	3	1	0	17990 M ⁻¹ .cm ⁻¹

Tabela 3. Valores de coeficiente de extinção molar obtidos para as proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp pelo método de Edelhoch.

4.2. Análise de similaridade de sequência

Com o objetivo de comparar a similaridade de sequência das proteínas em estudo com outras proteínas de plantas mono e dicotiledôneas, em diferentes compartimentos celulares, construímos uma árvore de similaridade de sequência, com algumas sHSPs escolhidas (Figura 10). Podemos observar que as sHSPs estudadas neste projeto, apresentam maior similaridade de seguência guando comparadas com proteínas do mesmo compartimento celular, independente da espécie. Podemos observar ainda que, entre as proteínas do mesmo compartimento celular, são formados clados diferenciando plantas mono de dicotiledôneas. Dessa maneira, a SsHSP22.3-cp tem maior similaridade com a TaHSP26.6 (78 %) de trigo, enguanto a SsHSP21.5-mt tem maior similaridade com a ZmHSP23.8 (82 %) de milho, e com a TaHSP23.5 de trigo, todas plantas monocotiledôneas como a canade-açúcar.



Figura 10. Cladograma de similaridade de sequência de aminoácidos relacionando as proteínas sHSP21.5-mt e sHSP22.3-cp com algumas sHSP de diversos compartimentos celulares de plantas. Barra indica a taxa de substituição.

4.3. Expressão

As proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp foram transformadas em cepas de *E. coli* BL21(DE3), e para determinar a melhor condição de expressão dessas proteínas, realizamos testes de indução em diferentes temperaturas (20°C, 30°C e 37°C) para ambas as proteínas. Os resultados obtidos sugerem que as proteínas estavam sendo expressas em todas as temperaturas testadas, porém com maior rendimento de expressão na temperatura de 37°C (Figura 11), portanto, as condições escolhidas para padronização da expressão foram 37°C por um período de 4h para ambas as proteínas.

Apesar da massa molecular predita das proteínas de interesse ser em torno de 24 kDa, com cauda de poli-histidina, a migração no SDS-PAGE ocorre com massa aparente próximo da banda equivalente a 31 kDa do padrão de massa molecular



Figura 11. Análise do teste de indução para SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3-cp (B) à 37°C por SDS-PAGE (12%). Fração 1: não induzida, fração 2 – 11: precipitado e sobrenadante de 1h, 2h, 3h, 4h e 15h, respectivamente; fração 12: padrão de massa padrão de proteína 'low range' (kDa) em ambos os géis. Para acompanhar todo o processo de expressão de proteínas, em cada temperatura foram coletadas alíquotas das culturas antes da indução e de hora em hora após a adição de IPTG. As amostras foram centrifugadas, as células bacterianas lisadas e sobrenadantes e precipitados no SDS-PAGE.

4.4. Purificação

Ambas as proteínas foram purificadas em duas etapas cromatográficas: cromatografia de afinidade ao níquel utilizada para isolar as SsHSPs da grande maioria dos contaminantes provenientes da *E. coli*, pois essas proteínas estavam fusionadas a uma cauda de poli-histidina; e cromatografia de gel filtração utilizada para separação de proteínas por massa molecular, isolando a proteína de interesse em um único estado oligomérico, e livre de espécies protéicas agregadas. Todas as etapas cromatográficas foram acompanhadas por SDS-PAGE, e podem ser visualizadas nas Figuras de 11 a 14 para a proteína SsHSP21.5-mt, e nas Figuras 15 a 18 para a SsHSP22.3-cp.

4.4.1. Purificação da proteína SsHSP21.5-mt

O cromatograma referente à primeira etapa de purificação da proteína SsHSP21.5-mt, está apresentado na Figura 12, e a segunda etapa cromatográfica está apresentada na Figura 14. Todas as etapas foram analisadas por gel de SDS (Figuras 13 e 15).

Podemos observar no cromatograma da Figura 12 que a proteína foi eluída apenas em tampão contendo 500 mM de imidazol, no pico de absorbância entre 120 – 140 mL, e pelo gel na Figura 13, que apenas com uma etapa cromatográfica a proteína de interesse encontra-se praticamente pura. Entretanto, para remover as pequenas impurezas, e observar o estado oligomérico, realizamos uma segunda cromatografia de gel filtração.

De acordo com o cromatograma (Figura 14) e pelo gel (Figura 15) podemos observar que a proteína em estudo encontra-se livre de impurezas, e em único estado oligomérico, ou seja, com alto teor de pureza (>95%).

Cada fração foi devidamente quantificada pelo método de Edelhoch (descrito no item 3.9.), e pelos valores de \mathcal{E}_{280} medidos, as concentrações calculadas variaram de 5 a 10 μ M. O que representa que a proteína foi obtida pura com rendimento médio de 42 mg / mL a cada 1L de indução.



Figura 12. Cromatografia de afinidade da SsHSP21.5-mt. Utilizamos uma coluna de afinidade a níquel de 5 mL. O gradiente linear foi realizado de 0 – 100% de tampão B. Tampão A: Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5 e tampão B: Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / imidazol 500 mM.



Figura 13. Análise do processo de purificação por cromatografia de afinidade da fração solúvel da SsHSP21.5-mt por SDS-PAGE (12%). Fração 1: precipitado de célula bacteriana lisado 'input', frações 2 e 3: lavagem com tampão A, frações 4: primeiro pico correspondente a 45 mL, fração 5: alíquota coletada com 80 mL de volume de eluição, frações 6 e 7: eluição com 100% tampão B – com volume de 130 mL, fração 8 : padrão de massa molecular 'low range'. Tampão A: Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5 e Tampão B: Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5.



Figura 14. Cromatografia de gel filtração da SsHSP21.5-mt. Utilizamos uma coluna de 320 mL, com resina superdex 200, com tampão Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5, com fluxo de eluição de 2 mL / min.



Figura 15. Análise do processo de purificação por cromatografia de gel filtração da SsHSP21.5-mt por SDS-PAGE (12%). As frações 1 – 7: eluições do pico de máxima absorbância em 150 mL, fração 8: padrão de massa molecular 'low range'.

RESULTADOS

4.4.2. Purificação da proteína SsHSP22.3-cp

A primeira etapa cromatográfica para purificação da proteína SsHSP22.3-cp está apresentada na Figura 16, e a segunda etapa cromatográfica está apresentada na Figura 18. Todo o processo foi analisado por gel de SDS (Figuras 17 e 19).

A proteína foi eluída quando utilizamos tampão com 100% de imidazol (500 mM) observados no pico de absorbância entre 100 – 130 mL, apresentado no gel de SDS nas frações de 5 a 8, com alto teor de pureza (>90%). Porém, para observar e isolar esta proteína em um único estado oligomérico realizou-se uma segunda cromatografia de gel filtração (Figura 18).

Observamos dois picos de intensa absorbância no cromatograma, o que indica que a proteína tem mais de um estado oligomérico. Analisando os dois picos pelo gel de SDS (Figura 19), podemos observar que a proteína de interesse está sendo eluída em ambos os picos, pela banda aparente no gel em torno de 31 kDa, o que indica que o primeiro pico, com volume de eluição menor, ou seja, com massa molecular maior, provavelmente seja um agregado, que foi facilmente isolado do segundo pico.

Podemos observar que duas etapas cromatográficas foram suficientes para obter a proteína com alto grau de pureza (>95%). Cada fração foi devidamente quantificada pelo método de edelhoch (descrito no item 3.9.), e pelos valores de \mathcal{E}_{280} medidos, as concentrações calculadas variaram de 5 a 30 µM, o que significa que a proteína foi obtida pura com rendimento médio de 16 mg / mL a cada 1L de indução.



Figura 16. Cromatografia de afinidade da SsHsp22.3-cp. Utilizamos uma coluna de afinidade a níquel, de 5 mL. O gradiente linear foi realizado de 0 – 100% de tampão B. Tampão A: Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM pH 7,5 e tampão B: Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / jet 7,5.



Figura 17. Análise do processo de purificação por cromatografia de afinidade da SsHsp22.3-cp por SDS-PAGE (12%). As frações 1 - 2: 'flow through' - aplicação da amostra na coluna, frações 3 e 4: primeiro pico do cromatograma em 45 mL, frações de 5 a 8: segundo pico do cromatograma entre 120-140 mL, fração 9: padrão de proteínas 'low range'.



Figura 18. Cromatografia de gel filtração da SsHsp22.3-cp. Utilizamos uma coluna de 320 mL, com resina superdex 200, com tampão Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5, com fluxo de eluição de 2 mL / min. Todas as frações da purificação foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 18).



Figura 19. Análise do processo de purificação por cromatografia de gel filtração da SsHSP22.3-cp por SDS-PAGE (12%). As frações 1 e 2: primeiro pico, frações de 3 a 11: segundo pico, fração 12: padrão de massa molecular 'low range'.

RESULTADOS

4.5. Remoção da cauda de poli-histidina

Com as proteínas purificadas, realizamos diversos experimentos na tentativa de clivar a cauda de poli-histidina existente na sequência expressa das proteínas em estudo. Os testes foram realizados com adição da enzima trombina nas concentrações de 1u a 5u / 1 µL, com diferentes tempos de incubação (0,5h à 16h) em temperaturas variadas (4ºC e 25ºC), sendo a trombina adicionada diretamente na solução proteica ou aplicada na coluna de afinidade, diluída em solução tamponante. Após o período de incubação a solução proteica foi aplicada em uma coluna cromatográfica de afinidade ao níquel, pois assim, a porção contendo a cauda de poli-histidina ficaria retida na coluna (interage com o níquel) e a porção sem cauda de poli-histidina seria eluída facilmente.

Devido ao grande número de variáveis testadas, diversos géis de poliacrilamida foram realizados, entretanto, optamos por apresentar um único gel, cujo resultado obtido foi semelhante aos das outras condições testadas, sendo este gel (Figura 20) referente à proteína SsHSP21.5-mt clivada com trombina (1u / μ L) por um período de 3h a temperatura ambiente.

Pelos resultados obtidos, observamos que em todas as condições testadas, a trombina não clivou ou clivou inespecificamente ambas as proteínas, sendo possível visualizar no gel de poliacrilamida (Figura 20) duas ou mais bandas correspondentes a fragmentos de proteínas. Portanto, realizamos a caracterização estrutural e funcional de ambas as proteínas contendo a cauda de poli-histidina em suas sequências.



Figura 20. Análise por SDS-Page (12%) do teste de clivagem da cauda de polihistidina da proteína SsHSP21.5-mt com trombina (1u / μL) com incubação por **3h na coluna de afinidade a temperatura ambiente.** Fração 1: SsHSP21.5-mt pura (controle), fração 2: 'flow through' – aplicação da proteína em estudo na coluna de afinidade, frações 3 e 4: lavagem com tampão A, fração 5: 'flow through' - aplicação de trombina diluída no tampão A, a qual foi incubada por 3h, frações de 6 a 11: lavagens com concentrações crescentes de imidazol (100 mM a 500 mM), fração 12: padrão de massa molecular 'low range'. Tampão A: Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5 e tampão B: Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / imidazol 500 mM / pH 7,5.

RESULTADOS

4.6. Medidas de emissão de fluorescência

Obtivemos os espectros de emissão de fluorescência das proteínas em condições nativas, e em condições de desnaturação (Gdm-Cl 8M), pois esta técnica permite uma análise do ambiente dos resíduos W, devido à sensibilidade deste resíduo à polaridade do ambiente. Os experimentos foram realizados com SsHSP21.5-mt a 10 μ M e a SsHSP22.3-cp a 5 μ M, e os resultados estão apresentados na Figura 21e na Tabela 4.

Tabela 4. Emissão de fluorescência e centro de massa calculado para aSsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp com e sem ureia 8M.

Proteínas	Emissão fluor. λ_m (nm)	Centro de massa (nm)
SsHSP21.5-mt	343 ± 1	348 ± 1
SsHSP21.5-mt + ureia 8M	351 ± 1	350 ± 1
SsHSP22.3-cp	331 ± 1	331 ± 1
SsHSP22.3-cp + ureia 8M	352 ± 1	358 ± 1

A SsHSP21.5-mt possui 2 W e a SsHSP22.3-cp possui 3 W, contudo apenas um dos W é conservado, mesma posição na sequência, nas duas proteínas. Com estes experimentos notamos que, os W da proteína SsHSP21.5-mt estavam parcialmente expostos e para a proteína SsHSP22.3-cp observamos que pelo menos um dos W estava no interior da proteína e pelo menos um W parcialmente exposto (ver item Discussão).



Figura 21. Espectro de emissão de fluorescência da SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3-cp (B) a 20°C. Excitação em 295nm e emissão de 300-400 nm em tampão Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5 com e sem ureia 8 M. Este experimento foi realizado cinco vezes, mas os dados apresentados referem-se à média de um único experimento realizado em triplicata.
4.7. Dicroísmo circular (CD)

Experimentos de dicroísmo circular foram realizados para verificar se as proteínas purificadas estavam enoveladas e para caracterizar suas estruturas secundárias. Os espectros (Figura 22) foram obtidos à 20 °C, em cubetas de quartzo de 0,2 cm de caminho ótico, sendo os resultados a média de 16 leituras. Os brancos utilizados são os próprios tampões, portanto, os espectros dos tampões foram subtraídos dos espectros das proteínas. Os dados apresentados foram normalizados para elipticidade molar residual, e referem-se à média de um experimento realizado em triplicata, porém este experimento foi realizado oito vezes. Observamos com este experimento (Figura 22) que as duas proteínas apresentam espectro de CD condizente com o de proteínas com predominância de estrutura secundária do tipo folha β , pois apresentam mínino de sinal de dicroísmo circular em torno de 217 nm, característico deste tipo de estrutura.



Figura 22. Caracterização da estrutura secundária da SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp monitorada por dicroísmo circular na região do UV-distante. Os espectros foram medidos de 260 a 198 nm, ambas as proteínas na concentração de ~15 μM, em tampão Tris-HCl 12,5 mM / NaCl 50 mM / pH 7,5. Os dados apresentados foram normalizados para elipticidade molar residual, e referem-se à média de um experimento realizado em triplicata.

4.7.1. Desenovelamento térmico acompanhado por dicroismo circular

Avaliamos a estabilidade das SsHSPs por experimentos de desenovelamento térmico (Figura 23) acompanhado pelo sinal de dicroísmo circular a 217 nm, pois estas proteínas apresentam estruturas secundárias predominantemente to tipo folha- β . Os experimentos foram realizados em cubetas de quartzo de 0,5 cm de caminho ótico, aumentamos a temperatura gradualmente na velocidade de 1°C / minuto, de 20°C a 90°C, e o resfriamento das amostras de 90°C a 20°C ocorreu na mesma velocidade do aquecimento.

Observamos que ambas as proteínas não se desenovelam completamente mesmo à 90°C. Utilizamos os valores de Tm, temperatura no ponto médio da transição, como parâmetro de comparação das estabilidades dessas duas proteínas. A SsHSP21.5-mt apresentou Tm = 60 ± 1 °C e para a SsHSP22.3-cp fizemos um ajuste sigmoidal dos pontos resultando em um Tm de 58 ± 1 °C. O desenovelamento, de ambas as proteínas, for reversível nas condições aqui testadas, sinal de CD foi recuperado (~90%), mesmo com a diminuição da temperatura.



Figura 23. Desenovelamento e renovelamento térmico da SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3-cp (B), monitorado por dicroísmo circular à 217 nm. Proteínas na concentração de 10 uM, em tampão Tris-HCl 12,5 mM / NaCl 50 mM / pH 7,5. Este experimento foi realizado quatro vezes, mas os dados apresentados referem-se à média de um experimento realizado em triplicata, com lotes de proteínas diferentes.

4.7.2. Desenovelamento induzido por uréia acompanhado por dicroismo circular

A estabilidade das SsHSP foram avaliadas por experimentos de desenovelamento químico (Figura 24) com adição de concentrações crescentes (0 a 8M) do agente desnaturante uréia. O grau de desenovelamento químico foi monitorado a 20 °C através da leitura do sinal em 217 nm, pois estas proteínas apresentam estruturas secundárias predominantemente como folha-β.

Os perfis de desenovelamento induzido por uréia mostraram que ambas as proteínas apresentaram perfil de desenovelamento do tipo dois estados. Os gráficos de elipticidade molar em função da concentração de uréia foram construídos e o ajuste sigmoidal dos pontos resultou em um Cm, concentração de uréia no ponto médio da transição, de 2,5 \pm 0,2 M de uréia para a SsHSP21.5-mt e Cm = 1,9 \pm 0,1 M para a SsHSP22.3-cp. Entretanto, podemos observar que nem mesmo 8 M de uréia foram capazes de desenovelar completamente estas proteínas, nas condições testadas, tanto nos experimentos acompanhados por CD, quanto para os de fluorescência intrínseca do triptofano.



Figura 24. Desenovelamento químico da SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3-cp (B) monitorado pelo sinal de dicroísmo circular à 217 nm. Os dados apresentados referem-se à média, com erro padrão, de cinco experimentos independentes. O ajuste sigmoidal dos pontos resultou em Cm, concentração de uréia no ponto médio da transição, de 2,5 M de uréia para a SsHSP21.5-mt e Cm 1,9 M para a SsHSP22.3-cp.

4.8. Caracterização estrutural

4.8.1. Gel filtração analítica

Utilizamos cromatografia de gel filtração analítica, com proteínas de massa molecular e raio de Stokes (Rs) conhecidos, para construir uma curva de calibração (Figura 25 A e C) de (-log kav)^{1/2}, onde Kav é o coeficiente de partição obtido pelo volume de eluição de cada proteína, versus Raio de Stokes (Á) das proteínas padrões eluídas na cromatografia de gel filtração analítica, e assim estimar o Rs das proteínas em estudo. Pela equação da reta obtida (Figura 25 B e D), o raio de Stokes calculado para a proteína SsHSP21.5-mt foi de 60 Á, e 53 Á para a SsHSP22.3-cp.

Utilizamos ainda esta técnica para avaliar o estado oligomérico das chaperonas estudadas, e se estas sofriam alterações em funções do pH. As proteínas foram preparadas em soluções com diferentes pHs (5,5 / 6,5 / 7,5 / 8,0), estando a SsHSP21.5-mt a 34 µM e a SsHSP22.3-cp a 38 µM em todos os pHs testados. Todas as soluções protéicas foram eluídas na coluna de gel filtração analítica (Figura 26), cujo volume de eluição pode ser relacionado com o tamanho da proteína (Tabela 5).



Figura 25A. Cromatografia de gel filtração analítica para determinação do raio de Stokes da SsHSP21.5-mt (A e B) Em preto está apresentado o cromatograma do padrão de proteínas, e em azul o da proteína em estudo. Na figura B a curva de calibração de (-log kav)^{1/2} versus Rs (Á) das proteínas padrões (quadrados pretos) com ajuste linear dos pontos (reta preta). Pela equação da reta gerada o Rs da SsHSP21.5-mt foi estimado em 60 ± 2 Å (circulo vermelho).



Figura 25B. Cromatografia de gel filtração analítica para determinação do raio de Stokes da SsHSP22.3-cp (C e D). Em preto está apresentado o cromatograma do padrão de proteínas, e em azul o da proteína em estudo. Na figura B a curva de calibração de (-log kav)^{1/2} versus Rs (Å) das proteínas padrões (quadrados pretos) com ajuste linear dos pontos (reta preta). Pela equação da reta gerada o Rs da SsHSP22.3-cp foi estimado em 53 ± 2 Å (circulo vermelho).



Figura 26. Cromatografia de gel filtração analítica para analisar o estado oligomérico das proteínas em função do pH, SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3-cp (B).

Proteína	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,0
SsHSP21.5-mt	11,6	11,5	11,4	11,2
SsHSP22.3-cp	13,2	12,9	12,8	12,5

Tabela 5. Volumes de eluição da cromatografia de gel filtração analítica das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp em diferentes pHs.

Podemos observar pela Figura 26 e Tabela 5 que para a proteína SsHSP21.5mt não houve deslocamento significativo no volume de eluição (Ve), estando portanto, com Rs de 60 Å, nas condições testadas. Para a proteína SsHSP22.3-cp observamos pequenas diferenças nos valores de volume de eluição, mas, quando extrapolados estes valores de Ve na curva de calibração da GFA, estas diferenças apresentam valores de Rs dentro do erro da técnica (erro ± 2 Å), portanto, esta proteína encontra-se em todas os pHs testados com Rs de 53 ± 2 Å.

Entretanto, foi possível observar um segundo pico de absorbância, próximo ao volume de eluição de 10 mL, nas soluções tamponantes de pH 5,5 e 6,5 para a proteína SsHSP21.5-mt, e na condição de pH 8,0 para a SsHSP22.3-cp, indicando um possível agregado pois o volume morto desta coluna cromatografia é de ~9,5 mL, ou ainda, formação de um estado oligomérico de maior Rs que o caracterizado em pH 7,5. Porém, devido à baixa concentração da alíquota coletada, não foi possível caracterizá-los.

4.8.2. Cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multi-ângulo de espalhamento de luz (SECMALS)

Para determinar a massa molecular, e também o estado oligomérico das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp, utilizamos um detector multi-ângulo de espalhamento de luz (MALS), acoplado à um detector de índice de refração, durante a eluição da cromatografia de exclusão molecular (SEC), com as amostras proteicas nas concentrações de 2 mg/mL (Figura 27).

Com este experimento foi possível determinar a massa molecular média, que foi de 467 ± 9 kDa, correspondente a 20 monômeros para a SsHSP21.5-mt, e de 364 ± 4 kDa, correspondente a 16 monômeros, para a SsHSP22.3-cp.



Figura 27. Caracterização do estado oligomérico da SsHSP21.5-mt (A) e SsHSP22.3-cp (B) em solução por SEC-MALS. A partir da coleta de dados de espalhamento de luz e do perfil cromatográfico da proteína, plotamos um gráfico da distribuição das massas moleculares medidas em função do volume de eluição das proteínas na coluna de exclusão molecular, em função das absorbâncias medidas.

4.8.3. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Para medir o coeficiente de difusão (D) das proteínas em estudo, realizamos experimentos de DLS em triplicata para SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp, em 6 concentrações diferentes: 5, 10, 15, 20, 50 e 100 uM à 25°C. O coeficiente de difusão obtido pelo resultado médio de 50 medidas independentes, não apresentou variações significativas nas concentrações testadas.

A partir do coeficiente de difusão medido, predizemos o Raio de Stokes (Rs) e massa molecular das proteínas em estudo, como se fossem esferas, utilizando o software SednTerp (http://www.jphilo.mailway.com / download.htm) para calcular a viscosidade do tampão: Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 à 25°C, (η = 1,1047 10⁻² Poise), e volume parcial específico (*Vbar* = 0,7269 mL/g) necessários para o cálculo de Rs e MM, para uma esfera, através da equação Stokes-Einstein, apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros hidrodinâmicos para SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp à 25°C. Em vermelho as medidas diretas de cada técnica e o restante a predição para uma esfera de mesma massa molecular.

SsHSP21.5-mt	Rs (Å)	MM (kDa)	D (cm ² /s)
Gel filtração analítica	60 ±2	480	4,1 10 ⁻⁷
DLS	77	571	2,5 ±0,5 10 ⁻⁷
Sec Mals	51	467 ±9	4,8 10 ⁻⁷
1 monômero ^a	19	23	1,0 10 ⁻⁷
20 monômeros ^a	51	468	4,8 10 ⁻⁷
SsHSP22.3-cp	Rs (Å)	MM (kDa)	D (cm²/s)
Gel filtração analítica	53 ±2	423	4,7 10 ⁻⁷
DLS	60	430	3,1±0,5 10 ⁻⁷
Sec Mals	47	364 ±4	5,2 10 ⁻⁷
1 monômero ^a	19	22	1,3 10 ⁻⁷
16 monômeros ^a	47	357	5,2 10 ⁻⁷

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

^a valores calculados para uma esfera.

Com os valores obtidos pelas análises hidrodinâmicas, calculamos o fator de Perrin (f/f0) das proteínas em estudo, que é a razão do coeficiente friccional medido (f) pelo coeficiente friccional para uma esfera hipotética (f0), cujo raio hipotético é calculado a partir da massa molecular, e fornece informações sobre a forma das proteínas, sendo 1 uma forma globular. Utilizamos os valores de Rs medido por gel filtração analítica (f), e calculado através da equação Stokes-Einsten pela massa molecular determinada por SecMals (f0), e encontramos os valores de: f/f0 = 1,2 para a SsHSP21.5-mt, e f/f0 = 1,1 para a SsHSP22.3-cp, indicando que ambas as proteínas tem estrutura quaternária globular.

4.9. Atividade chaperona

4.9.1. Atividade chaperona com substratos modelos

Realizamos experimentos de prevenção, pelas sHSPs, da agregação térmica dos substratos modelos: malato desidrogenase (MDH) (Figura 28) à 42^oC, e citrato sintase à 45^oC (Figura 29) acompanhando o sinal de espalhamento de luz mensurado à 320 nm. Avaliamos ainda a atividade das sHSPs em condições redutoras, por experimentos de prevenção contra agregação dos substratos modelos lisozima (Figura 30) e insulina (Figura 31), agregando estas proteínas com adição de agente redutor – ditiotreitol (DTT – 25mM).

Pelos resultados obtidos para o experimento de atividade em condições de estresse térmico, com o substrato MDH (Figura 28) observamos que apenas a SsHSP22.3-cp teve atividade protetora perante este substrato, pois a SsHSP21.5-mt não foi capaz de protegê-lo da agregação térmica à 42°C nas condições testadas (proporções de sHSP:MDH de 1:1 à 5:1). Entretanto, quando utilizamos CS como substrato modelo (Figura 29), nossos resultados mostraram que a proteína SsHSP22.3-cp teve novamente, atividade protetora superior à SsHSP21.5-mt, protegendo 90% a CS contra a agregação térmica, na menor concentração testada (proporção 1:1).

Em relação aos experimentos de atividade das sHSPs em condições redutoras, observamos que o DTT foi capaz de agregar a lisozima e a insulina, por

RESULTADOS

reduzir as ligações dissulfetos existentes nestas proteínas, cuja agregação ocasionou aumento do sinal de espalhamento de luz detectado.

Quando incubamos as sHSPs com a lisozima (Figura 30), observamos uma queda relativa na intensidade de espalhamento de luz da lisozima, indicando que as chaperonas em estudo protegeram com alta eficiência este substrato, sendo que a SsHSP21.5-mt protegeu 90% contra uma proteção de aproximadamente 100% da SsHSP22.3-cp na mesma proporção (proporção sHSP : lisozima de 5:1).

Em relação ao experimento com o substrato insulina (Figura 31), verificamos que a SsHSP21.5-mt apresenta atividade protetora acima de 50% em altas concentrações (proporção sHSP:insulina de 0,3:1), enquanto a SsHSP22.3-cp protegeu em aproximadamente 70% já na menor concentração testada (proporção sHSP:insulina de 0,05:1). Observamos ainda, que ambas as atividades protetoras não aumentaram nas últimas concentrações testadas (proporção sHSP:insulina de 0,6:1), sugerindo que ambas as proteínas atingiram suas capacidades máximas de proteção dessas proteínas, nas condições testadas. A alta concentração de insulina utilizada foi devida às dificuldades experimentais de se observar o início da agregação desta proteína, pois ocorria rapidamente.

Todos os experimentos apresentados nas Figuras 28, 29, 30 e 31 referem-se à média, com erro padrão, de três experimentos independentes, realizados em triplicatas.



Figura 28. Teste de atividade chaperona da SsHSP21.5-mt (preto) e SsHSP22.3-cp (listrado) contra o substrato modelo malato desidrogenase à 42°C por 60 min. Neste experimento medimos o espalhamento de luz relativo das proteínas em estudo isoladas, e do substrato modelo (MDH) a 42°C, e em seguida incubamos as proteínas com o MDH e imediatamente iniciamos as leituras. O experimento foi acompanhado através da turbidez da amostra a 320 nm, com as proteínas em tampão Tris-HCl 25 mM / NaCl 100 mM / pH 7,5.



Figura 29. Teste de atividade chaperona da SsHSP21.5-mt (preto) e SsHSP22.3-cp (listrado) contra o substrato modelo citrato sintase à 45°C por 60 min. Neste experimento medimos o espalhamento de luz relativo das proteínas em estudo e do substrato modelo (CS) a 45°C, como no experimento realizado para o substrato MDH, porém quando incubamos as sHSP com o CS, observamos uma queda relativa na intensidade de espalhamento de luz, indicando que as sHSP protegeram o substrato CS. Utilizamos aldolase (proporção 1:1) como controle negativo da reação.



Figura 30. Teste de atividade chaperona da SsHSP21.5-mt (preto) e SsHSP22.3cp (listrado) contra o substrato modelo lisozima à 25°C. Nos experimentos de agregação com adição de agente redutor, observamos que a adição de DTT foi capaz de agregar a lisozima, ocasionando um alto espalhamento de luz.



Figura 31. Teste de atividade chaperona da SsHSP21.5-mt (preto) e SsHSP22.3cp (listrado) contra o substrato modelo insulina à 20ºC. Estes experimentos foram realizados de maneira similar ao experimento acima, com modificação da temperatura e proporções (sHSP:substrato) testadas.

4.9.2. Atividade chaperona com extrato de *E. coli*

Realizamos experimentos para avaliar a capacidade das chaperonas em estudo de prevenir contra a agregação térmica as proteínas provenientes do extrato de E. coli. O extrato foi incubado com diferentes concentrações das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp, separadamente (Figura 32) e também com uma mistura dessas proteínas (Figura 33). Os experimentos foram realizados por 15 min a 45 °C, e as amostras foram aplicadas em gel de SDS, os quais foram analisados pelo programa ImageJ (Schneider e col., 2012). O extrato de E. coli utilizado nos experimentos estava na concentração total de 6,2 mg / mL, sendo que a concentração da fração insolúvel (IN) era de 5,2 mg / mL e da fração solúvel (S) 1,0 mg / mL. Podemos observar pelos controles utilizados neste experimento (Figura 32) que diversas proteínas do extrato de *E. coli* sofrem agregação com o aquecimento a 45 °C por 15 min, e que ambas as sHSPs permanecem solúveis nessas condições. Porém, quando incubamos o extrato com a SsHSP21.5-mt, não houve alteração no perfil de proteínas solúveis e esta chaperona passou a fazer parte da fração insolúvel (IN). Entretanto, guando a incubação ocorreu na presença da SsHSP22.3cp, diversas proteínas do extrato foram protegidas da agregação (análise realizada pelo programa ImageJ), principalmente com a SsHSP22.3-cp na concentração de 10 uM, ocorrendo portanto uma alta proteção das proteínas do extrato *E. coli* contra agregação. Nestas condições, uma fração da SsHSP22.3-cp também passou a fazer parte da fração insolúvel.

Para verificar se as sHSPs em estudo interagiam entre si, e se ainda, juntas teriam maior atividade chaperona (efeito sinérgico), realizamos o mesmo experimento incubando o extrato na ausência e presença das duas sHSPs (Figura 33), na qual a concentração da SsHSP21.5-mt foi mantida fixa (10 uM), pois observamos que nesta concentração a atividade chaperona dessa proteína foi baixa perante as proteínas proveniente do extrato de *E.coli*, e adicionamos concentrações crescentes da SsHSP22.3-cp (2, 5 e 10 uM). Podemos observar com estes resultados (Figura 33) que em todas as concentrações testadas a mistura das chaperonas em estudo foram direcionadas para a fração insolúvel após o aquecimento, e mesmo nesta fração foram capazes de proteger as proteínas do extrato de *E. coli* da agregação.



Figura 32. Análise por SDS-Page (12 %) da atividade chaperona das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp separadamente, contra as proteínas do extrato de *E.coli*, por 15 min à 45 °C. As primeiras frações são correspondentes aos controles: extrato de *E. coli*, SsHSP21.5 e SsHSP22.3, os quais após aquecimento foram centrifugados e, separados em fração insolúvel (IN) e fração solúvel (S). Na sequência temos o extrato incubado com a SsHSP21.5-mt nas concentrações de 5 uM (+) e 10 uM (++), o extrato incubado com a SsHSP22.3-cp a 5 uM (+) e 10 uM (++), e por último o padrão de massa molecular 'broad range'.



Figura 33. Análise por SDS-Page (12 %) da atividade chaperona das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp misturadas, contra as proteínas provenientes do extrato de *E. coli* à 45 °C. As primeiras frações são correspondentes aos controles: extrato de *E.coli*, SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp, os quais após aquecimento foram centrifugados e separados em fração insolúvel (IN) e fração solúvel (S). Na sequência temos o extrato incubado com a mistura das duas chaperonas em estudo, em concentrações crescentes de SsHSP22.3-cp (2, 5 e 10 uM) e concentração fixa de SsHSP21.5-mt (10 uM) e por último o padrão de massa molecular 'broad range'.

Para compreender melhor estes resultados, substituímos o extrato de *E. coli* por uma solução de sacarose a 200 g / L (Figura 34), com o objetivo de verificar se as chaperonas estavam sendo direcionadas para a fração insolúvel (IN) devido a alta concentração do meio (densidade da solução de extrato de *E. coli*) ou devido a interações com proteínas do extrato de *E. coli*. Com o resultado deste experimento (Figura 34) observamos que quando incubamos a mistura dessas chaperonas com elevadas concentrações de sacarose, ambas permanecem solúveis mesmo após o aquecimento. Portanto, uma possível explicação para este resultado é que as chaperonas se associam as proteínas agregadas do extrato de *E. coli*, sendo coprecipitadas nestas condições.



Figura 34. Análise por SDS-Page (12%) da solubilidade das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp na ausência e presença de sacarose 200 g / L. Na sequência temos a proteína SsHSP21.5-mt (10 uM), a SsHSP22.3-cp (10 uM), e a mistura das duas sHSPs (10 uM cada) todas na ausência e presença de sacarose (200 g / L), e por último o padrão de massa molecular 'broad range'. Este experimento foi realizado nas mesmas condições do experimento com extrato de *E. coli* (15 min a 45 $^{\circ}$ C).

5. DISCUSSÃO

Embora os estudos biofísicos de sHSPs de cana-de-açúcar sejam recentes, as sHSPs de plantas são amplamente estudadas há décadas, e estes estudos mostram que a grande maioria dessas proteínas formam oligômeros em solução, sendo que as sHSPs citoplasmáticas geralmente são encontradas como dodecâmeros, como as proteínas SsHSP17.2 e SsHSP17.9 de cana-de-acúcar estudadas pelo nosso grupo (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2007), as sHSPs de milho ZmHSP17 e ZmHSP17.8 estudada por Klein (Klein, 2014) e a proteína de trigo TaHSP16.9 estudada por Sobott, Basha e Vierling (Sobott, 2002; Basha e Vierling, 2004). Em relação às sHSPs de organelas existem poucos relatos na literatura à respeito da caracterização estrutural. Dentre os estudos publicados, nota-se que o estado oligomérico nas sHSPs de organelas variam, pois há proteínas caracterizadas como dímeros em solução como NtHSP24.6 de tabaco (Kim, 2011), com 9 subunidades como a HSP21 de ervilha (Harndahl, 1998), com 12 subunidades (Lambert, 2011) e com 21 subunidades (Harndahl, 2001).

Para caracterizar o estado oligomérico das proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp, realizamos experimentos de gel filtração analítica, SecMals e DLS, em diferentes concentrações proteicas. Com estes experimentos verificamos que ambas encontravam-se em um único estado oligomérico, porém, os valores obtidos para a SsHSP21.5-mt correspondem a um oligômero composto de 20 subunidades, enguanto a SsHSP22.3-cp corresponde a 16 subunidades. Esta diferença, provavelmente, está relacionada com a identidade do domínio α -cristalino (~40%), domínio este responsável pela oligomeração das sHSPs (Berengian e col., 1997; Bagneris e col., 2009; Hochberg e Benesch, 2014). Resultado similar foi observado para a sHSP21 de Arabidosis thaliana, localizada em cloroplastos, que foi caracterizada como um oligômero de 21 subunidades na forma oxidada, e 19 subunidades na forma reduzida (Harndahl, 2001). Provavelmente a predominância de estrutura secundária do domínio α -cristalino, também é responsável pelos resultados de CD obtidos. Os quais mostraram que ambas as sHSPs em estudo estavam enoveladas após as etapas de purificação, e apresentando estrutura secundária predominantemente do tipo folha- β , com mínimo em torno de 215 nm,

DISCUSSÃO

como as demais sHSPs estudadas (Sobott, 2002; Van Montfort e col., 2001; Tiroli-Cepeda e Ramos, 2007).

Pelo fator de Perrin calculado, observamos que ambas as proteínas em estudo apresentam formatos esféricos, corroborando com as demais sHSPs de cana-de-açúcar (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010) e para a grande maioria das sHSPs estudadas (Vierling, 1999). Este formato está diretamente relacionado com a função chaperona dessas proteínas, pois de acordo com as estruturas resolvidas, essa família de proteínas tem formato esférico com centro oco, estando o domínio N-terminal voltado para este centro, no qual ocorrerá a ligação ao substrato (Van Montfort e col., 2001; Kim e col., 1998; Fleckenstein e col., 2015).

Realizamos experimentos de emissão de fluorescência, cuja análise permite apenas uma análise global do ambiente dos triptofanos, contudo neste caso algumas particularidades do sistema permitem uma análise mais pormenorizada dos ambientes nas duas proteínas (Figura 35). A SsHSP21.5-mt possui 2 W (W89 e W115) e a SsHSP22.3-cp possui 3 W (W89, W146 e W147), sendo que todos encontram-se no domínio α-cristalino, contudo apenas um dos W é conservado (W89), mesma posição na seguência, nas duas proteínas, e nas demais proteínas mitocondriais e de cloroplasto analisadas. Os outros 2 W de SsHSP22.3-cp são vizinhos na sequência, sendo o W147 conservado nas demais sHSPs de cloroplasto. O lambda máximo de emissão e o centro de massa do espectro de fluorescência de SsHSP21.5-mt indicaram que seus W estavam parcialmente expostos passando a totalmente expostos na presença do desnaturante uréia. A mesma análise feita para a proteína SsHSP22.3-cp indicou que pelo menos um dos W estava no interior da proteína e pelo menos um W parcialmente exposto. Esta análise sugere que o W conservado nas proteínas (W89) está parcialmente exposto já que ambos os espectros indicam pelo menos um W exposto em cada uma. Sendo assim, pelo menos um dos W de SsHSP22.3-cp, ou os dois já que são vizinhos, estaria no interior da proteína. Pela mesma linha de raciocínio o W não conservado em SsHSP21.5-mt (W115), o qual é conservado em algumas sHSPs mitocondriais, estaria parcialmente exposto ao solvente.

98



Figura 35. Esquema da posição dos triptofanos nas proteínas SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp. A. Estrutura primária das sHSPs demonstrando a localização dos W no domínio α-cristalino. **B.** Esquema exemplificando os resíduos de W parcialmente expostos ao solvente (W89) conservados nas sHSPs, o parcialmente exposto na proteína SsHSP21.5-mt (W115), e os dois enterrados no interior da proteína SsHSP22.3-cp (W146W147). Nos experimentos de estabilidade térmica e química, observamos que estas proteínas são estáveis, pois não se desenovelaram completamente em temperaturas elevadas (90°C), e nem mesmo com altas concentrações de agente desnaturante (8M de uréia). Observamos ainda que, a SsHSP22.3-cp é mais estável que a SsHSP21.5-mt, pois apresentou Tm, temperatura média no ponto de transição, de Tm=73°C, contra uma Tm=60°C da SsHSP21.5-mt. Esta alta estabilidade térmica e química, superior as demais sHSPs desse organismo já estudadas (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010), pode sugerir a importância dessas proteínas para a termotolerância na cana-de-açúcar.

Como a principal questão deste trabalho era entender a necessidade que um organismo vegetal, nesse caso a cana-de-açúcar, tem de expressar grandes quantidades de sHSPs em todos os compartimentos celulares, além dos estudos estruturais, realizamos diferentes estudos de atividade chaperona com quatros substratos modelos (MDH, CS, lisozima e insulina) e também experimentos com extrato de *E.coli*.

Pelos ensaios de atividade chaperona com o substrato MDH observamos que apenas a SsHSP22.3-cp teve atividade protetora perante este substrato, pois a SsHSP21.5-mt não foi capaz de protegê-lo da agregação térmica à 42ºC nas condições testadas. Resultado este interessante, pois a MDH é uma proteína mitocondrial, e tanto a proteína de cloroplasto, como as citoplasmáticas estudadas anteriormente (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010) foram capazes de proteger este substrato da agregação térmica, o que pode evidenciar a função chaperona dessas proteínas não apenas no compartimento celular de localização, mas em todo o ambiente celular. Além disso, quando utilizamos o substrato citrato sintase como modelo, ambas as proteínas protegeram este substrato da agregação térmica à 45°C, corroborando com o obtido para outras proteínas mitocondriais NtHSP24.6 (Kim, 2011) e sHSP23.8 (Liu, 1999). Entretanto, apesar do substrato CS ser mitocondrial, a SsHSP22.3-cp apresentou atividade chaperona superior à SsHSP21.5-mt, nas condições analisadas. Esta superioridade funcional da proteína SsHSP22.3-cp, para as proteínas modelo testadas, também pode ser observada nos experimentos com o substrato insulina e perante as proteínas provenientes do extrato de E.coli. Resultado similar de proteção da insulina foi observado para a sHSP21 de Arabidosis thaliana, localizada em cloroplastos (Harndahl, 2001), e em relação a insulina, dados semelhantes foram obtidos para as outras sHSP de canade-açúcar (Tiroli-Cepeda e Ramos, 2010).

Esta diferença funcional, pode ser explicada pela baixa identidade entre as sHSPs em estudo (~25%), identidade esta que se analisada apenas no domínio N-terminal, domínio envolvido na interação das sHSPs com seus substratos, é ainda menor (primeiros 70 resíduos tem identidade de ~22%). De maneira geral, segundo a literatura, a interação das sHsps com seus substratos envolve sítios múltiplos do domínio N-terminal, mas também depende do tipo de substrato e da sHSP em questão (Basha *et al.*, 2006).

6. CONCLUSÕES

6.1. Proteína SsHSP21.5-mt

- A análise da sequência primária por similaridade de sequência mostrou que a SsHSP21.5-mt é similar a outras sHSP de mitocôndria de plantas monocotiledôneas.
- Expressão na fração solúvel, com alto rendimento e purificada com alto teor de pureza (>95%) em dois passos cromatográficos (afinidade e gel filtração).
- Os experimentos de CD indicaram que a proteína recombinante foi produzida enovelada, apresentando estrutura secundária predominantemente do tipo folhaβ, como as demais chaperonas dessa família.
- Nos experimentos de desenovelamento térmico e químico monitorados por CD em λ = 217 nm, o valor de temperatura média no ponto de transição observado foi de Tm = 60ºC, e a concentração de uréia no ponto médio de transição de Cm = 2,5 M. Ambos os desenovelamentos foram reversíveis, sendo os sinais recuperados (~90%) após o resfriamento ou diluição de uréia.
- Monodispersa em solução, como um oligômero formado por 20 monômeros, com massa molecular de 467 kDa e raio de Stokes de 60 Å e formato globular.
- Apresenta especificidade a substratos, como a grande maioria das sHSP, pois dentre os substratos modelos testados esta proteína foi capaz de proteger com eficiência apenas os substratos citrato sintase e lisozima, protegendo com baixa eficiência a insulina e as proteínas provenientes do extrato de *E. coli*. E ainda, não foi capaz de proteger o substrato malato desidrogenase.

6.2. Proteína SsHSP22.3-cp

- Por similaridade de sequência foi possível verificar que a SsHSP22.3-cp apresenta sequência primária similar a outras sHSP de cloroplasto de plantas monocotiledôneas.
- Expressão na fração solúvel, e purificação em duas etapas cromatográficas (afinidade e gel filtração), com alto teor de pureza (>95%) e alto rendimento.
- Por espectro de CD, verificamos que a proteína recombinante foi produzida enovelada, com predominância de estrutura secundária do tipo folha-β, como as demais chaperonas dessa família.
- Nos experimentos de desenovelamento térmico e químico monitorados por CD em λ = 217 nm, obeteve-se valores de temperatura média no ponto de transição de Tm = 58°C, e concentração de uréia no ponto médio de transição de Cm = 21,9 M. Ambos os desenovelamentos foram praticamente reversíveis, sendo os sinais recuperados após o resfriamento ou diluição de uréia.
- Monodispersa em solução, caracterizada como um grande oligômero, composto de 16 monômeros, com massa molecular de 364 kDa e raio de Stokes de 53 Å e formato globular.
- Apresenta excelente atividade chaperona, sendo capaz de proteger todos os substratos modelos testados (malato desidrogenase, citrato sintase, lisozima, insulina) e também proteínas provenientes do extrato de *E.coli* contra a agregação.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo a literatura (Vierling, 1999; Borges e col., 2001) as plantas, dentre elas a cana-de-açúcar, expressam sHSPs sob condições de estresse em vários compartimentos celulares. Neste trabalho foi possível validar dois genes anotados no banco de dados SUCEST como chaperonas pertencentes à família das sHSP, encontradas em dois compartimentos celulares: mitocôndria e cloroplasto. A partir dessas informações, e dos resultados obtidos, pode-se formular a hipótese de que a expressão de várias sHSPs é essencial para as plantas pois estas proteínas devem agir sobre substratos diferentes durante condições de estresse térmico. Sendo que, cada uma atua sobre substratos específicos, com os quais tem maior afinidade realizando, portanto, sua atividade chaperona com maior eficiência.

8. REFERÊNCIAS

1. Acunzo, J.; Katsogiannou, M.; Rocchi, P. (**2012**) Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), alphaB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death, *The International Journal of Biochemistry* & *Cell Biology*, 44, 1622 – 1631.

2. Anfinsen, C.B. (**1973**) Principles That Govern Folding of Protein Chains, *Science*, 181, 223-230.

3. Arrigo, A.P. (**2013**) Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update, *FEBS Letters*, 587, 1959–1969.

4. Bagneris, C.; Bateman, O.A.; Naylor, C.E.; Cronin, N.; Boelens, W.C.; Keep, N.H.; Slingsby, C. (**2009**) Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20, *Journal of Molecular Biology*, 392, 1242–1252.

5. Barth, H.G.; Jackson, C.; Boyes, B.E. (**1994**) Size Exclusion Chromatography, *Analytical Chemistry*, 66, 595-620.

6. Basha, E.; Lee, G.J.; Demeler, B.; Vierling, E. (**2004**) Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat, *European Journal Biochemistry*, 271, 1426-1436.

7. Basha, G.J.; Friedrich, K.L.; Vierling, E. (**2006**) The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 39943-39952.

8. Basha, E.; O'Neill, H.; Vierling, E. (**2012**) Small heat shock proteins and alphacrystallins: dynamic proteins with flexible functions, *Trends Biochemical Sciences*, 37, 106–117.

9. Batista, F.A.H.; Gava, L.M.; Pinheiro, G.M.S.; Ramos, C.H.I. and Borges, J.C. (**2015**) From Conformation to Interaction: Techniques to Explore the Hsp70/ Hsp90 Network, *Current Protein and Peptide Science*, 16, 735-753.

10. Benndorf, R.; Martin, J.L.; Kosakovsky Pond, S.L.; Wertheim, J.O. (**2014**) Neuropathy- and myopathy-associated mutations in human small heat shock proteins: Characteristics and evolutionary history of the mutation sites, *Mutation Research*/Reviews *in Mutation Research*, 761, 15-30.

11. Berengian, A.R.; Bova, M.P.; McHaourab, H.S. (**1997**) Structure and function of the conserved domain in alphaAcrystallin. Site-directed spin labeling identifies a beta-strand located near a subunit interface, *Biochemistry*, 36, 9951–9957.

12. Borges, J.C.; Peroto, M.C.; Ramos, C.H.I. (**2001**) Molecular chaperone genes in the sugarcane expressed sequence database (SUCEST), *Genetic and Molecular Biology*, 24, 85-92.

13. Borges, J.C. and Ramos, C.H.I. (**2005**) Protein folding assisted by chaperones, *Protein and Peptide Letters*, 12, 257-261.

14. Borges, J.C., Cagliari, T.C., Ramos, C.H.I. (**2007**) Expression and variability of molecular chaperones in the sugarcane expressome, *Journal of Plant Physiology*, 164, 505-513.

15. Bradford, M. M. (**1976**) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

16. Boston, R.S.; Viitanen, P.V.; Vierling, E. (**1996**) Molecular chaperones and protein folding in plants, *Plant Molecular Biology*, 32, 191-222.

17. Cagliari, T.C.; da Silva, V.C.H.; Borges, J.C.; Prando, A.; Tasic, L.; Ramos, C.H.I. (**2011**) Sugarcane Hsp101 is a hexameric chaperone that binds nucleotides, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 1022-1030.

18. Caspers, G.J.; Leunissen, J.A.M.; de Jong, W.W. (**1995**) The expanding small heat shock protein family and structure predictions of the conserved 'a-crystallin-domain', *Journal of Molecular Evolution*, 40, 238-248.

19. Chou, M.; Chen, Y.M.; Lin, C.Y. (**1989**) Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins, *Plant Physiology*, 98, 617–621.

20. Clark, J.I. and Muchowski, P. (**2000**) Small heat-shock proteins and their potential role in human disease, *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 52-59.

21. Corrêa, D.H.A. and Ramos, C.H.I. (**2009**) The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function, *African Journal of Biochemistry Research*, 3, 164-173.

22. Das, K.P. and Surewicz, W.K. (**1995**) Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of alpha-crystallin, *FEBS Letters*, 369, 321–325.

23. Datskevich, P.N.; Nefedova, V.V.; Sudnitsyna, M.V.; Gusev, N.B. (**2012**) Mutations of small heat shock proteins and human congenital diseases, *Biochemistry*, 77, 1500–1514.

24. De Jong, W.W.; Caspers, G.J.; Leunissen, J.A. (**1998**) Genealogy of the alpha-crystallin-small heat shock protein superfamily, *International Journal of* Biological *Macromolecules*, 22, 151-162.

25. Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding, *Nature, 426*, 884-890.

26. Edelhoch, H. (**1967**) Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins, *Biochemistry*, 6, 1948-54.

27. Edward, J.T. (**1970**) Molecular Volumes and the Stokes-Einstein Equation, *Journal of Chemical Education*, 47, 261-270.

28. Fink, A.L. (**1999**) Chaperone-mediated protein folding, Physiological Reviews, 79, 425-449.

29. Fleckenstein, T.; Kastenmuller, A.; Stein, M.L.; Peters, C.; Daake, M.; Krause, M.; Weinfurtner, D.; Haslbeck, M.; Weinkauf, S.; Groll, M. and Buchner, J. (**2015**) The Chaperone Activity of the Developmental Small Heat Shock Protein Sip1 is Regulated by pH-Dependent Conformational Changes, *Molecular Cell*, 58, 1067-1078.

30. Freeman, W.H.; Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. (**2012**) Biochemistry, 7th edition.

31. Frydman, J. and Hartl, F.U. (**1996**) Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms, Science, 272, 1497-1502.

32. Fu, X. and Chang, Z. (**2004**) Temperature-dependent subunit exchange and chaperone-like activities of Hsp16.3, a small heat shock protein from Mycobacterium tuberculosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316, 291–299.

33. Gava, L. and Ramos, C. (**2009**) Human 90 kDa Heat Shock Protein Hsp90 as a Target for Cancer Therapeutics, *Current Chemical Biology*, 3, 10-21.

34. Gill, S.C.; Von Hippel, P.H. (**1989**) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Analytical Biochemistry*, 182, 319-26.

35. Glover, J.R. and Lindquist, S. **(1998)** Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins, *Cell*, 94, 73–82.

36. Grimsley, G.R.; Pace, N. (**2004**) Spectrophotometric Determination of Protein Concentration, *Current Protocols in Protein Science*, unit 3.1.

37. Guo, S.J.; Zhou, H.Y.; Zhang, X.S.; Li, X.G.; Meng, Q.W. (**2007**) Overexpression of CaHSP26 in transgenic tobacco alleviates photoinhibition of PSII and PSI during chilling stress under low irradiance, *Journal Plant of Physiology*, 164, 126–136.

38. Gusev, N.B.; Bogatcheva, N.V.; Marston, S.B. (**2002**) Structure and Properties of Small Heat Shock Proteins (sHsp) and Their Interaction with Cytoskeleton Proteins, *Biochemistry*, 67, 511-519.

39. Haber, E. and Anfinsen, C.B. (**1962**) Side chain interactions governing the pairing of half-cystine residues in ribonuclease, *Journal of Biological Chemistry*, 237, 1839-1844.

40. Haley, D.A., Horwitz, J.; Stewart, P.L. (**1998**) The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure, *Journal of Molecular Biology*, 277, 27-35.

41. Hanahan, D. (**1983**) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.

42. Härndahl, U.; Tufvesson, E.; Sundby, C. (**1998**) The Chloroplast Small Heat Shock Protein-Purification and Characterization of Pea Recombinant Protein, Protein, *Expression and Purification*, 14, 87-96.

43. Harndahl, U.; Kokke, B.P.; Gustavsson, N.; Linse, S.; Berggren, K.; Tjerneld, F.; Boelens, W.C.; Sundby, C. (**2001**) The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphipathic a-helix, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1545, 227–237.

44. Hartl, F. U. (**1996**) Molecular chaperones in cellular protein folding, *Nature*, 381, 571-579.

45. Hartl, F.U.; Bracher, A; Hayer-Hartl, M. (**2011**) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature*, 475, 324-32.

46. Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (**2009**) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo, *Nature*, 16, 574 – 581.

47. Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. & Buchner, J. (**1999**) Hsp26: a temperature-regulated chaperone, *EMBO J*ournal, 18, 6744-6751.

48. Hendrick, J.P. and Hartl, F.U. (**1993**) Molecular chaperone functions of heatshock proteins, *Annual review of biochemistry*, 62, 349-384.
49. Hochberg, G.K. and Benesch, J.L. (**2014**) Dynamical structure of alphaB-crystallin, *Progress in Biophysics* & *Molecular Biology*, 115, 11–20.

50. Horwitz, J. (**1992**) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone, *PNAS*, 89, 10449–10453.

51. Horwitz, J.; Bova, M.P.; Ding, L.L.; Haley, D.A.; Stewart, P.L. (**1999**) Lens alpha-crystallin: function and structure, *Eye*, 13, 403-408.

52. Jachimska, B.; Wasilewska, M.; Adamczyk, Z. (**2008**) Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements, *Langmuir*, *24*, 6866-6872.

53. Jakob, U.; Gaestel, M.; Engel, K.; Buchner, J. (**1993**) Small heat shock proteins are molecular chaperones, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 1517–1520.

54. Kim, D.R.; Lee, I.; Ha, S.C.; Kim, K.K. (**2003**) Activation mechanism of HSP16.5 from *Methanococcus jannaschii*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 991–998.

55. Kim, K.K., Kim, R.; Kim, S.H. (**1998**) Crystal structure of a small heat-shock protein, *Nature*, 394, 595–599.

56. Klein, R.D.; Chidawanyika, T.; Tims, H.S.; Meulia, T.; Bouchard, R.A.; Pett, V.B. (**2014**) Chaperone function of two small heat shock proteins from maize, *Plant Science*, 221, 48-58.

57. Kim, K.P.; Yu, J.H.; Park, S.M.; Koo, H.J.; Hong, C.B. (**2011**) Tobacco mitochondrial small heat shock protein NtHSP24.6 adopts a dimeric configuration and has a broad range of substrates, *BMB Reports*, 44, 816-820.

58. Kriehuber, T.; Rattei, T.; Weinmaier, T.; Bepperling, A.; Haslbeck, M.; Buchner, J. (**2010**) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins, *FASEB Journal*, 24, 3633–3642.

59. Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. (**1994**) MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers, *Computer Applications Biosciences*, 10, 189–191.

60. Laemmli, U.K. (**1970**) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, *Nature*, 277, 680-5.

61. LaFayette, P.; Nagao, R.; O'Grady, K.; Vierling, E.; Key, J. (**1996**) Molecular characterization od cDNAs enconding low-molecular-weight heat shock proteins of soybean, *Plant Molecular Biology*, 30, 159-169.

62. Lakowicz, J.R. (**1999**) Principles of fluorescence spectroscopy. 2ª edição.

63. Lambert, W.; Koeck, P.J.B.; Ahrman, E.; Purhonen, P.; Cheng, K.; Elmlund, D.; Hebert, H.; Emanuelsson, H. (**2010**) Subunit arrangement in the dodecameric chloroplast small heat shock protein Hsp21, *Protein Science*, 20, 291 – 301.

64. Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G. (**2007**) Clustal W and Clustal X version 2.0., *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.

65. Lee, G.J.; Roseman, A.M.; Saibil, H.R.; Vierling, E. (**1997**) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state, *EMBO Journal*, 16, 659–671.

66. Lee, G.J. and Vierling, E. (**2000**) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein, *Plant Physiology*, 122, 189-198.

67. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (**2004**) *Principles of Biochemistry*, 4th edition.

68. Lelj-Garolla, B. and Mauk, A.G. (**2006**) Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated, *Journal of Biological Chemistry*, 281, 8169–8174.

69. Lenne, C.; Block, M.A.; Jerome, G.; Douce, R. (**1995**) Sequence and expression of the mRNA enconding HSP22, the mitochondrial small heat-shock protein in pea leaves, *Biochemical Journal*, 311, 805-813.

70. Levinthal, C. (**1969**) How to fold graciously. Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, IL, USA, University of Illinois Press, 22-24.

71. Li, C.; Wang, L.; Ning, X.; Chen, A.; Zhang, L.; Qin, S.; Wu, H.; Zhao, J. (**2010**) Identification of two small heat shock proteins with different response profile to cadmium and pathogen stresses in Venerupis philippinarum, *Cell Stress Chaperones*, 15, 897-904.

72. Lindquist, S. and Craig, E.A. (**1988**) The heat-shock proteins, *Annual Review* of *Genetics*, 22, 631-677.

73. Liu, J. and Shono, M. (**1999**) Characterization of mitochondria-located small heat shock protein from tomato (Lycopersicon esculentum), *Plant Cell Physiology*, 40, 1297–1304.

74. Mani, N.; Ramakrishna, K.; Suguna, K. (**2015**) Characterization of rice small heat shock proteins targeted to different cellular organelles, *Cell Stress and chaperones*, 20, 451–460.

75. Martin, J. and Hartl, F. U. (**1993**). Protein folding in the cell: molecular chaperones pave the way. *Structure*, 1, 161-164.

76. Millar, D.P. (**1996**) Time-resolved fluorescence spesctroscopy, *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 637-642.

77. Mosser, D.D. and Morimoto, R. (**2004**) Molecular chaperones and the stress of oncogenesis, *Oncogene*, 23, 2907-2918.

78. Muranova, L.K.; Weeks, S.D.; Strelkov, S.V.; Gusev, N.B. (**2015**) Characterization of Mutants of Human Small Heat Shock Protein HspB1 Carrying Replacements in the N-Terminal Domain and Associated with Hereditary Motor Neuron Diseases, *PloS ONE*, 10, 5.

79. Mymrikov, E.V.; Seit-Nebi, A.S.; Gusev, N.B. (**2011**) Large potentials of small heat shock Proteins, *Physiological Reviews*, 91, 1123–1159.

80. Nandi, S.K.; Panda, A.K.; Chakraborty, A.; Ray, S.S.; Biswas, A. (**2015**) Role of Subunit Exchange and Electrostatic Interactions on the Chaperone Activity of *Mycobacterium leprae* HSP18, *PLoS ONE*, 10, 6.

81. Neta-Sharir, I.; Isaacson, T.; Lurie, S.; Weiss, D. (**2005**) Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation, *Plant Cell*, 17, 1829–1838.

82. Pace, C.N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. (**1995**) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Science*, 4, 2411-2423.

83. Porath, J. (**1992**) Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, *Protein Expression and purification*, 3, 263-281.

84. Ramos, C.H.I.; Ferreira, S.T. (**2005**) Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases, *Protein Peptide Letters*, 12, 213-222.

85. Ramos, C.H.I. (**2008**) Prevention of protein misfolding and aggregation by the machinery of molecular chaperones. In: Cian B. O'Doherty; Adam C. Byrne. (Org.).

Proetin Misfolding: New Research. 1ed. Hauppauge: Nova Science Publishers, Inc, v. 1.

86. Ramos, C.H.I. (**2008**) Dicroísmo circular para a análise da conformação de proteínas: uma visão prática. In: Salvatore Giovanni De Simone. (Org.). A arte da caracterização e separação de proteínas. Fortaleza: RDS gráfica e editora Ltda, v. 1.

87. Ramos, Carlos. (**2011**) Molecular chaperones and protein quality control, *Protein and Peptide Letters*, 18, 100-100.

88. Ribeiro-Jr, E.A.; Regis, W.C.B.; Tasic, L.; Ramos, C.H.I. (**2003**) Fast Purification of the Apo form and of a Non-binding Heme Mutant of Recombinant Sperm Whale Myoglobin, *Protein Expression and Purification*, 28, 202-8.

89. Ribeiro-Jr, E.A.; Ramos, C.H.I. (**2004**) Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants, *Analytical Biochemistry*, 329, 300-306.

90. Rudiger, S.; Schneider-Mergener, J. and Bukau, B. (**2001**) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone, *EMBO Journal*, 20, 1042-1050.

91. Saibil H. (**2013**) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation, *Nature*, 14, 630-642.

92. Sambrook, J.; Russell, D.W. (**2001**) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1.124-1.125, A1.27.

93. Sanmiya, K.; Suzuki, K.; Egawa, Y.; Shono, M. (**2004**) Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants, *FEBS Letters*, 557, 265–268.

94. Scharf, K.D.; Siddique, M.; Vierling, E. (**2001**) The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acd proteins), *Cell Stress Chaperones*, 6, 225–237.

95. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. (**2012**) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature methods*, 9, 671 – 675.

96. Siddique, M.; Gernhard, S.; von Koskull-Doring, P.; Vierling, E.; Scharf, K.D. (**2008**) The plant sHSP superfamily: five new members in Arabidopsis thaliana with unexpected properties, *Cell Stress Chaperones*, 13, 183–197.

97. Sobott, F.; Benesch, J.L.P.; Vierling, E.; Robinson, C.V. (**2002**) Subunit Exchange of Multimeric Protein Complexes, *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 38921 – 38929.

98. Stamler, R. ; Kappe, G.; Boelens, W.C.; Slingsby, C. (**2005**) Wrapping the [alpha]-crystallin domain fold in a chaperone assembly, *Journal of Molecular Biology*, 353, 68–79.

99. Stryer, L. (**2004**) Bioquímica. 5ªedição, Rio de Janeiro.

100. Studier, F.W.; Moffatt, B.A. (**1986**) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *Journal of Molecular Biology*, 189, 113-30.

101. Studier, W. F.; Rosenberg, A. H.; Dunn, J. J.; Dubendorff, J. W. (**1990**) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymology*,185, 60-89.

102. Tiroli, A.O. and Ramos, C.H.I. (**2007**) Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane. Involvement of a specific region located at the N-terminus with substrate specificity, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 818-831.

103. Tiroli-Cepeda, A.O. and Ramos, C.H.I. (**2010**) Heat causes oligomeric disassembly and increases the chaperone activity of small heat shock proteins from sugarcane, *Plant Physiology Biochemistry*, 48, 108-116.

104. Tiroli-Cepeda, A.O. and Ramos, C. (**2011**) An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis, *Protein and Peptide Letters*, 18, 101-109.

105. Tiroli-Cepeda, A.O.; Lima, T.B.; Balbuena, T.S.; Gozzo, F.C.; Ramos, C.H.I. (**2014**) Structural and functional characterization of the chaperone Hsp70 from sugarcane. Insights into conformational changes during cycling from cross-linking/mass spectrometry assays. *Journal of Proteomics*, 104, 48-56,

106. Van Montfort, R.L.; Basha, E.; Friedrich, K.L.; Slingsby, C.; Vierling, E. (**2001**) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein, *Nature Structural* Biology, 8, 1025–1030.

107. Van Montfort, R.; Slingsby, C.; Vierling, E. (**2001**) Structure and function of the small heat shock protein/ α -crystallin family of molecular chaperones, *Advances in protein chemistry*, 59, 105-106.

108. Veinger, L.; Diamant, S.; Buchner, J.; Goloubinoff, P. (**1998**) The small heat shock protein lbpB from Escherichia coli stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 11032–11037.

109. Voet, D. and Voet, J.G. (**2011**) Biochemistry, 4th edition.

110. Vierling, E. (**1991**) LMW Heat shock proteins, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 579-620.

111. Waters, E.R.; Lee, G.L.; Vierling, E. (**1996**) Evolution, structure and function of the small heat chock proteins in plants, *Journal of Experimental Botany*, 47, 325-338.

112. Waters, E.R. and Vierling, E. (**1999**) The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses, *Molecular Biology and Evolution*, 16, 127–139.

113. Wettstein, G.; Bellaye, P.S.; Micheau, O.; Bonniaud, P. (**2012**) Small heat shock proteins and the cytoskeleton: An essential interplay for cell integrity?, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44, 1680–1686.

114. Woody, R.W. (1995) Circular dichroism, *Methods in Enzymology*, 246, 34-71.

115. Wyatt, P. (**1993**) Light scattering and the absolute characterization of macromolecules, *Analytica Chimica Acta*, 272, 1-40.

116. Yang, C.; Trent, S.; Ionescu-Tiba, V.; Lan, L.; Shioda, T.; Sgroi, D.; Schmidt, E.V. (**2006**) Identification of cyclin D1- and estrogen-regulated genes contributing to breast carcinogenesis and progression, *Cancer Research*, 66, 11649 – 11658.

9. ANEXOS

9.1. Declaração de biossegurança

