

Caracterização bioquímica e biofísica da Proteína Ligante de acil-CoA

Murilo C. Faleiros¹, Natália Fontana¹, Antonio J. Costa-Filho¹

¹Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

Introdução: Este projeto tem como foco o estudo da proteína ligante de acil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* (ScACBP). Homólogos de ACBP foram encontrados em todos os organismos distribuídos nos quatro reinos eucariotos, possuindo alguma similaridade sequencial (~48%). A sua presença ao longo dos reinos e seu envolvimento em diversos mecanismos metabólicos essenciais relacionados ao éster acil-CoA levaram à conclusão de que se trata de uma *housekeeping protein*, e não uma proteína específica, confinada a um tipo especializado de célula. Neste trabalho, pretendemos fazer uma caracterização bioquímica e biofísica inicial da ScACBP, buscando esclarecer questões como: a influência do éster acil-CoA sobre a estabilidade estrutural da proteína e o mecanismo molecular de interação proteína-membrana. Para tanto, é necessário primeiramente sua caracterização biofísica e bioquímica por: SDS-PAGE, absorção óptica, dicroísmo circular, fluorescência e calorimetria diferencial de varredura. Após sua caracterização, será analisada sua estabilidade com o ligante e sua interação com membrana através de dicroísmo circular e métodos de fluorescência.

Métodos: As proteínas foram clonadas em vetor pET-Sumo e transformadas em Rosetta, sendo selecionadas com clorafenicol e canamicina, induzidas com IPTG e expressas por 18 horas. A purificação se deu por coluna de níquel devido à presença da proteína Sumo, que é clivada pela SUMO protease ULP1, passando por fim por cromatografia por exclusão de tamanho.

Para o dicroísmo circular, foram preparadas amostras de ScACBP com concentração de 7 μ M, com membranas POPC, POPG e POPC/POPG colocadas de razão de 1:20 e 1:50, e também para a proteína apenas em tampão. A preparação para o gel SDS-PAGE deu-se pela coleta de frações em diferentes etapas de purificação, aplicação de corante às frações e aplicação de um marcador de peso molecular em um de seus poços, sendo que os remanescentes foram preenchidos com as frações coletadas.

Resultados e Discussões: As medidas realizadas de dicroísmo circular no espectropolarímetro Jasco J-810 demonstram picos negativos entre 208 e 222nm, como demonstrado na Figura 1, característico de estruturas α -hélice. A comparação entre os espectros obtidos para a proteína em conjunto com as membranas POPC, POPG e POPC/POPG demonstram que suas estruturas secundárias se mantêm expostas caso aconteça interação com a membrana, sendo que na presença de POPG observa-se uma diminuição da intensidade do pico negativo (cores azuis e magenta), enquanto tal diminuição não é observado para a medida apenas com POPC (em vermelho).

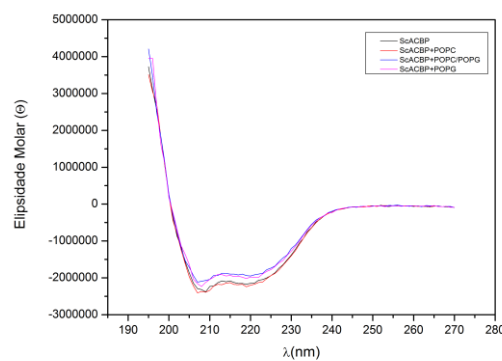


Figura 1 – Dicroísmo circular. Em preto, o espectro para a proteína sozinha em tampão.

Posteriormente serão realizadas medidas de calorimetria diferencial de varredura e utilizados métodos de fluorescência afim de melhor analisar sua interação com membrana e características bioquímicas e biofísicas, para melhor compreender sua conformação e mecanismo de funcionamento.

Conclusões: A expressão e purificação da ScACBP se mostraram eficazes, bem como seu rendimento foi satisfatório. Os espectros obtidos caracterizam a proteína de maneira esperada para sua estrutura bioquímica, e espera-se que os futuros experimentos corroborem com os dados já expostos, além de ajudarem a caracterizá-la bioquímica e biofísicamente.