

CHAPERONES MOLECULARES - OS MESTRES DO ORIGAMI

PAULA C. RAMOS^{1*}, ANA C. MATIAS^{1,2} E ANTÓNIO J. MARQUES²

Uma proteína acabada de ser sintetizada só se torna funcionalmente activa após adquirir a sua estrutura tridimensional nativa. Como é que isso acontece? Embora a informação estrutural de uma proteína esteja contida na sua sequência de resíduos de aminoácidos, as evidências vão crescendo de que a aquisição eficiente de uma estrutura nativa funcional depende, em muitos casos, de uma maquinaria celular complexa que envolve chaperones moleculares e hidrólise de ATP. Se a informação para a obtenção da estrutura de uma proteína é inerente à sua sequência, porque é que os chaperones são necessários? Os chaperones têm como função proteger as cadeias polipeptídicas não nativas de mau-enrolamento e de agregação, servir de catalisadores do enrolamento ou re-enrolamento de uma cadeia polipeptídica na sua estrutura nativa, ou evitar/reverter interacções incorrectas durante, por exemplo, condições de stress. A compreensão de como milhares de proteínas diferentes sintetizadas numa célula utilizam a maquinaria dos chaperones moleculares começa a ter profundas implicações na biotecnologia e medicina.

PALAVRAS-CHAVE: Chaperones, enrolamento de proteínas (folding), proteínas de choque térmico, controlo de qualidade

INTRODUÇÃO

As proteínas acabadas de ser sintetizadas têm de adquirir a sua estrutura tridimensional característica. Apenas uma conformação é extremamente estável e possui as propriedades químicas exactas que permitem que a proteína desempenhe a sua função específica na célula. As proteínas são enroladas de uma forma tão precisa que nalguns casos basta a mudança de um resíduo de aminoácido para perderem a função. Embora esteja provado por experiências *in vitro* que toda a informação necessária ao correcto enrolamento (*folding*) de uma proteína está contida na sua sequência polipeptídica [1], o enrolamento nativo de proteínas dentro das células não é, na generalidade, um processo espontâneo [2]. Ao longo dos últimos anos as evidências são cada vez maiores de que muitas proteínas recém-sintetizadas necessitam de uma maquinaria celular complexa de *chaperones* moleculares e energia metabólica para alcançarem os seus estados nativos eficientemente. A questão que se coloca é a seguinte: se a informação para o enrolamento de uma proteína é inerente à sua sequência,

então porque é que os *chaperones* moleculares são necessários? Os *chaperones* moleculares têm como função proteger as cadeias polipeptídicas nascentes, evitando o mau-enrolamento e agregação de proteínas. A agregação é um problema para as cadeias nascentes que ainda não adquiriram a sua estrutura nativa (Figura 1). Quando uma cadeia nascente é libertada do ribossoma, resíduos hidrofóbicos (normalmente protegidos no interior da proteína), podem ficar expostos e a cadeia, em vez de se enrolar apropriadamente, pode-se associar (agregar) a outras cadeias nascentes que

possuem também resíduos hidrofóbicos expostos. Pensa-se que na célula as proteínas em estados não-nativos têm grande tendência para agregar devido à elevada concentração local de proteínas nascentes nos polirribossomas. Se tomarmos em atenção que o citosol é um meio atulhado de proteínas e outras macromoléculas, a propensão para a agregação de cadeias proteicas não-nativas encontra-se aumentada pela sua concentração efectiva. O “aglomeramento macromolecular” (*molecular crowding*) fornece uma força não específica para a compactação e associação macromole-

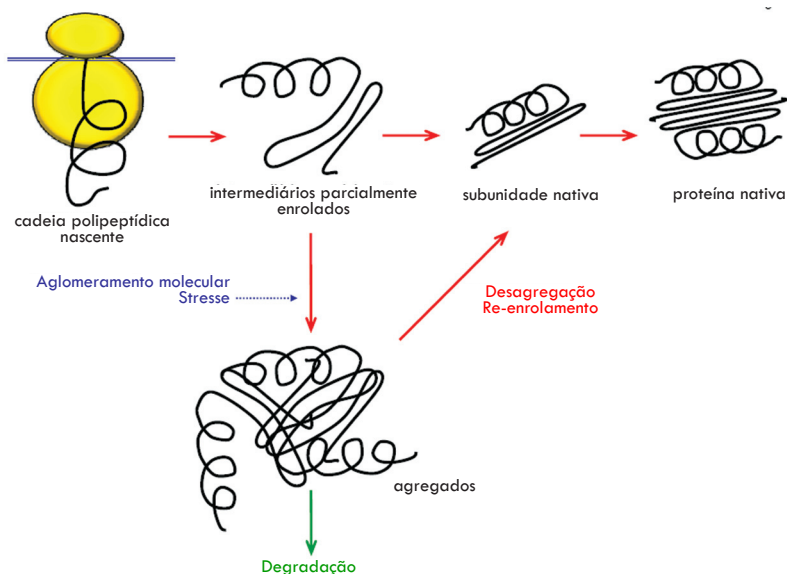


Figura 1 Destinos de uma proteína acabada de sintetizar: aquisição de estrutura nativa e funcional (enrolamento); intermediários parcialmente enrolados são altamente susceptíveis de sofrerem agregação devido ao aglomerado molecular característico da célula ou em condições de stress. Os agregados podem sofrer desagregação e re-enrolamento por acção de *chaperones* ou serem conduzidos a degradação. Setas encarnadas, participação de *chaperones*. Seta verde, acção de sistemas proteolíticos

¹ Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

² Institute for Genetics, University of Cologne, Zùlpicher Str. 47, D-50674 Cologne, Germany

* E-mail: pcramos@ualg.pt

cular que inclui o colapso de cadeias polipeptídicas durante o enrolamento (Figura 1). A agregação remove proteínas irreversivelmente das suas vias produtivas de enrolamento e deverá ser evitado *in vivo* pelos *chaperones* moleculares [3]. O re-enrolamento espontâneo *in vitro* é normalmente eficiente para proteínas pequenas com um único domínio. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos são em milissegundos protegidos no seu interior, logo no início do enrolamento [2]. Ao contrário, proteínas grandes, compostas por vários domínios, frequentemente enrolam-se de uma forma ineficaz, devido à formação de intermediários parcialmente enrolados, incluindo estados mal enrolados, que tendem a agregar [2].

As células necessitam da actividade dos *chaperones* moleculares não só para prevenir a agregação de proteínas com conformação não-nativa, durante a aquisição da sua estrutura aquando da sua síntese, mas também para evitar e/ou reverter interacções incorrectas que ocorrem por exemplo, em condições de stresse, tais como temperaturas elevadas, que provocam o desenrolamento das proteínas expondo superfícies que normalmente estão protegidas no interior. A ligação a um *chaperone* poderá não somente bloquear agregação directa entre as moléculas através de protecção das superfícies interactivas nos polipéptidos não-nativos, incluindo as de subunidades não montadas, como também evitar ou reverter mau enrolamento dentro da própria molécula. Para além de protegerem áreas potencialmente reactivas na sequência polipeptídica, os *chaperones* funcionam também como catalisadores no processo de enrolamento. Tendo em conta que numa bactéria, cujo tempo de duplicação pode estar abaixo de 30 minutos, são sintetizados mais de 30 000 polipéptidos por minuto, a transposição das barreiras energéticas de estados de alta energia (polipéptidos desenrolados) para estados de baixa energia (conformações nativas), induzidas apenas por interacções com o ambiente citosólico, não seria suficientemente rápida e eficaz para permitir a viabilidade celular, especialmente se considerados os polipéptidos maiores que 30kDa. Alguns *chaperones* en-

volvem as cadeias, isolando-as total ou parcialmente do meio exterior e criando o ambiente ideal para que a aquisição das conformações nativas (de alta para baixa energia) ocorra rapidamente e sem interferências [2].

Muitos *chaperones*, embora sejam expressos constitutivamente, são sintetizados em concentrações elevadas em condições de stresse e por isso são classificados como proteínas de stresse ou de choque térmico (*heat-shock proteins* – Hsp). Mas existem *chaperones* que não são proteínas de stresse, bem como existem proteínas de choque térmico que não são *chaperones*. São conhecidos até à data numerosos *chaperones*, mas certamente existirão outros por caracterizar. Existem *chaperones* que são específicos para uma função, como por exemplo o *trigger factor* (TF), e outros que são multivalentes e actuam em vários processos como os Hsp70. Os *chaperones* assistem uma vasta variedade de processos, por exemplo: 1) enrolamento de proteínas nascentes e acabadas de sintetizar; 2) desagregação de proteínas; 3) transdução de sinais; 4) translocação de proteínas do citoplasma para organelos; 5) controlo de qualidade das proteínas; 6) montagem de complexos proteicos.

1. Enrolamento de proteínas nascentes e acabadas de sintetizar

O ribossoma, organelo responsável pela tradução das cadeias polipeptídicas, possui uma subunidade grande cujo comprimento do canal de saída

do polipéptido é de 100Å – o comprimento de uma cadeia distendida com cerca de 30 resíduos de aminoácidos ou uma hélice α com cerca de 65 resíduos [4]. A largura do canal tem em média 15Å, e em princípio, enrolamentos para além de hélices não são espacialmente permitidos dentro do ribossoma [4].

O TF, os Hsp70s e a prefoldina são *chaperones* que se ligam a cadeias polipeptídicas nascentes. Estes *chaperones* são responsáveis pela estabilização das cadeias em elongação nos ribossomas assegurando que se mantenham num estado não agregado (Figura 2). No citoplasma, o processo de enrolamento da cadeia polipeptídica prossegue com a libertação controlada dos factores que se associam ao ribossoma ou através da transferência das proteínas recém-sintetizadas para outros *chaperones* como, por exemplo as chaperoninas (ver abaixo).

A - Chaperones de ligação ao ribossoma

O TF é uma proteína de 48kDa, existente nas eubactérias, que se liga ao ribossoma numa proporção estequiométrica de 1:1 e interage com cadeias emergentes do ribossoma tão pequenas como 57 resíduos de aminoácidos, evitando assim o contacto entre segmentos hidrofóbicos e, portanto, mantendo as cadeias nascentes solúveis (Figura 2 e Figura 4A) [5]. O reconhecimento da cadeia polipeptídica alvo pelo TF é mediado por pequenas sequências ricas em resíduos hidro-

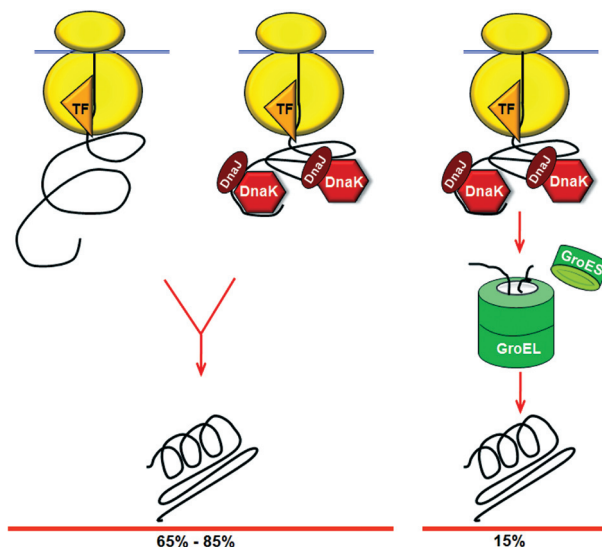


Figura 2 Vias de enrolamento de proteínas acabadas de sintetizar em bactérias e percentagens aproximadas da sua ocorrência

fóbicos/aromáticos. O TF dissocia-se do seu substrato (cadeia nascente) de uma forma independente de ATP, após a libertação da cadeia polipeptídica do ribossoma. O TF possui uma actividade de peptidil-prolil-*cis-trans* isomerase cuja relevância não é ainda compreendida e tem uma função de *chaperone* que se sobrepõe ao sistema Hsp70 bacteriano, DnaK e DnaJ (ver sistema Hsp70, abaixo), na estabilização de cadeias nascentes mantendo-as numa forma competente para subsequente enrolamento [6]. O citosol eucariota não possui TF, mas sim um complexo heterodimérico com duas subunidades α (33kDa) e β (22kDa) designadas por NAC (*nascent chain-associated complex*), que se associa com pequenas cadeias acabadas de emergir do túnel do ribossoma. A dissociação ocorre após a cadeia ser libertada do ribossoma [7].

As leveduras de padeiro, bem como outros fungos, possuem uns homólogos de Hsp70 citosólicos especializados em ligar-se a cadeias polipeptídicas emergentes do ribossoma. Nos eucariotas, ditos superiores, são as próprias proteínas do sistema Hsp70 que actuam tanto co- como pós-traducionalmente. Em *Saccharomyces cerevisiae*, Ssb1 e Ssb2 interagem com o ribossoma e com pequenas cadeias nascentes [8]. Esta função das proteínas Ssb parece ser mediada por outra Hsp70, Ssz1, que forma um complexo estável com o ribossoma e a zutina, designado por RAC (*ribosome-associated complex*). Pensa-se que o RAC e as proteínas Ssb têm uma acção concertada em estabilizar cadeias nascentes.

B - O sistema Hsp70

Os membros típicos da família Hsp70 são *chaperones* monoméricos que não ligam ao ribossoma e se encontram presentes tanto no citosol de células eucarióticas e bacterianas e de algumas arqueobactérias, como em organelos eucariotas tais como mitocôndrias e retículo endoplasmático [3]. **O citosol dos eucariotas ditos superiores contém homólogos de Hsp70 expressos constitutivamente (Hsc70 – heat shock cognate protein 70) e formas induzidas pelo stress (Hsp70).** Na levedura de padeiro existem qua-

tro Hsp70 que não se ligam ao ribossoma e estão presentes no citosol, designadas por Ssa1 a Ssa4.

Os Hsp70 promovem o processo de enrolamento de segmentos peptídicos hidrofóbicos expostos pelas proteínas nos seus estados não nativos, através de ciclos de ligação/libertação do substrato regulados pela sua própria actividade ATPásica e por proteínas co-factores. O ciclo de ligação/libertação do substrato é conduzido pela mudança entre o estado de baixa afinidade para o ATP e o estado de elevada afinidade para o ADP (ver revisões de Young e colegas [9] e de Mayer e Bukau [10]). Este ciclo é controlado tanto por *co-chaperones* da família das Hsp40 (DnaJ), que dirigem os Hsp70 para os seus substratos, como por factores permutadores de nucleótidos que determinam o tempo de vida do complexo Hsp70-substrato.

O mecanismo de acção dos Hsp70 encontra-se bem estudado nas eubactérias. O Hsp70 de *Escherichia coli* é conhecido por DnaK, o seu *co-chaperone* é designado por DnaJ (pertence à família dos Hsp40) e o seu factor permutador de nucleótidos é conhecido por GrpE. O *chaperone* DnaK associa-se preferencialmente a polipéptidos enlongados maiores do que 20 a 30kDa e, portanto, actua nas cadeias nascentes subsequentemente ao TF (Figura 2). O DnaK possui um domínio com cerca de 44kDa no terminal N que tem função ATPásica e um domínio de ligação a péptidos no terminal C com cerca de 27kDa. Em termos de estrutura terciária, o terminal C possui um subdomínio em sanduíche β com um fenda de ligação ao péptido e um segmento em hélice α tipo trinco (Figura 3A).

Os péptidos alvo contêm cerca de sete resíduos de comprimento e são tipicamente hidrofóbicos na sua região central, tendo a leucina e a isoleucina como resíduos preferenciais. Estatisticamente, numa proteína, estes resíduos encontram-se em média em cada 40 resíduos de aminoácidos. A ligação entre o péptido alvo, que se encontra numa forma estendida, e o DnaK ocorre através de interacções hidrofóbicas com as cadeias laterais e por pontes de hidrogénio com o “esqueleto” pep-

tídico. Ou seja, o Hsp70 reconhece aspectos estruturais comuns à maioria das cadeias nascentes. A ligação ao péptido é rápida e ocorre no estado ligado a ATP do DnaK. Neste estado, o “trinco” da hélice α sobre a fenda do domínio de ligação ao péptido está numa conformação aberta (Figura 3B). A manutenção da ligação estável ao péptido capturado envolve o fecho do trinco, uma alteração conformacional obtida através da hidrólise do ATP ligado, a ADP. O ciclo do DnaK entre estes dois estados é regulado pelo *co-chaperone* DnaJ e pelo factor permutador de nucleótidos, GrpE. O terminal N do domínio J do *co-chaperone* DnaJ liga-se ao DnaK e acelera a hidrólise do ATP por este, facilitando a captura do péptido. O terminal C do DnaJ funciona como *chaperone* e está envolvido no reconhecimento de péptidos hidrofóbicos podendo recrutar DnaK para cadeias nascentes. Após a religação de ATP, o complexo DnaK-péptido dissocia-se, completando o ciclo. O enrolamento completo do polipéptido poderá requerer vários ciclos de ligação e libertação.

O sistema Hsp70 em eucariotas é semelhante ao anteriormente descrito para *E. coli*. Homólogos de DnaJ (HDJ1 e HDJ2, em mamíferos ou Ydj1 e Sis1, em *S. cerevisiae*) interagem com os polipéptidos substratos e estimulam a hidrólise de ATP pelos Hsp70 correspondentes (Hsc70 em mamíferos e Ssa1 a 4 em *S. cerevisiae*). Embora não se encontrem ortólogos do factor permutador de nucleótidos GrpE no citoplasma eucariota, a troca de nucleótidos é estimulada por *co-chaperones*, estruturalmente não relacionados, como BAG1 (*BCL2-associated athanogene 1*) e seus homólogos. Outros permutadores conhecidos são o HspBP1 (em mamíferos) e Fes1 (em *S. cerevisiae*).

C – Prefoldina/GimC

A prefoldina, também conhecida por complexo GimC (de genes envolvidos na biogénese dos microtúbulos), é um complexo hexamérico, com cerca de 90kDa composto por duas subunidades α e quatro subunidades β , existente no citosol das arqueobactérias e dos seres eucariotas [3]. Foi, inicialmente, descrita como necessária para

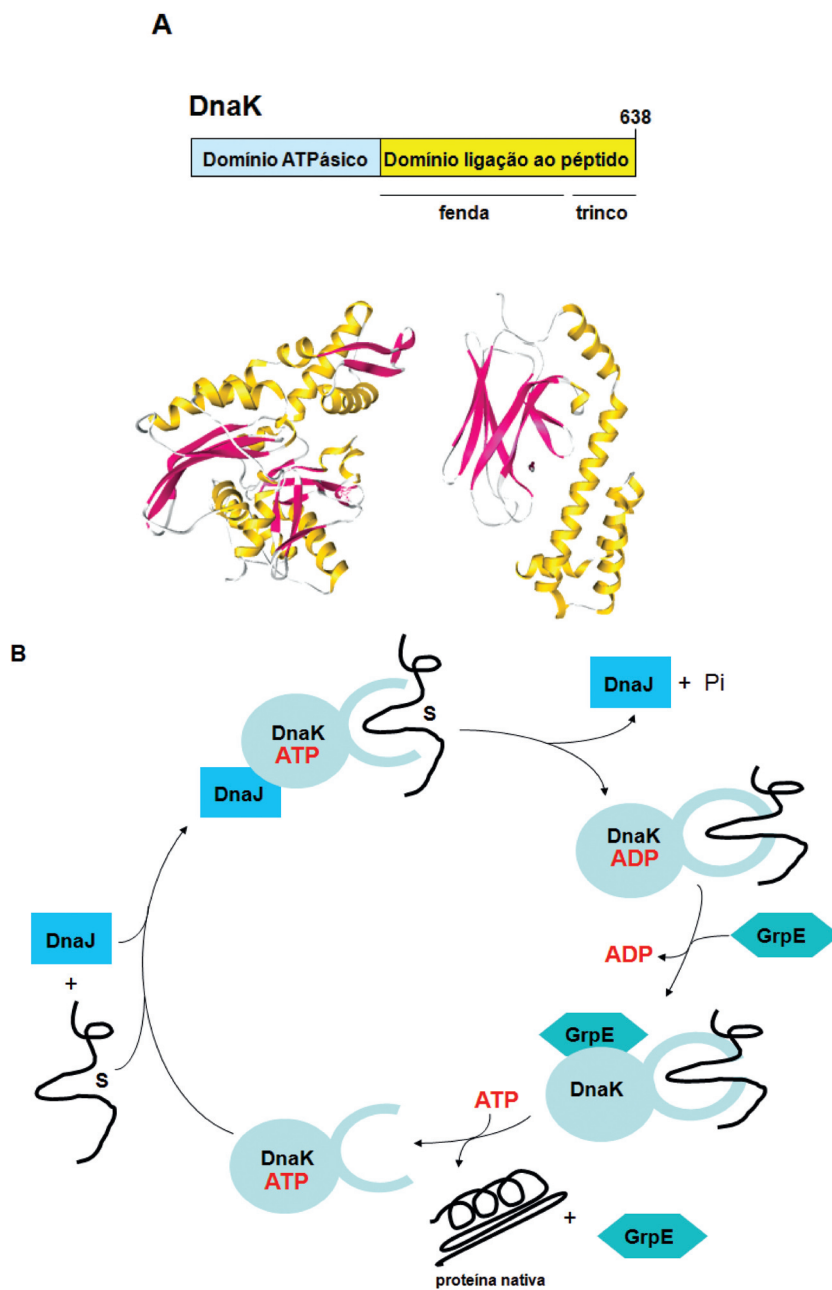


Figura 3 O sistema Hsp70. (A) Organização estrutural da *chaperone* DnaK, estruturas dos domínios ATPásico (esquerda) e de ligação ao péptido do DnaK (direita). As estruturas foram produzidas com o programa PDB viewer. (B) Ciclo de acção do sistema Hsp70 de *E. coli* (ver texto para detalhes). S, proteína substrato

o enrolamento e montagem da tubulina em *S. cerevisiae* e o seu homólogo em mamíferos como responsável por distribuir actina não-nativa ao *chaperone* TRiC *in vitro* [11]. A estrutura da prefoldina parece uma medusa com seis tentáculos em forma de hélice α *coiled-coil* com cerca de 65Å de comprimento agarradas a um corpo em forma de barril composto por estruturas β (ver Figura 4B) [12]. As pontas dos tentáculos estão parcialmente desenroladas expondo resíduos hidrofóbicos para a ligação à proteína substrato não nativa. A prefoldina liga-se a cadeias nascentes durante a sua tradução e transfere-as, poste-

riormente, para a chaperonina TRiC. Cooperar com a chaperonina TRiC no enrolamento da actina e da tubulina, nos passos após tradução. A ligação e libertação do substrato pela prefoldina é independente de ATP.

D - Chaperoninas

As chaperoninas são uma família muito conservada de complexos cilíndricos de grandes dimensões em duplo anel, com cerca de 800kDa. Dispõem de um compartimento central interior onde uma cadeia polipeptídica pode ser enrolada [13]. Embora a ligação/libertação do substrato seja depen-

dente de ATP, o mecanismo de enrolamento é muito diferente do sistema Hsp70. A proteína não nativa é capturada através de contactos hidrofóbicos com as subunidades da chaperonina e uma vez no interior da cavidade é enrolada e libertada para o exterior, não sendo, portanto, possível a agregação com outras proteínas não-nativas. Estão classificadas em dois grupos com arquitectura semelhante, mas com sequências remotamente relacionadas [3,13]. As chaperoninas do grupo I, também conhecido por chaperoninas Hsp60, encontram-se nas eubactérias e nos organelos com origem endossimbiótica, mitocôndrias e cloroplastos e colaboram com os co-factores GroES (Hsp10). Ao grupo II pertencem as chaperoninas que são independentes de Hsp10 e que estão presentes nas arqueobactérias e no citosol das células eucarióticas.

GRUPO I – A chaperonina mais bem estudada é a GroEL (Hsp60) e o seu co-factor GroES (Hsp10) de *E. coli*, figura 5A. A GroEL é constituída por dois anéis heptaméricos com subunidades idênticas de 57kDa [14]. Cada subunidade possui três domínios distintos: o domínio equatorial, que contém o sítio de ligação ao ATP, ligado através de um domínio intermediário, tipo dobradiça, ao domínio apical. Este último faz a abertura do cilindro e expõe um número de resíduos hidrofóbicos na cavidade que liga o substrato. GroES é um anel homo-heptamérico de subunidades com cerca de 10kDa que funciona como o interruptor de GroEL controlada pela ATPase da própria GroEL. A GroEL funcional é assimétrica, uma vez que os dois anéis não se encontram no mesmo estado ligado a nucleótidos [14]. A ligação do substrato ao complexo GroEL-GroES ocorre na extremidade do anel de GroEL que não está ligado a GroES (Figura 5D). Quase simultaneamente ligam-se 7 moléculas de ATP às subunidades do anel de GroEL que acabou de receber o substrato e um complexo GroES, o que provoca o encapsulamento do substrato dentro da cavidade GroEL-GroES. As alterações conformacionais geradas levam à dissociação de GroES que se encontrava ligada ao anel oposto e a libertação de 7 moléculas de ADP. A ligação da molécula de GroES cau-

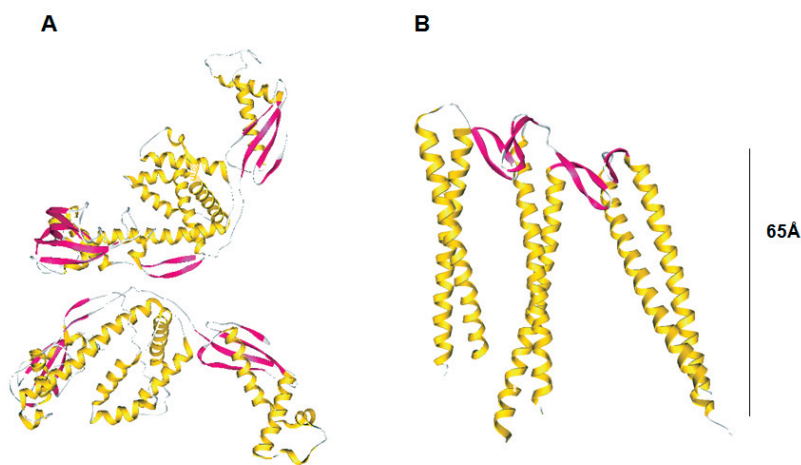


Figura 4 Estruturas tri-dimensionais dos chaperones trigger factor (A) e da prefoldina (B) (As estruturas foram produzidas com o programa PDB viewer)

sa grandes rearranjos conformacionais da cavidade que se torna mais espaçosa e as propriedades da sua superfície interna passam de hidrofóbicas a hidrofílicas. Proteínas não-nativas até cerca de 60kDa podem ser encapsuladas e sofrerem enrolamento no interior da cavidade [3,13].

GRUPO II—As chaperoninas do grupo II também possuem estrutura em anel duplo, embora o número de subunidades por anel varie entre oito e nove [3,13]. Os complexos arqueobacterianos, conhecidos por termossomas, contêm duas ou três subunidades distintas por anel (Figura 5C). A chaperonina eucariota designada por TRiC/CCT (*TCP-1 ring complex/chaperonin-*

containing TCP-1) possui oito subunidades diferentes por anel, com cerca de 50 a 60kDa. As estruturas dos termossomas mostram que o arranjo das subunidades é idêntico ao encontrado na GroEL. O domínio de ligação ao ATP é conservado entre todas as chaperoninas e a divergência maior ocorre no domínio apical que possui uma extensão em hélice α que se projecta para a abertura do anel (Figura 5B).

Como a diferença essencial entre as chaperoninas do grupo I e II é a ausência do factor GroES nas últimas, pensa-se que essas extensões funcionem como uma tampa funcionalmente equivalente a GroES [15].

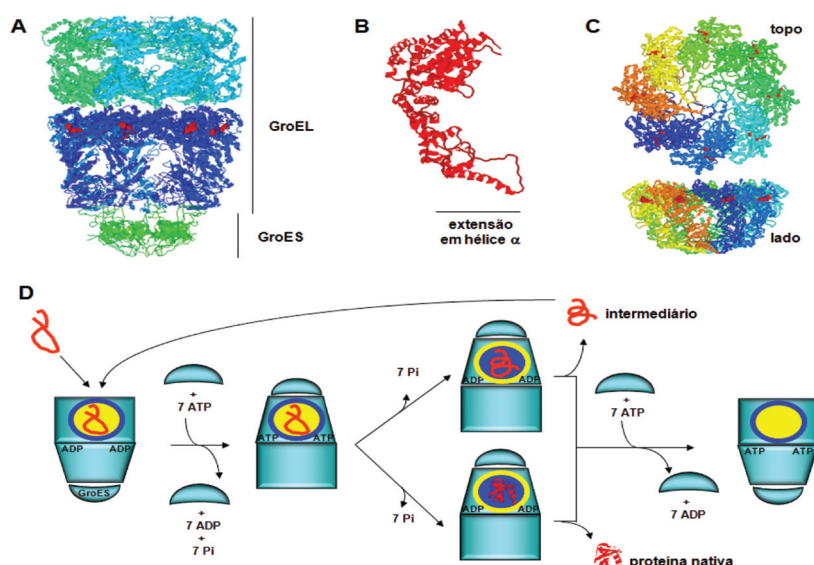


Figura 5 As chaperoninas. (A) Estrutura tridimensional da GroEL/ES de *E. coli*. (B) Estrutura cristalina duma subunidade isolada do termossoma (TRiC) de *Thermoplasma acidophilum*. (C) Aspectos estruturais do anel α do termossoma de *Thermococcus* sp.. Painel de cima, vista de topo. Painel de baixo, vista de lado. Moléculas de ADP, representadas a vermelho em space fill [39]. As estruturas foram produzidas com o programa RasMol. (C) Ciclo de acção da chaperonina GroEL/ES, ver texto para detalhes. Círculo amarelo, superfície apolar. Círculo azul, superfície polar

A forma como as chaperoninas do grupo II medeiam o enrolamento das proteínas está ainda muito pouco esclarecida (ver revisão de Spiess e colegas [16]). A actina e a tubulina foram os primeiros substratos descritos da TRiC, no entanto, actualmente, conhecem-se outros como a ciclina E e várias proteínas contendo domínios WD, ou seja domínios constituídos apenas por folhas β anti-paralelas [16].

2. Desagregação de proteínas

A exposição de células a certas condições de stresse produz agregação massiva de proteínas. Este é um problema comum especialmente nos organismos que não controlam a sua temperatura interna, como bactérias, fungos e plantas. A sobrevivência destes organismos depende da cooperação de um sistema bi-chaperónico, formado por Hsp70 e por Hsp100, que actua na solubilização das proteínas agregadas (desagregação) e na reacquirição da suas estruturas nativas (re-enrolamento) (ver revisão de Liberek e colegas [17]). Curiosamente, cada componente deste sistema, por si só, tem fraca capacidade (Hsp70) ou mesmo nenhuma capacidade de desagregação (Hsp100). Ortólogos de Hsp100 não foram encontrados em células animais, mas encontram-se na maioria das bactérias (ClpB), em *S. cerevisiae* (Hsp104) ou em plantas (Hsp101). O Hsp100 é um *chaperone* em forma de anel constituído por ATPases AAA+ (*ATPases associated with various cellular activities*). A actividade de desagregação de proteínas do Hsp100 está potencialmente relacionada com o desenrolamento que ocorre durante a translocação do polipéptido através do seu canal central [18]. Estudos recentes mostram que o *chaperone* Hsp70 é necessário para a fragmentação de agregados grandes em mais pequenos e que na ausência de Hsp100 os polipéptidos extraídos dos agregados não adquirem o enrolamento correcto, mas voltam a formar novos agregados [19]. Não só o tamanho do agregado é importante como parece ser importante o conteúdo em estruturas β . Observou-se que agregados contendo concentrações elevadas de estrutura β só são

processados na presença de Hsp100 [20]. Com a informação actual disponível, pensa-se que a acção do sistema Hsp70-Hsp100 na desagregação de proteínas ocorre da seguinte forma: primeiro, o *chaperone* Hsp70 desemaranha a cadeia polipeptídica do agregado; segundo, o polipéptido é transferido para o *chaperone* Hsp100 e translocado através do canal central para o seu interior, ocorrendo hidrólise de ATP. Terceiro, o polipéptido é libertado do Hsp100 e ou enrola espontaneamente ou sofre re-enrolamento pelo sistema Hsp70 (ver Figura 6).

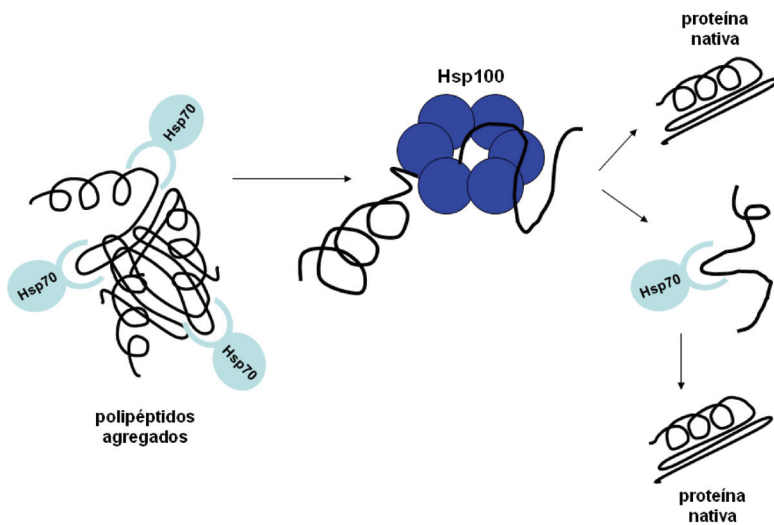


Figura 6 Esquema de actuação do sistema chaperónico Hsp100-Hsp70 na recuperação de polipéptidos agregados

3. Transdução de sinais

O *chaperone* Hsp90 presente nas células eucarióticas, desde a levedura de padeiro a organismos mais complexos como os mamíferos, está envolvido no enrolamento de um diverso leque de proteínas, tais como: factores de transcrição, proteínas envolvidas na transdução de sinais, como por exemplo receptores de hormonas esteróides e cinases reguladoras e outras proteínas que aparentemente não possuem aspectos estruturais ou funcionais semelhantes [21,22].

Ao contrário do que acontece com o Hsp70, o Hsp90 normalmente não actua no enrolamento de proteínas nascentes. O Hsp90 liga-se a proteínas cuja estrutura é próxima da nativa, actuando portanto a um nível do enrolamento final da proteína substrato (Figura 7A). O Hsp90 é um *chaperone* dependente de ATP e opera no cito-

plasma integrando uma maquinaria multichaperónica que inclui o *chaperone* Hsp70, peptidil-propil-isomerases e outros *co-chaperones* [9,23]. A actividade desta maquinaria é modulada por proteínas co-factores que interagem directamente e especificamente com o Hsp70 ou com o Hsp90 ou nalguns casos com ambos os *chaperones* (por exemplo, os *co-chaperones* da família com o domínio TPR-clamp, *tetratricopeptide repeat-clamp domain*). A proteína Hsp90 é homodimérica e cada subunidade possui três domínios bem definidos: i) um domínio de

ligação ao ATP no terminal N; ii) um domínio central que completa o sítio activo da ATPase e liga à proteína substrato; e iii) um domínio de dimerização no terminal C (Figura 7B). A resolução recente da estrutura da proteína HtpG, a Hsp90 de *E. coli*, veio revelar novos aspectos do mecanismo de acção desta classe de *chaperones*. Durante o ciclo ATPásico, os três domínios de Hsp90 passam de um estado aberto - livre de ATP - para um estado fechado - ligado a ATP (Figura 7B). Na ausência de ATP o dímero de Hsp90 encontra-se numa conformação "aberta", ou seja a posição dos dois monómeros é tal que origina uma grande abertura central "forrada" com elementos hidrofóbicos provenientes dos três domínios (estado apo) [24].

O estado apo é o estado mais provável para a ligação de proteínas substrato (Figura 7C). A estrutura sugere que durante o ciclo ATPásico ocorrem rearranjos radicais que conduzem à compactação do Hsp90. A ligação ao ATP induz a dimerização dos terminais N fechando a estrutura. A forma como a ligação do ATP interfere com o rearranjo da estrutura não está ainda clara, o que é óbvio é que, na totalidade, a hidrofobicidade da superfície da abertura central diminui. Pensa-se que então ocorrerá remodelação da proteína substrato. A hidrólise do ATP resulta num estado muito compacto contendo ADP e na libertação da proteína substrato e de *co-chaperones*.

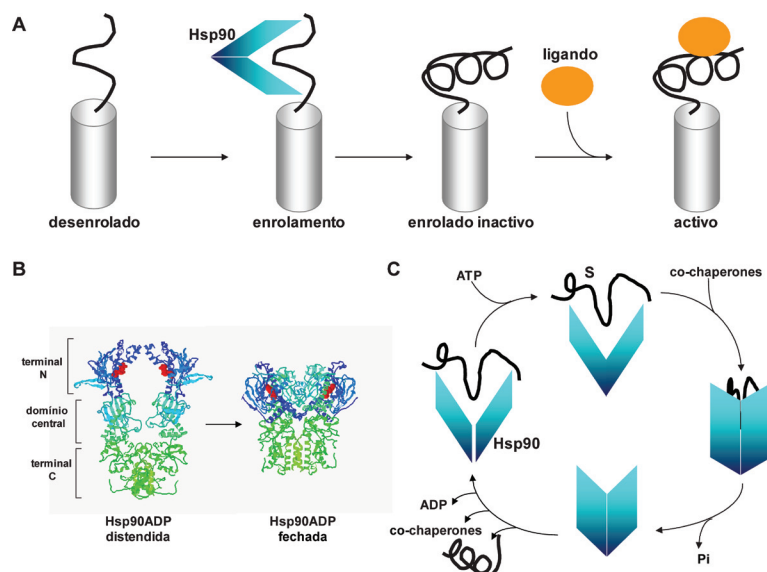


Figura 7 (A) Modelo de um dos tipos de acção do chaperone Hsp90 na vias de transdução de sinais. Os receptores de hormonas esteróides e cinases são enrolados pela maquinaria Hsp90 e após a ligação do ligando tornam-se activos. O cilindro representa a parte já estruturada da proteína substrato do Hsp90. (B) Estrutura do Hsp90 ligada a ADP (a vermelho) nas formas distendida e fechada. As estruturas foram produzidas com o programa PDB viewer. (C) Ciclo de acção do Hsp90. S, substrato

A dissociação do ADP leva ao estado apo (aberto) e pronto para um novo ciclo.

Várias são as questões ainda em aberto sobre o modo de acção do *chaperone* Hsp90. Por exemplo, a forma como as proteínas substrato se ligam aos vários domínios do Hsp90 ou de que forma os *co-chaperones* regulam o ciclo ATPásico, ou ainda como é regulada a especificidade do sistema Hsp90.

4. Translocação de proteínas do citoplasma para organelos

A maquinaria Hsp70-Hsp90 para além de participar no enrolamento de vários polipéptidos desempenha um importante papel na distribuição de proteínas tanto para organelos como para a degradação pelo proteassoma (ver secção controlo de qualidade). As proteínas mitocondriais são na sua maioria sintetizadas no citoplasma numa forma precursora e importadas após a tradução para as mitocôndrias. A membrana externa das mitocôndrias possui um translocase designada por TOM e a membrana interna contém outro translocase conhecido por TIM. A Hsp90 e a Hsp70 de mamífero mantêm a solubilidade de polipéptidos precursores, enquanto no citoplasma, de algumas proteínas da membrana interna das mitocôndrias e medeiam a sua “entrega” ao translocase existente na membrana externa (TOM70) [9,25]. Na levedura de padeiro a Ydj1 associa-se transientemente com a membrana e dirige algumas proteínas para a mitocôndria e para o retículo endoplasmático [26]. Enquanto que, o *co-chaperone* Djp1 (da família das Hsp40) encontra-se especificamente envolvido na translocação de proteínas para os peroxissomas, mas não para o retículo ou para as mitocôndrias [27].

5. Controlo de qualidade das proteínas

A função de uma proteína está associada à sua estrutura tridimensional. Uma vez perdida a estrutura, a proteína deixa de ser funcional. Isto pode acontecer devido a mutações ou devido à exposição das células a determinadas condições de stresse. As células desenvolveram mecanis-

mos de controlo de qualidade que reconhecem proteínas mal-enroladas. O controlo é realizado, por um lado, por *chaperones* que controlam o estado de enrolamento das proteínas e medeiam o seu re-enrolamento e, por outro lado, por proteases responsáveis pela degradação de proteínas mal-enroladas (Figura 1). As ATPases AAA+ são complexos proteicos em forma de anel que podem cooperar tanto com sistemas chaperónicos como com sistemas proteolíticos no controlo da qualidade das proteínas. Nas células eucarióticas o sistema intracelular de degradação de proteínas, dependente de ubiquitina/proteassoma (ver revisão em português de Ramos [28]), é responsável pela remoção de proteínas celulares tanto danificadas (devido a mau enrolamento, ou desnaturação) bem como de proteínas nativas de forma a regular a quantidade disponível da proteína funcional. O proteassoma 26S, o complexo proteolítico responsável pela degradação dos substratos possui na base da partícula reguladora um anel de ATPases AAA+. Por outro lado, a proteína Hsp100, também uma ATPase AAA+, actua independentemente de sistemas proteolíticos e em conjunto com o sistema chaperónico Hsp70 na solubilização e re-enrolamento de proteínas agregadas (ver secção desagregação de proteínas).

Nos mamíferos, a maquinaria Hsp70-Hsp90, para além da sua função como maquinaria de enrolamento de proteínas, está envolvida no controlo de qualidade das proteínas celulares. A proteína Bag1, um factor permutador de nucleótidos do Hsp70, para além de regular o ciclo ATPásico do *chaperone* Hsp70 possui um domínio *ubiquitin-like* que medeia a interacção com o proteassoma. A proteína CHIP (*carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein*) está envolvida na ubiquitilação e degradação de alguns polipéptidos que são substratos da maquinaria Hsp70-Hsp90 uma vez que possui um domínio (TRP-clamp – *tetratricopeptide repeat*) que pode ser reconhecido tanto pelo Hsp70 como pelo Hsp90 e ao mesmo tempo possui actividade de ligase de ubiquitina (E3 do tipo U-Box, [28]). CHIP e BAG1 interagem entre si e pensa-se que recebam substratos não-nativos do sistema Hsp70-Hsp90, medeiam

a sua ubiquitilação e consequente degradação pelo proteassoma.

No retículo endoplasmático, o processo de maturação de uma proteína é acompanhado pela acção de vários enzimas e conduzido por um grande número de *chaperones*. O controlo de qualidade destas proteínas é conduzido por *chaperones* moleculares que dirigem proteínas aberrantes para o sistema ERAD (*ER-associated degradation*) (ver revisões de Brodsky [29] e de Anelli e Sitia [30]).

6. Montagem de complexos proteicos

A importância dos *chaperones* na aquisição da estrutura tridimensional de uma proteína ou no desmantelamento de agregados encontra-se bem reconhecida, mas, normalmente, fica esquecida a importância dos *chaperones* na formação de complexos proteicos multiméricos. No entanto, as evidências são cada vez maiores de que a montagem de proteínas multiméricas é assistida por *chaperones* específicos [31].

O DNA é uma molécula muito longa que se encontra empacotada no núcleo de modo a ocupar pouco espaço. Os nucleossomas são estruturas constituídas por DNA enrolado (cerca de 146 pares de bases) num complexo de proteínas básicas designadas por histonas. A correcta deposição de histonas no DNA acabado de duplicar (replicar) é assistida por *chaperones* nucleares. Os nucleossomas são estruturas muito dinâmicas devido à acção do DNA. Assim, os *chaperones* nucleares estão divididos em dois grupos: a) *chaperones* envolvidos na montagem dependente de replicação; b) *chaperones* envolvidos na montagem independente de replicação. No primeiro grupo encontram-se o CAF-1 (*chromatin assembly factor 1*) e o NAP-1 (*chaperone nucleosome assembly factor 1*). Do segundo grupo constam *chaperones* como a HIRA (*histone-associated regulatory protein*), a nucleoplasmina, a proteína nuclear N1 e o TAF-1 (*template activating factor 1*).

O proteassoma 26S é uma protease multimérica dependente de ATP com cerca de 2000 kDa, que degrada pro-

teínas conjugadas covalentemente com ubiquitina. É constituído por dois complexos regulatórios 19S e por um complexo catalítico de com cerca de 700kDa, designado por proteassoma 20S [28]. A estrutura do proteassoma 20S de *S. cerevisiae* revelou a posição final das 28 subunidades que o constituem. Sete subunidades α diferentes e sete subunidades β distintas organizam-se em quatro anéis empilhados, cada qual constituído por sete membros, numa estequiometria $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ [32]. Embora a estrutura seja conhecida há mais de dez anos, a forma como as 28 subunidades se associam de modo a formar uma estrutura funcional ainda não é totalmente clara. O primeiro *chaperone* a ser descrito envolvido na montagem do proteassoma 20S foi o Ump1 [33]. Actualmente, sabe-se que são vários os *chaperones* que assistem a montagem do proteassoma 20S (Figura 8). O primeiro passo ocorre com a síntese das subunidades α . Um heterodímero constituído pelos *chaperones* PAC1-PAC2 liga-se a algumas subunidades α servindo como alicerce para a montagem de um anel α . Um terceiro *chaperone* Pba3-Pba4 contribui também para organização dos anéis α . As subunidades β_2 , β_3 e β_4 juntam-se ao anel formando o complexo 13S. As restantes subunidades β , bem como o *chaperone* Ump1, ligam-se formando o complexo 15S, com a libertação de Pba3-Pba4. O proteassoma 20S resulta da dimerização dos complexos 15S assistida pelo *chaperone* Ump1 que, após processamento autocatalítico das três subunidades β contendo actividade proteolítica, é degradado

pelo proteassoma, bem como os *chaperones* PAC1-PAC2 [33-36].

Perspectivas futuras

A compreensão do funcionamento e acção dos *chaperones* no enrolamento de proteínas apresenta um enorme potencial do ponto de vista biotecnológico pois poderá servir de base na optimização da produção de proteínas recombinantes (vejam-se algumas aplicações na referência 37). O incorrecto enrolamento de proteínas chave em determinados processos celulares, bem como a acumulação e consequente agregação de proteínas desenroladas estão associados a várias doenças como o cancro, doenças neurodegenerativas e senescência [38]. O melhor conhecimento de como a maquinaria de *chaperones* funciona, permitirá no futuro controlar a acção das proteínas tanto em condições normais como em condições de stress ou em caso de doença.

AGRADECIMENTOS

O trabalho no laboratório de PCR é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, projecto POCI/BIA-PRO/58344/2004. ACM é financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, bolsa SFRH/BD/16951/2004/62qt. AJM é financiado por uma bolsa de doutoramento do programa "Genetics of Cellular Systems" da Forschungsgemeinschaft. Manifestamos o nosso agradecimento ao Professor Jürgen Dohmen pelas facilidades laboratoriais durante a escrita deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [1] C. B. Anfinsen, *Science* **181** (1973) 223-230.
- [2] C. M. Dobson, M. Karplus, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** (1999) 92-101.
- [3] F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl, *Science* **295** (2002) 1852-1858.
- [4] P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **289** (2000) 920-930.
- [5] T. Hesterkamp, S. Hauser, H. Lütcke, B. Bukau, *PNAS* **93** (1996) 4437-4441.
- [6] S. A. Teter, W. A. Houry, D. Ang, T. Trandler, D. Rockabrand, G. Fischer, P. Blum, C. Georgopoulos, F. U. Hartl, *Cell* **97** (1999) 755-765.
- [7] B. Wiedmann, H. Sakai, T. A. Davis, M. Wiedmann, *Nature* **370** (1994) 434-440.
- [8] C. Pfund, N. Lopez-Hoyo, T. Ziegelhoffer, B. A. Schilke, P. Lopez-Buesa, W. A. Walter, M. Wiedmann, E. A. Craig, *EMBO J.* **17** (1998) 3981-3989.
- [9] J. C. Young, V. R. Agashe, K. Siegers, F. U. Hartl, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5** (2004) 781-791.
- [10] M. P. Mayer, B. Bukau, *Cell Mol. Life Sci.* **62** (2005) 670-684.
- [11] M. R. Leroux, M. Fändrich, D. Klunker, K. Siegers, A. N. Lupas, J. R. Brown, E. Schiebel, C. M. Dobson, F. U. Hartl, *EMBO J.* **18** (1999) 6730-6743.
- [12] R. Siegert, M. R. Leroux, C. Scheufler, F. U. Hartl, I. Moarefi, *Cell* **103** (2000) 621-632.
- [13] J. Frydman, *Annu. Rev. Biochem.* **70** (2001) 603-647.
- [14] Z. Xu, A. L. Horwich, P. B. Sigler, *Nature* **388** (1997) 741-750.
- [15] L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, K. O. Stetter, H. Huber, R. Huber, S. Steinbacher, *Cell* **93** (1998) 125-138.

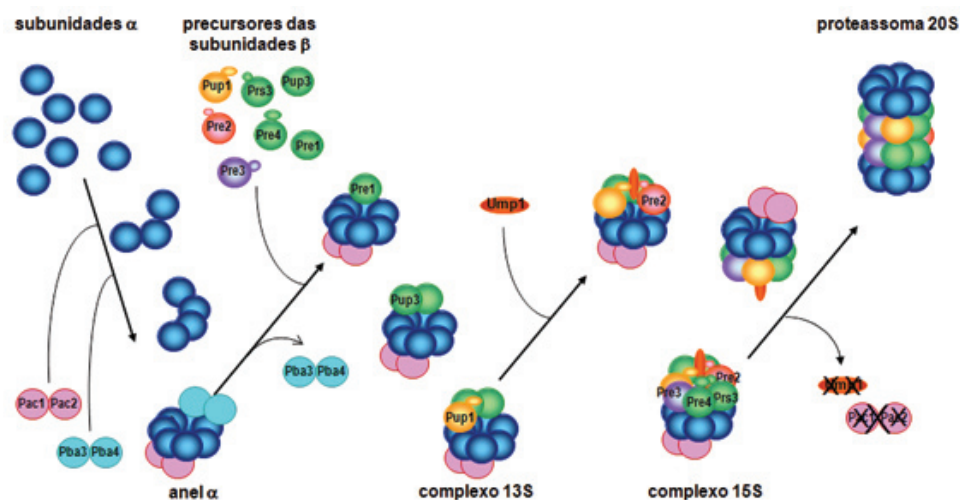


Figura 8 Montagem do proteassoma 20S assistida por *chaperones*

- [16] C. Spiess, A. S. Meyer, S. Reissmann, J. Frydman, *Trends Cell Biol.* **14** (2004) 598-604.
- [17] K. Liberek, A. Lewandowska, S. Zietkiewicz, *EMBO J.* **27** (2008) 328-335.
- [18] J. Weibezahn, P. Tessarz, C. Schlieker, R. Zahn, Z. Maglica, S. Lee, H. Zentgraf, E. U. Weber-Ban, D. A. Dougan, F. T. Tsai, A. Mogk, B. Bukau, *Cell* **119** (2004) 653-665.
- [19] S. Zietkiewicz, A. Lewandowska, P. Stocki, K. Liberek, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) 7022-7029.
- [20] A. Lewandowska, M. Matuszewska, K. Liberek, *J. Mol. Biol.* **371** (2007) 800-811.
- [21] J. C. Young, I. Moarefi, F. U. Hartl, *J. Cell Biol.* **154** (2001) 267-273.
- [22] K. Richter, J. Buchner, *J. Cell Physiol.* **188** (2001) 281-290.
- [23] D. L. Riggs, M. B. Cox, J. Cheung-Flynn, V. Prapapanich, P. E. Carrigan, D. F. Smith, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39** (2004) 279-295.
- [24] A. K. Shiau, S. F. Harris, D. R. Southworth, D. A. Agard, *Cell* **127** (2006) 329-340.
- [25] J. C. Young, N. J. Hoogenraad, F. U. Hartl, *Cell* **112** (2003) 41-50.
- [26] J. Becker, W. Walter, W. Yan, E.A. Craig, *Mol. Cell Biol.* **16** (1996) 4378-4386.
- [27] E.H. Hetteema, C.C. Ruigrok, M.G. Koerkamp, M. van den Berg, H.F. Tabak, B. Distel, I. Braakman, *J. Cell Biol.* **142** (1998) 421-434.
- [28] P. C. Ramos, *Química - Bol. Soc. Port. Qui.* **96** (2005) 57-63.
- [29] J.L. Brodsky, *Biochem. J.* **404** (2007) 353-363.
- [30] T. Anelli, R. Sitia, *EMBO J.* **27** (2008) 315-327.
- [31] R.J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **31** (2006) 395-401.
- [32] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **386** (1997) 463-471.
- [33] P. C. Ramos, J. Höckendorff, E. S. Johnson, A. Varshavsky, R. J. Dohmen, *Cell* **92** (1998) 489-499.
- [34] Y. Hirano, K. B. Hendil, H. Yashiroda, S. Iemura, R. Nagane, Y. Hioki, T. Natsume, K. Tanaka, S. Murata, *Nature* **437** (2005) 1381-1385.
- [35] Y. Hirano, H. Hayashi, S. Iemura, K. B. Hendil, S. Niwa, T. Kishimoto, M. Kasahara, T. Natsume, K. Tanaka, S. Murata, *Mol. Cell.* **24** (2006) 977-984.
- [36] A.R. Kusmierczyk, M.J. Kunjappu, M. Funakoshi, M. Hochstrasser, *Nat. Struct. Mol. Biol. Epub* (2008).
- [37] K. Nishihara, M. Kanemori, H. Yanagi, T. Yura, *Appl. Environm. Microbiol.* **66** (2000) 884-889.
- [38] C.M. Dobson, *Protein Pept. Lett.* **13** (2006) 219-227.
- [39] Y. Shomura, T. Yoshida, R. Iizuka, T. Maruyama, M. Yohda, K. Miki, *J. Mol. Biol.* **335** (2004) 1265-1278.

CURIOSIDADE HISTÓRICA

OS GÉNIOS QUÍMICOS DA LÂMPADA

Embora a paternidade da lâmpada de incandescência seja muitas vezes atribuída a Thomas Edison, na realidade Edison baseou o seu trabalho numa lâmpada descrita por um químico inglês num artigo publicado na *Scientific American*.

Edison trabalhou a invenção desse químico e apresentou a sua versão ligeiramente melhorada (essencialmente em termos da resistência do filamento) em Outubro de 1879, versão que patenteou em Janeiro de 1880 (patente 223 898 de 27 de Janeiro).

A lâmpada incandescente foi de facto inventada por Joseph Wilson Swan, a quem devemos igualmente o papel fotográfico de brometo de prata e trabalho pioneiro com nitrocelulose, um dos primeiros polímeros feitos, ou antes, modificados, pelo Homem.

Swan trabalhava na sua versão da lâmpada incandescente com filamento de carbono desde 1848 mas as bombas de vácuo existentes impediam a construção de uma lâmpada eficiente.

Hermann Sprengel, um químico que trabalhara na Alemanha no laboratório de Robert Wilhelm Bunsen (o mesmo dos bicos de Bunsen), mudou-se para Oxford em 1859.

Sprengel desenvolveu uma bomba de vácuo mais eficiente, a partir da versão inventada por Johann Heinrich Wilhelm Geissler, um mecânico e soprador de vidro que fabricava instrumentos científicos para vários investigadores da Universidade de Bona (que o agraciou com um doutoramento *Honoris Causa* em 1868).

Em 1868, Swan, que tivera conhecimento da bomba de Sprengel pelo trabalho de William Crookes, utilizou-a no aperfeiçoamento das suas lâmpadas. Em 1878, Swan relatou à *Newcastle Chemical Society* o sucesso da lâmpada que demonstrou em Fevereiro de 1879 numa conferência em Newcastle e patenteou no mesmo ano.

De qualquer forma, se não há dúvidas de que não foi Edison o inventor da lâmpada de incandescência nem sequer o primeiro a patentear a mesma, importa não esquecer que a iluminação eléctrica, das ruas principalmente, não se iniciou com Edison como

muitos igualmente pensam.

De facto, em 1802, muitos anos antes de Edison sequer ter nascido, outro químico inglês, Humphry Davy, descobrira o arco voltaico, também designado por arco de Davy, e inventara a lâmpada de Davy, apresentada à *Royal Society* a 9 de Novembro de 1815. As lâmpadas de arco voltaico foram utilizadas durante muitos anos na iluminação pública.

Nomeadamente, três anos antes de Edison nascer, em 1844, o físico francês Jean Foucault, que desenvolveu a invenção de Davy, conseguiu um arco eléctrico suficientemente brilhante para iluminar a Praça da Concórdia em Paris.

De igual forma foi um químico, o austríaco Carl Auer von Welsbach que se doutorou com Robert Bunsen, quem apresentou a primeira lâmpada comercial com filamento de metal.

PS

Where Chemistry Meets Life Science

14 national
chemical societies
of EUChemSoc



are co-owners of
ChemBioChem



Austria



Belgium



Czech Republic



France



Germany



Greece



Hungary



Italy



Netherlands



Poland



Portugal



Spain



Sweden

Subscribe now!

For further information
and to subscribe please
send an E-mail to:

cs-journals@wiley.com

(North and South America)

service@wiley-vch.de

(Germany/Austria/Switzerland)

cs-journals@wiley.co.uk

(all other areas)



ISI Impact
Factor (2006):
4.100

2008. Volume 9.
18 Issues.
ISSN 1439-4227 print
ISSN 1439-7633 online

**ChemBioChem is
a leading journal for
chemical biology and
biological chemistry
covering**

- bioinorganic and bioorganic chemistry
- biochemistry and biophysics
- molecular and structural biology
- biotechnology

Chairmen of the Editorial Advisory Board:

Alan R. Fersht (UK)
Jean-Marie Lehn (France)

Editor: Peter Göllitz

Deputy Editor: Lobat Doostdar

Managing Editor: Lisa Abel

ChemBioChem offers:

- FREE Table of Contents
- Early View – fully citable articles ahead of the printed version
- RSS feeds: Be automatically informed of new articles as soon as they are published online
- An attractive mixture of Communications, Full Papers, Reviews & Minireviews

Visit *ChemBioChem* online www.chembiochem.org



39200712