



Investigação da relação estrutura e função da co-chaperona Hsp40

Objetivo do projeto

Produzir a Hsp40 recombinante de nome AaDnaJ, caracterizar sua conformação e avaliar sua função de chaperona.

Descrição da pesquisa

A primeira etapa da pesquisa foi o estabelecimento do protocolo de purificação para a produção da proteína de interesse. O protocolo era estabelecido à medida que se produzia a proteína e algumas condições eram alteradas para chegar em produções mais puras e eficientes. A produção consiste em duas partes: a expressão e a purificação. Por sua vez a expressão é composta da transformação, pré-inóculo, inóculo e lise; já a purificação por uma etapa de cromatografia de troca iônica e outra cromatografia de gel filtração.

A transformação consiste na inserção do DNA plasmidial através de choque térmico, previsto pelo procedimento descrito por Sambrook, J. e Russell, D.W. (2001) no *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, na célula competente. Tal célula competente é uma mutante da bactéria comumente utilizada em procedimentos genéticos, a *Escherichia coli*.

O pré-inóculo e o inóculo, são procedimentos que são acertados conforme a resposta da expressão proteica, ou seja, não existe um procedimento padrão para todas as proteínas. O pré-inóculo é a primeira fermentação das colônias mais expressivas geradas na expressão, dura no mínimo 12 horas. O inóculo é uma segunda fermentação, auxiliada por uma certa concentração de IPTG, o qual induz a bactéria a produzir mais da proteína desejada.

Por fim, a última etapa da expressão, a lise é o procedimento de romper-se a parede celular bacteriana, através do uso de um ultrassom, a fim de expor todos os seus metabólitos, para que assim fosse possível a purificação do conteúdo.

No seguir da produção tem-se a etapa de purificação, a qual se baseia na separação da proteína de interesse de todo o conteúdo exposto na lise. Para isso, como a proteína gerada na expressão, possui uma massa pequena comparada com o resto dos metabólitos presentes, é necessária uma cromatografia por afinidade para em seguida realizar outra cromatografia por tamanho (SQUIZATO PINHEIRO DE CASTRO, 2015).

A metodologia para essas análises é o HPLC (High performance liquid chromatography ou cromatografia líquida de alta eficiência), onde utiliza-se colunas de diferentes tamanhos e resinas (fase estacionária), as quais interagem com o substrato injetado (fase móvel) realizando variados tipos de separação, como, por exemplo, por tamanho e afinidade (SQUIZATO PINHEIRO DE CASTRO, 2015).

A cromatografia por afinidade empregada é a cromatografia por troca iônica, a qual pode ser de dois tipos: troca catiônica e aniônica. A proteína em estudo que inicialmente se encontra em tampão sem sal, é injetada na coluna de troca catiônica previamente equilibrada, de maneira que logo que entra em contato com o grupo SO_3^- presente na coluna, interage com este.

O cromatógrafo possui um detector de UV, que ao detectar a presença de moléculas complexas como proteínas, dispara em valores altos de absorbância, podendo se observar um pico. Deste modo, é possível se observar o momento que proteínas se desligam da coluna, assim, o conteúdo coletado referente a esses picos de absorbância são armazenados a 4°C para serem analisados pela técnica de eletroforese, para, assim, descobrir qual dessas frações possui a proteína de interesse.

Após a confirmação da expressão da proteína por eletroforese, realiza-se a cromatografia por gel filtração a qual irá separar de maneira mais minuciosa, toda molécula contida na fração injetada, por tamanho oligomérico.

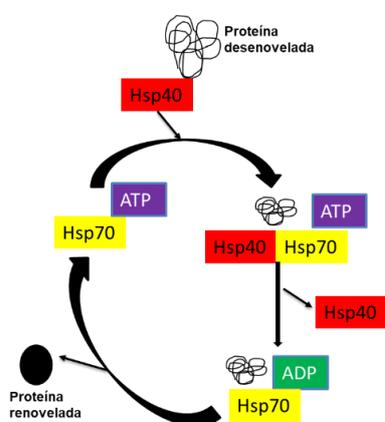
Realizada a produção da proteína estudou-se sua conformação pela técnica conhecida como SEC-MALS. Tal técnica é uma cromatografia de exclusão molecular (SEC) acoplada a



um detector multi-ângulo de espalhamento de luz (MALS), o que permite determinar o estado oligomérico da proteína.

Em seguida estudou-se a atividade de chaperona através da técnica de espectroscopia de fluorescência, analisando-se no equipamento fluorímetro a turbidez da amostra. A chaperona em estudo, pertence ao grupo das Hsp40, o que a faz ser uma co-chaperona, isto é, ela somente impede a desnaturação proteica, sendo a função de renovelamento pertencente a chaperona Hsp70. De maneira esquemática a interação dessas chaperonas com o substrato se dá como apresentado na Figura 1.

Figura 1: Interação de co-chaperonas do tipo Hsp40 com as chaperonas do tipo Hsp70 e um substrato (Arquivo pessoal).



Deste modo, para estudar a atividade de chaperona, é necessário analisar o comportamento da proteína na presença de uma cliente (proteína que sofrerá um estresse, desenovelando-se) sendo esperado que a chaperona, por ser do tipo Hsp40, somente impeça a agregação da cliente. As clientes utilizadas foram a citrato sintase e a luciferase.

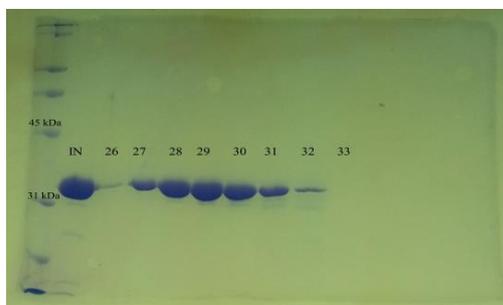
A última análise empregada foi o desenovelamento térmico e espectro em dicroísmo circular. Os espectros de CD de proteínas diferem de acordo com a estrutura secundária, sendo, portanto, possível distinguir estruturas do tipo hélice- α e folhas- β etc. O cromóforo amida predominante no espectro de CD 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). Através dessa técnica, também é possível avaliar a estabilidade térmica, medindo a perda de estrutura secundária com aumento de temperatura.

Resultados

O protocolo de purificação foi estabelecido satisfatoriamente, sendo possível identificar a proteína de interesse por eletroforese após a última etapa da purificação, a cromatografia por gel filtração. Na Figura 2 abaixo apresenta-se o gel obtido da primeira produção de proteína realizada no protocolo estabelecido.



Figura 2: Gel de SDS-PAGE referente ao pico indicado na cromatografia de gel filtração (Arquivo pessoal).

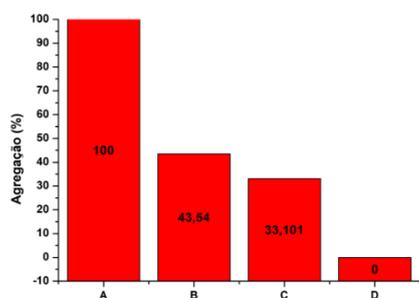


O gel possui 9 colunas, as quais são, na respectiva ordem: marcador, INPUT e os tubos referentes ao pico de absorvância do equipamento. Os marcadores de 45 e 31 kDa estão indicados na imagem, e espera-se que a chaperona esteja indicada próximo ao marcador de 31 kDa, pois sua massa é aproximadamente 29 kDa. Nota-se que as bandas mais intensas são referentes aos tubos 28 ao 30, o que significa que nessas frações há a AaDnaJ em maiores concentrações.

Na análise de SEC-MALS, realizada em triplicata, confirmou-se que a chaperona é monomérica, que seu peso molecular é aproximadamente 28,5 kDa e que seu raio hidrodinâmico é aproximadamente 3,230 rh(Q)z.

A atividade de chaperona com a cliente citrato sintase está representada na Figura 3 e a mesma análise realizada com a luciferase na Figura 4.

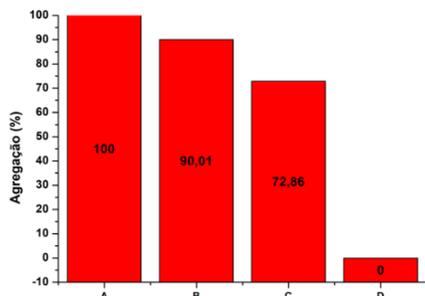
Figura 3: Porcentagem de agregação da cliente citrato sintase na análise (Arquivo pessoal).



A representa a porcentagem da citrato sintase a 2,5 uM; B representa a porcentagem de agregação da 2,5 uM da citrato sintase com 5 uM de AaDnaJ; C representa a porcentagem de agregação da 2,5 uM da citrato sintase com 2,5 uM de AaDnaJ e D representa a porcentagem de agregação de 5 uM de AaDnaJC8.



Figura 4: Porcentagem de agregação da cliente luciferase na análise (Arquivo pessoal).

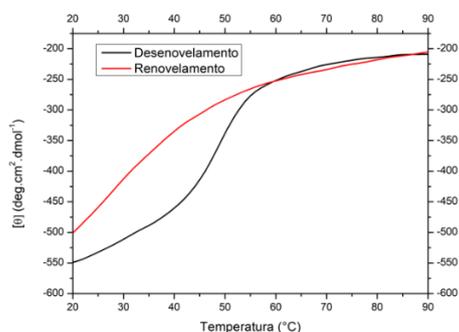


A representa a porcentagem da luciferase a 3,5 uM; B representa a porcentagem de agregação da 3,5 uM da luciferase com 21 uM de AaDnaJ; C representa a porcentagem de agregação da 3,5 uM da luciferase com uM de AaDnaJ e D representa a porcentagem de agregação de 5 uM de AaDnaJC8.

Em ambos os resultados se nota que a capacidade de agregação das clientes não é máxima com a presença da AaDnaJC8, concluindo que está é capaz de proteger a citrato sintase e a luciferase.

Os espectros do desenovelamento e renovelamento da AaDnaJ, em elepticidade molar seguem na Figura 5. O ponto médio da transição na curva de desenovelamento foi de aproximadamente 47°C.

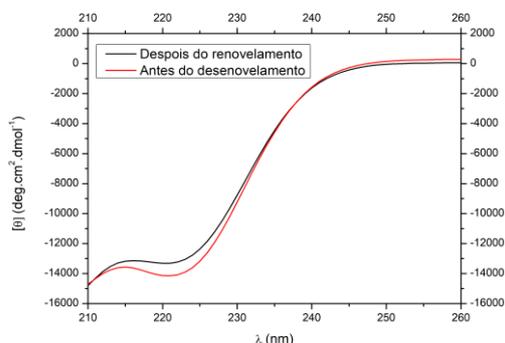
Figura 5: Espectros do desenovelamento e renovelamento térmico (Arquivo pessoal).



Antes e depois de realizar a varredura por temperatura, tirou-se um espectro da proteína para se constatar se essa estava íntegra. Os espectros foram medidos no comprimento de 210 a 260 nm, com aumento gradual de 20 nm/minuto em um total de quatro acumulações. Segue os espectros em elepticidade molar, calculado conforme descrito, na Figura 6.



Figura 6: Espectros da AaDnaJ antes e depois do experimento de desenovelamento térmico (Arquivo pessoal).



Nota-se que os espectros estão quase sobrepostos, isso significa que a proteína após ser submetida a elevada temperatura possui a capacidade de retornar ao estado inicial ao ser resfriada a 20°C novamente. Isso sugere que a AaDnaJ tem a capacidade de se renovar nas condições testadas. Também se nota nos espectros um mínimo, aproximadamente em 222 nm. Esse mínimo é característico de proteínas com predominância de hélice- α em sua estrutura secundária (ZANPHORLIN MURAKAMI; RULLER, 2016). Deste modo, é possível se predizer que a AaDnaJ possui uma maior quantidade de estruturas em α -hélice.

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Calos Henrique Inácio Ramos, Dra. Carolina Oliveira Matos e Dra. Annelize Zambon Barbosa Aragão por terem supervisionado meu trabalho e me ensinado sobre a pesquisa de bioquímica de proteínas. Também agradeço ao Instituto de química da Unicamp e ao CNPq, à FAPESP e ao PIBIC por proporcionarem e financiarem a pesquisa que realizei.

Referências Bibliográficas

- 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.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, the Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SQUIZATO PINHEIRO DE CASTRO, Glauca Melina. **Caracterização estrutural e funcional das chaperonas moleculares SsHSP21.5-mt e SsHSP22.3-cp de Saccharum spp. (cana-de-açúcar)**. 2015. 115 f. Tese de doutorado (Doutorado em ciências) - Instituto de Química, UNICAMP, [S. l.], 2015.
- ZANPHORLIN MURAKAMI, Leticia Maria; RULLER, Roberto. **Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas**. In: ZANPHORLIN MURAKAMI, Leticia Maria; RULLER, Roberto. **Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas**. 2016. Memorando Técnico (Técnico) - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, [S. l.], 2016. f. 8. Disponível em: <http://lnbr.cnpem.br/wp-content/uploads/2016/08/MeT03-2016.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2020.