



Purificação e caracterização da proteína SGT, co-chaperona da Hsp70 e Hsp90 em *Aedes aegypti*

Projeto de Iniciação Científica Voluntária

Laboratório de Bioquímica do Chaperoma e Proteostase (LaBiC) – IQ

Aluno: Rafael de Paula Camacho

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos

Co-orientadora: Dra. Natália Galdi Quel

1) Objetivos

Caracterizar a proteína SGT de *Aedes Aegypti* quanto a sua estrutura e função através dos seguintes objetivos específicos.

- Expressar e purificar a AaSGT selvagem e a mutante AaSGT₁₋₂₀₈ (sem o C-Terminal);
- Caracterizar estruturalmente AaSGT e AaSGT₁₋₂₀₈;
- Caracterizar funcionalmente AaSGT.

2) Introdução

A proteína SGT (*Small glutamine-Rich TPR-containing protein*) faz parte do foldossoma, onde atua como co-chaperona das proteínas Hsp70 e Hsp90 que cumprem funções importantes na homeostase proteica, sendo então, essenciais para a proliferação celular de organismos eucariotos (KRYSZTOFINSKA et al., 2017). SGT interage com ambas proteínas através de seu domínio TPR (*tetratricopeptide repeat*), participando na estabilização do complexo Hsp70/ADP/proteína-cliente e mediando a interação entre Hsp70 e Hsp90 durante a formação do complexo intermediário.

SGT (SGTA em humanos ou SGT2 em leveduras) é dimérica, sendo cada monômero de aproximadamente 35 kDa e composto pelos domínios N-terminal, de dimerização; TPR, de interação com chaperonas; e um C-terminal desestruturado com uma região rica em glutaminas (Q), que interage com a região hidrofóbica de proteínas-cliente (Figura 2). Ainda, o C-terminal possui motivos NNP (asparagina-asparaginaprolina), importantes para a função da SGT (MARTÍNEZ-LUMBRERAS et al., 2018).

SGT também atua no controle de qualidade proteico citoplasmático, reconhecendo e protegendo proteínas que possuam regiões hidrofóbicas expostas, através de seu domínio C-terminal (CHARTRON; VANDERVELDE; CLEMONS, 2012; LEZNICKI et al., 2013). Por meio da interação com o complexo BAG6, SGT direciona essas proteínas para ancoramento em membrana, re-novelamento, reposicionamento na localização celular correta ou degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (ROBERTS et al., 2015). Ainda, SGT juntamente com o complexo BAG6 também participam da degradação associada ao retículo endoplasmático (DARE; em inglês ERAD: Endoplasmic reticulum associated degradation) importante para a sobrevivência celular em situações de estresse (XU et al., 2012). A SGT e o complexo BAG6



reconhecem e estabilizam as proteínas, mantendo-as solúveis no citoplasma, o que evita a agregação das mesmas. Deste modo, elas podem ser enviadas para degradação pelo proteassoma, ou ainda, direcionadas para desubiquitinação, para outro destino que não a degradação (WUNDERLEY et al., 2014).

Dada a importância da SGT na homeostase proteica celular, somada a importância do mosquito *Aedes aegypti* como vetor de doenças endêmicas principalmente em regiões tropicais, a caracterização dessa proteína faz-se essencial para o entendimento da biologia do mosquito de modo a, futuramente, permitir o desenvolvimento de estratégias que visem o controle do mesmo. Este trabalho é parte do trabalho de doutorado da Dra. Natália Galdi Quel, cuja tese foi defendida em agosto de 2019.

3) Resultados

3.1) Expressão

AaSGT WT e AaSGT₁₋₂₀₈ (sem o C-terminal) foram ambas super expressas em *Escherichia coli* BL21 (DE3) por 4 horas, utilizando-se 1M de indutor, em temperatura de 37°C. Observando os géis SDS-PAGE (figura 1), constatou-se que ambas são solúveis, pois se apresentam na linha S (Fração solúvel).

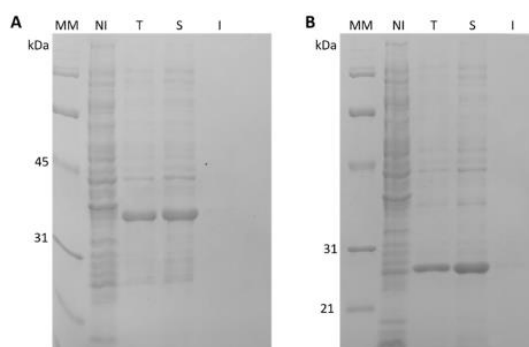


Figura 1: Expressão da AaSGT WT (A) e AaSGT₁₋₂₀₈ (B) em BL21 (DE3) a 37°C por 4h. NI: não induzido (antes da adição do IPTG), T: total, S: solúvel, I: insolúvel. Ambas as proteínas foram expressas de maneira solúvel.

3.2) Purificação

O sobrenadante obtido por centrifugação após a lise de *E. coli* expressando a AaSGT WT ou a AaSGT₁₋₂₀₈ foi submetido à cromatografia por troca aniônica. Tanto AaSGT WT como AaSGT₁₋₂₀₈ foram eluídas na etapa com 35% de tampão NaCl, correspondente a 350 mM (Figuras 5 e 6).

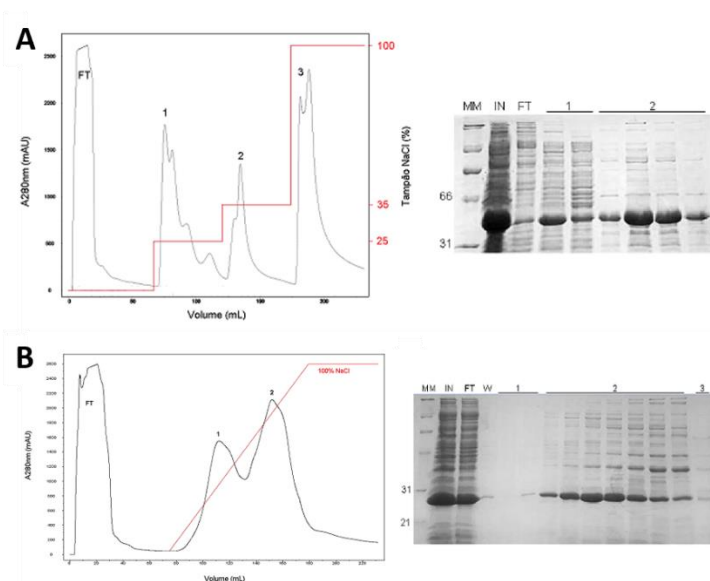


Figura 5: Cromatografia por troca aniônica para purificação da AaSGT WT (A) e AaSGT₁₋₂₀₈ (B). Esquerda: Cromatogramas. Preto: A280nm; Vermelho: gradiente de Tampão contendo NaCl (em etapas de 20%, 35% e 100% para AaSGT WT e linear de 0 a 100% para AaSGT₁₋₂₀₈). Direita: Géis SDS-PAGE, indicando a presença da AaSGT WT e AaSGT₁₋₂₀₈ nos picos denominados 2 (referente à 350 mmol L⁻¹ de NaCl (35%)). MM: padrão de massa molecular; IN: “input” FT: “flow through”.

As frações obtidas na cromatografia por troca aniônica foram concentradas e dialisadas contra tampão Tris-HCl 25 mmol L⁻¹, NaCl 200 mmol L⁻¹, pH 8 e submetidas a cromatografia por filtração em gel. AaSGT WT foi eluída em aproximadamente 173 mL, como demonstrado pela presença da proteína nas frações correspondentes ao pico de maior absorbância (Figura 7). AaSGT₁₋₂₀₈ foi eluída em aproximadamente 210 mL, como demonstrado pela presença da proteína nas frações correspondentes ao pico de maior absorbância (Figura 8).

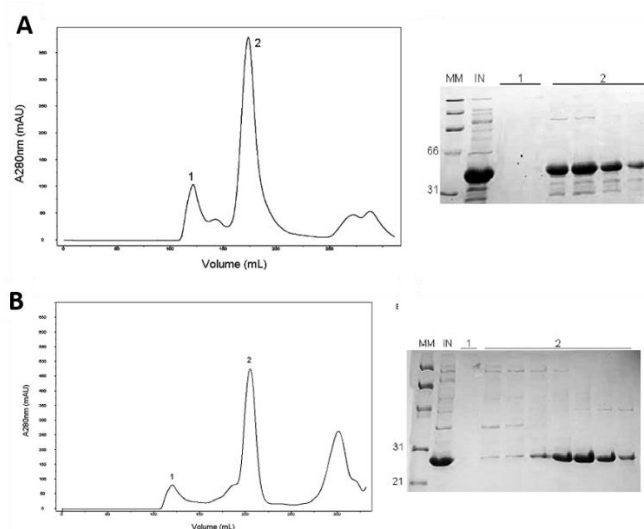


Figura 7: Cromatografia por filtração em gel para purificação da AaSGT WT (A) e AaSGT₁₋₂₀₈ (B). Direita: Cromatograma, demonstrando a eluição em dois picos, sendo o primeiro no volume



morto da coluna. Esquerda: Géis SDS-PAGE, demonstrando a presença da AaSGT WT e AaSGT₁₋₂₀₈ nos picos denominados 2. MM: padrão de massa molecular; IN: "input".

3.3) Caracterização conformacional e funcional

3.3.1) Avaliação da estrutura secundária

AaSGT WT e AaSGT₁₋₂₀₈ foram avaliadas quanto a sua estrutura secundária pela técnica de espectropolarimetria de dicroísmo circular. Os respectivos espectros apontam que ambas as proteínas se apresentaram enoveladas (Figura 9). Ainda, as bandas negativas em 208 e 222 nm as caracterizam como proteínas compostas majoritariamente de hélices α .

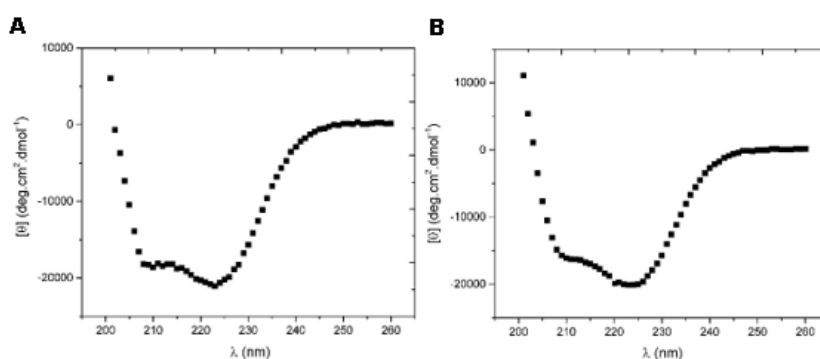


Figura 9: Espectro de dicroísmo circular de AaSGT WT (A) e AaSGT₁₋₂₀₈ (B).

3.3.2) Avaliação da atividade chaperona da AaSGT

Afim de averiguar a atividade chaperona da AaSGT, utilizou-se α -sinucleína como proteína modelo. A α -sinucleína possui região central rica em resíduos hidrofóbicos (GIASSON et al., 2001). Tal região tende a agregação em meio hidrofílico, sendo então possível a utilização desta proteína como modelo de cliente para a SGT. A α -sinucleína foi expressa em *E. coli* e purificada conforme Hoyer et al (2002). AaSGT e α -sinucleína foram incubadas na proporção de dois para um (monômeros) à 42°C sob agitação constante durante 48 horas. Após incubação, adicionou-se ThT (tioflavina T) em concentração final de 20 μ mol L⁻¹ (1:1, v:v) e realizou-se medidas de fluorescência. O espectro de fluorescência comprova atividade chaperona da AaSGT, o qual demonstra uma proteção de agregação relativa à α -sinucleína sozinha de aproximadamente 95% (Figura 10).

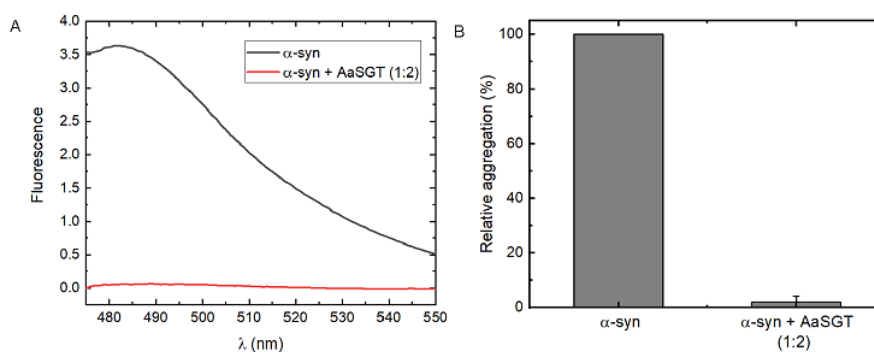




Figura 10: Avaliação da atividade chaperona da AaSGT. A. Espectro de Fluorescência, Preto: α -sinucleína sozinha, apresenta máximo em 482 nm. Vermelho: AaSGT + α -sinucleína. B. Gráfico comparativo da agregação da α -sinucleína na presença da AaSGT relativa à α -sinucleína sozinha. Utilizou-se os valores de emissão de fluorescência a 482nm, e o valor obtido para α -sinucleína sozinha foi considerado como 100%.

4) Conclusões

AaSGT WT e AaSGT₁₋₂₀₈ foram expressas enoveladas, são solúveis e compostas majoritariamente de hélices α . AaSGT demonstrou atividade chaperona frente a α -sinucleína, com 95% em proteção de agregação relativa.

5) Agradecimentos

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelos financiamentos; à PRP-UNICAMP pelo oferecimento do PIBIC; ao Instituto de Química pela infraestrutura e apoio técnico e a todos os membros do Laboratório de Bioquímica do Chaperoma e Proteostase.

6) Referências

CHARTRON, J. W.; VANDERVELDE, D. G.; CLEMONS, W. M. Structures of the Sgt2/SGTA Dimerization Domain with the Get5/UBL4A UBL Domain Reveal an Interaction that Forms a Conserved Dynamic Interface. *Cell R*, v. 2, p. 1620–1632, 2012.

GIASSON, B. I. et al. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *The Journal of biological chemistry*, v. 276, p. 2380–2386, 2001.

HOYER, W. et al. Dependence of α -Synuclein Aggregate Morphology on Solutions Conditions. *Journal of Molecular Biology*, v. 322, p. 383–393, 2002.

KRYSZTOFINSKA, E. M. et al. Structure and Interactions of the TPR Domain of Sgt2 with Yeast Chaperones and Ybr137wp. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, p. 68, 2017.

LEZNICKI, P. et al. The Association of BAG6 with SGTA and Tail-Anchored Proteins. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e59590, 2013.

MARTÍNEZ-LUMBRERAS, S. et al. Structural complexity of the co-chaperone SGTA: a conserved C-terminal region is implicated in dimerization and substrate quality control. v. 6, p. 1–18, 2018.

ROBERTS, J. D. et al. Structural and Functional Insights into Small, Glutamine-Rich, Tetratricopeptide Repeat Protein Alpha. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 2, 18 dez. 2015.

WUNDERLEY, L. et al. SGTA regulates the cytosolic quality control of hydrophobic substrates. *Journal of Cell Science*, v. 127, p. 4728–4739, 2014.

XU, Y. et al. SGTA Recognizes a Noncanonical Ubiquitin-like Domain in the Bag6-Ubl4ATrc35 Complex to Promote Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Cell Reports*, v. 2, p. 1633–1644, 2012.