



Caracterização conformacional e funcional da chaperona Hsp70 do *Aedes aegypti*

Palavras-Chave: Caracterização, chaperona, Hsp70

Autores:

Claudia de Lourenço, UNICAMP

Bárbara Cristina Trainotti Amaro (coautora), UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (orientador; cramos@unicamp.br), UNICAMP

1. INTRODUÇÃO:

Para que uma proteína possa desenvolver suas funções, ela precisa estar em seu estado enovelado, o qual é solúvel e funcional. Portanto, muitas proteínas necessitam de auxílio para se enovelar, e este auxílio é providenciado por chaperonas moleculares e Hsps ('heat shock proteins'). A Hsp70, potenciada pela hidrólise de ATP, consegue agir como uma 'enovelase', auxiliando tanto no enovelamento de novas proteínas quanto na reativação de aglomerados protéicos. A inibição deste complexo aumenta a sensibilidade celular a vários tipos de estresses, enquanto a superexpressão do sistema leva a um efeito contrário e benéfico, chegando inclusive a reverter fenótipos causados por amiloidogênese. Assim, esse projeto tem o intuito de ampliar nosso conhecimento das características da Hsp70 do organismo do *Aedes aegypti* (AaHsp70), a fim de desenvolver possíveis estratégias para combatê-lo. Os objetivos são: fazer comparações entre a sequência de aminoácidos da AaHsp70 com as sequências homólogas de outros organismos; obter a AaHsp70 a partir da expressão do seu cDNA; fazer a clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante e caracterizar sua conformação. O presente projeto teve seu prazo abreviado devido ao cancelamento do contrato e dos inconvenientes trazidos pela pandemia de COVID-19. Contudo, foram conseguidos diversos resultados, os quais são relevantes para o estudo da AaHsp70.

2. METODOLOGIA:

Para a etapa de identificação da sequência, foi realizada a busca através do banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), do inglês *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas), pelo gene responsável pela sua codificação, a partir da sequência da Hsp70 humana (*template*). Com o *template*, foi feita uma busca através da plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), do inglês *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local), para encontrar regiões de similaridade com a AaHsp70. A sequência obtida foi comparada com a adquirida comercialmente utilizando a ferramenta de alinhamento Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). O gene que codifica para AaHsp70 foi então obtido comercialmente clonado em vetor de expressão pelo sistema pET.

A sequência da AaHsp70 obtida foi comparada com a de outros organismos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Leishmania braziliensis* e *Saccharum officinarum*)

para se obter a porcentagem de identidade e avaliar a proximidade evolutiva entre elas, através do levantamento de uma árvore filogenética também através da ferramenta Clustal Omega.

Na etapa de purificação, os seguintes procedimentos foram feitos: Expressão: a bactéria utilizada foi a *E. coli* Origami 2 (DE3), as quais foram transformadas com o plasmídeo contendo o gene de interesse e colocadas para crescerem em meio LB com 30 µg/mL de canamicina e 10 µg/mL de tetraciclina, à 37° C e sob agitação. A expressão foi induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG à 20° C. Após 24 horas, essas células foram centrifugadas (15 min., 4° C, 2450 g) para remover o meio de cultura. Lise: as bactérias foram lisadas utilizando 200 µL de PMSF, 12 µL de lisozima, 4 µL de DNase e 20 mL de tampão A, (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl e 1mM DTT; pH 7,5); seguido do uso de um sonificador (amplitude: 40; Pulse ON: 10s; Pulse OFF: 1,30 min; Process Time: 2 min). O conteúdo lisado foi centrifugado (15 min., 4°C, 18000 g) e o sobrenadante foi filtrado com filtro milipore de 0,45 µm. Cromatografia de afinidade: a amostra filtrada foi injetada numa coluna carregada com sulfato de níquel. A eluição acontece com a presença de imidazol. Para se encontrar a concentração de imidazol para a sua eluição, foi realizado um gradiente linear do tampão B (25 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 500 mM imidazol; 1 mM DTT; pH 7,5) de 0 até 500 mM de concentração de imidazol, até se obter a eluição da proteína. Amostras foram recolhidas para realização de SDS-PAGE. SDS-PAGE: foi utilizada com as amostras recolhidas na etapa anterior, para se encontrar em qual concentração de imidazol houve uma melhor eluição da AaHsp70. Cromatografia por gel filtração: essa etapa foi utilizada como passo adicional de purificação e verificação de possíveis artefatos agregados. A amostra foi injetada numa coluna de resina Superdex 200 com 320 mL, equilibrada com tampão TKP (25 mM Tris-HCl; 500 mM NaCl; 5 mM KCl; 5 mM Na₂HPO₄; 5 µM MgCl₂; 1 mM DTT; pH: 7,5), em um fluxo de 2 mL/min.

Para o experimento do dicroísmo circular (CD), foi utilizado um espectropolarímetro modelo Jasco J-810, medindo-se primeiramente os sinais de CD obtidos pela exposição da amostra contendo apenas proteína, seguido pela exposição apenas do tampão TKP, para que pudesse ser feita a sua subtração. A varredura compreendeu os comprimentos de onda (λ) de 205 a 260 nm. Utilizou-se uma cubeta de vidro de 0,2 cm de caminho óptico, e uma concentração da proteína de 4,0 µM. O cálculo da elipticidade molar é obtido através da fórmula:

$$f H = \frac{[\theta]_{222 \text{ nm}} - 3000}{-36000 - 3000} \quad (\text{Equação 1})$$

Por fim, para a predição da estrutura secundária, utilizou-se da ferramenta de bioinformática PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), do Departamento de Ciência e Computação da Universidade de Londres. O resultado foi comparado com o obtido experimentalmente pelo CD.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Análise e comparação da sequência:

A sequência adquirida comercialmente apresentou 100% de identidade com a obtida pela ferramenta BLAST, indicando que ela realmente se refere a proteína de interesse, AaHsp70, conforme a Tabela 1:

Tabela 1: Porcentagem de identidade entre as sequências de AaHsp70 e da obtida comercialmente.

Proteína/Organismo	Número de acesso	Porcentagem de identidade
Hsp70 (<i>Aedes aegypti</i>)	ACJ64198	100%

A comparação da sequência de AaHsp70 com a de outros organismos apresentou as porcentagens de identidade demonstradas na Tabela 2:

Tabela 2: comparação da sequência de AaHsp70 com a de outros organismos.

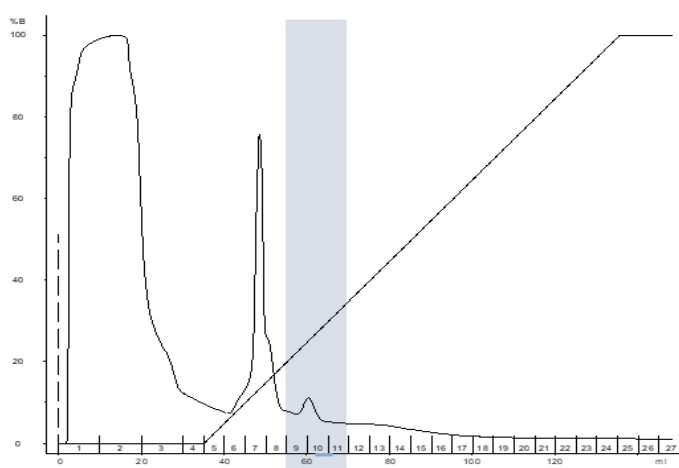
Proteína/Organismo	Número de acesso	Porcentagem de identidade
Hsp70 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	NP_524927	79,72%
HSPA1L (<i>Homo sapiens</i>)	AQY76891	74,29%
Hsp70 (<i>Mus musculus</i>)	NP_038586	74,13%
Hsp70 (<i>Leishmania braziliensis</i>)	AAG01344	68,03%
Hsp70 (<i>Saccharum officinarum</i>)	ANN87873	30,74%

Com os dados da Tabela 2, obteve-se a seguinte árvore filogenética, conforme Figura 1:



Figura 1: Árvore filogenética com proteínas Hsp70 homólogas.

3.2. Purificação



Após a expressão da AaHsp70, foi realizada a afinidade linear. A proteína de interesse eluiu no pico referente as frações 9, 10 e 11 (Figura 2), que correspondem a maior quantidade de AaHsp70 de acordo com a análise feita por SDS-PAGE (Figura 3). Essas porções representam uma concentração de aproximadamente 200 mM de imidazol.

Figura 2: Cromatografia de afinidade. AaHsp70 foi eluída nas frações 9, 10 e 11.



Figura 3: SDS-PAGE. M: marcador molecular, inpt: injetado na coluna; números correspondem àqueles apresentados na cromatografia da Figura 2. Eluatos 9, 10 e 11 mostram uma maior concentração de Hsp70.

Com as amostras das frações 9, 10 e 11, obteve-se o seguinte perfil de eluição na cromatografia de gel filtração (Figura 4):

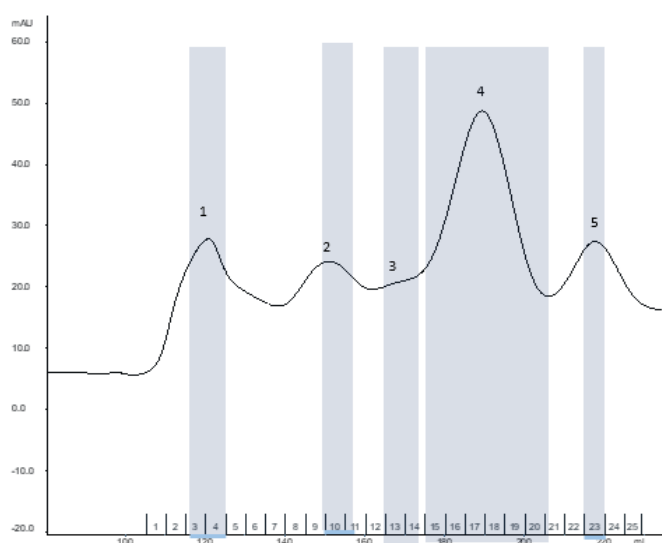


Figura 4: Cromatografia de gel filtração da AaHsp70 realizada com as frações 9, 10 e 11 da afinidade.

Todos os picos, do 1 ao 5, são formados pela AaHsp70, porém em diferentes estados oligoméricos. O primeiro é composto por agregados proteicos de AaHsp70, que correspondem ao volume morto. O quarto, representado pelas porções 15 a 20, foi escolhido para ser utilizado no experimento do CD, pois foi o maior pico apresentado e, de acordo com as análises de Hsp70 de outros organismos já estudados pelo grupo, são nessas frações que há uma maior concentração dessa proteína.

3.3. Dicroísmo circular (CD)

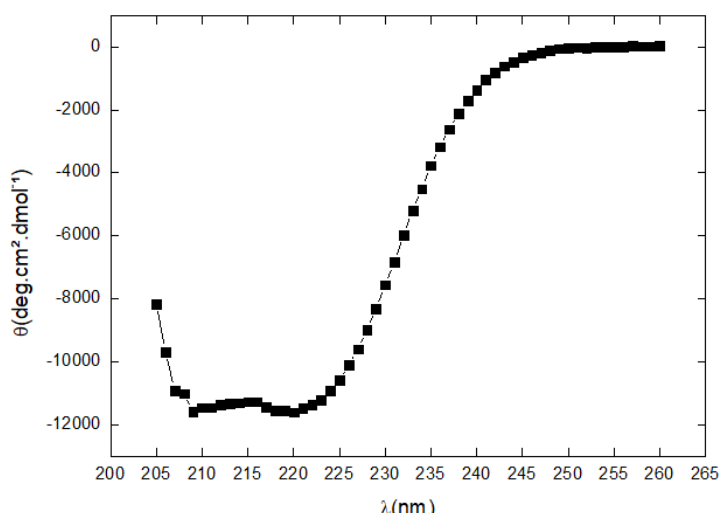


Figura 5: Gráfico de comprimento de onda (nm) por CD (deg.cm².dmol⁻¹) da proteína AaHsp70 subtraída de seu tampão.

Observa-se, pelo gráfico da Figura 5, um mínimo de sinal nos comprimentos de onda de 222 e 208 nm, o que é característico de uma proteína cuja estrutura secundária é composta principalmente por hélices- α . Fazendo-se os cálculos, utilizando-se da equação 1, obtém-se:

$$f H = \frac{-11361,26357 - 3000}{-36000 - 3000} = 0,368 = 0,37$$

Portanto, a quantidade de α -hélices encontrada na proteína AaHsp70 foi de 37%.

3.4. Predição de estrutura secundária

Sabendo-se que a AaHsp70 possui 671 resíduos e utilizando-se da ferramenta PSIPred, foi encontrado um número total de resíduos referente a hélices- α de 252, correspondendo a 37,55% da proteína. Assim, a predição teórica coincidiu com a porcentagem experimental obtida por meio do CD.

4. CONCLUSÕES:

Apesar de todas as dificuldades enfrentadas devido à pandemia de Covid-19 e às restrições impostas à comunidade, o trabalho de pesquisa da AaHsp70 conseguiu cumprir seus objetivos. Foi obtida a sequência da proteína e, quando comparada com as sequências homólogas de outros organismos, obteve-se o resultado esperado; o gene para AaHsp70 foi clonado em vetor para expressão em bactéria; a proteína foi purificada e teve sua estrutura secundária analisada experimentalmente por CD, que apresentou o mesmo resultado previsto teoricamente.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Departamento de Ciência e Computação da UCL: Grupo de Bioinformática. Disponível em: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>
2. NCBI. NCBI BLAST . Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
3. NCBI. NCBI GENBANK. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
4. 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