

## Determinação do coeficiente estequiométrico da interação entre as isoformas da co-chaperona Aha e a Hsp90 de *Plasmodium falciparum*

Isabela Espirito Santo Lopes

Arthur Moraes Franco da Rocha

Prof. Dr. Júlio César Borges

Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos

ilopes@usp.br

### Objetivos

Este trabalho tem como objetivo expressão e purificação das proteínas Hsp90 de *P. falciparum* e suas variantes truncadas PfHsp90M e PfHsp90NM, com as suas co-chaperonas PfAha2 e PfAha4, além de determinar a estequiometria da interação entre elas por meio de técnicas biofísicas, e avaliar a possível formação do complexo ternário.

### Métodos e Procedimentos

As proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho foram produzidas a partir dos plasmídeos pET28a, que codifica uma sequência de 6 histidinas vicinais na extremidade N-terminal. Para isto, os respectivos plasmídeos foram usados para transformar cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3). O processo de indução foi feito por meio de 0,4 mM de IPTG em 30 °C e 200 rpm. Após isso, ocorreu o processo de purificação, em que o pellet bacteriano foi ressuspenso em uma solução tampão, DNase, e lisozima, e depois incubado por 30 min no gelo. Em seguida, a amostra foi submetida a pulsos ultrassônicos intermitentes, posteriormente centrifugou-se e, filtrou-se a amostra através de uma membrana de 0,45 µm. A seguir, o lisado bacteriano foi submetido pela cromatografia de afinidade ao níquel, sendo carregada a coluna HisTrap Chelating, que foi eluída com tampão de Tris-HCl (pH 7,5) contendo imidazol 500

mM. Após essa etapa a amostra foi submetida a uma diálise em tampão de 200 mM de NaCl, 200 mM de TRIS-HCl (pH 7,5), por 8h na presença de trombina para a remoção da HisTag. O passo seguinte da purificação se deu através da cromatografia de exclusão por tamanho preparativa e usou a coluna Superdex 200 16/60, que foi equilibrada com o mesmo tampão da diálise. A eficiência de purificação foi aferida por técnica SDS-PAGE.

As análises feitas após a purificação foram com o intuito de avaliar o conteúdo de estruturas secundárias e terciárias das amostras, sendo realizadas respectivamente por meio de dicroísmo circular (CD) e espectrofotometria de fluorescência intrínseca do triptofano, em ambas as técnicas as proteínas foram preparadas em tampão HEPES 4 mM, KCl 2,5 mM (pH 7,5).

### Resultados

Os rendimentos observados foram para as co-chaperonas PfAha2 e PfAha4 e o mutante truncado Hsp90M. Por outro lado, a PfHsp90 e PfHsp90NM o rendimento foi baixo (dados não mostrados). As análises da purificação por SDS-PAGE indicaram com alto grau de pureza (dados não mostrados).

As análises por CD e por fluorescência intrínseca do triptofano indicaram que todas as proteínas foram obtidas com estrutura secundária e estrutura terciária. A Figura 1 que representa os resultados do CD, apesar das

suas características ruidosas, pode-se observar picos negativos em 222 nm, o que nos indica a presença da hélice alfa. Além disso, somente nos gráficos das chaperonas observa-se um pico negativo em 208 nm que também indica a presença de hélices alfa. Outro pico que podemos visualizar é o de 215 nm, que retrata as folhas beta.

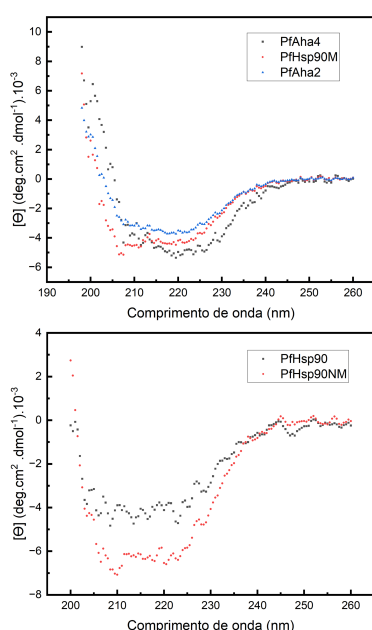
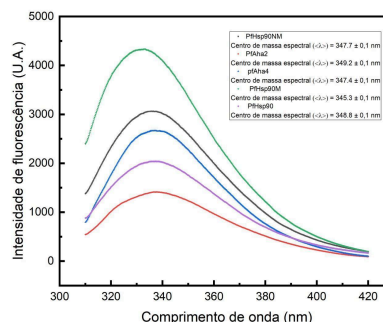


Figura 1: Espectropolarimetria de dicroísmo circular.

Na Figura 2 podemos observar que o comprimento máximo de emissão de fluorescência ocorreu entre 330-340 nm indicando que o Trp estava parcialmente protegido do solvente, o que é característico de proteínas enoveladas. Comparando com os resultados anteriores obtidos pelo grupo de pesquisa, a estrutura terciária local para ambas as proteínas está de acordo com o esperado.

Figura 2: Fluorimetria intrínseca de triptofano com excitação em 295 nm.



## Conclusões

Com base nos resultados obtidos na caracterização das proteínas, pode-se concluir que as metodologias utilizadas foram eficazes na purificação e análise das proteínas de interesse. Os resultados de CD e fluorescência indicaram que as proteínas foram obtidas de forma estruturada. A etapa de interação entre as chaperonas e co-chaperonas não foi realizada devido a problemas técnicos no equipamento necessário.

## Agradecimentos

Agradeço ao grupo de pesquisa LBBP pelo apoio. Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio César Borges pelo auxílio e orientação durante todo o projeto. Ao CNPq pelo investimento realizado na pesquisa.

## Referências

- Karine M.. Estudos comparativos da interação de Hsp90 de diferentes organismos com nucleotídeos adenosina e caracterização da Aha4 de Plasmodium falciparum. PhD thesis, Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.
- Sophie E. Jackson. Hsp90: Structure and Function, page 155–240. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- Paul LaPointe, Rebecca Mercier, and Annemarie Wolmarans. Aha-type co-chaperones: the alpha or the omega of the hsp90 atpase cycle? Biological Chemistry, 401(4):423–434, November 2019