

## AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO ESTADO REDOX NA FORMAÇÃO E NA ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES DA HSPA5 (BIP)

Mariana Oliveira Tavares

Noeli Soares Melo da Silva

Júlio César Borges

Instituto de Química de São Carlos/ Universidade de São Paulo

ma\_oliveira29@usp.br

### Objetivos

O objetivo geral desse trabalho refere-se ao estudo de como o ambiente redox modula o comportamento dos complexos supramoleculares (CSMs) da proteína recombinante HSPA5 (a Hsp70 humana residente no retículo endoplasmático conhecida como BIP, do inglês *Binding Immunoglobulin Protein*), bem como a possível ação auto proteolítica desta proteína sobre seus CSMs. Como objetivo específico, o projeto visou realizar a obtenção e caracterização dos CSMs da HSPA5 recombinante por meio de técnicas biofísicas e ensaios hidrodinâmicos, avaliando sua estabilidade em condições oxidantes e redutoras.

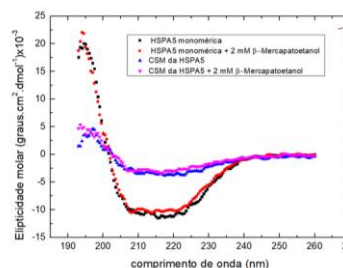
### Métodos e Procedimentos

A HSPA5 recombinante foi obtida como descrito em Silva et al. (2021). O CSM da HSPA5 foi obtido como descrito em Kiraly et al. (2020). Essa caracterização estrutural foi feita por meio de ensaios de Dicroísmo Circular (CD), Fluorescência Intrínseca do Triptofano; Fluorescência extrínseca com ANS e cromatografia de exclusão por tamanho analítica. Os experimentos foram realizados em tampão TKP (Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, NaCl 50 mM e KCl 5 mM).

### Resultados

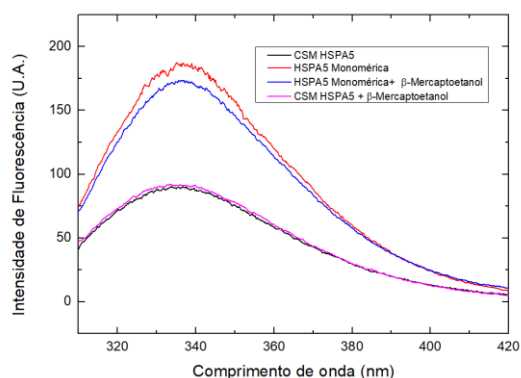
A HSPA5 recombinante foi obtida com pureza > 95% como atestado SDS-PAGE 12% (dados não mostrados). A fração dimérica da HSPA5 recombinante obtida por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC, do inglês *Size Exclusion Chromatography*), na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, foi aquecida a 42 °C por 2h e repurificada numa SEC no volume morto visando a separação das frações não agregadas da HSPA5.

Os espectros de CD (Figura 1) demonstrou que tanto a HSPA5 monomérica, quanto o CSM apresentam estrutura secundária, sendo que o da última é significativamente menor.



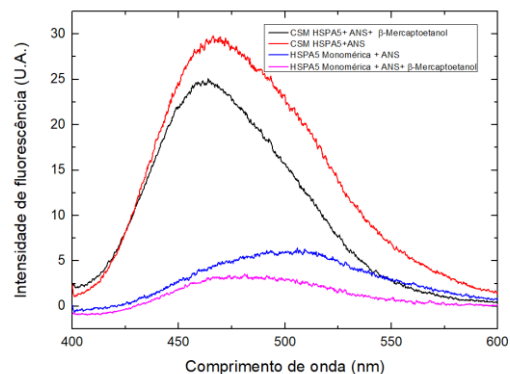
**Figura 1.** Espectro de CD realizado para HSPA5 monomérica (controle) e seus CSM na presença e na ausência do agente redutor em tampão TKP.

O ensaio de fluorescência intrínseca do triptofano (Figura 2) mostrou a presença estrutura terciária local na HSPA5 e também no seu CSM. Baseado no comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{max}}$ ), não houve mudança no ambiente químico do triptofano. No entanto, houve mudança na intensidade de fluorescência sugerindo a presença do fenômeno de supressão de fluorescência no CSM da HSPA5.



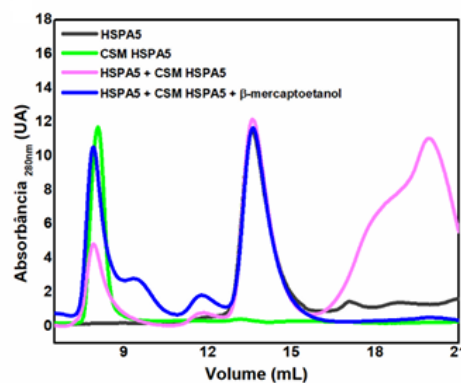
**Figura 2.** Espectro de Emissão de fluorescência das espécies analisadas por Fluorescência Intrínseca do Triptofano após excitação foi feita em 295 nm. A HSPA5 monomérica apresentou maior intensidade de fluorescência (curvas vermelha e azul) do que o CSM (curvas rosa e preta). Concentração de proteína usada: 2,5  $\mu\text{M}$ .

O ensaio de Fluorescência do ANS mostrou que o processo de oligomerização da proteína HSPA5 levou a maior emissão de fluorescência do ANS para as amostras do CSM (curvas vermelha e preta), quando comparado a proteína monomérica (curvas rosa e azul). O ANS é uma sonda extrínseca que se liga a fendas hidrofóbicas na proteína. Quanto maior a intensidade de fluorescência da sua emissão, maior a quantidade destas fendas hidrofóbicas.



**Figura 3.** Espectro de emissão de fluorescência do ANS. A coleta de dados foi realizada de 400 à 600 nm com  $\lambda$  de excitação em 350 nm.

Por fim, o experimento de SEC analítica (Figura 4) mostrou a depuração do oligômero da HSPA5 em diferentes condições redox. Na presença da espécie monomérica, em condições oxidantes e redutoras pode ocorrer a diminuição de CSM via degradação ou desmontagem em espécies oligoméricas menores.



**Figura 4.** O oligômero térmico obtido foi analisado por SEC analítica (linha verde) na presença do monômero (linha preta), não submetido ao aquecimento, em condições oxidantes (linha rosa) e redutoras (linha azul).

## Conclusões

Os resultados indicam que o processo de indução e purificação foram realizados com

êxito, atingindo o grau de pureza desejado. O processo de caracterização do CSM demonstrou que este apresenta estrutura secundária e estrutura terciária local. O ensaio de fluorescência do ANS mostrou que os CSMs apresentaram maior número de fendas hidrofóbicas, quando comparado a proteína monomérica. Por fim, a partir do ensaio de SEC analítica foi possível analisar dois mecanismos de depuração dos CSM, influenciados pelo ambiente redox.

### Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Programa Unificado de Bolsas (PUB), bem como a USP como um todo pela oportunidade de realizar minha Iniciação científica, através da bolsa concedida pelo programa. Além disso, gostaria de agradecer à FAPESP pela bolsa concedida (2024/04401-4) e ao projeto FAPESP 2017/26131-5. Por fim, gostaria de agradecer ao meu grupo de pesquisa LBBP, ao meu orientador Prof. Dr. Júlio César Borges e a minha colaboradora Dra. Noeli Soares Melo da Silva por toda orientação e suporte ao longo do desenvolvimento desse projeto.

### Referências

- Buchner, J. (2019). Molecular chaperones and protein quality control: an introduction to the JBC Reviews thematic series. *Journal of Biological Chemistry*, 294(6), 2074–2075. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.006739>.
- Shemesh, N., Jubran, J., Dror, S., Simonovsky, E., Basha, O., Argov, C., Hekselman, I., Abu-Qarn, M., Vinogradov, E., Mauer, O., Tiago, T., Carra, S., Ben-Zvi, A., & Yeger-Lotem, E. (2021). The landscape of molecular chaperones across human tissues reveals a layered architecture of core and variable chaperones. *Nature Communications*, 12(1), 2180. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22369-9>.
- Whitley, D., Goldberg, S. P., & Jordan, W. D. (1999). Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. *Journal of Vascular Surgery*, 29(4), 748–751. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(99\)70329-0](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(99)70329-0).
- Kosmaoglou, M., Schwarz, N., Bett, J. S., & Cheetham, M. E. (2008). Molecular chaperones and photoreceptor function. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(4), 434–449. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.03.001>.
- Tittelmeier, J., Nachman, E., & Nussbaum-Krammer, C. (2020). Molecular Chaperones: A Double-Edged Sword in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.581374>.
- Silva, N. S. M. da. (2021). Caracterização estrutural, funcional e estabilidade térmica das proteínas humanas HspA5 e HspA8: uma abordagem comparativa. <https://doi.org/10.11606/T.75.2021.tde-30062021-152518>.
- Kiraly, V. T. R., Does-Silva, P. R., Serrão, V. H. B., Cauvi, D. M., de Maio, A., & Borges, J. C. (2020). Thermal aggregates of human mortalin and Hsp70-1A behave as supramolecular assemblies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.236>.
- Does-Silva, P. R., Cauvi, D. M., Coto, A. L. S., Kiraly, V. T. R., Borges, J. C., & de Maio, A. (2020). Interaction of HSPA5 (Grp78, BIP) with negatively charged phospholipid membranes via oligomerization involving the N-terminal end domain. *Cell Stress and Chaperones*, 25(6), 979–991. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01134-9>

