

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), Na₂HPO₄ 5 mM, NaCl 50 mM e KCl 5 mM).

Resultados

A HSAP5 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 β-mercaptopoetanol, 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.

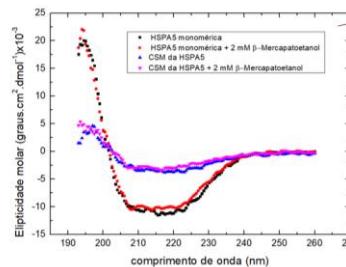


Figura 1. Espectro de CD realizado para HSPA5 monomérica (controle) e seus CSM na presença e na ausência do agente redutor em tampão TKP.

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 (λ_{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.

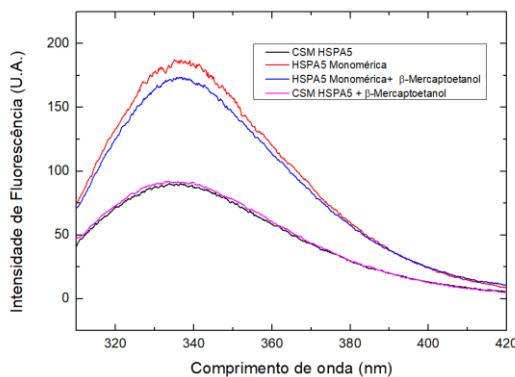


Figura 2. Espectro de Emissão de Fluorescência das espécies analisadas por Fluorescência Intrínseca do Triptofano após excitação foi feita em 295 nm. A HSPA5 monomérica apresentou maior intensidade de fluorescência (curvas vermelha e azul) do que o CSM (curvas rosa e preta). Concentração de proteína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

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.

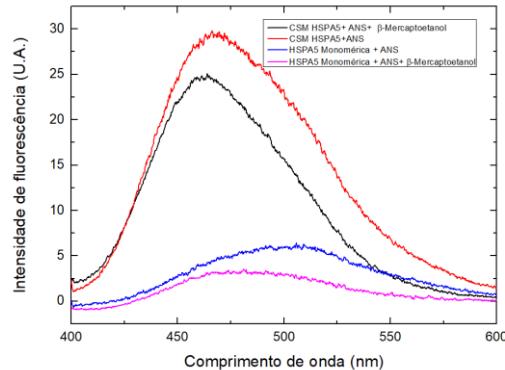


Figura 3. Espectro de emissão de fluorescência do ANS. A coleta de dados foi realizada de 400 à 600 nm com λ de excitação em 350 nm.

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.

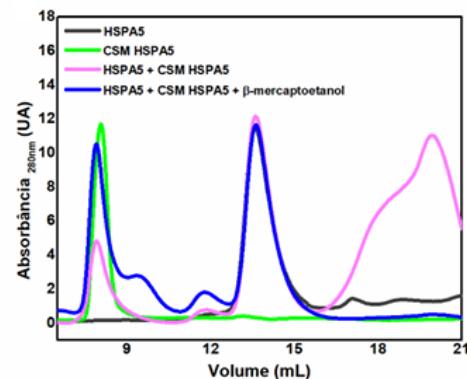


Figura 4. O oligômero térmico obtido foi analisado por SEC analítica (linha verde) na presença do monômero (linha preta), não submetido ao aquecimento, em condições oxidantes (linha rosa) e redutoras (linha azul).

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., Dores-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>
- Dores-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>

