

ESTUDO DOS EFEITOS DE NUCLEOTÍDEOS ADENOSINA E CÁLCIO NA ESTRUTURA DO NUCLEOTIDE BINDING DOMAIN DA PROTEÍNA HSPA1A.

Gustavo De Oliveira

Amanda Helena Tejada

Prof. Dr. Júlio César Borges

Universidade de São Paulo-USP

Gustavoifspvtp@usp.br

Objetivos

Produzir e obter a proteína recombinante HSP701A_NBD de forma enovelada e purificada, assim como avaliar a estabilidade térmica e química desta construção proteica na presença de diferentes íons e o comportamento da estrutura terciária local da mesma em diferentes condições e na presença de nucleotídeos de ATP e ADP. Avaliar a atividade ATPásica desta construção proteica na presença de cálcio e magnésio.

Materiais e Métodos

Foi realizada a técnica de expressão e indução da construção proteica HSP701A_NBD, a partir do plasmídeo pET28a::HSPA1A_NBD, transformando cepas bacterianas de *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente foram realizadas as etapas de lise celular e purificação da proteína recombinante, em duas etapas cromatográficas: cromatografia por afinidade de íons Ni^{2+} e cromatografia preparativa por exclusão por tamanho (pSEC). Em seguida, as amostras proteicas foram monitoradas e quantificadas a partir do método de espectroscopia de absorção molecular e SDS-PAGE. Também foram realizados experimentos de caracterização biofísica e bioquímica, como fluorescência intrínseca do

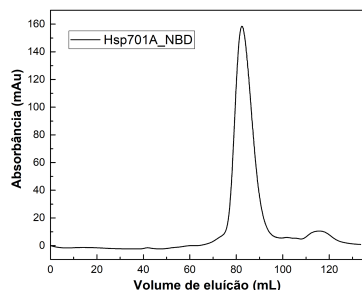
triptofano, ensaios de estabilidade térmica acompanhado por espectropolarimetria de dicroísmo circular e atividade ATPásica.

Resultados

Foi possível observar por meio pSEC e SDS-PAGE que a HSP701A_NBD foi obtida de forma enovelada e purificada e se manteve estável mesmo após congelamento e liofilização. Foi observado o fenômeno de supressão de fluorescência na presença de cálcio e magnésio e dos nucleotídeos ADP e ATP, a partir do método de fluorescência intrínseca do triptofano.

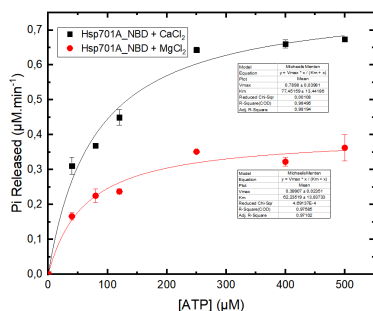
Foi realizado um ensaio de estabilidade térmica acompanhado por CD, sendo visualizado um aumento da estabilidade térmica desta construção proteica na presença de cálcio, no entanto não foi observado o mesmo para o magnésio. Finalmente, foi realizado um ensaio de atividade ATPásica a partir da hidrólise do nucleotídeo ATP em ADP e P_i , monitorado pelo Varioskan, no qual foi possível analisar uma maior atividade ATPásica da proteína recombinante na presença de cálcio em relação ao magnésio.

Figura 1: Cromatografia de exclusão molecular por tamanho da proteína HSP701A_NBD.



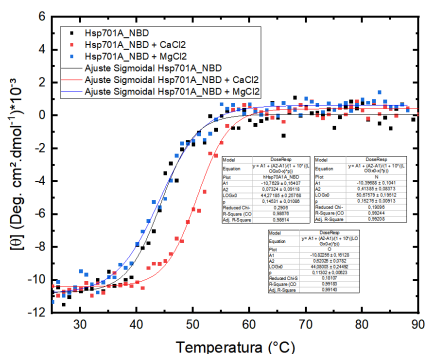
Fonte: Autoria própria.

Figura 2: Curva de atividade ATPásica da HSP701A_NBD na presença de cálcio e magnésio.



Fonte: Autoria própria

Figura 3: Curva de desenovelamento térmico da construção proteica HSP701A_NBD acompanhada por CD em 222 nm.



Fonte: Autoria própria.

Conclusões

A proteína HSP701A_NBD suportou congelamento e liofilização e foi obtida de forma purificada e enovelada, além disso foi

possível observar o fenômeno de supressão de fluorescência para os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e nucleotídeos de adenosina ADP e ATP, como também ficou evidente um aumento da estabilidade térmica e da T_m na presença de cálcio. Foi observado uma maior atividade ATPásica na presença de cálcio em relação ao magnésio.

Agradecimentos

Ao IQSC-USP e a CNPq por todo apoio e amparo e a todo o grupo de Bioquímica e Biofísica de Proteínas e ao Prof. Dr. Júlio C. Borges por todo apoio, amparo e todo conhecimento passado durante a realização deste projeto de iniciação científica.

Referências

- DOMINGUES, Bruna Cristina Lopes et al. Suplementos Alimentares: Aspectos Químicos e Aplicações de Macro e Micronutrientes. *Revista Virtual de Química*, v. 15, n. 3, 2023.
- RADONS, Jürgen. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?. *Cell Stress and Chaperones*, v. 21, n. 3, p. 379-404, 2016.
- KABAKOV, Alexander E. et al. Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 283, n. 2, p. C521-C534, 2002.
- KAMPINGA, Harm H. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones*, v. 14, p. 105-111, 2009.
- KUBOTA, Hiroshi et al. Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. *Cell Stress and Chaperones*, v. 15, p. 1003-1011, 2010.
- MAYER, M. P.; BUKAU, Bernd. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, v. 62, p. 670-684, 2005.
- CHEN, Bryan et al. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 3, n. 8, p. a004374, 2011.
- CIECHANOVER, Aaron; KWON, Yong Tae. Protein quality control by molecular chaperones in neurodegeneration. *Frontiers in neuroscience*, v. 11, p. 185, 2017.
- MAYER, Matthias P. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences*, v. 38, n. 10, p. 507-514, 2013.
- BORGES, Júlio C.; RAMOS, Carlos HI. Protein folding assisted by chaperones. *Protein and peptide letters*, v. 12, n. 3, p. 257-261, 2005.
- BORGES, Júlio C.; RAMOS, Carlos HI. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 452, n. 1, p. 46-54, 2006.
- BRACHER, Andreas; VERGHESE, Jacob. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Frontiers in molecular biosciences*, v. 2, p. 10, 2015.
- CASTRO, Simone Vieira et al. Proteínas de choque térmico hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinária Brasileira*, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2013.
- CIOCCA, Daniel R.; CALDERWOOD, Stuart K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress & chaperones*, v. 10, n. 2, p. 86, 2005.
- CASAS, Caty. GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. *Frontiers in neuroscience*, v. 11, p. 177, 2017.
- SMELTZER, Suzanne C.; BARE, Brenda G. Brunner & Suddarth, Tratado de enfermagem médico-cirúrgica. In: *Brunner & Suddarth, Tratado de enfermagem médico-cirúrgica*. 2005. p. 1133-1133.
- GUYTON, Arthur C. et al. *Tratado de fisiologia médica*. México: Interamericana, 1971.
- MELDOLESI, Jacopo; POZZAN, Tullio. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends in biochemical sciences*, v. 23, n. 1, p. 10-14, 1998.
- PREISLER, Steffen et al. Calcium depletion challenges endoplasmic reticulum proteostasis by destabilising BiP-substrate complexes. *ELife*, v. 9, p. e62601, 2020.
- DORES-SILVA, Paulo R. et al. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. *PLoS One*, v. 10, n. 1, p. e0117170, 2015.