CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL E FUNCIONAL DA CHAPERONA HSP70 DO *AEDES AEGYPTI*

Palavras-Chave: Chaperona, caracterização, Hsp70

Autores:

CLAUDIA DE LOURENÇO, UNICAMP

Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE INÁCIO RAMOS (orientador), UNICAMP

---

1. INTRODUÇÃO:

As proteínas desenvolvem inúmeras funções nos organismos, sendo indispensáveis à vida. Mas para que elas possam desempenhar as suas funções, elas precisam estar na sua forma nativa, apresentando uma estrutura secundária enovelada corretamente. Existe uma classe de proteínas que atua justamente no auxílio correto de outras proteínas, que são as chamadas chaperonas moleculares, conhecidas como Hsps ('heat shock proteins'). A Hsp70, considerada uma chaperona central nesse processo, é o foco desse trabalho, no qual será estudada a Hsp70 específica do organismo do *Aedes aegypti* (AaHsp70). Os objetivos desse projeto são: realizar titulação da AaHsp70 com bis-ANS até o ponto de saturação; medir a emissão de fluorescência com bis-ANS na presença de ADP; medir a atividade chaperona da AaHsp70 com lisozima e tratar dados da atividade chaperona da AaHsp70 com insulina.

2. METODOLOGIA:

Espectroscopia de fluorescência com bis-ANS na presença de ADP: O bis-ANS é um dímero de sulfonato de anilinonaftaleno, que atua como uma sonda de regiões hidrofóbicas e indicador de mudanças conformacionais, devido a sua capacidade de emitir fluorescência quando associado em regiões apolares expostas, o que não aconteceria em meio aquoso (STRYER, 1965). Sabendo-se que a proteína Hsp70 é composta por dois domínios, o Nucleotide Binding Domain (NBD), que realiza atividade ATPásica, e o Substrate Binding Domain (SBD), que se liga ao substrato, e que quando o domínio NBD está associado à molécula de ATP, o domínio SBD se encontra em seu estado aberto, possuindo pouca afinidade pelo substrato, a espectroscopia de fluorescência com o bis-ANS na presença de ADP busca avaliar essas mudanças estruturais providas. Primeiro, realizou-se uma curva de titulação da AaHsp70 à 10 µM com bis-ANS à 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 40 µM de concentração, até atingir o ponto de saturação da AaHsp70, para se saber qual concentração de bis-ANS utilizar para o experimento com a molécula de ADP. Depois, utilizou-se ADP à 5, 10 e 50 µM para a realização da espectroscopia de fluorescência, adicionando-o à solução de AaHsp70 com bis-ANS. Os procedimentos foram realizados no fluorímetro Aminco Bowman® Series

2 (SLM-AMINCO), em cubeta de quartzo de 1x1 cm de caminho óptico; comprimentos de onda de 365 nm de excitação e 485 nm de emissão; leitura de 400 à 600 nm e voltagem máxima de 740 volts. Os dados obtidos foram tratados pelo software Origin 8.1 Folder.

Atividade chaperona com lisozima: A AaHsp70 é uma proteína do tipo chaperona, que atua protegendo outras proteínas da agregação e propiciando um ambiente adequado para o seu enovelamento. Assim, nessa etapa, uma proteína cliente, a lisozima, foi exposta a um ambiente com ditiotreitol (DTT), um agente redutor de proteínas, para se verificar o quanto a AaHsp70 conseguiria proteger a lisozima da agregação nesse ambiente de estresse oxidativo. O procedimento foi realizado também no fluorímetro Aminco Bowman® Series 2 (SLM-AMINCO), em cubeta de quartzo de 1x1 cm de caminho óptico, intervalo de tempo de 0 à 3000 segundos (50 minutos) a uma temperatura de 25º C. As concentrações utilizadas foram de 4 µM de AaHsp70, 4 µM de lisozima e 100 mM de DTT. Antes de iniciar as medidas, aguardou-se 50 minutos em banho à 25ºC. A quantificação da porcentagem de proteção proporcionada pela AaHsp70 foi obtida através da equação 1 e os resultados foram tratados pelo software Origin 8.1 Folder.

Proteção (%) = $\frac{100\ x\ (\Delta e - \Delta ech)}{\Delta e}$ (Equação 1)

Onde Δe = máximo espalhamento de luz na ausência da chaperona e Δech = máximo espalhamento de luz na presença da chaperona.

Atividade chaperona com insulina: O objetivo dessa parte é exatamente o mesmo anterior, apenas trocando a proteína lisozima pela insulina para ver se atividade chaperona da AaHsp70 se manteria. Esse experimento em si foi realizado por outros membros do grupo, onde fiquei responsável apenas pelo tratamento dos dados através do software Origin 8.1 Folder. O grupo realizou o experimento no fluorímetro Aminco Bowman® Series 2 (SLM-AMINCO), em cubeta de quartzo de 1x1 cm de caminho óptico e intervalo de tempo de 0 à 3000 segundos (50 minutos) As concentrações utilizadas foram de 9 µM de AaHsp70, 45 µM de insulina e 25 mM de DTT.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Espectroscopia de fluorescência com bis-ANS na presença de ADP: A titulação da AaHsp70 10 µM foi realizada com concentrações crescentes de bis-ANS. O ponto de saturação é obtido em concentrações maiores que 15 µM de bis-ANS. Portanto, foi escolhido um ponto intermediário da curva para se fazer os experimentos com a molécula de ADP, o que corresponde a uma concentração de bis-ANS de 5 µM. Assim, tendo definido a concentração de ADP a utilizar, foram construídas quatro curvas, sendo elas:

- 5 µM AaHsp70 + 5 µM bis-ANS (1:1:0);
- 5 µM AaHsp70 + 5 µM bis-ANS + 5 µM ADP (1:1:1);
- 5 µM AaHsp70 + 5 µM bis-ANS + 10 µM ADP (1:1:2);

- 5 µM AaHsp70 + 5 µM bis-ANS + 50 µM ADP (1:1:10).

Como a atividade ATPásica da AaHsp70 acontece no seu domínio NBD, caso o bis-ANS estivesse interagindo com ele, haveria uma diminuição do sinal da fluorescência, já que o ADP se liga nessa região, o que não ocorreu. Portanto, o que se pode afirmar é que o ADP não interfere na ligação da AaHsp70 com o bis-ANS; pois, se interferisse, haveria apagamento da curva conforme se aumenta a concentração de bis-ANS no meio.

Atividade chaperona com lisozima: Aqui, foi observado elevada intensidade no espalhamento de luz quando não se é adicionado Hsp70 ao meio. Essa redução na intensidade do espalhamento de luz é ocasionada pela atividade de proteção que a AaHsp70 proporcionou à proteína lisozima frente ao DTT. Assim, verifica-se que ela está apresentando atividade chaperona. Utilizando a equação 1, e com os valores máximos de espalhamento de luz medido no tempo 2500 segundos, obteve-se um valor de proteção contra a agregação de 68 ± 5 %. A figura 1 demonstra esses valores em porcentagem de agregação.

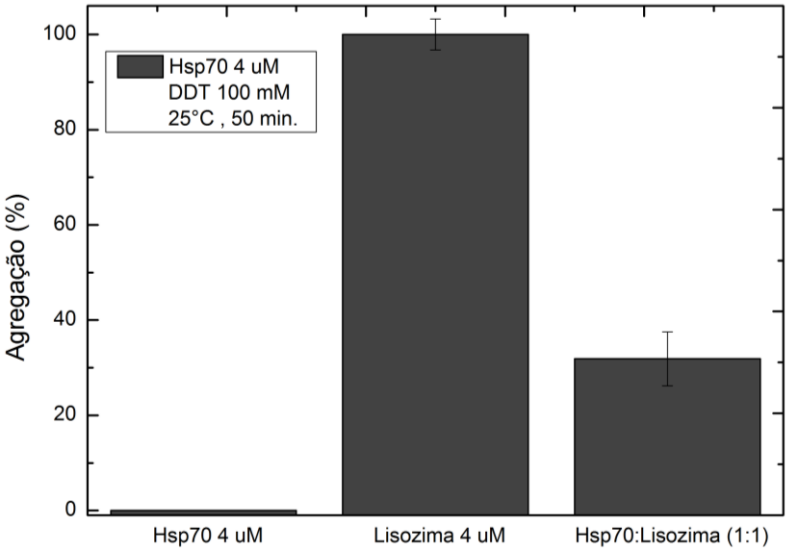

Figura 4. *Porcentagem de agregação: lisozima.*

Figura 5. *Atividade chaperona da AaHsp70 com insulina.*

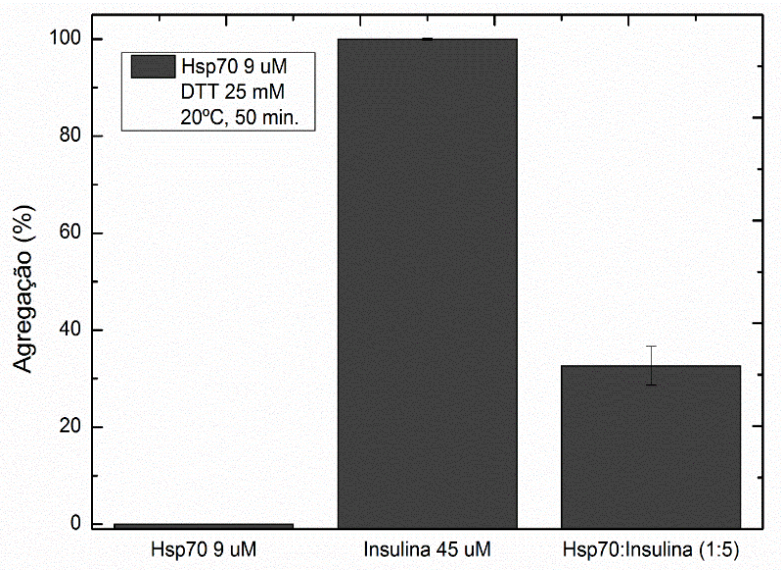

Figura 2. *Porcentagem de agregação: insulina*

Atividade chaperona com insulina: Aqui, novamente se observa que a AaHsp70 está exercendo sua atividade chaperona. A intensidade de espalhamento de luz diminuiu ao adicioná-la ao meio. Utilizando-se da equação 1 e com os valores máximos de espalhamento de luz medido no tempo 2500 segundos, tem-se uma porcentagem de proteção de 67 ± 4%. Na Figura 2, estão demostrados esses valores em porcentagem de agregação.

CONCLUSÕES:

Nesse trabalho de pesquisa, todos os objetivos propostos conseguiram ser cumpridos. Foi possível verificar que a mudança conformacional na estrutura secundária da AaHsp70, resultante de sua atividade ATPásica, não sofre interferência quando exposto às moléculas de bis-ANS; ou seja, as moléculas de ADP não interferem na ligação da AaHsp70 com o bis-ANS, já que não foi observado apagamento de sinal. Nos experimentos de atividade chaperona, foi possível confirmar a atividade de proteção contra a agregação que a proteína AaHsp70 fornece às suas proteínas-cliente, como no caso da lisozima e da insulina utilizadas no procedimento apresentado, assim como quantificar a porcentagem dessa proteção.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os membros do grupo de pesquisa, por todo o auxílio e dedicação que me deram e que tem sido essencial à minha aprendizagem e ao meu desenvolvimento; a minha família, que sempre me motivou a continuar e a vencer os desafios do caminho; e a FAPESP, pela acreditação do projeto e financiamento da pesquisa.

BIBLIOGRAFIA

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 2ª edição. Nova York: Springer, 1999.

STRYER L. A interação de um corante naftaleno com apomioglobina e apohemoglobina. Uma sonda fluorescente de sítios de ligação não polares. JMol Biol. 1965 Set;13(2):482-95. doi: 10.1016/s0022-2836(65)80111-5. PMID: 5867031.