

# RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E FUNÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO “SMALL” DE *AEDES AEGYPTI*

**Palavras-Chave:** Caracterização, Chaperona, Proteosatase

**Autores/as:**

Ana Paula Lima Gravito, UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (orientador; [cramos@unicamp.br](mailto:cramos@unicamp.br)), UNICAMP

## **INTRODUÇÃO:**

As proteínas são macromoléculas cuja estrutura está intrinsecamente relacionada com suas funções vitais nos organismos, suas condições ideais de existência envolvem um estado enovelado e solúvel. O processo de enovelamento proteico é afetado diretamente por modificações no meio em que a proteína está inserida, como por exemplo pH, concentração e temperatura. O estado nativo e funcional é aquele termodinamicamente mais estável, uma condição de menor energia livre que uma proteína pode alcançar [1]

Diante disso, as células possuem mecanismos para auxiliar o enovelamento correto de proteínas como a existência de proteínas específicas para a homeostase proteica como as chaperonas moleculares ou HSPs ('heat shock proteins'), as quais podem ser expressas constitutivamente ou em resposta ao estresse e atuam na prevenção no enovelamento incorreto ao impedir interações não produtivas. [2 - 3]. Nosso objetivo é estudar uma entre 12 e 42 KDa. Além de formarem oligômeros, estas proteínas e estão envolvidas na regulação do estado redox, atividade anti-apoptótica, regulação da proliferação celular e estabilização do citoesqueleto [4 - 5].

A SmHSP de *Aedes aegypti*, foi clonada, expressa em *E. coli* e purificada para ser posteriormente caracterizada por meio de técnicas biofísicas e bioquímicas, a fim de compreender os mecanismos da manutenção da proteostase do mosquito. A AaSmHSP possui 194 resíduos de aminoácidos, a presença de um domínio alfa cristalino e uma massa molecular de 25,3 kDa. Esperamos que nosso estudo possa levar a de estratégias no combate ao mosquito visto que esta espécie é vetor responsável pela transmissão de vírus emergentes como ZIKa (ZIKV), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Febre Amarela (YFV).

## **METODOLOGIA:**

### **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL**

#### **Espectroscopia de dicroísmo circular - Far UV(200 -260 nm)/Near UV (260 nm- 320 nm)**

O dicroísmo circular é uma técnica espectropolarimétrica que quantifica a diferença de absorção da luz polarizada circularmente para a esquerda e para a direita. O uso na caracterização de proteínas é aplicável na medida que consegue avaliar a estrutura secundária de proteínas.[6] O espectro de CD de proteínas mostra padrões da conformação secundária, o que permite identificar com estruturas como hélices- $\alpha$ , folhas- $\beta$  e conformações aleatórias. Os espectros foram medidos utilizando-se o espectropolarímetro J-720 (JASCO), cubeta de quartzo de 0,2 cm de caminho óptico, dependendo da concentração protéica (13  $\mu$ M). As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. No desenovelamento térmico da proteína, foram quantificadas as variações na estrutura secundária em resposta ao aumento e diminuição da temperatura. O sinal foi monitorado na faixa de temperatura de 20 a 90  $^{\circ}$ C.

Outra análise realizada por CD foi na região do UV próximo (Near UV). A estrutura vibracional do espectro de dicroísmo circular (CD) próximo ao ultravioleta da proteína (240 a 320 nm).O espectro pode ser usado para detectar a estrutura e a dinâmica do enovelamento da proteína. A espectroscopia de CD nessa região pode refletir as a o arranjo dos grupos cromóforos de cadeia lateral de proteínas triptofano, fenilalanina, tirosina e mudanças no microambiente de ligação dissulfeto [6] [11]

### **Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)**

A fim de entender a estabilidade térmica da estrutura terciária da proteína foi realizado o experimento de DSC, o qual fornece informações acerca do enovelamento/desnaturação de proteínas. As proteínas em seu estado nativo não possuem conformações únicas, essa são compostas por conjuntos de conformações com dinâmica de interconversão cruciais para muitos fenômenos relevantes para a função biológica [7]. As varreduras térmicas foram realizadas de 20 a 90°C a uma taxa de 1°C/min. A proteína estava a uma concentração de 70 µM em tampão NaCl 150mM e TrisHCl 25mM. A amostra foi centrifugada antes da análise.

### **Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)**

Com o intuito de entender a agregação da proteína frente o aquecimento foi realizado um experimento de DLS. As soluções de proteínas são compostas por solventes (solução tampão) e soluto (proteínas). Essas macromoléculas estão presentes em diferentes distribuições de tamanho e caracterizam populações de partículas em solução, que podem ser identificadas pela técnica de espalhamento de luz dinâmica. [8] Os experimentos foram monitorados de 20 - 90°C a fim de detectar a estabilidade da proteína em concentrações baixas(13µM) frente a uma rampa de temperatura, por meio da identificação de alterações no diâmetro hidrodinâmico de partículas bem como a intensidade de espalhamento de luz dessas em solução ao longo da variação de temperatura.

## **CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL**

### **Atividade chaperona**

Os experimentos de atividade chaperona na prevenção de agregação térmica foram realizados usando o substrato modelo de Luciferase a 42°C. Esses foram conduzidos no equipamento de leitor de placas, o qual avalia o efeito da sHSP sob o substrato, esse equipamento emite radiação eletromagnética sob a amostra e monitora dados de absorção de intensidade luminosa a 320 nm. Quando ocorre a agregação dos substratos a turbidez da amostra tende a aumentar e ocorre o aumento do espalhamento de luz. A atividade chaperona pode ser relacionada com a porcentagem de proteção que é descrita pela equação: Proteção (%) =  $\Delta e - \Delta ech / \Delta e$  (Equação 1). Sendo que  $\Delta e$  e  $\Delta ech$  representam o máximo de absorção de luz (no tempo final de reação) na ausência e presença de chaperona

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

### **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL**

Os experimentos realizados em triplicatas independentes de dicroísmo circular tinham como objetivo assegurar que as proteínas obtidas na etapa de purificação estavam em seu estado conformacional enovelado, além de fornecer informações sobre a estrutura secundária da proteína. A proteína se apresentou enovelada, e em sua estrutura secundária há a predominância de estruturas do tipo hélice-alfa e folha-beta (BeStSel™ (2014-2024) – ELTE Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary)[9 – 10]. A estrutura secundária possui alta estabilidade conformacional frente ao aquecimento e resfriamento.

O experimento de CD na região do UV próximo possui bem definidas as bandas aromáticas nos comprimentos de onda :Triptofano (285-310 nm), Tirosina (275-285 nm) e Fenilalanina (255-270 nm), logo conclui-se que estava enovelada, e após o experimento de aquecimento realizado na amostra essa região perde quase que totalmente a estrutura, o que trouxe a necessidade de testes acerca da estabilidade da estrutura terciária.

A fim de entender a estabilidade térmica da proteína em altas e baixas concentrações, foram realizados experimentos de DLS e DSC. Durante o experimento de DSC a proteína (70µM) sofreu agregação e precipitação irreversível a partir de 70°C, indicando nesse ponto uma alteração conformacional de oligômeros em solução para agregados. A realização da análise por DLS decorreu do interesse em investigar se as partículas em solução tendiam ou não à agregação diante do aumento da temperatura em baixas concentrações (13 µM). A rampa de temperatura de 20 a 90°C possui parâmetros constantes, até que por volta de 65°C, onde a amostra apresenta um valor máximo, sugerindo a presença de agregação dos oligômeros.

### **CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL**

Investigamos a prevenção, causada pela sHSP, da agregação térmica no substrato modelo de Luciferase a 42°C, acompanhando o sinal de absorção de luz mensurado em um comprimento de onda fixo em 320 nm por 2 horas. Pelos resultados obtidos para o experimento de atividade em condições de estresse térmico (Tabela 1), observa-se que a AaSmHSP teve atividade de chaperona contra a agregação térmica, de forma que a absorbância a 320 nm da luciferase(1µM) é máxima na ausência de chaperona(indicando agregação), e tende a decrescer na

presença de contrações crescentes da chaperona, o que comprova que a agregação térmica da luciferase foi impedida.

Proporção Luc : SmHSP	Proteção %
1 : 0,25	37,5
1 : 0,5	66,0
1 : 1	79,6
1: 2	83,0

**Tabela 1.** Percentuais de proteção contra agregação térmica em substrato modelo de Luciferase 1uM. Monitoramento da absorção de luz pelas amostras a 320 nm sob condição de estresse térmico 42°C por ~2 horas. A tabela apresenta as porcentagens de proteção calculadas pela equação 1.

## CONCLUSÃO

Por espectros de CD - UV distante, avaliamos que a proteína recombinante foi produzida enovelada, com predominância de estrutura secundária intrinsecamente desordenada e com do tipo folha- $\beta$ , como as demais chaperonas dessa família. Esta proteína apresentou-se estável conformacionalmente durante o experimento de desenovelamento térmico monitorado por CD(UV distante), não sendo observado alterações do sinal durante o aquecimento nem no resfriamento. No que se refere ao dicroísmo circular na região de UV próximo foi possível visualizar as bandas características dos cromóforos que integram a proteína, bem como detectar agregação da amostra, com a quase completa perda de sinal nesta região. Além de que por experimentos de DLS e DSC foi possível mostrar que a proteína não possui estabilidade térmica da estrutura terciária em temperaturas maiores do que 65°C, passando por agregação e precipitação. Por fim, no experimento de atividade funcional de chaperona, a proteína mostrou proteção quase completa do substrato modelo da Luciferase, contra a agregação térmica.

**AGRADECIMENTOS:** FAPESP, CNPq, DOW Chemical Company e a todos os colegas de laboratório.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] ANFINSEN, Christian. Principles that govern folding of protein chains. **Science**, v. 181, p. 223-230, 1973.
- [2] TIROLI-CEPEDA, Ana and RAMOS, Carlos. Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 818-831, 2007.
- [3] RAMOS, Carlos and FERREIRA, Sergio. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, p. 213-222, 2005.
- [4] FINK, Anthony. Chaperone-mediated protein folding. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 425-449, 1999.
- [5] BASHA, Eman; O'NEIL, Heather; VIÉRLING, Elizabeth. Small heat shock proteins and alphacrystallins: dynamic proteins with flexible functions. **Trends Biochemical Sciences**, v. 37, p. 106-117, 2012.
- [6] SHARON M. Kelly, Thomas J. Jess, Nicholas C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Volume 1751, Issue 2, 2005, Pages 119-139, ISSN 1570-9639, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>.
- [7] CHRISTOPHER M. Johnson, Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 531, Issues 1-2, 2013, Pages 100-109, ISSN 0003-9861, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.008>.
- [8] JACHIMSKA B.; Wasilewska, M.; Adamczyk, Z. (2008) Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements, *Langmuir*, 24, 6866-6872.
- [9] MICSONAI A., Bulyáki, É., Kardos, J. (2021). BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. In: Chen, Y.W., Yiu, C.P.B. (eds) *Structural Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2199. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_11)
- [10] TRIVEDI R, Nagarajaram HA. Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 14;23(22):14050. doi: 10.3390/ijms232214050. PMID: 36430530; PMCID: PMC9693201.
- [11] BOLJE A, Gobec S. Analytical Techniques for Structural Characterization of Proteins in Solid Pharmaceutical Forms: An Overview. *Pharmaceutics*. 2021 Apr 11;13(4):534. doi: 10.3390/pharmaceutics13040534. PMID: 33920461; PMCID: PMC8070348.