

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

AMANDA HELENA TEJADA

**EFEITO DE ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO NA ESTABILIDADE TÉRMICA DO
DOMÍNIO N-TERMINAL DA HSP701A**

SÃO CARLOS

2023

AMANDA HELENA TEJADA

EFEITO DE ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO NA ESTABILIDADE TÉRMICA DO
DOMÍNIO N-TERMINAL DA HSP701A

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal de São Carlos como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges (IQSC/USP)

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius (DGE/UFSCar)

SÃO CARLOS

2023

AMANDA HELENA TEJADA

EFEITO DE ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO NA ESTABILIDADE TÉRMICA DO
DOMÍNIO N-TERMINAL DA HSP701A

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Membros Efetivos:

Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

Dra. Milene Nóbrega de Oliveira Moritz

Prof. Dr. Júlio César Borges

Local: Sala 10 do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (DGE/UFSCar)

Data: 29 de agosto de 2023

Horário: 14h30

SÃO CARLOS

2023

Aos meus pais, Elisete e Reginaldo, por todas as oportunidades que tive na vida.

Ao meu irmão, João Gabriel, por todo carinho.

Aos meus avós, Aparecida, Lásaro, Leonor e Benedito, por todo amor e dedicação.

Ao meu tio, Daniel, pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, pelas inúmeras experiências e vivências e pelo conhecimento obtido durante esta jornada.

À Universidade de São Paulo, USP, e ao Instituto de Química de São Carlos, IQSC, pelos recursos concedidos e por proporcionarem todo o amparo necessário para a execução do projeto.

À minha família, em especial meus pais, meu irmão, meus avós e meus tios, por todos os ensinamentos humanos e amor imensurável que me proporcionaram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio César Borges, por todos os ensinamentos, ajuda, confiança e dedicação a mim e a todos os que já passaram pelo laboratório.

Ao Me. Carlos Sabino, pelo amparo e pelos ensinamentos.

Aos demais colegas de laboratório: Amanda Coto, Arthur Moraes, Gustavo de Oliveira, Maria Júlia Mattos, Mariana Tavares, Milene Moritz, Noeli Soares e Thiago Seraphim pela parceria e companhia.

Aos meus professores que ao decorrer da graduação me ensinaram muito além do conhecimento teórico e sim como ser uma boa profissional.

A todos os funcionários de ambas as Universidades, por proporcionarem o ótimo funcionamento destas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Beatriz Gusson, Caroline Fregonesi, Conny Fukuyama, Felipe Ribaldo, Isabela Dolci, Isadora Pedrino, Jaiane Santana, Ellen Souza, Lucca Policastro, Maria Helena Zanetti, Maria Luiza Melaré, Maria Júlia Macedo, Maria Júlia Mattos, Matheus Pintor, Renan Omete, Sara Nery e Wesley Santos pelo companheirismo e carinho.

Aos meus colegas de trabalho do estágio, pelos ensinamentos, companheirismo e profissionalismo.

RESUMO

Proteínas são necessárias para a homeostase dos organismos e para que isso aconteça, elas precisam existir em sua estrutura adequada e localização correta. Neste contexto, é dada a importância das chaperonas moleculares da família da Hsp70, proteínas corresponsáveis pelo controle da qualidade do enovelamento proteico, transporte de proteínas para os compartimentos celulares, prevenção da formação de agregados proteicos, entre outros. Sendo assim, defeitos nas proteínas desta família podem estar relacionados a diversas patologias humanas, como doenças neurodegenerativas, diabetes e até mesmo alguns tipos de câncer. Um exemplo importante de membro desta família de proteínas é a Hsp701A. Esta é composta por dois domínios, o NBD, que se liga aos nucleotídeos ATP e ADP, e o PDB, que se liga à proteína-cliente. No presente estudo, visou-se realizar ensaios para a verificação de características biofísicas, hidrodinâmicas e bioquímicas da construção recombinante equivalente ao NBD da Hsp701A na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e de nucleotídeos ATP e ADP. Para isso, a proteína em questão foi expressa de maneira recombinante por bactérias, purificada a partir de dois passos de cromatografia e analisada. Com isso, verificou-se que o Hsp701A_NBD foi produzido em seu estado puro, monomérico e enovelado e cataliticamente ativo. Neste contexto, foi possível verificar que a presença dos íons divalentes não ocasionou mudança significativa no conteúdo secundário estrutural do domínio. Além disso, percebeu-se também que os íons e os nucleotídeos ocasionam supressão da fluorescência, indicativo este de formação de complexo. Ademais, na presença de Ca^{2+} , existe um deslocamento da fluorescência para uma região de maior energia, um aumento da estabilidade térmica da proteína e um aumento na atividade catalítica de quebra de ATP em ADP e Pi. Além disso, o cálcio atua nas chaperonas moleculares da família das Hsp70 aumentando a afinidade do NBD por ADP, que resulta em uma liberação mais lenta de proteínas-clientes. Portanto, as avaliações biofísicas, hidrodinâmicas e bioquímicas demonstraram que o domínio Hsp701A_NBD foi obtido puro, como um monômero globular, enovelado e cataliticamente ativo e que as alterações na presença de Ca^{2+} foram mais acentuadas.

Palavras-chave: Hsp701A_NBD, Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP e ADP.

ABSTRACT

Proteins are important for the homeostasis of organisms. For this to happen, they need to exist in their proper structure state and correct cellular location. In this context, it is given the importance of molecular chaperones of the Hsp70 family, proteins which are responsible for the quality control mechanism of protein folding, transport of them to cellular compartments, prevention of the formation of protein aggregates, among others. Therefore, defects in Hsp70 proteins may be related to several human pathologies, such as neurodegenerative diseases, diabetes and even some types of cancer. An important example of a member of this protein family is Hsp701A. This protein has two domains, the NBD, which binds to the nucleotides ATP and ADP, and the PDB, which binds to the client protein. In the present study, experiments were carried out to verify the biophysical and biochemical characteristics of the recombinant NBD of Hsp701A in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions and ATP and ADP nucleotides. For this, the protein in question was expressed by a recombinant bacterial system, purified by two chromatography steps and then analyzed. Thus, it was verified that Hsp701A_NBD was produced in its pure, monomeric, folded and catalytic active state. In this context, it was possible to verify that the presence of divalent ions did not cause a significant change in the secondary structural content of the domain. In addition, it was also noticed that ions and nucleotides cause suppression of fluorescence, indicating complex formation. Moreover, in the presence of Ca^{2+} , there was a shift of fluorescence to a region of higher energy, an increase in the thermal stability of the protein and an increase in the catalytic activity of breaking down ATP into ADP and Pi. Furthermore, calcium acts on molecular chaperones of the Hsp70 family increasing the affinity of NBD for ADP, which results in a slower release of client proteins. Therefore, the biophysical, hydrodynamic and biochemical evaluations demonstrated that the Hsp701A_NBD domain was pure, monomeric, folded and catalytically active and that changes in the presence of Ca^{2+} were more pronounced.

Keywords: Hsp701A_NBD, Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP and ADP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática de estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária de proteínas.....16
- Figura 2** - Representação esquemática da estrutura atômica das Hsp70. Em azul é referente ao NBD, e as regiões em rosa e verde, respectivamente, aos subdomínios PBD- β e PBD- α , que compõem o PBD (PBD:2KHO).....18
- Figura 3** - Ciclo alostérico das Hsp70 seguindo à ligação de nucleotídeos adenosina e hidrólise do ATP em ADP e Pi aos processos de ligação e liberação da proteína cliente.....19
- Figura 4** - Fluxograma da metodologia aplicada para a realização do trabalho.....32
- Figura 5** - Cromatograma da exclusão por tamanho preparativa da construção proteica Hsp701A_NBD.....34
- Figura 6** - Monitoramento da expressão e purificação das proteínas Hsp701A_NBD recombinante por SDS-PAGE 15%.....34
- Figuras 7** - Espectro obtido da estrutura secundária da proteína Hsp701A_NBD humana recombinante por meio de Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular (CD).....36
- Figura 8** - Espectros do experimento de Fluorescência Intrínseca do Triptofano da Hsp701A_NBD na presença dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , ATP e ADP.....37
- Figura 9** - Espectro de Desenovelamento Térmico da construção proteica recombinante Hsp701A_NBD na presença de na ausência de íons Ca^{2+} e Mg^{2+}41
- Figura 10** - Perfil de eluição da proteína de interesse em diferentes soluções em comparação com proteínas padrão de massa molecular conhecida.....43

Figura 11 - Atividade ATPásica da construção Hsp701A_NBD na presença de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos aminoácidos acerca de sua hidrofiliicidade e hidrofobicidade...14	14
Tabela 2 - Proteínas da família das Hsp70 humanas, a quantidade de aminoácidos que as formam e as suas respectivas localizações celulares.....19	19
Tabela 3 - Composição de aminoácidos do NBD da Hsp701A.....20	20
Tabela 4 - Constituição das soluções-tampão utilizadas no decorrer do trabalho.....23	23
Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos da construção Hsp701A_NBD.....32	32
Tabela 6 - Conteúdo médio de estrutura secundária da proteína Hsp70-1A_NBD na sua forma APO.....35	35
Tabela 7 - Centros de Massa Espectrais calculados a partir da análise da Fluorescência Intrínseca do Triptofano nas amostras.....39	39
Tabela 8 - Valores de ponto médio de transição da proteína Hsp701A_NBD na presença e ausência de íons Mg^{2+} e Ca^{2+}40	40
Tabela 9 - Dados teóricos obtidos a partir da sequência de aminoácido da proteína recombinante Hsp70-1A_NBD na forma de monômero pelo Software Sednterp.....41	41
Tabela 10 - Valores obtidos através do Coeficiente de Partição obtido experimentalmente...42	42

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Lei de Beer-Lambert.....	26
Equação 2 - Cálculo da Elipticidade Molar Residual ($[\theta]_{EMR}$).....	27
Equação 3: Cálculo do Centro de Massa Espectral.....	28
Equação 4: Cálculo do Coeficiente de Partição (K_{av}).....	29
Equação 5: Cálculo da Razão Friccional da proteína.....	29

ABREVIATURAS E SIGLAS**ATP** - Adenosina Trifosfato**CD** - Dicroísmo Circular**ADP** - Adenosina Difosfato**Hsp701A_NBD** - Domínio NBD da Proteína Hsp701A**CaCl₂** - Cloreto de Cálcio**Pi** - Fosfato Inorgânico**MgCl₂**- Cloreto de Magnésio**<λ>** - Centro de Massa Espectral**Ca²⁺** - Íon Divalente Cálcio**T_m** - Temperatura Média de Transição**Mg²⁺** - Íon Divalente Magnésio**W** - Triptofano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aminoácidos e Proteínas	14
1.2. Chaperonas Moleculares e Enovelamento Proteico	15
1.3. A Família das Hsp70	16
1.4. Hsp701A Humana	19
1.5. Íons Cálcio e Hsp70 Humanas	21
2. OBJETIVOS	22
2.1. Gerais	22
2.2. Específicos	22
3. METODOLOGIA	23
3.1. Constituição das Soluções-Tampão	23
3.2. Propagação do vetor	23
3.3. Determinação dos Parâmetros Físico-Químicos da Construção Hsp701A_NBD	23
3.4. Expressão, Purificação e Quantificação de Hsp701A_NBD	24
3.5. Ensaio de Caracterização Biofísica	26
3.5.1. Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular	26
3.5.2. Fluorescência Intrínseca do Triptofano	27
3.5.3. Estabilidade Térmica	27
3.6. Ensaio de Caracterização Hidrodinâmica	28
3.6.1. Cromatografia de Exclusão por Tamanho Analítica	28
3.7. Ensaio de Caracterização Bioquímica	29
3.7.1. Atividade ATPásica	29
3.8. Fluxograma da Metodologia	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos de Hsp701A_NBD	32
4.2. Expressão, Purificação e Quantificação de Hsp701A_NBD	32
4.3. Ensaio de Caracterização Biofísica	34
4.3.1. Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular	34

	14
4.3.2. Fluorescência Intrínseca do Triptofano	35
4.3.3. Estabilidade Térmica	38
4.4. Ensaio de Caracterização Hidrodinâmica	40
4.4.1. Cromatografia de Exclusão de Tamanho Analítica	40
4.5. Ensaio de Caracterização Bioquímica	42
4.5.1. Atividade ATPásica	42
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	46
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	47
8. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aminoácidos e Proteínas

Proteínas são macromoléculas bastante complexas física e funcionalmente. Elas são responsáveis por papéis importantes na homeostase celular. Uma proteína é gerada pelo processo de tradução, torna-se madura por meio do enovelamento proteico e eventos de processamento pós-traducional, alterna entre estados de trabalho e repouso através da interação com fatores reguladores, envelhece e por fim é degradada a seus aminoácidos constituintes, os quais podem ser reutilizados ou usados para gerar energia metabólica. Embora mais de 300 aminoácidos já tenham sido relatados existentes na natureza, as proteínas são sintetizadas quase exclusivamente por um grupo de 20 L- α -aminoácidos nos seres humanos, chamados de padrão, que por sua vez são codificados por tríades de nucleotídeos, denominados códons (RODWELL, V. W., 2017).

Os aminoácidos podem ser classificados de diferentes formas. A classificação mais genérica é como hidrofóbico ou hidrofílico (**Tabela 1**), sendo esta distinção relacionada com a capacidade destes de associar ou minimizar o contato com ambientes aquosos. Além disso, os aminoácidos também podem ser classificados como básicos, ácidos, aromáticos, alifáticos ou contendo enxofre, com base na composição e nas propriedades de seus grupos funcionais (RODWELL, V. W., 2017).

Aminoácidos Hidrofílicos	Aminoácidos Hidrofóbicos
Arginina; Asparagina; Ácido Aspártico; Cisteína; Ácido Glutâmico; Glutamina; Glicina; Histidina; Lisina; Serina; Treonina.	Alanina; Isoleucina; Leucina; Metionina; Fenilalanina; Prolina; Triptofano; Tirosina; Valina.

Tabela 1 - Classificação dos aminoácidos acerca de sua hidrofilicidade e hidrofobicidade.

Fonte: Elaborado pela autora com base em RODWELL, V. W. (2017).

Devido a sua complexidade, as proteínas têm a sua estrutura organizada em quatro níveis (**Figura 1**). A estrutura primária está relacionada com a sequência de aminoácidos que forma uma proteína e que pode ser representada basicamente por uma série de letras que representam aminoácidos. A estrutura secundária está relacionada com motivos recorrentes simples, sendo os mais comuns as α -hélices e as folhas- β , os quais são repetidos na maior parte da extensão das proteínas. A estrutura terciária representa a conformação tridimensional geral da proteína, isto é, o seu enovelamento, que é o maior responsável por determinar a sua função, isto é, monômeros. Por fim, a estrutura quaternária é o arranjo entre várias cadeias

polipeptídicas de proteínas que possuem mais de uma (RIBEIRO, A. J. M., 2014). No entanto, nem toda proteína tem os quatro níveis estruturais.

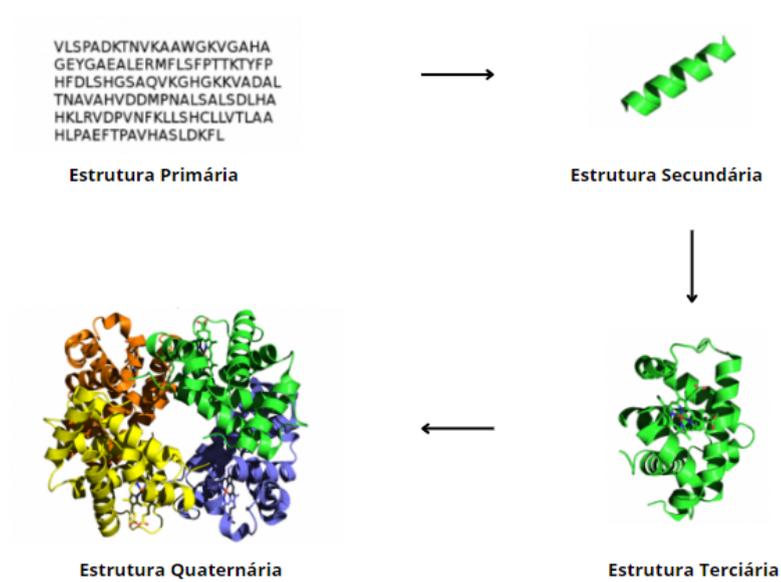


Figura 1 - Representação esquemática de estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária de proteínas.

Fonte: Adaptado de RIBEIRO, A. J. M. (2014).

1.2. Chaperonas Moleculares e Enovelamento Proteico

Como visto, o enovelamento proteico é um processo de extrema importância, já que por meio dele as proteínas atingem uma estrutura tridimensional nativa, característica de cada uma delas, o que permite a elas desempenhar suas funções de forma eficiente. Entretanto, esse processo é complexo e diversos fatores podem levar ao enovelamento incorreto, acarretando assim na formação de proteínas não funcionais e de agregados proteicos tóxicos ao meio celular (NELSON, D. L., COX, M. M., 2014; HETZ, C., ZHANG, K., KAUFMAN, R. J., 2020).

De forma que os processos do enovelamento proteico ocorram eficientemente, os sistemas biológicos desenvolveram um mecanismo de controle de qualidade das proteínas (PQC, do inglês *Protein Quality Control*), constituído por chaperonas moleculares e outras proteínas envolvidas na depuração de proteínas (KOHLENER, V., ANDRÉASSON, C., 2020). As chaperonas moleculares são compostas por diferentes famílias de proteínas, as quais são agrupadas de acordo com a massa molecular em kDa (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40,

Small Hsps, entre outras) e estão presentes tanto em células procarióticas quanto eucarióticas (RICHTER, K., HASLBECK, M., BUCHNER, J., 2010). As chaperonas apresentam importante papel na homeostase celular, visto que são capazes de realizarem diversas funções celulares fundamentais, como: o auxílio no correto enovelamento, o transporte de proteínas para compartimentos celulares, a prevenção da formação de agregados proteicos e desagregação e no direcionamento de proteínas cliente para a proteólise e depuração (HARTL, F. U., BRACHER, A., HAYER HARTL, M., 2011).

As chaperonas moleculares, também denominadas como proteínas de choque térmico ou, do inglês, *Heat Shock Proteins* (Hsps) são altamente expressas sob condições de estresse térmico, estresse oxidativo, hipóxia, metais pesados e radiação ultravioleta, porém, também são expressas de forma constitutiva pelos sistemas de expressão celular em condições de não estresse (SOUFI *et al.*, 2008; KALMAR, B., GREENSMITH, L., 2009; VOSTAKOLAEI *et al.*, 2020). A desregulação dessas proteínas está associada a diversas patologias humanas, como: câncer, doenças imunológicas, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, obesidade, entre outras (ARAUJO, N., HEBBAR, N., RANGNEKAR, V. M., 2018; ENOGIERU *et al.*, 2019; FU *et al.*, 2021).

1.3. A Família das Hsp70

A família das Hsp70 apresenta maior caracterização em relação às outras famílias de chaperonas moleculares, além disso é constituída por proteínas conservadas entre si, ATP-dependentes e abundantes (RICHTER, K., HASLBECK, M., BUCHNER, J. 2010; VOSTAKOLAEI *et al.*, 2020). As Hsp70 são proteínas tecido-específicas envolvidas nas tarefas biológicas basais de manutenção celular (DAUGAARD, M., ROHDE, M., JÄÄTTELÄ, M., 2007).

Estruturalmente, as Hsp70 são constituídas por dois domínios: o domínio de ligação ao nucleotídeo adenosina (NBD, do inglês *Nucleotide Binding Domain*) e o domínio de ligação a proteína-cliente (PBD, do inglês *Protein Binding Domain*). Esses domínios estão conectados por uma região flexível denominada “*linker*” (**Figura 2**), que apresenta um importante papel na comunicação alostérica entre os domínios (VOSTAKOLAEI *et al.*, 2020).

O NBD das Hsp70 possui aproximadamente 45 kDa e localiza-se na região N-terminal e é composto por dois subdomínios que possuem estruturas secundárias majoritariamente formadas por α -hélices. Estas estruturas, se ligam ao nucleotídeo ATP e hidrolisam-no em

ADP e Pi, logo, sendo o domínio responsável pela atividade ATPásica intrínseca característica das Hsp70.

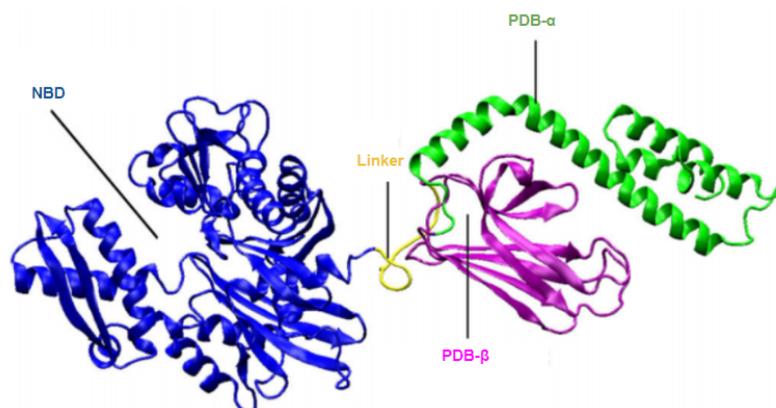


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura terciária das Hsp70. Em azul é referente ao NBD, e as regiões em rosa e verde, respectivamente, aos subdomínios PDB-β e PDB-α, que compõem o PBD (PBD:2KHO).

Fonte: Adaptado de VOSTAKOLAEI *et al.* (2020).

As Hsp70 apresentam um ciclo funcional guiado pela ligação a proteínas cliente e aos nucleotídeos ATP e ADP. A hidrólise do ATP, catalisada pelo NBD, é fundamental para a atividade chaperona das Hsp70, de forma que a ligação aos diferentes nucleotídeos ao NBD provoca mudanças conformacionais que são transmitidas ao PBD e a ligação de proteínas-cliente ao PBD geram mudanças conformacionais que são transmitidas ao NBD. Quando ligadas ao ADP, os domínios NBD e PBD ficam isolados, sendo apenas intermediados pela região do *linker*. Dessa forma, o PBD se apresenta na sua conformação fechada, o que significa que a tampa do subdomínio PDB-α se encontra localizada sobre o PDB-β. Nesta situação, existe uma alta afinidade deste domínio pelas proteínas-cliente, isto é, baixa troca de proteínas cliente (MAYER, M. P., 2013; KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020).

Já a ligação de ATP ao NBD desencadeia um rearranjo conformacional que causa a dissociação da tampa PDB-α ao PDB-β, causando então a ligação do PBD e do linker ao NBD. Dessa forma, o NBD fica em uma conformação inadequada para realizar a sua ação catalítica de hidrólise do ATP em ADP e Pi. Enquanto isso, a conformação aberta que o PBD possibilita altas taxas de troca da proteína cliente, devido à uma baixa afinidade a elas nesta conformação (MAYER, M. P., 2013; KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020).

Devido à ligação da proteína-cliente ao PBD, os seus subdomínios PBD- α e PBD- β são liberados da ligação ao NBD e por sua vez, o PBD volta a adotar a conformação fechada. Isso proporciona uma mudança conformacional no NBD que permite que este exerça a sua atividade catalítica de hidrólise do ATP em ADP e Pi, auxiliado por chaperonas Hsp40 (RADONS, J., 2016). Depois da hidrólise a afinidade da chaperona à proteína-cliente é aumentada, facilitando assim a atividade de enovelamento desta. Por fim, co-chaperonas que atuam como fator de troca de nucleotídeo trocam o ADP por ATP, o que gera uma mudança conformacional que desencadeia a abertura do PDB e consequente liberação da proteína-cliente, o que permite que o ciclo se inicie novamente (MAYER, M. P., 2013; KOHLER, V., ANDRÉASSON, C., 2020) (**Figura 3**). Vale ressaltar que íon cálcio participa como cofator metálico na coordenação dos nucleotídeos adenosina na dinâmica de atuação das chaperonas moleculares da família das Hsp70 (PREISLER *et al.*, 2020). Sendo assim, na presença deste cátion ocorre o aumento da afinidade do NBD por ADP, que resulta em uma liberação mais lenta de proteínas-cliente.

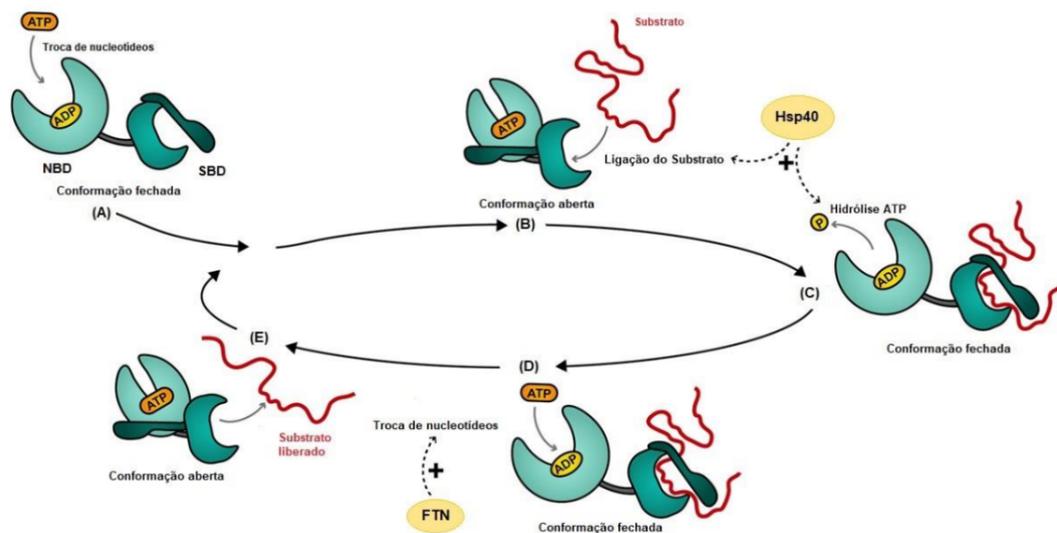


Figura 3 - Ciclo alostérico das Hsp70 seguindo à ligação de nucleotídeos adenosina e hidrólise do ATP em ADP e Pi aos processos de ligação e liberação da proteína cliente. Os domínios NBD e PBD são mostrados como domínios sem contato direto intermediados pela região do *linker* (A). O ciclo mostrado é regulado pela ligação dos nucleotídeos ATP e ADP no NBD, e como pode ser visualizado, a ligação ao ATP rearranja conformacionalmente a proteína, deixando uma conformação aberta para que o PBD se ligue ao substrato (B). Neste sentido, através da coparticipação da co-chaperona Hsp40, acontece a ligação da proteína cliente ao PBD e a hidrólise do ATP em ADP e Pi no NBD (C). Depois disso, devido à mudança de ATP para ADP no NBD, a tampa do PBD- α se fecha sobre a proteína cliente resultando no aumento da afinidade da chaperona por sua proteína alvo que está desenovelada para que a proteína da família Hsp70 realize sua função de enovelamento da proteína cliente (D). Posteriormente, com o estímulo de Fatores de Troca de Nucleotídeos (FTN), por exemplo,

co-chaperonas, desencadeia-se a abertura do PBD e a liberação do substrato, o que permite que o ciclo da chaperona se reinicie (E).

Fonte: Adaptado de KOHLER, V., ANDRÉASSON, C. (2020).

1.4. Hsp701A Humana

A família das Hsp70 humanas (HspAs) é composta por 13 isoformas gênicas que se diferenciam quanto ao nível de expressão, localização celular e constituição dos aminoácidos (**Tabela 2**) (RADONS, J., 2016).

Proteína	Tamanho em Aminoácidos	Localização Celular
Hsp701A	641	Citosol, núcleo, membrana celular e exossomos extracelulares
HspA1B	641	Citosol, núcleo e exossomos extracelulares
HspA1L	641	Citosol e núcleo
HspA2	639	Citosol, núcleo, membrana celular e exossomos extracelulares
HspA5	654	Retículo endoplasmático e exossomos extracelulares
HspA6	643	Citosol e exossomos extracelulares
HspA7	367	Micropartículas do sangue e exossomos extracelulares
HspA8	646	Citosol, núcleo, membrana celular e exossomos extracelulares
HspA9	679	Mitocôndria e núcleo
HspA12A	675	Intracelular e exossomos extracelulares
HspA12B	685	Células endoteliais, intracelular e plasma sanguíneo
HspA13	471	Retículo endoplasmático, exossomos extracelulares e microsossomos
HspA14	509	Citosol e membrana celular

Tabela 2 - Proteínas da família das Hsp70 humanas, a quantidade de aminoácidos que as formam e as suas respectivas localizações celulares.

Fonte: Adaptado de RADONS, J. (2016).

Dentre os produtos gênicos de Hsp70 humanas encontra-se a Hsp701A, também denominada como Hsp70-1, Hsp72, HspA1, Hsp70-1A e Hsp70i. Ela é a principal chaperona citosólica estudada, entretanto, pode estar presente também no núcleo, membrana celular e exossomos extracelulares (RADONS, J., 2016). A Hsp701A humana desempenha um

importante papel na proteostase celular, e apresenta uma super expressão sob condições de estresse térmico.

Vale ressaltar que muitas das doenças neurodegenerativas são consideradas proteinopatias, já que são causadas pelo acúmulo de proteínas patológicas enoveladas incorretamente (BERETTA, G., SHALA, A., 2022). Dessa forma, a diminuição da quantidade de chaperonas moleculares pode influenciar na existência de doenças neurodegenerativas. Enquanto, células cancerígenas dependem da expressão aumentada de proteínas da família Hsp70, já que elas ligam-se aos resíduos hidrofóbicos expostos em proteínas desdobradas e enoveladas incorretamente, mantendo-as num estado de dobragem intermediária e impedindo a sua agregação (MURPHY, M, 2013). Portanto, a supracitada proteína faz parte do controle de qualidade de proteínas e defeitos nela podem resultar em diversas patologias humanas tais como, doenças neurodegenerativas, diabetes, alguns tipos de cânceres, entre outras (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I., 2006; KASIOUMI *et al.*, 2019; SULZBACHER, M. M., LUDWIG, M. S., HECK, T. G, 2020).

Assim como as outras proteínas da família das Hsp70, a Hsp701A possui dois domínios: o NBD e o PBD. Eles possuem, respectivamente, 43,7 e 30,2 kDa de massa molecular (Software Sednterp - Disponível em: <http://www.rasmb.org/sednterp/>). A proteína completa sem a cauda de histidina, considerando-se o NBD, domínio de interesse deste estudo, e o PBD, tem a composição de aminoácidos mostrada na **Tabela 3**.

ALA	ARG	ASN	ASP	CYS	GLN	GLU	GLY	HIS	ILE
57	31	30	45	5	27	47	55	7	42
LEU	LYS	MET	PHE	PRO	SER	THR	TRP	TYR	VAL
50	50	9	25	24	34	41	2	15	45

Tabela 3 - Composição de aminoácidos do NBD da Hsp701A.

Legenda: ALA - Alanina; ARG - Arginina; ASN - Asparagina; ASP - Aspartato (Ácido aspártico); CYS - Cisteína; GLN - Glicina; HIS - Histidina; ILE - Isoleucina; LEU - Leucina; LYS - Lisina; MET - Metionina; PHE - Fenilalanina; PRO - Prolina; SER - Serina; THR - Treonina; TRP - Triptofano; TYR - Tirosina; VAL - Valina.

Fonte: Autoria própria com auxílio do Software Sednterp (Disponível em: <http://www.rasmb.org/sednterp/>).

1.5. Íons Cálcio e Hsp70 Humanas

Aproximadamente 60% do corpo humano adulto é composto por líquidos que são basicamente compostos por soluções aquosas de íons e outras substâncias. Dois terços desses fluidos encontram-se no espaço intracelular, denominados como LIC (líquido intracelular), cuja constituição contém cátions, distribuídos majoritariamente em: potássio (em média 140 mmol.L⁻¹) e magnésio (em média 29 mmol.L⁻¹), mas que também conta com a participação de cálcio e outros (SMELTZER S. C., BARE, B. G, 2005; GUYTON, A. C., HALL, J. E., 2011). É importante ressaltar que a concentração citosólica de íons Ca²⁺ em células animais varia de 100 a 200 nmol.L⁻¹ (CARAFOLI, E., 1987), enquanto no lúmen do RE é estimada que essa concentração seja de 1 a 3 mmol.L⁻¹ (MELDOLESI, J., POZZAN, T., 1998).

O cálcio participa na dinâmica de atuação das chaperonas moleculares da família das Hsp70, pois na presença deste cátion divalente ocorre o aumento da afinidade do NBD por ADP, que resulta em uma liberação mais lenta de proteínas-cliente. Desta forma, dentro do exposto, a Hsp701A utiliza o íon Ca²⁺ como cofator metálico na coordenação dos nucleotídeos adenosina (PREISSLER *et al.*, 2020)..

Adicionalmente, íons Mg²⁺ causam aumento da estabilidade térmica do NBD da Hsp701A (BORGES, J. C., RAMOS, C. H. I, 2006) e da HspA9 (DORES-SILVA *et al.*, 2015). Sendo assim, busca-se uma análise comparativa do efeito do Ca²⁺ e Mg²⁺ na presença e na ausência de nucleotídeos adenosina ATP e ADP na estrutura da construção proteica referente ao NBD da hHsp701A de forma a subsidiar informações do efeito destes íons sobre as proteínas completas.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Produzir de forma purificada e enovelada a construção recombinante do NBD da proteína Hsp701A, na presença da cauda de histidina, assim como avaliar em condições saturantes a ação dos íons divalentes cálcio e magnésio e dos nucleotídeos adenosina ATP e ADP na estrutura, na estabilidade térmica e química e nos parâmetros hidrodinâmicos do construto de interesse.

2.2. Específicos

- Estimativa dos parâmetros físico-químicos da Hsp701A_NBD.
- Expressão e purificação da construção recombinante Hsp701A_NBD.
- Quantificação da construção recombinante Hsp701A_NBD para o cálculo da quantidade de proteína adicionada em cada experimento.
- Avaliação do conteúdo de estrutura secundária, estrutura terciária local e estabilidade térmica referente a Hsp701A_NBD, na presença de Cálcio e Magnésio e dos nucleotídeos ATP e ADP.
- Entendimento em termos de parâmetros hidrodinâmicos, como o raio hidrodinâmico do construto recombinante da proteína Hsp701A_NBD na presença e na ausência de cálcio e magnésio e dos nucleotídeos ATP e ADP.
- Avaliação da Atividade ATPásica da proteína Hsp701A_NBD na presença de Cálcio e Magnésio.

3. METODOLOGIA

3.1. Constituição das Soluções-Tampão

As soluções tampão, e as suas respectivas constituições, que foram utilizadas no decorrer da produção deste trabalho podem ser visualizadas na **Tabela 4**.

Tampão de Lise	Tris-HCl 50 mmol.L ⁻¹ (pH = 8,0), KCl 100 mmol.L ⁻¹
Tampão de Lavagem da Coluna da Cromatografia de Afinidade	Tris-HCl 20 mmol.L ⁻¹ (pH = 8,0), NaCl 100 mmol.L ⁻¹ , Imidazol 20 mmol.L ⁻¹
Tampão de Eluição das Proteínas na Coluna de Afinidade	Tris-HCl 20 mmol.L ⁻¹ (pH = 8,0), NaCl 100 mmol.L ⁻¹ , Imidazol 500 mmol.L ⁻¹
Tampão da Cromatografia de Exclusão por Tamanho e nos Ensaios de Caracterização Biofísica	Tris-HCl 25 mmol.L ⁻¹ (pH = 8,0), NaCl 50 mmol.L ⁻¹ , Na ₂ HPO ₄ 5 mmol.L ⁻¹ , KCl 5 mmol.L ⁻¹ , β-mercaptoetanol 2 mmol.L ⁻¹
Tampões utilizados na Atividade ATPásica	Os tampões utilizados nos ensaios que envolviam atividade ATPásica não possuíam adição de fosfato.

Tabela 4 - Constituição das soluções-tampão utilizadas no decorrer do trabalho.

Fonte: Autoria Própria.

3.2. Propagação do vetor

A propagação do vetor pET28a (pET28a::Hsp701A_NBD) para a produção do presente trabalho foi realizada a partir do protocolo de extração por lise alcalina do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems. Para assim realizá-lo, transformou-se cepas de *Escherichia coli* DH5α com vetores pET28a (pET28a::Hsp701A_NBD), os quais estavam separados em alíquotas de diferentes concentrações e foram previamente sintetizados e fornecidos pelo grupo de pesquisa do laboratório. Após realizar a transformação destas células bacterianas, elas cresceram em meio de cultura líquido LB (Lysogeny Broth) (10 g.L⁻¹ NaCl, 10 g.L⁻¹ Peptona e 5 g.L⁻¹ de Extrato de Levedura, pH 7,0) contendo 5 µg.mL⁻¹ do antibiótico canamicina, durante 16 h. Então, realizou-se a extração indicada pelo kit e congelou-se o tubo contendo os vetores após o process a -20 °C.

3.3. Determinação dos Parâmetros Físico-Químicos da Construção Hsp701A_NBD

A partir de sequências de aminoácidos fornecidas pelo grupo do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas (LBBP - IQSC), os parâmetros físico-químicos, como: constante de absorvidade molar em 280 nm (na presença e na ausência de guanidina), a qual

é importante para os futuros cálculos de concentração proteica que serão discorridos; massa molecular do domínio; quantidade de aminoácidos presentes no domínio, considerando-se a cauda de histidina; e os parâmetros hidrodinâmicos, como por exemplo o Raio de Stokes teórico foram estimados. Realizou-se isso com a utilização do software Sednterp (Disponível em: <http://www.rasmb.org/sednterp/>). Ademais, também foi possível verificar a constituição específica desta construção proteica.

3.4. Expressão, Purificação e Quantificação de Hsp701A_NBD

O vetor pET28a:Hsp701A_NBD foi utilizado para transformar cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) via choque térmico. Posteriormente, pré-inoculou-se uma colônia destas células transformadas em 50 mL de meio de cultura LB (Lysogeny Broth) (10 g.L⁻¹ NaCl, 10 g.L⁻¹ Peptona e 5 g.L⁻¹ de Extrato de Levedura, pH = 7,0) com 5 µg.mL⁻¹ de antibiótico canamicina, e incubou-se à 37 °C, 200 rpm por 16-18 horas. Depois disso, seguiu-se para uma posterior indução da expressão a 30 °C, por 6 h, a partir da adição de 0,4 mmol.L⁻¹ de isopropil tio-β-D-galactosídeo, condição a qual foi previamente testada pelo grupo do laboratório e definida como melhor para a expressão da proteína recombinante, visto que nesta temperatura a proteína se encontra mais solúvel. Para que isso fosse possível, o pré-inóculo foi diluído em 5% (v/v) em 500 mL de meio LB com 500 µg.mL⁻¹ de canamicina e incubado à 37 °C e 220 rpm até que uma Densidade Óptica em 600 nm de 0,6 à 0,8 fosse atingida. Ao fim da indução, as células bacterianas foram sedimentadas e recolhidas por meio de uma etapa de centrifugação (13600xg, 4 °C e 20 min) e então congeladas para armazenamento anterior à purificação.

Posteriormente, para o processo de pré-purificação, o pellet contendo as células bacterianas armazenadas e congeladas foi ressuspensas em Tampão de Lise, com adição de 0,01 mgmL⁻¹ de Lisozima Sigma e 5 Unidades de DNase Sigma e incubadas por 30 min em banho de gelo. Para o processo seguinte, o de lise mecânica, utilizou-se o sonicador Ultrasonic Homogeneizador Sonicator Celular Processor Disruptor Mixer 900, com uma amplitude de 35% com pulsos de 6 s e intervalos de 1 min) para obtenção do lisado celular, sempre mantendo a amostra em banho de gelo. Então, o lisado celular passou por um processo de centrifugação (13600 x g, 4 °C, 40 min). Após isto, filtrou-se o sobrenadante, por meio de uma membrana hidrofílica de 0,45 µm. O sobrenadante foi utilizado devido ao fato de que a maior quantidade proteica se encontra solúvel nele, como será mostrado pelos resultados.

O processo de purificação em si consistiu de duas etapas, a primeira delas foi cromatografia de afinidade por íons (Ni^{2+}) imobilizados, o que é possibilitado pela presença do DNA codante clonado no vetor pET28a, o qual é responsável pela expressão de um peptídeo de fusão de poli-histidina, conhecido como cauda de histidina, na região N-terminal das proteínas recombinantes. Este processo utilizou uma coluna HiTrap Chelating HP 5mL (GE Healthcare LifeSciences), com íons Ni^{2+} imobilizados.

A segunda etapa de purificação consiste em uma cromatografia de exclusão por tamanho preparativa, a qual foi realizada na coluna cromatográfica constituída por uma resina polimérica HiLoad Superdex 16/60 200 Prep Grade (GE Healthcare LifeSciences), a qual foi ligada ao sistema FPLC, auxiliada pelo equipamento ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare LifeSciences) e a um banho térmico de circulação, que permitiu o controle da temperatura em 4 °C durante todo o processo cromatográfico. A eluição da proteína de interesse foi realizada utilizando tampão de eluição composto por Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹ (pH 8,0), NaCl 50 mmol.L⁻¹, KCl 5 mmol.L⁻¹, Fosfato de Sódio 5 mmol.L⁻¹ e β -mercaptoetanol 2 mmol.L⁻¹. A fim de confirmar o grau de pureza da proteína recombinante, utilizou-se análises por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Com o intuito de realizar experimentos posteriores, quantificou-se a proteína recombinante por meio de espectroscopia de absorção molecular, com o auxílio do Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 na região de 280 nm, o que pode ser realizado devido à presença dos resíduos triptofano e tirosinas. Para realizar tal processo, as proteínas foram diluídas 5 vezes em solução de Cloridrato de Guanidina 7,5 mol.L⁻¹ e Na_2HPO_4 25 mmol.L⁻¹ (pH = 6,5), e incubadas por 30 min antes da leitura, em temperatura ambiente (EDELHOCH, H., 1967). A guanidina presente na solução possibilita uma condição desnaturante que permite a exposição dos resíduos de W e Y do cerne hidrofóbico e diminui as ligações entre resíduos de cisteína da proteína, o que faz com que não haja interferência do ambiente hidrofóbico na absorção de luz (NOBLE, J. E., 2014).

Feita a medição, coletou-se os espectros de absorbância da solução contendo a proteína e do tampão (branco) entre os comprimentos de onda de 320 a 250 nm e então aplicou-se a lei de Beer-Lambert no valor de absorbância em 280 nm (**Equação 1**) a fim de calcular a concentração molar.

$$A = C \times l \times \varepsilon$$

Equação 1 - Lei de Beer-Lambert. A é a absorvância em unidades arbitrárias, C é a concentração molar (mol.L^{-1}), l é o caminho óptico da cubeta em centímetros, e ε é o coeficiente de extinção molar em $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L.cm}^{-1}$.

3.5. Ensaio de Caracterização Biofísica

3.5.1. Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular

Um dos objetivos do presente trabalho foi a produção enovelada do domínio recombinante Hsp701A_NBD. Para isso, utilizou-se os experimentos de espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) no UV-Distante (260 - 190 nm), os quais foram realizados com o auxílio de um Espectropolarímetro J-815 (Jasco Inc.) acoplado a um sistema peltier (PFD 425S) e banho térmico para controle da temperatura. Durante todo o processo a temperatura foi mantida a 20 °C. A partir disto, avaliou-se o conteúdo de estrutura secundária das construções proteicas referente à proteína de interesse na sua forma APO.

Nos experimentos utilizando este equipamento, a luz, que é circularmente polarizada à esquerda e à direita incide sobre a amostra, o que possibilita realizar a medição da diferença de absorção que ocorre devido a cromóforos quirais. Isso acarreta então em uma luz elipticamente polarizada e seu ângulo (Θ), possibilitando assim monitorar da composição estrutural secundária da proteína e a avaliação da estabilidade proteica (KELLY, S. M., JESS, T. J., PRICE, N. C., 2005)

Para a realização deste experimento, a proteína de interesse Hsp701A_NBD foi incubada por 1 h em temperatura ambiente. Então, preparou-se a proteína em concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e as leituras foram realizadas em cubeta com caminho óptico de 0,1 cm. Para a realização das análises dos dados, os valores CD foram normalizados para Elipticidade Molar Residual ($[\theta]_{EMR}$) (CORREA, D. H. A., 2009) (**Equação 2**)

$$[\theta]_{EMR} = \frac{\theta_{(\lambda)}}{10.[c].l.n}$$

Equação 2 - Cálculo da Elipticidade Molar Residual ($[\theta]_{EMR}$). $\theta(\lambda)$ é o sinal de CD em elipticidade, n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína, l é o caminho óptico da cubeta em cm, e [c] é a concentração da proteína em mol.L^{-1} .

Feito isso, realizou-se então a deconvolução dos espectros já normalizados para $[\theta]_{EMR}$ com o auxílio do Software CDNN Deconvolution, o que possibilitou calcular a porcentagem relativa do conteúdo de estruturas secundárias presente nas proteínas recombinantes.

3.5.2. Fluorescência Intrínseca do Triptofano

Os aminoácidos não absorvem a luz visível e, assim, são incolores. Contudo, a tirosina, a fenilalanina e, principalmente, o triptofano absorvem luz ultravioleta com elevado comprimento de onda (250-290 nm). Como ele absorve, de maneira eficiente, 10 vezes mais luz ultravioleta do que a fenilalanina e a tirosina, o triptofano é o principal responsável pela habilidade da maioria das proteínas em absorver luz na região de 280 nm.

Nos ensaios de espectroscopia de fluorescência, utilizou-se os resíduos de triptofano (W) como sondas intrínsecas de fluorescência para a Hsp701A, em sua forma APO e também na presença do cálcio 2 mM e magnésio 2 mM e na presença e na ausência dos nucleotídeos adenosina, a fim de investigar a estrutura terciária local do NBD recombinante da Hsp701A. Os espectros foram coletados de 310-420 nm, visto que houve a utilização do comprimento de onda de excitatório de 295 nm. Foi assim realizado com o intuito verificar apenas o aminoácido triptofano, já que a excitação em comprimentos de onda menores acarreta na excitação de outros aminoácidos aromáticos, em 280 nm, a tirosina, e em 260 nm, a fenilalanina (RAMANUJAM. et al., 2000) O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro de fluorescência F-4500 (Hitachi) acoplado a um banho térmico para controle de temperatura de 20 °C. A partir dos dados obtidos, calculou-se o centro de massa espectral ($\langle\lambda\rangle$), por meio da **Equação 3**, e o λ máximo de emissão de fluorescência (λ_{max}) (LAKOWICS, J. R., 2006).

$$\langle\lambda\rangle = \frac{\sum\lambda_i F_i}{\sum F_i}$$

Equação 3: Cálculo do Centro de Massa Espectral. λ_i é o comprimento de onda medidos e F_i são as intensidades de fluorescência de λ_i .

3.5.3. Estabilidade Térmica

O desenvolvimento térmico das construções proteicas Hsp701A_NBD foi analisado por CD sob monitoramento em 222 nm. Nesta técnica, utilizou-se o mesmo tampão da cromatografia de exclusão por tamanho preparativa para preparar as amostras proteicas. Tal

experimento foi conduzido a fim de avaliar a estabilidade térmica e verificar as transições térmicas de desnaturação da proteína na presença do cálcio 2 mM. Neste contexto, realizou-se os ensaios em um intervalo de 20 °C a 90 °C e taxa de aquecimento de 1 °C/min. Os experimentos também foram realizados na presença de íons magnésio 2 mM.

3.6. Ensaios de Caracterização Hidrodinâmica

3.6.1. Cromatografia de Exclusão por Tamanho Analítica

Cromatografia de Exclusão por Tamanho Analítica (*aSEC* - do inglês - Analytical Size Exclusion Chromatography) é uma técnica responsável por separar proteínas dependendo do seu tamanho molecular. Isso é possível devido à migração das proteínas através dos poros da resina polimérica. Sendo assim, o volume de eluição da coluna é diretamente influenciado pelo tamanho da proteína (BURGESS, R. R., 2011). Dessa maneira, com o intuito de verificar e calcular as propriedades hidrodinâmicas, como por exemplo o raio hidrodinâmico, a massa molecular aparente e um possível estado oligomérico da proteína Hsp701A_NBD, a cromatografia analítica foi realizada.

Os experimentos foram realizados em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Lifesciences), que foi acoplada ao sistema FPLC, por meio do equipamento ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare LifeSciences) e equilibrada em tampão. Monitoram-se os volumes de eluição em função da absorbância de 280 nm. A Hsp701A_NBD foi injetada individualmente em concentração de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, na ausência e na presença de cálcio 2 mM, magnésio 2 mM, ATP 200 μM e ADP 200 μM .

Com a finalidade de realização dos cálculos para estimar os dados hidrodinâmicos da proteína na presença dos diferentes íons e nucleotídeos na solução, também realizou-se uma corrida de uma mistura de proteínas globulares, em uma concentração aproximada de 1 mg.mL^{-1} , de massa molecular (MM) e Raio de Stokes (R_s) conhecidos. As proteínas padrão utilizadas foram: Apoferritina (480 kDa e $R_s = 67,1 \text{ \AA}$), γ -Globulina (160 kDa e $R_s = 48 \text{ \AA}$), BSA (67 kDa e $R_s = 36,2 \text{ \AA}$), Anidrase Carbônica (30 kDa e $R_s = 23,9 \text{ \AA}$) e Citocromo c (12,3 kDa e $R_s = 14,2 \text{ \AA}$). Para estimar o volume morto (V_0) da coluna, realizou-se a corrida do blue dextran 1 mg.mL^{-1} .

Posteriormente, os volumes de eluição da Hsp701A_NBD, das proteínas padrão e do blue dextran (marcador do volume morto da coluna), foram utilizados para os cálculos dos respectivos Coeficientes de Partição (K_{av}) (**Equação 4**).

$$K_{av} = \frac{(V_t - V_e)}{(V_t - V_0)}$$

Equação 4: Cálculo do Coeficiente de Partição (K_{av}). V_t é o volume total da coluna, V_e é o volume de eluição de cada proteína e V_0 é o volume morto da coluna, todos em mL.

Para calcular a massa molecular aparente (MMapp), realizou-se a plotagem do gráfico de K_{av} versus $\log(\text{MMapp})$. Feito isso, foi possível determinar o valor de R_s do gráfico R_s versus $-\log K_{av}^{1/2}$, que pode ser adquirido através da equação da reta e dos coeficientes angular e linear resultantes do ajuste linear das proteínas padrão, realizado pelo Origin 2018 (Disponível em: <https://www.originlab.com/>). Já para o cálculo da razão friccional (f/f_0) das proteínas, utilizado para determinar um possível estado oligomérico destas, utiliza-se o Raio de Stokes Teórico (R_0) (**Equação 5**), o qual foi previamente obtido pelo Software Sednterp.

$$\frac{f}{f_0} = \frac{R_s}{R_0}$$

Equação 5: Cálculo da Razão Friccional da proteína.

3.7. Ensaios de Caracterização Bioquímica

3.7.1. Atividade ATPásica

Com o intuito de analisar a atividade enzimática da construção Hsp701A_NBD recombinante em hidrolisar ATP em ADP e Pi na presença de cálcio 2 mM e magnésio 2 mM, foram realizados ensaios de atividade ATPásica desta construção proteica. Neste experimento, mediu-se a quantidade de Pi liberado mediante a quebra da molécula de ATP pelo domínio recombinante. Para isso, utilizou-se o kit colorimétrico PiColorLock™ Gold Phosphate Detection System (Innova Biosciences). Este kit funciona a partir da absorvância do corante verde malaquita na presença de Pi, devido à formação de fosfomolibdatos (SILVA *et al.*, 2018). Neste contexto, o Pi livre é proporcional à taxa de hidrólise de ATP pela enzima. Tais experimentos foram realizados em uma microplaca de 96 poços UV-Star (Greiner), incubando-se 2 μM Hsp701A_NBD com concentrações crescentes de ATP e 2 mM de MgCl_2 ou CaCl_2 por 1 h em 37 °C. Vale ressaltar que também foi realizada uma curva padrão com valores crescentes de fosfato inorgânico com o intuito de normalizar os dados que foram

obtidos experimentalmente. A leitura das absorbâncias foi realizada no leitor de microplacas Varioskan™ LUX 3020-197 (Thermo Fisher Scientific) em 590 nm.

3.8. Fluxograma da Metodologia

A fim de melhor compreender a sequência de experimentos que foram realizados para a produção do presente trabalho, construiu-se um fluxograma da metodologia (**Figura 4**)

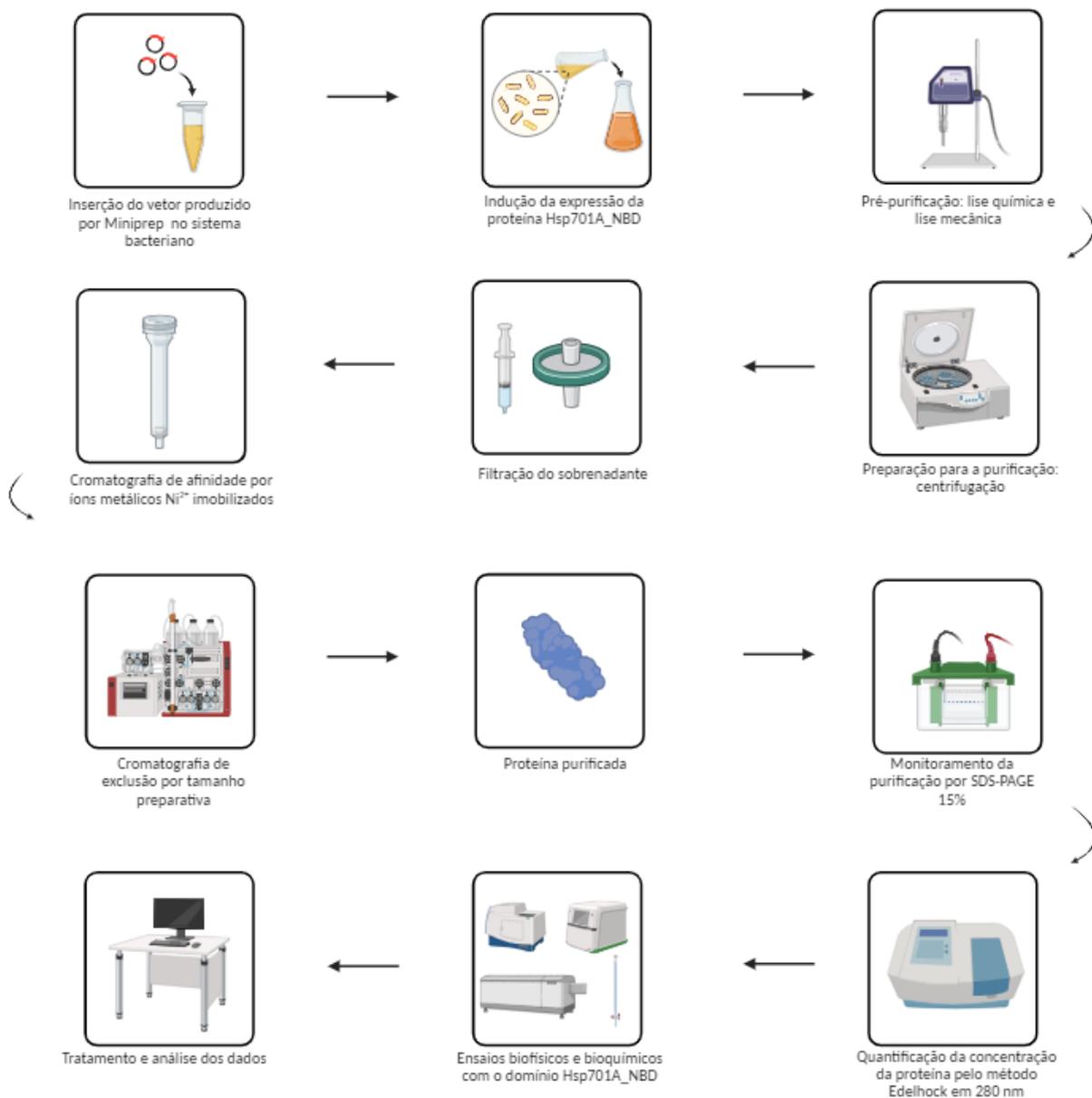


Figura 4 - Fluxograma da metodologia aplicada para a realização do trabalho.

Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.com.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos de Hsp701A_NBD

A partir da utilização do programa Sednterp (Disponível em: <http://www.rasmb.org/sednterp/>), inseriu-se a sequência de aminoácidos pré-determinada pelo grupo do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de proteínas e construiu-se a **Tabela 5**, a qual relaciona os parâmetros bioquímicos do NBD da Hsp701A, considerando-se a presença da cauda de histidina. Tais parâmetros são importantes não somente para o conhecimento, mas também para a realização dos cálculos dos experimentos posteriores.

Construção	Massa Molecular (kDa)	Coefficiente de distinção molar em 280 nm (mol/L) ⁻¹ .cm ⁻¹	Quantidade de Resíduos de Aminoácidos
Hsp701A_NBD	43,602	18490	397

Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos da construção Hsp701A_NBD.

Fonte: Autoria própria.

4.2. Expressão, Purificação e Quantificação de Hsp701A_NBD

Houve a indução da expressão da proteína recombinante no sistema bacteriano e a sua presença foi maior na porção solúvel do que na fração insolúvel (**Figura 6**). Neste contexto, para purificar construção proteica Hsp701A_NBD por meio de duas etapas de cromatografia. A primeira, de afinidade por íons metálicos imobilizados (Skerra, A., Pfitzinger, I., Pluckthun, A., 1991), possibilitada justamente pela existência da fusão destas proteínas à cauda de histidina, denominada de His-tag. A segunda cromatografia aplicada foi a de exclusão por tamanho preparativa, cujo cromatograma (**Figura 5**), mostra o pico de eluição da proteína de interesse, assim como o pico representante de proteínas contaminantes e imidazol, o qual está presente no tampão de eluição.

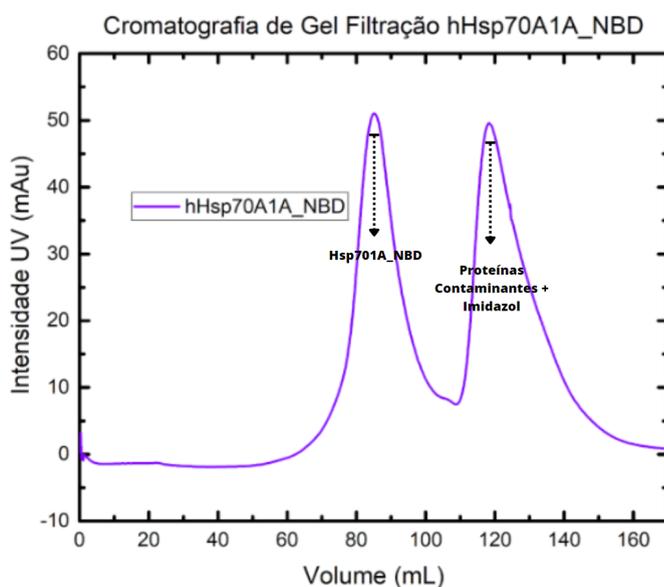
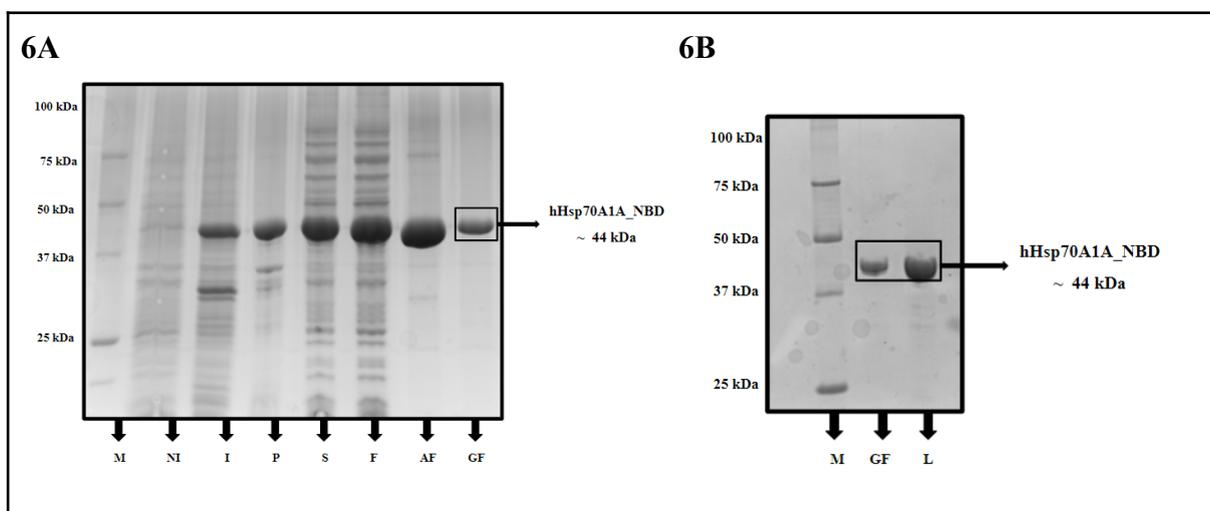


Figura 5 - Cromatograma da exclusão por tamanho preparativa da construção proteica Hsp701A_NBD. O primeiro pico do gráfico representa a eluição da proteína de interesse e o segundo pico representa as proteínas contaminantes juntamente com o imidazol. Vale ressaltar que o passo de cromatografia de exclusão molecular por tamanho preparativa representado foi realizado com o auxílio de uma coluna cromatográfica HiLoad Superdex 200 16/60 e é por isso que a proteína Hsp701A_NBD foi eluída próxima a um volume de 80 mL.

Fonte: Autoria própria.

As etapas de expressão e purificação foram monitoradas por SDS-PAGE 15% para a proteína de massa molecular 43,602 kDa (Hsp701A_NBD) (**Figura 6A**). Além disso, como o grupo de trabalho do laboratório conseguiu realizar a liofilização da proteína, verificou-se a integridade desta a partir da análise via SDS-PAGE 15%, comparando a banda da proteína recém-purificada com a proteína liofilizada (**Figura 6B**).



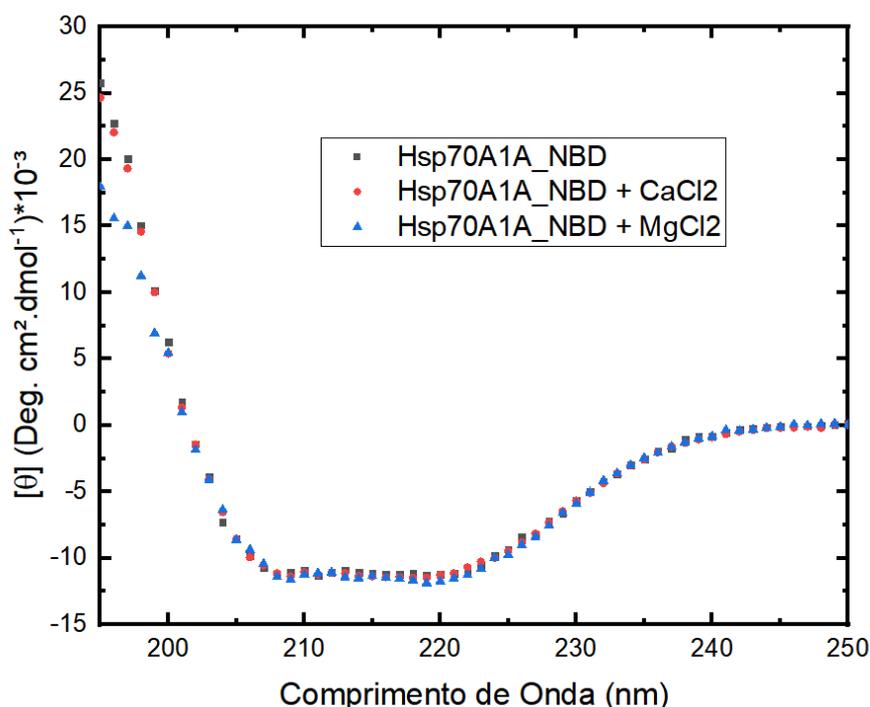
Figuras 6A e 6B - Monitoramento da indução da expressão e purificação das proteínas Hsp701A_NBD recombinante por SDS-PAGE 15%. A Figura 6A representa os passos de purificação da proteína desde a sua indução até a cromatografia de exclusão por tamanho molecular, onde (M) Padrão marcador de massa molecular pré-corado (kDa). (NI) Fração de proteínas totais da cultura sem a indução; (I) Proteínas totais da cultura induzida; (P) Fração insolúvel das proteínas totais da cultura induzidas; (S) Fração solúvel das proteínas totais da cultura induzidas; (F) Amostra coletada após filtração utilizando uma Membrana Hidrofílica Durapore de 0,45 μm e 47 mm de diâmetro; (AF) Proteína coletada após a cromatografia de afinidade; (GF) Proteína coletada após a etapa de cromatografia de exclusão por tamanho preparativa. A Figura 6B representa a comparação da amostra de proteína Hsp701A_NBD liofilizada e uma amostra de proteína Hsp701A_NBD recém purificada, onde (M) Padrão marcador de massa molecular pré-corado (kDa); (GF) Proteína coletada após a etapa de cromatografia de exclusão por tamanho preparativa; (L) Proteína liofilizada.

Fonte: Autoria própria.

4.3. Ensaios de Caracterização Biofísica

4.3.1. Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular

A fim de determinar-se a purificação e o enovelamento correto da construção proteica Hsp701A_NBD, realizou-se experimentos utilizando-se da técnica de Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular. Neste contexto, o espectro que foi obtido (**Figura 7**), revela a presença de estrutura secundária do tipo hélice- α e folha- β nesta proteína recombinante e na presença de íons cálcio e magnésio.



Figuras 7 - Espectro obtido da estrutura secundária da proteína Hsp701A_NBD humana recombinante por meio de Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular (CD). Com esta caracterização, observa-se estrutura secundária do tipo hélice- α e folha- β nas proteínas que foram obtidas de forma recombinante, inclusive na presença de íons cálcio 2 mM e magnésio 2 mM. A Figura 7 demonstra o espectro adquirido por meio da leitura no UV-Distante (260nm - 195nm) da proteína Hsp701A_NBD na sua forma APO e na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Fonte: Autoria própria.

Percebe-se que existem mínimos característicos de Hélice- α , em 222 e 208 nm no gráfico referente ao Dicroísmo Circular no UV-distante da proteína Hsp701A_NBD, tanto na sua forma APO quanto na presença dos íons divalentes. Ao utilizar-se o software CDNN Deconvolution, foi possível verificar a composição percentual em diferentes faixas de comprimentos de onda (195-260 nm; 200-260 nm; 205-260 nm; e 210-260 nm) de cada estrutura secundária na proteína em sua forma APO e na presença dos íons cálcio 2 mM e magnésio 2 mM. Com isso, realizou-se a média entre tais percentuais para verificar a composição experimental da proteína nas condições supracitadas (**Tabela 6**).

Amostra / Estrutura	Hélice- α	Antiparalela	Paralela	Folha- β	Estrutura Randômica
Hsp701A_NBD 5 μ M APO	37%	7%	8%	16 %	30%
Hsp701A_NBD 5 μ M + CaCl_2 2 mM	37%	6%	7%	16%	32%
Hsp701A_NBD 5 μ M + MgCl_2 2 mM	37%	6%	7%	17%	33%

Tabela 6 - Conteúdo médio de estrutura secundária da proteína Hsp70-1A_NBD na sua forma APO. Deconvolução dos espectros realizada utilizando os dados normalizados para elipticidade molar residual e com auxílio do software CDNN (versão 2.1).

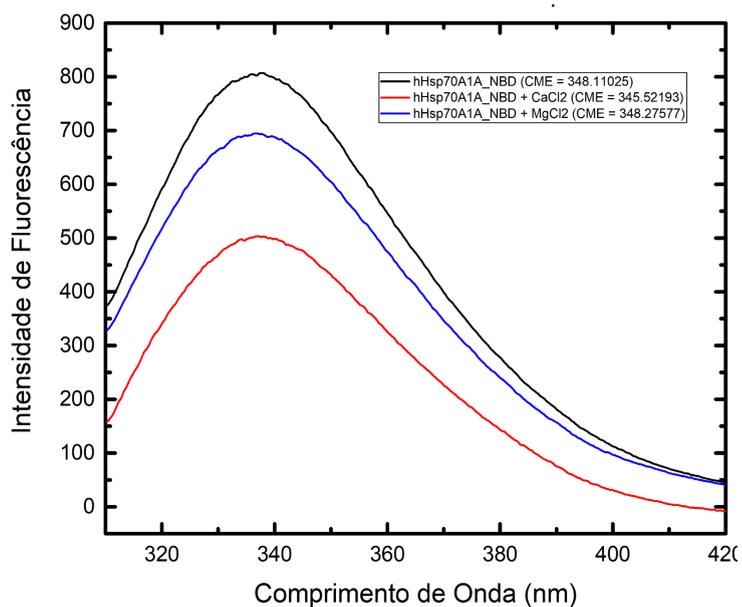
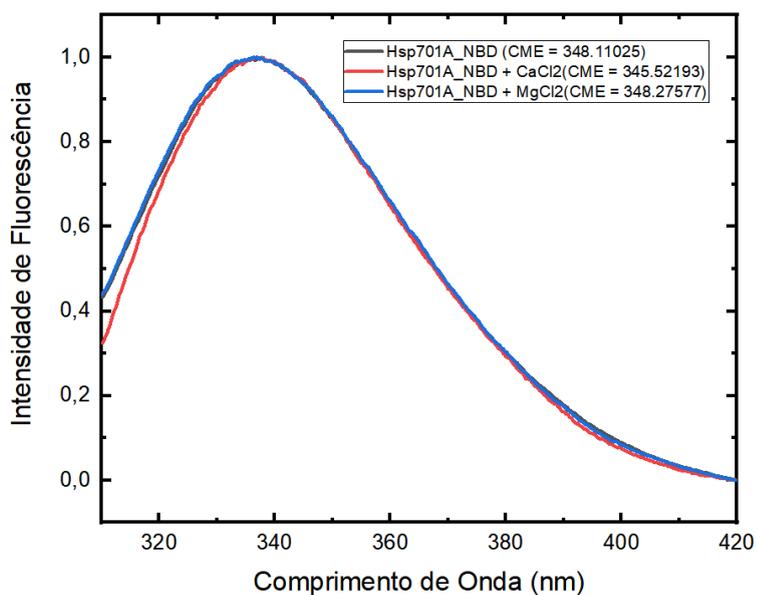
Fonte: Autoria própria.

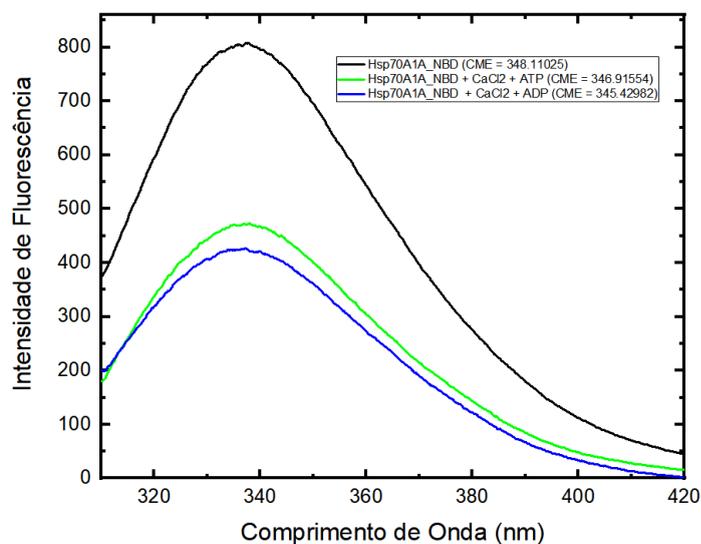
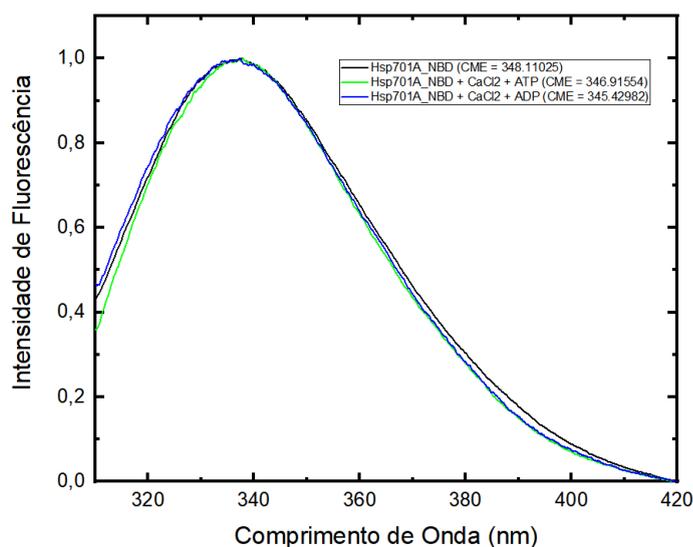
A partir disso, verifica-se que na presença dos íons divalentes cálcio e magnésio não ocasionou mudanças consideráveis na porcentagem de estrutura secundária da proteína. Sendo assim, na presença destes íons não foi verificada nem ganho e nem perda de estrutura.

4.3.2. Fluorescência Intrínseca do Triptofano

Visando-se investigar a estrutura terciária local e o enovelamento da proteína recombinante, utilizou-se como sonda intrínseca o único resíduo de triptofano presente no NBD da proteína Hsp701A, localizado na posição W90, para a realização do experimento de

fluorescência desta construção recombinante. Realizou-se este procedimento com excitação em 295 nm, já que neste comprimento de onda somente os resíduos de Triptofano (W) são excitados (Eftink, M. R., 1994). Além do domínio na sua forma APO, também se verificou os espectros na presença dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , e dos nucleotídeos ATP e ADP (**Figuras 8A e 8B**).

8A.1**8A.2**

8B.1**8B.2**

Figuras 8A.1, 8A.2, 8B.1 e 8B.2 - Espectros do experimento de Fluorescência Intrínseca do Triptofano da Hsp701A_NBD na presença dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , ATP e ADP. Em 7A, mostra-se o centro de massa espectral $\langle\lambda\rangle$ da proteína recombinante na forma APO foi de $348,1 \pm 0,1$ nm. Na presença de cloreto de cálcio 2 mM, responsável por fornecer íons Ca^{2+} , o $\langle\lambda\rangle$ passou a ser $345,5 \pm 0,1$ nm. Na presença de cloreto de magnésio 2 mM, responsável por fornecer os íons Mg^{2+} , o centro de massa espectral obteve um valor de $348,3 \pm 0,1$ nm. Em 7A.1 é evidenciada a diferença de intensidade de fluorescência, enquanto em 7A.2 é evidenciada a diferença do centro de massa espectral $\langle\lambda\rangle$. Em 7B, mostra-se o $\langle\lambda\rangle$ da proteína recombinante na forma APO foi de $348,1 \pm 0,1$ nm, na presença íons Ca^{2+} e ATP de $346,9 \pm 0,1$ nm e na presença íons Ca^{2+} e ADP de $345,4 \pm 0,1$ nm. Em 7B.1 é evidenciada a diferença de intensidade de fluorescência, enquanto em 7B.2 é evidenciada a diferença do centro de massa espectral $\langle\lambda\rangle$.

Fonte: Autoria própria.

Com os dados fornecidos, é possível fazer dois tipos de análise em relação a estrutura terciária local da proteína quando em solução com diferentes íons e nucleotídeos. A primeira delas diz respeito à supressão ou aumento da intensidade de fluorescência, o que está relacionado à formação de complexos estáveis entre o fluoróforo e ligantes. A outra análise, é sobre o centro de massa espectral (**Tabela 7**), o qual representa uma média ponderada do espectro, que pode ser deslocado para um comprimento de onda mais energético (deslocado para o violeta), ou para um comprimento de onda menos energético (deslocado para o vermelho). Esses deslocamentos sinalizam o grau de exposição do resíduo de triptofano ao ambiente hidrofóbico (deslocado para o violeta) e hidrofílico (deslocado para o vermelho).

Solução	$\langle \lambda \rangle$ (nm)
Hsp701A_NBD 5 uM	348,1 ± 0,1 nm
Hsp701A_NBD 5uM + CaCl ₂ 2 mM	345,5 ± 0,1 nm
Hsp701A_NBD 5uM + MgCl ₂ 2 mM	348,3 ± 0,1 nm
Hsp701A_NBD 5uM + CaCl ₂ 2 mM + ATP 200 uM	346,9 ± 0,1 nm
Hsp701A_NBD 5uM + CaCl ₂ 2 mM + ADP 200 uM	345,4 ± 0,1 nm

Tabela 7 - Centros de Massa Espectrais calculados a partir da análise da Fluorescência Intrínseca do Triptofano nas amostras.

Fonte: Autoria própria.

A partir das figuras e da tabela, é possível verificar um deslocamento considerável para o violeta na presença de íons Ca²⁺, isto é, para um comprimento de onda mais energético. Entretanto, quando consideramos a presença de íons Mg²⁺, existiu um sutil deslocamento para o vermelho, isto é, para um comprimento de onda menos energético. A diminuição na intensidade de fluorescência das amostras da proteína com os íons e com os nucleotídeos é sugestivo da formação de complexo (Misra, P. P., Kishore, N., 2011).

4.3.3. Estabilidade Térmica

Com o intuito de melhor compreender a estabilidade térmica do domínio recombinante Hsp701A_NBD, realizou-se um experimento de Desenovelamento Térmico com o auxílio da monitoração por CD_{222nm} na ausência e na presença de íons Ca²⁺ 2 mM e Mg²⁺ 2 mM, o que

possibilitou, com o ajuste das curvas sigmoidais, o cálculo das temperaturas de transição das soluções (**Figura 9**).

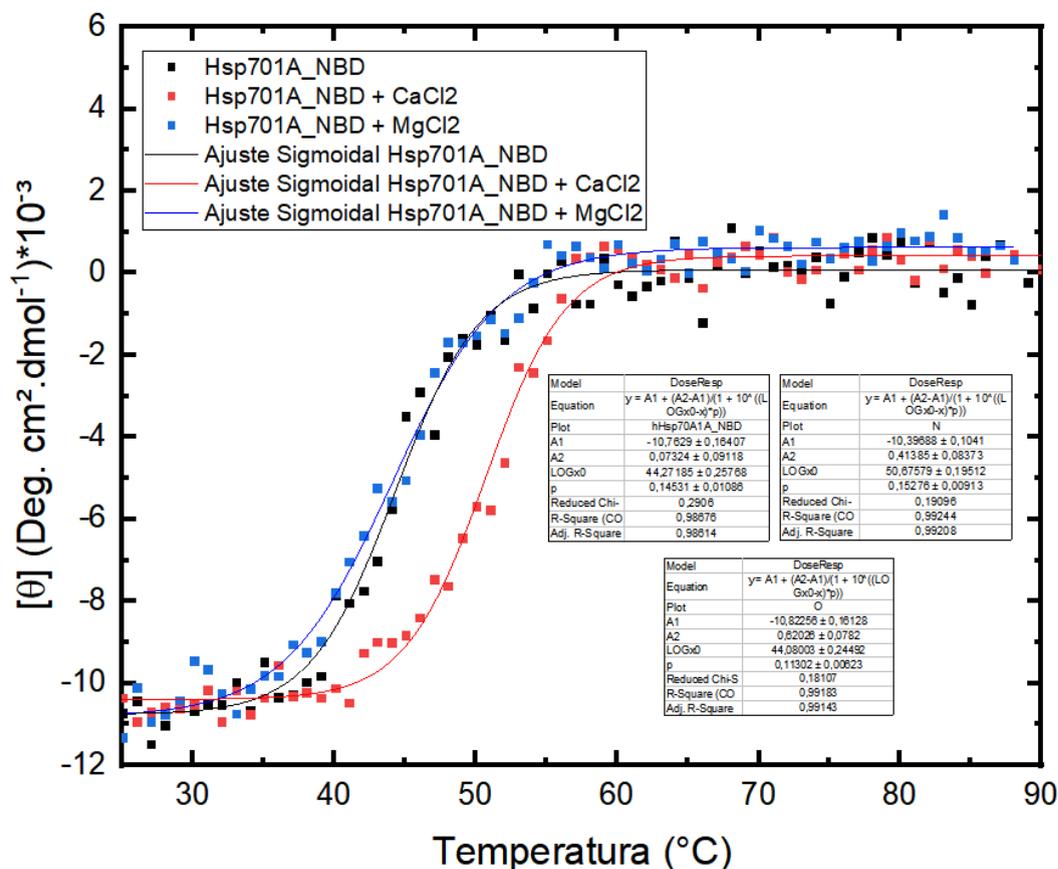


Figura 9 - Espectro de Desenovelamento Térmico da construção proteica recombinante Hsp701A_NBD na presença de na ausência de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . É perceptível que na presença de íons Ca^{2+} houve um aumento na estabilidade térmica do domínio recombinante. No caso da proteína Hsp701A, na presença e ausência de ambos os íons existiram eventos de transição únicos cujas temperaturas médias de transição serão discutidas a seguir. Além disso, verificamos as informações sobre os ajustes das curvas sigmoidais nos espectros de Desenovelamento Térmico da construção proteica recombinante Hsp701A_NBD na presença de na ausência de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . O modelo aplicado de curva sigmoide para os três casos foi o DoseResp e as temperaturas médias encontradas a partir disso são representadas nas tabelas por “LOGx0”.

Fonte: Autoria própria.

A temperatura média da transição (T_m) está relacionada com a temperatura em que metade da amostra está desnaturada e metade continua com sua estrutura tridimensional. Neste contexto, quanto maior é o T_m , maior é a estabilidade térmica da proteína. Sendo assim, é possível avaliar a estabilidade térmica da proteína nas diferentes amostras através da T_m (**Tabela 8**).

Amostra	T _m (°C)
Hsp701A_NBD 5 uM	44,3 ± 0,3
Hsp701A_NBD 5 uM + CaCl ₂ 2 mM	50,7 ± 0,2
Hsp701A_NBD 5uM + MgCl ₂ 2 mM	44,1 ± 0,2

Tabela 8 - Valores de ponto médio de transição da proteínas Hsp701A_NBD na presença e ausência de íons Mg²⁺ e Ca²⁺. Valores adquiridos a partir do ajuste de uma curva sigmoideal com o auxílio do software OriginPRO 2016.

Fonte: Autoria própria.

Como a T_m da proteína na presença dos íons Cálcio é consideravelmente maior, tem-se que esta passa a ser mais estável quando na presença de tais íons. O mesmo não acontece na presença de íons Magnésio. Os valores de T_m podem ser obtidos a partir do ajuste de curvas sigmoidais com o auxílio do software OriginPro2016, os quais foram demonstrados na **Figura 9A e 9B**.

4.4. Ensaios de Caracterização Hidrodinâmica

4.4.1. Cromatografia de Exclusão de Tamanho Analítica

Primeiramente, para a realização deste experimento, faz-se necessário a determinação de alguns parâmetros hidrodinâmicos teóricos do NBD da proteína Hsp701A (**Tabela 9**).

Parâmetro Hidrodinâmico Teórico	MM (kDa)	Ro (Å)
Hsp701A_NBD	43,7	23,3

Tabela 9 - Dados teóricos obtidos a partir da sequência de aminoácido da proteína recombinante Hsp70-1A_NBD na forma de monômero globular pelo Software Sednterp (Disponível em: <http://www.rasmb.org/sednterp/>).

Fonte: Autoria própria.

Com os resultados anteriores obtidos, foi possível obter-se informações relacionadas às estruturas primária, secundária e terciária do domínio de interesse Hsp701A_NBD. Neste contexto, mostra-se interessante verificar se existe presença de estrutura quaternária neste constructo, ou se ele se apresenta como um monômero. Para isso, realizou-se uma

cromatografia analítica para determinação do perfil de eluição e do raio de Stokes experimental (R_s) na presença dos íons cálcio 2 mM e magnésio 2 mM e dos nucleotídeos ATP 200 μ M e ADP 200 μ M (**Figura 10**). Observa-se que a proteína de interesse, independente da solução é eluída entre as proteínas padrão de 30 kDa e 67kDa.

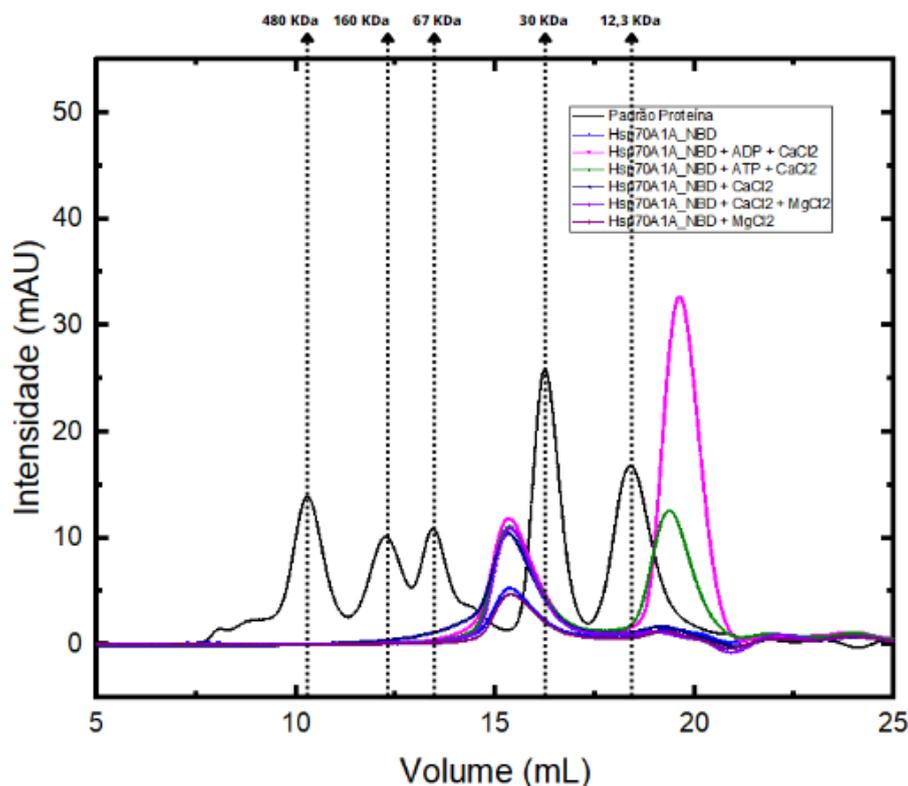


Figura 10 - Perfil de eluição da proteína de interesse em diferentes soluções em comparação com proteínas padrão de massa molecular conhecida. As proteínas padrão são: Apoferritina (480 kDa); Gama-globulina (160 kDa); BSA (67 kDa); Anidrase Carbônica (30 kDa); e Citocromo c (12,3 kDa).

Fonte: Autoria própria.

Com os dados obtidos, foi possível calcular o valor da Massa Molecular Aparente (MMapp) da proteína nestas diferentes soluções, conforme descrito nos Materiais e Métodos, assim como os valores de R_s experimentais e a razão friccional (**Tabela 10**).

Solução	MMapp (kDa)	R_s Experimental (Å)	Razão Friccional
Hsp70A1A_NBD 20 μ M	44 \pm 4	30 \pm 1	1,29 \pm 0,1
70A1A_NBD 20 μ M + CaCl ₂ : 2 mM	45 \pm 4	30 \pm 1	1,30 \pm 0,1
70A1A_NBD 20 μ M + MgCl ₂ : 2 mM	44 \pm 4	30 \pm 1	1,29 \pm 0,1

701A_NBD 20 μ M + CaCl ₂ + MgCl ₂ (2 mM)	44 \pm 4	30 \pm 1	1,29 \pm 0,1
701A_NBD 20 μ M + CaCl ₂ 2 mM + ADP 200 μ M	45 \pm 4	30 \pm 1	1,29 \pm 0,1
701A_NBD 20 μ M + CaCl ₂ 2 mM + ATP 200 μ M	44 \pm 4	30 \pm 1	1,29 \pm 0,1

Tabela 10 - Valores obtidos através do Coeficiente de Partição obtido experimentalmente.

Fonte: Autoria própria.

Os dados obtidos para a razão friccional, a qual é justamente calculada pela divisão do Rs experimental pelo Rs teórico sugerem que independente da presença de íons cálcio e magnésio ou de nucleotídeos ATP e ADP, o constructo proteico recombinante se assemelha mais a um monômero globular em solução.

4.5. Ensaios de Caracterização Bioquímica

4.5.1. Atividade ATPásica

Com o intuito de compreender a Atividade ATPásica da construção Hsp701A_NBD, sabendo-se que as devido à presença do NBD, as proteínas da família das 70 são capazes de hidrolisar ATP em ADP e Pi, realizou-se um experimento no qual foi medida a quantidade de Pi liberado do ATP quando na presença da proteína. Os parâmetros cinéticos foram então ajustados de acordo com o modelo não linear de Michaelis-Menten (**Figura 11**).

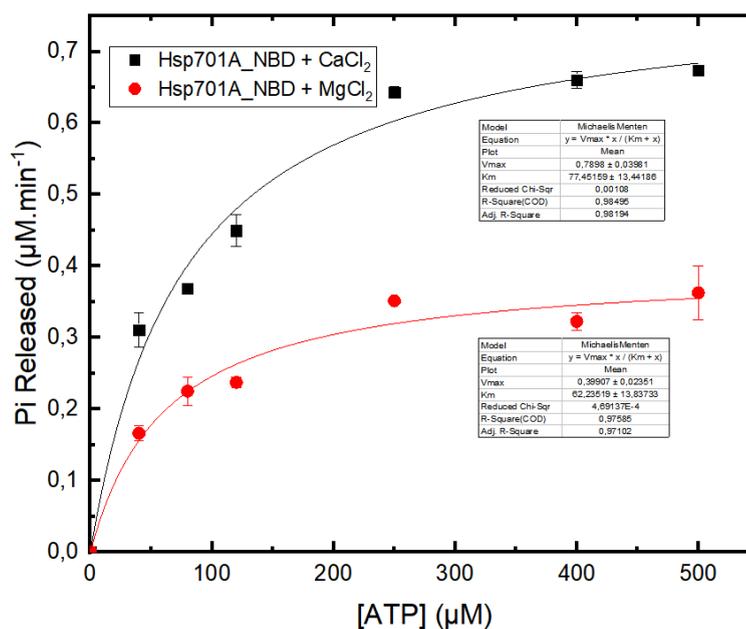


Figura 11 - Atividade ATPásica da construção Hsp701A_NBD na presença de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} . Quantidade de Pi liberado por minuto na presença de Cálcio e Magnésio para o domínio Hsp701A_NBD.

Fonte: Autoria própria.

Para a Atividade ATPásica do domínio recombinante Hsp701A_NBD, houve uma maior liberação de Pi na presença de cálcio quando comparado ao magnésio, fato que pode ser observado pelos dados cinéticos de $V_{\text{máx}}$, que foi de $0,79 \pm 0,04 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ e de K_m de $80 \pm 10 \mu\text{M}$ quando na presença de cálcio, enquanto $V_{\text{máx}}$ é de $0,40 \pm 0,02 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ e K_m de $60 \pm 10 \mu\text{M}$ na presença de magnésio. Isso corrobora o fato de que o domínio estava ativo, realizando sua atividade enzimática de quebra de ATP em ADP e Pi e que quando com cálcio este ativo é melhor. Apesar disso, tais valores correspondem a uma baixa atividade enzimática, o que pode ser explicada pelo fato da existência de outros ligantes reguladores, como co-chaperonas e proteínas-clientes.

5. DISCUSSÃO

Com este trabalho, foi possível verificar a importância da biotecnologia em diversos setores da ciência, principalmente quando consideramos pesquisa de base. A presente formação no curso de Bacharelado em Biotecnologia e experiência adquirida no Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas foram essenciais para a produção do trabalho, já que a temática abordada pelo mesmo, assim como as técnicas utilizadas para realizá-lo, foram aprendidas durante o decorrer da graduação. Além disso, pode-se perceber como proteínas, em especial as chaperonas moleculares da família das Hsp70 são importantes para a biodinâmica e homeostase dos indivíduos. Por isso o estudo sobre elas é tão importante.

Notou-se também, que de fato os objetivos propostos foram atingidos, como a purificação da construção proteica recombinante Hsp701A_NBD, mostrado pelo monitoramento por SDS-PAGE 15%; e também enovelada, como mostrado pelos ensaios biofísicos. Adicionalmente, mostrou-se que a presença de íons cálcio e magnésio não causam aumento e nem diminuição considerável do conteúdo de estrutura secundária do domínio recombinante.

Percebeu-se também que a presença de íons cálcio e magnésio juntamente com a construção proteica Hsp701A_NBD diminuem a intensidade de fluorescência de seu aminoácido W, isto é, ocasionam supressão da fluorescência. Sendo assim, aparentemente, quando na presença destes, a localização deste resíduo de aminoácido passa a ser mais hidrofóbica. Ademais, na presença de cálcio, existe um deslocamento da fluorescência para uma região de maior energia. Além disso, a presença de ATP gera uma menor supressão na intensidade de fluorescência e um deslocamento do centro de massa espectral menos energético e a presença de ADP gera uma maior supressão na intensidade de fluorescência e um sutil deslocamento do centro de massa espectral para um comprimento de onda mais energético. A diminuição na intensidade de fluorescência das amostras da proteína com os íons e com os nucleotídeos é sugestivo da formação de complexo

Observou-se também que a presença de íons cálcio na construção proteica Hsp701A_NBD aumentou a estabilidade térmica desta proteína. Verificou-se com os dados obtidos para a razão friccional, independente da presença de íons cálcio ou magnésio ou de nucleotídeos ATP e ADP, que o constructo proteico recombinante se assemelha a um monômero globular em solução, isto é, não possui estrutura quaternária. Ao final, foi mostrado também que o domínio estava ativo, realizando sua atividade enzimática de quebra

de ATP em ADP e Pi e que quando com cálcio este ativo é melhor, mesmo que a atividade enzimática observada tenha sido baixa, o que pode ser explicada pelo fato da existência de outros ligantes reguladores, como co-chaperonas e proteínas-clientes.

Portanto, as avaliações biofísicas, hidrodinâmicas e bioquímicas demonstraram que o domínio Hsp701A_NBD foi obtido puramente, no estado monomérico, corretamente enovelado e cataliticamente ativo. Além disso, foi possível verificar as alterações que íons divalentes como cálcio e magnésio causaram na estrutura e na estabilidade do domínio.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, mostrou-se que Hsp701A_NBD foi expressa pelo sistema bacteriano de maneira enovelada e depois foi corretamente purificada, como mostrado pelo gel de eletroforese. Além disso, a presença de ambos os íons divalente não causam aumento e nem diminuição considerável do conteúdo de estrutura secundária do domínio recombinante, evidenciado pelo experimento de espectropolarimetria de dicroísmo circular.

Quando na presença de íons cálcio, a construção proteica Hsp701A_NBD mostra uma diminuição na intensidade de fluorescência do triptofano e deslocam o centro de massa espectral comprimento de onda mais energético, indicativo este de que a localização deste resíduo de aminoácido passa a ser mais hidrofóbica. Também foi possível verificar que existiu uma diminuição na intensidade de fluorescência das amostras da proteína com os íons cálcio e magnésio, assim como com os nucleotídeos, o que apresenta ser sugestivo da formação de complexo.

Verificou-se também que a presença de íons cálcio na construção proteica Hsp701A_NBD aumentou a estabilidade térmica desta proteína, acompanhado em um comprimento de onda de 222 nm.

Adicionado a isso, independente da presença de íons cálcio ou magnésio ou de nucleotídeos ATP e ADP, que o constructo proteico recombinante se assemelha a um monômero globular em solução, isto é, não possui estrutura quaternária, visto no experimento de cromatografia de exclusão por tamanho analítica.

Portanto, as avaliações biofísicas, hidrodinâmicas e bioquímicas demonstraram que o domínio Hsp701A_NBD foi obtido puro, como um monômero globular, enovelado e cataliticamente ativo e que as alterações na presença de íons cálcio foram mais acentuadas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho verificou informações importantes acerca do conhecimento biofísico, hidrodinâmico e bioquímico do domínio Hsp701A_NBD na presença de íons divalentes como cálcio e magnésio e de nucleotídeos ATP e ADP. Isso abre espaço para mais estudos com domínios NBD, principalmente como temática para projetos de pós-graduação. Sendo assim, além da Hsp701A, os domínios NBD de diferentes proteínas da família das Hsp70 podem ser verificados quanto à estrutura e à funcionalidade, a fim de comparação com os dados obtidos por este estudo. Além disso, pode-se examinar o domínio PDB quanto também a proteína completa. Além disso, novos experimentos que corroboram os dados obtidos podem ser realizados, como por exemplo Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), a fim de observar novamente os dados da estabilidade térmica. Outros tipos de estudo, como por exemplo de estabilidade química na presença de agentes desnaturantes também podem ser aplicados.

8. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, N.; HEBBAR, N.; RANGNEKAR, V. M. GRP78 is a targetable receptor on cancer and stromal cells. **EBioMedicine**, v. 33, p. 2-3, 2018;

BEHNKE, J.; FEIGE, M. J.; HENDERSHOT, L. M. BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sill1: mechanisms of action and biological functions. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n.7, p. 1589-1608, 2015;

BERETTA, Giangiacomo; SHALA, Aida Loshaj. Impact of heat shock proteins in neurodegeneration: possible therapeutical targets. **Annals of Neurosciences**, v. 29, n. 1, p. 71-82, 2022.

BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.*, v. 5, n. 3, p. 191-5, Apr 1992;

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. 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;

BURGESS, R. R A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. **Protein Expression Purification**, v. 150, p. 81-85, 2011;

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 395-433, 1987;

CASAS, C. GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 1–15, 2017;

CORREA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009;

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JÄÄTTELÄ, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Letters**, v. 581, n. 19, p. 3702-3710, 2007;

DORES-SILVA, P. R.; BARBOSA, L. R. S; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. 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. 1-24, 2015;

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948-1954, 1967;

EFTINK, M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 2 (pt. 1), p. 482–501, 1994;

ENOGIERU, A. B.; OMORUYI, S. I.; HISS, D. C.; EKPO O. E. GRP78/BIP/HSPA5 as a Therapeutic Target in Models of Parkinson's Disease: A Mini Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 5, p. 2706783, 2019;

FU, J.; WEI, C.; HE, J.; ZHANG, L.; ZHOU, J.; BALAJI, K. S.; SHEN, S.; PENG, J.; SHARMA, A. Evaluation and characterization of HSPA5 (GRP78) expression profiles in normal individuals and cancer patients with COVID-19. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n.3, p. 897-910, 2021;

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011;

HARTL, F.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, p. 324–332, 2011;

HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 8, p. 421-438, 2020;

KALMAR, B.; GREENSMITH, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 4, p. 310-318, 2009;

KASIOUMI, P.; VRAZELI, P.; VEZYRAKI, P.; ZERIKIOTIS, S.; KATSOURAS, C.; DAMALAS, A.; ANGELIDIS, C. Hsp70 (Hsp701A) downregulation enhances the metastatic ability of cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 54, p. 821-832, 2019;

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005;

KOHLER, V., ANDRÉASSON, C. Hsp70-mediated quality control: should I stay or should I go? **Biological Chemistry**, v. 401, n. 11, p. 1233-1248, 2020;

LAKOWICS, J. R. Protein Fluorescence. In: (Ed.). **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer, Boston, MA, 2006;

MAYER, M. P. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 10, p. 507-514, 2013;

MELDOLESI, J.; POZZAN, T. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. **Trends Biochemical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 10-14, 1998;

MURPHY, Maureen E. The HSP70 family and cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 6, p. 1181-1188, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 4ª Edição. São Paulo: Sarvier, 1202p, 2006;

NOBLE, J. E. **Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes**. **Methods Enzymology**, v. 536, p. 17-26, 2014;

PFAFFENBACH, K. T.; LEE, A. S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2011;

PREISLER, S.; RATO, C.; YAN, Y.; PERERA, L. A.; CZAKO, A.; RON, D. Calcium depletion challenges endoplasmic reticulum proteostasis by destabilising BiP-substrate complexes. **Elife**, v. 9, p. 62601, 2020;

RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? **Cell Stress Chaperones**, v. 21, n. 3, p. 379-404, 2016;

RAMANUJAM, N., Fluorescence spectroscopy in vivo. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, R. A. Meyers, Ed., John Wiley: Chichester, 2000;

RIBEIRO, António José Meireles. Proteína. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 3, 2014.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 253–266, 2010;

RODWELL, Victor W. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30. ed. West Lafayette, Indiana: Amgh Editora Ltda., 2017. 832 p.

SILVA, N. S. M.; SERAPHIM, T. V.; MINARI, K.; BARBOSA, L. R. S.; BORGES, J. C. Comparative studies of the low-resolution structure of two p23 co-chaperones for Hsp90 identified in *Plasmodium falciparum* genome. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 193–204, 2018;

SKERRA, A.; PFITZINGER, I.; PLUCKTHUN, A. The Functional Expression of Antibody Fv Fragments in Escherichia coli: Improved Vectors and a Generally Applicable Purification Technique. **BioTechnology**, v. 9, p. 273-278, 1991;

SMELTZER S. C.; BARE, B. G. **Tratado de Enfermagem Médico – Cirúrgica**. 10ª edição. Editora Guanabara Koogan, 2005;

SOUFI, F. G.; FARAJNIA, S.; ASLANABADI, N.; AHMADIASL, N.; ALIPOUR, M.; SHEIKHZADEH, F. Long-term exercise training affects age-induced changes in HSP70 and apoptosis in rat heart. **General Physiology and Biophysics**, v. 27, n. 4, p. 263–270, 2018;

SULZBACHER, M. M.; LUDWIG, M. S.; HECK, T. G. Oxidative stress and decreased tissue HSP70 are involved in the genesis of sepsis: HSP70 as a therapeutic target. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 32, n. 4, p. 585-591, 2020;

TSAI, Y. L.; HA, D. P.; ZHAO, H.; CARLOS, A. J.; WEI, S.; PUN, T. K.; WU, K.; ZANDI, E.; KELLY, K.; LEE, A. S. Endoplasmic reticulum stress activates SRC, relocating chaperones to the cell surface where GRP78/CD109 blocks TGF- β signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 18, p. 4245-4254, 2018;

VOSTAKOLAEI, M. A.; HATAMI-BAROOGH, L.; BABAEI, G.; MOLAVI, O.; KORDI, S.; ABDOLALIZADEH, J. Hsp70 in cancer: A double agent in the battle between survival and death. **Journal of cellular physiology**, v. 236, n. 5, p. 3420-3444, 2020;

WANG, J.; LEE, J.; LIEM, D.; PING, P. HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. **Gene**, v. 30, n. 618, p. 14-23, 2017.