



# Alinhamentos múltiplos entre aminoácidos da proteína de choque térmico HSP70 em distintos animais por análises de bioinformática

*Multiple alignments between HSP70 thermal shock protein aminoacids in diverse animals through bioinformatics analysis*

Maria do Desterro Azevedo da Silva<sup>[a]</sup>, Jane Eyre Gabriel<sup>[b]</sup>

## Resumo

O presente estudo teve como objetivo investigar o grau de conservação entre aminoácidos presentes na proteína de choque térmico HSP70 em espécies animais, empregando ferramentas de alinhamentos múltiplos. Tais análises comparativas foram realizadas a partir do algoritmo ExPASy Proteomics Server, capaz de organizar e ordenar dados biológicos, inferindo informações cruciais acerca da estrutura e função de biomoléculas. A análise do segmento peptídico HSP701A, contendo 644 aminoácidos, demonstrou máxima conservação e identidade entre os resíduos da proteína HSP70, correspondendo a 60% dos resíduos totais. Em adição, o alinhamento múltiplo entre os aminoácidos da HSP70 nas espécies selecionadas demonstrou maior similaridade entre as sequências da HSP70 bovina e humana. Os resultados gerados a partir das sequências de aminoácidos da proteína HSP70 em distintas espécies sugerem um elevado grau de similaridade entre animais geneticamente divergentes. O alto grau de similaridade e identidade observado em tais análises comparativas reforça a crucial participação da proteína de estresse HSP70 nos mecanismos celulares universais de reparo de peptídeos recém sintetizados e nas respostas celulares ao estresse.

**Palavras-chave:** Bioinformática. Conservação proteica. Proteínas de choque térmico.

## Abstract

*The aim of the present study is to investigate the conservation between aminoacids present in the thermal shock protein HSP70 in animal species through multiple alignment bioinformatics analysis. The multiple alignments were performed based on the ExPASy Proteomics Server, which applies algorithms and statistical techniques to the interpretation, classification and understanding of biological datasets, inferring crucial information about the structure and function of biomolecules. The molecular characterization of the HSP701A peptide segment, containing 644 aminoacids, showed maximum conservation and identity between aminoacids of HSP70 protein. In addition, multiple alignments between the HSP70 aminoacids in selected species showed greater similarity between the sequences of the bovine and human HSP70 protein. The results generated from the aminoacid sequences of HSP70 protein in different species suggest a high degree of similarity (60%). The accentuated similarity and identity observed in these sequences emphasize the crucial involvement of HSP70 stress protein in the universal cellular mechanisms of repair of newly synthesized peptides and in cellular response to stress.*

**Keywords:** Bioinformatics. Protein conservation. Thermal shock proteins.

<sup>[a]</sup> Estudante de iniciação científica do curso de Licenciatura em Ciências Exatas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Patos, PB - Brasil.  
<sup>[b]</sup> Professora adjunta I da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE - Brasil, e-mail: jane.gabriel@univasf.edu.br

Recebido: 12/08/2010  
Received: 08/12/2010

Aprovado: 12/08/2011  
Approved: 08/12/2011

## Introdução

Células expostas à ação de diferentes agentes estressantes promovem a ativação de um grupo restrito de genes, até então quiescentes, expressando em grande quantidade uma determinada classe de proteínas, denominadas proteínas de choque térmico HSP (“Heat Shock Proteins”) ou proteínas de estresse. Desde sua descoberta por Ritossa (1), tais peptídeos vêm sendo extensamente identificados e agrupados em grandes famílias: HSP27, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP110 (2), de acordo com suas sequências de aminoácidos e com seus pesos moleculares. Em cada família, estão agrupadas diferentes proteínas, tais como HSP72 e HSP73, pertencentes ao grupo HSP70, com pesos moleculares similares, mas apresentando distintos padrões de indução e expressão (3).

Diversos tipos de estresses metabólicos, tais como exposição ao calor, análogos de aminoácidos, metais pesados, ionóforos e outras toxinas metabólicas, capazes de afetar a produção de ATP, alteram de modo descontrolado a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas (4). Isso leva a um acúmulo de proteínas incorretamente enoveladas em meio intracelular, caracterizando um mecanismo universal de resposta celular ao estresse.

Ainda, uma das principais funções biológicas atribuídas às proteínas HSPs refere-se a seu papel como “chaperoninas”, por serem moléculas biológicas que, sem fazer parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas. Auxiliam no término da montagem dessas proteínas, bem como em sua síntese, e facilitam o dobramento correto de proteínas recém sintetizadas assim como suas translocações para os compartimentos celulares (5).

Nos últimos anos, vários trabalhos científicos têm descrito a importância das HSPs na sobrevivência e homeostase celular em uma grande variedade de organismos (6, 7). Várias sequências de aminoácidos correspondentes às proteínas de choque térmico vêm sendo regularmente depositadas em bancos de dados de informação biológica e uma análise detalhada das sequências regulatórias desses genes e de seus motivos tem fornecido importantes evidências para o entendimento do grau de organização, evolução e caracterização desses genes em distintas espécies de animais. Sendo assim, as ferramentas de

bioinformática poderão fornecer novas evidências das bases moleculares envolvidas nos mecanismos de regulação da temperatura corporal animal.

Tendo em vista a função protetora desses peptídeos em organismos expostos a diversos agentes estressantes e o crescente avanço da bioinformática como área do conhecimento, o presente projeto de pesquisa objetivou identificar o grau de conservação de aminoácidos presentes na proteína de choque térmico HSP70 entre animais geneticamente divergentes por análises de alinhamentos múltiplos.

## Material e métodos

Busca de sequências de interesse em bancos de dados biológicos

As sequências de aminoácidos da proteína HSP70 foram obtidas por meio de buscas a partir do banco de dados de informação biológica ExPASy Proteomics Server – UniProt knowledgebase (<http://www.expasy.org/sprot>), que armazena uma vasta quantidade de sequências de proteínas e suas respectivas características moleculares. Tal algoritmo permite a análise e mineração de sequências específicas de inúmeros genes e proteínas, que foram depositadas ao longo de décadas e que estão virtualmente disponíveis ao acesso público.

As sequências selecionadas para efetuar tais análises comparativas representam a sequência total da proteína de choque térmico HSP70 (peptídeo HSP701A), expressas nos seguintes animais: touro *Bos taurus* (Q27995), galinha *Gallus gallus* (P08106), porco *Sus scrofa* (P34930), salmão *Oncorhynchus tshawytscha* (Q91233), homem *Homo sapiens* (P08107) e camundongo *Mus musculus* (Q61696).

Alinhamentos múltiplos entre aminoácidos da proteína HSP70

Nas análises de alinhamentos múltiplos foram empregadas ferramentas disponíveis no programa computacional ExPASy Proteomics Server – UniProt knowledgebase (<http://www.expasy.ch/sprot/>), possibilitando a investigação de similaridades entre sequências oriundas de diferentes organismos pela comparação direta entre os segmentos de interesse. Tais alinhamentos comparativos entre biossequências

fornecem critérios de significância a partir de parâmetros descritivos avaliativos, discriminando se tal alinhamento é significativo ou se representa somente uma mera coincidência de alguns poucos pares de bases com certa identidade entre elas. A sequência total referente à composição química do segmento peptídico HSP701A foi selecionada a partir de distintas espécies animais e submetida à comparação direta entre os resíduos apresentados em formato FASTA. Baseado nos resultados de alinhamentos foi estabelecido o grau de conservação com identidade máxima ou mínima entre os resíduos, sendo apresentado como porcentagem de ocorrência observada durante as análises de bioinformática.

## Resultados

Os resultados apresentados na Figura 1 demonstram o alinhamento parcial (aminoácidos 1 a 180) entre os resíduos de aminoácidos da proteína HSP70

expressos em distintos animais. Em tais análises, os símbolos asterisco (\*), ponto (.) e dois pontos (:), observados na linha inferior em cada série de alinhamento, indicam máxima identidade entre todas as sequências analisadas; alteração de um resíduo de aminoácido ou alteração de dois aminoácidos, respectivamente (Figura 1). Em contrapartida, a ausência desses símbolos na linha inferior em cada série indica a presença de pelo menos três aminoácidos diferentes entre as sequências investigadas (Figura 1).

A análise do segmento peptídico total correspondente à proteína HSP701A, contendo 644 aminoácidos, demonstrou máxima conservação e identidade entre os resíduos da proteína HSP70, correspondendo a 60% dos resíduos totais. A presença de pelo menos três aminoácidos diferentes, ocupando a mesma posição no segmento proteico, correspondeu a apenas 3% do número total de resíduos analisados (644 aminoácidos).

As análises de alinhamentos múltiplos entre os aminoácidos da HSP70 demonstraram maior similaridade entre as sequências bovina e humana, como

```
Q27975      --MAKNMAIGIDLGTITYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ  58
P08107      --MAKAAAIGIDLGTITYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ  58
P34930      --MAKSVAIGIDLGTITYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSSVAFTDTERLIGDAAKNQ  58
Q61696      --MAKNTAIGIDLGTITYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ  58
Q91233      MSSAKGPSIGIDLGTITYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ  60
P08106      -MSGKGAIGIDLGTITYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ  59
          . * :*****

Q27975      VALNPQNTVFDKRLIGRKFGDPVVQSDMKHWPFVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPEE  118
P08107      VALNPQNTVFDKRLIGRKFGDPVVQSDMKHWPFVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPEE  118
P34930      VALNPQNTVFDKRLIGRKFGDPVVQSDMKHWPFVINDGDKPKVQVSYKGETKGFYPEE  118
Q61696      VALNPQNTVFDKRLIGRKFGDAVVQSDMKHWPFVQVNDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEE  118
Q91233      VAMNPNTVFDKRLIGRKFNQVQVQADMKHWPFKVVSDGGKPKVQVQDYKGENKSFNPEE  120
P08106      VAMNPTNFDAKRLIGRKYDDPTVQSDMKHWPFVYVNEGGKPKVQVEYKGENKTFPEE  119
          **: * * :***** : . * * : * : * * : * : * : * * * * * : * * *

Q27975      ISSMVLTKMKEIAEAYLGHPVNTAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA  178
P08107      ISSMVLTKMKEIAEAYLGYPTAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA  178
P34930      ISSMVLTKMKEIAEAYLGHPVNSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA  178
Q61696      ISSMVLTKMKEIAEAYLGHPVNTAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA  178
Q91233      ISSMVLVKMREIAEAYLGQVSNNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA  180
P08106      ISSMVLTKMKEIAEAYLGKVVETAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTITGLNVMRINEPTA  179
          ***** . ** :***** .*** * .***** . * :***** :*****
```

**Figura 1** - Alinhamento múltiplo parcial (resíduos 1 a 180) entre as sequências da proteína HSP70 em distintos animais. As sequências selecionadas foram: Q27975 (touro *Bos taurus*), P08107 (homem *Homo sapiens*), P34930 (porco *Sus scrofa*), Q61696 (camundongo *Mus musculus*), Q91233 (salmão *Oncorhynchus tschawytscha*) e P08106 (galinha *Gallus gallus*). Os símbolos asterisco \*, ponto . e dois pontos : (apresentados na linha inferior em cada série de alinhamento) indicam máxima identidade entre todas as sequências, alteração de um resíduo de aminoácido ou alteração de dois aminoácidos, respectivamente. A ausência desses símbolos na linha inferior em cada série indica a presença de pelo menos três aminoácidos diferentes entre as sequências analisadas

Fonte: Dados da pesquisa.

pode ser observado nas análises comparativas demonstradas na Figura 1 (primeira e segunda linhas representando as sequências bovina e humana, respectivamente). Entretanto como observado na Figura 1, maior divergência entre as sequências da HSP70 foi observada entre os animais touro e galinha (primeira e última linhas do alinhamento, respectivamente).

## Discussão

As descobertas apresentadas neste estudo demonstram o alto grau de conservação entre aminoácidos presentes na proteína de choque térmico HSP70 em espécies animais empregando ferramentas de bioinformática. Em tais análises comparativas, alto grau de identidade foi observado entre os aminoácidos presentes na proteína HSP70, sendo constatada similaridade de 60% entre os resíduos totais (Figura 1).

As semelhanças identificadas entre sequências de nucleotídeos e aminoácidos, como resultado de similaridades, permitem assim a inferência e a caracterização estrutural e funcional de importantes biomoléculas (8, 9). A alta similaridade das sequências peptídicas entre as espécies analisadas nesse estudo pode estar associada à função da proteína HSP70 como molécula-chave no desencadeamento de mecanismos universais de defesa e de reparo de peptídeos recém sintetizados. De fato, muitas propriedades moleculares têm sido desvendadas em estudos empregando ferramentas de bioinformática, acarretando significativas implicações evolutivas. Tem sido estabelecido que as espécies progressivamente acabem divergindo e que as estruturas de determinadas proteínas acompanham essas divergências progressivamente (10).

Investigar eventos biológicos em nível molecular é um dos caminhos indispensáveis para a compreensão global de assuntos tão relevantes e os biólogos moleculares tendem a utilizar métodos estatísticos, capazes de analisar grandes quantidades de dados biológicos para inferir funções de genes e para demonstrar relações entre genes e proteínas. Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que os genes de choque térmico mantêm-se altamente conservados, mesmo entre espécies de animais pertencentes a filos evolutivamente tão divergentes (Figura 1). Em adição, tais análises comparativas de alinhamento múltiplo exibiram baixa discriminação

entre as espécies ao longo do processo evolutivo em função do alto grau de similaridade observado entre os resíduos de aminoácidos da HSP70 (Figura 1).

O principal mecanismo de ação das proteínas de choque térmico, mediante o qual conferem proteção, seria seu papel biológico como "chaperoninas" moleculares (11). Tal função impede interações incorretas durante a síntese, dobramento e degradação proteica. O dobramento das proteínas é um processo de conversão das cadeias lineares de polipeptídios em estruturas tridimensionais, as quais possibilitam que tais biomoléculas possam exercer todas as suas atividades vitais (12). Graças a seu papel citoprotetor em resposta a distintos estresses, Craig e Gross (13) postularam que as proteínas de choque térmico poderiam funcionar como "termômetro celular".

Baseado nas evidências apresentadas por análises de alinhamentos múltiplos, as descobertas apresentadas no presente estudo sugerem que o elevado grau de similaridade e identidade da proteína de choque térmico HSP70 entre as mais variadas espécies de animais poderia reforçar a crucial participação desse peptídeo nos mecanismos celulares de reparo de peptídeos recém sintetizados e nas respostas celulares ao estresse em distintos vertebrados.

## Referências

1. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 1962;18(12):571-3.
2. Sato H, Yamaguchi M, Shibasaki T, Ishii T, Banna I. Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by the anti-rheumatic agents gold sodium thiomalate and auranofin. *Biochem Pharm*. 1995;49(10):1453-7.
3. Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(19):6455-9.
4. Craig EA, Gross CA. Is HSP70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci*. 1991;16(4):135-40.
5. Ellis RJ, Hartl FU. Protein folding in the cell: competing models for chaperonin function. *FASEB J*. 1996;10(1):20-6.

6. Gabriel JE, Ferro JA, Stefani RMP, Ferro MIT, Gomes SL, Macari M. Effect of acute heat stress on heat shock protein 70 messenger RNA and on heat shock protein expression in the liver of broilers. *Br Poult Sci.* 1996;37(2):443-9.
7. Gabriel JE. Os mecanismos celulares de adaptação ao estresse e a expressão das proteínas de choque térmico. *Boletim Ciênc Saúde.* 2008;1:31-8.
8. Lima RBM, da Silva MF, Maia DRB, Gabriel JE. O programa computacional BLAST e suas aplicações nos estudos de caracterização funcional e estrutural de biomoléculas. *Boletim Ciências Saúde.* 2008;1(2):22-32.
9. de Araújo ND, de Farias RP, Pereira PB, de Figueirêdo FM, de Moraes AMB, Saldanha LC, et al. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as Ciências da Saúde. *Estud Biol.* 2008;30(70/71/72):143-8.
10. Lesk AM. Introdução à bioinformática. 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.
11. Feige U, Polla BS. HSP70 - a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia.* 1994;50(12):979-86.
12. Ellis RJ, Hartl FU. Protein folding in the cell: competing models for chaperonin function. *FASEB J.* 1996;10(1):20-6.
13. Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 1992;72(4):1063-81.

