

Obtenção da GFP recombinante fusionada a uma sequência *degron* C-terminal para testes de interação com Hsp70s humanas.

Martina Jusan Fernandes Daú

Milene N. O. Moritz, Arthur M. F. Rocha

Prof. Dr. Júlio César Borges

Universidade de São Paulo

martinajusandau@usp.br

Objetivos

O objetivo deste trabalho consistiu em produzir e purificar a proteína recombinante eGFPuv-dCL1, a partir do vetor de expressão pET28a::eGFPuv-dCL1, e caracterizar as estruturas secundária e terciária da mesma. Com a proteína devidamente estruturada e purificada, pretende-se averiguar a interação da eGFPuv-dCL1 com as chaperonas moleculares Hsp70 citoplasmáticas humanas (HSPA8 e HSPA1A) recombinantes. Além disso, pretende-se proceder testes de estabilidade comparativa com a eGFPuv *wildtype* recombinante.

Métodos e Procedimentos

A expressão da proteína recombinante eGFPuv-dCL1 foi realizada em bactérias *Escherichia coli* (cepa BL21(DE3)) transformadas com o vetor de expressão pET28a::eGFPuv-dCL1, o qual foi obtido comercialmente. A expressão foi induzida com IPTG, sendo as proteínas expressas a 30 °C, durante 4h. A proteína recombinante foi purificada usando cromatografia de afinidade ao níquel seguida de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC, do inglês *Size Exclusion Chromatography*). Após a etapa

cromatográfica de captura, incubou-se com trombina para a remoção da cauda His-tag. O grau de pureza foi analisado por SDS-PAGE 10%. A quantificação das proteínas, por sua vez, foi realizada por espectroscopia de absorção molecular, seguindo a metodologia descrita por (Pace et al., 1995) e coeficientes de extinção molecular determinados a partir da sequência de aminoácidos das proteínas utilizando o programa PROTPARAM. As caracterizações de suas estruturas secundária e terciária foram analisadas por dicróismo circular (CD) e fluorimetria, respectivamente.

Resultados

Realizadas as etapas cromatográficas da eGFPuv-dCL1, a eficácia da purificação foi avaliada por SDS-PAGE 10%. Como pode ser observado no gel (Figura 1), a proteína ainda não se encontra no grau de pureza esperado, sendo necessário o aprimoramento do processo de purificação. Nele, é notório a migração da eGFPuv-dCL1, com peso molecular de 29 kDa, para uma posição mais baixa, próximo a 23 kDa, o que poderia ser explicado pela degradação da mesma, resultando em fragmentos menores que migram mais rapidamente no gel. Porém, ainda que a pureza não estivesse adequada,

constatou-se a presença da proteína bem estruturada pela visualização da fração proteica eluída da coluna de afinidade, a qual era fluorescente na região do verde (Figura 2).

Figura 1: SDS-PAGE 10% para controle da purificação da eGFPuv-dCL1. Marcador de peso molecular (M); pellet não induzido (NI); pellet lisado (LP); sobrenadante lisado (LS); amostra coletada após coluna de afinidade de níquel (Af); coleta após a diálise (D); coleta após a SEC preparativa (Ex).

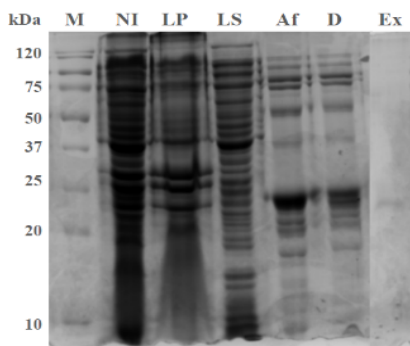
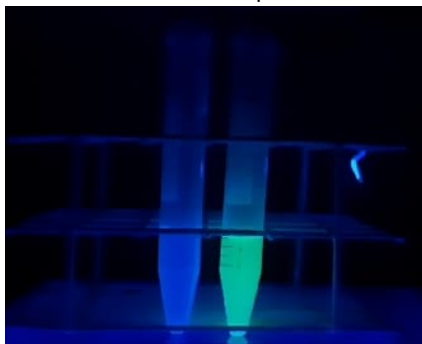


Figura 2: Procedimento de purificação da eGFPuv-dCL1 realizado no Transiluminador UV, demonstrando sua fluorescência. O tubo da esquerda consiste no descarte da coluna de afinidade, contendo basicamente o tampão. O tubo à direita contém a proteína.



Após a SEC preparativa, procedeu-se às caracterizações estruturais. A partir da análise de elipticidade molar residual média de eGFPuv-dCL1 foi avaliada no CD no intervalo entre 260 nm e 195 nm (Figura 3). Nele, foi

possível observar um conteúdo predominante de folhas- β em sua estrutura secundária, o que mostra concordância com a sua estrutura proeminente de barril β (Figura 4), composta de 11 filamentos formando uma folha- β em estrutura de barril, o qual abriga o cromóforo e segmentos de hélice- α em seu interior (RESENDE; RODRIGO, 2015), proporcionando estabilidade à proteína, mesmo com a porção degron em seu C-terminal.

Figura 3: Espectro de CD da eGFPuv-dCL1.

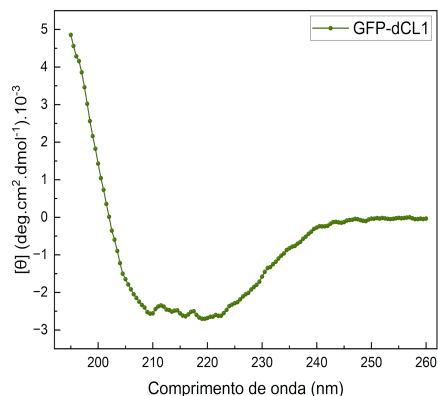
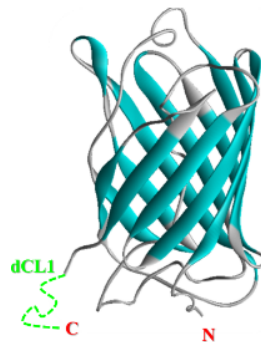


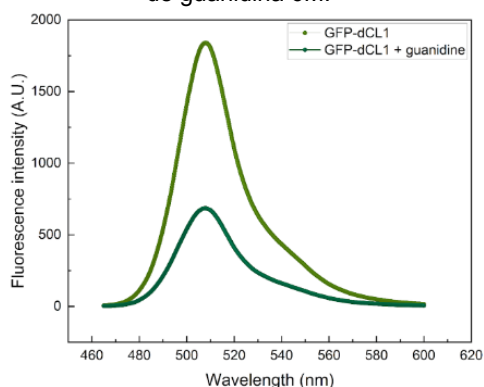
Figura 4. Estrutura cristalina da eGFPuv-dCL1, evidenciando as porções C-terminal e N-terminal. A porção dCL1 é representada pela linha pontilhada em verde.



A Figura 5 mostra o espectro de emissão de fluorescência intrínseca da eGFPuv-dCL1 após

excitação em 450 nm, e o mesmo na presença de cloridrato de guanidina 6M. Para a proteína nativa, pode-se observar um $\lambda_{\text{máx}}$ em torno de 507 nm, indicando a presença de estrutura terciária local. Isso demonstra que o cromóforo da eGFPuv purificada estava preservado, o que possibilitou uma alta emissão de fluorescência. Para a curva da molécula na presença de 6M guanidina observa-se um pico no mesmo comprimento de onda, porém com menor intensidade, uma vez que o desnaturante rompeu as interações não covalentes da eGFPuv. Por isso, houve a desestabilização de sua estrutura tridimensional, resultando na perda da conformação nativa. Tal desnaturação afetou o ambiente ao redor do cromóforo, diminuindo sua eficiência na emissão de fluorescência. Este efeito demonstra a importância de compreender as condições que levam à perda de funcionalidade biológica das proteínas, especialmente em aplicações biotecnológicas onde a atividade fluorescente é crucial para o monitoramento e visualização de processos celulares.

Figura 5. Espectros de fluorescência intrínseca do triptofano da eGFPuv-dCL1, na presença e ausência de guanidina 6M.



Conclusões

As análises foram realizadas de modo a entender as estruturas secundária e terciária da eGFPuv-Dcl1 para futuras interações com

as Hsp70s, como a HSPA8 e a HSPA1A. Desse modo, constatou-se que a eGFPuv, apesar de possuir uma sequência *degron* em sua porção C-terminal, que a torna instável, é viável de ser produzida enovelada em quantidades suficientes para as análises posteriores planejadas.

Agradecimentos

Ao IQSC-USP e à FAPESP (processo 2017/26131-5) pela oportunidade fornecida, a todo o grupo de Bioquímica e Biofísica de Proteínas (LBBP), em especial ao mestrando Arthur Moraes e a pós doutoranda Milene Moritz, pela orientação e parceria, e ao Prof. Dr. Júlio C. Borges, cuja sabedoria, apoio e dedicação me guiaram durante a realização deste projeto de iniciação científica.

Referências

- BARBOSA, Rayson Carvalho et al. O USO DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES NA CIÊNCIA CONTEMPORÂNEA. Biotecnologia aplicada à saúde-vol. 1: fundamentos e aplicações, v. 1, p. 341, 2015.
- Gilon, T., Chomsky, O., and Kulka, R.G. (1998). Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 17, 2759-2766.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to Measure and Predict the Molar Absorption-Coefficient of A Protein. Protein Sci. 4, 2411-2423.
- RESENDE, R. R. Biotecnologia aplicada à saúde - vol. 1. [s.l.] Editora Blucher, 2015.