

Caracterização estrutural dos mutantes truncados da Hsp70-escort protein 1 humana

Srta. Maria Júlia Mattos Gomes

Dra. Milene N.O. Moritz

Prof. Dr. Júlio César Borges

Instituto de Química de São Carlos | Universidade de São Paulo

mjuliamattos@gmail.com

Objetivos

O objetivo desse trabalho foi a caracterização estrutural dos mutantes truncados da proteína humana Hsp70-escort protein 1 (hHep1) com as regiões N- ou C-terminais deletados, como apresentado na Figura 1. Essa co-chaperona é eficaz na prevenção da agregação térmica das HSPAs (HSPA9 e HSPA1A), bem como estimulando sua atividade ATPásica. Então, a fim de avaliar quais extremidades possuem papel essencial em relação à proteína hHep1 completa, essa caracterização se faz necessária. As proteínas que foram expressas e purificadas são a hHep1 Δ mts, hHep1-core, hHep1-Ndel e hHep1-Cdel.

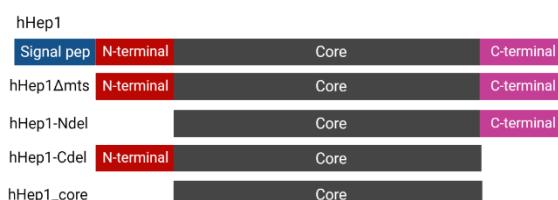


Figura 1. Diagrama esquematizando as regiões da hHep1 mantidas nos construtos hHep1 Δ mts, hHep1-core, hHep1-Ndel e hHep1-Cdel.

Métodos e Procedimentos

As construções das proteínas recombinantes foram produzidas pelos vetores de expressão pET28a::hHep1 Δ mts, pET28a::hHep1-Ndel e pET28a::hHep1-Cdel na cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3). As células competentes foram transformadas com os respectivos vetores em meio contendo canamicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e submetidas a indução com IPTG a 30°C e 200

rpm por 4 h. O *pellet* obtido foi ressuspenso no tampão de lise (pH 8,0; 8,5 para hHep1-Cdel) e lisado por sonicação. A fração solúvel foi separada por centrifugação e em seguida clarificada por filtração utilizando membrana com poro de $0,45 \mu\text{m}$. O vetor pET28a codifica no N-terminal uma sequência de 20 aminoácidos (*His-Tag*) contendo uma sequência de 6 His vicinais e um sítio para a enzima trombina. A *His-tag* facilita a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. A fração filtrada foi aplicada em uma coluna de afinidade ao níquel *HiTrap Chelating HP* 5 mL equilibrada em tampão com 20 mM de imidazol (pH 7,5; 8,5 para hHep1-Cdel). Após a obtenção das proteínas purificadas, a *His-tag* foi removida pela enzima trombina em diálise em tampão TK (pH 7,5; 8,5 para hHep1-Cdel) e as proteínas foram novamente submetidas a uma cromatografia de afinidade em tampão A sem imidazol (pH 7,5; 8,5 para hHep1-Cdel). Em seguida, foram purificadas por cromatografia de exclusão por tamanho preparativa na coluna *HiLoad Superdex 75 16/60*, equilibrada com TK (pH 7,5; 8,0 para hHep1-Cdel e depois dialisada para pH 7,5). Durante todas as etapas foram coletadas amostras e a pureza avaliada por SDS-PAGE, em tampão Tris/Tricina.

Resultados

Como resultados obtidos apresentamos na Figura 2 a eficiência do processo de obtenção desses mutantes. Além disso, a clivagem da cauda da histidina mostrou-se eficaz para todos os mutantes. Todas as proteínas foram estáveis por um período de 72 h não apresentando degradação (dados não apresentados).

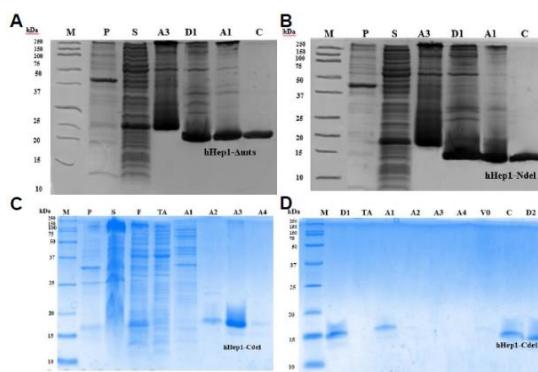


Figura 2. Perfil eletroforético dos mutantes da hHep1 obtidos durante as etapas de purificação. (A) SDS-PAGE de amostras da hHep1Δmts: (P) pellet; (S) sobrenadante; (A3) 1^a cromatografia de afinidade; (D1) diálise com trombina; (A1) 2^a cromatografia de afinidade; (C) cromatografia de exclusão de tamanho. (B) SDS-PAGE dessas mesmas amostras para hHep1-Ndel. (C) SDS-PAGE de amostras mutantes de hHep1-Cdel: (P) pellet; (S) sobrenadante; (F) filtrado; (TA), (A1), (A2), (A3) e (A4) eluato em 20, 75, 150, 300 e 500 mM de imidazol. (D) SDS-PAGE de amostras de (D1) diálise de trombina; (TA), (A1), (A2), (A3) e (A4) eluato em 20, 75, 150, 300 e 500 mM de imidazol na 2^a cromatografia de afinidade; (V0) volume morto; (C) eluato da cromatografia de exclusão por tamanho; (D2) diálise para troca de tampão.

A partir do espectro na Figura 3A é possível identificar semelhança estrutural entre as proteínas hHep1-Ndel e hHep1Δmts, assim como para as proteínas hHep1-Cdel e hHep1-core. Além disso, foram realizadas análises de estrutura terciária local por meio da fluorescência intrínseca do W115 (Figura 3B), em que o espectro apresentado indica que a ausência das regiões N- e C-terminais não provocou alterações estruturais significativas capazes de causar uma mudança substancial no ambiente da sonda fluorescente intrínseca.

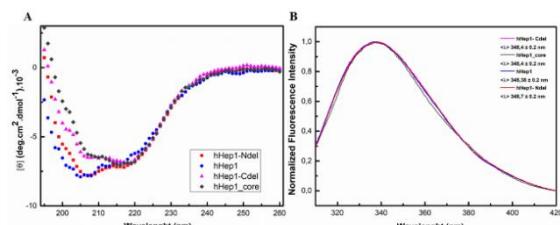


Figura 3. Caracterização estrutural dos mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel, hHep1-core e proteína hHep1Δmts por espectropolarimetria de CD e emissão de fluorescência intrínseca do W115. (A) O perfil da variação da elipticidade molar em função do comprimento de onda dos mutantes na faixa de 260 a 195 nm. (B) Espectro da estrutura terciária para os mutantes obtidos a partir da excitação em 295 nm.

A Figura 4 apresenta a avaliação da estabilidade química do mutante hHep1-Ndel. O perfil dos

espectros na Figura 4B indica que há um deslocamento para comprimentos de onda maiores à medida que há um aumento na concentração do agente desnaturante, concomitantemente, há uma diminuição na intensidade de fluorescência (Figura 4A). Além disso, foi estimada a concentração média de transição de 1,4 M (Figura 4C).

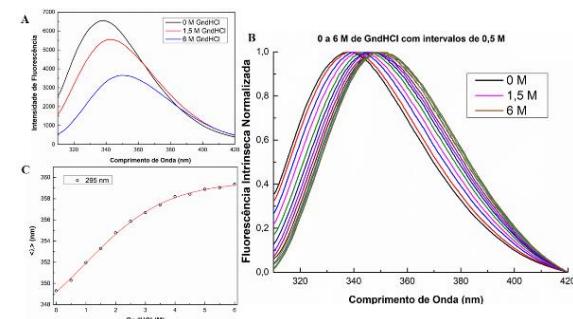


Figura 4. Avaliação da estabilidade química do mutante hHep1-Ndel frente ao agente desnaturante Gnd-HCl. (A) Espectro de emissão de fluorescência da proteína enovelada (preto), Cm do agente desnaturante (vermelho) e a concentração saturante (azul). (B) Espectros normalizados para concentrações crescentes de Gnd-HCl, com intervalos de 0,5 M. (C) Variações de $\langle\lambda\rangle$ em função da concentração de Gnd-HCl.

Conclusões

Neste trabalho, foi possível obter as proteínas recombinantes em seus estados solúveis e monoméricos, bem como uma estabilidade de até 72h. Adicionalmente, as análises estruturais indicaram uma semelhança entre as proteínas hHep1-core e hHep1-Cdel, assim como a hHep1Δmts e hHep1-Ndel. Além disso, a estrutura terciária local indica que a remoção das regiões N- e C-terminais não influenciaram na região onde o fluoróforo se encontra. A estabilidade química do mutante hHep1-Ndel indica uma Cm de 1,4 M para o agente caotrópico Gnd-HCl, o qual foi capaz de provocar o seu desenovelamento completo. A análise da estabilidade química das demais construções está em andamento.

Referências Bibliográficas

- DORES-SILVA, P. R. et al. New insights on human Hsp70-escort protein 1: chaperone activity, interaction with liposomes, cellular localizations and hspa's self-assemblies remodeling. *Int. J. Biol. Macromol.*, [S.L.], v. 182, p. 772-784, jul. 2021.
- KIRALY, Vanessa T.R. et al. Thermal aggregates of human mortalin and Hsp70-1A behave as supramolecular assemblies. *Int. J. Biol. Macromol.*, [S.L.], v. 146, p. 320-331, mar. 2020.