

Estudos da Interação dos Mutantes Truncados dos Mutantes da hHep1 Humana com Lipossomas Carregados Negativamente.

Arthur Moraes Franco da Rocha

Coto, A. L. S.

Borges, J. C.

Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos.

arthurmoraes@usp.br

Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo elucidar os mecanismos de interação envolvidos entre os mutantes hHep1-Ndel, hHep1-Cdel e hHep1-core e os lipossomas de POPS e cardiolipina, por meio de estudos de incorporação e métodos biofísicos de análise.

Métodos e Procedimentos

As proteínas utilizadas foram sintetizadas utilizando plasmídeos específicos que codificam na extremidade N-terminal 6 histidinas para auxílio da purificação e um sítio para clivagem com trombina. A transformação foi realizada com cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3), na presença de canamicina. Os pré-inóculos cresceram durante 18 h a 37 °C e a indução foi feita pela adição de 0,4 mM de IPTG a 30 °C por 4h.

A purificação inicia com a lise das bactérias pela incubação de 30 minutos na presença de DNase e Lisozima em gelo, seguido da realização de pulsos ultrasônicos intermitentes. A amostra passa pelo processo de clarificação, por centrifugação, seguida da filtração em uma membrana de 0,45 µM. A proteína recém clarificada, passa por uma coluna de afinidade por Ni²⁺ seguida de um gel filtração em coluna superdex 16/60 preparativa. A amostra foi submetida a uma diálise por 20 h a 4 °C na presença de trombina para a remoção da cauda de histidina. Para a etapa final da purificação, uma nova afinidade a Ni²⁺ é

realizada para remoção da trombina e das mutantes não clivadas e a proteína é submetida a uma diálise para troca do tampão de purificação para o tampão de análise Tris-HCl.

Os lipossomas de POPS e cardiolipina foram produzidos pesando-se 40 mg de lipídio, solubilizando em 400 µL de clorofórmio e secos com N₂, ressuspensos no tampão Tris-HCl de análise e homogeneizados por procedimento de extrusão.

A análise das estruturas secundárias e terciárias foram respectivamente realizadas por espectropolarimetria de dicroísmo circular e Espectrofluorimetria de excitação do triptofano.

Resultados

Os resultados de purificação indicam eficiência na obtenção com grau de pureza para o processo de purificação das proteínas alvo de estudo. A proteína também se mostrou estável no tampão de análise, tornando possível a realização dos experimentos.

Um pico negativo é visto em 208 nm indicando a presença de alfa-hélices, evidenciando a estabilidade dos mutantes em tampão (figura 1A). Após a incorporação dos mutantes, não houve variação significativa nas estruturas secundárias da proteína que permaneceu preservada no núcleo (figura 1B, figura 1C). Os experimentos realizados com a hHep1 completa mostram um claro aumento nas estruturas secundárias quando incorporadas aos lipossomas (figura 1D).

Diferentemente do que foi observado na incorporação da hHep1 completa nos lipossomas, as interações das mutantes hHep1-Ndel e hHep1-Cdel não geraram alterações significativas nas estruturas secundárias e terciárias da proteína.

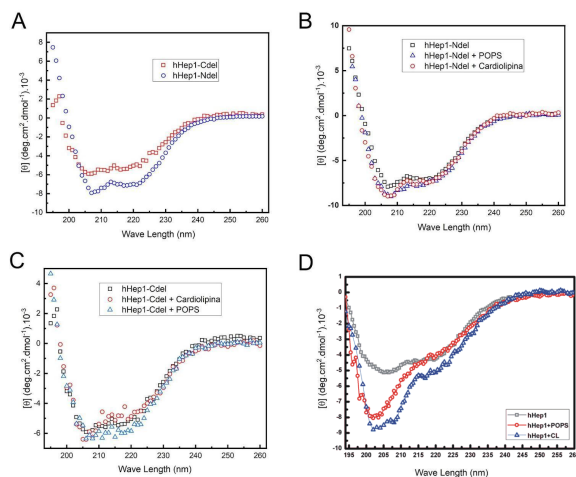


Figura 1: Gráfico da análise das estruturas secundárias das mutantes hHep1-Cdel e hHep1-Ndel em suas respectivas incorporações por dicroísmo circular.

Conclusões

Os ensaios biofísicos realizados mostram que a interação com os lipossomas não provoca alterações estruturais detectáveis em nível secundário e terciário. Para corroborar com os dados apresentados e dar sequência a este trabalho novos ensaios se fazem necessários, em especial aqueles que fornecem mais informações sobre a incorporação dos mutantes nos lipossomas.

Referências Bibliográficas

DORES-SILVA, P. R.; CAUVI, D. M.; COTO, A. L. S.; KIRALY, V. T. R. et al. Interaction of HSPA5 (Grp78, BIP) with negatively charged phospholipid membranes via oligomerization involving the N terminal end domain. *Cell Stress Chaperones*, 25, n. 6, p. 979-991, 11 2020.

DORES-SILVA, P.R.; BELOTI, L.L.; MINARI, K.; SILVA, S.M.O.; BARBOSA, L.R.s.; BORGES, J.C.. Structural and functional studies of Hsp70-escort protein – Hep1 – of *Leishmania braziliensis*. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 79, p. 903-912, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.042>

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. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 182, p. 772-784, jul. 2021. Elsevier BV