

Trabalho



Título em Português:	Identificação de motivos de ligação a cálcio e seu papel em biomineralização
Título em Inglês:	Identification of Calcium-Binding Motifs and Their Role in Biomineralization
Autor:	Luisa Marques Pimentel
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	João Renato Carvalho Muniz
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biofísica Molecular
Agência Financiadora:	CNPq - PIBIC

IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS DE LIGAÇÃO A CÁLCIO E SEU PAPEL NA BIOMINERALIZAÇÃO

Luisa Marques Pimentel

Paulina Rossi Ferreira

Prof. Dr. João Renato Carvalho Muniz

Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo

luisamarques@usp.br

Objetivos

(i) Desenvolver e otimizar protocolos de expressão heteróloga e purificação da proteína CARP4, integrante da matriz orgânica do esqueleto do coral *Stylophora pistillata* recombinante em *Escherichia coli*; (ii) Realizar análises bioinformáticas e modelagem estrutural preditiva com base na sequência primária da proteína. (iii) Aplicação de técnicas de caracterização biofísica e de estabilidade, como espalhamento dinâmico de luz (DLS), fluorimetria de varredura diferencial (DSF) e dicróismo circular (CD); (iv) Tentativas de cristalização e análises de difração de raios X para a determinação experimental da estrutura tridimensional da proteína.

Métodos e Procedimentos

A sequência codificante da proteína CARP4 foi expressa heterológamente em *Escherichia coli* (cepas BL21(DE3) e Origami). A transformação foi realizada por choque térmico, com cultivo em meio LB suplementado com antibióticos específicos, expressão induzida com IPTG e mantida a 18 °C por 16 horas. Após a colheita celular por centrifugação, procedeu-se à lise por sonicação em tampões contendo Tris-HCl e NaCl, testando-se diferentes condições de

solubilização. A purificação envolveu três etapas cromatográficas: afinidade em coluna HisTrap, com eluição em gradiente de imidazol; troca aniônica em coluna MonoQ, voltada à separação de isoformas e contaminantes por diferenças na carga superficial; e exclusão por massa molecular em coluna Superdex 200, utilizada para isolar a proteína na forma monodispersa e livre de agregados. Os tampões adotados foram baseados em PBS pH 7,0, com variações nas concentrações de NaCl e imidazo. A avaliação da pureza das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida, elas foram previamente tratadas com tampão de carga contendo SDS e β -mercaptoetanol, seguidas de desnaturação térmica a 95 °C. Em paralelo, foram feitas análises bioinformáticas usando ProtParam para propriedades físico-químicas e modelagem estrutural preditiva com AlphaFold Protein Structure Database, considerando níveis de confiança e erro previstos. As análises biofísicas e estruturais, como DLS, DSF, CD, a cristalização e difração de raios X, ainda não foram iniciadas, pois tem-se o objetivo de otimização do protocolo de purificação.

Resultados

A expressão heteróloga da proteína CARP4 foi bem-sucedida, entretanto a purificação

apresentou desafios diante a reprodutibilidade e precipitação, possivelmente resultantes do perfil ácido da proteína e sua alta carga negativa. Ajustes no pH, força iônica e estratégias alternativas estão sendo avaliados para superar essas limitações. A concentração das frações eluídas da cromatografia de troca aniônica avaliada pelo SDS-PAGE revelou uma banda predominante compatível com ~37 kDa, correspondente à proteína alvo (Figura 1). Pela cromatografia de exclusão molecular notou-se uma conformação monomérica, evidenciando homogeneidade estrutural. As análises bioinformáticas indicaram massa teórica de 34,75 kDa, pI de 3,99 e alta proporção de resíduos ácidos, sugerindo função de interação com cátions divalentes. O índice de instabilidade e o valor negativo de GRAVY indicam estabilidade em solução, apesar da tendência à agregação. A modelagem estrutural (Figura 2) revelou uma região C-terminal ordenada com feixe de fitas β e hélices, e uma região N-terminal desordenada e flexível, associada à captura eletrostática de íons. A qualidade da predição estrutural foi reforçada pela matriz de erro previsto (PAE), indicando alta confiabilidade local no domínio C-terminal e maior incerteza nas regiões desordenadas. Comparações com estudos anteriores mostraram concordância quanto ao alto teor de resíduos ácidos e interação com cálcio, enquanto a modelagem indicou um núcleo ordenado não descrito antes, sugerindo que possivelmente a CARP4 combina flexibilidade funcional com estabilidade estrutural localizada.

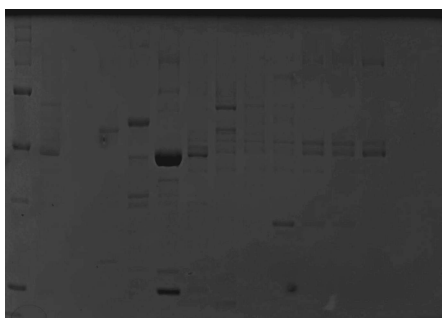


Figura 1. Gel SDS-PAGE da proteína CARP4



Figura 2. Estrutura predita pelo AlphaFold

Conclusões

As análises confirmam a acidez e desordem da CARP4, com um papel potencial na organização de íons de cálcio na biomineralização. A próxima fase da pesquisa se concentra na otimização da purificação da proteína, explorando novas estratégias cromatográficas para aumentar o rendimento e a estabilidade. Além disso, serão realizados ensaios para caracterizar sua interação com íons metálicos, tentativas de cristalização para determinar sua estrutura 3D, e mutagênese dirigida para entender a função de suas regiões ácidas. Tais abordagens visam aprofundar o conhecimento sobre a biomineralização coralina para futuras aplicações biotecnológicas.

Referências

- [1] Mass et al. (2013). Proc. R. Soc. B, v. 280, art. 20122963.
- [2] Mass et al. (2013). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 110, p. 16337–16342.
- [3] Drake et al. (2022). Front. Mar. Sci., v. 9, art. 875021.
- [4] Khan et al. (2023). J. Struct. Biol., v. 215, art. 107902.

IDENTIFICATION OF CALCIUM BINDING MOTIFS AND THEIR ROLE IN BIOMINERALISATION

Luisa Marques Pimentel

Paulina Rossi Ferreira

Prof. Dr. João Renato Carvalho Muniz

Institute of Physics of São Carlos / University of São Paulo

luisamarques@usp.br

Objectives

(i) Develop and optimize protocols for heterologous expression and purification of the CARP4 protein, a component of the organic matrix of the coral skeleton *Stylophora pistillata*, recombinantly produced in *Escherichia coli*; (ii) Perform bioinformatic analyses and predictive structural modeling based on the protein's primary sequence. (iii) Apply biophysical and stability characterization techniques such as dynamic light scattering (DLS), differential scanning fluorimetry (DSF), and circular dichroism (CD); (iv) Attempts at crystallization and X-ray diffraction analysis for the experimental determination of the protein's three-dimensional structure.

Materials and Methods

The CARP4 protein coding sequence was heterologously expressed in *Escherichia coli* (strains BL21(DE3) and Origami). Transformation was performed by heat shock, cultured in LB medium supplemented with specific antibiotics, expression induced with IPTG, and maintained at 18°C for 16 hours. After cell harvest by centrifugation, lysis was performed by sonication in buffers containing Tris-HCl and NaCl, testing different solubilization conditions. Purification involved three chromatographic steps: affinity on a

HisTrap column, with imidazole gradient elution; anion exchange on a MonoQ column, aimed at separating isoforms and contaminants by differences in surface charge; and molecular weight exclusion on a Superdex 200 column, used to isolate the protein in a monodisperse, aggregate-free form. The buffers adopted were based on PBS pH 7.0, with varying NaCl and imidazole concentrations. Sample purity was assessed by polyacrylamide gel electrophoresis. Samples were pretreated with a loading buffer containing SDS and β -mercaptoethanol, followed by thermal denaturation at 95°C. In parallel, bioinformatic analyses were performed using ProtParam for physicochemical properties, and predictive structural modeling with AlphaFold Protein Structure Database, considering predicted confidence and error levels. Biophysical and structural analyses, such as DLS, DSF, CD, crystallization, and X-ray diffraction, have not yet begun, as the goal is to optimize the purification protocol.

Results

Heterologous expression of CARP4 was successful; however, purification presented challenges due to reproducibility and precipitation, possibly resulting from the protein's acidic profile and high negative

charge. Adjustments in pH, ionic strength, and alternative strategies are being evaluated to overcome these limitations. The concentration of the eluted fractions from anion exchange chromatography, assessed by SDS-PAGE, revealed a predominant band compatible with ~37 kDa, corresponding to the target protein (Figure 1). Size exclusion chromatography revealed a monomeric conformation, demonstrating structural homogeneity. Bioinformatic analyses indicated a theoretical mass of 34.75 kDa, a pI of 3.99, and a high proportion of acidic residues, suggesting a function of interaction with divalent cations. The instability index and the negative GRAVY value indicate stability in solution, despite the tendency to aggregation. Structural modeling (Figure 2) revealed an ordered C-terminal region with a bundle of β -strands and helices, and a disordered and flexible N-terminal region associated with electrostatic ion trapping. The quality of the structural prediction was reinforced by the predicted error (PAE) matrix, indicating high local confidence in the C-terminal domain and greater uncertainty in the disordered regions. Comparisons with previous studies showed agreement regarding the high content of acidic residues and interaction with calcium, while the modeling indicated an ordered core not previously described, suggesting that CARP4 possibly combines functional flexibility with localized structural stability.

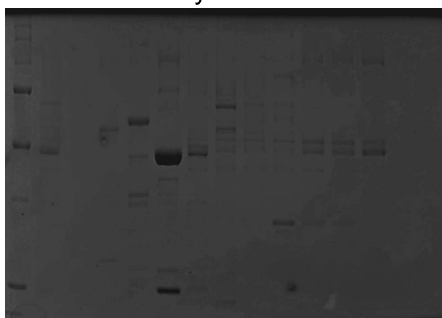


Figure 1. SDS-PAGE gel of CARP4 protein



Figure 2. Structure predicted by AlphaFold

Conclusions

The analyses confirm the acidity and disorder of CARP4, with a potential role in the organization of calcium ions in biomineralization. The next phase of research focuses on optimizing protein purification, exploring new chromatographic strategies to increase yield and stability. Furthermore, assays will be performed to characterize its interaction with metal ions, crystallization attempts to determine its 3D structure, and site-directed mutagenesis to understand the function of its acidic regions. These approaches aim to deepen knowledge about coralline biomineralization for future biotechnological applications.

References

- [1] Mass et al. (2013). *Proc. R. Soc. B*, v. 280, art. 20122963.
- [2] Mass et al. (2013). *Proc. Natl. Academic. Sci. USA*, v. 110, p. 16337–16342.
- [3] Drake et al. (2022). *Front. Mar. Sci.*, v. 9, art. 875021.
- [4] Khan et al. (2023). *J. Struct. Biol.*, vol. 215, art. 107902.