

Trabalho



Título em Português:	Elucidando os mecanismos moleculares da agregação de amiloides funcionais formados pelo Hormônio Liberador de Corticotrofina humano
Título em Inglês:	Elucidating the molecular mechanisms of functional amyloid aggregation formed by the human Corticotropin-Releasing Hormone
Autor:	Leila Prando Hartvite
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Luis Felipe Santos Mendes
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biofísica Molecular
Agência Financiadora:	USP - Programa Unificado de Bolsas



Expressão, purificação e estudo de propriedades estruturais do domínio DUF724 em *Arabidopsis thaliana*

Estudante: Leila Prando Hartvite

Colaborador: Prof. Ítalo Cavini

Orientador: Prof. Luis Felipe Santos Mendes

Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo

leila.hartvite@usp.br

Objetivos

O projeto tem como objetivo investigar a estrutura e função das proteínas contendo o domínio DUF724 de *Arabidopsis thaliana*, com ênfase em dois membros da família, AtDUF5 e AtDUF7. Estas proteínas apresentam domínios coiled-coil (CC) na região C-terminal, que podem estar relacionados à formação de complexos homo- ou heteroméricos e à interação com outros parceiros moleculares.

A compreensão dessas interações pode revelar funções biológicas ainda pouco conhecidas e auxiliar na elucidação do papel dessas proteínas em processos de desenvolvimento vegetal e regulação celular.

Durante o período de vigência da bolsa, buscou-se expressar e purificar tanto o domínio DUF724 completo de AtDUF5 quanto sua versão truncada contendo apenas a região coiled-coil (AtDUF5CC), visando avaliar suas propriedades de solubilidade e estabilidade. Esses ensaios servirão como base para experimentos posteriores de caracterização biofísica, cristalização e estudos de interação com AtDUF7, permitindo validar hipóteses geradas por modelagens estruturais in silico.

Métodos e Procedimentos

Foi realizada a clonagem, expressão e purificação de AtDUF5 e de sua versão truncada contendo apenas o domínio CC (AtDUF5CC). As construções foram expressas em *E. coli* Rosetta(DE3) e purificadas por cromatografia de afinidade com metal imobilizado, seguida de clivagem da cauda de histidinas e exclusão molecular.

Para a proteína insolúvel, aplicou-se protocolo de renovelamento com ureia (4–6 M) e gradiente de remoção do agente desnaturante. As sequências clonadas foram validadas por sequenciamento Sanger, e a pureza e integridade das amostras avaliadas por SDS-PAGE convencional e tricina-SDS-PAGE, possibilitando melhor resolução de proteínas de baixo peso molecular.

Resultados

A expressão de AtDUF5 foi elevada, porém majoritariamente insolúvel, apresentando forte precipitação logo após a eluição, mesmo com ajustes de tampão. A aplicação de protocolo de renovelamento solubilizou a proteína, mas não impediu agregação significativa.

A estratégia de construção truncada (AtDUF5CC) apresentou melhor solubilidade e rendimento (~30 mg/L), sendo obtida diretamente da fração solúvel, com apenas leve tendência à agregação em concentrações mais altas. Esses resultados indicam que a construção CC é mais adequada para avançar nas próximas etapas de caracterização estrutural e ensaios de interação.

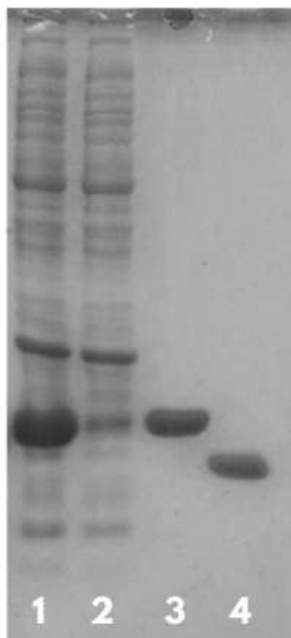


Figura 1: Gel da purificação de AtDUF5CC da fração solúvel. 1, fração solúvel. 2, saída da coluna. 3, eluição, 4, após clivagem da cauda.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que a construção proteica truncada, AtDUF5CC, apresenta maior solubilidade em comparação à proteína completa AtDUF5, permitindo sua purificação a partir da fração solúvel do lisado celular. Essa maior solubilidade torna AtDUF5CC uma alternativa mais promissora para análises estruturais e estudos de

interação de domínios proteicos, contribuindo para a compreensão do funcionamento do domínio DUF724. Os desafios observados na purificação da proteína completa, incluindo a precipitação imediata após a eluição, apontam para a necessidade de otimização dos protocolos, incluindo ajustes na composição do tampão de eluição e nas condições de expressão.

As próximas etapas do projeto envolverão tentativas de cristalização de AtDUF5CC e a produção das proteínas AtDUF7 (inteira e CC) para validação de interações previstas, bem como a revisão aprofundada da literatura para fundamentar as estratégias experimentais subsequentes. Esses esforços visam não apenas aprimorar o rendimento e a qualidade das amostras proteicas, mas também fornecer dados essenciais para futuras análises funcionais e estruturais.

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Leila Prando Hartvite e Prof. Ítalo Cavini realizaram todos os experimentos. Leila Prando Hartvite redigiu o resumo sob orientação do Prof. Ítalo Cavini e do Prof. Luís Felipe Santos Mendes, que supervisionaram o projeto.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Luis Felipe Santos Mendes pela oportunidade de participar do projeto de bolsa unificada na universidade, que me permitiu crescer profissional e academicamente, desenvolvendo habilidades práticas e aprofundando meus conhecimentos na área. Sou também imensamente grata ao Prof. Ítalo Cavini, que, com paciência, atenção e cuidado, me orientou de maneira exemplar, transmitindo os conteúdos de forma clara e me ensinando tudo o que sei sobre técnicas de laboratório de bancada. Sua dedicação e apoio foram fundamentais para o meu aprendizado e confiança no ambiente experimental.

Referências

ABRAMSON, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, v. 630, p. 493-500, 2024.

BRASIL, J. N. et al. AIP1 is a novel Agenet/Tudor domain protein from Arabidopsis that interacts with regulators of DNA replication, transcription and chromatin remodeling. *BMC plant biology*, v. 15, p. 1-21.

CAO, X. et al. Characterization of DUF724 gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, v. 72, p. 61-73, 2010.

CHEN, G. et al. Overexpression of the nuclear protein gene AtDUF4 increases organ size in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *J. Genet. Genomics* v. 45, p. 459–462, 2018.

LUO, C. et al. Domain of unknown function (DUF) proteins in plants: function and perspective. *Protoplasma*, v. 261, p. 397–410, 2024.

LV, P. et al. Unraveling the Diverse Roles of Neglected Genes Containing Domains of Unknown Function (DUFs): Progress and Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 4187, 2023.

MISTRY, J. et al. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, v. 49, p. D412–D419, 2021.

PAYSSAN-LAFOSSE, T. et al. InterPro in 2022. *Nucleic acids research*, v. 51, n. D1, p. D418-D427, 2023.

YUAN, Y. et al. Genome-Wide Identification, Characterization and Expression Analysis of

the TaDUF724 Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 14248, 2023.

Expression, Purification, and Structural Characterization of the DUF724 Domain in *Arabidopsis thaliana*

Leila Prando Hartvite

Prof. Ítalo Cavini

Prof. Luis Felipe Santos Mendes

Institute of Physics of São Carlos – University of São Paulo

leila.hartvite@usp.br

Objectives

The project aims to investigate the structure and function of proteins containing the DUF724 domain in *Arabidopsis thaliana*, focusing on two members of the family, AtDUF5 and AtDUF7. These proteins contain coiled-coil (CC) domains in their C-terminal region, which may be involved in forming homo- or heteromeric complexes and interacting with other molecular partners.

Understanding these interactions may reveal previously unknown biological functions and help elucidate the role of these proteins in plant development and cellular regulation.

During the scholarship period, efforts were made to express and purify both the full DUF724 domain of AtDUF5 and its truncated version containing only the coiled-coil region (AtDUF5CC), in order to assess their solubility and stability. These assays will serve as a foundation for subsequent biophysical characterization, crystallization, and interaction studies with AtDUF7, allowing validation of hypotheses generated by in silico structural modeling.

Materials and Methods

Cloning, expression, and purification of AtDUF5 and its truncated CC-domain construct (AtDUF5CC) were performed. The constructs were expressed in *E. coli* Rosetta(DE3) and purified via immobilized metal affinity chromatography, followed by His-tag cleavage and size-exclusion chromatography.

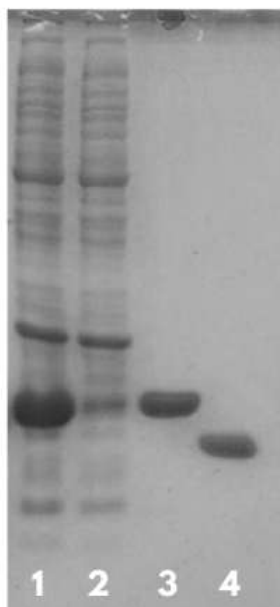
For insoluble protein, a refolding protocol with urea (4–6 M) and a denaturant removal gradient was applied. The cloned sequences were validated by Sanger sequencing, and sample purity and integrity were assessed using conventional SDS-PAGE and Tricine-SDS-PAGE, providing better resolution for low-molecular-weight proteins.

Results

AtDUF5 expression levels were high but mostly insoluble, showing strong precipitation immediately after elution, even with buffer adjustments. The refolding protocol solubilized the protein but did not prevent significant aggregation.

The truncated construct (AtDUF5CC) exhibited higher solubility and yield (~30 mg/L), obtained

directly from the soluble fraction, with only minor aggregation at higher concentrations. These results indicate that the CC construct is more suitable for subsequent structural characterization and interaction assays.



Picture 1: Gel of AtDUF5CC purification from the soluble fraction. 1, soluble fraction; 2, flow-through; 3, elution; 4, after His-tag cleavage.

Conclusions

The results indicate that the truncated protein construct, AtDUF5CC, exhibits higher solubility compared to the full-length AtDUF5, allowing its purification from the soluble fraction of the cell lysate. This higher solubility makes AtDUF5CC a more promising candidate for structural analyses and protein interaction studies, contributing to the understanding of the DUF724 domain function.

Challenges observed during full-length protein purification, including immediate precipitation

after elution, highlight the need to optimize protocols, including buffer composition and expression conditions.

The next steps of the project will include attempts to crystallize AtDUF5CC and the production of AtDUF7 (full-length and CC) to validate predicted interactions, as well as a more in-depth literature review to support subsequent experimental strategies. These efforts aim not only to improve protein sample yield and quality but also to provide essential data for future functional and structural analyses.

The authors declare no conflicts of interest. All experiments were conducted by Leila Prando Hartvite and Prof. Ítalo Cavini. The abstract was drafted by Leila Prando Hartvite under the guidance of Prof. Ítalo Cavini and Prof. Luís Felipe Santos Mendes, who provided supervision for the project.

Acknowledgements

I would like to thank Prof. Luis Felipe Santos Mendes for the opportunity to participate in the unified scholarship project at the university, which allowed me to grow professionally and academically, developing practical skills and deepening my knowledge in the field. I am also immensely grateful to Prof. Ítalo Cavini, who guided me with patience, care, and attention, clearly explaining the content and teaching me everything I know about bench laboratory techniques. His dedication and support were essential for my learning and confidence in the experimental environment.

References

ABRAMSON, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, v. 630, p. 493–500, 2024.

BRASIL, J. N. et al. AIP1 is a novel Agenet/Tudor domain protein from Arabidopsis that interacts with regulators of DNA replication, transcription and chromatin remodeling. *BMC Plant Biology*, v. 15, p. 1–21.

CAO, X. et al. Characterization of DUF724 gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, v. 72, p. 61–73, 2010.

CHEN, G. et al. Overexpression of the nuclear protein gene AtDUF4 increases organ size in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *J. Genet. Genomics*, v. 45, p. 459–462, 2018.

LUO, C. et al. Domain of unknown function (DUF) proteins in plants: function and perspective. *Protoplasma*, v. 261, p. 397–410, 2024.

LV, P. et al. Unraveling the Diverse Roles of Neglected Genes Containing Domains of Unknown Function (DUFs): Progress and Perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 4187, 2023.

MISTRY, J. et al. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, v. 49, p. D412–D419, 2021.

PAYSSAN-LAFOSSE, T. et al. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D418–D427, 2023.

YUAN, Y. et al. Genome-Wide Identification, Characterization and Expression Analysis of the TaDUF724 Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 14248, 2023.