

# **Raport Științific de Etapă**

al proiectului

## **Studiul mecanismului molecular al opacifierii gamma D-cristalinului, și screeningul compușilor anti-cataractă in *silico***

Cod proiect PN-III-P4-PCE-2021-0316, Contract de Finanțare nr. PCE59 / 02.06.2022

**Etapa 1 / 2022: Interacțiunea hgDp23T: aB-Cristalin (partea 1)**

Pentru îndeplinirea obiectivelor propuse, în cadrul etapei nr. 1 de implementare am desfășurat, în conformitate cu planul de lucru al proiectului, următoarele activități:

### **A 1.1 - Studiul perturbării deplasărilor chimice RMN în soluție**

Procesul de descoperire al medicamentelor este unul complex și de durată, implicând o abordare interdisciplinară. Dezvoltarea bazată pe cercetarea fundamentală începe cu identificarea receptorului, proteinele fiind în general țintă principală de interacțiune cu potențialele medicamente. Elucidarea relației dintre activitatea biologică și cea structurală este esențială în procesul de selecție ai diverșilor compuși, care odată optimizați devin potențiali candidați în profilaxie sau tratament.

În această etapă a proiectului ne-am propus să înțelegem mecanismul molecular al procesului de agregare al mutantului Pro23Thr gamma-D cristalin (hγD-p23T) care cauzează cataracta congenitală, studiind modul de interacțiune cu proteina chaperonă de tip șoc termic αB-cristalin (αB-Crys). Mecanismul detaliat de agregare al mutantului hγD-p23T nu este elucidat, din cauza lipsei de informații structurale ale speciilor predispuse spre agregare. Înțelegerea mecanismului molecular al agregării hγD-p23T, este o etapă preliminară în screeningul compușilor capabili să blocheze procesul de separare de fază lichid-precipitant, în vederea dezvoltării de metode alternative de prevenire și tratament ale cataractei congenitale cauzată de acest mutant.

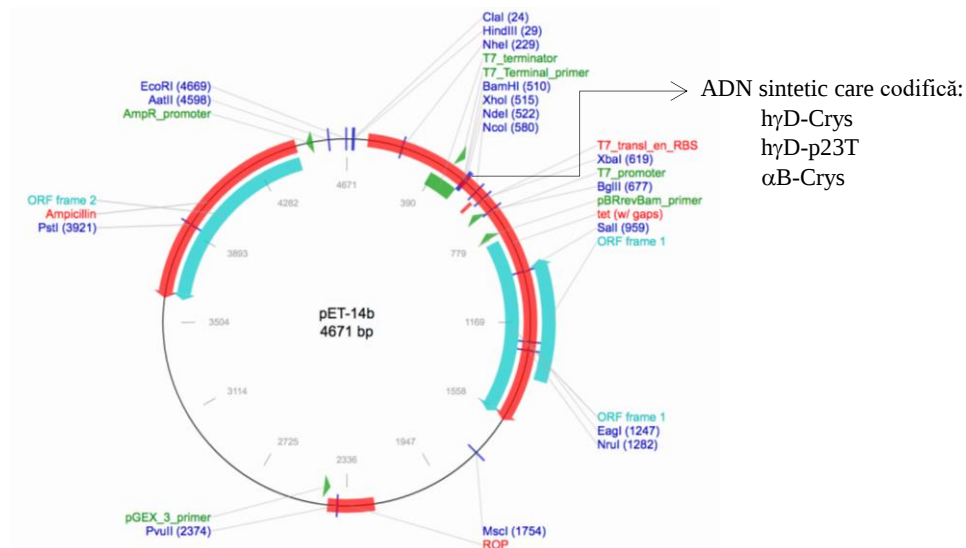
#### 1.1a Clonarea, transformarea, expresia, și purificarea proteinelor

Ca prim pas în studierea structurii și modului de interacțiune al proteinelor din familia cristalinelor (prezente în proporție de 90% în lentila oculară), am preparat gamma-D cristalin nativă (hγD-Crys) având o secvență de 173 aminoacizi, mutantul hγD-p23T, și proteina chaperonă αB-Crys având o secvență de 175 aminoacizi, marcate izotopic cu <sup>15</sup>N, precum și αB-Crys nemarcată izotopic, pentru măsurători RMN în soluție.

Producția de proteine s-a realizat prin metoda recombinantă. ADN-ul sintetic care codifică proteina hγD-Crys nativă, mutantul hγD-p23T, și αB-Crys, a fost inserat în mod individual în vectorul de expresie pET-14b (**Figura 1**), urmând să fie transformate în celulele de expresie BL21(DE3), rezistente la ampicilină/carbenicilină.

Proteinele au fost exprimate în mediul de cultura LB (αB-Crys nemarcată izotopic), sau mediu modificat M9 în prezența izotopului <sup>15</sup>N, pentru γD-Crys nativă, mutantul γD-p23T, și αB-Crys,

marcate uniform cu  $^{15}\text{N}$ . Celulele au fost crescute într-un incubator/agitator (~225 rpm), la o temperatură de 37°C, iar expresia proteinelor a fost indusă cu 1 mM IPTG.



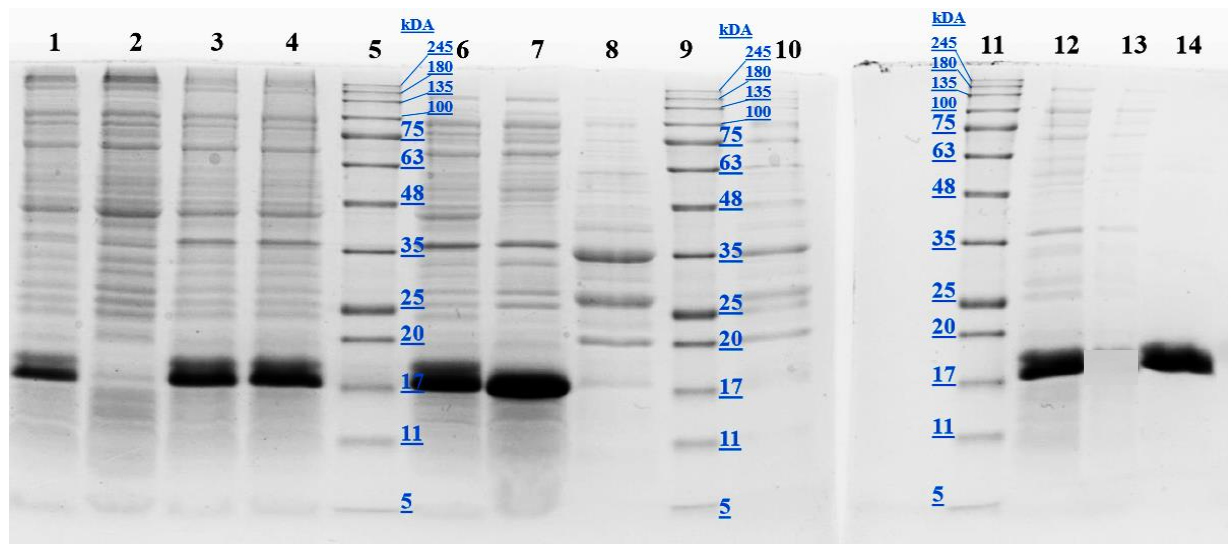
**Figura 1** Reprezentarea vectorului de expresie pET-14b

Proteinele au fost purificate prin metode care exploatează diferențele în proprietățile fizico-chimice și afinitatea de legare, folosind coloanele de schimb ionic (Q-FF și SP-FF), precum și cromatografie de excludere a mărimii prin utilizarea gelurilor poroase (coloana size-exclusion Superdex), atașate sistemului de purificare FPLC-Äkta.

Pentru purificarea hyD-Crys și hyD-P23T, supernatantul rezultat în urma sonicării celulelor și a centrifugării (15,000 g), a fost injectat într-o coloană de schimb anionic Q-FF, echilibrată cu 50 mM Tris (pH=8), 1 mM DTT, ca și soluție tampon. Frația eluată a fost dializată peste noapte în soluție tampon 10 mM MES 1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 2% (pH=6), și injectată într-o coloană de schimb de cationi SP-FF, urmând să fie fracționată folosind un gradient liniar de 1M NaCl. Pentru purificarea finală fracțiile conținând proteina de interes, concentrate la un volum de 5ml, au fost injectate într-o coloana de tip size-exclusion Superdex, în soluție tampon 50 mM fosfat de sodiu (pH=7), 5 mM DTT. Calitatea proteinelor analizată prin 15% SDS-PAGE (**Figura 2**), indică o expresie suficientă (~10 mg/mL), și o puritate ridicată, necesare pentru studiul RMN.

Pentru a purifica αB-Crys, supernatantul dializat peste noapte în soluție tampon 10mM TRIS a fost injectat într-o coloană de schimb anionic Q-FF echilibrată cu 10 mM Tris (pH=8), urmând să fie fracționată folosind un gradient liniar de 1M NaCl. Pentru purificarea finală fracțiile rezultate,

concentrate la un volum de 5ml, au fost injectate într-o coloană de tip gel size-exclusion Superdex, în soluție tampon 50 mM fosfat de sodiu (pH=7).



**Figura 2.** SDS-PAGE gel 15%, conținând probe în diferite stadii de purificare ale mutantului hγD-p23T cristalin, exprimat în celulele BL21(DE3)

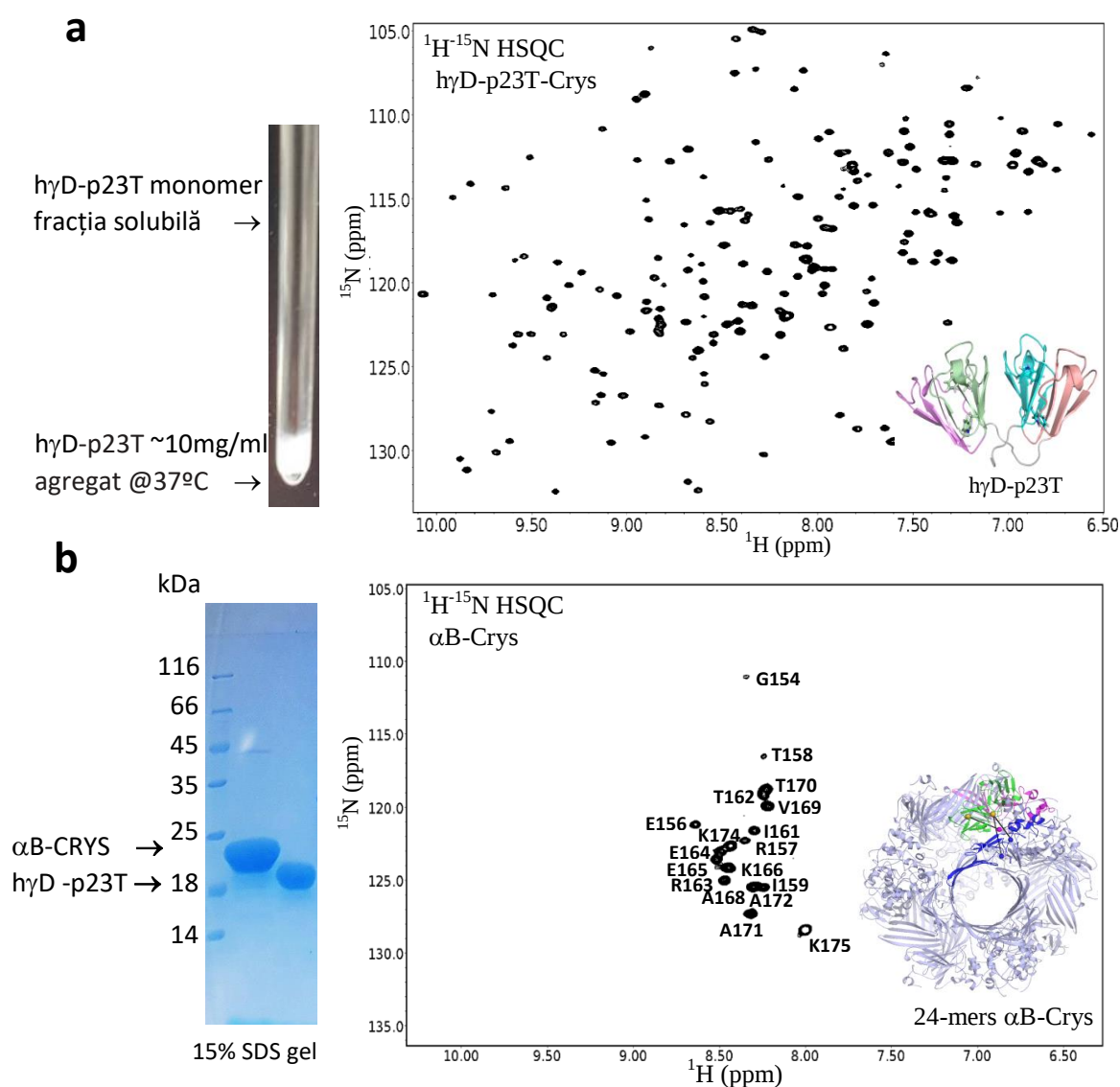
1 – 2h după inducerea expresiei proteinei cu 1mM IPTG, 2 – înaintea inducerii expresiei proteinei, 3 – 2.5 h după inducerea expresiei proteinei, 4 – 3h după inducerea expresiei proteinei, 5 – standard (masă moleculară proteine), 6 – amestec rezultat în urma sonicării, înainte de purificare, 7 – fracția care nu se atașează de coloana de tip Q-FF, în soluție tampon A (0% NaCl), 8 – fracția care se atașează de coloana Q-FF, în urma eluției în soluție tampon B (50% NaCl), 9 – standard (masă moleculară proteine), 10 – fracția care se atașează de coloana Q-FF, în urma eluției în soluție tampon B (100% NaCl), 11 – standard (masă moleculară proteine), 12 – fracția care se atașează de coloana SP-FF, în urma eluției în soluție tampon B (50% NaCl), 13 – fracția care nu se atașează de coloana de tip SP-FF, în soluție tampon A (0% NaCl), 14 – fracția finală purificată folosind coloana size-exclusion Superdex

### 1.1b Studii de interacțiune intermoleculară prin RMN în soluție

Secvența de pulsuri  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC a fost folosită pentru a evalua calitatea, și integritatea structurală a proteinelor, fiind un indicator care arată dacă o macromoleculă suferă schimbări structurale majore în urma unei mutații. Experimentele  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC au fost de asemenea folosite pentru a studia complexe macromoleculare. Proteinele hγD-Crys, hγD-P23T, și αB-Crys marcate izotopic cu  $^{15}\text{N}$ , la o concentrație de ~50 μM, în 50 mM fosfat de sodiu (pH=7) soluție tampon, 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$ , au fost folosite pentru măsurători RMN (spectrometru Bruker AVANCE<sup>III</sup>).

**Figura3** ilustrează spectrele  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (298 K) ale hγD-p23T (a) și αB-Crys (b) marcate cu izotopul  $^{15}\text{N}$ . Proteina hγD-Crys nativă este monomerică, foarte solubilă, și nu prezintă niciun semn de precipitare la o concentrație fiziologică de ~100mg/ml. În schimb, hγD-p23T suferă un proces de

separare de fază (agregare) la o concentrație de  $\sim 10\text{mg/ml}$ , în condiții fiziologice,  $\text{pH}=7$ ,  $37^\circ\text{C}$  (**Figura 3a, stanga**). Frația solubilă a h $\gamma$ D-p23T prezintă semnale de rezonanță bine dispersate și vizibile pentru numărul așteptat de aminoacizi (**Figura 3a, dreapta**), similar cu proteina monomerică h $\gamma$ D-Crys nativă. În schimb, proteina  $\alpha$ B-Crys oligomerizează într-un ansamblu macromolecular de  $\sim 24$ -mers ( $\text{MW}\sim 500\text{ kDa}$ ). Cu excepția aminoacizilor din lanțul polipeptidic C-terminal (G154–K175), care este mult mai flexibil generând linii de rezonanță spectrală înguste, vizibile în spectrele HSQC, restul semnalelor sunt lărgite dincolo de limita de detecție (**Figura 3b, dreapta**). Gelul 15% SDS-PAGE indică o puritate ridicată a proteinelor (**Figura 3b, stanga**).



**Figura 3.** Spectrele  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (298 K) ale proteinelor marcate izotopic: a) h $\gamma$ D-p23T, b)  $\alpha$ B-Crys

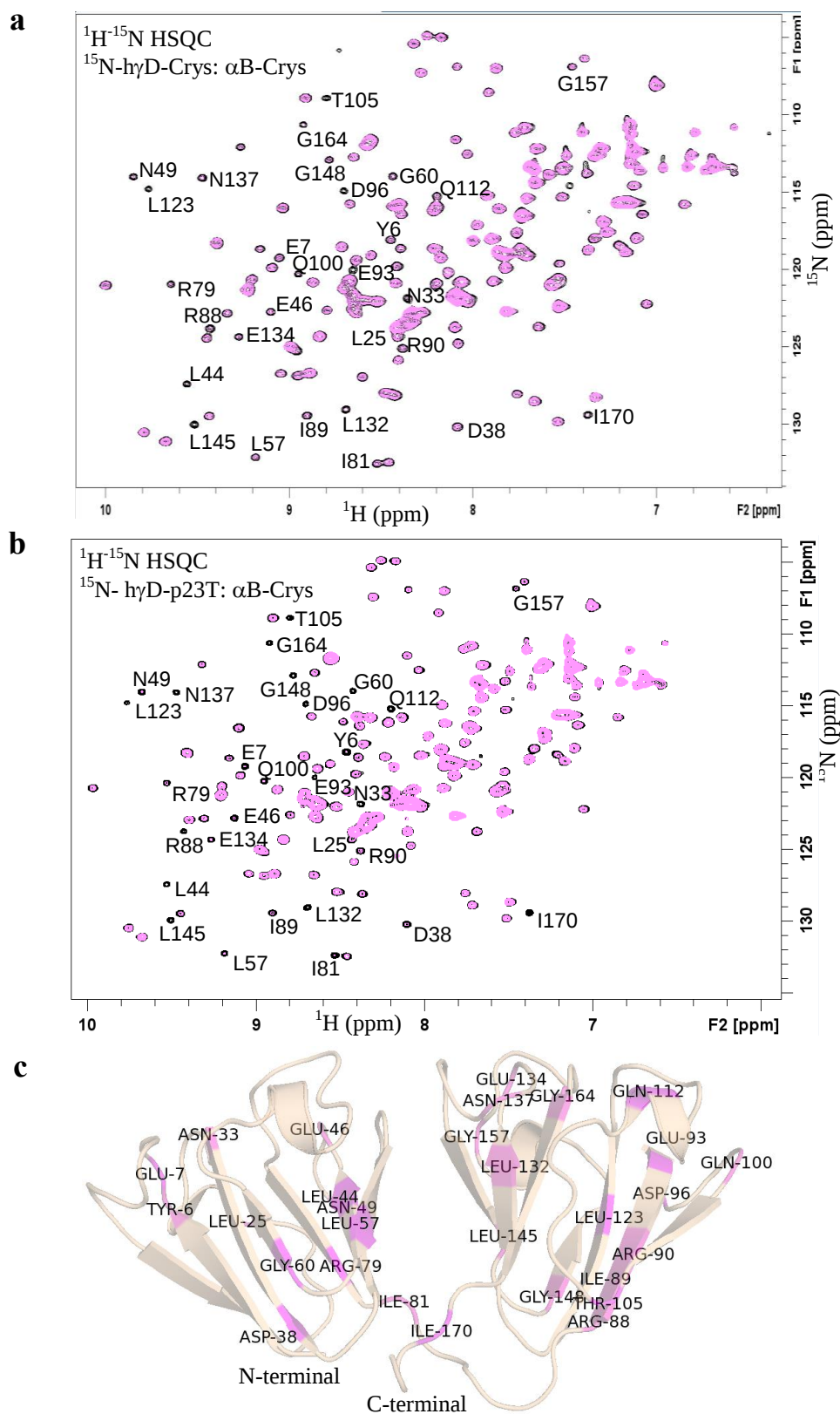
Pentru a înțelege modul în care modificările structurale locale cauzate de mutația Pro23Thr conduc la cataracta congenitală, am efectuat studii comparative de interacțiune între proteina hγD-Crys nativă, respectiv mutantul hγD-P23T, cu proteina chaperonă αB-Crys. Acest studiu oferă un cadru molecular necesar pentru a înțelege dacă procesul de agregare al hγD-P23T este o proprietate directă a mutației, sau reflectă incapacitatea de a fi recunoscut de către proteina chaperonă αB-Crys.

Pentru studierea complexului hγD-Crys/hγD-p23T:αB-Crys, am efectuat experimente de interacțiune RMN în soluție, comparând perturbațiile deplasărilor chimice ale semnalelor de rezonanță NH în spectrele  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC, corespunzătoare proteinelor  $^{15}\text{N}$ -hγD-Crys, și  $^{15}\text{N}$ -hγD-p23T (~50μM), în prezența αB-Crys (nemarcată izotopic), aflate în soluție tampon conținând 50 mM fosfat de sodiu (pH=7), 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$ .

Studiul comparativ prin suprapunerea spectrelor  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC ale  $^{15}\text{N}$ -hγD-Crys (**Figura 4a**), și  $^{15}\text{N}$ -hγD-p23T (**Figura 4b**) în absența (semnale de rezonanță reprezentate în negru), respectiv prezența αB-Crys nemarcată izotopic (semnale de rezonanță reprezentate în roz), este un indicator al regimului de schimb chimic, și al calității complexului. Analiza modificărilor spectrale HSQC nu indică o perturbare vizibilă a deplasărilor chimice, observându-se doar o reducere a intensității semnalelor NH, ca urmare a efectului lărgirii liniilor de rezonanță. Acest fapt indică o interacțiune nespecifică între hγD-Crys, respectiv hγD-p23T, cu proteina chaperonă αB-Crys. Reprezentarea Pymol a structurii tridimensionale a hγD-p23T, indicând aminoacizii care suferă cele mai pronunțate lărgiri ale semnalelor de rezonanță NH în prezența αB-Crys, este ilustrată în **Figura 4c**.

Prin urmare, fracția solubilă (monomerică) a mutantului hγD-p23T interacționează nespecific cu proteina chaperonă αB-Crys, de o manieră asemănătoare proteinei hγD-Crys nativă, sugerând doar o interacțiune tranzitorie de verificare a integrității structurale. Aceasta este un prim studiu RMN care evidențiază rolul protector al proteinei chaperonă αB-Crys, asigurând o pliere tridimensională adecvată a proteinelor partenere (cristalinelor), prezente în lentila oculară (umană).

Totuși, această interacțiune nespecifică nu este suficientă pentru a preveni procesul de agregare al mutantului hγD-p23T, în condiții fiziologice. În aparență procesul de autoasociere macromoleculară al mutantului hγD-p23T este unul pronunțat, astfel încât acesta reușește să evadeze de sub supravegherea proteinei chaperonă αB-Crys, cauzând cataracta.



**Figura 4.** Spectrele  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (281 K) ale hyD-Crys și hyD-p23T marcate izotopic cu  $^{15}\text{N}$ , în absența (negru), respectiv în prezența  $\alpha\text{B}$ -Crys nemarcată izotopic (roz): a) hyD-Crys, b) hyD-p23T; Semnalele de rezonanță afectate (lărgite), corespunzătoare aminoacizilor hyD-Crys, respectiv hyD-p23T în complex cu  $\alpha\text{B}$ -Crys, sunt marcate; c) Reprezentarea în Pymol a structurii tridimensionale corespunzătoare hyD-p23T, indicând aminoacizii care suferă lărgiri ale semnalelor de rezonanță în prezența  $\alpha\text{B}$ -Crys

## Valorificarea rezultatelor

Obiectivele propuse pentru această etapă au fost realizate.

- (1) Două protocoale experimentale, fiecare alcătuit din metode de clonare, transformare, expresie, și purificare ale proteinelor: primul se referă la prepararea proteinelor prezente în lentila oculară: gamma-D cristalin ( $\gamma$ D-Crys), și mutantul Pro23Thr ( $\gamma$ D-p23T), marcate izotopic cu  $^{15}\text{N}$ , iar cel de al doilea se referă la expresia și purificarea proteinei chaperonă  $\alpha$ B-Crys marcat izotopic cu  $^{15}\text{N}$ , sau nemarcat izotopic. Protocoalele optimizate vor sta la baza preparării tuturor proteinelor utilizate în continuare. pe parcursul derulării proiectului.
- (2) Studiul RMN în soluție are o importanță practică remarcabilă, astfel:
  - (i) Secvența de pulsuri RMN  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC a fost folosită pentru a evalua calitatea și structura tridimensională a proteinelor.
  - (ii) Experimentul  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC a fost deasemena folosit pentru a studia interacțiunea dintre proteinele  $\gamma$ D-Crys, respective  $\gamma$ D-p23T, cu proteina  $\alpha$ B-Crys, și a proba formarea complexului macromolecular. Acesta este primul studiu care evidențiază rolul protector al proteinei chaperonă  $\alpha$ B-Crys în controlul structurii tridimensionale ale proteinelor partenere (cristalinelor), aflate în lentila oculară (umană).

Rezultatele acestui studiu obținut în colaborare cu Facultatea de Chimie, Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca, sunt în curs de sistematizare în cadrul unui articol științific care va fi trimis spre publicare anul viitor.

Studii suplimentare de dinamică moleculară care să probeze formarea complexului macromolecular  $\gamma$ D-Crys/ $\gamma$ D-p23T: $\alpha$ B-Crys, cum ar fi măsuratori de relaxare  $T_2$ -RMN, sunt programate pentru etapa următoare: *Interacțiunea  $\gamma$ Dp23T: $\alpha$ B-Cristalin* (partea 2).

Având în vedere faptul că procesul de agregare al mutantului  $\gamma$ D-p23T nu poate fi suprimat în mod natural, acesta reușind să scape de sub controlul proteinei chaperonă  $\alpha$ B-Crys, în următoarea etapă ne propunem să identificăm noi inhibitori împotriva agregării  $\gamma$ D-P23T, utilizând screeningul compușilor *in silico*.

## Rezumat al activităților realizate în etapa-1/2022

### A 1.1 - Studiul perturbării deplasărilor chimice RMN în soluție

#### 1.1.a Clonarea, transformarea, expresia, și purificarea proteinelor

În scopul studierii interacțiunii dintre proteinele din familia cristalinelor prezente în lentila oculară umană, am preparat gamma-D cristalin (hγD-Crys) nativă, mutantul hγD-p23T, și proteina chaperonă αB-Crys, marcate izotopic cu  $^{15}\text{N}$ , precum și αB-Crys nemarcată izotopic, prin metoda recombinantă, folosind vectorul pET-14b, și celulele de expresie BL21(DE3). Proteinele au fost purificate folosind metode de separare prin schimb ionic (coloanele Q-FF, SP-FF), și cromatografie de excludere a mărimii (coloana size-exclusion Superdex), atașate sistemului de purificare FPLC-Äkta. Calitatea proteinelor analizată prin 15% SDS-PAGE indică o expresie suficientă, și o puritate ridicată, necesare studiului RMN.

#### 1.1b Studii de interacțiune intermoleculară prin RMN în soluție

Proteinele hγD-Crys, hγD-P23T, și αB-Crys au fost marcate izotopic cu  $^{15}\text{N}$ . Spectrul  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC a fost folosit pentru a evalua structura tridimensională, și calitatea proteinelor. De asemenea, folosind spectrele  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC am studiat interacțiunea dintre  $^{15}\text{N}$ -hγD-Crys, respectiv mutantul  $^{15}\text{N}$ -hγD-P23T, cu proteina chaperonă αB-Crys (nemarcată izotopic).

Spectrul  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC indică faptul că fracția solubilă a mutantului hγD-p23T prezintă semnale de rezonanță bine dispersate și vizibile pentru numărul așteptat de aminoacizi, similar cu proteina monomerică nativă hγD-Crys. În schimb, αB-Crys oligomerizează într-un ansamblu de ~24-mers (MW ~500kDa), astfel încât doar semnalele de rezonanță C-terminal (G154–K175) sunt vizibile în spectrul  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, restul semnalelor fiind lărgite dincolo de limita de detecție.

Pentru studierea complexului hγD-Crys/hγD-p23T:αB-Crys, am efectuat experimente de interacțiune RMN în soluție, comparând perturbațiile deplasărilor chimice NH în spectrele  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC ale hγD-Crys, și hγD-p23T marcate cu  $^{15}\text{N}$ , în absența, respectiv prezența αB-Crys (nemarcată izotopic). Analiza modificărilor spectrale HSQC indică faptul că fracția solubilă (monomerică) a mutantului hγD-p23T interacționează nespecific cu proteina chaperonă αB-Crys, de o manieră asemănătoare proteinei hγD-Crys nativă, sugerând o interacțiune tranzitorie de verificare a integrității structurale, însă fără posibilitatea de a preveni procesul de agregare.

Director Proiect,  
Dr. Elena Matei

