

Estudos da interação entre as proteínas HBXIP-c7orf59 e HBx

Pesquisadora responsável: Dr^a Juliana H. C. Smetana (LNBio)

Co-orientação: Mariana Piccoli Gonçalves

1. Introdução/estado da arte

Em eucariotos, as vias de sinalização celular são importantes para a coordenação de diversas atividades e funções celulares, sendo comumente controlados por proteínas *scaffold* e adaptadoras, que por sua vez formam os complexos de sinalização. Desvendar a estrutura e a arquitetura molecular dessas proteínas é muito importante para compreendermos os processos de regulação espacial e temporal do processo de sinalização celular.

Através de processos de sinalização celular, fatores de crescimento, níveis de energia e de aminoácidos podem promover o crescimento celular através da ativação da mTORC1-quinase. Foi mostrado que aminoácidos promovem a translocação da mTORC1 para as membranas dos lisossomos, onde proteínas Rag GTPases residem, e são responsáveis pela translocação da mTORC1 até seu ativador, Rheb. O complexo Ragulator, por sua vez, é responsável por interagir com as Rag GTPases, recrutando-as para os lisossomos, sendo assim essencial para a ativação da mTORC1 através da via de sinalização mediada por aminoácidos (Sancak, 2010).

A estrutura do complexo Ragulator foi recentemente caracterizada por diversos grupos independentes, demonstrando que o pentâmero é formado por dois heterodímeros, MP1-p14 e c7orf59-HBXIP, enlaçados pela proteína p18. Os heterodímeros apresentam pouca interação entre si, sendo a proteína p18 a principal responsável por manter a unidade do complexo (Araujo, 2017; Su, 2017; Mu 2017; Zhang, 2017; Yonehara, 2017) (Figura 01). Nosso grupo recentemente resolveu a estrutura do dímero HBXIP-c7orf59 e caracterizou um novo mecanismo de regulação do Ragulator por fosforilação (Rasheed et al, 2019).

A proteína HBXIP (*mammalian hepatitis B X-interacting protein*), foi originalmente identificada num contexto bastante diferente da via de ativação da mTOR: foi descoberta devido à sua interação com a porção C terminal da proteína HBx (*HBV X protein*), transcrita pelo vírus HBV (*Chronic hepatitis B virus*) (Melegari, 1998), causador da Hepatite B, uma doença infecciosa que acomete o fígado, sendo associada ao aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC) (Beasley, 1981).

Neste contexto, a proteína HBXIP atuaria como um elo de ligação entre a maquinaria celular e o patógeno viral, tendo o papel de suprimir a morte celular. Resultados não publicados do nosso grupo

mostraram que HBx interagem com subunidades do Ragulator em células transfectadas e que um peptídeo derivado da região C-terminal da HBx é capaz de interagir com o dímero HBXIP-c7orf59 *in vitro*.

HBx é uma proteína de cerca de 16 kDa cuja estrutura completa é desconhecida, provavelmente trata-se de uma proteína intrinsecamente desenovelada, assim como a subunidade p18 do Ragulator. Uma hipótese interessante é que HBx possa ocupar a mesma interface de p18 na região de interação com HBXIP. Sendo assim, buscamos elucidar as bases estruturais da interação HBXIP-HBx para compreender como ela se relaciona com o Ragulator pentamérico.

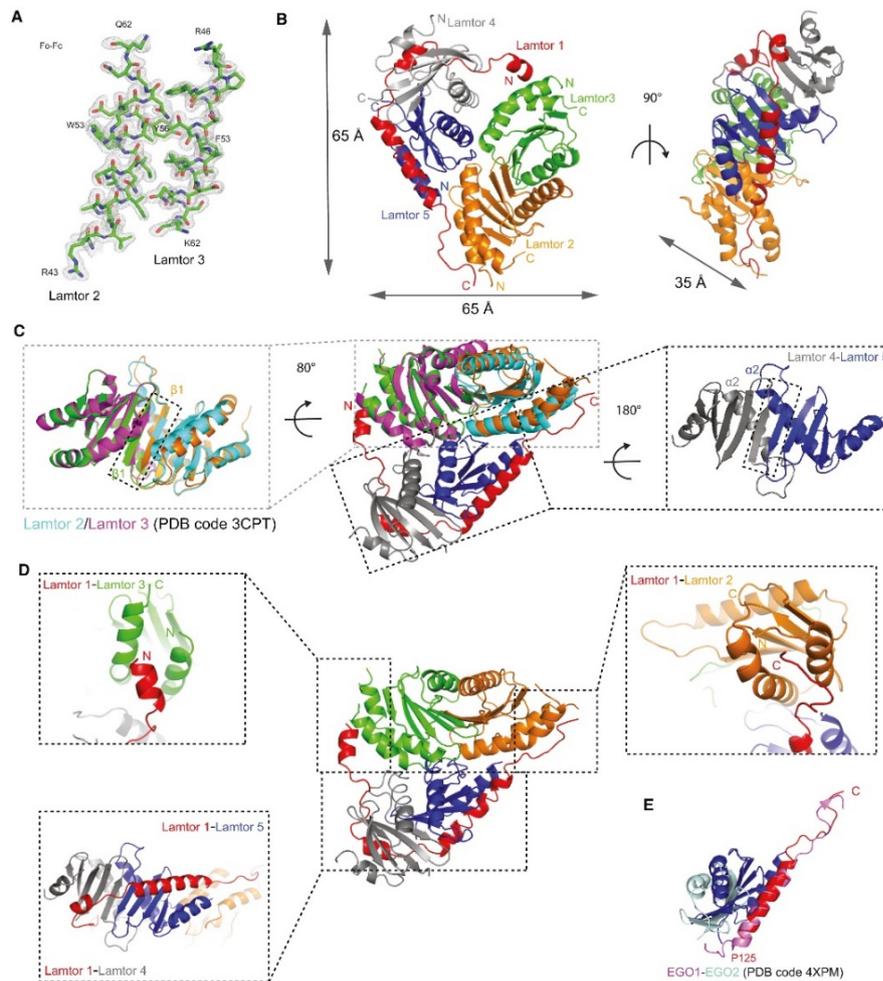


Figura 01: Estrutura cristalográfica do complexo pentamérico Ragulator (Su, 2017). A estrutura é formada a partir de quatro proteínas que apresentam domínios *Roadblock*, organizadas sob a forma de heteodímeros (MP1/p14 e c7orf59/HBXIP) e a proteína p18, que atua como um laço unindo os heterodímeros.

2. Objetivos

Objetivo geral: Esta proposta tem o objetivo de produzir o complexo HBx-HBXIP-c7orf59 em *E. coli* para estudos estruturais e ensaios de interação.

Objetivos específicos:

→ Produzir e purificar o dímero HBXIP-c7orf59 para ensaios de co-cristalização com peptídeo e ensaios biofísicos que serão realizados pela doutoranda do grupo, Mariana Piccoli Gonçalves, e acompanhar a realização desses experimentos;

→ Padronizar a expressão em *E. coli* da construção GST-HBx (C-terminal) sozinha ou com o dímero HBXIP-c7orf59, e realizar ensaios de interação (GST *pulldown*) para confirmar a interação.

→ Padronizar a expressão em *E. coli* de um vetor multicistronico de expressão do trímero HBXIP-c7orf59-HBx (C-terminal), visando a obtenção de proteína solúvel em quantidade suficiente para ensaios de cristalização.

3. Métodos

3.1. Expressão e purificação: A purificação do dímero HBXIP-c7orf59 seguirá protocolos já padronizados em nosso grupo, que consistem, resumidamente, na expressão das proteínas em *E. coli* em fusão a cauda de polihistidina e subsequente purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado seguida de gel-filtração. Todos os vetores de expressão necessários à execução do projeto já estão prontos.

3.2. Ensaio de interação: As proteínas serão submetidas a ensaios de *pulldown* para purificação e o produto da purificação será analisado através de gel de SDS-PAGE e *Western blot*.

4. Referências Bibliográficas

- Beasley, R. P., C. C. Lin, L. Y. Hwang, and C. S. Chien. (1981). **Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan**. *Lancet*,ii:1129–1133.
- de Araujo MEG, Naschberger A, Fürnrohr BG, Stasyk T, Dunzendorfer-Matt T, Lechner S, Welti S, Kremser L, Shivalingaiah G, Offterdinger M, Lindner HH, Huber LA, Scheffzek K. (2017) **Crystal structure of the human lysosomal mTORC1 scaffold complex and its impact on signaling**. *Science*.;358(6361):377-381.
- Lin S, Zhang YJ. **Interference of Apoptosis by Hepatitis B Virus**. *Viruses*. 2017;9(8).
- Mu Z., Wang L., Deng W., Wang J., Wu G. (2017) **Structural insight into the Ragulator complex which anchors mTORC1 to the lysosomal membrane**. *Cell Discov*. 2017 26;3:17049.
- Rasheed N, Lima TB, Mercaldi GF, Nascimento AFZ., Silva ALS, Righetto GL, Bar-Peled, L, Shen K, David M. Sabatini DM, Gozzo FC, Aparicio R, Smetana JHC. **C7orf59/LAMTOR4 phosphorylation and structural flexibility modulate Ragulator assembly**. *FEBS Open Bio* **72**, 1737 (2019).
- Sancak, Y., Bar-Peled L., Zoncu R., Markhard A., Nada S., Sabatini D. **Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids**. *Cell*. 2010 ;141(2): 290-303.
- Su MY, Morris KL, Kim DJ, Fu Y, Lawrence R, Stjepanovic G, Zoncu R, Hurley JH. (2017). **Hybrid Structure of the RagA/C-Ragulator mTORC1 Activation Complex**. *Mol Cell*. ;68(5):835-846.e3
- Yonehara R, Nada S, Nakai T, Nakai M, Kitamura A, Ogawa A, Nakatsumi H, Nakayama KI, Li S, Standley DM, Yamashita E, Nakagawa A, Okada M. (2017). **Structural basis for the assembly of the Ragulator-Rag GTPase complex**. *Nat Commun*. 2017 Nov 20;8(1):1625.
- Zhang T, Wang R, Wang Z, Wang X, Wang F, Ding J. (2017). **Structural basis for Ragulator functioning as a scaffold in membrane-anchoring of Rag GTPases and mTORC1**. *Nat Commun*. 2017 Nov 9;8(1):1394.