

Otimização da purificação dos mutantes truncados da proteína Hsp70-escort protein 1 humana

Maria Júlia Mattos Gomes

Dra. Milene N. O. Moritz

Prof. Dr. Júlio César Borges

Instituto de Química de São Carlos | Universidade de São Paulo

mjuliamattos@gmail.com

Objetivos

O objetivo desse trabalho foi a expressão e purificação dos mutantes truncados da proteína humana Hsp70-escort protein 1 (hHep1) com as regiões N- ou C-terminais deletados, como apresentado na Figura 1. Essa co-chaperona é eficaz na prevenção da agregação térmica das HSPAs (HSPA9 e HSPA1A), bem como estimulando sua atividade ATPase. Então, a fim de avaliar quais extremidades possuem papel essencial em relação à proteína hHep1 completa, essa caracterização se faz necessária. As proteínas que foram expressas e purificadas são a hHep1Δmts, hHep1-Ndel e hHep1-Cdel.

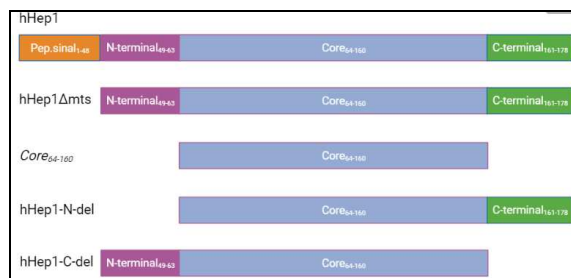


Figura 1. Diagrama esquematizando as regiões da hHep1 mantidas nos construtos hHep1Δmts, hHep1-Ndel e hHep1-Cdel.

Métodos e Procedimentos

As construções das proteínas recombinantes foram produzidas pelos vetores de expressão pET28a::hHep1Δmts, pET28a::hHep1-Ndel e pET28a::hHep1-Cdel na cepa de *Escherichia coli* BL21. As células competentes foram

transformadas com os respectivos vetores em meio contendo canamicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e submetidas a indução com IPTG a 30°C e 200 rpm por 4 h. O *pellet* obtido no processo de indução foi ressuspenso no tampão de lise (pH 8,0; 8,5 para hHep1-Cdel) e lisado por sonicação. A fração solúvel foi separada por centrifugação e em seguida clarificada por filtração utilizando membrana com poro de $0,45 \mu\text{m}$. O vetor pET28a codifica no N-terminal uma sequência de 20 aminoácidos (*His-Tag*) contendo uma sequência de 6 His vicinais e um sítio para a enzima trombina. A *His-tag* facilita a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Portanto, a fração filtrada foi aplicada em uma coluna de afinidade ao níquel *HiTrap Chelating HP* 5 mL equilibrada em tampão A com 20 mM de imidazol (pH 7,4; 8,5 para hHep1-Cdel). Após a obtenção das proteínas purificadas, a *His-tag* foi removida pela enzima trombina em diálise em tampão TKP (pH 7,4; 8,5 para hHep1-Cdel) e as proteínas foram novamente submetidas a uma cromatografia de afinidade em tampão A sem imidazol (pH 7,4; 8,5 para hHep1-Cdel). Em seguida, foram purificadas por cromatografia de exclusão por tamanho preparativa na coluna *HiLoad Superdex 75* 16/60, equilibrada com TKP (pH 7,4; 8,0 para hHep1-Cdel). A amostra obtida foi dialisada para troca de pH em TKP (pH 7,4). Durante todas as etapas foram coletadas amostras para avaliá-las por SDS-PAGE, em tampão Tris/Tricina e gel de poliacrilamida 12%.

Resultados

Como resultados apresentamos na Figura 2A a avaliação por SDS-PAGE das concentrações de IPTG que foram utilizadas (0,2 uM e 0,4 uM) para induzir a expressão dos mutantes. A concentração que obteve um maior rendimento foi de 0,4 uM, em que todos os mutantes foram obtidos em uma maior quantidade na sua forma solúvel. Na Figura 2B (hHep1 Δ mts), 2C (hHep1-Ndel) e 2D (hHep1-Cdel) temos a análise do padrão de bandas por SDS-PAGE das amostras eluídas e coletadas em cada etapa da purificação. Podemos observar em todos os géis que os mutantes foram purificados e, como apresentado na caneleta (S), obtidos em sua forma solúvel no lisado celular. Além disso, no perfil (T) que corresponde à amostra coletada após o período de incubação com a enzima trombina, temos uma diminuição de massa da banda de interesse, a qual corresponde a clivagem da His-tag, equivalente à cerca de 2 kDa.

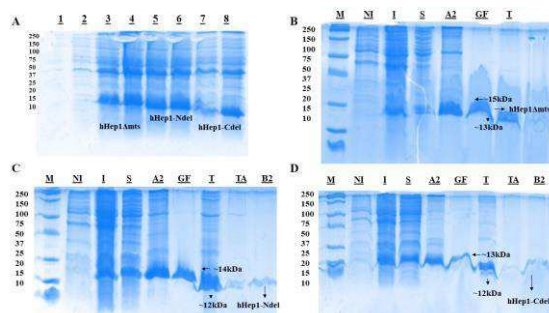


Figura 2: Perfil proteico das etapas de purificação por SDS-PAGE (M) marcador de peso molecular; (NI) células não induzidas; (I) células induzidas; (S) sobrenadante após centrifugação; (A2) fração eluída em 500 mM de imidazol na 1^o cromatografia de afinidade; (GF) fração obtida na cromatografia de exclusão por tamanho preparativa; (T) fração após diálise na presença de trombina para clivagem da His-Tag. Nas figuras 1C e 1D duas bandas a mais referentes à (TA) flowthrough eluído em tampão 0 mM na 2^o cromatografia de afinidade ao níquel; (B2) fração eluída em 75 mM de imidazol na 2^o cromatografia de afinidade ao níquel.

Além disso, como pode ser visto na Figura 3, obtivemos a purificação dos mutantes truncados, em que todos foram purificados nos estados solúveis e monoméricos, conforme atestado por cromatografia de exclusão por tamanho preparativa. O primeiro pico representa contaminantes que eluíram no volume morto da coluna. As proteínas

recombinantes representam o segundo pico do cromatograma. Vale ressaltar que a purificação da hHep1-Cdel foi realizada em condições diferentes dos outros mutantes.

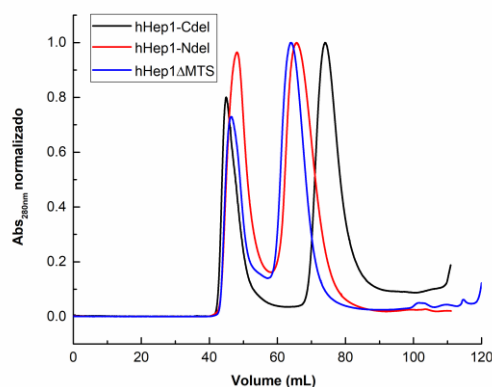


Figura 3: perfil da cromatografia de exclusão por tamanho dos mutantes. Em preto temos o mutante hHep1-Cdel; vermelho hHep1-Ndel; azul hHep1 Δ mts.

Conclusões

Neste trabalho, concluímos que a concentração ideal para a indução da expressão dos mutantes truncados da hHep1 é de 0,4 uM de IPTG a 30 °C e 200 rpm por 4 h. Além disso, foi possível realizar a purificação das três proteínas recombinantes hHep1 Δ mts, hHep1-Ndel e hHep1-Cdel, em que foram obtidas em seus estados solúveis e monoméricas. Salientamos que ainda existem certas condições a serem aprimoradas, visando um maior rendimento dessas purificações, como a utilização de banho a 4 °C durante a cromatografia de exclusão por tamanho, para garantir que não haja degradação durante esse processo. Ademais, faz-se necessário testes com diferentes pH para a purificação do mutante hHep1-Cdel, a fim de obter maior estabilidade da proteína, bem como evitar uma possível degradação.

Referências Bibliográficas

- 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. *Int. J. Biol. Macromol.* [S.L.], v. 182, p. 772-784, jul. 2021.
- KIRALY, Vanessa T.R. et al. Thermal aggregates of human mortalin and Hsp70-1A behave as supramolecular assemblies. *Int. J. Biol. Macromol.* [S.L.], v. 146, p. 320-331, mar. 2020.