

Planejamento, expressão, purificação e análise de proteína recombinante LipoCAT-2 para a quantificação absoluta de apolipoproteínas em amostras biológicas

Vinicius Diniz Nassin

Douglas Ricardo de Souza Junior

Graziella Eliza Ronsein

Instituto de Química da Universidade de São Paulo – IQ/USP

vinidnassin@usp.br

Objetivos

A lipoproteína de alta densidade do inglês, *high-density lipoprotein*, HDL) é uma partícula constituída por diversas apolipoproteínas, possuindo funções essenciais metabolicamente. Reporta-se que os níveis de colesterol carregados por HDL têm relação inversa com as chances de mortalidade por doença cardiovascular aterosclerótica e infecções [1]. A HDL não carrega apenas colesterol e fosfolípidos, mas também muitas proteínas. Uma alternativa inovadora à tradicional quantificação por conteúdo de colesterol de HDL é a quantificação absoluta das proteínas contidas nestas partículas. Isto pode ser feito por meio de uma proteína recombinante formada por peptídeos de apolipoproteínas constituintes da HDL que atue como padrão interno (QconCAT) para sua quantificação por proteômica acoplada à espectrometria de massas [2].

O projeto visou realizar o desenho, otimização das condições de expressão e purificação e a avaliação da performance analítica da proteína recombinante LipoCAT-2 como padrão interno para a quantificação absoluta de lipoproteínas da HDL em amostras biológicas simples e

complexas, monitorando parâmetros analíticos para cada peptídeo.

Métodos e Procedimentos

Foi desenhada a proteína recombinante LipoCAT-2, com 48 peptídeos de apolipoproteínas importantes para a biologia da HDL e possuindo ajustes sobre um QconCAT anterior (LipoCAT-1).

A expressão da LipoCAT-2 foi realizada em bactérias *E. coli* BL21(DE3) cultivadas em meio LB mediante indução de IPTG. Avaliou-se a condição ideal de expressão variando a concentração de IPTG e o tempo de indução (**Figura 1**). A purificação da proteína foi feita usando sua cauda de polihistidina (10xHisTag) realizando Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (IMAC) com resina de Ni²⁺ (Roche) (**Figura 2**). Uma vez otimizado o protocolo, a proteína foi expressa em meio mínimo marcado isotopicamente com ¹⁵NH₄Cl e purificada. Após obtenção de amostras de plasma sanguíneo humano de voluntários saudáveis, isolou-se as partículas de HDL por ultracentrifugação e adicionou-se ¹⁵N-LipoCAT-2 em seguida. As amostras foram digeridas com tripsina e submetidas à análise em espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos e pelo software Skyline, comparando a

LipoCAT-2 com a LipoCAT-1 quanto à performance analítica para a quantificação de apolipoproteínas em amostras biológicas.

Resultados

Determinou-se a condição ideal de expressão da LipoCAT-2, mediante indução por 0,5 mM IPTG por 3h a 37°C e ressuspensão de corpos de inclusão (**Figura 1**). Otimizou-se a purificação por IMAC incubando overnight e realizando lavagem com tampão básico (pH 10,0) e eluição por adição de imidazol (**Figura 2**). Expressou-se em meio mínimo marcado e purificou-se a ¹⁵N-LipoCAT-2, e quantificou-se absolutamente as lipoproteínas de amostras de HDL utilizando a proteína recombinante como padrão interno de quantificação por espectrometria de massas (**Figuras 3 e 4**).

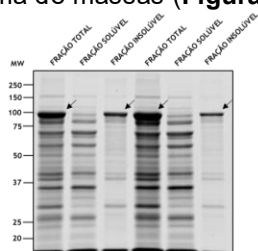


Figura 1: Gel de SDS-PAGE usado para determinar a condição ideal de expressão da LipoCAT-2.

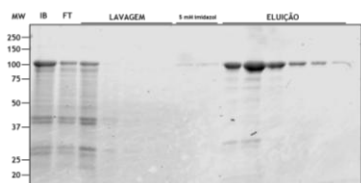


Figura 2: Resultado da purificação otimizada.

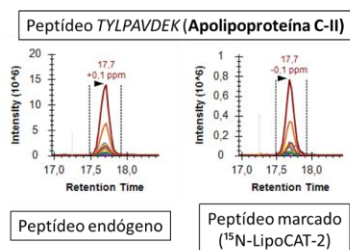


Figura 3: Cromatogramas representativos de peptídeos endógenos de HDL e da ¹⁵N-LipoCAT-2 obtidos pelo software Skyline.

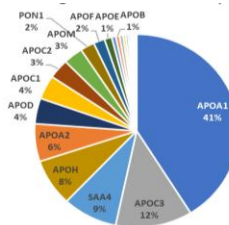


Figura 4: Contribuição relativa de cada apolipoproteína quantificada para HDL

Conclusões

Foi desenvolvido e otimizado um método eficiente e reprodutível de expressão e purificação da proteína recombinante LipoCAT-2. Utilizando-a como padrão interno, foi possível quantificar absolutamente 29 das apolipoproteínas mais importantes para a biologia da HDL. Comparando com a LipoCAT-1, o novo QconCAT apresentou melhor eficiência na purificação e menores coeficientes de variação. Consultando a literatura, houve concordância quanto à contribuição das apolipoproteínas, salvo raras exceções que possivelmente se devem à baixa detecção de seus respectivos peptídeos. Este problema será corrigido em testes futuros em função de novos aprimoramentos já realizados nos protocolos de purificação e análise. Os autores declaram não haver conflito de interesses. Ronsein G.E. e Souza Junior D.R. conceberam e planejaram os experimentos, Souza Junior D.R. e Nassin V.D. realizaram a coleta e análise de dados, e Nassin V.D. e Ronsein G.E. contribuíram para escrita e revisão do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Referências

- [1] WILSON P.W. et al. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The framingham heart study. Arteriosclerosis, 8:737-41, 1988
- [2] SIMPSON D.M. et al. QconCATs: design and expression of concatenated protein standards for multiplexed protein quantification. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 404:977-89, 2012