



## Interações da glicoproteína associada à microfibrila (MAGP-1) com proteínas de plaquetas e do plasma

Jaqueline de Souza Gianchetto<sup>1</sup>, Cristina Pontes Vicente<sup>1</sup>, Claudio Chrysostomo Werneck<sup>1</sup>

1. Instituto de Biologia, UNICAMP

### Introdução

A glicoproteína associada à microfibrila-1 (MAGP-1) é parte integrante da rede de microfibrilas que compõem as fibras elásticas, estando presente na grande maioria, senão em todas, as microfibrilas de vertebrados<sup>1</sup>. A partir de ensaios de trombose arterial com camundongos nulos para MAGP-1, foi possível verificar que a ausência de MAGP-1 leva a uma deficiência na trombogênese, visto que o tempo de formação do trombo foi de quase duas vezes o do camundongo selvagem. Quando aplicada uma injeção prévia de MAGP-1 recombinante, o tempo de oclusão normal foi resgatado. Por outro lado, quando uma MAGP-1 recombinante mutada em dois resíduos de valina foi injetada, esta não foi efetiva em resgatar o tempo normal de formação de trombo<sup>2</sup>.

### Objetivos

O objetivo geral deste projeto é avaliar as interações da MAGP-1 com proteínas do plasma e de plaquetas a fim de identificar as proteínas presentes no plasma e nas plaquetas com as quais a MAGP-1 selvagem e mutada interagem, a partir de ensaios de "pull-down" de MAGP1 recombinante contra o plasma e contra extrato de plaquetas.

### Metodologia

#### a) Expressão e purificação da MAGP-1 recombinante (selvagem e mutada)

A MAGP-1 foi obtida através da expressão por bactérias previamente transformada com o vetor pQE30 (Qiagen, Valencia, CA). Este vetor permite a inserção de uma sequência de 6 aminoácidos de histidina na região N-terminal da proteína, permitindo a purificação por resina de NTA-Níquel (ácido nitrilo tri-acético). Após indução da expressão, as bactérias foram centrifugadas, 4000 g por 20 minutos, e o precipitado foi lisado com tampão de lise (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM + Tris-HCl 10 mM + Ureia 8 M pH 8,0) por duas horas em um agitador de tubos à temperatura ambiente. A amostra foi submetida à centrifugação por 30 minutos a 10000 g a 4°C. O sobrenadante foi incubado por um período de 12-18 h com resina de agarose que contém NTA (ácido nitrilo tri-acético)

ligado e, posteriormente, centrifugado a 4000 g por 20 minutos. Ao precipitado foi adicionado tampão de lavagem, que nada mais é do que o tampão de lise com pH=6,7. A amostra foi ressuspensa e novamente centrifugada a 4000 g por 20 min. Este processo foi repetido por mais duas vezes. Após a terceira vez, tampão de eluição foi adicionado a amostra, que na verdade é o tampão de lise com pH=4,5. Após homogeneização em vórtex, a amostra foi então centrifugada a 4000 g por 20 minutos.

#### b) Purificação por cromatografia de afinidade e diálise da amostra

Em um dos testes, foi realizado a purificação por cromatografia em coluna. Após a expressão e purificação, a amostra já lisada foi submetida à centrifugação. O sobrenadante foi ligado a resina. A cromatografia de afinidade foi então procedida onde a resina foi exaustivamente lavada com tampão de lavagem (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM + Tris-HCl 10 mM + Ureia 8 M pH 6,3), por meio de uma bomba peristáltica, e finalmente, MAGP-1 foi eluída da coluna com tampão de baixo pH (=4,5). A amostra obtida foi submetida a um processo de diálise, através de um tubo de celulose mergulhado em soluções de ácido acético 50 mM. Este processo foi utilizado para a retirada de íons retidos na amostra.

#### c) Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

A eletroforese em gel trata-se de uma técnica laboratorial simples que utiliza a corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas. Todas as amostras obtidas foram testadas pela eletroforese em gel para verificar a presença da MAGP-1. Para a separação de proteínas por massa molecular, foi utilizado gel de poliacrilamida 12,5%. Inseriu-se o gel em uma cuba contendo o tampão de corrida (tris 30,3 g; glicina 144,2 g; SDS 5 g; litro de água Milli-Q) e ligou-se a cuba a uma fonte à 120V. O tempo de corrida foi variável, sendo encerrado quando a linha estava a 0,5 cm da base do gel.

## Resultados

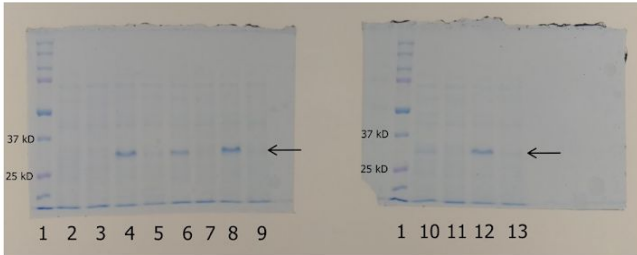
Após a primeira expressão e purificação, a eletroforese foi realizada. Utilizamos três colônias selecionadas, comparando as amostras induzidas e não-induzidas, assim como o que ligou ou não na resina. Conforme mostrado na figura 1, obtivemos o resultado desejado. Notamos a presença de bandas mais destacadas da MAGP-1 nas amostras induzidas e ligadas a resina. Continuamos os testes utilizando a amostra 1 do teste

anterior. Após a indução da expressão, purificamos a amostra utilizando a cromatografia de afinidade e realizamos a eletroforese antes e depois do processo de diálise (figura 2 e 3). O resultado obtido foi considerado insatisfatório, devido à ausência de uma banda significativa da MAGP-1. Uma possível causa para este resultado é algum erro cometido durante o processo de cromatografia. Para averiguarmos, realizamos uma nova eletroforese utilizando a resina, a fim de identificar se a proteína continuava presa a ela (figura 4).

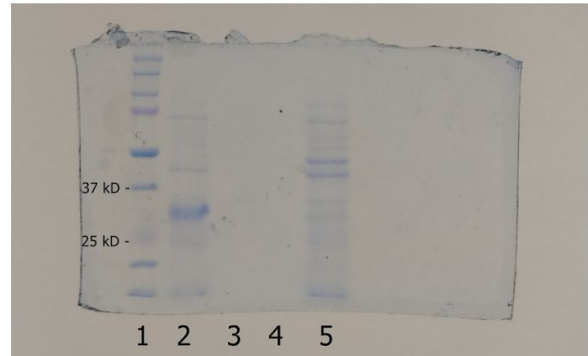
A partir do resultado obtido, notamos que na resina ligaram-se muitas proteínas diferentes, inclusive uma com um peso muito maior do que a MAGP-1. No entanto, não verificamos a presença da própria MAGP-1 na resina. Uma possível explicação para este evento seria uma provável mutação na bactéria da colônia 1, devido ao longo tempo de armazenamento em geladeira. Em consequência disto, re-iniciamos plaqueando novas bactérias.

Prossequimos selecionando três colônias e realizamos novos testes. Utilizamos como padrão de referência para presença de MAGP-1 a amostra 1 induzida inicial (figura 1). Verificamos a presença da MAGP-1 nas amostras analisadas (figura 5), principalmente nas amostras 1 e 3. Selecionamos a amostra 3 para prosseguir os experimentos. Realizamos a expressão desta mesma colônia com diferentes concentrações do indutor (1 mM, 2 mM e 4 mM) e com diferentes tempos de indução (3 horas, 4 horas e 5 horas). Identificamos a presença de bandas claras da MAGP-1 no gel com amostras ligadas à resina (figura 6). Entretanto, observamos pouca diferença entre as diferentes concentrações do indutor e tempo de indução. Selecionamos a amostra de 1 mM do indutor para novos testes. O resultado (figura 7) mostrou novamente a presença de outra proteína de maior peso molecular em grande quantidade, devido a provável mutação na bactéria utilizada. Re-iniciamos os experimentos, plaqueando novos meios de cultura. Selecionamos três colônias para prosseguir. Obtivemos sucesso com a amostra 2 induzida (figura 8), única amostra com uma banda relevante da nossa proteína de interesse, a MAGP-1. Iniciamos o prosseguimento do experimento com a amostra 2, no entanto, neste ponto, paralisamos as atividades juntamente com a suspensão das atividades presenciais na UNICAMP (dia 13 de março de 2020).

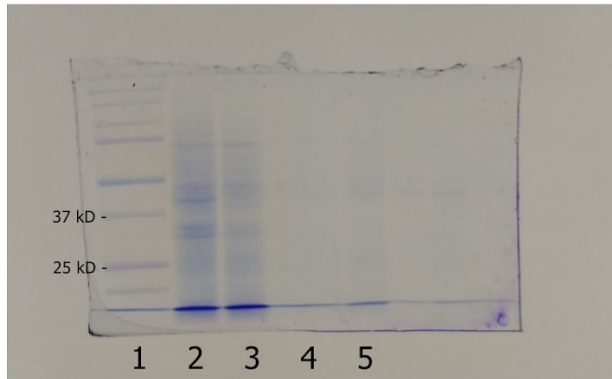
## FIGURAS



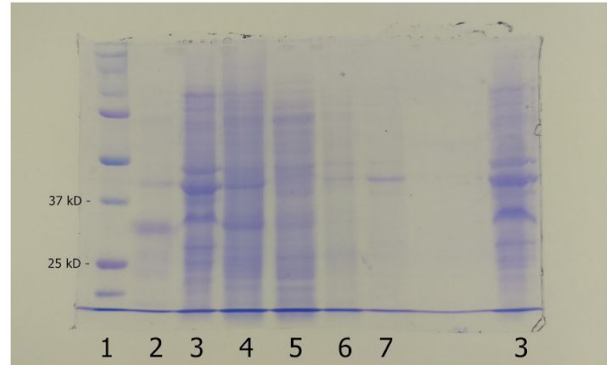
**Fig. 1** – Eletroforese em gel: 1 (padrão), 2 (Amostra 1 não-induzida ligada a resina), 3 (Amostra 1 não-induzida e não ligada a resina), 4 (Amostra 1 induzida), 5 (Amostra 1 induzida não ligada a resina), 6 (Amostra 2 não-induzida ligada a resina), 7 (Amostra 2 não-induzida e não ligada a resina), 8 (Amostra 2 induzida), 9 (Amostra 2 induzida não ligada a resina), 10 (Amostra 3 não-induzida ligada a resina), 11 (Amostra 3 não-induzida e não ligada a resina), 12 (Amostra 3 induzida), 13 (Amostra 3 induzida não ligada a resina).



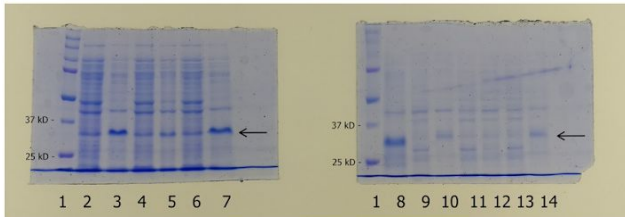
**Fig. 2** – Eletroforese em gel anterior a diálise: 1 (Padrão), 2 (Amostra 1 induzida de referência), 3 (Eluato), 4 (Lavagem), 5 (Não ligado à resina).



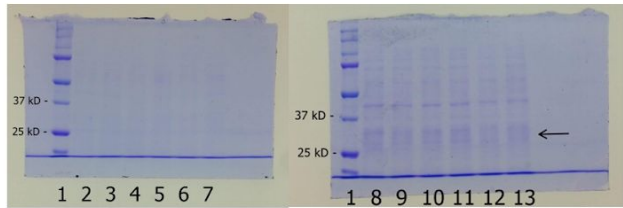
**Fig. 3** – Eletroforese em gel posterior a diálise: 1 (Padrão), 2 (Extrato), 3 (Não ligado à resina), 4 (Lavagem), 5 (Eluato).



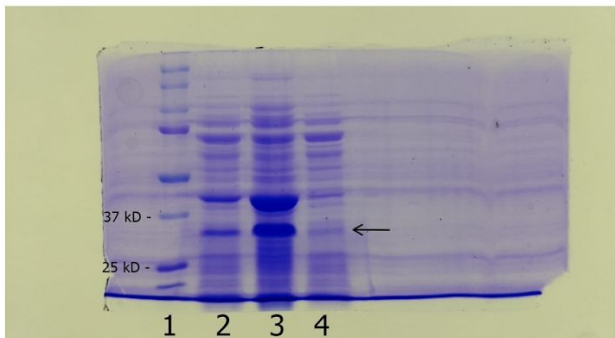
**Fig. 4** - Eletroforese em gel para teste da resina: 1 (Padrão), 2 (Amostra 1 induzida de referência), 3 (Resina), 4 (Extrato), 5 (Não ligado a resina), 6 (Lavagem), 7 (Eluato).



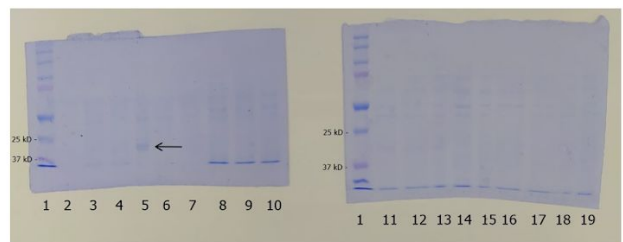
**Fig. 5** - Eletroforese em gel, no primeiro gel (esquerda) temos as amostras não ligadas à resina: 1 (padrão), 2 (Amostra 1 não induzida), 3 (Amostra 1 induzida), 4 (Amostra 2 não induzida), 5 (Amostra 2 induzida), 6 (Amostra 3 não induzida), 7 (Amostra 3 induzida); no segundo gel (direita) temos as amostras ligadas à resina: 8 (Amostra 1 induzida de referência), 9 (Amostra 1 não induzida), 10 (Amostra 1 induzida), 11 (Amostra 2 não induzida), 12 (Amostra 2 induzida), 13 (Amostra 3 não induzida), 14 (Amostra 3 induzida).



**Fig. 6** - Eletroforese em gel, no gel à esquerda temos as amostras não ligadas à resina: 1 (padrão), 2 (3 horas), 3 (4 horas), 4 (5 horas), 5 (1mM), 6 (2mM), 7 (4mM); no gel à direita temos as amostras ligadas à resina: 8 (3 horas), 9 (4 horas), 10 (5 horas), 11 (1mM), 12 (2mM), 13 (4mM).



**Fig. 7** - Eletroforese em gel: 1 (Padrão), 2 (Extrato), 3 (Ligado a resina), 4 (Não ligado à resina).



**Fig. 8** – Eletroforese em gel: 1 (Padrão), 2 (Amostra 1 ligada à resina), 3 (Amostra 2 ligada à resina), 4 (Amostra 3 ligada à resina), 5 (Amostra 2 induzida ligada à resina), 6 (Amostra 3 induzida ligada à resina), 7 (Amostra 1 induzida ligada à resina), 8 (Amostra 1 extrato), 9 (Amostra 2 extrato), 10 (Amostra 3 extrato), 11 (Amostra 1 induzida extrato), 12 (Amostra 2 induzida extrato), 13 (Amostra 3 induzida extrato), 14 (Amostra 1 não ligada à resina), 15 (Amostra 2 não ligada à resina), 16 (Amostra 3 não ligada à resina), 17 (Amostra 1 induzida não ligada à resina), 18 (Amostra 2 induzida não ligada à resina), 19 (Amostra 3 induzida não ligada a resina).

## Considerações Finais

O primeiro experimento realizado obteve o resultado esperado, no qual encontramos a MAGP-1 em maior concentração nas amostras induzidas. No entanto ao prosseguir com os testes, observamos a presença de uma proteína de maior peso molecular, indicando uma possível mutação na colônia testada. Reiniciamos os testes, utilizando novas colônias, nos quais conseguimos obter uma amostra viável com a presença da MAGP-1. Apesar dos problemas com mutações inesperadas, avançamos na purificação da MAGP-1 e esperamos poder dar prosseguimento no projeto iniciando os ensaios pull-down de MAGP-1 recombinante contra o plasma e contra extrato de plaquetas.

## Referências

1. MECHAM, Robert P.; GIBSON, Mark A.. The microfibril-associated glycoproteins (MAGPs) and the microfibrillar niche. *Matrix Biology*, [s.l.], v. 47, p.13-33, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.003>.
2. Werneck, C.C., Vicente, C.P., Weinberg, J.S., Shifren, A., Pierce, R.A., Broekelmann, T.J., Tollefsen, D.M., and Mecham, R.P. 2008. Mice lacking the extracellular matrix protein