

Palavras chave: Mioglobina-Estabilidade de Proteína-Expressão de Proteína-Purificação de Proteína-Espectroscopia.

A importância do estudo de proteínas

A compreensão do processo de enovelamento de proteínas é de grande importância para se entender os vários processos celulares, já que para uma proteína ser funcional ela deve estar enovelada corretamente. O enovelamento incorreto de uma proteína pode ocasionar uma deposição da mesma na célula na forma de agregados ou de fibrilas amilóides que tem efeito citotóxico.⁽¹⁾ Neste trabalho, reportamos a caracterização inicial de dois mutantes de Mioglobina, um múltiplo mutante denominado de D20N-H24V-D27N-R118Q-H119F (Figura-1A), este “desenhado” para remover uma rede eletrostática interna, e outro duplo mutante denominado de V10F-M131F (Figura-1B), este “desenhado” para aumentar a polaridade e hidrofobicidade de resíduos internos da estrutura da Mioglobina. O estudo de mutantes é importante para a compreensão geral do enovelamento proteico através da comparação desses mutantes com a proteína selvagem.

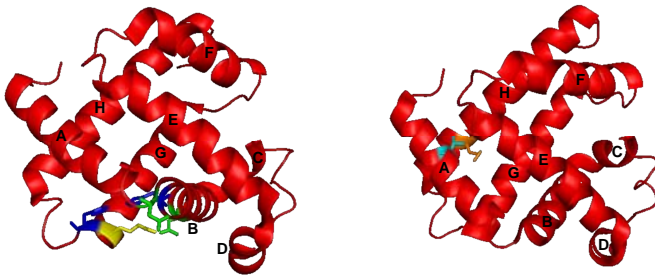


FIGURA 1. Estrutura tridimensional da mioglobina de baleia (*Physeter catodon*), proteína em hélice- α envolvida no transporte de oxigênio. Contém 8 hélices- α , nomeadas de A a H. As hélices são mostradas como “cartoons”. **A)** resíduos mutados no múltiplo mutante são mostrados como “sticks” (D20 e D27 em verde; H24 e H119 em azul; R118 em amarelo), **B)** resíduos mutados no duplo mutante são mostrados como “sticks” (V10 em ciano; M131 em laranja). A figura foi criada usando o software PyMOL (Delano Scientific LLC) e a estrutura em PDB da mioglobina (2JHO).

Resultados

Indução e Expressão do múltiplo mutante de mioglobina

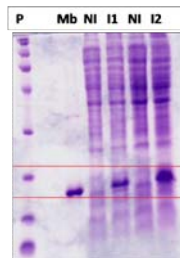


FIGURA 2. Teste de expressão e indução do múltiplo mutante – cujo cDNA foi clonado anteriormente em vetor pT7-7 por outro estudante – em *E.coli* BL21 (DE3), visualizado através de eletroforese em gel desnaturante de Poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 15%. **NI-** alíquota retirada antes da indução, **I1-** após 1 h de indução e **I2-** após 2 h de indução com 0,4 mM de IPTG, **Mb-** padrão de mioglobina.

Foi observado uma diferença na corrida eletroforética entre o padrão de mioglobina e o mutante expresso. Para a identificar das razões de tal diferença outros testes foram realizados para verificar possíveis problemas no gel ou com o padrão de mioglobina utilizado.

Após o teste de indução, foi realizado uma expressão em larga escala (1 L) e purificação conforme descrito em Ribeiro e col. (2003).⁽²⁾

Purificação do múltiplo mutante da mioglobina

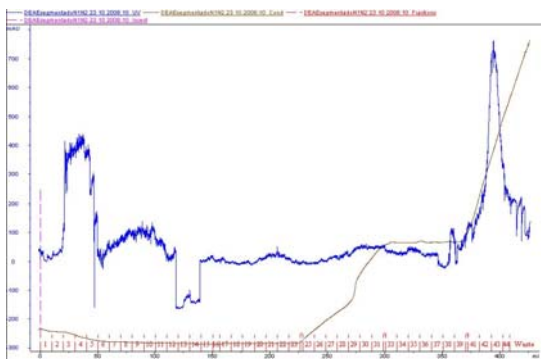


FIGURA 3. Perfil cromatográfico da purificação do múltiplo mutante da mioglobina de baleia por troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose Fast Flow. O tampão de corrida utilizado foi Fosfato de sódio 50 mM, pH 7.2. (—) absorbância em 280, (5) fração eluída coletada. O múltiplo mutante foi eluído nas frações de 7-11 (visualizados por SDS-PAGE, dados não mostrados).

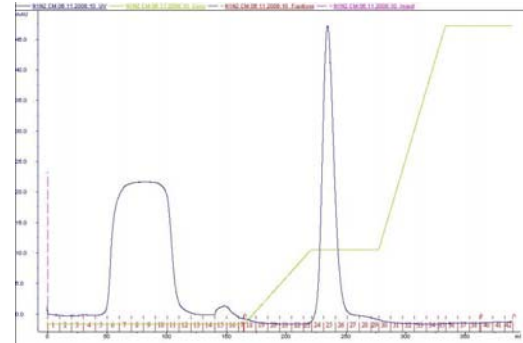


FIGURA 4. Perfil cromatográfico da purificação do múltiplo mutante por troca catiônica em coluna CM-Sepharose Fast Flow. O tampão de corrida utilizado foi Acetato de sódio 10 mM, pH 2. (—) absorbância em 280, (5) fração eluída coletada. O múltiplo mutante foi eluído nas frações de 24-26 (visualizados por SDS-PAGE, Figura 5).

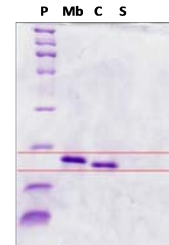


FIGURA 5. SDS-PAGE 15% do concentrado das frações 24-26 (Figura 4). **P-** padrão de massa molecular, **Mb-** padrão de Mioglobina de cavalo, **C-** amostra concentrada e **S-** filtrado do concentrado

Observa-se uma diferença de massa molecular entre **Mb** e **C** (Figura 5), diferença observada em razão do uso de um padrão de mioglobina que era de cavalo e não de baleia. O processo de indução e expressão do múltiplo mutante foi feito novamente, porém não foi possível obter esse mutante novamente, para tanto, em razão da não obtenção do mutante, foi realizado uma Mini-preparação de DNA plasmidial para análise sequencial, ao mesmo tempo, passou-se para o estudo do mutante V10F-M131F.

O duplo mutante V10F-M131F foi expresso e purificado nas mesmas condições descritas para o múltiplo mutante, sendo obtido com alta pureza (dados não mostrados).

Aqui reporta-se o estudo inicial da estabilidade do mutante V10F-M131F submetido a um desenovelamento induzido por uréia em pH 7,8 para efeito comparativo com a proteína selvagem já reportada na literatura científica.⁽³⁾

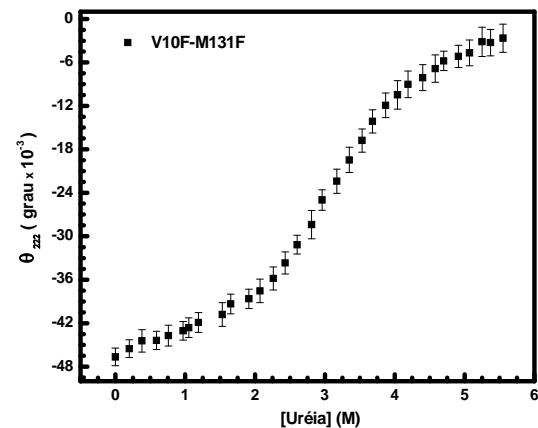


Figura 6. Dicroísmo circular em 222 nm do desenovelamento de V10F-M131F induzido por uréia em tampão Hepes 10 mM, pH 7,8 a 4°C, caminho óptico de 1 cm em cubeta de quartzo. Pode-se observar que o valor de Cm (concentração de desnaturante na metade da transição) para o mutante V10F-M131F é de 3,1 M, menor quando comparado ao da proteína selvagem (3,4 M – dados da literatura⁽³⁾), e portanto menos estável que a forma selvagem. Os pontos são a média \pm SD referentes a 61 leituras.

Conclusões

- As mutações foram realizadas e as proteínas recombinantes foram expressas.
- O duplo mutante V10F-M131F foi purificado e testes de dicroísmo circular mostram que está enovelado.
- A dupla mutação V10F-M131F desestabiliza a proteína em pH7,8.
- Próximos passos: purificação e caracterização do múltiplo mutante; estudos da estabilidade do duplo mutante em pHs ácidos.

Referências

- (1) Ramos, C.H.I.; Ferreira, S.T. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases, 2005, *Protein Pept. Lett.* 12, 213-222.
- (2) Ribeiro, E.A.; Regis, W.C.B.; Tasic, L.; Ramos, C.H.I. Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin, 2003, *Protein Expr. Purif.* 28, 202-208.
- (3) Regis, W.C.B.; Fattori, J.; Santoro, M.M.; Jamin, M.; Ramos, C.H.I. On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins, 2005, *Arch. Biochem. Biophys.* 436, 168-177.