



Expressão e purificação do domínio catalítico da Quinase de Abelson (Abl) para estudos biofísicos com potenciais inibidores

Philippe O. Fernandes (PG)^{1*}, Diego M. Martins (PG)², Mozart S. Pereira (PQ)², Adolfo H. Moraes (PQ)²

¹ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

² Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

*philipe.of@gmail.com

RESUMO

A quinase Abl é um alvo terapêutico relevante na leucemia mieloide crônica (LMC), mas sua expressão recombinante é dificultada por toxicidade e baixa solubilidade. Este trabalho desenvolveu uma estratégia de expressão do domínio catalítico da Abl em *Escherichia coli*, utilizando *tag* de solubilidade MBP e coexpressão com a fosfatase YopH. A purificação envolveu duas etapas de cromatografia por afinidade e uma etapa de cromatografia de exclusão por tamanho. A proteína foi obtida de forma solúvel e pura, com rendimentos satisfatórios em meio LB e mínimo. Análises por RMN confirmaram o seu enovelamento, e ensaios funcionais demonstraram atividade catalítica. Os resultados comprovam a eficácia da abordagem adotada, fornecendo uma enzima funcional adequada para estudos biofísicos e interação com inibidores, com potencial contribuição para o desenvolvimento de terapias direcionadas à LMC.

Palavras-chave: Abl quinase, domínio catalítico, expressão de proteínas, purificação de proteínas

Introdução

A proteína quinase de Abelson (Abl) é uma tirosina quinase não receptora envolvida em processos celulares essenciais como reparo de danos ao DNA, regulação do citoesqueleto, diferenciação celular, apoptose e proliferação. Contudo, mutações que levam à sua ativação constitutiva — como observado na formação da oncoproteína Bcr-Abl, característica da leucemia mieloide crônica (LMC) — conferem à enzima uma atividade quinase aberrante, resultando em transformação celular maligna [1]. Frente à sua relevância, a Abl tornou-se um destacado alvo molecular, com diversos inibidores sendo desenvolvidos nas últimas décadas. O estudo dos mecanismos de interação entre inibidores e a quinase requer a obtenção da enzima em sua forma solúvel, ativa e com alto grau de pureza — uma etapa que representa um desafio técnico considerável, dado o perfil de instabilidade, toxicidade e tendência à formação de agregados ou corpos de inclusão observados em quinases recombinantes expressas em *Escherichia coli* [2,3]. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a otimização de uma estratégia de expressão e purificação do domínio catalítico da Abl quinase, utilizando tanto meio rico (LB) quanto meio mínimo, visando à obtenção de material proteico viável para experimentos biofísicos futuros.

Experimental

A abordagem experimental baseou-se na construção de um vetor de expressão contendo o domínio catalítico da Abl quinase fusionado à *maltose-binding protein* (MBP), com um sítio de clivagem reconhecido pela protease TEV, permitindo a remoção do *tag* de solubilidade após a purificação inicial.

Visando mitigar a toxicidade associada à atividade quinase durante a expressão em *E. coli*, realizou-se a coexpressão com a fosfatase bacteriana YopH, conforme relatado na literatura [3].

A indução da expressão foi realizada com IPTG, sendo testadas condições em meio LB e em meio mínimo. A purificação foi realizada por três etapas cromatográficas: (i) cromatografia de afinidade a níquel, visando a captura da proteína *His-tagged*; (ii) clivagem com protease TEV, seguida por uma segunda cromatografia de afinidade para remoção da MBP e da protease; e (iii) cromatografia de exclusão por tamanho, empregada como etapa polidora. A pureza e identidade da proteína foram avaliadas por SDS-PAGE.

A integridade conformacional da proteína foi verificada por espectroscopia de RMN de 1D de hidrogênio, enquanto a atividade catalítica foi avaliada por ensaio enzimático com um peptídeo modelo (peptídeo KKDAEYAAP), monitorando-se a fosforilação via análise espectroscópica de RMN 1D de ³¹P.

Resultados e Discussão

A estratégia adotada permitiu a obtenção da Abl quinase de forma solúvel, com expressiva presença da proteína MBP-Abl no *pelet* e no sobrenadante após a lise celular (Figura 1, canaleta 2). A primeira etapa de cromatografia por afinidade à Níquel resultou na retenção eficiente da proteína na matriz cromatográfica (Figura 1, canaleta 5). A subsequente clivagem com a TEV promoveu a separação efetiva entre a MBP e a Abl, conforme evidenciado pelas bandas distintas de aproximadamente 45 kDa (MBP) e 33 kDa (Abl) no SDS-PAGE (Figura 1, canaleta 7).



Na segunda etapa de cromatografia por afinidade à Níquel as proteínas com cauda histidina (MBP e TEV) ficaram aderidas à matriz de níquel, enquanto a Abl foi recuperada no fluxo não retido (Figura 1, canaletas 8, 9 e 10). A etapa final de exclusão por tamanho eliminou contaminantes residuais, resultando em uma proteína com alto grau de pureza.

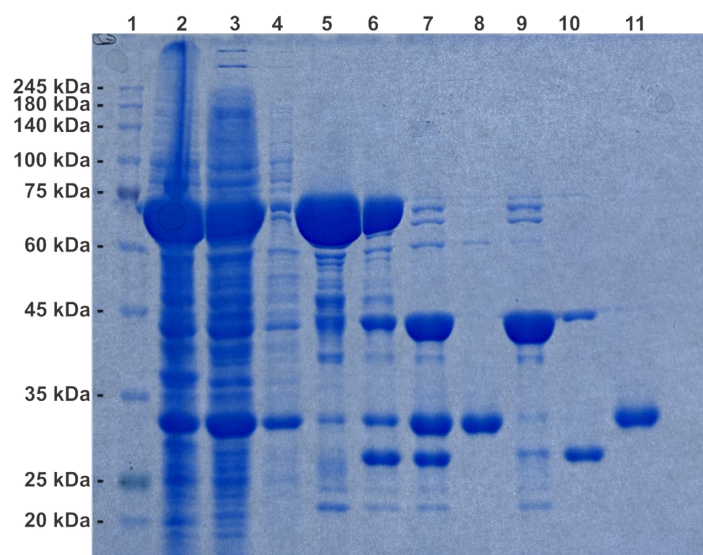


Figura 1. Perfil eletroforético da purificação do domínio catalítico da Abl quinase de. Canaletas: 1: Padrão de peso molecular; 2: *Pelet*; 3: Lisado; 4: *Flow through* níquel primeira etapa; 5: Fração retida na níquel primeira etapa; 6: Fração retida na níquel primeira etapa encubada com a TEV após 5 minutos; 7: Fração retida na níquel primeira etapa encubada com a TEV após 16 horas; 8: *Flow through* níquel segunda etapa (Abl); 9: Primeiro pico eluído na níquel segunda etapa; 10: Segundo pico eluído na níquel segunda etapa; 11: Abl após a cromatografia de exclusão por tamanho (superdex).

Os rendimentos obtidos foram de 3,2 mg/L para a expressão em meio LB e 1,0 mg/L para o meio mínimo. A análise por RMN 1D de ^1H revelou dispersão química característica de proteínas enoveladas, com sinais bem definidos na região de 7–10 ppm, correspondentes a hidrogênios amídicos, além de sinais abaixo de 0 ppm indicativos de grupos metila em ambientes hidrofóbicos protegidos.

No ensaio de atividade, a proteína demonstrou atividade catalítica funcional, com detecção do produto fosforilado em 0 ppm, confirmando a capacidade da enzima purificada de transferir grupos fosforila ao substrato (Figura 2).

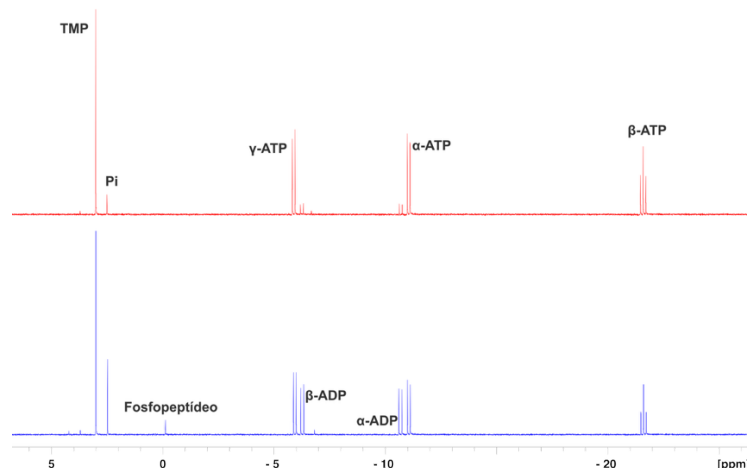


Figura 2. Espectros de RMN de ^{31}P de ensaio de fosforilação do peptídeo utilizando a enzima quinase Abl. Acima, controle negativo contendo apenas ATP em tampão Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), 2,5 mM MgCl_2 , 2% DMSO. Em baixo, reação com o peptídeo KKDAEYAAP 200 μM e quinase Abl 1,27 μM , mostrando o aparecimento de um novo sinal de ^{31}P consistente com fosforilação de tirosina. Todas as reações foram incubadas por 2 horas a 25 °C e interrompidas com uma solução de parada contendo EDTA antes da aquisição por RMN.

Conclusões

Os resultados obtidos demonstram o sucesso da estratégia de coexpressão com fosfatase e fusão à MBP na superação dos principais obstáculos relacionados à toxicidade, agregação e baixa solubilidade da Abl quinase recombinante.

A enzima foi purificada em alta pureza, mostrou-se solúvel, enovelada e cataliticamente ativa, sendo adequada para aplicações em ensaios biofísicos. Esses dados preliminares estabelecem uma base sólida para os próximos estudos, que deverão incluir investigações de interação com inibidores alostéricos ou competitivos, caracterização termodinâmica, determinação de parâmetros cinéticos e estudos estruturais por RMN ou outras técnicas.

Dessa forma, o presente trabalho contribui diretamente para o avanço do entendimento mecanístico da interação fármaco-proteína, com potencial impacto no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da LMC.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Referências

1. Martins et al. *Chem Bio Chem.* **2024**, 25 (23), e202400296.
2. Albanese et al. *Biochemistry.* **2018**, 57(31), 4675
3. Seeliger et al. *Protein Sci.* **2005**, 14(12), 3135