

AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DE TRIM21 HUMANA¹

Luísa Fontes Giachini², Laura S Cordeiro², Maria de Lourdes Borba Magalhães³, Anelize Felício Ramos⁴,
Leonardo Antônio Fernandes⁴

¹ Vinculado ao projeto “Otimização da expressão de TRIM21 humana”

² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PIVIC/UDESC

³ Orientadora, Departamento de Produção Animal e alimentos – CAV – maria.magalhaes@udesc.br

⁴ Alunos do programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – CAV

A TRIM21 é uma proteína intracelular a qual possui propriedades que permitem sua ligação em imunoglobulinas do tipo G através do reconhecimento da porção Fc dessas glicoproteínas por meio do domínio PRYSPRY. Essa propriedade de reconhecimento de IgGs permitiu que o grupo de pesquisa do laboratório de biologia e bioquímica molecular do CAV/UDESC validasse e patenteasse a proteína quimérica TRIMSA, que consiste na junção do domínio PRYSPRY e da estreptavidina, como uma ferramenta de purificação de anticorpos em testes de imunodiagnóstico do tipo ELISA. Entretanto, apesar da validação da proteína quimérica como reagente nesses imunoenaios, para sua viabilização é necessária sua produção em quantidades significativas. Com esse objetivo, o projeto consistiu na inserção, apenas, do domínio PRYSPRY da TRIM21 humana em um plasmídeo, com a intenção de obter o domínio responsável pela identificação dos anticorpos na fração solúvel e aumentar, assim, a expressão da proteína visando uma futura produção em grande escala. Primeiramente, para a obtenção da proteína na fração solúvel, com o intuito de favorecer sua aplicabilidade, o vetor recombinante de expressão da TRIM21PRYSPRY no plasmídeo pET-30a (+) precisou passar pela transformação em *Escherichia coli* Rosetta-gami2 (DE3). A utilização dessa cepa de *E. coli* se deu devido aos recursos OrigamiTM e RosettaTM da bactéria, os quais aumentam a expressão de proteínas que contêm códons raros sob o controle de seu promotor nativo e facilitam a formação de pontes dissulfeto citoplasmáticas. Dessa maneira, foi possível avaliar aquele que se apresentaria como um meio de cultura, um tempo de indução, quantidade de isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG), tempo de incubação pós-indução e temperatura de indução ideais para um maior rendimento, condições as quais foram analisadas separadamente para ser avaliado o padrão de expressão mais eficaz em cada caso. Portanto, para iniciar o processo de avaliação da proteína TRIM21 nas diferentes condições, foi necessário a produção de células Rosetta-gami eletrocompetentes. Para isso essas células foram semeadas por esgotamento em placas LB ágar com Ampicilina, placa controle, e outra com Kanamicina + Clorofenicol. Após o crescimento das colônias, foi feito o pré-inoculo em meio BHI líquido, que, ao crescer overnight, foi inoculado, em meio LB com glicose 20% e cloreto de magnésio 1M filtrados. Ao atingir a OD ideal os meios passaram por seis lavagens e centrifugações, uma vez que, as quatro primeiras foram realizadas com água e as duas seguintes com glicerol 10%. Por fim, as alíquotas foram ressuspensas em glicerol 10% e congeladas em nitrogênio líquido para utilização no decorrer do projeto. A partir da produção das células eletrocompetentes foi iniciado o processo de transformação do vetor recombinante, juntamente com o plasmídeo, na célula de *E. coli*. Então, para a análise primária da eficácia na expressão da proteína no meio LB, foi adicionado a diluição do plasmídeo às células Rosetta-gami para a eletroporação, conteúdo que,

posteriormente, foi ressuspensionado em meio SOC, incubado pelo período de uma hora e plaqueado em meio LB ágar com Kanamicina, antibiótico do plasmídeo, e Clorofenicol, antibiótico da célula, as quais ficaram a 37 °C overnight, juntamente com as placas de controle. Finalmente, essas colônias foram induzidas para crescimento em diferentes temperaturas e diferentes concentrações de IPTG, assim, foram coletadas amostras em horários crescentes, as quais foram ressuspensionadas, sonicadas e, através da centrifugação, separadas em fração solúvel e insolúvel para que, por meio do SDS-page em gel de 12%, fosse possível visualizar em quais das porções a proteína TRIM21 se encontrava, já que ela apresenta uma massa esperada de 20kDa. Para análise das condições específicas foram testadas, também, diferentes temperaturas de indução das amostras, mudanças na concentração de IPTG e nos diferentes tempos de indução, no entanto, por fim, o domínio PRYSPRY da TRIM21 humana foi expresso predominantemente na fração insolúvel em todos os cenários avaliados (Figura 1). O procedimento acima mencionado foi repetido utilizando agora a cepa *E. coli* Artic Express (DE3), pois essas células foram desenvolvidas com intuito de aumentar a solubilidade de proteínas e é famigerada pelo seu alto desempenho na expressão de proteínas heterólogas. Porém, sua expressão nas temperaturas recomendadas pelo fabricante, 10-13 °C, também apresentou insucesso na tentativa de obter proteínas na fração solúvel. Tornou-se evidente, portanto, que as condições avaliadas expressaram o domínio PRYSPRY majoritariamente na fração insolúvel e não foi possível estabelecer uma condição adequada para a expressão da proteína solúvel. Em desvantagem, esses polipeptídeos na fração obtida precisam de tratamentos adicionais para o reestabelecimento da sua forma bioativa, diferentemente da solúvel, desenvolvendo o processo de formação dos corpos de inclusão, considerados como uma etapa de purificação natural dessas proteínas. Dessa maneira, nas perspectivas de estudo do grupo de pesquisa, a otimização do processo de obtenção de proteínas a partir dos corpos de inclusão, podem ser mais vantajosas que a escolha de outras condições de expressão e indução para obter a proteína na fração, inicialmente, desejada.

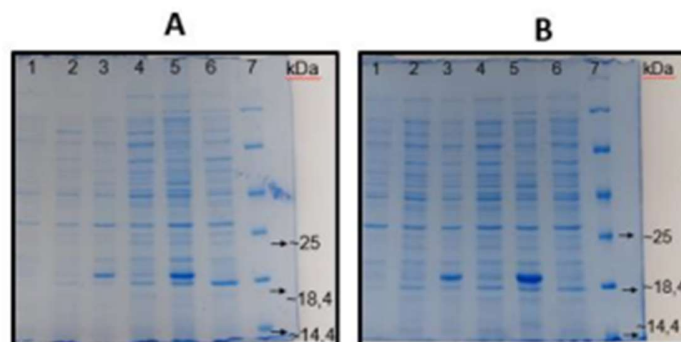


Figura 1: SDS-PAGE das frações provenientes da expressão em Rosetta-gami nas condições temperatura e indutor de: A- 37°C com 0,1mM de IPTG; B- 37°C com 0,05mM de IPTG. 1- fração insolúvel antes da indução, 2- fração solúvel antes da indução, 3- fração insolúvel após 6h de indução, 4- fração solúvel 6h de indução, 5- fração insolúvel após 20h de indução, 6- fração solúvel, após 20h de indução, 7-marcador de peso molecular BLUeye Prestained Protein Ladder (94964-Sigma).

Palavras-chave: Proteínas solúveis. Rosetta-gami. Padrão de expressão proteico.