

PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS PEPTÍDEOS LIGANTES A PROTEÍNA SPIKE DE SARS-COV2¹

Sarha Xavier², Maria de Lurdes Borba Magalhães³, Leonardo Antônio Fernandes⁴ e Anderson Albino Gomes⁵

¹ Vinculado ao projeto “Desenvolvimento de peptídeos de ligação à proteína Spike de Sars-CoV2 para diagnóstico de COVID 19”

² Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PIBITI/CNPq

³ Orientador, Departamento de Produção Animal e de Alimentos – CAV – maria.magalhaes@udesc.com.br

⁴ Mestre em Bioquímica e biologia molecular – CAV

⁵ Doutorando em Bioquímica e biologia molecular – CAV

A principal via de entrada do vírus SARS-CoV-2 é por meio da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2). O vírus possui uma glicoproteína chamada proteína Spike (S) ancorada no seu exterior com domínios de ligação ao receptor de superfície (RBD, do inglês receptor-binding domain). Essas duas estruturas são críticas para a entrada do vírus na célula humana. E são os principais alvos para criação de estratégias tanto para criação de tratamentos quanto de diagnósticos. Estudos estruturais demonstraram que as interações com a proteína S de SARS-CoV-2 com, mais precisamente com o domínio RBD estão relacionados principalmente a α -hélice 1 da região amino-terminal (N-terminal) da ACE2. Essa informação foi utilizada para criação de peptídeos α -helicoidais pelo nosso grupo de pesquisa, que poderiam imitar a ACE2 e se ligar à proteína S. Nosso projeto de pesquisa desenvolveu uma proteína quimérica usando arcabouço de defensina contendo uma α -hélice mimetizando a ACE2 tendo muito mais estabilidade e conformação mais estável. Foi selecionado os principais resíduos localizados na α -hélice 1 de ACE2, que está em contato com o RBD, e foi introduzido na α -hélice de um inibidor de protease humana do tipo-defensina para investigar a capacidade desse peptídeo projetado de se ligar ao RBD da proteína S do SARS-CoV-2.

Transformação, expressão e purificação

Os plasmídeos comerciais das proteínas recombinantes foram transformados por eletroporação em células *Escherichia coli* pLysS (DE3). Assim, foram semeados em placas de LB ágar contendo 100 μ g/mL de ampicilina e 37,5 μ g/mL de cloranfenicol, e as colônias isoladas foram inoculadas em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos e cultivadas durante a noite a 37 °C até atingir a DO a 600 nm comprimento de onda de 0,6 absorbâncias. As células foram induzidas com IPTG 0,1 mM e incubadas a 37 °C por 7 h. Para a purificação, todos os procedimentos foram realizados a 4 °C. As células foram suspensas em 20 mL de 50 mM Tris-HCl, pH 8,0: 500 mM NaCl (Tampão A) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e lisozima (10 mg/mL). As células foram rompidas por sonicação em gelo por 30 min. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi aplicado a uma coluna Ni-NTA Sepharose pré-equilibrada com Tampão A. As proteínas fracamente ligadas foram removidas por lavagem com tampão B (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; 500 mM NaCl; 60 mM imidazol) e as proteínas foram eluídas em tampão C (500 mM NaCl, 500 mM Imidazole; 50 mM Tris-HCl ,

pH 8,0). O eluído foi dialisado contra PBS pH 7,2 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline SIGMA), misturado a 50% de glicerol e armazenado a -20°C. SDS-PAGE determinou a pureza.

Concentração de proteínas

A quantificação de proteínas seguiu o método de absorção a 280 nm no equipamento de espectrofotometria NanoDrop® 2000 (Thermo-Scientific). Com base nas equações de Lambert-Beer, através do coeficiente de extinção molar prévio, foi obtido a concentração de proteínas.

Essa nova abordagem relatada nesse trabalho, permitiu o design de um ligante de α -hélice rígida para SARS-CoV-2 estabilizado por um arcabouço do tipo-defensina que é um candidato promissor para diagnóstico de COVID-19 e neutralização viral. A proteína foi altamente expressa na fração solúvel células de *E. coli*, o que facilita sua purificação e futura utilização.

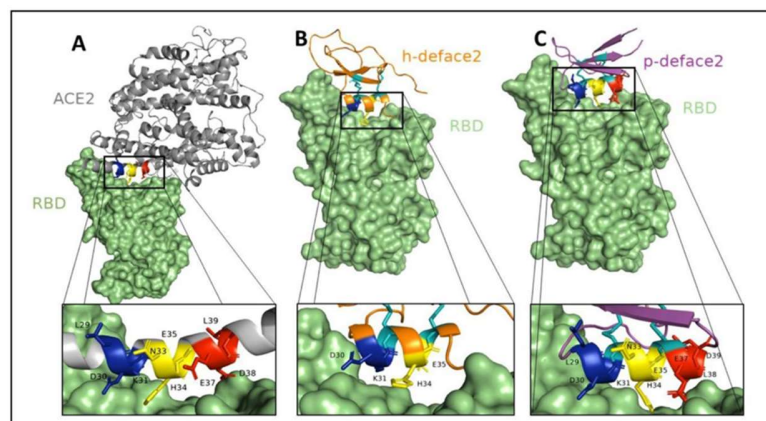


Figura 1 - Diagrama esquemático de peptidomiméticos baseados em Defensina ACE2

A: Estrutura tridimensional do complexo SARS CoV2 RBD/ACE2 destacando as interações entre a hélice 1 e o Spike RBD. B: Modelo hipotético de h-deface2 e complexo RBD. C: Modelo hipotético de p-deface2 e complexo RBD.

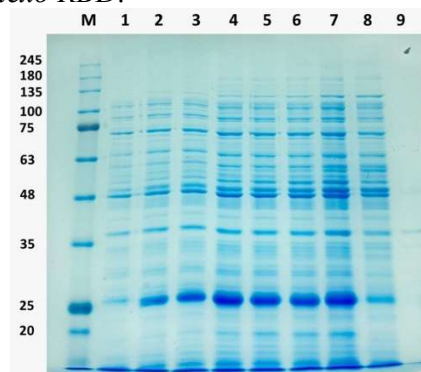


Figura 2. Expressão da proteína mimética em diferentes horários: [M] marcador, [1] 0 horas, [2] 1 hora, [3] 2 horas, [4] 3 horas, [5] 4 horas, [6] 5 horas, [7] 6 horas, [8] 7 horas e [9] purificado (única amostra com a fração insolúvel).

Palavras-chave: Expressão. proteica. Proteína Spike. COVID 19.