

Renaturação do Gene XAC 3272 de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* utilizando Altas Pressões Hidrostáticas

Gleyce de Lima Pinto e Ligia Ely Morganti Ferreira Dias
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

As bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) são as hospedeiras mais utilizadas para produzir proteínas recombinantes, principalmente pela possibilidade de produção de proteínas em grande escala, geralmente resultando no acúmulo de depósitos de proteínas insolúveis e inativas, denominadas de corpos de inclusão (CIs) [1, 2]. A agregação das proteínas como CI é um problema para a biotecnologia, pois dificulta processos de renaturação na obtenção de muitas proteínas de interesse. A utilização da alta pressão hidrostática tem se mostrado muito eficiente na desagregação e renaturação de CIs, possibilitando a obtenção de proteínas solúveis e bioativas [3]. Foram utilizados os Cis da proteína produto do gene XAC3272 de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, uma bactéria causadora do cancro cítrico em uma variedade de hospedeiros, de interesse econômico, como laranjas.

OBJETIVO

Estudar o processo de renaturação da proteína de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* – gene XAC 3272, produzida como CIs em *E. coli*, utilizando altas pressões hidrostáticas.

METODOLOGIA

Foi realizada a expressão da proteína produto do gene XAC3272 e os CIs foram lavados utilizando-se metodologia previamente descrita [3].

Com a finalidade de obtenção de renaturação da proteína, amostras de suspensões de CIs foram submetidas a 2,4 kbar (16 horas), seguido de descompressão para pressão atmosférica, com adição de diferentes aditivos no tampão de renaturação. Após a seleção do melhor aditivo na renaturação sob pressão, diferentes métodos de compressão e descompressão foram testados utilizando suspensões dos CIs da proteína, com o objetivo de proporcionar níveis ideais de pressão para favorecer a renaturação da proteína.

Os sobrenadantes das amostras submetidas à pressão foram dialisados e congelados para posterior análise em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

RESULTADOS

Utilizando diferentes métodos de compressão e descompressão, a pressão que se mostrou ótima para a dissociação dos CIs de XAC3272 é 2,4 kbar (1,5 hora), porém a renaturação da proteína acontece em 0,8 kbar (16 horas) e descompressão até a pressão atmosférica, obtendo 75% de rendimento de renaturação (Figura 1).

Como podemos visualizar na Figura 2, a renaturação do produto do gene XAC3272 a partir de CIs submetidos à alta pressão foi de 9% na ausência de aditivos. O aminoácido L-Arginina foi o mais efetivo entre os aditivos testados, elevando o rendimento de renaturação para 98%.

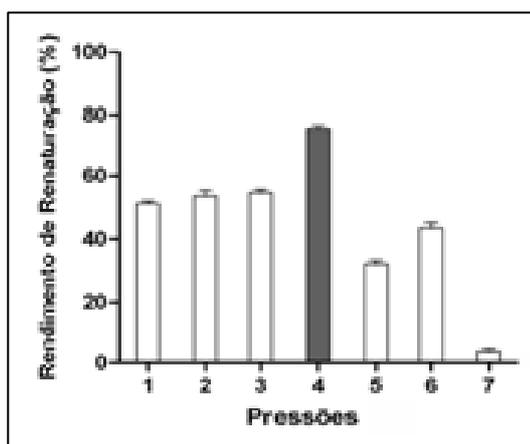


Figura 1. Rendimento de solubilização de amostras solúveis de corpos de inclusão da proteína do gene XAC3272 submetidos a diferentes esquemas de compressão e descompressão. **1.** 2,4 kbar (1,5 h) – descomp. direta para pressão atm (16 h); **2.** 2,4 kbar (16 h) – descomp. direta para pressão atm; **3.** 2,4 kbar (1,5 h) – descomp. em degraus até pressão atm (16 h); **4, 5 e 6.** 2,4 kbar (1,5 h) – descomp. direta para 0,8, 0,4 e 0,2 kbar respectivamente (16 h) – descompressão para pressão atm; barra **7.** Incubação em pressão atmosférica. One-way ANOVA, $p < 0,005$.

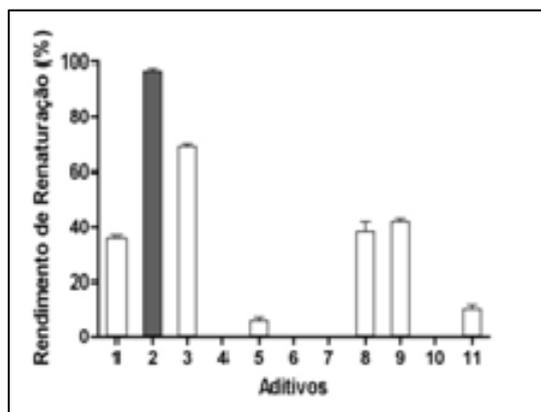


Figura 2. Rendimento de renaturação de amostras solúveis de CIs submetidos à pressão de 2,4 kbar para a seleção de diferentes aditivos. **1.** NaCl; **2.** L-Arginina sem GdnHCl; **3.** L-Arginina com GdnHCl; **4.** Glicose; **5.** Sacarose; **6.** Peg; **7.** Glicerol; **8.** Tween; **9.** Triton; **10.** Bis-ANS e **11.** Ausência de aditivo. One-way ANOVA, $p < 0,005$.

CONCLUSÕES

Pela primeira vez foi obtida a renaturação da proteína produto do gene XAC3272. A associação da aplicação de alta pressão, com otimização de esquemas de descompressão, e presença de L-Arginina foi efetiva para a renaturação da proteína, com rendimento de 98% a partir de suspensões de CIs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lefebvre, B. G., M. J. Gage, et al. "Maximizing recovery of native protein from aggregates by optimizing pressure treatment." **20**(2): 623-9, 2004;
- [2] Baneyx, F. and M. Mujacic. "Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli." **22**(11): 1399-408, 2004;
- [3] Malavasi, N. V., D. Foguel, et al. "Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model." **46**(2): 512-518, 2011.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq