

Renaturação do Gene XAC 2810 de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* utilizando Altas Pressões Hidrostáticas

Fabiana Mourão dos Santos e Ligia Ely Morganti Ferreira Dias
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A produção de polipéptidos recombinantes em hospedeiros procarióticos muitas vezes resulta em incompletos processos de renaturação, com o acúmulo de agregados insolúveis no citoplasma, conhecidos como corpos de inclusão (CIs) [1]. A alta pressão hidrostática tem sido utilizada como uma ferramenta para a dissociação e renaturação destes agregados, sem a necessidade de desnaturar as estruturas nativas nos CIs, possibilitando o aumento de rendimentos de renaturação de proteínas com conformação nativa e atividade biológica [2]. Foi utilizada a proteína produto do gene XAC2810 de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, uma bactéria causadora do cancro cítrico em uma variedade de hospedeiros.

OBJETIVO

Estudar o processo de renaturação da proteína insolúvel de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* – gene XAC2810, utilizando altas pressões hidrostáticas.].

METODOLOGIA

A expressão da proteína produto do gene XAC2810 foi realizada em diferentes temperaturas. Os CIs foram lavados utilizando-se metodologia previamente descrita [3].

A solubilidade dos CIs produzidos em diferentes temperaturas foi testada pelo efeito solubilizante de Hidrocloro de Guanidina (GdnHCl).

Com a finalidade de obtenção de renaturação da proteína, amostras de CIs foram submetidas a 2,4 kbar (16 horas), seguido de decompressão para pressão atmosférica, na presença de diferentes aditivos no tampão de renaturação.

Os sobrenadantes das amostras foram dialisados e foram congelados para posterior análise em eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE).

RESULTADOS

A curva de solubilização dos CIs com GdnHCl (figura 1) mostra que os CIs produzidos à 20°C foram mais facilmente solubilizados (ponto médio: 1,5 M de Gdn HCl), do que os CIs produzidos à 37°C (ponto médio: 2,5 M de Gdn HCl). Tendo em vista que a expressão de CIs produzidos em baixas temperaturas produz agregados mais facilmente solubilizáveis, optamos pela expressão desta proteína na menor temperatura testada.

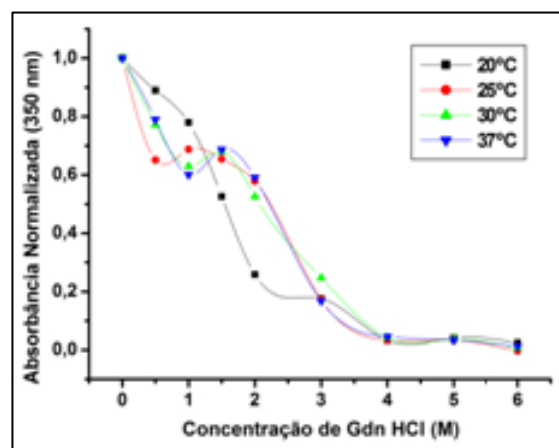


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de GdnHCl na dissociação de CIs produzidos em diferentes temperaturas de cultivo.

Foi obtido um rendimento de renaturação de 10% da proteína quando a suspensão de CIs foi submetida à alta pressão (2,4 kbar) durante 16 horas na ausência de aditivos. No entanto, o rendimento de renaturação da proteína subiu para 62% quando a suspensão de CIs foi pressurizada na presença de 0,5 M do aminoácido L-Arginina (Figura 2).

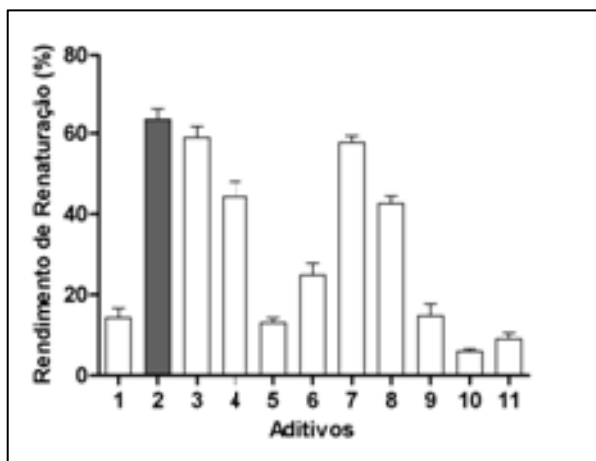


Figura 2. Rendimento de solubilização de amostras solúveis de CIs submetidos à pressão de 2,4 kbar para a seleção de diferentes aditivos. 1. NaCl; 2. L-Arginina sem GdnHCl; 3. L-Arginina com GdnHCl; 4. Glicose; 5. Sacarose; 6. Peg; 7. Glicerol; 8. Tween; 9. Triton; 10. Bis-ANS e 11. Ausência de aditivo.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

CONCLUSÕES

Utilizando corpos de inclusão do gene XAC2810 de *Xanthomonas axonopodis* pv citri, obtivemos 62% de rendimento de renaturação desta proteína pela utilização de altas pressões hidrostáticas na presença do aminoácido L-Arginina no tampão de renaturação. Pelo que é de nosso conhecimento a renaturação desta proteína não foi anteriormente obtida por outros grupos de estudo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Baneyx, F. and M. Mujacic. "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." **22**(11): 1399-408, 2004;
- [2] Lefebvre, B. G., M. J. Gage, et al. "Maximizing recovery of native protein from aggregates by optimizing pressure treatment." **20**(2): 623-9, 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