

ESTUDO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA TMPRSS2 EM SISTEMA BACTERIANO

Gabrielli Perez Pedro¹

Sergio Daishi Sasaki²

Fábio Thimoteo de Mendonça³

Jhonny Frank Sousa Joca⁴

Maria do Socorro Sousa Silva⁵

Resumo: A COVID-19 — do inglês “*Coronavirus Disease 2019*” — foi inicialmente identificada em dezembro de 2019, na china. Posteriormente, em março de 2020, foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Sob esse viés, a doença é causada pelo agente etiológico “SARS-CoV-2”, cujo principal mecanismo de entrada se faz possível com o pela ação de uma enzima presente na membrana das células, a Serino Protease Transmembranar 2 (TMPRSS2). Essa enzima é responsável por hidrolisar resíduos de arginina da proteína S, cuja função tem relação com o processo de adsorção do ciclo viral, permitindo que ocorra uma ligação com a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), gerando um endossomo que transportará o RNA viral até a célula infectada. Portanto, é evidente que o estudo dos agentes envolvidos com o processo de infecção da Covid-19 é essencial na tentativa de selecionar moléculas com potencial terapêutico contra a infecção por Sars-CoV-2. Por isso, a expressão da TMPRSS2 — realizada em bactérias *BL21(DE3)* — foi efetuada com sucesso e, além disso, foi estabelecido um protocolo econômico e coerente de quantificação de enzimas utilizando a proteína do leite, a Caseína.

Palavras-Chave: TMPRSS2, COVID-19, proteína recombinante, serinoproteases.

¹Aluna do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio – perezgabrielli@hotmail.com

²Professor Orientador da Iniciação Científica na UFABC – sergio.sasaki@ufabc.edu.br

³Co-orientador UFABC – fabiothimoteo@hotmail.com

⁴Professor do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio – jhonny.joca@etec.sp.gov.br

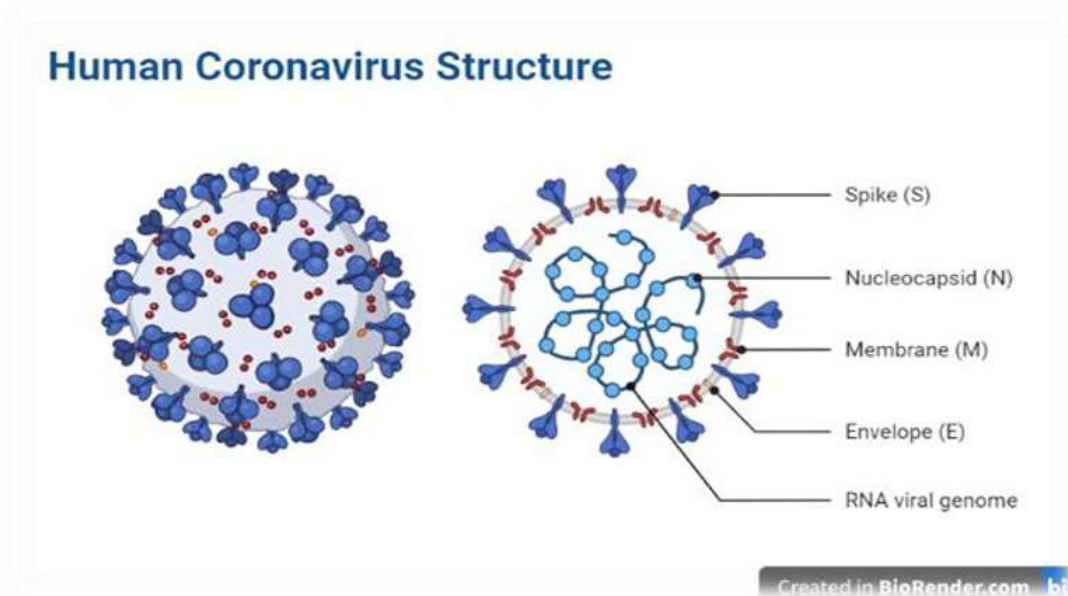
⁵Professora do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio – maria.silva2473@etec.sp.gov.br

1 INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas cujas principais funções envolvem a degradação de proteínas, elas fazem isso por meio da quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos que compõem o seu substrato, realizando, assim, a clivagem da proteína (Barrett; Rawlings, 2007). Dentre esse grupo, existem as serinoproteases, isto é, proteases que possuem um resíduo de serina em seu sítio ativo, catalisando, da mesma forma, a quebra da ligação peptídica entre aminoácidos (Rao et al., 1998).

A COVID-19 é uma síndrome respiratória aguda causada pelo agente SARS-CoV-2, um vírus de alta transmissibilidade e potencial risco, tendo como principal via de contaminação a respiratória, ocorrendo geralmente por gotículas de saliva, que são aspiradas pelo hospedeiro. O beta coronavírus SARS-CoV-2 pertence à família Coronaviridae, e sua estrutura é composta por: (S) proteína *Spike* — dividida em duas subunidades funcionais, S1 e S2 —, (N) proteína do nucleocapsídeo, (M) membrana plasmática, (E) envelope e genoma de RNA viral.

Figura 1 - Estrutura do coronavírus.



Fonte: Biorender, 2023.

O processo de infecção se inicia quando o receptor de membrana enzima conversora de angiotensina II (ECA2) se liga à proteína S, mais especificamente no *receptor binding domain (RBD)*, presente na subunidade S1, que apresenta complementariedade de ligação com a ECA2 (WANG, Q. et al., 2020).

Mais adiante, após a ancoragem do coronavírus com o receptor, entra em ação a enzima serinoprotease transmembranar 2 (TMPRSS2), que atua na clivagem da proteína *Spike*, induzindo a fusão de membranas da célula hospedeira com a membrana viral e formando o endossomo, que deve transportar o RNA viral até o citoplasma (IWATA-YOSHIKAWA, N. et al., 2019). Posteriormente, no citoplasma, ocorre a etapa de desnudamento, em que o material genético sai de dentro do endossomo, dando continuidade à replicação viral. Drogas que bloqueiam a atividade da TMPRSS2 têm se mostrado candidatas ao tratamento terapêutico da COVID-19. Portanto, para compreender o funcionamento da molécula, faz-se necessário o estudo de sua expressão e atividade proteolítica.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Expressar a proteína recombinante TMPRSS2 em bactérias *E.coli BL-21(DE3)*.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1 – Transformar o plasmídeo contendo a construção da TMPRSS2 em bactérias *Escherichia coli BL-21(DE3)*;
- 2 – Avaliar a atividade proteolítica da TMPRSS2 recombinante;
- 3 – Estabelecer um protocolo de avaliação proteolítica com Caseína.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Procedimento Experimental

2.1.1 Plasmídeo pET21A-XXA-TMPRSS2

O plasmídeo para induzir a expressão gênica da XXA-TMPRSS2 em bactéria BL-21(DE3) foi cedido, gentilmente, pelo professor Lang Rao, do instituto de biotecnologia industrial de Tianjin, China.

2.1.2 Recuperação plasmidial e indução com IPTG

O plasmídeo *pET21A-XXA-TMPRSS2* foi recuperado por meio de transformação bacteriana em células *E. coli TOP10F*, seguida de uma mini preparação plasmidial, conforme descrito em Sambrook et al. (1989). Em seguida, o plasmídeo recombinante foi transformado em células competentes *E. coli BL21(DE3)*. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina.

Posteriormente, algumas colônias foram pré-inoculadas em 5 mL de meio LB com a adição de ampicilina. Após 18 horas de crescimento, duas inoculações foram realizadas em Erlenmeyers contendo o mesmo meio, que foram incubados a 37 °C sob agitação de 150 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorado por leituras de absorbância em 600 nm (OD600), e, quando a leitura atingiu 0,4, a expressão gênica foi induzida com IPTG, sendo a cultura mantida por 17 horas a 25 °C sob agitação de 150 rpm.

Concluído esse período, as células foram centrifugadas por 25 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspenso em tampão Tris-HCl, pH 8,0. A lise bacteriana foi realizada por ultrassom, com 10 pulsos de 10 segundos cada, totalizando 35 minutos de processamento. Por fim, o extrato bacteriano foi novamente centrifugado por 25 minutos, sendo o sobrenadante coletado para posterior purificação.

2.1.3 Cromatografia de afinidade com coluna HisTrap - níquel sepharose para purificação da XXA-TMPRSS2

O sobrenadante obtido foi filtrado utilizando filtro de membrana e, em seguida, submetido à cromatografia de afinidade em coluna HisTrap - Níquel Sepharose. Para esse processo, empregaram-se dois tampões: o tampão A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,0), utilizado para a ligação da proteína à coluna, e o tampão B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8,0), destinado à eluição da enzima. A cromatografia foi realizada com fluxo inicial de 1 mL/min, sendo injetado 1 mL da amostra por vez, e a eluição ocorreu por gradiente crescente de imidazol, com as seguintes concentrações: 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM.

2.1.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Submeter as amostras de sobrenadante obtidas pela expressão e pela cromatografia à eletroforese em gel de poliacrilamida com adição de SDS, conforme descrito em Laemmli et al. (1970). Utilizar os géis de separação de 12%, além de géis de concentração a 5%, a coloração para detectar proteínas será realizada com o reagente de coomassie brilliant blue G 250 nas proporções: 40% metanol, 20% de ácido acético, 0,5% Coomassie Brilliant Blue G-250.

2.1.5 Protocolo de quantificação de hidrólise de enzima utilizando Caseína

2.1.5.1 Dissolver 1 g de caseína em 100 mL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0).

2.1.5.2 Aquecer levemente (até 37 °C) e agitar para completa solubilização;

2.1.5.3 Preparar a solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) em água destilada;

2.1.5.4 Ajustar a concentração da enzima TMPRSS2 conforme a necessidade (ex.: 0,1 a 1 µg/µL).

2.1.5.5 Em placas de 96 poços, adicionar:

- 75 µL de caseína 1%;
- 30 µL de tampão Tris-HCl;
- 45 µL de enzima TMPRSS2.
- Volume Total de 150 µL

2.1.5.6 Para o controle negativo, trocar a enzima por tampão

2.1.5.7 Incubar os tubos em banho-maria e agitação constante a 37 °C por 90 minutos.

2.1.5.8 Após incubação, adicionar 150 µL de TCA 10% em cada poço.

2.1.5.9 Misturar bem e deixar em repouso a 4 °C por 10 minutos para completa precipitação da caseína não hidrolisada.

2.1.5.10 Centrifugar os tubos a 10.000 g por 10 minutos, a 4 °C;

- O precipitado conterá a caseína intacta;

- O sobrenadante conterá os peptídeos hidrolisados e aminoácidos livres.

2.1.5.11 Transferir cuidadosamente 1 mL do sobrenadante para uma cubeta limpa.

2.1.5.12 Medir a absorbância a 280 nm usando o espectrofotômetro:

- A absorbância será proporcional à quantidade de proteína hidrolisada

2.1.5.13 Fazer a leitura também do controle negativo (sem enzima), para subtrair o branco.

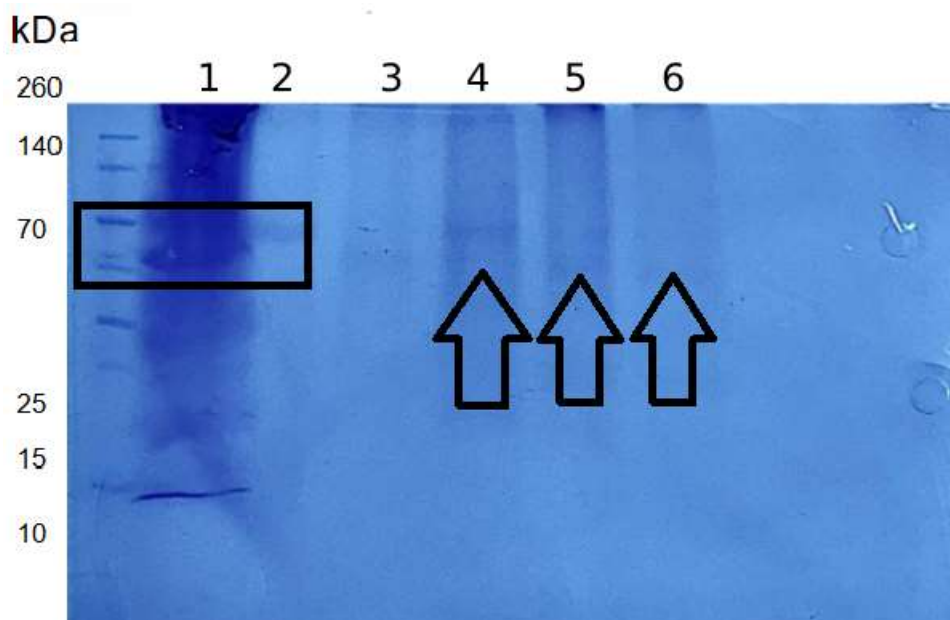
2.1.6 Teste de atividade da proteína XXA-TMPRSS2 no leitor de placas

Foram realizados ensaios para a detecção da atividade da XXA-TMPRSS2 utilizando o substrato BOC-GLN-ALA-ARG a 8 mM, em tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl e 5% de DMSO. As leituras de fluorescência foram feitas a cada 3 minutos, durante um período total de 35 minutos de ensaio.

2.2 Resultados e Discussão

Após as etapas de transformação e indução, fez-se necessária a comprovação da expressão da proteína para dar continuidade aos experimentos. Sob esse viés, foi realizado um gel de eletroforese SDS-PAGE, conforme aprofundado em 4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). A proteína XXA-TMPRSS2 migrou até 70kDa, como demonstra a figura 2.

Figura 2 – SDS-PAGE da proteína recombinante XXA-TMPRSS2 em que as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são, respectivamente: Lisado, sonicado, não retido e eluição 13, 14 e 15 do cromatograma.



Fonte: Os Autores

Posteriormente, após comprovada a presença da enzima, é imprescindível compreender seu nível de atividade proteolítica. Entretanto, a realização de testes utilizando substrato pode ser inviável, haja vista que uma pequena alíquota do substrato utilizado (Boc-Gln-Ala-Arg-pNA) pode custar milhares de reais. Sendo

assim, tornou-se necessário o desenvolvimento de um protocolo de quantificação enzimática de baixo custo.

Dada a problemática anteriormente citada, foram executados experimentos de modo a identificar as melhores condições de atividade enzimática para a posteriori tornar possível a medição adequada da absorbância em espectrofotômetro. A premissa do experimento se encontra na compreensão que a TMPRSS2, ao demonstrar atividade, passará a hidrolisar a Caseína, liberando peptídeos que tornarão a absorbância maior.

Tabela 1 – Absorbância de diferentes amostras

	Branco	Amostra
1	0	0.233
2	0	0.204
3	0	0.238

Média	Variância	DP	CV
0.225	0.000224667	0.018	0.082

Fonte: Os Autores

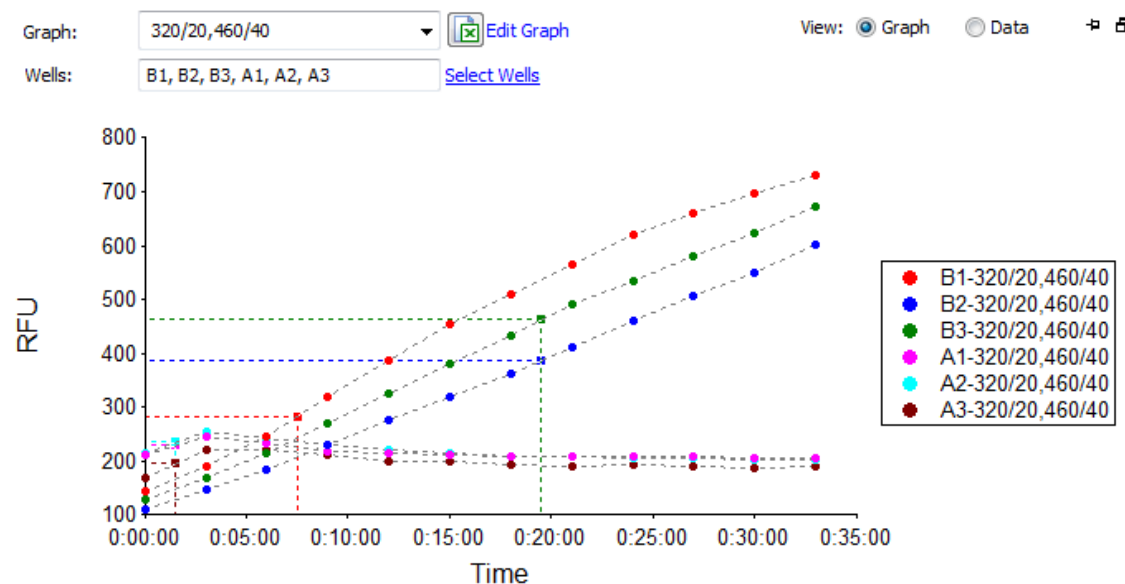
Figura 3 - Gráfico referente à hidrólise das amostras de acordo com a absorbância. No eixo X a unidade 1 se refere ao branco, as unidades 2, 3 e 4 são a triplicata e a unidade 5 é a média da triplicata.



Fonte: Os Autores

Mais adiante, de modo a comprovar definitivamente a confiabilidade do protocolo da expressão enzimática, foi feito também uma leitura de placa com o substrato.

Figura 4 - Gráfico referente à quantificação de proteínas na leitura de placa contendo 6 curvas, em que 3 delas não possuem enzima (A1, A2, A3) e 3 possuem (B1, B2, B3).



Fonte: Os Autores

Do gráfico apresentado, pode-se abstrair que as curvas B (Com Enzima) tiveram atividade maior do que o branco, pois seu coeficiente angular é maior.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Inicialmente, pode-se concluir que a proteína XXA-TMPRSS2 foi corretamente expressa, uma vez que o gel SDS-PAGE (Figura 2) apresentou uma banda em aproximadamente 70 kDa, compatível com os valores descritos na literatura.

Além disso, a atividade proteolítica foi confirmada pois a fluorescência da amostra é numericamente superior ao branco, o que evidencia a ocorrência do processo de hidrólise. Ao adicionar os dados em um plano cartesiano com eixo X e Y sendo X o eixo de fluorescência e Y o eixo do tempo, observa-se uma inclinação positiva da reta, característica de uma função de primeiro grau, o que reforça a conclusão cinética do experimento. Esse comportamento, aliado à baixa variância registrada entre as triplicatas (Tabela 1), demonstra consistência e reprodutibilidade dos resultados.

Por fim, a leitura de placa garantiu os achados ao quantificar a atividade enzimática (Figura 4), confirmando a eficiência do protocolo e consolidando a comprovação da atividade hidrolítica da TMPRSS2.

4 REFERÊNCIAS

IWATA-YOSHIKAWA, Naoko; OKAMURA, Tadashi; SHIMIZU, Yukiko; HASEGAWA, Hideki; TAKEDA, Makoto; NAGATA, Noriyo. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. *Journal of Virology*, Washington, v. 93, n. 6, p. 1-15, 15 mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01815-18>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; HUANG, X.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

ZHOU, Peng; YANG, Xing-Lou; WANG, Xian-Guang; HU, Ben; ZHANG, Lei; ZHANG, Wei; SI, Hao-Rui; ZHU, Yan; LI, Bei; HUANG, Chao-Lin. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, London, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 3 fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.