

Obtenção de linhagens estáveis para estudos de interação de proteínas envolvidas na via mTOR

Pesquisadora responsável: Juliana H. C. Smetana
Unidade do CNPEM: LNBio

Introdução

Em eucariotos, as vias de sinalização celular são importantes para a coordenação de diversas atividades e funções celulares, sendo comumente controlados por proteínas *scaffold* e adaptadoras, que por sua vez formam os complexos de sinalização com outras proteínas como quinases e fosfatases. Desvendar a estrutura e a arquitetura molecular dessas proteínas é muito importante para compreendermos os processos de regulação espacial e temporal do processo de sinalização celular.

Fatores de crescimento, níveis de energia e de aminoácidos podem promover o crescimento celular por meio da ativação da quinase mTOR (*Mechanistic Target of Rapamycin*). Aminoácidos promovem a translocação da mTOR no complexo mTORC1 para a superfície dos lisossomos, onde proteínas Rag GTPases residem, e são responsáveis pela translocação da mTORC1 até seu ativador, Rheb. O complexo Ragulator, por sua vez, é responsável por interagir com as GTPases Rag, recrutando-as para os lisossomos, sendo assim um *scaffold* essencial para a ativação da mTORC1 (1). Ragulator é um pentâmero formado por proteínas chamadas LAMTOR 1–5 que interage diretamente com um dos sensores de aminoácidos da via mTORC1, e atua como fator de troca de nucleotídeo (GEF) das Rags (2, 3).

A proteína HBXIP/LAMTOR5 (*mammalian hepatitis B X-interacting protein*), uma das cinco subunidades do Ragulator, foi originalmente identificada devido à sua interação com a porção C-terminal da proteína viral HBx (*HBV X protein*), transcrita pelo vírus HBV (*Chronic hepatitis B virus*) (4). Esse vírus é o causador da Hepatite B, uma doença infecciosa que acomete o fígado, sendo associada ao aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular

(HCC). Neste contexto, a proteína HBXIP atua como um elo de ligação entre a maquinaria celular e o patógeno viral, tendo o papel de suprimir a morte celular.

HBXIP/LAMTOR5 apresenta uma isoforma longa de cerca de 18kDa, e uma isoforma curta, de cerca de 11kDa. O impacto dessa isoforma longa na formação do complexo Ragulator e na interação com HBx não é conhecido. Também não se conhece a relação entre HBx e Ragulator, o que nos leva a questionar se HBx é capaz de interagir com outras subunidades do Ragulator além de HBXIP, ou se age como um regulador negativo da montagem do Ragulator. Em parte, esses questionamentos podem ser resolvidos com a identificação do perfil de interações (interactoma) de cada uma dessas proteínas.

Temos atualmente dois projetos de doutorado e um de mestrado dentro desse tema, e contamos com ferramentas validadas para o estudo dessas proteínas em cultura de células, como vetores de expressão e anticorpos. Experimentos preliminares mostraram que é possível identificar por espectrometria de massas as interações de subunidades do Ragulator endógenas com proteínas transfectadas de forma transiente, porém a identificação dessas interações de forma confiável requer a obtenção de linhagens estáveis, ou seja, células transfectadas de forma permanente com os plasmídeos que codificam as proteínas de interesse, para melhorar a reprodutibilidade e a estequiometria entre proteínas transfectadas e endógenas.

Objetivos

- Aprender técnicas de cultura de linhagens celulares de mamíferos, imunoprecipitação, SDS-PAGE e *Western blot*, e auxiliar em projetos do grupo que dependam dessas técnicas,
- Obter linhagens estáveis de HEK293 transfectadas com plasmídeos codificantes das proteínas de interesse e caracterizar os níveis de expressão das proteínas nessas linhagens,
- Realizar ensaios de interação proteína-proteína (imunoprecipitação) a partir de extratos das linhagens obtidas.

Metodologia

Plasmídeos

Os plasmídeos necessários ao desenvolvimento do projeto já estão prontos, e o(a) bolsista deverá realizar a transformação em cepa de *E. coli* DH5 α e a extração do DNA plasmidial com *kit* comercial de midiprep, seguida de análise por eletroforese em gel de agarose e sequenciamento confirmatório. Todos os plasmídeos possuem a marca de resistência ao antibiótico G418.

Cultura de células e transfecção

Células HEK293 serão cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com soro fetal bovino 10% e antibiótico/antimicótico em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Serão feitas trocas periódicas do meio de cultura a cada 2 ou 3 dias e passagens quando as células atingirem 80 a 90% de confluência. A transfecção será feita utilizando PEI (*Polysciences*). Após 48 a 72 horas, será iniciada a seleção com o antibiótico G418, que será mantida por cerca de 4 semanas até que sobrevivam apenas as células resistentes ao antibiótico. Será feita diluição limitante seguida de amplificação para obter clones derivados de uma única célula.

Imunoprecipitação e *Western blot*

Para avaliar os níveis de expressão das proteínas de interesse nas linhagens obtidas, serão preparados extratos solúveis das células transfectadas. Esses extratos serão quantificados por absorbância a 280 nm e por método colorimétrico (BCA) e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de *Western blot* com anticorpos comerciais anti-FLAG, anti-HA, assim como anticorpos específicos para subunidades endógenas do Ragulator. O anticorpo anti-actina será usado como controle de *loading* para garantir quantidades equivalentes de proteína total. Os extratos solúveis serão também submetidos a imunoprecipitação com resinas comerciais com anticorpos FLAG ou HA imobilizados, e os resultados das imunoprecipitações serão analisados por SDS-PAGE/ *Western blot* para detectar interações com proteínas endógenas.

Referências Bibliográficas

1. Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., and Sabatini, D. M. (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. **141**, 290–303
2. Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R., and Sabatini, D. M. (2012) Ragulator Is a GEF for the Rag GTPases that Signal Amino Acid Levels to mTORC1. *Cell*. **150**, 1196–1208
3. Shen, K., and Sabatini, D. M. (2018) Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **115**, 9545–9550
4. Melegari, M., Scaglioni, P. P., and Wands, J. R. (1998) Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication. *J. Virol*. **72**, 1737–1743