

Uso de biotinilação por proximidade para identificação de interatores da proteína dissulfeto isomerase A3 durante a diferenciação neuronal

Caroline Barbosa da Cruz

Ana Luiza Lourenço Gonçalves e Lais Henrique Lotufo

Prof. Dr. Danilo Bilches Medinas

Instituto de Química, Universidade de São Paulo

E-mail: carolbarbosac03@gmail.com

Objetivos

As proteínas desempenham diversos papéis nas células e organismos, os quais frequentemente dependem da formação de complexos proteicos e interações entre proteínas (1). As interações entre proteínas podem ocorrer de maneira estável ou transitória, dependendo das proteínas e suas funções bioquímicas em determinado processo celular. O estudo de interações entre proteínas foi aprimorado com a invenção de metodologias de modificação química por proximidade. O uso de biotinilação por proximidade, método referido como BiOID (2), permite a identificação de interações transitórias ou pouco abundantes entre proteínas, como entre enzimas e substratos. A proteína dissulfeto isomerase A3 (PDIA3) é uma enzima do retículo endoplasmático (RE) envolvida na catálise da formação de pontes dissulfeto em proteínas (3). Perturbações genéticas e bioquímicas na atividade da PDIA3 podem acarretar problemas neurológicos como deficiência intelectual (DI), sugerindo sua participação em processos celulares do neurodesenvolvimento e atividade neuronal (3). Assim, torna-se crítico estudar a função da PDIA3 em neurônios, sendo que a determinação de substratos da PDIA3 compreende tarefa essencial para elucidar mecanismos moleculares nestas células. Neste estudo, buscou-se estabelecer linhagens neuronais para utilizar BiOID no estudo de substratos de PDIA3.

Métodos e Procedimentos

As linhagens HEK293, NSC-34 e HT-22 foram cultivadas em meio DMEM de alta glicose suplementado com penicilina/estreptomicina e 5% de soro fetal bovino em incubadora com atmosfera e temperatura controladas (5% CO₂ e 37°C). As células foram transfectadas com Effectene (Qiagen). O sistema de expressão induzível T-REx foi utilizado para a construção de vetores da ferramenta BiOID para PDIA3. T-Rex baseia-se na utilização de dois plasmídeos, pcDNA6 que codifica o repressor Tet (TetR) e confere resistência à blasticidina, e pcDNA4/TO onde deve ser inserida a sequência da proteína de interesse sob controle de um promotor inibido por TetR e que confere resistência à zeocina. Brevemente, o cADN correspondente à sequência de PDIA3 humana, seguida pelas sequências codificadoras da biotina ligase 2 mutante (BiOID2), do peptídeo V5 e do sinal de retenção do RE (QEDL), foi obtido por síntese química (PDIA3-BiOID2-V5) e inserido no plasmídeo pcDNA4/TO. A toxicidade de blasticidina e zeocina foi investigada através de curvas dose-resposta e inspeção visual no microscópio com contraste de fase. Linhagens estáveis expressando o repressor TetR foram obtidas através da transfecção do plasmídeo pcDNA6 seguida de seleção com blasticidina. A expressão de PDIA3-BiOID2-V5 a partir do vetor pcDNA4/TO foi investigada em células HT-22 selvagens e HT-22/TetR por Western-blot contra PDIA3 e V5. A expressão de proteínas a partir

de pcDNA4/TO foi monitorada utilizando o gene repórter *lacZ* que codifica a β -galactosidase e ensaio enzimático com X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosídeo) seguido de detecção por microscopia de campo claro.

Resultados

As linhagens HEK293, NSC-34 e HT-22 mostraram-se suscetíveis à blasticidina. Em 24h de incubação, os efeitos da blasticidina já eram notáveis nas células tratadas com 25 μ g/ml da droga. Em 48h, as células incubadas com 5 e 10 μ g/ml da droga também exibiram viabilidade comprometida, apresentando morfologia redonda e desprendimento da placa de cultivo.

De maneira geral, as linhagens HEK293, NSC-34 e HT-22 mostraram-se mais resistentes à zeocina em comparação com blasticidina. A curva dose-resposta de 125 até 500 μ g/ml de zeocina não evidenciou perda de viabilidade celular em nenhuma das linhagens em 24h de tratamento, sendo que após 72h somente as linhagens NSC-34 e HT-22 mostraram uma perda de viabilidade parcial na condição 500 μ g/ml.

A transfecção de pcDNA6 conferiu resistência contra blasticidina na linhagem HT-22. Após 24h de transfecção, blasticidina foi adicionada numa concentração de 5 μ g/ml nas células que receberam pcDNA6 e células controles sem transfecção. Após 48h, as células controle haviam morrido completamente enquanto as células pcDNA6 puderam ser amplificadas e mantidas em meio contendo 5 μ g/ml de blasticidina. Estas células, denominadas HT-22/TetR, mostraram-se mais resistentes à zeocina em comparação com as células HT-22 selvagens.

Para testar a atividade do repressor Tet nas células HT-22/TetR, estas foram transfectadas com pcDNA4/TO codificando PDIA3-BioID2-V5, cuja expressão deveria ser reprimível, e com pcDNA3 codificando PDIA3- V5, cuja expressão não deveria ser influenciada por TetR. Como controle de expressão não reprimível, pcDNA4/TO e pcDNA3 foram transfectados nas células HT-22 selvagens. A análise por Western blot revelou os mesmos níveis de expressão de

PDIA3-BioID2-V5 e PDIA3- V5 nas células HT-22/TetR e HT-22 selvagens, indicando que a possível expressão de TetR nas células HT-22 não foi suficiente para inibir a expressão a partir de pcDNA4/TO.

A atividade de pcDNA4/TO pode ser monitorada com o sistema *lacZ*/X-gal em células NSC-34 e HT-22, revelando uma população de 5-10% de células transfectadas. Este sistema repórter será utilizado para o monitoramento da atividade de TetR em futuros experimentos.

Conclusões

A produção de linhagens estáveis contendo pcDNA6 foi bem-sucedida. Contudo, não foi possível corroborar a atividade de TetR. O uso do sistema *lacZ*/X-gal será feito para o estabelecimento de condições de repressão por TetR. Finalmente, o uso de zeocina deve ser otimizado para promover a seleção de células transfectadas com pcDNA4/TO, o que pode ser feito pelo aumento da concentração da droga ou tempo e condições do meio de exposição.

Os autores declaram não haver conflito de interesses. DBM concebeu e planejou o estudo. CBC, ALLG e LHL realizaram a coleta e análise dos dados. CBC e DBM participaram da redação e revisão final do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Referências

1. Skinnider, M. A., Scott, N. E., Prudova, A., Kerr, C. H., Stoynov, N., Stacey, R. G., Chan, Q. W. T., Rattray, D., Gsponer, J., and Foster, L. J. (2021) An atlas of protein-protein interactions across mouse tissues. *Cell*. **184**, 4073-4089.e17
2. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., and Burke, B. (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*. **196**, 801–10
3. Medinas, D. B., Rozas, P., and Hetz, C. (2022) Critical roles of protein disulfide isomerases in balancing proteostasis in the nervous system. *J Biol Chem*. **298**, 102087