



CLONAGEM GÊNICA E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA PROTEÍNA IMUNOESTIMULATÓRIA

JOÃO VICTOR MOUTTA DE CARVALHO; CHRISTIANE ELIZA MOUTTA DUARTE;
MARCO AURELIO FERREIRA

RESUMO

Com o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, tornou-se possível, através de ferramentas de biologia molecular, introduzir moléculas de DNA recombinante em células para a produção de proteínas de interesse terapêutico. Nesse contexto foi pesquisado a possibilidade de expressar uma lectina que em ensaios pilotos mostrou possível atividade imunoestimulatória. Essa lectina foi isolada de *Brassica oleracea* ssp. *botrytis*, (*BOL*), contudo, sua purificação a partir de floretes de couve-flor apresentou baixo rendimento que pode ser aumentado através da clonagem do gene *BOL* em vetor de expressão bacteriano e expressar a proteína recombinante em *Escherichia coli*. O gene *BOL* foi clonado por restrição enzimática no vetor pET28a, a seguir procedeu-se a transformação de *Escherichia coli* (*E.coli*) *DH5α* para a propagação do DNA plasmidial. O vetor foi extraído da bactéria através de mini-preparação por lise alcalina e utilizado para transformação da cepa de expressão *Rosetta*, por choque térmico. A expressão de *BOL* foi induzida pela adição de 0,8mM de isopropil-β-d-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 4 horas a 37°C ou 48 horas a 20°C. Os extratos celulares foram avaliados por meio de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, a transformação por eletroporação e replicação do gene *BOL* em cepas de *DH5α* foi confirmada pela presença de colônias cultivadas em meio sólido seletivo com o antibiótico de seleção, canamicina e pela análise eletroforética em gel de agarose do DNA plasmidial extraído de *E.coli* *DH5α*, que foi utilizado para a transformação da cepa *Rosetta*. As colônias transformantes foram inoculadas em meio líquido e a expressão de *BOL* foi induzida pela adição de IPTG. Na análise por eletroforese em SDS-PAGE não foram identificadas bandas expressivas que poderiam corresponder à fração induzida da proteína de interesse, com peso molecular aparente de 35kDa, em comparação a fração não induzida. Assim, sendo necessários novos testes com condições modificadas como a concentração de IPTG, tempo de indução e outras cepas de expressão. A expressão heteróloga de *BOL* nas condições testadas apresentou resultados inconclusivos, indicando que as condições de expressão devem ser otimizadas para que seja possível produzir uma lectina recombinante capaz de ser utilizada em ensaios biológicos futuros.

Palavras-chave: Clonagem; Expressão; Lectina; Recombinante.

1 INTRODUÇÃO

Ensaios preliminares mostraram que a fagocitose e a produção NO por macrófagos foram estimuladas na presença de *BOL*, o que demonstra a possibilidade dessa lectina atuar como agente imunoestimulador capaz de auxiliar na ativação da imunidade inata (Duarte et al. 2017). Entretanto, a quantidade de proteína nativa recuperada no processo de purificação limita o número de ensaios biológicos que podem ser realizados. Um rendimento inferior a 1% de lectina foi obtido nas preparações cromatográficas a partir do extrato bruto de couve-

flor. Foram feitos vários testes com diferentes tampões de eluição na tentativa de se obter a lectina em seu estado nativo, contudo não houve sucesso nesses procedimentos, desse modo, esta pesquisa tentou padronizar e/ou adaptar metodologias para expressão heteróloga da lectina BOL em *Escherichia coli*, na tentativa de aumentar o rendimento da BOL recombinante similar a BOL nativa para a realização de futuros ensaios biológicos sobre seu papel imunoestimulatório.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O gene *BOL* foi clonado por restrição enzimática no vetor *pET28a*, a partir do desenho dos primers forward e reverse que foi feito com base na sequência codificante do gene de lectina de *Brassica oleracea*, fornecido pelo banco de dados que o programa *BLAST*, publicado pela *National Center For Biotechnology Information* (Altschul, S.F. et.al, 1990) e armazenado sob a identificação: MN937259, a seguir foi realizado a transformação por choque térmico de cepas *Escherichia coli* (*E.coli*) *DH5a* capacitadas para a propagação, sendo plaqueadas em meio Luria Broth sólido e seletivo com a adição de um antibiótico de seleção, a canamicina, sendo deixadas para crescer em overnight a 37°C, após esse período o vetor foi extraído da bactéria através de mini-preparação por lise alcalina QUIBASA - Bioclin (Belo Horizonte, Brasil) e o DNA plasmidial extraído foi então utilizado para transformação por eletroporação de cepas de expressão denominadas de *Rosetta*, através de transformação choque térmico. A expressão de BOL pela cepa *Rosetta* foi induzida pela adição em meio líquido de 0,8mM de isopropil-β-d- 1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 4 horas a 37°C ou 48 horas a 20°C. Os extratos celulares foram avaliados por meio de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Transformação por eletroporação das cepas *DH5a* e extração do DNA plasmidial

A transformação por eletroporação e replicação do gene *BOL* em cepas de *DH5a* foi confirmada pela presença de poucas colônias crescidas em meio sólido seletivo. Kostylev et al (2015) relataram que cepas de *DH5a*, quando transformadas por choque térmico, apresentavam um número maior de colônias crescidas após o cultivo em meio seletivo do que cepas transformadas por eletroporação. Segundo os autores, tal diferença poderia ser explicada pelo fato de que a transformação por choque térmico tornava as cepas de *DH5a* competentes tanto por um processo físico, no caso as variações de temperatura, como por um processo químico, através do preparo destas células em tampão contendo cloreto de cálcio. Já as cepas eletrocompetentes só adquirem competência por um único processo, o de eletroporação.

Ademais, fatores como concentração de DNA, tamanho do plasmídeo, tempo de recuperação e duração do tratamento em gelo podem afetar a eficiência de transformação (Liu et al. 2014). Através das análises eletroforéticas em gel de agarose a 0,8%, foi possível confirmar a presença do plasmídeo *pET28a-BOL* em cepas de *DH5a*, recuperados após extração do DNA plasmidial por lise alcalina. A análise do gel de agarose possibilitou observar, a presença de bandas com tamanho superior a 6.000pb, que é compatível com o vetor recombinante contendo o gene *BOL*, o qual possui 6.415pb. Nessa análise também foi possível avaliar a integridade do plasmídeo, já que não foram observadas bandas típicas de degradação do material genético, que aparecem como bandas de intensidade fraca e aspecto difuso no gel (Lucena-Aguilar et al. 2016).

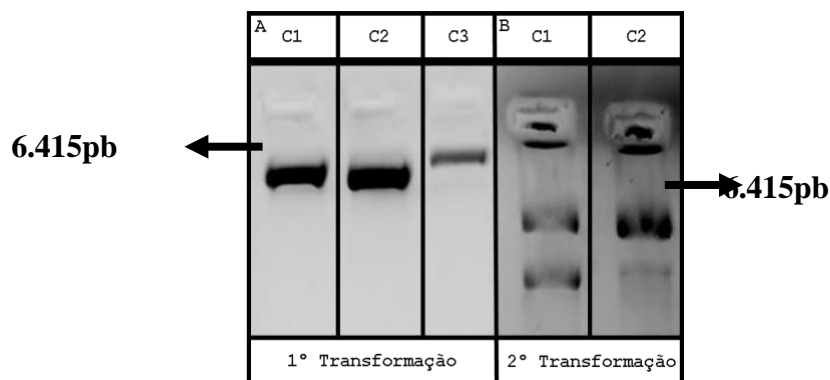


Figura 1A. Resultados da análise em gel de agarose do vetor pET28a-BOL, extraído das colônias 1(C1), 2(C2) e 3(C3) de cepas de DH5 α após a 1ª transformação por eletroporação.

Figura 1B. Resultados da análise em gel de agarose, referente a 2ª transformação por eletroporação das colônias 1 (C1) e 2(C2) de DH5 α .

3.2. Transformação das cepas Rosettas por choque térmico e indução da expressão de BOL pelo IPTG

Após a extração do DNA plasmidial, as colônias transformantes foram inoculadas em meio líquido de LB e seletivo com a adição de 20 μ L de canamicina. Já o plaqueamento em meio seletivo, resultou em crescimento apenas para a cepa *Rosetta*., Há vários fatores que podem estar relacionados a essa baixa taxa de crescimento das cepas transformadas, estando relacionadas com as condições físicas e químicas de cultivo no meio, que não favoreceram seu crescimento em um meio seletivo. Desse modo, faz-se necessário que as condições de cultivo sejam otimizadas até que haja um aumento no número de colônias possivelmente transformantes (Brock, T.D. et.al. 2016.). Outro fator que pode explicar esse resultado é uma possível toxicidade da proteína recombinante devido a expressão basal da BOL, a qual pode apresentar uma função tóxica para as cepas hospedeiras, afetando assim a taxa de crescimento, o que pode ter ocasionado resultado no crescimento de uma única colônia (Rosano; Ceccarelli, 2014). A expressão de BOL foi induzida pela adição de IPTG, Apesar do crescimento de apenas uma colônia em meio sólido, prosseguiu-se com a semeadura em meio líquido. Após atingir densidade óptica de 0,6, a cultura de Rosetta foi induzida pela adição de IPTG. Foi coletada uma fração antes da indução e outra pós-período de indução e expressão da proteína, conforme descrito na metodologia. A fração induzida também foi processada de modo a obter um extrato de proteínas solúvel no citoplasma da célula e um extrato de proteínas insolúvel, presentes nos chamados corpos de inclusão. Todas as frações foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.3. Análise eletroforética da BOL recombinante em gel de poliacrilamida a 12%

Na análise por eletroforese em SDS-PAGE não foram identificadas bandas expressivas que poderiam corresponder à fração induzida da proteína de interesse, com peso molecular aparente de 35kDa, em comparação a fração não induzida. Assim, sendo necessários novos testes com condições modificadas como a concentração de IPTG, tempo de indução e outras cepas de expressão.

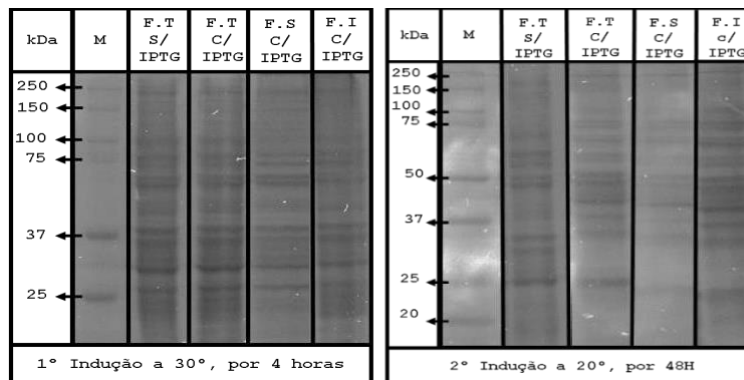


Figura 2A e B. Resultado dos do 1° e 2° teste de indução com IPTG analisados em gel de poliacrilamida, aplicado nas canaletas do gel da seguinte forma: Marcador (M) - Fração Total sem IPTG (F.T S / IPTG) - Fração total com IPTG (F.T C / IPTG) - Fração solúvel com IPTG (F.S C / IPTG) - Fração Insolúvel com IPTG (F.I C / IPTG).

Apesar de não ser possível a identificação de uma banda indicativa da presença da proteína recombinante nos géis de eletroforese, não é possível descartar que não houve nenhuma indução. Contudo, as condições de indução deverão ser otimizadas de modo a possibilitar a obtenção de quantidades mais significativas da proteína de interesse. Sendo assim, serão necessários novos testes com condições modificadas para otimizar a expressão heteróloga da lectina de *Brassica oleracea*, condições como a concentração de IPTG utilizada nas amostras, tempo de indução que a amostra é exposta ao IPTG e até mesmo o uso de outras cepas capazes de expressar a lectina (Silva MQM, 2021) são estratégias que poderão ser utilizadas em ensaios futuros.

4 CONCLUSÃO

Os procedimentos descritos aqui tornaram possível a obtenção de um vetor recombinante em que o gene BOL é expresso fusionado a seis histidinas, na porção N-terminal. Essa construção será útil para obtenção e purificação da proteína recombinante. Contudo, a expressão heteróloga de BOL nas condições testadas apresentou resultados inconclusivos, indicando que as condições de expressão devem ser otimizadas para que seja possível produzir uma lectina recombinante capaz de ser utilizada em ensaios biológicos futuros.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. (Blast).
- Brock, T.D. et al., *Microbiologia de Brock* 14. ed. Artmed. 2016. [PDF]
- Duarte CEM, Abranches MV, Silva PF et al 2017. A new TRAF-like protein from *Brassicaoleracea* ssp. *botrytis* with lectinic activity and its effect on macrophages. *Int J Biol Macromol* 1:508–514.
- Kostylev, M. et al. Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5 α -Mediated Assembly of

Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. PLOS ONE, v. 10, n. 9, p. e0137466, 8 set. 2015.

Liu X, Liu L, Wang Y, Wang X, Ma Y, Li Y. The Study on the factors affecting transformation efficiency of E. coli competent cells. Pak J Pharm Sci. 2014;27(3 Suppl):679-684.

Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. Biopreserv Biobank. 2016;14(4):264-270. doi:10.1089/bio.2015.0064.

Silva, MMQ. Aplicação de diferentes cepas de Escherichia coli na otimização da expressão de uma aglutinina de leguminosa. 2021. Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.