

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM QUÍMICA

PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE UMA SERPINA DO *Bacillus subtilis*

Aluna: Elizângela de Almeida Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Luciano Puzer

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM QUÍMICA

PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE UMA SERPINA DO *Bacillus subtilis*

Assinatura da aluna: Elizângela de Almeida Carvalho

Assinatura do Orientador: Luciano Puzer

INTRODUÇÃO

Serpina é o nome dado a superfamília de proteínas com uma grande diversidade de funções biológicas, e que tem como principal característica a inibição de serino proteases (Hunt and Dayhoff 1980; Bock *et al.*, 1982), de onde sai o nome desta família de proteínas, “*serine protease inhibitor*”. Os primeiros relatos sobre serpinas ocorreram a partir da observação de similaridades na sequência de aminoácidos de três proteínas humanas: antitrombina, inibidor de protease- $\alpha 1$ e ovalbumina. Posteriormente, a partir da resolução da estrutura terciária de outras serpinas, ficou demonstrado que uma região de grande similaridade na sequência de aminoácidos refletia um domínio altamente conservado na estrutura terciária destas proteínas. Embora este domínio de aproximadamente 350 resíduos de aminoácidos esteja presente em todas as serpinas, há uma grande variação no tamanho destas proteínas, resultante de extensões polipeptídicas nas regiões N- e/ou C-terminal, além de N- e/ou O-glicosilações. Assim, muitas serpinas tem entre 40-60 kDa. O inibidor C1, que possui uma extensão de 100 resíduos de aminoácidos na região N-terminal, com seis N- e doze O-glicosilações, tem aproximadamente 105 kDa e é a maior serpina conhecida. Apesar de ter sido demonstrado que muitas destas proteínas não possuíam atividade inibitória frente à serino proteases, por exemplo o angiotensinogênio e a ovalbumina, e além de algumas serpinas serem capazes de inibir cisteíno proteases, estabeleceu-se que o nome da superfamília seria mantido.

As serpinas pertencem a família I4 (Rawling *et al.*, 2004) de inibidores protéicos de protease e até pouco tempo eram encontradas apenas em eucariontes multicelulares (Irving *et al.*, 2000). Nesta linha, recentemente descrevemos e caracterizamos a primeira serpina do *Sphenophorus levis*, popularmente conhecido como bicudo da cana, e que ataca os canaviais brasileiros causando grandes prejuízos a essa lavoura (Fonseca *et al.*, 2011). Acreditamos que essa serpina esteja relacionada ao mecanismo de defesa do *Sphenophorus levis*, a partir da regulação de uma serino peptidase que ativa a enzima fenoloxidase, responsável pelo início do processo de melanização. Verificamos que a serpina do *Sphenophorus levis* tem especificidade restrita à enzimas do tipo tripsina-like.

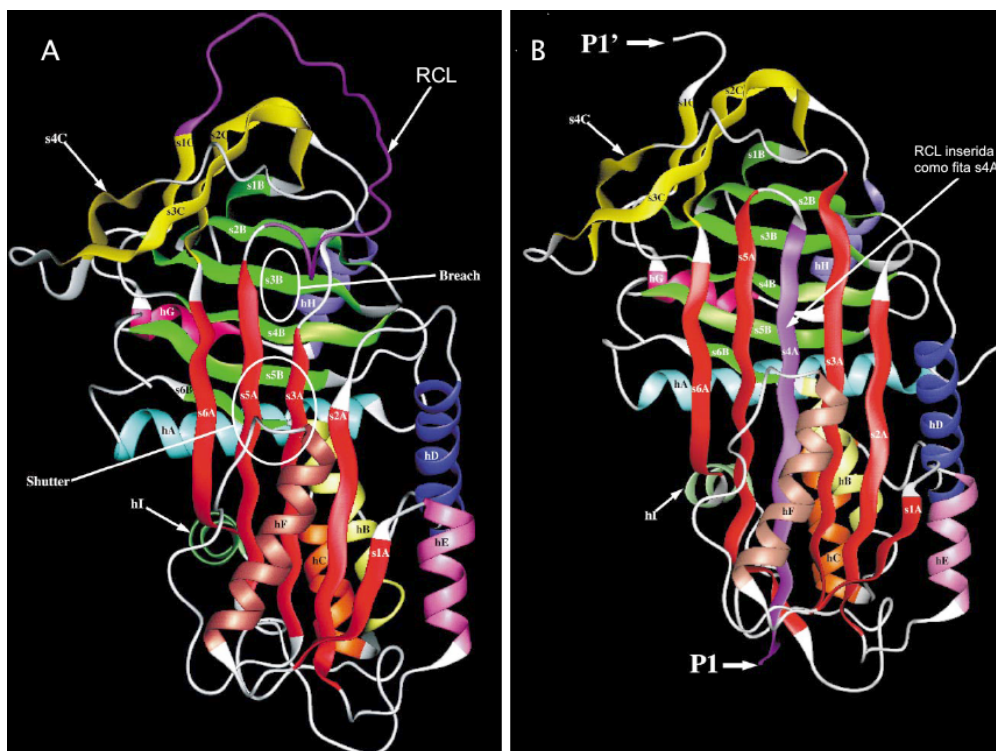


Figura 1. Estrutura da α_1 -antitripsina humana. A) destaque para as 9 α -hélices (hA-I), 3 fita- β (sA-C) e a alça do centro reativo. B) após a clivagem, a *RCL* é inserida no interior da serpina, como uma das fitas- β (s4A). (Adaptado de Whisstock *et al.*, 2000).

A principal característica estrutural das serpinas é a presença de uma alça constituída de aproximadamente 20 aminoácidos, conhecida como alça do centro reativo (*RCL*), localizada próxima da região C-terminal (Figura 1A). Essas proteínas agem via mecanismo de inibição irreversível, onde a *RCL* inicialmente assume o papel de um substrato canônico, sofrendo a clivagem proteolítica e formando o primeiro intermediário acil-enzima, característico do mecanismo de ação das proteases. Mostrou-se que é necessária uma grande tensão estrutural para que a *RCL* mantenha-se exposta sobre a estrutura da serpina. Assim, após sua clivagem e consequente formação do primeiro intermediário acil-enzima, a energia acumulada nessa tensão estrutural é usada para provocar uma grande mudança conformacional na serpina, o que leva a *RCL* a ser inserida, como uma fita- β , no interior de sua estrutura (figura 1B). Desta forma, a protease que está complexada à serpina, via clivagem da *RCL*, também sofre uma modificação estrutural que leva

a desarticulação de seu sítio de catálise, o que impede a continuidade do mecanismo de proteólise (Figura 2).

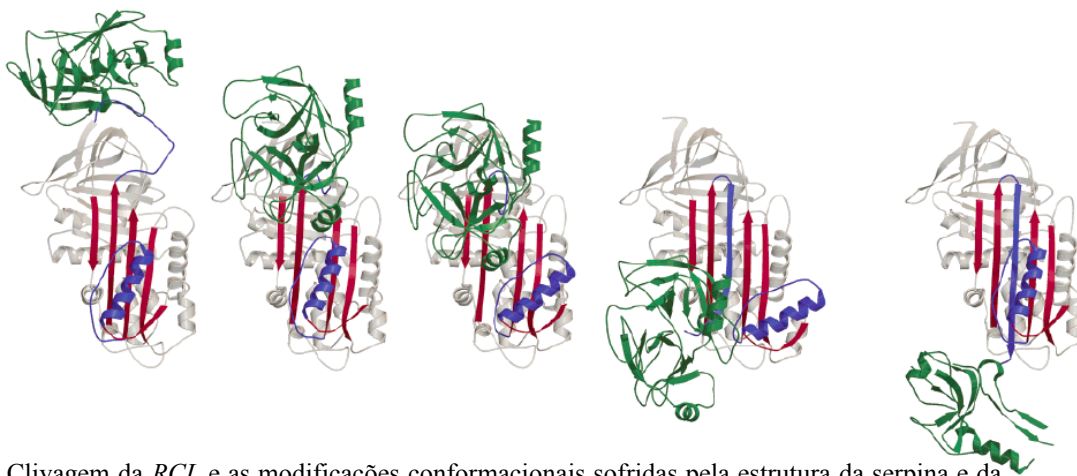


Figura 2. Clivagem da *RCL* e as modificações conformacionais sofridas pela estrutura da serpina e da enzima, que levam à inativação enzimática. (Adaptado de Gettins 2002).

Curiosamente, algumas serpinas são encontradas em organismos termofílicos, o que se esperava incompatível com o mecanismo de ação desses inibidores, devido à drástica mudança conformacional em sua estrutura terciária. A termopina, uma serpina específica de enzimas tipo quimiotripsina-*like*, é capaz de estabilizar a formação do complexo enzima-serpina a temperaturas de 60°C (Irving *et al.*, 2003), temperatura na qual o inibidor α -1-antitripsina perde sua atividade em poucos minutos.

Uma das vantagens de trabalhar com serpinas, em relação aos inibidores à base de moléculas orgânicas, é a possibilidade de sua obtenção via tecnologia do DNA recombinante, o que permite também a obtenção de diferentes mutantes com modificações na sequência de aminoácidos da *RCL*. Nesse sentido, Chen *et al.* (2000) mostraram que mutações sítio dirigidas na *RCL* da calistatina, uma serpina de humanos conhecida como o inibidor endógeno da calicreína tecidual (Luo *et al.*, 2006), modificam a especificidade da serpina em relação a protease.

Com o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento de DNA, e com o melhoramento dos métodos de bioinformática, mudou-se totalmente a percepção sobre a presença de serpinas em

organismos unicelulares (Roberts *et al.*, 2004). A análise dos genomas de organismos procarióticos disponíveis na base de dados MEROPS indica que as serpinas são a terceira família mais abundante de inibidores de protease nesses organismos. Elas são encontradas em 97 dos 920 genomas bacterianos sequenciados até o momento, e as doze primeiras sequências foram descritas pelo grupo de James Whisstock e colaboradores (Irving *et al.*, 2002), mostrando que serpinas bacterianas podem apresentar importância funcional nesses organismos. Além disso, com a diminuição dos custos e do tempo para realização do sequenciamento de genomas, a tendência é que mais serpinas sejam identificadas em bactérias. Desta forma, também aumentará demanda por informações bioquímicas que auxiliem no entendimento e caracterização das vias de ação destas proteínas.

Uma análise preliminar das estruturas primárias das serpinas bacterianas depositadas no banco de dados MEROPS revelou uma grande variação de aminoácidos na região do sítio de clivagem na *RCL*, o que aponta para um amplo espectro de possíveis proteases alvos (Figura 3). A alça do centro reativo pode ser caracterizada em duas regiões, uma sequência bem conservada (GTEAAAAT) que auxilia na inserção da fita- β s4A para o interior da serpina, e uma segunda sequência que apresenta grande variação de aminoácidos, o que ajuda a garantir a especificidade dessas proteínas para diferentes proteases. O possível sítio de clivagem para essas serpinas também é mostrado na figura 3, e observamos que as ligações peptídicas a serem clivadas apresentam uma boa diversidade de aminoácidos, principalmente na posição P1. Assim, temos os seguintes pares P1-P1' nas sequências apresentadas na figura 3: Ala-Thr para a serpina do *Bacillus subtilis* (MER223870), Leu-Thr para *Dehalococcoides ethenogenes* (MER048439), Pro-Val para *Myxococcus xanthus* (MER068102), Arg-Thr para *Gloeobacter violaceus* (MER036597) e Glu-Ala para *Natranaerobius thermophilus* (MER088272). É interessante observar que não encontramos nenhuma serpina de bactéria com os aminoácidos Phe ou Tyr na posição P1. Isso é surpreendente visto que são os dois aminoácidos preferidos por proteases do tipo quimiotripsina-*like* nesta posição.

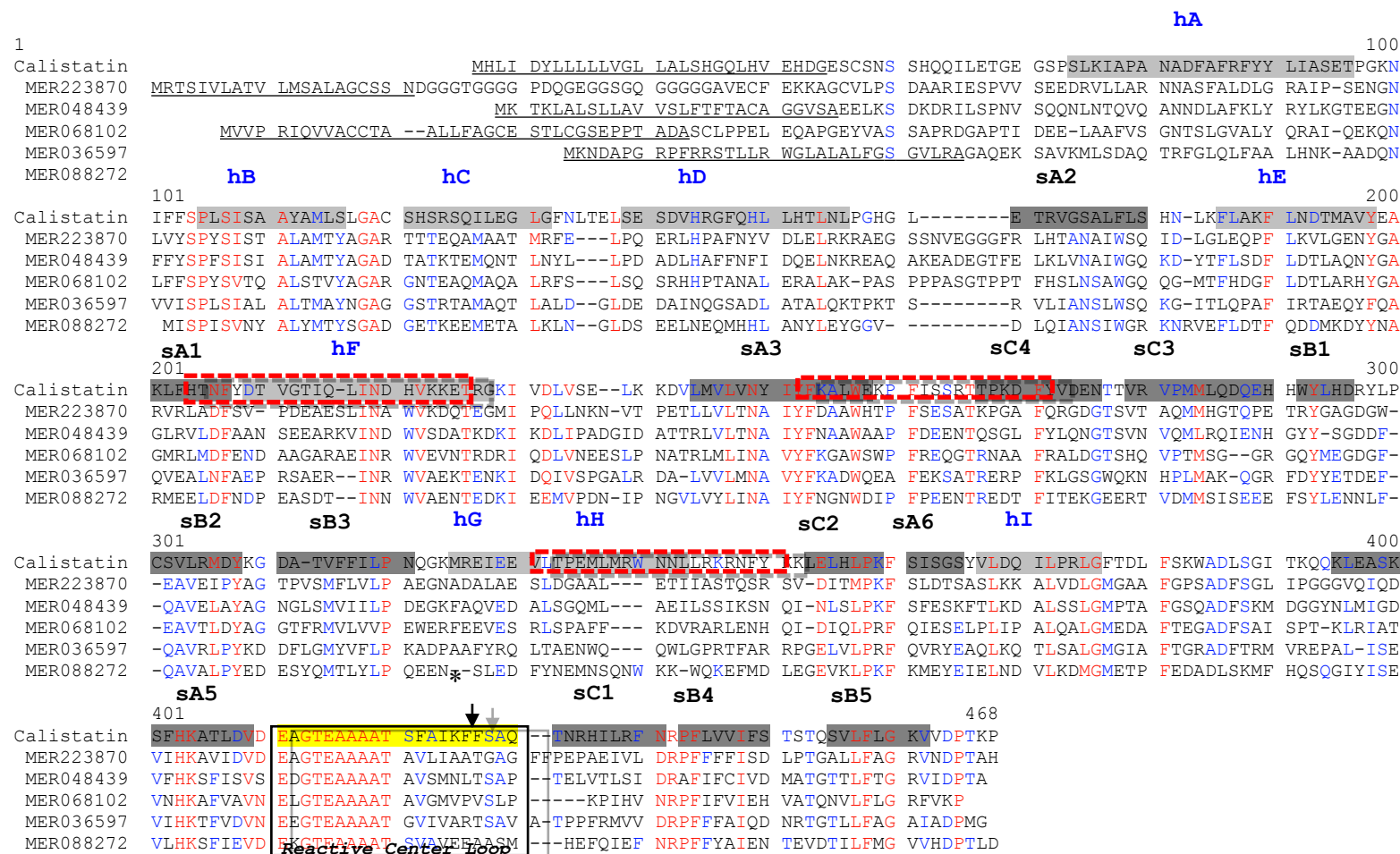


Figura 3. Estrutura primária das serpinas de *Bacillus subtilis* (MER223870), *Dehalococcoides ethenogenes* (MER048439), *Myxococcus xanthus* (MER068102), *Gloeobacter violaceus* (MER036597) e *Natranaerobius thermophilus* (MER088272), em comparação com a calistatina. Em destaque estão as sequências de aminoácidos das 9 α -hélices (hA-I), 3 fitas- β (sA-C), em amarelo destaca-se a sequência da alça do centro reativo, destacados em caixas vermelhas estão as sequência de interação com heparina, para a calistatina. (*) mostra o possível sítio de clivagem. A sequência sublinhada próxima ao N-terminal refere-se ao provável peptídeo sinal da proteína.

OBJETIVOS

Neste projeto o objetivo é a produção recombinante da serpina do *Bacillus subtilis*

MATERIAIS E MÉTODOS

Clonagem da serpina do *Bacillus subtilis*.

A clonagem da serpina foi feita inicialmente a partir do DNA do *Bacillus subtilis* caracterizado e isolado de material de compostagem oriundo do jardim zoológico de São Paulo.

O gene da serpina do *Bacillus subtilis* foi adquirido dentro do plasmídeo pBS (p-Blue Script), que foi transformado em bactérias competentes *E. coli* DH5 α (linhagem rosetta), produzidas com cloreto de cálcio utilizando o protocolo das páginas 58 e 59 do livro “Condensed Protocols”. As bactérias foram colocadas em uma placa de LB - Ágar com meio seletivo contendo o antibiótico ampicilina, porque o plasmídeo pBS induz na bactéria resistência a este antibiótico. Após a formação de colônias de bactéria no meio seletivo, uma colônia foi cultivada em uma nova placa, para ser estocada à uma temperatura de 4°C.

Estocagem do plasmídeo pBS contendo o gene da serpina

As bactérias transformadas, também foram estocadas em glicerol, para ter uma vida útil maior. Inicialmente em um tubo falcon de 15mL contendo 3 mL de LB líquido (Luria Bertani) e 3 μ L de ampicilina, foi colocado uma colônia de bactéria da placa de estoque com células transformadas, para serem mantidas à 37 °C sob agitação de 240 rpm. Após 16 horas, a solução foi colocada em tubos de micro-centrífuga de 1,5 ml, preenchendo 70 % do seu volume e completando com glicerol. Todas as amostras foram misturadas no Vortex e guardadas à uma temperatura de -20°C.

Após a transformação, foi realizada a extração do plasmídeo pBS através do rompimento da membrana da bactéria pelo protocolo QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) da empresa QIAGEN.

Clonagem do gene da serpina no plasmídeo pET 28a(+)

O plasmídeo pBS contendo o gene da serpina, e o plasmídeo pET 28a(+), foram clivados pelas enzimas NDE I e Hind III, seguindo o protocolo de clivagem FastDigest® da empresa Fermentas, no sítios de restrição que estão sublinhados a seguir: sentido 5' CAT ATG GCT CGA TCA CCT 3' e anti-senso 5' AAG CTT TCA TTG TGC AGT 3'. No plasmídeo pBS a clivagem foi feita para separar o gene da serpina do restante do plasmídeo, enquanto no pET 28a(+) ela foi feita para tirar uma parte de menos de 100 pares de bases do plasmídeo, onde será ligado o gene da serpina.

Após o protocolo de clivagem, foi realizada uma eletroforese com gel de agarose, para separar o material clivado por tamanho. Esse gel foi cortado nas bandas desejadas e purificado utilizando o protocolo Cyclo-Pure Agarose Gel Extraction Kit da empresa Amresco®. A concentração das amostras purificadas foi medida em um NanoDrop 2000 utilizando comprimento de onda de 260 nm para fazer o protocolo de ligação Rapid DNA Ligation Kit da empresa Thermo, utilizando as proporções em massa de 3:1 e 1:3, onde o primeiro número indica a massa do inserto (gene da serpina), e o segundo número indica o vetor (pET).

O plasmídeo com o gene da serpina foi transformado em bactéria DH5α e cultivado em placa de LB - Ágar contendo kanamicina à 37°C. Depois de 20 horas, foi realizado um PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com todas as colônias para confirmar se o material resultante era o desejado, eliminando falso-positivo. As colônias que foram amplificadas com sucesso, foram cultivadas em placas de LB - Ágar contendo kanamicina e estocadas.

Transformação do plasmídeo pET 28a(+) na bactéria BL21

Foram preparadas bactérias competentes BL21 (linhagem DE3) utilizando cloreto de cálcio, de acordo com o livro “Condensed Protocols” páginas 58-59, para realizar a transformação com o plasmídeo pET contendo o gene da serpina que foi extraído da bactéria DH5α.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clonagem e Estocagem do plasmídeo contendo o gene da serpina

A clonagem foi realizada com sucesso utilizando as bactérias competentes preparadas com cloreto de cálcio. As bactérias transformadas foram colocadas em dois estoques diferentes, o primeiro foi feito em uma placa de LB-Ágar, e o segundo foi feito em um microtubo de 1,5 ml, preenchido com 30% de glicerol. Esses dois estoques foram feitos por segurança, caso algum fosse contaminado. As etapas seguintes foram feitas a partir da placa de LB-Ágar.

Clonagem do gene da serpina no plasmídeo pET 28a(+)

O gene da serpina do *Bacillus subtilis* foi adquirido dentro do plasmídeo pBS, que é um plasmídeo Estrigente (ocorre em pouca quantidade dentro da bactéria), mas para que a expressão da proteína fosse mais eficiente, foi necessário transferir o gene da serpina para o plasmídeo pET 28a(+). Esse plasmídeo foi escolhido porque, além de ser relaxado (ocorre em grande quantidade de cópias por bactéria), ele foi modificado em laboratório para ter um promotor de crescimento, que otimizasse a síntese de proteínas em uma região específica de seu DNA. Essa região tem uma sequência de nucleotídeos que são clivados pelas enzimas de restrição NDE I e Hind III.

O plasmídeo pBS teve que ser clivado pelas mesmas enzimas de restrição, para formar fragmentos compatíveis, que puderam ser ligados pela ação da enzima T4 DNA ligase. No protocolo FastDigest® da empresa Fermentas, o tempo que os plasmídeos deveriam ficar em contato com as enzimas de restrição era de 5 minutos, mas após várias tentativas sem sucesso, foi realizado o protocolo mudando o tempo de 5 para 60 minutos. Depois de terminado o protocolo, a amostra passou por uma eletroforese.

Na Figura 4 temos uma foto do gel de agarose após a eletroforese:

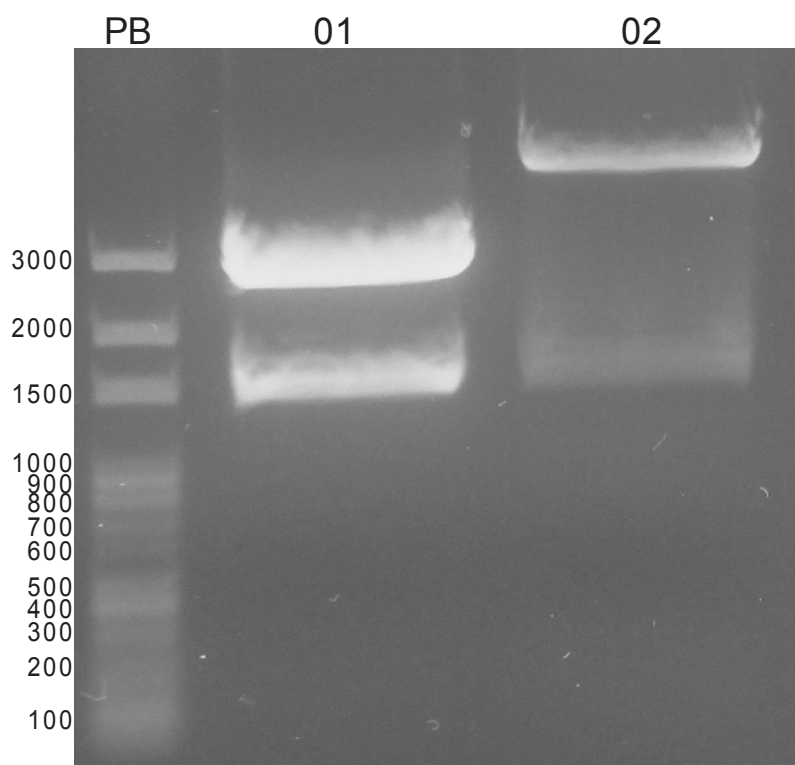


Figura 4. A notação PB indica os Pares de Bases. Na coluna 01, na banda de aproximadamente 1500 está o gene da serpina, e na banda de 3000 está o restante do plasmídeo pBS. Na coluna 02 na banda de aproximadamente 1500 está o gene da serpina, e acima de 3000 se encontra o pET 28a(+).

A análise confirmou um resultado positivo da clivagem, pois apareceu uma banda na região de 1500 pares de bases, que é o tamanho do gene da serpina, e uma banda na região de 3000 pares de bases, que é o DNA restante do plasmídeo.

Após processo de clivagem, foi realizado a ligação do gene da serpina com o plasmídeo pET 28a(+) linearizado. A ligação sugerida pelo protocolo Rapid DNA Ligation Kit da empresa Thermo era realizada durante 5 minutos em um banho de água a 22°C, mas após várias tentativas que deram errado, essas condições foram alteradas para 24 horas -4°C, utilizando o dobro da quantidade da enzima T4 DNA ligase dito no protocolo.

Imediatamente depois de realizar o protocolo de ligação, os plasmídeos foram transformados em bactéria DH5α competentes e semeados em placas de LB-Ágar contendo o antibiótico

kanamicina, porque quando o plasmídeo pET 28a(+) consegue infectar a bactéria, ele induz resistência a esse antibiótico.

Após o crescimento de colônias nas placas, foi retirado a metade de cada colônia que cresceu para a realização do PCR, a fim de verificar se a sequência de DNA desejada estava realmente dentro do plasmídeo.

O PCR foi realizado segundo as condições da tabela 1;

Tabela 1: Programação do Termociclador para a realização do PCR

Sequência	Temperatura (°C)	Tempo
1	95	02:00
2c	95	00:30
3c	51	00:30
4c	72	01:30
5	72	07:00
6	04	00:00

A sequência 2, 3,4 foi repetida em ciclo trinta vezes antes de iniciar o passo 5.

Quando todas as etapas foram realizadas, as amostras foram aplicadas em um Gel de Agarose para a realização da Eletroforese, a fim de verificar se o gene desejado foi amplificado.

Na Figura 5 temos o resultado de uma eletroforese feitas depois do PCR.

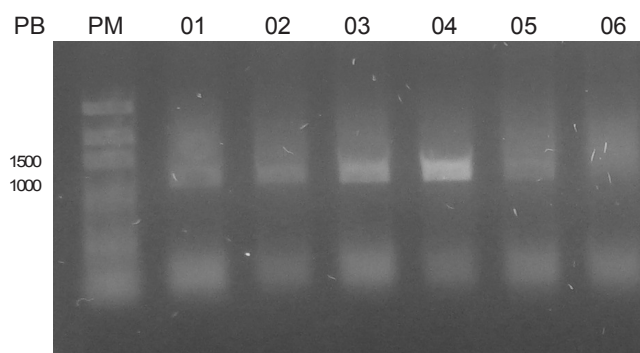


Figura 5. Eletroforese das amostras amplificadas em gel de agarose. As amostras de 01 à 06, representam o resultado do PCR das seis colônias diferentes que cresceram na placa após a transformação. A banda mais brilhante entre 1000 e 1500 da coluna 04, informa um resultado positivo da amplificação.

Como mostra a figura 5, das seis colônias que cresceram na placa, apenas a colônia número quatro amplificou corretamente o gene da serpina. Esta colônia foi semeada em uma nova placa de LB – Ágar contendo kanamicina e estocada à -4 °C.

Transformação do plasmídeo pET 28a(+) na bactéria BL21

O plasmídeo foi extraído da bactéria DH5a e transformado na bactéria BL21 competentes, através dos mesmos protocolos de extração e transformação descritos anteriormente. As amostras foram semeadas em placas contendo os antibióticos kanamicina e clorofenicol diluídos mil vezes em LB – Ágar à temperatura ambiente. Após 24 horas na estufa, uma colônia foi retirada e cultivada em uma nova placa com os mesmos antibióticos, e estocada à 4°C.

CONCLUSÃO

Apesar das dificuldades na realização dos protocolos de ligação e transformação, que tiveram que ser modificados, foi possível alterar o DNA das bactérias visando a produção de proteínas recombinantes, portanto os objetivos deste projeto foram alcançados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sambrook, Joseph. **The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory PR
- Bock SC, Wion KL, Vehar GA, Lawn RM (1982). Cloning and expression of the cDNA for human antithrombin III. *Nucleic Acids Res* 10 (24), 8113-25.
- Chen VC, Chao L, Chao J (2000). Roles of the P1, P2, and P3 residues in determining inhibitory specificity of kallistatin toward human tissue kallikrein. *J Biol Chem.* 2000 275(49), 38457-66.

- Fonseca FP, Ike PT, Assis DM, Icimoto MY, Juliano MA, Juliano L, Puzer L, Henrique-Silva F (2011). Leviserpin: a serine peptidase inhibitor (Serpine) from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. *Protein J*
- Gettins PG (2002). Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chem Rev.* 102, 4751-4803.
- Hunt LT, Dayhoff MO (1980). A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 95 (2), 864-71
- Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC (2000). Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* 10, 1845.
- Irving JA, Steenbakkens PJ, Lesk AM, Op den Camp HJ, Pike RN, Whisstock JC (2002). Serpins in prokaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1881.
- Irving JA, Cabrita LD, Rossjohn J, Pike RN, Bottomley SP, Whisstock JC (2003). The 1.5 Å crystal structure of a prokaryote serpin: controlling conformational change in a heated environment. *Structure* 11, 387.
- Luo Ly, Jiang W (2006). Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors, *Biol. Chem.* 387, 813.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 378, 705-716.
- Roberts TH, Hejgaard J, Saunders NF, Cavicchioli R, Curmi PM (2004). Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution. *J. Mol. Evol.* 59, 437.
- Whisstock JC, Skinner R, Carrell RW, Lesk AM (2000). Conformational Changes in Serpins: I. The Native and Cleaved Conformations of α1-Antitrypsin. *J Mol Biol.* 296, 685-699.