

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM QUÍMICA

CLONAGEM DE UMA ECOTINA DE *Klebsiella pneumoniae*

Aluno: William Oyadomari
Orientador: Prof. Dr. Luciano Puzer

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM QUÍMICA

CLONAGEM DE UMA ECOTINA DE *Klebsiella pneumoniae*

Assinatura do aluno: William Oyadomari

Assinatura do orientador: Luciano Puzer

Ecotinas pertencem a uma família de inibidores de proteases limitadas a bactérias e protozoários. Em bactérias, apesar de algumas poucas exceções, proteínas ecotinas-*like* são encontradas nas diferentes espécies de proteobactérias, especialmente na subdivisão gama. A primeira ecotina foi isolada a partir de extratos de *Escherichia coli* e caracterizada como uma proteína de 38 kDa resistente à fervura e estável em pH 1,0, que inibiu a tripsina, quimotripsina e elastase pancreática (Chung *et al.*, 1983). Posteriormente outros trabalhos surgiram mostrando a capacidade dessas proteínas para inibir a ação de enzimas como o fator Xa e elastase de neutrófilos humanos (Seymour *et al.*, 1994); calicreína plasmática, uroquinase e fator XII (Ulmer *et al.*, 1995); colagenase e granzima B (Tsu *et al.*, 1997). Além disso, recentemente mostrou-se que ecotinas podem contribuir para a patogenicidade da *Yersinia pseudotuberculosis* pela inibição de serino proteases do hospedeiro (Clark *et al.*, 2011).

Atualmente sabe-se que as ecotinas apresentam uma estrutura dimérica onde cada monômero tem cerca de 120 resíduos de aminoácidos (Shin *et al.*, 1996). Desta forma, as ecotinas são capazes de interagir com duas proteases ao mesmo tempo, formando uma estrutura tetradimérica (Figura 1). As ecotinas possuem uma alça, chamada alça do centro reativo, responsável pela interação com o sítio de catálise da protease. A especificidade primária pela alça do centro reativo, nas ecotinas, parece não representar um fator determinante para a inibição. A posição P1 dessa alça, que é a posição ocupada pelo aminoácido cuja ligação peptídica será clivada pela protease, é ocupada por um resíduo de Met que, a princípio, seria um fator impeditivo para a interação com enzimas do tipo tripsina-*like*, que preferem resíduos básicos nessa posição P1, como Arg e Lys. No entanto, a ecotina isolada de *E. coli* possui um $K_i = 0,91$ nM para a inibição da tripsina de rato. Mutações sítio dirigidas nessa posição, substituindo a Met por Arg, Lys, Phe e Trp, modificou o valor de K_i para 0,4 nM, 0,6

nM, 4,4 nM e 2,2 nM, respectivamente (Yang *et al.*, 1998). Além disso, as ecotinas possuem um segundo sítio de ligação que interage com um sítio alostérico na estrutura da protease e que, desta forma, auxilia na especificidade enzima-inibidor.

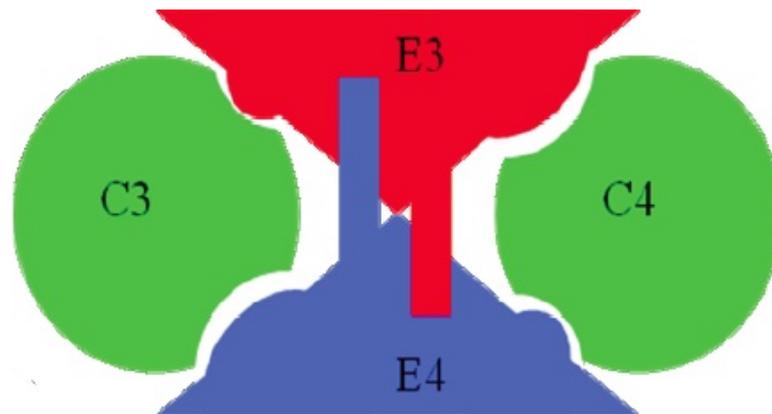


Figura 1 - Representação do tetrâmero formado por duas moléculas de quimiotripsina (verde) e os dois monômeros de ecotina (vermelho e azul). Adaptado de Clark *et al.*, 2011.

Uma busca preliminar nos 920 genomas bacterianos sequenciados até maio de 2011 mostrou a presença de 86 ORFs que codificam para ecotinas nesses microorganismos. A figura 2 apresenta o alinhamento da estrutura primária de ecotinas presentes em *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Aeromonas salmonicida*, *Burkholderia glumae*, *Campylobacter hominis* e *Klebsiella pneumoniae*, onde é possível verificar a região de interação com o sítio de clivagem da protease e a região que interage com o sítio alostérico da enzima. Ambas as regiões possuem aminoácidos bem conservados, que devem ser importantes na orientação da interação, e regiões com diversidade de aminoácidos, que são essenciais para garantir diferentes especificidades frente a diferentes enzimas.

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 ecotina

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 3µL de ampicilina, foi colocada 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% de seu volume e completando com glicerol. Todas as amostras foram misturadas no Vortex e guardadas a 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 ecotina no plasmídeo pET 28a(+)

O plasmídeo pBS contendo o gene da ecotina e o plasmídeo pET 28a(+), foram clivados pelas enzimas NDE I e Hind III, seguindo o protocolo de clivagem FastDigest® da empresa Fermentas, nos sítios de restrição que estão sublinhados a seguir: sense 5' CAT ATG CAA GCA TCC ATT 3' e anti-sense 5' AAG CTT TCA CAG CTT GAT 3'. No pBS a clivagem foi feita para separar o gene da ecotina 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 ecotina.

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 ecotina), e o segundo número indica o vetor (pET).

O plasmídeo com o gene da ecotina 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 é o desejado, eliminando falso-positivo. As colônias que geraram um resultado positivo depois da amplificação foram cultivadas em placas de LB - Ágar contendo kanamicina e estocadas.

O PCR foi realizado segundo as condições da tabela 1.

Tabela 1: Programação do Termociclador para realizar o PCR

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

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 ecotina que foi extraído da bactéria DH5 α .

Expressão da ecotina do *Klebsiella pneumoniae*

Em 5mL de cultura LB líquido, foi realizado um pré-inóculo de uma colônia da placa de agar com as células transformadas. Essa cultura foi mantida à 37°C sob agitação de 240 rpm. Após 16 horas, diluiu-se uma alíquota de 500 μ L do pré-inóculo em 50 mL do mesmo meio contendo o antibiótico kanamicina 50 μ g/mL. Esta cultura foi mantida à 37°C sob agitação de 240 rpm até atingir a densidade óptica de 0,5 à 600 nm, quando então, foi adicionado a este meio IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (Amresco) para uma concentração final de 1mM, que foi mantido por mais 6 horas sob as mesmas condições. Foram retiradas alíquotas de 1 mL das culturas não-induzida e induzida após 1, 2, 3, 4, 10 e 20 horas. As alíquotas foram centrifugadas em uma centrífuga Sorval – Legend Micro 17 R por 1 minuto à 13000 rpm, e submetidas a SDS-PAGE 12,5% (eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clonagem e Estocagem do plasmídeo contendo o gene da ecotina

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 ecotina no plasmídeo pET 28a(+)

O gene da ecotina do *Klebsiella pneumoniae* foi adquirido dentro do plasmídeo pBS, que é um plasmídeo estringente (ocorre em pouca quantidade dentro da bactéria), mas para que a expressão da proteína fosse mais eficiente, foi necessário transferir o gene da ecotina 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 promove 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 3 é apresentada uma foto do gel de agarose após a eletroforese.

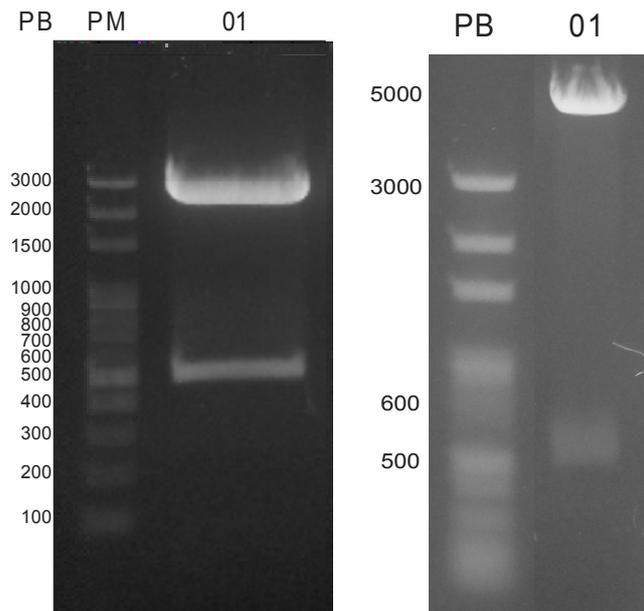


Figura 3: 2 geis de agarose após a clivagem com as enzimas de restrição. Na primeira figura, a amostra 01 representa o plasmídeo pBS, na região de 500 pares de bases está a ecotina, e na região de 3000 pares de bases está o que sobrou do plasmídeo pBS após a clivagem. Na figura 2, a amostra 01 representa o plasmídeo pET, na região de aproximadamente 500 pares de bases está a ecotina, e na região de aproximadamente 5000 pares de bases está o que sobrou do pET após a clivagem.

A foto confirmou um resultado positivo da clivagem, pois apareceu uma banda na região de 500 pares de bases, que é o tamanho do gene da ecotina, 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 ecotina 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.

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, o plasmídeo foi extraído de dentro da bactéria DH5 α para a realização do PCR, a fim de verificar se a sequência de DNA desejada estava realmente dentro do plasmídeo.

A Figura 4 mostra o resultado de uma eletroforese com as amostras do PCR.

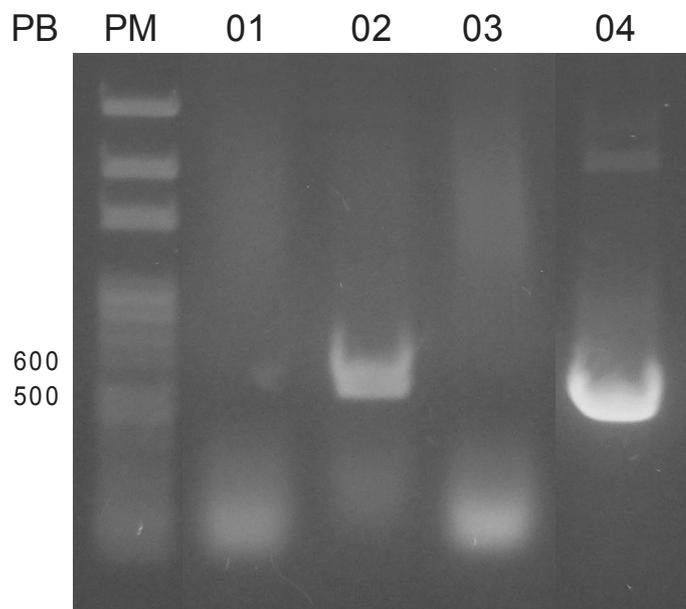


Figura 4: Foto das amostras após a realização do PCR, a amostra 04 é o controle positivo, e as amostras 01, 02 e 03 são as colônias de bactérias amplificadas. Apenas a amostra 02 amplificou corretamente a ecotina, que aparece na banda entre 500 e 600 pares de bases.

A colônia que amplificou corretamente o gene da ecotina foi semeada em uma nova placa de LB-Ágar contendo kanamicina, e estocada a 4°C.

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

O plasmídeo foi extraído da bactéria DH5 α e transformado na bactéria BL21 competente, 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 a 4 °C.

Expressão da ecotina do *Klebsiella pneumoniae*

Foi realizado uma eletroforese com gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE 12,5%, com alíquotas retiradas da cultura induzida e não-induzida com IPTG, depois de 4 e 20 horas, para comparar o efeito do tempo e da indução sobre a expressão da ecotina.

Na Figura 5 temos o resultado de uma eletroforese em gel de poliacrilamida.

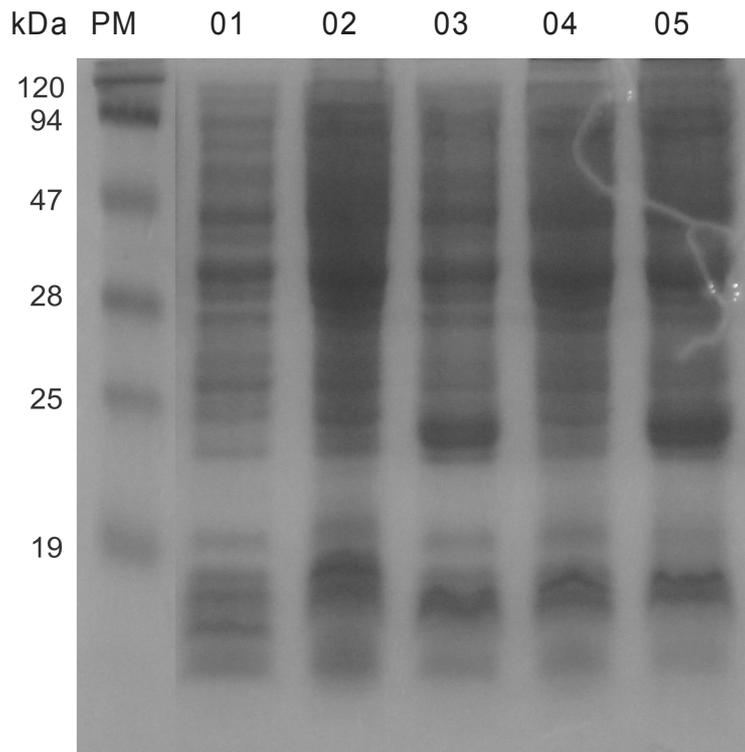


Figura 5: A imagem mostra o gel de poliacrilamida depois da eletroforese. A amostra 01 foi retirada do meio com a bactéria BL21 inicialmente. A amostra 02 foi retirada depois de 4h não-induzido. A amostra 03 foi retirada depois de 4h induzido. A amostra 04 foi retirada depois de 20h não-induzido. A amostra 05 foi retirada depois de 20h induzido. A massa da ecotina é de aproximadamente 22,2 Kda, então ela aparece no gel logo abaixo da banda de 25 Kda.

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 atingidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sambrook, Joseph. The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory PR
- Clark EA, Walker N, Ford DC, Cooper IA, Oyston PC, Acharya KR (2011). Molecular recognition of chymotrypsin by the serine protease inhibitor ecotin from *Yersinia pestis* J Biol Chem.
- Chung CH, Ives HE, Almeda S, Goldberg AL (1983). Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. J Biol Chem. 258 (18), 11032.
- Kantyka T, Rawlings ND, Potempa J (2010). Prokaryote-derived protein inhibitors of peptidases: A sketchy occurrence and mostly unknown function. Biochimie. 92 (11), 1644.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. Biochem J 378, 705.
- Seymour JL, Lindquist RN, Dennis MS, Moffat B, Yansura D, Reilly D, Wessinger ME, Lazarus RA (1994). Ecotin is a potent anticoagulant and reversible tight-binding inhibitor of factor Xa. Biochemistry 33, 3949.
- Shin DH, Song HK, Seong IS, Lee CS, Chung CH, Suh SW (1996). Crystal structure analyses of uncomplexed ecotin in two crystal forms: implications for its function and stability. Protein Sci. 5 (11), 2236.
- Tsu CA, Perona JJ, Fletterick RJ, Craik CS (1997). Structural basis for the broad substrate specificity of fiddler crab collagenolytic serine protease 1. Biochemistry 36, 5393.

Ulmer JS, Lindquist RN, Dennis MS, Lazarus RA (1995). Ecotin is a potent inhibitor of the contact system proteases factor XIIa and plasma kallikrein. *FEBS Lett.* 365, 159.

Yang SQ, Wang CI, Gillmor SA, Fletterick RJ, Craik CS (1998). Ecotin: a serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites. *J Mol Biol.* 279 (4), 945.