FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

Alexandre Yuji Uchina

Seleção de inibidores de quimotripsina a partir de uma biblioteca de *phage display* baseada no gene *SPINK5*

Trabalho de Conclusão de Curso

Santo André – SP

2019

Alexandre Yuji Uchina

Seleção de inibidores de quimotripsina a partir de uma biblioteca de *phage display* baseada no gene *SPINK5*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal do ABC, junto a Disciplina NANHT4046-15SA Trabalho de Conclusão de Curso em Química, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Puzer

Santo André – SP

2019

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Uchina, Alexandre Yuji
Seleção de inibidores de quimotripsina a partir de uma biblioteca de phage display baseada no gene SPINK5 / Alexandre Yuji Uchina. — 2019.

27 fls. : il.

Orientador: Luciano Puzer

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC, Bacharelado em Química, Santo André, 2019.

1. Biologia molecular. 2. Phage display. 3. Inibidor enzimático. I. Puzer, Luciano. II. Bacharelado em Química, 2019. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Kátia e Rogério, que sempre incentivaram a educação e me apoiaram em minhas decisões.

Aos meus irmãos, Flávio e Lucy, futuros formandos da UFABC, pela ajuda e apoio, pois também sabem como é difícil a graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Puzer, por ter me aceitado como aluno e confiado este projeto a mim.

Ao Dr. Marcelo Zani e Me. Aquiles Sant'Ana, pois este projeto só foi possível por causa do apoio, dos ensinamentos e da paciência deles.

Ao pessoal do Laboratório 107 de Biologia Molecular, Iasmin, Ingrid e Rafael, pela valiosa ajuda.

A todos que contribuíram para que eu chegasse aqui de alguma forma, pois foram longos 7 anos de graduação.

RESUMO

O gene humano *SPINK5* é responsável pela codificação do LEKTI, um inibidor da serino-protease Calicreína 7 (KLK7), que atua no processo de descamação natural da pele. Polimorfismos do *SPINK5* podem levar a problemas na regulação da atividade da KLK7, resultando em dermatites, psoríases e, em casos mais severos, na síndrome de Netherton. Com o objetivo de selecionar potentes inibidores para a KLK7, foram realizadas mutações aleatórias nas posições P1 a P2' do domínio 15 do *SPINK5*, utilizando *Overlap Extension Polymerase Chain Reaction* (OE-PCR), gerando fragmentos de DNA distintos. Estes fragmentos de DNA foram inseridos num vetor de clonagem, e estes inseridos em bacteriófagos, gerando a biblioteca de fagos. Para a seleção dos melhores inibidores, foram realizadas três rodadas de *biopanning* utilizando quimotripsina como antígeno, selecionando cinco variantes, as quais foram purificadas, amplificadas e sequenciadas.

Palavras-chave: *SPINK5*, calicreína, *Phage display*, *biopanning*

ABSTRACT

The human gene *SPINK5* is responsible for the LEKTI's codification, an inhibitor for the serine-protease Kallikrein 7 (KLK7), which plays a role in the natural skin desquamation. Polymorphisms of SPINK5 can lead to KLK7's regulatory activity problems, resulting in dermatitis, psoriasis and, in more severe cases, the Netherton syndrome. For the purpose of selecting potent inhibitors for the KLK7, random mutations were performed at P1 to P2' positions of domain 15 of *SPINK5* gene through Overlap Extension Polymerase Chain Reaction (OE-PCR), generating different DNA fragments. These DNA fragments were inserted into a cloning vector, and these were inserted into bacteriophages, generating the phage library. To select the best inhibitors, three rounds of biopanning were performed using chymotrypsin as antigen, selecting five variants, which were purified, amplified and sequenced.

Keywords*: SPINK5,* kallikrein, Phage display, biopanning

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 7
1.1. A calicreína tecidual humana 7
1.2. Gene *SPINK5* 7
1.3. *Phage display* 8
1.4. Plasmídeo pHAL30 10
2. OBJETIVOS 12
3. MATERIAIS E MÉTODOS 12
3.1. Lista de soluções específicas 12
3.2. Construção da biblioteca de fagos 13
3.3. *Biopanning* 15
3.4. *Master Plate*, *Production Plate* e estoque 17
3.5. Ensaio imunoenzimático ELISA 18
3.6. Sequenciamento 19
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 20
4.1. Ensaio imunoenzimático ELISA 20
4.2. Sequenciamento 23
5. CONCLUSÃO 25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 26

1. INTRODUÇÃO

1.1. A calicreína tecidual humana

A família das calicreínas teciduais humanas compreende 15 serino-proteases (KLK1 a KLK15), expressas em diversos tecidos e órgãos, como pele, próstata e ovários, sendo responsáveis por diversas funções fisiológicas no corpo humano (YOUSEF, 2001; CLEMENTS, 2004).

Dentre elas, a calicreína 7 (KLK7) é majoritariamente expressa na pele por células do tecido epitelial (queratinócitos), no estrato granuloso, migrando para o estrato córneo, onde atua no processo de descamação da pele. Possui especificidade semelhante a quimotripsina (quimotripsina-*like*), já que prefere substratos com resíduos aromáticos na posição P1, como tirosina e fenilalanina (FARADY, 2013).

A KLK7 atua na proteólise da corneodesmosina e desmocolina (FARADY,2013), proteínas que compõem o corneodesmossomo, estrutura responsável pela adesão das camadas mais externas da pele (CATARINO, 2015).

A função da KLK7 é fundamental para manter a homeostase da pele, garantindo um equilíbrio entre a descamação e renovação das células epiteliais. Para tal, a atividade da KLK7 é regulada por inibidores endógenos, dentre eles o LEKTI (*Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*), inibidor codificado pelo gene humano *SPINK5* (FARADY, 2013).

1.2. Gene *SPINK5*

O gene humano *SPINK5*, localizado no cromossomo humano 5, é responsável pela codificação do LEKTI. Esta proteína possui 15 domínios, cada um deles exibindo atividade inibitória diferente, inibindo desde tripsina e quimotripsina a KLK5 e KLK7 (DERAISON, 2007).

Especificamente na epiderme, o LEKTI é encontrado junto com a KLK7 no estrato granuloso e córneo da epiderme, camadas mais superficiais da pele. A inibição da KLK7 ocorre na camada mais profunda do estrato córneo, onde o pH varia entre 6,8 e 7,5, e o LEKTI encontra-se associado a KLK7. Conforme migra para a superfície, o valor do pH torna-se mais ácido e o LEKTI dissocia-se da KLK7, deixando-a livre para realizar a proteólise (VIEIRA, 2018).

Polimorfismos do gene podem levar a condições fisiológicas anormais, como dermatites e atopia, e, em casos mais severos, na Síndrome de Netherton.

A Síndrome de Netherton é uma condição autossômica recessiva, caracterizada por ictiose congênita, atopias e anormalidades nos fios capilares. Possui alta mortalidade no período pós-natal, devido ao alto risco de infecções e desidratação hipernatrêmica (CHAVANAS, 2000).

1.3. *Phage display*

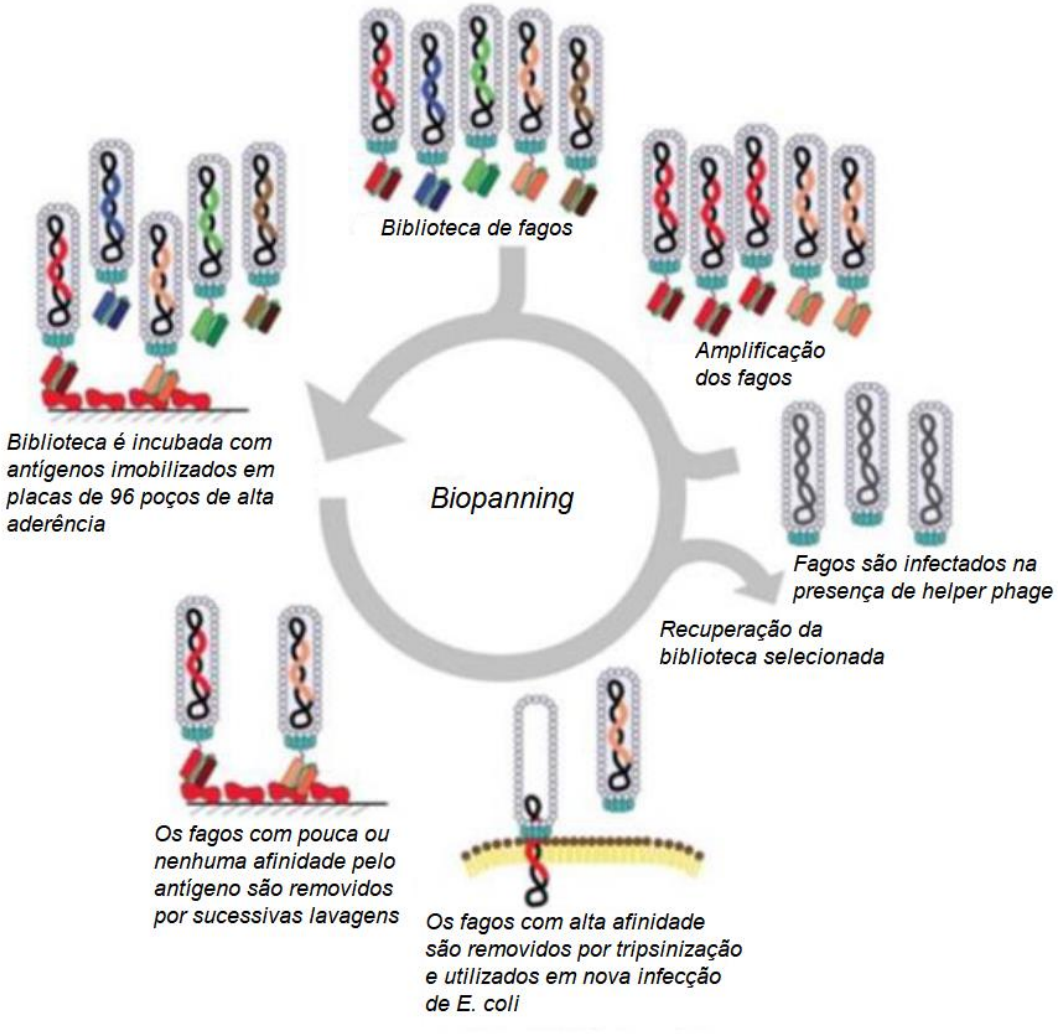
A técnica de *phage display* foi desenvolvida em 1985, por George Smith, como uma forma de expressar polipeptídeos ligados às proteínas do capsídeo viral de bacteriófagos filamentosos (BAZAN, 2012). O desenvolvimento do *phage display* rendeu a George Smith o prêmio Nobel de Química de 2018.

Como a expressão desses peptídeos está ligado ao genótipo inserido no bacteriófago, a técnica permite a criação de uma biblioteca de fagos contendo diferentes variedades de um peptídeo (BAZAN, 2012). Geralmente, a criação de uma biblioteca está associada a um processo de seleção por afinidade química entre a proteína expressa e o peptídeo alvo, conhecido como *biopanning* (FRENZEL, 2016). O procedimento resumido pode ser observado na figura 1.

A técnica *phage display*, associada ao processo de *biopanning*, tem sido utilizada para o desenvolvimento de diversos medicamentos, especialmente anticorpos monoclonais, como Humira (Abbot Laboratories), Benlysta e ABthrax (GlaxoSmithKline), já aprovados para uso em tratamentos, além de diversos outros em fase de testes (FRENZEL, 2016).

Da mesma forma, este trabalho é uma das etapas do desenvolvimento de possíveis novos medicamentos, voltado ao tratamento de algumas patologias dermatológicas, como dermatites atópicas e a Síndrome de Netherton.

Figura 1: fluxograma do processo de *biopanning*.



Fonte: modificado de Frenzel (2016).

Neste trabalho, serão geradas mutações aleatórias no domínio 15 do gene *SPINK5* (*SPINK5.15*), nas posições P1 a P2' do LEKTI (figura 2), estas inseridas no vetor de clonagem pHAL30 e, posteriormente, expressadas no bacteriófago M13 (figura 3), gerando a biblioteca de fagos.

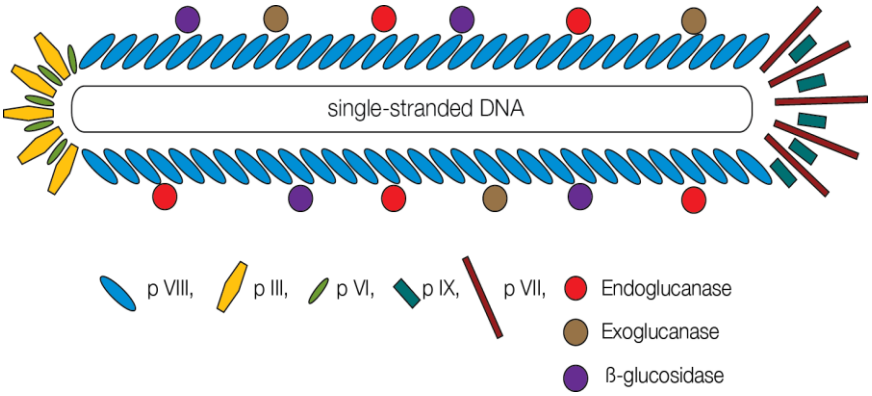
Figura 2: sequência de aminoácidos do LEKTI original, com destaque para os aminoácidos onde serão inseridas as mutações.

P1 P1' P2'

LEKTI SLDSEMCKDYRVLPRIGYLCP**KDL**KPVCGDDGQTYNNPCML
CHENLIRQTNTHIRSTGKCEE

Fonte: autoria própria.

Figura 3: estrutura do bacteriófago M13.



Fonte: iGEM Edinburgh[1].

Para a seleção dos melhores inibidores, serão feitas três rodadas de *biopanning* utilizando a quimotripsina como antígeno, devido a atividade quimotrispina-*like* da KLK7.

1.4. Plasmídeo pHAL30

O vetor de clonagem pHAL30 foi desenvolvido no Instituto de Bioquímica, Biotecnologia e Bioinformática da Technische Universität Braunschweig por Hust e colaboradores, utilizando como base o vetor pHAL14, com o objetivo de gerar uma biblioteca de anticorpos dos genes humanos HAL9 e HAL10 (KÜGLER, 2015).

O pHAL30 é formado por aproximadamente 4200 pares de bases nitrogenadas, contendo genes e sequências específicas de nucleotídeos, apresentados no quadro 1, que o tornam apropriados para o uso em construção de bibliotecas genômicas e a posterior seleção destas. A organização dos genes na estrutura circular e na região de inserção da construção do *SPINK5* podem ser visualizadas nas figuras 4 e 5, respectivamente.

Quadro 1: genes e sequências de nucleotídeos presentes no pHAL30 e suas funções.

(continua)

Gene ou sequência	**Função**
bla	Gene codificador da β-lactamase, que confere resistência a antibióticos β-lactâmicos, como a ampicilina
LacZ *promoter*	Mecanismo de regulação gênica, sendo utilizado como promotor para indução do inibidor

[1] Disponível em <http://2011.igem.org/Team:Edinburgh/Phage_Display>. Acesso em mar. 2019.

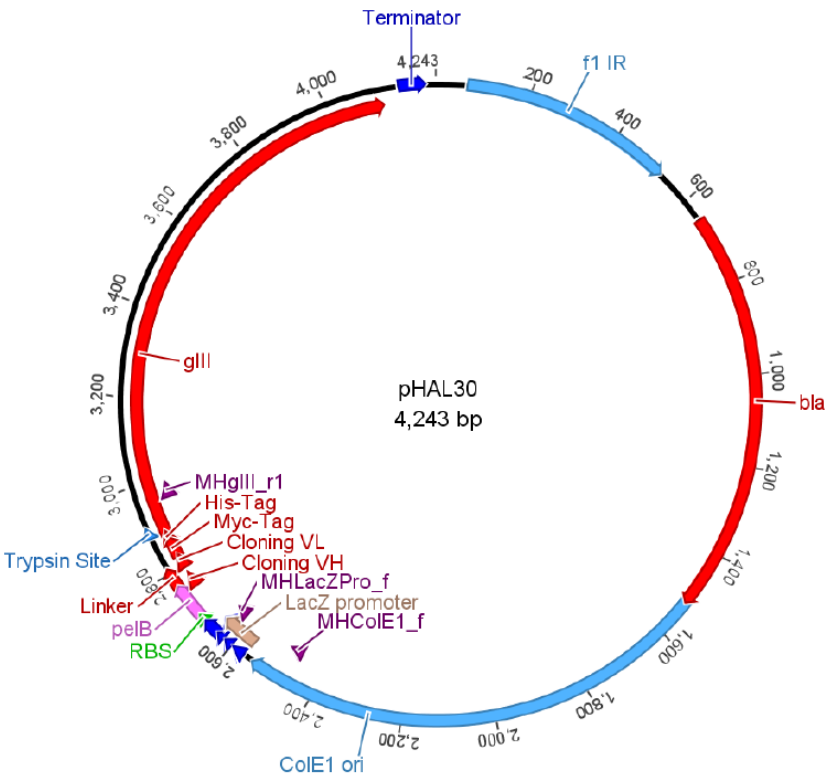
Quadro 1: genes e sequências de nucleotídeos presentes no pHAL30 e suas funções.

(continuação)

Gene ou sequência	Função
RBS	Sítio de ligação ribossomal
pelB	Gene codificador da pectato liase B, peptídeo sinalizador para a proteína migrar para o periplasma da bactéria (*Escherichia coli*)
Myc-Tag	Sequência específica de aminoácidos que possibilitam o reconhecimento do peptídeo por anticorpos específicos, utilizado em ensaios como ELISA
His-Tag	Sequência contendo 6 histidinas, para posterior purificação do peptídeo
Trypsin Site	Sítio de clivagem por tripsina, onde o peptídeo de interesse será separado da proteína pIII do capsídeo viral
gIII	Gene codificador da proteína pIII do capsídeo viral do bacteriófago M13

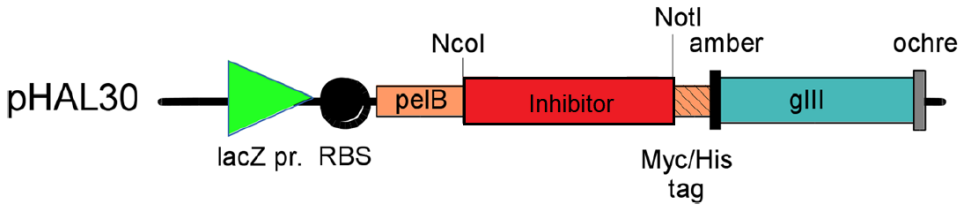
Fonte: autoria própria.

Figura 4: estrutura circular do pHAL30.



Fonte: Zani (2018).

Figura 5: esquemático da região de inserção do gene do inibidor no pHAL30.



Fonte: modificado de Kügler et al (2015).

É importante ressaltar que o pHAL30 não possui genes para montagem de novos fagos a partir da infecção de bactérias, sendo necessário o uso de um *Helper Phage* para esse fim.

O *Helper Phage* é um bacteriófago geneticamente modificado, possuindo todos os genes para codificação das proteínas de um capsídeo completo, porém sua origem de replicação ou o gene de empacotamento é propositalmente defeituosa (GANTEN, 2006). Assim, a maioria das partículas de M13 possuem o pHAL30 empacotado, ao invés do material genéticos do *Helper Phage*.

2. OBJETIVOS

- Geração de uma biblioteca de fagos com inibidores da protease KLK7;
- Seleção dos melhores inibidores da biblioteca através do *biopanning* e
- Clonagem, expressão e testes com os inibidores selecionados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Lista de soluções específicas

- 10xGA: solução 1 M de glicose (Sigma-Aldrich) e ampicilina 1 $mg.mL^{-1}$ (Sigma-Aldrich), autoclavado
- 2xYT: solução 1,6% de triptona (Kasvi), 1% de extrato de levedura (Kasvi) e 0,5% de NaCl (Sigma-Aldrich), autoclavado
- $2xYT_{(S)}$: solução 1,6% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 1,5% de ágar (Amresco Inc.), autoclavado
- $2xYT_{(S)}$-A: $2xYT_{(S)}$ com ampicilina 50 $\mu g.mL^{-1}$
- 2xYT-AK: 2xYT com ampicilina 100 $\mu g.mL^{-1}$ e canamicina 50 $\mu g.mL^{-1}$ (Sigma-Aldrich)
- 2xYT-GA: 2xYT com glicose 100 mM e ampicilina 100 $\mu g.mL^{-1}$

- 2xYT-GAT: 2xYT com glicose 100 mM, ampicilina 100 $\mu g.mL^{-1}$ e tetraciclina 25 $\mu g.mL^{-1}$ (Sigma-Aldrich)
- 2xYT-KAT: 2xYT com canamicina 50 $\mu g.mL^{-1}$, ampicilina 100 $\mu g.mL^{-1}$ e tetraciclina 25 $\mu g.mL^{-1}$
- *Blocking*: solução 2% de leite em pó sem gordura (Nestlé Molico) em PBS
- LB: solução 2% de LB Broth (Sigma-Aldrich), autoclavado
- *Panning block*: solução 1% de leite em pó sem gordura e 1% de BSA (Sigma-Aldrich) em PBS
- PBS: solução 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl (Amresco Inc.), 1,44 g de $Na_2HPO_4.2H_2O$ (Sigma-Aldrich) e 0,24 g KH_2PO_4 (USB Corporation) em 1 L de água deionizada, filtrado (0,45 µm)
- PBS-T 0,1%: solução de PBS adicionada de 0,1% de Tween 20 (Amresco Inc.)
- PBS-T 0,05%: solução de PBS adicionada de 0,05% de Tween 20
- PEG/NaCl: solução 20% de PEG 6000 (Sigma-Aldrich) e 14,6% de NaCl
- MPBS-T 2%: solução de PBS-T 0,1% adicionada de 2% de leite em pó
- *Phage dilution buffer* (PDB): solução tris 10 mM (Synth), NaCl 20 mM e EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich), pH 7,5
- TMB: 19 partes de TMB A e 1 parte de TMB B
- TMB A: 10 g de ácido cítrico (Vetec Química), 9,73 g de citrato de potássio (Vetec Química) em 1 L de água deionizada
- TMB B: 240 mg de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich), 907 µL de H_2O_2 30% (Metaquímica), 10 mL de acetona (Dinâmica Química) e 90 mL de etanol (Merck)

3.2. Construção da biblioteca de fagos

O domínio 15 do gene *SPINK5* (*SPINK5.15*) sofre mutações pontuais aleatórias em três códons: K, D e L (Lys 22, Asp 23 e Leu 24), gerando assim uma biblioteca do fragmento *SPINK5.15*. As mutações foram realizadas através de reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando oligonucleotídeos (*primers*) específicos, conforme mostrado no quadro 2. Três reações de PCR foram realizadas num termociclador *Infinigen Civic TC-96CG* (*Avans Biotechnology, Taipei - TWN*): a primeira utilizou os *primers* SPINK5.15-For e MHgIII-R, gerando um fragmento do domínio 15 contendo as mutações desejadas; a

segunda utilizou os *primers* SPINK5.15-Rev e MHLacZ-Pro_F, gerando um segundo fragmento contendo as mutações; e a terceira reação foi um *Overlap Extension* PCR (OE-PCR) utilizando os fragmentos das duas primeiras reações como molde e os *primers* MHLacZ-Pro_F e MHgIII-R para amplificar todo o domínio 15 contendo as mutações da biblioteca. A primeira e segunda reação de PCR utilizaram como DNA molde a sequência do domínio 15 inserida no vetor pHAL30, que contém o sítio para os oligos MHLacZ-Pro_F e MHgIII-R.

Quadro 2: *primers* utilizados para realizar a mutação no domínio 15 do gene *SPINK5*, gerando a biblioteca *SPINK5.15*.

Primer	**Sequência (5' - 3')**	**T_M***
SPINK5.15-For	TAT CTT TGT CCA NNN NNN NNN AAG CCT GTC TGT GGT	64,8 °C
SPINK5.15-Rev	ACC ACA GAC AGG CTT NNN NNN NNN TGG ACA AAG ATA	64,8 °C
MHLacZ-Pro_F	GGC TCG TAT GTT GTC TGG	54,9 °C
MHgIII-R	CTA AAG TTT TGT CGT CTT TCC	51,7 °C

* No caso dos oligos SPINK5.15-For e SPINK5.15-Rev, o T_M é o valor médio das possíveis sequências.

Fonte: autoria própria.

Após a amplificação, as sequências da biblioteca *SPINK5.15* foram tratadas com as enzimas de restrição NcoI e NotI (New England BioLabs Inc.), assim como o vetor pHAL30. As reações de digestão com as enzimas de restrição utilizaram cerca de 3 μg de DNA cada, e posteriormente purificadas com o *kit* de purificação de PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Utilizando os fragmentos digeridos, foi realizada uma reação de ligação do vetor pHAL30 com as sequências da biblioteca *SPINK5.15*, em uma proporção 3:1 de molaridade. A reação de ligação foi purificada para a retirada de todo o sal utilizando o PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), e eluída em água livre de DNase e RNase. Células de *E. coli* XL-1 *Blue* MRF' foram transformadas com a reação de ligação via eletroporação, utilizando 2500 V, 25 C, 200 Ω em cubeta de 2 mm. Para tal, foram utilizados 20 μL de reação de ligação em 50 μL de células.

As células transformadas foram cultivadas em meio 2xYT$_{(S)}$-GAT, a 37 °C por 20 horas. As colônias cultivadas foram recuperadas da placa com 1 mL de meio LB e estocadas em glicerol 25% para congelamento em -80 °C.

Utilizou-se 0,5 mL de células transformadas para inocular 400 mL de meio 2xYT-GAT, com crescimento até OD_{600} = 0,5, a 37 °C sob 200 rpm de agitação. Desse crescimento, 50 mL foram utilizados para a infecção com o *Helper Phage* M13K07 (Sigma-Aldrich) em proporção MOI 1:20 (*Multiplicity of Infection*). A infecção foi incubada a 37 °C por 30 minutos sem agitação e a 37 °C por 30 minutos com 200 rpm de agitação. As células infectadas foram recuperadas por centrifugação (3220 g por 10 minutos) e ressuspendidas em meio 2xYT-KAT e cultivado em 400 mL de meio 2xYT-KAT a 30 °C sob 200 rpm de agitação por 20 horas para a produção da biblioteca de fagos *SPINK5.15*.

O cultivado foi centrifugado (10000 g a 4 °C por 20 minutos) e o sobrenadante (cerca de 300 mL) incubado com 60 mL de solução PEG/NaCl a 4 °C por 20 horas (1ª precipitação). A 1ª precipitação foi centrifugada (10000 g a 4 °C por 1 hora), os *pellets* ressuspendidos em 10 mL de solução PDB, e novamente centrifugados (20000 g a 4 °C por 10 minutos). O sobrenadante foi filtrado (0,45 µm) para remoção de bactérias residuais e incubado com 2 mL de solução PEG/NaCl em gelo sob agitação por 30 minutos (2ª precipitação). A 2ª precipitação foi centrifugada (20000 g a 4 °C por 30 minutos) e o *pellet* ressuspendido em solução PDB com volume final de 1 mL, contendo a biblioteca de fagos *SPINK5.15*, pronta para o *biopanning*.

3.3. *Biopanning*

Uma placa de poliestireno de alta aderência foi utilizada no *biopanning*, sendo usados dois poços, um para o antígeno e o outro para solução de *panning block*. A quimotripsina foi utilizada como antígeno devido a semelhanças na atividade desta com a KLK7, sendo que, posteriormente, os inibidores selecionados serão testados contra a calicreína.

No primeiro poço, foram adicionados 5 µg de quimotripsina (Sigma-Aldrich) em 150 µL de PBS e, no segundo, 300 µL de solução de *panning block*. A placa foi incubada *overnight* a 4 ˚C.

Para o *panning*, foram descartados os conteúdos dos poços. No poço de antígeno, foram adicionados 300 µL de solução de *blocking* e no poço do *panning block*, 100 µL da

biblioteca de fagos (aproximadamente $5x10^{11}$ fagos) em 150 µL de solução *panning block*. Incubada por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação de 500 rpm.

Após o tempo de incubação, foi efetuada a lavagem do poço de antígeno com PBS-T 0,1% e transferido o conteúdo do poço com os fagos para o poço de antígeno. Incubado por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação de 500 rpm.

Novamente, o poço de antígeno foi lavado com PBS-T 0,1%, de modo a eluir os fagos que não ficaram aderidos a quimotripsina. Para eluição dos fagos que ficaram aderidos ao antígeno, foi feita incubação com 1,5 µg de tripsina (Sigma-Aldrich) em 150 µL de PBS por 30 minutos a 37 ˚C sob agitação de 500 rpm.

O eluído foi então adicionado a 150 µL de crescimento de *E. coli* TG1 (OD_{600} = 0,5) para infecção viral, incubado por 30 minutos a 37 ˚C sem agitação e, em seguida, por mais 30 minutos a 37 ˚C sob agitação de 200 rpm.

Para multiplicação das bactérias infectadas, foi adicionado 1 mL de meio 2xTY e 150 µL de solução 10xGA. A ampicilina seleciona somente as bactérias que foram infectadas, enquanto a glicose inibe a síntese do peptídeo alvo. Incubado novamente a 37 ˚C sob agitação de 200 rpm até que OD_{600} atingisse valor entre 0,4 e 0,5, levando aproximadamente 1 hora.

Para a formação de novas partículas virais, foi adicionado 50 µL de *Helper Phage* M13K07 (Sigma-Aldrich), aproximadamente 10^{10} partículas virais, incubado por 30 minutos a 37 ˚C sem agitação e, em seguida, por mais 30 minutos a 37 ˚C sob agitação de 200 rpm.

Em seguida, o meio foi centrifugado a 3220 g por 10 minutos, descartado o sobrenadante e ao *pellet* adicionado 950 µL de 2xTY-AK, sendo que os antibióticos ampicilina e canamicina são para a seleção de bactérias infectadas com o pHAL30 e o *Helper Phage*, respectivamente. Incubado *overnight* a 30 ˚C sob agitação de 200 rpm para multiplicação viral.

Após 24 horas, o meio foi centrifugado a 3220 g por 10 minutos e coletado o sobrenadante. Este sobrenadante foi então utilizado para uma nova rodada de *panning*, e assim procedido da mesma maneira nas duas rodadas subsequentes, sendo que o mesmo procedimento para preparação do pré-inóculo e da placa de *panning* foram adotados, conforme descrito anteriormente. Ao final da última rodada, o sobrenadante da multiplicação viral foi coletado e armazenado a 4 ˚C.

3.4. *Master Plate*, *Production Plate* e estoque

Com os fagos selecionados, foi efetuada uma titulação para contagem de partículas virais, diluindo o sobrenadante da última rodada do *panning* em $1:10^3$, $1:10^5$, $1:10^7$ e $1:10^9$, utilizando PDB, e infectando células de *E. coli* TG1 (OD_{600} = 0,5). Foram misturados 10 µL de cada diluição viral a 50 µL de células e incubados a 37 ˚C por 30 minutos. As misturas foram plaqueadas em uma placa de Petri com meio $2xYT_{(S)}$-A, aplicando três gotas de 10 µL para cada diluição, e incubando *overnight* a 37 ˚C.

A diluição $1:10^7$ apresentou contagem de colônias muito alta, enquanto a diluição $1:10^9$ apresentou uma contagem muito baixa. Foi então efetuada uma diluição de $1:10^8$, e esta utilizada para infectar 50 µL de células de *E. coli* TG1, conforme descrito anteriormente. O plaqueamento foi realizado em placa de Petri com meio sólido $2xYT_{(S)}$-A novamente, porém a mistura foi espalhada (*streaking*) por todo o meio, com o intuito de isolar colônias de genótipos diferentes. Incubada *overnight* a 37 ˚C.

A partir do crescimento das colônias, foi montada a *Master Plate* para crescimento das variantes selecionadas de forma isolada, utilizando uma placa de polipropileno de 96 poços profundos. À exceção dos controles negativos e positivos, foram adicionados 150 µL de 2xYT-GA em cada poço e uma das colônias do plaqueamento, coletadas manualmente da placa com o auxílio de ponteiras de pipeta. No controle negativo (H3 e H6), foi adicionado somente 150 µL de meio 2xYT-GA, enquanto no controle positivo (H9 e H12) foram adicionados 150 µL de meio 2xYT e uma colônia de TG1 não infectada. A placa foi incubada *overnight* a 37 ˚C sob agitação de 200 rpm.

A partir da *Master Plate*, foram montadas a placa de estoque e a *Production Plate*, esta última para uso em ensaios enzimáticos.

Para a geração da *Production Plate*, é necessária a indução da produção da proteína para realizar testes enzimáticos. Para tal, foram adicionados 180 µL de 2xYT-GA e 20 µL de cada poço da *Master Plate* aos poços da *Production Plate*, exceto para os controles positivos (H9 e H12), nos quais o meio adicionado não possuía ampicilina nem glicose. A placa foi incubada a 37 ˚C sob agitação de 200 rpm por 1 hora e meia, seguida de centrifugação por 10 minutos a 1600 g, temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado, e, em seguida, foram adicionados 180 µL de 2xYT-A e IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) (Calbiochem) o suficiente para que a concentração em solução

ficasse 50 µM, exceto nos controles positivos, onde o meio foi adicionado sem ampicilina. A placa foi incubada *overnight* a 30 ˚C sob agitação de 200 rpm para uso no dia seguinte.

A placa de estoque foi montada a partir do volume remanescente da *Master Plate*, aproximadamente 130 µL, sendo adicionados 45 µL de glicerol 80% autoclavado (Synth) em cada poço, resultando numa concentração final de 20% de glicerol. A placa foi coberta com filme adesivo selador e armazenada a -80 ˚C.

3.5. Ensaio imunoenzimático ELISA

Para teste de afinidade com o antígeno, foi efetuado um teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) indireto, utilizando quimotripsina como antígeno, Anti-Myc e Anti-IgG (Thermo Fisher Scientific) como anticorpos primário e secundário, respectivamente, sendo que este último vem conjugado a peroxidase para revelação com cromóforo (TMB).

Uma placa de 96 poços de alta aderência de poliestireno, numerados de A1 a H12, foi utilizada para ELISA, preparada no dia anterior ao ensaio revestindo-se a placa com 20 ng de quimotripsina solubilizados em 100 µL de PBS por poço, exceto pelo controle positivo, onde 20 ng de KLK7 foram solubilizados em 100 µL de PBS. Incubada *overnight* a 4 ˚C.

No dia do ensaio, os poços foram lavados com PBS-T 0,05%. Foi feita uma incubação com MPBS-T 2% por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação de 500 rpm e na sequência, efetuada nova lavagem com PBS-T 0,05%.

Foram transferidos 5 µL da *Production Plate* ao seu respectivo poço na placa de ELISA, sendo avolumados para 100 µL com PBS. Nos controles positivos (H9 e H12), foram utilizados 5 ng de anticorpo produzido no próprio laboratório contendo o *Myc-tag*, como uma metodologia bem estabelecida, avolumados para 100 µL com PBS. Efetuada nova incubação por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação de 500 rpm e, na sequência, nova lavagem com PBS-T 0,05%.

Em seguida, foi feita incubação com 100 ng do anticorpo primário, solubilizados em 100 µL de PBS em cada poço, por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação de 500 rpm. Efetuada nova lavagem com PBS-T 0,05% e realizada uma nova incubação por 45 minutos à temperatura ambiente sob agitação de 500 rpm, utilizando 100 ng do anticorpo secundário solubilizado em 100 µL de PBS, seguida de lavagem com PBS-T 0,05%.

A revelação da placa foi feita incubando a mesma com 100 µL de TMB, durante 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando 100 µL de H_2SO_4 1 N (Dinâmica Química).

A leitura de absorção foi realizada no espectrofluorímetro de placas *Synergy HT* (*BioTek, Winooski - USA*), nos comprimentos de onda de 450 e 630 nm, obtendo A_{450} e A_{630} respectivamente.

3.6. Sequenciamento

Foram preparados pré-inóculos das variantes A3, A4, A5, A6 e C9, utilizando LB como meio de crescimento, e deixadas em incubação *overnight* a 37 ˚C e 200 rpm de agitação. Para isolamento dos plasmídeos e posterior sequenciamento, foi utilizado o kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich).

O procedimento inicia com a centrifugação dos pré-inóculos a 9800 g durante 20 minutos e temperatura ambiente, descartando o sobrenadante. Os *pellets* são ressuspendidos utilizando 200 µL da solução de ressuspensão do kit e homogeneizados em agitador vórtex.

As células ressuspendidas são lisadas com a adição de 200 µL de solução de lise e agitação leve, para não haver contaminação com DNA cromossomal, até que os meios fiquem viscosos. Foram precipitadas as misturas adicionando 350 µL de solução de neutralização/ligação, invertendo os tubos levemente de 4 a 6 vezes e centrifugando a 9800 g por 10 minutos, deixando um sobrenadante límpido nos tubos.

Durante a centrifugação, foram preparadas as colunas de ligação do kit (uma para cada amostra), inserindo a coluna de ligação GenElute Miniprep em um tubo de microcentrífuga. Foi eluído 500 µL da solução de preparação de coluna, centrifugando a 9800 g por 30 segundos e descartando o eluído.

Os sobrenadantes das lises foram adicionados às colunas e centrifugados a 9800 g por 30 segundos, descartando o eluído das colunas. Na sequência, foi adicionado 750 µL de solução de lavagem em cada coluna, as quais foram centrifugadas novamente a 9800 g por 1 minuto, descartado o eluído e realizada nova centrifugação, para retirar excesso de etanol.

As colunas são transferidas para um tubo de coleta, adicionado 100 µL de água livre de RNase e DNase e centrifugando os tubos a 9800 g por 1 minuto. O eluído foi coletado e quantificado.

Para amplificação do material genético obtido do Miniprep, foi realizado um PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Foram realizadas 2 reações para cada amostra, usando os *primers* MHLacZ-Pro_F e MHgIII-R. A preparação das amostras foi feita levando em consideração que a massa total de DNA nas reações deve ser entre 200 e 300 ng e a concentração dos primers 1 µM num volume total de 10 µL, avolumados com água livre de DNase e RNase.

Além das amostras de DNA e *primers*, foi utilizado o reagente BigDye (1x), da Thermo Fisher Scientific. Como o reagente é fotossensível, o preparo das amostras foi feito em sala com pouca iluminação.

Os parâmetros do termociclador utilizados no PCR foram, em ordem, 10 segundos a 96 ºC, 5 segundos a 50 ºC e 4 minutos a 60 ºC, repetindo este ciclo por 35 vezes.

Para precipitação do DNA, os fragmentos gerados de cada reação no PCR foram misturados em solução de 2 µL de acetato de sódio 3 M (Amresco Inc.) e 50 µL de etanol 95%, agitados em agitador vórtex e mantidos em repouso em temperatura ambiente por 15 minutos. Efetuada centrifugação a 9800 g por 20 minutos, descartando o sobrenadante, e ressuspendido em 200 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação a 9800 g por 5 minutos e descarte do sobrenadante.

No precipitado final não deve haver etanol, pois o mesmo interfere no procedimento de sequenciamento. As amostras foram armazenadas a -20 ˚C até o envio para sequenciamento na Genomic Engenharia Molecular (Rua Itapeva 500, 5º andar, conjunto 5AB, Bela Vista, São Paulo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

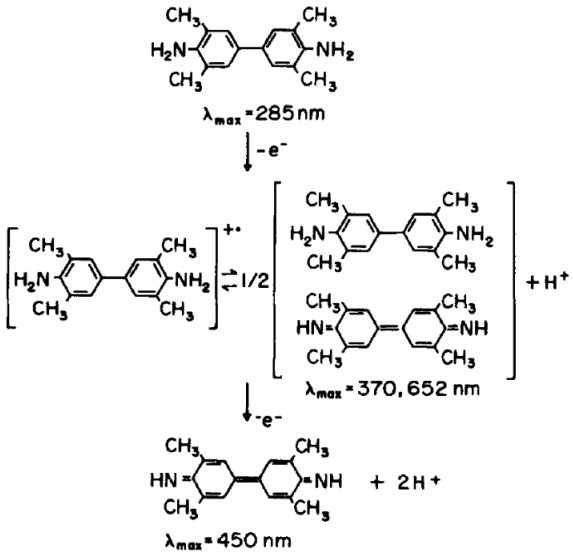
4.1. Ensaio imunoenzimático ELISA

O inibidor aderido ao antígeno possui um *Myc-tag* em sua porção final, assim o anticorpo primário *anti-Myc* reconhece esta sequência de aminoácidos, ligando-se a ele. Por sua vez, o anticorpo secundário reconhece o *anti-Myc*, ligando-se a este.

Após a adição do TMB, a peroxidase conjugada ao anticorpo secundário reduz o peróxido de hidrogênio a água, onde o TMB é oxidado a um complexo de transição de carga, atuando como doador de prótons e tornando a solução azul. O complexo formado possui absorção na faixa de 620 a 650 nm (JOSEPHY, 1982).

A interrupção da reação com ácido oxida o complexo formado anteriormente, gerando uma diimina estável em pH ácido, com absorção intensa em 450 nm (JOSEPH, 1982). A reação pode ser observada na figura 6.

Figura 6: estruturas do TMB nas etapas de oxidação.



Fonte: Josephy, 1982.

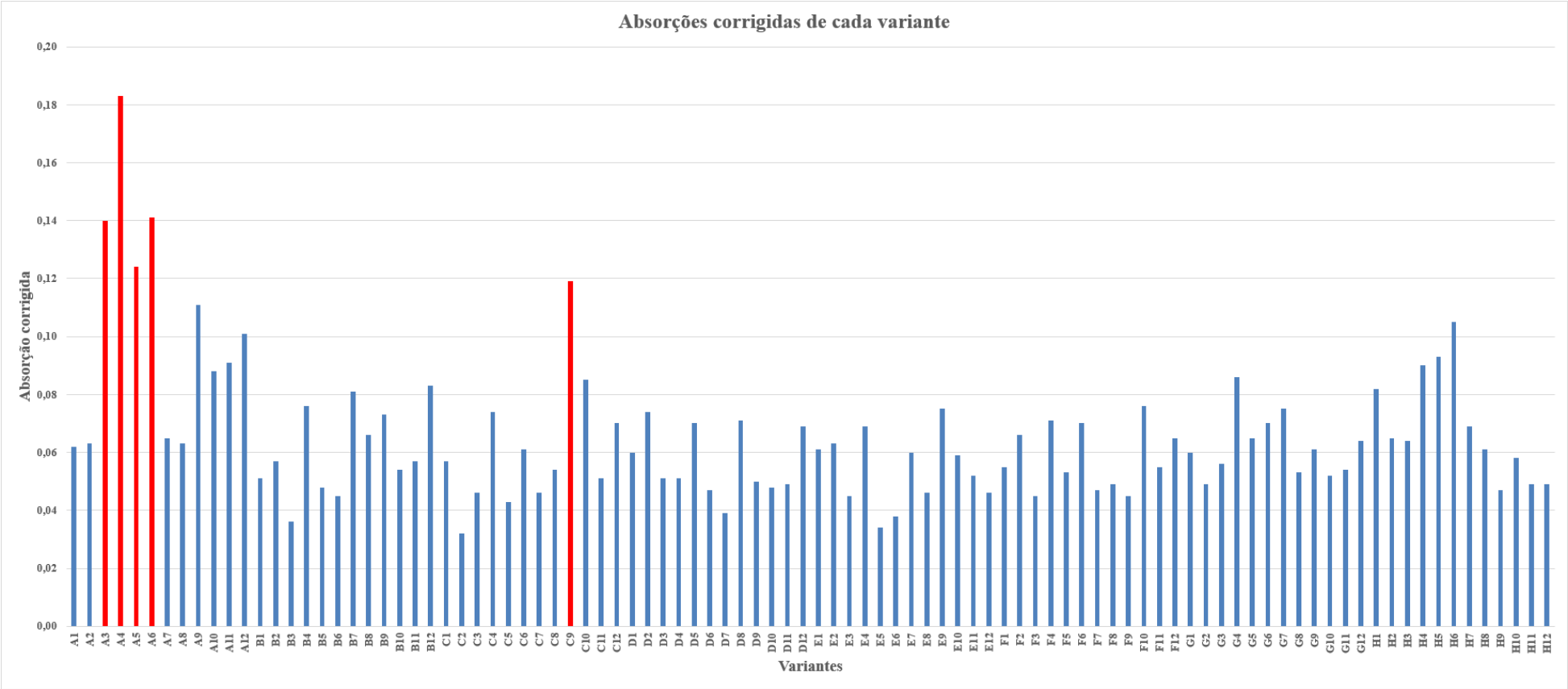
As absorções obtidas em 450 e 630 nm podem ser observadas na tabela 1. Foram efetuadas as correções das absorções calculando a diferença A_{450} - A_{630}, de modo a eliminar possíveis interferências, como sujeiras, digitais e poeiras, que absorvem igualmente em ambos os comprimentos de onda. Os resultados estão apresentados na figura 7, com destaque para as cinco variantes que apresentaram maior valor e foram posteriormente sequenciadas, sendo elas A3, A4, A5, A6 e C9.

Tabela 1: absorções obtidas no ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,103	0,106	0,186	0,226	0,168	0,185	0,106	0,132	0,152	0,13	0,133	0,142	450
	0,041	0,043	0,046	0,043	0,044	0,044	0,041	0,069	0,041	0,042	0,042	0,041	630
B	0,09	0,097	0,077	0,118	0,089	0,086	0,121	0,12	0,112	0,095	0,097	0,129	450
	0,039	0,04	0,041	0,042	0,041	0,041	0,04	0,054	0,039	0,041	0,04	0,046	630
C	0,099	0,077	0,088	0,115	0,095	0,105	0,184	0,096	0,161	0,128	0,094	0,116	450
	0,042	0,045	0,042	0,041	0,052	0,044	0,138	0,042	0,042	0,043	0,043	0,046	630
D	0,106	0,116	0,111	0,091	0,114	0,09	0,08	0,111	0,09	0,093	0,097	0,111	450
	0,046	0,042	0,06	0,04	0,044	0,043	0,041	0,04	0,04	0,045	0,048	0,042	630
E	0,108	0,103	0,089	0,116	0,077	0,082	0,104	0,087	0,118	0,1	0,096	0,096	450
	0,047	0,04	0,044	0,047	0,043	0,044	0,044	0,041	0,043	0,041	0,044	0,05	630
F	0,1	0,107	0,089	0,112	0,095	0,114	0,089	0,091	0,088	0,126	0,097	0,115	450
	0,045	0,041	0,044	0,041	0,042	0,044	0,042	0,042	0,043	0,05	0,042	0,05	630
G	0,1	0,09	0,107	0,126	0,111	0,114	0,126	0,095	0,099	0,094	0,096	0,106	450
	0,04	0,041	0,051	0,04	0,046	0,044	0,051	0,042	0,038	0,042	0,042	0,042	630
H	0,125	0,106	0,104	0,133	0,133	0,145	0,111	0,107	0,086	0,099	0,09	0,089	450
	0,043	0,041	0,04	0,043	0,04	0,04	0,042	0,046	0,039	0,041	0,041	0,04	630

Fonte: autoria própria.

Figura 7: gráfico das absorções corrigidas, com destaque para as variantes selecionadas.



Fonte: autoria própria.

É importante ressaltar que os resultados obtidos no ELISA podem indicar um valor mascarado de inibição, uma vez que cada variante carrega um gene diferente para produção de proteínas, a quantidade sintetizada não é igual para todas.

Dessa forma, pode haver um inibidor com melhores índices de inibição e que seja pouco produzido, bem como um inibidor pouco eficiente e produzido em grandes quantidades.

4.2. Sequenciamento

O eluído contendo o DNA plasmidial isolado (antes da amplificação) foi quantificado via *BioDrop Duo* (*BioDrop Ltd*, *Cambridge - UK*). Os resultados estão apresentados na tabela 2:

Tabela 2: concentrações de DNA plasmidial obtido das culturas de *E. coli*.

Amostra	**Concentração de DNA ($ng.\mu L^{-1}$)**
A3	80,03
A4	40,81
A5	61,41
A6	48,75
C9	72,51

Fonte: autoria própria.

Os resultados dos sequenciamentos obtidos podem ser vistos na figura 8, bem como a sequência original do *SPINK5.15*, alinhadas para comparação.

Figura 8: sequenciamento obtido para as variáveis selecionadas. Destacada em amarelo está a região onde foram inseridas as mutações; em letras vermelhas, os códons de parada. **A)** sequenciamento em bases nitrogenadas. **B)** sequência de aminoácidos codificados (X representa códon de parada).

```
A
SPINK5.15     AGCCTGGATAGCGAAATGTGTAAAGATTATCGTGTTCTGCCTCGCATTGGTTATCTTTGTCCA
   A5         AGCCTGGATAGCGAAATGTGTAAAGATTATCGTGTTCTGCCTCGCATTGGTTATCTTTGTCCA
   C9         AGCCTGGATAGCGAAATGTGTAAAGATTATCGTGTTCTGCCTCGCATTGGTTATCTTTGTCCA
   A3         TAATTAATTAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG-CGTATAAGTGAGTAGCGGCCG
   A4         TAATTAATTAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG-CGTATAAGTGAGTAGCGGCCG
   A6         TAATTAATTAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG-CGTATAAGTGAGTAGCGGCCG

SPINK5.15     AAGGATCTGAAGCCTGTCTGTGGTGATGATGGTCAGACCTATAACAATCCGTGTATGCTGTGT
   A5         TAATTAAGTAAGCCTGTCTGTGGTGATGATGGTCAGACCTATAACAATCCGTGTATGCTGTGT
   C9         TGAACTGAAAAGCCTGTCTGTGGTGATGATGGTCAGACCTATAACAATCCGTGTATGCTGTGT
   A3         CAGGTTCTG-ANC--------------------------------------------------
   A4         CAGGTTC--------------------------------------------------------
   A6         CAGGTTCT-------------------------------------------------------

SPINK5.15     CATGAAAATCTGATTCGTCAGACCAATACGCATATTCGTAGCACCGGTAAATGTGAGGAA
   A5         CATGAAAATCTGATTCGTCAGACCAATACGCATATTCGTAGCACCGGTAAATGTGAGGAA
   C9         CATGAAAATCTGATTCGTCAGACCAATACGCATATTCGNAGCNCCGGTAAATGTGAGGAA
   A3         ------------------------------------------------------------
   A4         ------------------------------------------------------------
   A6         ------------------------------------------------------------

B
 LEKTI        SLDSEMCKDYRVLPRIGYLCPKDLKPVCGDDGQTYNNPCMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEE
   A5         SLDSEMCKDYRVLPRIGYLCPXLSKPVCGDDGQTYNNPCMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEE
   C9         SLDSEMCKDYRVLPRIGYLCPXTEKPVCGDDGQTYNNPCMLCHENLIRQTNTHI-S-GKCEE
   A3         XLIKLEEGEFSEA-RISEXRPQVL
   A4         XLIKLEEGEFSEA-RISEXRPQV
   A6         XLIKLEEGEFSEA-RISEXRPQV
```

Fonte: autoria própria.

As variantes A3, A4 e A6 apresentaram sequenciamento idêntico ao pHAL30 puro, sem a construção *SPINK5.15* inseridas. Estas, em teoria, deveriam ter sido eliminadas com a solução de *panning block*, uma vez que não há especificidade quanto ao antígeno que se ligam.

Já as variantes A5 e C9 apresentaram a inserção do gene *SPINK5* com mutações, entretanto, na região que foram feitas as mutações, surgiram códons de parada, sendo o códon Ocre na variante A5 e Opala na C9. A linhagem de *E. coli* utilizada não é supressora destes códons, então a tradução do RNA_m é interrompida no meio da sequência do *SPINK5*, iniciando novamente ao encontrar um códon de iniciação ATG (metionina).

Dessa forma, somente um trecho do peptídeo do *SPINK5.15* é expressa ligada à proteína pIII do capsídeo viral. Como essas variantes foram selecionadas no *panning*, há a possibilidade de que o mecanismo e/ou sítio de inibição do *SPINK5.15* possam estar associados a este fragmento do gene, porém não foram encontrados em literatura tais informações, podendo ser alvo de estudos futuramente.

5. CONCLUSÃO

A presença de variantes com nenhuma inserção no plasmídeo e códons de parada precoces no gene mutado implicam em baixa eficiência no *biopanning* e/ou número insuficiente de rodadas. Mesmo utilizando soluções de *panning block* e *blocking*, peptídeos que teoricamente deveriam ser eliminados foram selecionados em contato com o antígeno.

Como próximos passos, serão efetuadas novas rodadas de *panning*, utilizando uma menor quantidade de antígeno, com o intuito de selecionar inibidores que se liguem de forma mais específica, bem como novos testes de ELISA e sequenciamentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAZAN, J.; CAŁKOSIŃSKI, I.; GAMIAN, A. **Phage display a powerful technique for immunotherapy**. Human Vaccines & Immunotherapeutics, v. 8, n. 12, p. 1817-1828, dezembro de 2012.

CATARINO, C. M. **Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo transwell e membrana polimérica**. 2015. 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CHAVANAS, S.; BODEMER, C.; ROCHAT, A.; HAMEL-TEILLAC, D.; ALI, M.; IRVINE, A. D.; BONAFÉ, J-L.; WILKINSON, A. T.; BARRANDON, Y.; HARPER, J. I.; DE PROST, Y.; HOVNANIAN, A. **Mutations in *SPINK5*, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome**. Nature genetics, v. 25, n. 2, p. 141-142, junho de 2000.

CLEMENTS, J. A.; WILLEMSEN, N. M.; MYERS, S. A.; DONG, Y. **The tissue Kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers**. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, v. 41, n. 3, p. 265-312, 2004.

DERAISON, C.; BONNART, C.; LOPEZ, F.; BESSON, C.; ROBINSON, R.; JAYAKUMAR, A.; WAGBERG, F.; BRATTSAND, M.; HACHEM, J. P.; LEONARDSSON, G.; HOVNANIAN, A. **LEKTI Fragments Specifically Inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and Control Desquamation through a pH-dependent Interaction**. Mol Biol Cell, v. 18, n. 9, p. 3607-3619, setembro de 2007.

FARADY, C.; MAYR, L. M.; KOLB, F. A. **Kallikrein-related Peptidase 7**. In: RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3rd ed. Elsevier Ltd., 2013, cap. 613, p. 2788-2792.

FRENZEL, A.; SCHIRMANN, T.; HUST, M. **Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy**. MAbs, v. 8, n. 7, p. 1177-1194, outubro de 2016.

GANTEN, D.; RUCKPAUL, K. **Helper Phage**. In: **Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine.** Berlim: Springer, 2005, v. 1, p. 753.

JOSEPHY, P. D.; ELING, T.; MASON, R. P. **The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine**. The Journal of Biological Chemistry, v. 257, n. 7, p. 3669-3675, abril de 1982.

KÜGLER, J.; WILKE, S.; MEIER, D.; TOMSZAK, F.; FRENZEL, A.; SCHIRRMANN, T.; DÜRBEL, S.; GARRITSEN, H.; HOCK, B.; TOLEIKIS, L.; SCHÜTTE, M.; HUST, M. **Generation and analysis of the improved human HAL9/10 antibody phage display libraries**. BMC Biotechnology, v. 15, n. 10, p. 1-15, fevereiro de 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D; W. **The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A laboratory manual**. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory. 2006.

VIEIRA, G. V. **Nocaute de LEKTI, através da utilização CRISPR/Cas9, em linhagem de queratinócito imortalizado**. 2018, 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

YOUSEF, G. M.; DIAMANDIS, E. P. **The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease**. Endocrine reviews, v. 22, n. 2, p. 184-204, abril de 2001.

YOUSEF, G. M.; DIAMANDIS, E. P. **Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers**. Clin Chem, v. 48, n. 8, p. 1198-1205, agosto de 2002.

ZANI, M. B. **Incorporação de um aminoácido fluorescente em serpinas para inibição de serino-proteases**. 2018, 100 f. Tese (Doutorado em Biossistemas) – Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2018.