

Clonagem molecular da proteína core do vírus da hepatite c em sistemas de expressão procarionte e eucarionte**Molecular cloning of the hepatitis c virus core protein in procaryionte and eukaryonite expression systems**

DOI:10.34117/bjdv6n7-658

Recebimento dos originais: 18/06/2020

Aceitação para publicação: 24/07/2020

Arnaldo Solheiro Bezerra

Graduado em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará - UECE

Instituição: Universidade Estadual do Ceará - UECE

E-mail: solheirobr@hotmail.com

Bruno Bezerra da Silva

Doutor em Biotecnologia da Saúde pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

Instituição: Universidade Estadual do Ceará – UECE

E-mail: brunoxbezerra@gmail.com

Lucelina da Silva Araújo

Doutora em Biotecnologia da Saúde pela Rede Nordeste de Biotecnologia -RENORBIO

Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE

E-mail: lucelinasaraujo@gmail.com

Eduarda Nattaly Ferreira Nobre Santos

Mestra em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal pela Universidade Estadual do Ceará - UECE

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

E-mail: nattalynobre@hotmail.com

Cícero Matheus Lima Amaral

Graduado em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará -UECE

Instituição: Universidade Estadual do Ceará – UECE

E-mail: cicero.matheus@hotmail.com

Antônio Hadson Bastos Neco

Graduando em Biotecnologia pela Universidade Federal do Ceará

Instituição: Universidade Federal do Ceará UFC

E-mail: hadsonbastos@hotmail.com

Maria Izabel Florindo Guedes

Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará - UFC

Instituição: Universidade Estadual do Ceará – UECE

E-mail: izabel.florindo@uece.br

RESUMO

A maioria dos casos de Hepatite C são assintomáticos e os sintomas aparecem quando a doença já apresenta comprometimento hepático. O presente trabalho objetivou a produção e purificação da proteína Core do vírus da Hepatite C (HCV) em sistema procarionte e sua subclonagem em vetores de expressão eucarionte. A bactéria *E. coli* foi selecionada para realizar a síntese da proteína de interesse, sendo esta purificada por cromatografia de afinidade e detectada por western blotting. Além disso, a sequência de interesse foi recombinada em plasmídeos para direcionamento a subcompartimentos da célula vegetal, sendo estes confirmados por PCR. Os processos realizados tiveram êxito e a posterior expressão nos diferentes compartimentos celulares possibilitará o melhor rendimento para a produção de imunógenos e viabilizar a produção de kit diagnóstico.

Palavras-chave: Hepatite C, Proteína Core, Tecnologia do DNA recombinante

ABSTRACT

Most cases of Hepatitis C are asymptomatic and symptoms appear when the disease is already hepatic. The present study aimed at the production and purification of the Hepatitis C virus core protein (HCV) in the prokaryotes system and its subcloning in eukaryonite expression vectors. The *E. coli* bacterium was selected to perform the synthesis of the protein of interest, which was purified by affinity chromatography and detected by western blotting. In addition, the sequence of interest was recombined in plasmids for targeting to plant cell sub-compartments, which were confirmed by PCR. The processes performed were successful and the subsequent expression in the different cell compartments will allow the best performance for the production of immunogens and enable the production of diagnostic kit.

Keywords: Hepatitis C, Core Protein, recombinant DNA Technology

1 INTRODUÇÃO

As hepatites virais constituem um conjunto de doenças que resultam em inflamação hepática aguda, porém somente as hepatites dos tipos B, C e D são capazes de evoluir para um quadro crônico, com progressão para cirrose e hepatocarcinoma (WHO, 2017).

No caso da hepatite C, cerca de 71 milhões de pessoas em todo o mundo possuem a forma crônica. A principal forma de transmissão é a infecção causada instrumentos perfurocortantes contaminados, como em acidentes de trabalho, no caso de profissionais da saúde, ou devido ao uso de drogas injetáveis. Globalmente os procedimentos de saúde inadequados são responsáveis por 5% dos novos casos, sendo estimados 1,75 milhão de novos casos por ano (WHO, 2017).

A maioria dos casos de Hepatite C são assintomáticos e os primeiros sintomas aparecem quando a doença já apresenta um elevado grau de comprometimento hepático, com possibilidade de evolução para fibrose, hepatocarcinoma e/ou cirrose. Atualmente, o diagnóstico é realizado por métodos imunológicos ou moleculares (ANSALDI *et al.*, 2014).

Apesar das limitações inerentes aos organismos procariontes, a bactéria *Escherichia coli* ainda apresenta-se como sistema de preferência para a produção de proteínas recombinantes (HUANG; LIN; YANG, 2012). Contudo, a produção de proteínas recombinantes em plantas, vem ganhando

destaque na produção de proteínas complexas, cujo escalonamento é facilitado pela ausência de endotoxinas e de patógenos humanos (TSCHOFEN *et al.*, 2016). O direcionamento celular é um fator chave na expressão de proteínas recombinantes em plataforma vegetal podendo impactar a expressão da proteína de interesse (GEISSLER *et al.*, 2018).

No intuito de produzir um kit de diagnóstico para a Hepatite C específico, sensível e de baixo custo, o presente trabalho buscou a produção de antígeno recombinante do vírus da Hepatite C em sistema procarionte e eucarionte, para seu posterior uso como imunógeno para a obtenção de anticorpos específicos contra o vírus.

2 METODOLOGIA

2.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DO CORE DO HCV EM SISTEMA DE EXPRESSÃO PROCARIONTE

Para a produção da proteína do core de HCV, um pré-inóculo de *E. coli* previamente transformada com plasmídeo recombinante foi preparado em meio LB (Lysogenic Broth) e diluído (1:25) em 1 L do mesmo meio de cultura. Ao atingir a densidade óptica de 0,7, as culturas foram induzidas pela adição de 0,5 mM do indutor isopropil β -D-1- tiogalactopiranosídeo (IPTG), sendo mantidas a 37 °C e sob agitação.

Após três horas, as culturas foram centrifugadas (8000 x g; 30' ; 4 °C) e o pellet bacteriano submetido ao processo de extração por ressuspensão em tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl, 20 mM de imidazol, pH 7,4). A esse tampão foram acrescentados 0,2 mg/mL de lisozima, 20 μ g/mL de DNase, 1 mM de MgCl₂ e 1 mM de PMSF (Sigma-Aldrich). O pellet ressuspendido foi então lisado em gelo com o auxílio de sonicador (15 pulsos de 20 segundos com 40 segundos de intervalo entre eles).

O extrato bacteriano obtido foi centrifugado (12000 x g; 40'; 4 °C) e o sobrenadante submetido à quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. Volume equivalente a 10 mg de proteínas totais foi aplicado em sistema de purificação por cromatografia de afinidade à metal imobilizado utilizando a coluna HisTrap FF Crude (GE Healthcare). As frações obtidas foram submetidas à análise por meio de SDS-PAGE e Western Blotting, sendo neste último empregado o uso de anticorpos policlonais anti-cauda de histidina (H1029; 1:5000) (Sigma-Aldrich) para a detecção das proteínas de interesse

2.2 RECOMBINAÇÃO DA PROTEÍNA DO CORE DO HCV EM VETORES EUCARIONTES BINÁRIOS COM DIRECIONAMENTO PARA DIFERENTES COMPARTIMENTOS DA CÉLULA VEGETAL

Para o direcionamento da proteína a diferentes compartimentos da célula vegetal, o gene de interesse foi recombinado em 5 versões do mesmo vetor de expressão, cada uma destas com sinalização para um dos seguintes compartimentos celulares: a) retículo endoplasmático; b) vacúolo; c) apoplasto; d) cloroplasto; e) citosol.

Para tanto, 100 ng do plasmídeo de clonagem foram utilizados para cada reação de recombinação utilizando a enzima LR Clonase (Gateway LR Clonase II Enzyme mix, Invitrogen), juntamente com 100 ng de cada um dos cinco vetores binários. Todo o volume da reação de recombinação foi então empregado para transformar células de *Escherichia coli* DH10b. Das colônias obtidas em cada placa, três foram selecionadas para confirmação utilizando a técnica de PCR. Para isso, cada uma das colônias foi inoculada e homogeneizada em 20 µL de água ultrapura estéril. A reação de PCR continha concentração final de 0,2 µM de cada primer, 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA Polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega) diluída no tampão de reação do fabricante. A cada reação foi adicionado 1,0 µL da colônia diluída em água estéril ou somente água (controle negativo). A amplificação do material seguiu a seguinte programação: 95 °C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos (95 °C – 30” / 60 °C – 60” / 72 °C – 60”) e extensão final de 72°C por 10 minutos.

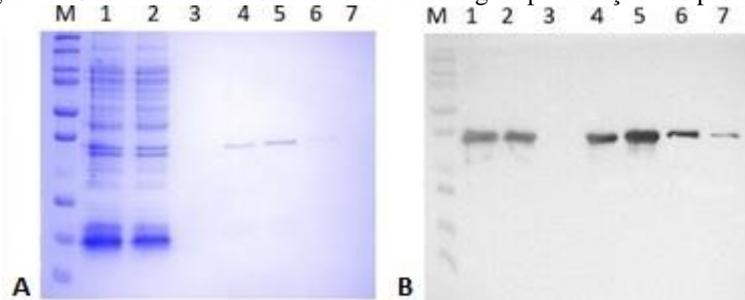
Os produtos de amplificação foram em seguida submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e então corados (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen) para sua visualização sob luz ultravioleta e fotodocumentação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DO CORE DO HCV EM SISTEMA DE EXPRESSÃO PROCARIONTE

Analisando os poços contendo as frações purificadas, pode-se observar a presença de uma banda única no peso molecular esperado, indicativo de que o processo de purificação baseado na cromatografia de afinidade da cauda de histidina ao níquel foi bem sucedida. No intuito de confirmar a identidade da proteína foi realizado um western blotting das frações isoladas com anticorpo específico para a cauda de histidina, uma vez que esta encontra-se conjugada em sua região N-terminal à cauda de histidina.

Figura 1: Gel de Eletroforese e Western Blotting da purificação das proteínas



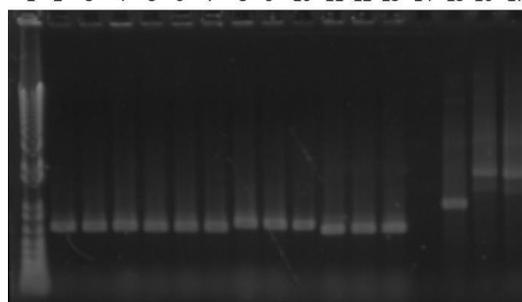
Nas figuras pode-se identificar 8 poços que possuem a sua distribuição da seguinte maneira. No primeiro poço se encontra o marcador de peso molecular, no segundo o extrato bruto das bactérias, no terceiro a fração não ligante e dos poços 4 - 8 são as frações purificadas de 1 - 5.

No estudo de Lorch e colaboradores (2018) as proteínas sintetizadas foram submetidas aos processos de eletroforese e western blotting para a sua caracterização. Após a confirmação, foi realizado a imunização de camundongos no intuito de avaliar a antigenicidade da proteína recombinante. A proteína produzida preservou suas características imunológicas, reafirmando o potencial da plataforma procarionte para a produção de imunógenos recombinantes.

3.2 RECOMBINAÇÃO DA PROTEÍNA DO CORE DO HCV EM VETORES EUKARIOTES BINÁRIOS COM DIRECIONAMENTO PARA DIFERENTES COMPARTIMENTOS DA CÉLULA VEGETAL

A análise por eletroforese em gel de agarose do produto de PCR das colônias recombinantes revela pequenas variações nas bandas resultantes dos produtos de amplificação em decorrência dos diferentes tipos de cauda de direcionamento celular empregadas (Figura 2). No primeiro poço o marcador de peso molecular, nos poços 2-4 estão os plasmídeos de direcionamento ao vacúolo, do 5-7 para o retículo endoplasmático, do 8-10 para o cloroplasto, do 11-13 para o apoplasto. As reações de controle podem ser visualizadas nos poços 14 (controle sem *template*), 15 (plasmídeo previamente recombinado com inserto distinto), 16 e 17 (plasmídeos nativos para direcionamento ao cloroplasto e ao retículo endoplasmático, respectivamente).

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificados para confirmação das colônias transformadas



No estudo de Nausch e colaboradores (2012) a proteína sintetizada foi testada em vários compartimentos celulares e o que apresentou melhor rendimento foi o retículo endoplasmático, este resultado fortalece a necessidade de averiguar a mesma condição para a proteína em questão.

4 CONCLUSÃO

Ao término do presente trabalho, foi possível a obtenção da proteína do core recombinante do vírus da hepatite C em sistema procarionte. Além disso, clonou-se essa proteína em vetores para direcionamento a diferentes compartimentos da célula vegetal, o que possibilitará no futuro otimizar a produção de imunógenos para o desenvolvimento de kit de diagnóstico específico, sensível e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

ANSALDI, F; ORSI, A.; STICCHI, L.; BRUZZONE, B.; ICARDI, G. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 29, p. 9633, 2014.

GEISLER, M; VOLK, J; STEHLE, F; KAYSER, O; WARZECHA, H. Subcellular localization defines modification and production of Δ 9-tetrahydrocannabinolic acid synthase in transiently transformed *Nicotiana benthamiana*. **Biotechnology letters**, v. 40, n. 6, p. 981-987, 2018.

HUANG, C.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383-399, 2012.

LORCH, M. S.; COLLADO, M. S.; ARGÜELLES, M. H.; ROTA, R. P.; SPINSANTI, L. I.; LOZANO, M. E.; GOÑI, S. E. Production of recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic flavivirus differential diagnosis. **Protein Expression and Purification**, 2018.

NAUSCH H, MIKSCHOFSKY H, KOSLOWSKI R, MEYER U, BROER I, HUCKAUF J. High-level transient expression of ER-targeted human interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48938, 2012.

TSCHOFEN, M.; KNOPP, D.; HOOD, E.; STOGER, E. Plant molecular farming: much more than medicines. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 9, p. 271-294, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global hepatitis report 2017. **World Health Organization**, 2017.