

CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

PROTEÍNAS RECOMBINANTES

“Expressão de SOD em E.Coli utilizando vetor pet28a(+)”

Alunos: Daniela Almeida da Silva RA: 11201811791

Rafael Nunes RA:11025216

Professor: Dr. Sérgio Sasaki

1. Introdução

Em nosso organismo há várias enzimas antioxidantes que atuam contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) e a superóxido dismutase (SOD) é uma destas enzimas. A SOD é uma enzima antioxidante que catalisa a desproporção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) transformando em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio menos reativo (H_2O_2), este último sendo posteriormente metabolizado pela catalase, as peroxidases e outros sequestrantes de oxigênio e de água evitando assim danos causados por radicais hidroxila. (BLACKNEY et al, 2014, SEA et al, 2014 e PANSARA et al, 2018).

A CuZnSOD ou SOD1 da família da SOD é encontrada no citosol, núcleo, peroxissomos e no meio intermembrana mitocondrial de células eucarióticas e no meio periplasmático de bactéria, a enzima humana é um homodímero de 32kDa com um sítio de ligação de cobre e zinco por subunidade de 153 aminoácidos (peso de 16kDa). (VALENTINE et al, 2005) A SOD mutante está relacionada com os mecanismos de toxicidade como o aumento de agregação, desestabilização de dímero e oligomerização.(PANSARA et al, 2018) A relação da enzima SOD1 com a doença esclerose lateral amiotrófica é fortemente estudada, sendo a esclerose lateral amiotrófica uma doença neurodegenerativa fatal caracterizada pela perda progressiva de neurônios motores no cérebro, tronco encefálico e medula espinhal, levando o paciente a ter paralisia e morrer dentro de alguns anos. (PANSARA et al, 2018)

Com isso, dada a importância desta enzima pretendemos avaliar a importância

dos metais relacionados diretamente a sua função, utilizando quelantes específicos para Cu e Zn para avaliar o desempenho da sua função em relação a presença ou ausência dos metais Cu e Zn que estão diretamente relacionados à sua estrutura e função.

2. Estrutura da proteína

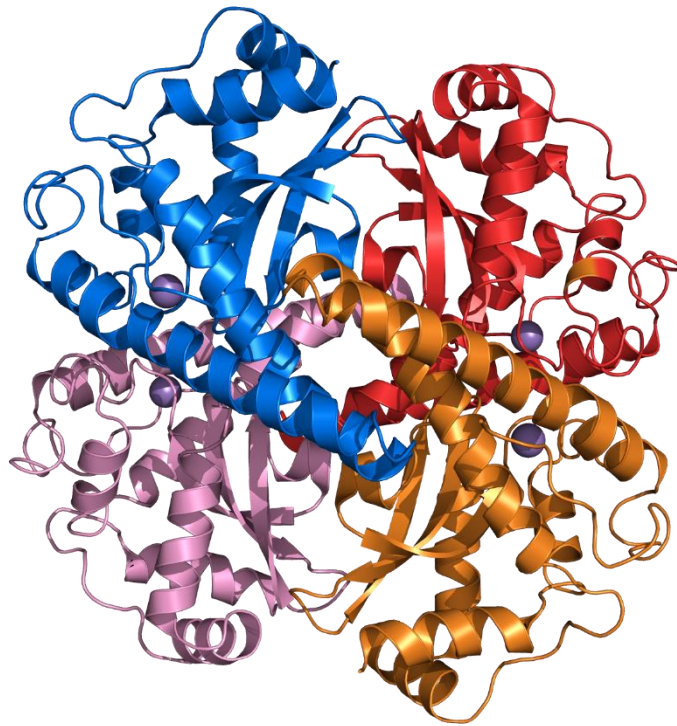


Imagem1: Estrutura tridimensional da superóxidodismutase.

2.1 Sequência da hSOD1 (mRNA)

```
GCGTCGTAGTCTCCTGCAGCGTCTGGGGTTTCCGTTGCAGTCCTCGGAACCAGGACCTCGGCG  
TGGCCTAGCGAGTTATGGCGACGAAGGCCGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCCAGTGCA  
GGGCATCATCAATTCGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATT  
AAAGGACTGACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATGAGTTTGGAGATAATACAGCAGG  
CTGTACCAGTGCAGGTCCTCACTTTAATCCTCTATCCAGAAAACACGGTGGGCCAAAGGATGA  
AGAGAGGCATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGCTGACAAAGATGGTGTGGCCGATGTG
```

TCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGGAGACCATTGCATCATTGGCCGCACACTGGTGG
TCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGCAAAGGTGGAAATGAAGAAAGTACAAAGACAGGAAA
CGCTGGAAGTCGTTTGGCTTGTGGTGTAAATTGGGATCGCCCAATAAACATTCCCTTGGATGTA
GTCTGAGGGCCCCTTAACTCATCTGTTATCCTGCTAGCTGTAGAAATGTATCCTGATAAACATTA
AACACTGTAATCTTAAAAGTGTAATTGTGTGACTTTTTTCAGAGTTGCTTTAAAGTACCTGTAGT
GAGAAACTGATTTATGATCACTTGGAAGATTTGTATAGTTTTATAAACTCAGTTAAATGTCT
GTTTCAATGACCTGTATTTTGCCAGACTTAATCACAGATGGGTATTAACTTGTGAGAATTTCT
TTGTCATTCAAGCCTGTGAATAAAAACCCTGTATGGCACTTATTATGAGGCTATTAAAGAATC
CAAATTCAACTAAA

Sequência retirada do GenBank da NCBI, número de acesso
NM_000454.5.

2.2 Sequência cDNA molde

ATG GCG ACG AAG GCC GTG TGC GTG CTG AAG GGC GAC GGC CCA GTG CAG GGC ATC ATC AAT
- A T K A V C V L K G D G P V Q G I I N
TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT
F E Q K E S N G P V K V W G S I K G L T
GAA GGC CTG CAT GGA TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT
E G L H G F H V H E F G D N T A G C T S
GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA AAG GAT GAA GAG AGG
A G P H F N P L S R K H G G P K D E E R
CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT GAC AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT
H V G D L G N V T A D K D G V A D V S I
GAA GAT TCT GTG ATC TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CGC ACA CTG GTG GTC
E D S V I S L S G D H C I I G R T L V V
CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT ACA AAG ACA GGA AAC
H E K A D D L G K G G N E E S T K T G N

GCT	GGA	AGT	CGT	TTG	GCT	TGT	GGT	GTA	ATT	GGG	ATC	GCC	CAA	TAA
A	G	S	R	L	A	C	G	V	I	G	I	A	Q	-

Sequência retirada do GenBank da NCBI, número de acesso CR541742.1.

3.Construção dos primers

3.1Análise de Restrição

Serão utilizadas as enzimas de restrição a seguir HindIII e XhoI. A análise de restrição não apresentou as sequências como representado na imagem 2.

HindIII

5'	A	↓	A	G	C	T	T	3'
3'	T	T	C	G	A	↑	A	5'

XhoI

5'	C	↓	T	C	G	A	G	3'
3'	G	A	G	C	T	↑	C	5'

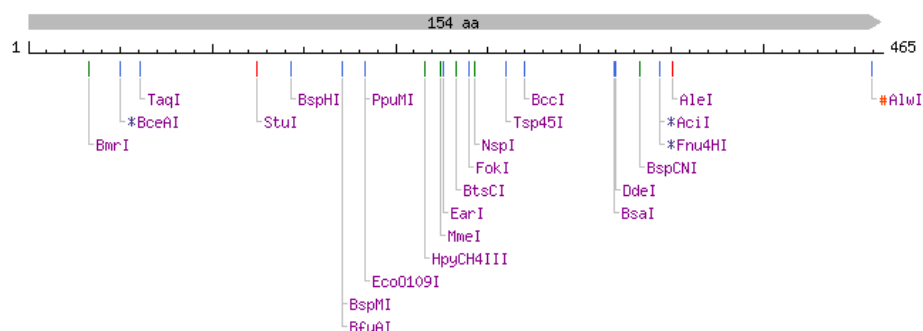


Imagem 2: Análise de restrição utilizando o NEBcutter V2.0 da BioLabs.

3.2 Construção do Primer FW

Teste da T_m para o início da sequência codificadora, 5'ATGGCGACGAAGGCCGTG 3'.

Physical Constants				Melting Temperature (T_m) Calculations	
Length:	18	Molecular Weight:	5589.7 ⁴	GC content:	67%
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm				1	54.9 °C (Basic)
is 4.953 microMolar ⁵ and contains 27.7 micrograms.				2	60.8 °C (Salt Adjusted)
				3	56.68 °C (Nearest Neighbor)

Imagem 3: Teste da T_m para a sequência codificadora *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*.

Adição da sequência do sítio de restrição a sequência codificadora com adição de nucleotídeos para uma boa clivagem (destacado em **negrito**), como indicado para o uso da enzima HindIII. A sequência codificadora possui um start códon destacado em verde.

5' **CCA**AGCTT**GG**ATG**GCGACGAAGGCCGTG**3'

Physical Constants				Melting Temperature (T_m) Calculations	
Length:	28	Molecular Weight:	8679.7 ⁴	GC content:	64%
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm				1	67.2 °C (Basic)
is 3.265 microMolar ⁵ and contains 28.3 micrograms.				2	75.9 °C (Salt Adjusted)
				3	67.87 °C (Nearest Neighbor)

Imagem 4: Teste da T_m para a o primer utilizando o *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*.

Na análise de auto complementariedade o primer não apresenta “hairpin” indicado na imagem 5.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:

None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !

Imagem 5: Teste de auto complementariedade e “hairpin” utilizando o *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*.

A tradução do primer indica a sequência esperada na imagem 6.

5'3' Frame 2									
ccaa	gct	tgg	atg	gcg	acg	aag	gcc	gtg	
Q	A	W	M	A	T	K	A	V	

Imagem 6: Tradução do primer utilizando Expasy translate.

3.3 Construção do primer RW

Teste da T_m para da sequência da fita codificante:

5'AATTGGGATCGCCCAATAA3'

Physical Constants				Melting Temperature (T _M) Calculations		
Length:	19	Molecular Weight:	5820.9 ⁴	GC content:	42%	<u>1</u> 46.8 °C (Basic)
1 ml of a sol'n with an Absorbance of	1	at 260 nm				<u>2</u> 53 °C (Salt Adjusted)
is	4.624	microMolar ⁵ and contains	26.9	micrograms.		<u>3</u> 48.39 °C (Nearest Neighbor)

Imagem 7: Teste da T_m para a o primer utilizando o *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*.

Adição da sequência do sítio de restrição a sequência codificadora com adição de nucleotídeos para uma boa clivagem (destacado em negrito), como indicado para o uso da enzima XhoI. A sequência codificadora possui um stop códon destacado em verde.

5' **ATTGGGCATCGCCCA****T**AA**CCC**TCGAGGG 3'

Gerando a fita reversa complementar:

5' **CCC**TCGAG**GGG**TTATTGGGCGATGCCCAAT 3'

Teste de T_m para o primer RW indicado na imagem 8.

Physical Constants				Melting Temperature (T _m) Calculations	
Length:	29	Molecular Weight:	8884.8 ⁴	GC content:	55%
1 ml of a sol'n with an Absorbance of				1	64.3 °C (Basic)
at 260 nm				2	73.2 °C (Salt Adjusted)
is	3.382	microMolar ⁵	and contains	30	micrograms.
				3	63.9 °C (Nearest Neighbor)

Imagem 8: Teste da T_m para a o primer utilizando o *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*.

O primer não apresenta complementariedade e “hairpin” como indicado na figura 9.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:

None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !

Imagem 9: Teste de auto complementariedade e “hairpin” utilizando o *Oligo Calc*:

Oligonucleotide Properties Calculator.

A tradução do prime indica a sequência esperada:

3'5' Frame 2									
attg	ggc	atc	gcc	caa	taa	ccc	tcg	agg	
L	G	I	A	Q	-	P	S	R	

Imagem 10: Tradução do primer utilizando Expasy translate.

4.Sistema de expressão

Escherichia coli (*E. coli*) é um dos organismos hospedeiro mais amplamente utilizado para a produção biofarmacêutica de proteínas recombinantes heterólogas não modificadas simples com um baixo número de ligações dissulfeto. As cepas de expressão de *E. coli* são favorecidas devido à sua capacidade de atingir rapidamente altas densidades celulares em meios baratos e seu status aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para aplicações em humanos. Além disso, sua genética bem caracterizada e sequências

genômicas publicamente disponíveis, e a disponibilidade de muitos vetores de clonagem e várias cepas mutantes garantem que *E. coli* permaneça um hospedeiro certo para a produção de proteína recombinante. Tendo isso em mente opta-se pela expressão utilizando o sistema bacteriano da linhagem *E. coli* BL21 (DE3), que é uma bactéria vendida comercialmente na forma já competente e possui um alta taxa de transformação (Rosano e Ceccarelli, 2014).

5.Vetor

O sistema pET é o sistema mais poderoso já desenvolvido para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Em plasmídeos pET os genes alvo são clonados sob o forte controle da transcrição do bacteriófago T7. O promotor T7 é um dos mais fortes promotores conhecidos. Podendo produzir uma grande quantidade de proteínas, podendo chegar até a 50% do conteúdo total de proteínas da célula. Por isso optamos por utilizar o plasmídeo pET-28a(+) já que ele produz proteínas marcadas com seis resíduos de histidina no N-terminal para facilitar o processo de purificação (Description *et al.*, 1800).

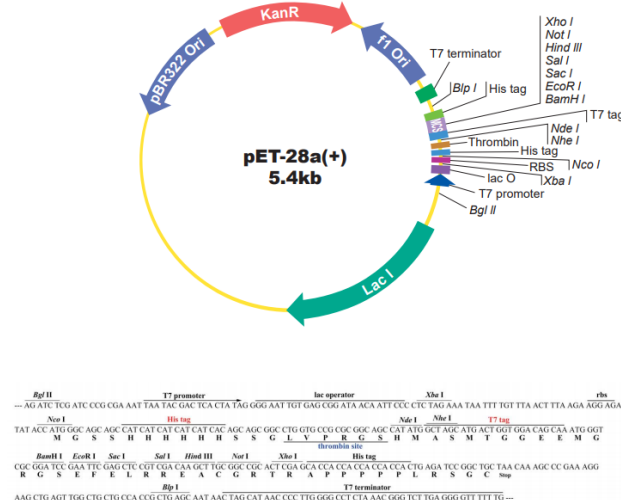


Imagem 11: Mapa do vetor pet28a(+)

6. Sistema de Indução

A expressão será induzida pela presença do isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em uma concentração de 1mM durante 6 horas a 37°C. Como a alolactose, o IPTG se liga ao repressor lac presente no vetor escolhido e libera o repressor tetramérico do operador lac de uma maneira alostérica, permitindo assim a transcrição de genes no operon lac, como o gene que codifica para beta-galactosidase, uma enzima hidrolase que catalisa a hidrólise de β -galactosídeos em monossacarídeos. Mas, ao contrário da alolactose, o átomo de enxofre (S) cria uma ligação química que não é hidrolisável pela célula, impedindo a célula de metabolizar ou degradar o indutor (Wurm *et al.*, 2016).

7. Purificação

Agarose Ni-NTA é uma resina de afinidade carregada de níquel que pode ser usada para purificar proteínas recombinantes contendo uma sequência de polihistidina (6xHis) a interação podemos ver na imagem 12. Sendo assim foi escolhido essa metodologia, já que na nossa proteína de interesse foi inserida essa calda de histidina. As proteínas ligadas à resina podem ser eluídas com tampão de baixo pH ou por competição com imidazol ou histidina. A purificação de uma etapa pode ser realizada em condições nativas e desnaturantes. Ni-NTA usa o ligante quelante ácido nitrilotriacético (NTA) acoplado a uma resina de agarose 6% reticulada que é adequada para uso em aplicações de lote e fluxo por gravidade. Análises de gel SDS-PAGE e western blot confirmarão a presença da proteína (Khan, He e Taussig, 2006).

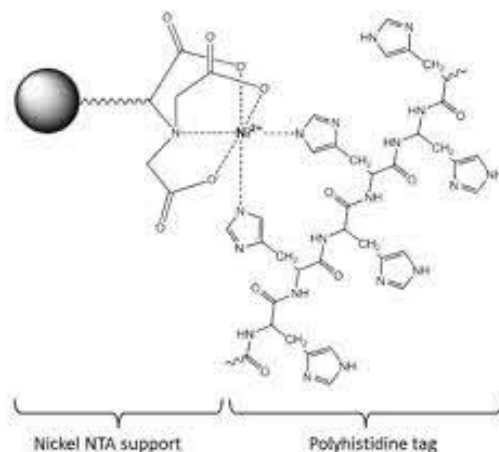


Imagem 12: Estrutura de ligação entre a coluna e os resíduos de histidina da proteína.

9. Resultados Esperados

Após etapa de purificação a amostra será analisada por meio de técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE-poliacrilamida associada a técnica de Western Blotting que faz uso de membrana de nitrocelulose e anticorpos primários e secundários para marcar a proteína de interesse sendo possível após revelação em um fotodocumentador observar a banda correspondente exatamente a nossa proteína de interesse, a SOD1. Logo esperamos observar uma banda na região de aproximadamente entre 15kDa até próximo de 30kDa, como pode ser observado na figura abaixo que é um exemplo da região que devemos observar a presença da proteína SOD do nosso interesse.

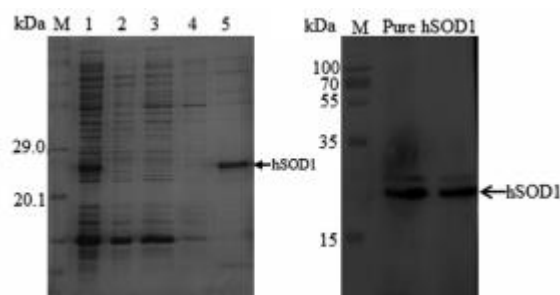


Imagem 13: Imagem de exemplo de uma membrana de Western Blotting onde podemos observar a presença da proteína hSOD1. Fonte: LIN et al 2018.

10. Bibliografia

BLACKNEY, M et al. Cloning and expression analysis of *Drosophila* extracellular Cu Zn superoxide dismutase. **Bioscience Reports**. vol 34. n.º 6. 2014

DESCRIPTION, A et al. pET System Manual 11 th Edition. **System**, 1800.

KHAN, F.; HE, M.; TAUSSIG, M. J. Double-hexahistidine tag with high-affinity binding for protein immobilization, purification, and detection on Ni-nitrilotriacetic acid surfaces. **Analytical Chemistry**, 2006.

LIN et al. Cloning, purification and enzymatic characterization of recombinant human superoxide dismutase 1 (hSOD1) expressed in *Escherichia coli*. **ABP Biochimia Polonica**. vol 65. p.1-6.2018

PANSARASA, O. et al. SOD1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis: "Ambivalent" Behavior Connected to the Disease. **Int. J. Mol. Sci.** vol 19. n.º 5. p. 1345. 2018

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. **Recombinant protein expression in**

Escherichia coli: Advances and challenges *Frontiers in Microbiology*, 2014.

SEA, K et al. Insights into the Role of the Unusual Disulfide Bond in Copper-Zinc Superoxide Dismutase. **Journal of Biological Chemistry**. vol 290. p.2405-2418. 2015

WURM, D. J. *et al.* The E. coli pET expression system revisited—mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.

VALENTINE, J. S., DOUCETTE, P.A., POTTER, S.Z. Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Annu.Rev.Biochem.** vol 74. p.563-93. 2005