

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA SERINOPROTEASE THROMBIN-LIKE
EM *Nicotiana benthamiana*

Letícia Guerra Morosini

Monografia apresentada à Coordenação do
curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA SERINOPROTEASE THROMBIN-LIKE
EM *Nicotiana benthamiana*

Letícia Guerra Morosini

Orientadora: Renata Santos Rodrigues

Co-orientador: Rafael Nascimento

Monografia apresentada à Coordenação do
curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Dezembro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA SERINOPROTEASE THROMBIN-LIKE
EM *Nicotiana benthamiana*

Letícia Guerra Morosini

Orientadora: Renata Santos Rodrigues

Instituto de Genética e Bioquímica

Co-orientador: Rafael Nascimento

Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela Coordenação do curso de
Biotecnologia em: __/__/__

Coordenador do Curso: Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Dezembro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA SERINOPROTEASE THROMBIN-LIKE
EM *Nicotiana benthamiana*

Letícia Guerra Morosini

Aprovado pela Banca Examinadora em: __/__/__ Nota: __

Presidente da Banca Examinadora: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Ass: _____

Uberlândia – MG

Dezembro – 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me guiado e me proporcionado todas as oportunidades e aprendizados que fizeram esse momento se tornar possível.

Aos meus pais, por todo o apoio, carinho, educação e dedicação à mim e minha formação educacional. Serei eternamente grata por ter tido vocês como meus grandes professores nessa vida.

À todos os meus familiares, que observaram e me ajudaram de diferentes maneiras durante toda essa caminhada, proporcionando-me todo o apoio que eu poderia precisar quando enfrentei o desafio de estudar (e morar) em uma cidade diferente.

À professora Dra. Renata Santos, por ter aceitado me orientar nesse projeto e sempre estar disposta à sanar minhas dúvidas e me ajudar em todos os obstáculos do fim da graduação.

Ao professor Dr. Rafael Nascimento, por ter aceitado me coorientar e ter permitido minha experiência em seu laboratório junto com sua equipe, período que me ajudou muito à me acostumar com a dinâmica laboratorial.

À Dra. Hebréia e à Jéssica Brito, que me ajudaram e acompanharam todos os experimentos e resultados desse projeto.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e toda a equipe do laboratório de Nanobiotecnologia da UFU, por terem me cedido o espaço e me ajudado em todos os experimentos que realizei.

Aos meus amigos de turma, principalmente Camila, Jéssica, Gessyca e Asaph, por me proporcionarem momentos de descontração e diversão em períodos que todos estávamos em nosso limite.

Ao Malik, por ter a paciência de escutar meus desabafos e me ajudar a sempre pensar em frente para a resolução de todos os meus desafios que vieram com esse projeto.

E a todos que de alguma maneira me ajudaram durante à graduação e essa monografia.

RESUMO

A técnica de expressão de proteínas heterólogas em espécies vegetais é muito utilizada no meio científico, sendo uma das metodologias mais utilizadas a transformação transiente do vegetal através da agroinfiltração com a bactéria *Rhizobium radiobacter*, que, pela presença do plasmídeo Ti em sua estrutura, é capaz de induzir o vegetal a produzir a proteína de interesse. Esse processo resulta em uma produção em larga escala de proteínas de interesse biotecnológico que são encontradas em baixas concentrações *in natura*. Dentre as proteínas de potencial aplicabilidade biotecnológica e, principalmente, farmacológica, tem-se a classe de enzimas serinoproteases *thrombin-like* encontradas em peçonhas de serpente como a espécie *Bothrops pauloensis* tendo aplicabilidade para futuros tratamentos para doenças como infarto do miocárdio, hemorragias, dentre outras aplicabilidades. Portanto, o objetivo desse trabalho foi clonar o gene de uma serinoprotease *thrombin-like* e expressá-la em *Nicotiana benthamiana*. A técnica de clonagem realizada foi através da utilização de enzimas digestivas e posterior ligação do gene de interesse ao vetor utilizado no projeto (pEAQ-HT), tendo já inserido nesse vetor o gene de silenciamento gênico do vegetal, não necessitando, portanto, uma coinfiltração. Posteriormente a ligação foi eletroporada nas células de *Escherichia coli* e *R. radiobacter*. O projeto resultou na clonagem do gene de interesse em *E. coli* e *R. radiobacter*, sendo posteriormente expresso em *N. benthamiana*, onde ainda não foi possível detectar a expressão da proteína.

Palavras-chave: Transformação vegetal, agroinfiltração, proteína recombinante, prócoagulante.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	1
2.1 <i>Rhizobium radiobacter</i>	1
2.2 <i>Nicotiana benthamiana</i>	4
2.3 Peçonha de serpentes	5
2.4 Cascata de coagulação	10
3. JUSTIFICATIVA	11
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo Geral	12
4.2 Objetivos Específicos	13
5. MATERIAIS E MÉTODOS	13
5.1 Síntese do vetor e genes de interesse	13
5.1.1 Síntese do vetor	13
5.1.2 Síntese dos genes	14
5.2 Clonagem de <i>E. coli</i>	16
5.2.1 Cultivo de <i>E. coli</i> DH5 α	16
5.2.2 Eletroporação de <i>E. coli</i> (DH5 α) com genes SPBP1 e SPBP1(-)	16
5.2.3 Extração de DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição das amostras	17
5.2.4 Eletroforese das amostras em gel de agarose 1.2%	18
5.2.5 Purificação do DNA obtido em eletroforese e ligação dos genes SPBP1 e SPBP1(-) obtidos ao vetor pEAQ-HT	18
5.2.6 Eletroporação de células DH5 α com os genes SPBP1 e SPBP1(-) ligados ao vetor pEAQ-HT	18
5.2.7 Extração do material genético das colônias transformadas	19
5.2.8 Digestão das amostras e análise da transformação das colônias em gel de agarose 1,2%	20
5.2.9 Extração de DNA plasmidial	20
5.3 Clonagem de <i>R. radiobacter</i>	20

5.3.1	Cultivo de <i>R. radiobacter</i> EHA105	20
5.3.2	Produção de células competentes de <i>R. radiobacter</i> EHA105	20
5.3.3	Eletroporação de <i>R. radiobacter</i>	21
5.4	Agroinfiltração em <i>N. benthamiana</i>	22
5.4.1	Cultivo de <i>N. benthamiana</i>	22
5.4.2	Agroinfiltração de <i>R. radiobacter</i> em <i>N. benthamiana</i>	22
5.4.3	Extração da proteína da folha vegetal	23
5.4.4	Análise de proteína em gel desnaturante SDS Page	23
5.4.5	Análise da expressão da proteína em <i>Western Blotting</i>	24
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
7.	CONCLUSÃO	32
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a técnica de agroinfiltração é muito utilizada para transformação transiente de vegetais com genes de interesse. Esta técnica constitui-se da infiltração de bactérias da espécie *Rhizobium radiobacter*, transformadas com o gene de interesse, em uma região do vegetal onde ocorrerá a expressão da proteína pela planta.

Com essa técnica, é possível expressar proteínas de interesse em uma larga escala, à baixo custo e com uma técnica relativamente simples, o que pode auxiliar na produção de proteínas de interesse farmacológico e industrial tanto para sua caracterização quanto comercialização.

Dentre essas proteínas de interesse, tem-se as encontradas em peçonhas de serpente, onde encontra-se um grande potencial farmacológico para o tratamento de variadas doenças. A classe de enzimas serinoproteases *thrombin-like* encontradas na peçonha de serpentes constitui-se como um potencial tratamento para doenças do sistema de coagulação humano, por sua capacidade em produzir a formação de um coágulo frouxo.

Ocorrem vários estudos envolvendo essa classe de enzimas expressas em sistemas heterólogos, estas tendo uma peculiaridade pois, por precisarem de um processamento pós-traducional conhecido como a glicosilação, estas só podem ser expressas em sistemas heterólogos eucariotos, sendo esses capazes de realizarem tal processamento.

Diante disso, a utilização do sistema vegetal para produção de uma serinoprotease *thrombin-like* torna-se uma alternativa viável para produção em larga escala dessa proteína para sua caracterização e produção comercial como um futuro fármaco.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Rhizobium radiobacter*

As bactérias do gênero *Agrobacterium* sp., são microrganismos Gram-negativos do solo, sendo geralmente aeróbicos e possuindo temperatura ótima de crescimento de 25 a 28°C. Suas colônias apresentam-se, em geral, apigmentadas, ou com leve coloração creme, convexas, lisas e circulares (HOLT, 1977). A espécie *Rhizobium radiobacter*, também conhecida como *Agrobacterium radiobacter* (MARTA et al., 2011), foi descrita pela primeira vez por Smith e Townsend (1907), com o nome de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bactéria é responsável pela doença galha-da-coroa em espécies vegetais, sendo essa doença caracterizada pelo crescimento de galhas na raiz e coroa da planta infectada (EMBRAPA, 2003).

Segundo Andrade, Sartoretto e Brasileiro (2003), essas galhas características da doença têm a capacidade de crescer sem reguladores de crescimento em meio de cultura *in vitro*, sendo esse crescimento relacionado ao plasmídeo Ti, responsável pelo processo de indução tumoral da doença (MADIGAN et al., 2016).

Neste plasmídeo, encontra-se a região T, onde encontra-se o segmento de DNA transferido para a célula vegetal, sendo este segmento denominado de T-DNA quando integrado ao DNA da planta, e a região *vir* (região de virulência) que contém genes responsáveis pela síntese de proteínas envolvidas na transferência da região T para o vegetal (Figura 1) (MADIGAN et al., 2016).

A indução tumoral promovida pelo plasmídeo em questão ocorre através da produção de auxinas e citocinas presentes na sequência plasmidial que acarretam em um desequilíbrio hormonal na célula vegetal resultando na formação do tumor característico da doença (GELVIN, 2003).

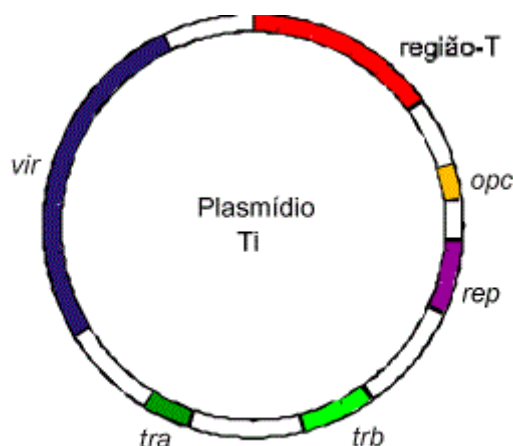


Figura 1. Plasmídeo Ti e suas regiões. A região T corresponde ao local onde estará o material genético de interesse, a região *vir* à região de virulência, *tra* e *trb* regiões de transferência conjugativa, *rep* região de replicação e *opc* origem de replicação (ZHU et al., 2000).

Após ocorrer a transformação da célula vegetal pelo DNA bacteriano, os genes presentes no T-DNA são então expressos pela célula transformada (ZUPAN et al., 2000) pois, apesar de sua origem procariota, o T-DNA contém especificidades para a transcrição e tradução desse gene em células eucarióticas, como a presença de TATA boxes e caudas poli(A), resultando na síntese dessas proteínas procariotas na célula vegetal sem obstáculos (ANDRADE et al., 2003).

Esse processo de transferência de genes característico da doença possibilitou estudos e um grande avanço na área de engenharia genética. Através da utilização desse mecanismo para a transferência de genes exógenos para organismos vegetais, esses organismos tornaram-se capazes de expressar proteínas de interesse biotecnológico derivadas de outras espécies animais ou vegetais, sendo este um grande avanço para a produção de proteínas de interesse farmacêutico e industrial (ANDRADE et al., 2003).

A técnica de inserção e transformação do vegetal com o DNA bacteriano denomina-se agroinfiltração, sendo esta uma técnica utilizada na transformação transiente de vegetais para rápida expressão de um gene de interesse (OBEMBE et al., 2011).

Esse processo foi desenvolvido na década de 90 e consiste na infiltração do tecido vegetal com uma suspensão contendo a *R. radiobacter* transformada com o vetor de interesse (OBEMBE et al., 2011), para que assim, ao transferir este vetor para as células vegetais, a planta seja capaz de expressar a proteína derivada do gene inserido na bactéria.

Nessa técnica, é comumente a utilização de vetores binários, pois, como o tamanho do plasmídeo Ti dificulta em sua manipulação e aplicação, outros vetores que contém a metodologia do T-DNA são utilizados para agir em conjunto com esse plasmídeo (BEVAN, 1984).

As vantagens desta técnica transiente quando comparada aos demais mecanismos de transformação vegetal, como bombardeamento, biobalística, micro e macroinjeção ou eletroporação de protoplasto, são sua simplicidade, baixo custo e rapidez na expressão das proteínas de interesse (WYDRO et al., 2006), caracterizando-a, assim, como um sistema muito utilizado para experimentos de engenharia genética e produção de proteínas heterólogas.

2.2. *Nicotiana benthamiana*

O gênero vegetal *Nicotiana* está presente na família *Solanaceae* e representa 76 espécies de regiões tropicais e subtropicais distribuídas em quatro continentes, sua maioria ocorrendo na América do Sul e Austrália (KNAPP et al., 2004). A espécie *Nicotiana benthamiana*, derivada deste gênero, é um importante modelo para estudos na área de virologia e biologia molecular de vegetais, por sua alta susceptibilidade a infecções virais (TODESCO & FELIPPES, 2016). Além disso, esta espécie demonstra melhor resposta se comparada à outras plantas utilizadas quando submetida a técnicas de transferência de genes exógenos, como a utilização de vetores virais, vetores baseados

em vírus, como os VIGS (da sigla em inglês, silenciamento genético induzido por vírus) e a técnica de agroinfiltração (GOODIN et al., 2008).

Para expressão do gene de interesse pelo vegetal através da agroinfiltração, é recorrente a utilização de sistemas de expressão transiente baseados em vírus de RNA de vegetais, por sua capacidade de crescer em diferentes hospedeiros e por seu RNA ser diretamente traduzido (CANIZARES et al., 2005).

Esses vetores frequentemente são otimizados para que a expressão da proteína ocorra em alto rendimento, essa otimização ocorrendo por exemplo, pela inclusão de múltiplos cassetes de expressão no vetor, permitindo assim a coexpressão de proteínas distintas, inibição de genes pós transcricionais de silenciamento gênico, ou enzimas envolvidas nas etapas de glicosilação (SOUZA, 2014). Um dos exemplos de vetores utilizados nessa otimização é o pEAQ-HT, derivado do vírus do mosaico do caupi (SAINSBURY et al., 2009), sendo este utilizado para esta pesquisa como o vetor binário manipulado para conter o T-DNA de interesse.

2.3. Peçonhas de Serpentes

Mundialmente, são conhecidas aproximadamente 3 mil espécies de serpentes, o Brasil apresentando atualmente 392 espécies desses répteis (COSTA; BÉRNILS, 2015), onde 74 são consideradas peçonhentas (BERNADE, 2014). Segundo Cardoso et al. (2003), as espécies peçonhentas são classificadas em duas famílias distintas, sendo essas Elapidae e Viperidae, ambas apresentando glândulas produtoras de peçonha e aparelho inoculador.

O gênero *Bothrops*, pertencente à família Viperidae, é responsável por mais de 70% dos acidentes ofídicos ocorridos nas diferentes regiões do país, de acordo com o Ministério da Saúde (2014). Nesse gênero tem-se a serpente *Bothrops pauloensis*, sendo

uma das espécies denominadas comumente de jararaca, encontrando-se em território nacional nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (COSTA; BÉRNILS, 2015).

A peçonha de serpentes é constituída por, aproximadamente, 90% de proteínas e peptídeos e 10% de aminoácidos, lipídeos, nucleotídeos e outras substâncias de baixa massa molecular (STOCKER, 1990). As proteínas ativas encontradas nessa peçonha são caracterizadas em diversas classes como metaloproteases, L-aminoácido oxidases, serinoproteases, fosfolipases A₂, lectinas tipo-C dentre outros (CALVETE et al., 2007), sendo responsáveis pelo processo inflamatório desencadeado no organismo onde a peçonha é inoculada (TEIXEIRA et al., 2009).

Esse processo pode levar a consequências como a necrose do tecido afetado ou mesmo a morte do organismo (ANGULO; LOMONTE, 2009), sendo para a espécie *B. pauloensis*, as classes de proteínas ativas mais presentes em sua peçonha metaloproteases (38%), fosfolipases A₂ (32%), peptídeos vasoativos (12.4%) e serinoproteases (10,5%) (RODRIGUES et al., 2012).

Segundo o Ministério da Saúde (2001), o quadro clínico ocasionado pela peçonha de *Bothrops pauloensis* em contato com o organismo humano é dividido em três efeitos distintos: proteolítico, coagulante e hemorrágico.

O efeito proteolítico é desencadeado majoritariamente por fosfolipases, que catalisam a hidrólise de substratos específicos e originam a partir de sua ação edemas no tecido afetado, podendo posteriormente desencadear sua necrose (MASUDA et al., 2005).

No caso do quadro coagulante, este é provocado por moléculas ativadoras de protrombina e do fator X, que alteram a hemostasia do organismo e causam sua coagulação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). O efeito hemorrágico é decorrente da

ação de metaloproteases presentes na peçonha da serpente em proteínas da matriz extracelular do tecido atingido (GONÇALVES; MARIANO, 2000), esse processo podendo desencadear hipovolemia, hipotensão, hiperfusão tecidual, choque cardiovascular e acidente vascular cerebral (SÁNCHEZ et al., 2008).

As serinoproteases, uma das classes de toxinas presentes na peçonha de *B. pauloensis* são glicoproteínas sintetizadas como zimogênios, tendo massas moleculares entre 23 a 67 kDa (CASTRO et al., 2004). Majoritariamente, essas proteínas possuem estrutura em forma de barril, formada por dois domínios assimétricos de folhas beta contendo pontes dissulfeto, semelhante à estrutura da quimiotripsina (LESK; FORDHAM, 1996), sendo sua sequência composta por aproximadamente 230 resíduos de aminoácidos com doze resíduos de cisteína (SERRANO; MAROUN, 2005).

O sítio ativo dessas proteínas é altamente conservado em sua classe, sendo composto por resíduos de serina, histidina e aspartato em sua região C-terminal, tais resíduos formando a tríade catalítica (Figura 2) (SERRANO; MAROUN, 2005).

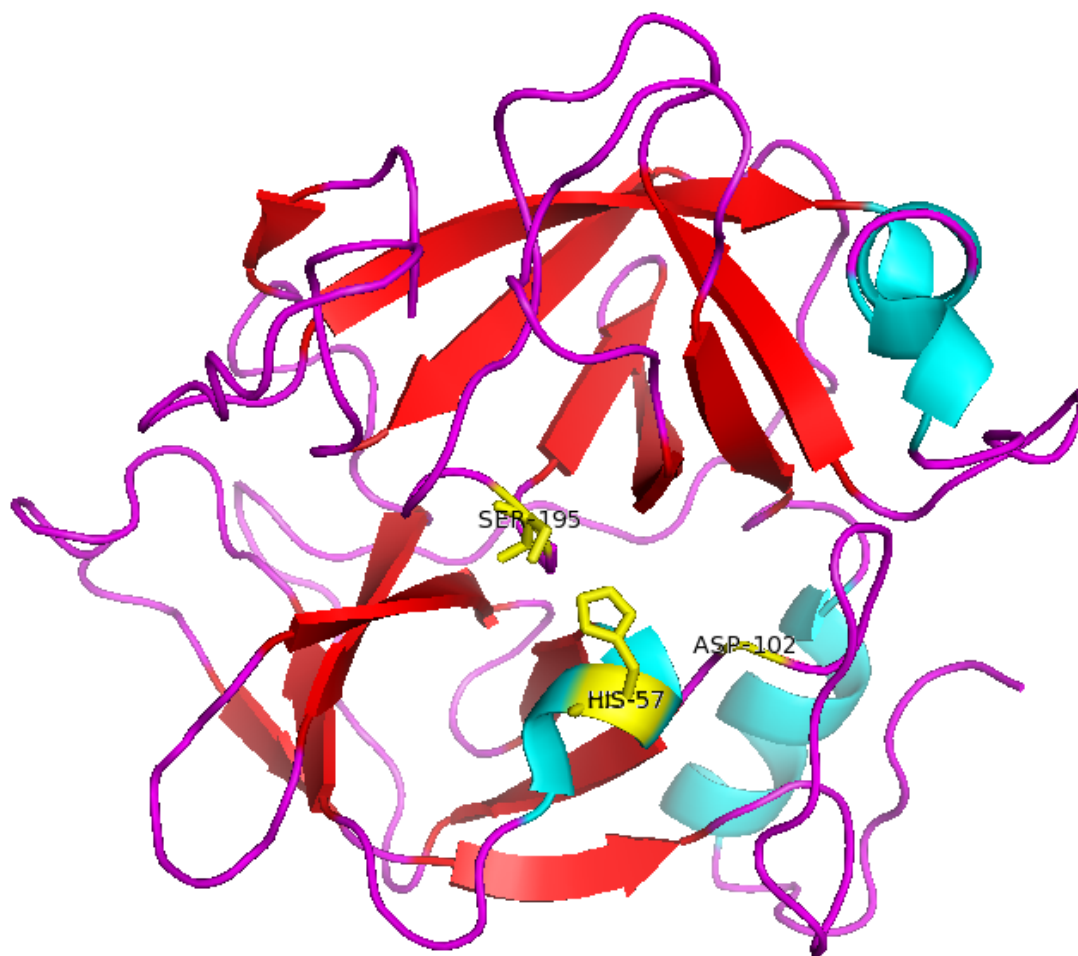


Figura 2. Estrutura tridimensional de uma serinoprotease *thrombin-like* isolada da peçonha de *Agkistrodon halys pallas* (ZENG et al., 2012). As regiões amarelas indicam os resíduos da tríade catalítica (Histidina-57, Aspartato-102 e Serina-195), as regiões vermelhas indicam as folhas beta, as regiões em azul as α hélices e as regiões em magenta as regiões de extensão. Não há registros da estruturação tridimensional de uma serinoprotease *thrombin-like* isolada da peçonha de *B. pauloensis*, sendo, portanto, utilizado para elucidação o modelo da peçonha de *A. halys pallas*.

Apesar da semelhança entre suas sequências, diferentes serinoproteases são altamente específicas para reagir com determinados substratos, como fibrinogênio, cininogênio e plasminogênio (SERRANO; MAROUN, 2005). As serinoproteases que atuam sobre o fibrinogênio, classificadas como *thrombin-like* por demonstrarem atividade proteolítica semelhante à trombina, clivam o fibrinogênio e o transformam em fibrina, resultando assim na formação do coágulo frouxo (STOCKER et al., 1982).

A clivagem do fibrinogênio realizada pelas serinoproteases resulta em diferentes fibrinopeptídeos, dependendo da cadeia de fibrinogênio clivada pela enzima (Figura 3) (STOCKER et al., 1982).

As serinoproteases do tipo A (SVTLE-A) são responsáveis pela clivagem da cadeia α do fibrinogênio, dando origem a fibrinopeptídeos do tipo A, já as serinoproteases do tipo B (SVTLE-B) clivam a cadeia β da molécula gerando fibrinopeptídeos do tipo B, e as serinoproteases do tipo AB (SVTLE-AB) clivam as duas cadeias citadas do fibrinogênio, gerando fibrinopeptídeos do tipo AB (CASTRO et al., 2004).

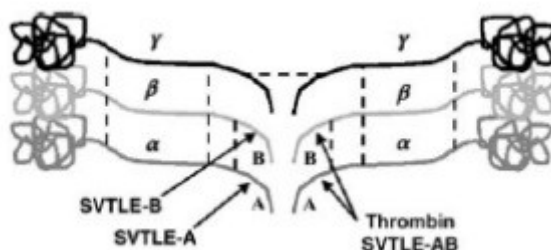


Figura 3. Ação de serinoproteases sobre o fibrinogênio. Na figura os símbolos α , β e γ identificam as cadeias de fibrinogênio, as siglas SVTLE-A, SVTLE-B e SVTLE-AB indicam os tipos de serinoproteases, e as regiões A e B seus respectivos fibrinopeptídeos gerados (CASTRO et al., 2004).

Essas enzimas *thrombin-like* são um importante alvo de estudo para a indústria farmacêutica, em áreas como na detecção de fibrinogênio em amostras de sangue heparinizadas, na análise da formação da rede de fibrina, e em transplantes de órgãos e cirurgias vasculares, onde a enzima é capaz de evitar o desencadeamento de uma hemorragia (MARSH; WILLIAMS, 2015). Segundo Ferreira et al. (2017), serinoproteases *thrombin-like* apresentaram resultados positivos para sua utilização em cirurgias e para tratamento de úlceras venosas crônicas, demonstrando, assim, o potencial destas proteínas para utilização pela indústria farmacêutica em futuros medicamentos e tratamentos.

2.4. Cascata de coagulação

De acordo com Santos et al. (2015), o mecanismo de cascata de coagulação sanguínea foi proposto, primeiramente, em 1964 por Marcflane e Davie & Ratnoff, sendo elucidado como uma sequência de ativação de pró-enzimas através da ação proteolítica de proteases do plasma, resultando na formação e ativação da trombina, responsável pela quebra da molécula de fibrinogênio em fibrina que resultará na formação do coágulo sanguíneo, esse processo sendo dividido em duas vias: intrínseca e extrínseca.

Porém, estudos posteriores demonstraram que esta distinção entre duas vias não tem comprovação fisiológica, sendo, atualmente, aceito que as duas vias atuam de forma interativa e não podem ser distintas em modelos *in vivo* (FERREIRA et al., 2010).

O novo modelo proposto para o processo de coagulação sanguínea é baseado em superfícies celulares, onde a cascata de coagulação sempre se inicia com a exposição de FT na corrente sanguínea, estando presente quando há lesão endotelial ou pela ativação de células endoteliais ou monócitos, que irão expressá-lo (FERREIRA et al., 2010).

As reações desencadeadas pela expressão de FT transformam zimogênios de enzimas em suas formas ativas proteolíticas até a produção de trombina e, posteriormente, do coágulo de fibrina, em quantidade adequada para a lesão endotelial existente (Figura 4) (FRANCO, 2001).

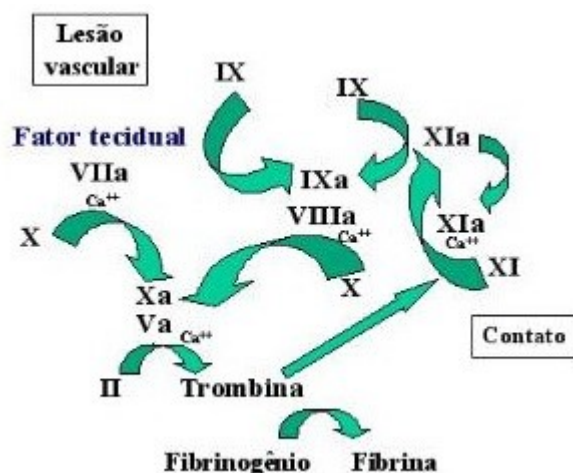


Figura 4. Atual modelo da cascata de coagulação. Nesse modelo, as reações ocorrem em superfícies celulares e não há distinção das duas vias como ocorria com o modelo anterior (FRANCO, 2001).

Como já citado, esse processo sequencial da ativação de enzimas proteolíticas resulta na formação de trombina, essencial para a finalização da coagulação sanguínea. É nesse quesito que moléculas como as serinoproteases *thrombin-like* atuam nesse processo, pois por terem semelhanças funcionais com a molécula de trombina, estas também acarretam na formação do coágulo sanguíneo de maneira similar à enzima natural.

3. JUSTIFICATIVA

Peçonhas de serpentes são um alvo recorrente de estudos na área farmacêutica, pois muitas toxinas que compõem a peçonha têm potencial em se tornarem medicamentos para tratamento de doenças como câncer, hipertensão e trombose (VYAS et al., 2013).

Dentre as moléculas analisadas derivadas de peçonhas de serpente para aplicação farmacêutica, tem-se a classe das serinoproteases *thrombin-like*. Essas moléculas, por terem ação similar à molécula de trombina, são muito estudadas e apresentam potencial para tratamento de doenças como infarto do miocárdio, isquemia aguda e desordens do sistema de coagulação sanguínea (MARKLAND, 1998).

Para um estudo detalhado e a produção em maior quantidade da serinoprotease, dentre outras proteínas de interesse, é muito utilizada a técnica de expressão heteróloga, tendo esse método aplicação na área farmacêutica e industrial (PORRO et al., 2010).

No caso das enzimas da classe serinoprotease, estas não podem ser expressas em sistemas de expressão heteróloga procarióticos, pois como essas enzimas precisam do processamento pós-traducional de glicosilação para sua ativação, processo que só ocorre em sistemas eucarióticos, a utilização de sistemas procariotos para produção dessa enzima torna-se inviável (NEURATH; DREYER, 1955).

Estudos foram realizados expressando serinoproteases derivadas de *B. pauloenis* em *Pichia pastoris*, onde também foi estudado o potencial antitumoral dessa molécula expressa (COSTA, 2014; OLIVEIRA, 2017). O sistema vegetal também pode ser utilizado para expressão de proteínas de interesse, pois esse sistema, além de apresentar baixo custo e facilidade em sua utilização, também é capaz de produzir maior concentração de enzima, o que propiciará maior facilidade ao decorrer das análises e caracterizações desta molécula (KUSNADI et al., 1997).

Além disso, a ênfase para utilização da técnica de expressão da serinoprotease em sistema vegetal dá-se também pelo fato de que na literatura não há registros sobre a utilização desse método para expressão de toxinas encontradas em peçonhas de serpentes, indicando assim um potencial para exploração da técnica, que pode apresentar vantagens e facilidades para expressão e posterior produção em larga escala dessas proteínas de potencial aplicação farmacêutica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Clonar e expressar uma serinoprotease *thrombin-like* derivada da peçonha de *B. pauloensis* no vegetal *N. benthamiana* através da técnica de transformação vegetal transiente agroinfiltração.

3.2. Objetivos específicos

Têm-se como objetivos específicos desse projeto: sintetizar os vetores e genes de interesse, eletroporar os genes de interesse em células de *E. coli* DH5 α , extrair o material genético das células eletroporadas, digerir com enzimas de restrição as amostras obtidas, analisar e isolar o gene de interesse e o vetor em gel de agarose 1.2%, ligar os genes de interesse isolados ao vetor, eletroporar os insertos obtidos em células de *E. coli* DH5 α , analisar a transformação das colônias em gel de agarose 1.2%, extrair o material genético das colônias transformadas, eletroporar as amostras obtidas em células de *R. radiobacter* EHA105, agroinfiltrar as colônias transformadas em folhas de *N. benthamiana* e verificar a expressão da proteína no vegetal através de *Western Blotting*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Síntese do vetor e genes de interesse

5.1.1 Síntese do vetor

O vetor foi manipulado para conter o gene de interesse, a sequência de resistência ao antibiótico canamicina e a sequência para o silenciamento gênico vegetal, além de outras sequências necessárias para o mecanismo de replicação deste vetor pelo vegetal (Figura 5).

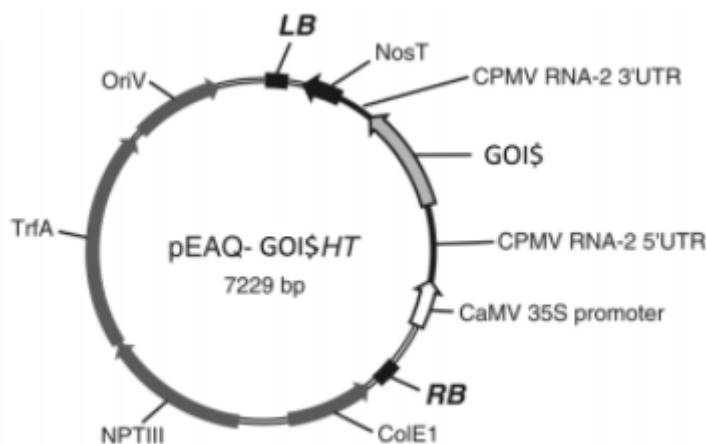


Figura 5. Esquemática do vetor pEAQ-HT. Sendo RB a borda direita, LB a borda esquerda, CaMV 35S *promoter* o promotor de Vírus do mosaico de couve-flor, CPMV RNA-2 UTRs as linhas pretas sólidas; GOI o gene de interesse; NosT as sequências terminadoras de Nopaline synthase; OriV a origem de replicação; NPT o gene de resistência ao antibiótico canamicina de Neomycin Phospho-transferase e TrfA, o locus essencial à replicação.

Esse vetor não contém a região *vir* pois esta é utilizada proveniente do plasmídeo Ti encontrado na *R. radiobacter* onde este vetor foi eletroporado.

Além disso, esse vetor estava presente em estoque em glicerol a -80°C em células da linhagem de *E. coli* DH5α.

5.1.2. Síntese dos genes

O gene de interesse (Figura 6) foi constituído com sítios para as enzimas de restrição NruI, SmaI e PacI em sua extremidade 5' e XhoI, XbaI e AvrII em sua extremidade 3', a sequência do peptídeo sinal da alfa-amilase do arroz, que direciona a proteína para o apoplasto do vegetal, facilitando seu processo de purificação pois, pela proteína encontrar-se na região extracelular do vegetal, não é necessário a lise celular da célula vegetal para extração da proteína, e sequências repetidas codificantes do peptídeo FLAG, sendo esse utilizado no mesmo processo separação da proteína dentre os outros componentes presentes no extrato vegetal.



Figura 6. Esquematização da composição do gene de interesse que foi inserido no vetor pEAQ-HT.

Onde na extremidade 5' há os sítios para as enzimas de restrição NruI, SmaI e PacI, e na extremidade 3' para as enzimas XhoI, XbaI e AvrII; a sequência Kozak contendo o códon de iniciação ATG; o peptídeo sinal da alfa amilase do arroz; a sequência do gene de interesse, no caso uma serinoprotease “thrombin-like”; cauda de purificação 3x-FLAG e códon de terminação TGA.

Portanto, baseando-se no gene sintetizado para expressão da serinoprotease pelo vegetal, tem-se que a sequência de aminoácidos resultantes dessa construção da proteína de interesse com seus sítios de restrição e peptídeos sinais seguirá a descrição presente na Figura 7.

```

5'- NruI - SmaI - PacI -
MKNTSSLCLLLLVLCSLTCNSGQAMVLRVNVANLLILQLSYAQKSSKLIVGGDECKINEHRSVLVLFNSSGFLCAGTLNEEWVLTAAHCD
SKNFQMLGVHSHKKVLNEDEQTRDPKEKFICPNRKKDDELDKDIMLIKLDSTVSTVTHIAPLTPSAFPVWAQLARIMGWGAIITSEDY
PDVPHCANINLFNNTVCREAYNGLPAKTLCAVLQGGIDTCGGDSGGPLICNGQFQGILSWGSDPCAEPKPAFYTKVFDYLPWIIQSIIA
GNKTATCPPHHHHHHH
- XhoI - XbaI - AvrII - 3'

```

Figura 7. Sequência de aminoácidos da serinoprotease codificada pelo gene de interesse. Em azul tem-se os sítios para as enzimas de restrição NruI, SmaI, PacI, XhoI, XbaI e AvrII, em amarelo tem-se a sequência do peptídeo sinal para direcionamento da proteína para o apoplasto do vegetal; em cinza a sequência da proteína de interesse; em verde a sequência do peptídeo FLAG (3x) e em vermelho o Stop Codon para tradução da proteína (TGA).

Pode-se observar que na Figura 6 encontra-se a cauda de purificação anti-flag presente na sequência da proteína, enquanto que na Figura 7 encontra-se a sequência da cauda de purificação anti-his. Isto ocorreu pois na sequência sintetizada do gene de interesse houve a inserção das duas caudas de purificação exemplificadas.

A partir da síntese desses genes codificantes da serinoprotease tanto com a sequência do peptídeo sinal da alfa amilase do arroz quando na ausência desta sequência, têm-se que a massa molecular desses genes são, respectivamente, 902pb e 827pb. Além disso, têm-se que a proteína expressa contém uma massa molecular de aproximadamente 40kDa.

Posteriormente à otimização do gene de interesse, esse foi produzido pela empresa GenScript, com sede na Califórnia, nos Estados Unidos da América sendo sintetizado no vetor pUC57-Kan.

5.2. Clonagem do gene de interesse em *E. coli*

5.2.1. Cultivo de *E. coli* DH5 α

As bactérias utilizadas nessa transformação encontravam-se estocadas em glicerol a -80°C, sendo descongeladas e cultivadas em meio LB líquido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) a 37°C com 250rpm *overnight*.

5.2.2. Eletroporação de *E. coli* (DH5 α) com genes SPBP1 e SPBP1 (-)

Foram adicionados 40 μ g de cada DNA em 40 μ L de água DNase e RNase Free, para se ter uma suspensão de 50% de material genético, destes um sendo do gene sem o peptídeo sinal da alfa amilase do arroz (SPBP1 (-)), e o outro sendo este mesmo inserto com o peptídeo sinal (SPBP1). Posteriormente, 1 μ L dessas amostras foi adicionado em células de DH5 α em estoque.

As células foram eletroporadas com pulso elétrico de 1,7 kV, os parâmetros resultantes no aparelho sendo de aproximadamente 2 e 5. Após o choque foi adicionado 1mL de meio LB dentro da cubeta para cada suspensão eletroporada. As células foram transferidas para tubos Falcon que ficaram sob agitação a 37°C por 30 minutos para

recuperação das células do choque da eletroporação. Posteriormente, as suspensões foram plaqueadas em quatro placas contendo meio LB sólido com 0,01% do antibiótico canamicina, duas placas contendo células eletroporadas com SPBP1 e duas placas com células de SPBP1 (-).

As placas ficaram *overnight* a 37°C sendo posteriormente verificado o crescimento das colônias nestas. Uma colônia de cada placa foi selecionada e adicionada a um tubo Falcon com 5mL de meio LB líquido com 0,01% de canamicina, ficando a 37°C *overnight* novamente.

5.2.3. Extração de DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição das amostras

A extração de DNA plasmidial foi feita utilizando o Kit QIAGEN® QIAprep® Spin Miniprep, as amostras extraídas derivaram das suspensões de colônias de DH5α transformadas com os genes SPBP1, SPBP1 (-), e o vetor de interesse pEAQ-HT, este sendo retirado de estoque previamente realizado em -80°C.

As amostras obtidas foram então digeridas a partir da adição das quantias de reagentes expressas na tabela 1.

Reagente	pEAQ-HT	SPBP1	SPBP1 (-)
DNA (µg/µL)	10	10	10
Tampão (µg/µL)	4	4	4
Xho I (µg/µL)	0,8	0,8	0,8
Nru I (µg/µL)	0,8	0,8	0,8
Água RNase Free (µL)	61	67	63

Tabela 1. Concentração dos reagentes para digestão das amostras. Sendo o DNA as amostras extraídas no protocolo anterior, o tampão conforme a necessidade para que a reação ocorra funcionalmente, Xho I e

Nru I as enzimas de restrição, e o volume de água RNase Free necessária para completar a mesma concentração para todas as amostras.

As soluções foram colocadas em termociclador, onde ficaram a 37°C por uma hora e posteriormente 20 minutos a 80°C para inativação das enzimas.

5.2.4. Eletroforese das amostras em gel de agarose 1.2%

As amostras digeridas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1.2%, sendo adicionado 50µL de cada solução com 2µL de GelRed™ (composição confidencial) e 2µL de LOAD (50% Glicerol, 0.125% Azul de Bromofenol, 0.125% Xileno Cianol) para separação do inserto digerido de interesse no gel. Sendo visualizadas a separação da sequência dos genes SPBP1 e SPBP1(-) do seu vetor pUC57-Kan e da sequência do vetor pEAQ-HT utilizado para ligação com estes genes.

5.2.5. Purificação do DNA obtido em eletroforese e ligação dos genes SPBP1 e SPBP1(-) obtidos ao vetor pEAQ-HT

Para purificação da banda, foi utilizado o kit de extração de gel QIAGEN® MinElute®, a partir do recorte das bandas de interesse do gel analisado.

Após o protocolo, foi realizada a quantificação de DNA das amostras derivadas do gel, sendo posteriormente, realizada a ligação dos insertos utilizando na proporção 10:1 utilizando 5µL de QIAGEN® Buffer EB (composição confidencial), 1µL de vetor pEAQ-HT, 3µL de cada inserto e 1µL de DNA ligase deixados *overnight* em duas condições: duas amostras na geladeira e duas amostras a 14°C.

5.2.6. Eletroporação de células DH5α com os genes SPBP1 e SPBP1(-) ligados ao vetor pEAQ-HT

Foram aplicados 3 μ L da ligação realizada, tendo portanto 50% de material genético no volume total, em células competentes de *E. coli* DH5 α , através da eletroporação destas células, sendo elas posteriormente colocadas em meio LB a 37°C por 30 minutos. Após esse processo, as células foram plaqueadas em meio LB sólido e colocadas *overnight* a 37°C.

5.2.7. Extração do material genético das colônias transformadas

Inicialmente, 6 colônias de bactérias transformadas com SPBP1 e 6 com SPBP1(-) foram selecionadas e cultivadas por um dia em meio LB líquido a 37°C com 0,01% de canamicina, com rotação de 150 rpm, sendo esse o pré-inóculo do experimento.

Foi utilizado o protocolo caseiro pelo objetivo do experimento ser apenas a confirmação do inserto de interesse dentro das colônias escolhidas. Portanto, o pré-inóculo obtido foi centrifugado a 13000rpm a 4°C por 6 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Foram adicionados 175 μ L de tampão TES (28% NaCl 5M, 10% Tris HCl 1M pH: 8,4% EDTA 0,5M pH: 8) para ressuspensão de pellet e posteriormente 20 μ L de lisozima. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos, sendo colocadas em banho maria a 73°C por 15 minutos para rompimento das células. Após estas etapas, as amostras foram centrifugadas a 13000rpm por 15 minutos a 4°C, onde o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf. Adicionaram-se 20 μ L de acetato de sódio e 400 μ L de etanol gelado para posterior submissão das amostras ao freezer a -20°C por uma hora. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 μ L de etanol 70% gelado. A solução foi centrifugada a 13000rpm por um minuto, com descarte do sobrenadante. O DNA resultante foi ressuspendido em 20 μ L de água ultrapura, para posterior quantificação em NanoDrop e armazenagem a -20°C.

5.2.8. Digestão das amostras e análise da transformação das colônias em gel de agarose 1,2%

Após esse processo, o inserto foi digerido usando 10µg/µL de DNA, 0,8µg/µL das enzimas de restrição Xho I e Nru I, 4µg/µL de QIAGEN® Buffer 3.1 (composição confidencial) e 12,2µL de água. Essa digestão foi realizada para clivar os genes SPBP1 e SPBP1(-) do vetor pEAQ-HT onde foram ligados, afim de que, na análise em eletroforese, o inserto isolado destes genes conseguisse ser identificado. Após a digestão, foi realizada eletroforese das amostras em gel de agarose 1.2%.

5.2.9. Extração de DNA plasmidial

Foram escolhidas duas colônias onde foi verificada a transformação com cada gene (colônias 1 e 6 para o gene com peptídeo sinal, e 2 e 6 para o gene sem o peptídeo sinal) sendo estas submetidas à extração de DNA plasmidial através do Kit QIAprep® Spin Miniprep novamente.

Após o processo, as amostras foram quantificadas utilizando o aparelho NanoDrop.

5.3. Clonagem de *R. radiobacter*

5.3.1. Cultivo de *R. radiobacter* EHA105

As células de *R. radiobacter* da linhagem EHA105, uma linhagem desarmada para não gerar infecção do vegetal infiltrado, encontravam-se estocadas em glicerol a -80°C, sendo descongeladas e cultivadas em meio LB líquido com 0,01% de canamicina a 28°C por dois dias.

5.3.2. Produção de células competentes de *R. radiobacter* EHA105

2 μ L das células em estoque foram inoculadas em 5mL de meio LB líquido e deixadas *overnight* a 28°C com rotação de 200rpm. Posteriormente, 2mL da suspensão foi inoculada em 500mL de meio LB líquido e deixada a 28°C até atingir OD de 0,3.

A suspensão fora transferida para tubos estéreis e deixada no gelo por 30 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 4000rpm e 4°C por 10 minutos onde fora descartado o sobrenadante.

Após isso, o *pellet* foi ressuspendido no mesmo volume inicial com água mili-Q gelada autoclavada, sendo posteriormente centrifugado a 4000rpm e 4°C por 10 minutos e descartado o sobrenadante.

O *pellet* foi novamente ressuspendido em metade do volume inicial com água mili-Q gelada autoclavada, sendo centrifugado nas mesmas condições, descartado o sobrenadante, e ressuspendido o *pellet* em 1/10 do volume inicial com água mili-Q gelada autoclavada.

Novamente a suspensão foi centrifugada a 4000rpm e 4°C por 10 minutos sendo descartado o sobrenadante e ressuspendido o *pellet* em 2mL de glicerol 10%.

As alíquotas foram estocadas a -80°C.

5.3.3. Eletroporação de *R. radiobacter*

Foi utilizado 3 μ L de cada amostra de DNA extraídas das duas colônias com transformação confirmada em células de *E. coli*, com concentração de 60ng/ μ L, em células competentes de *R. radiobacter*, sendo estas células submetidas ao choque para eletroporação com pulso de 1,7kV e posteriormente colocadas em meio LB líquido a 28°C por 30 minutos. As células foram plaqueadas em meio LB sólido e 0,01% de canamicina e colocadas a 28°C por dois dias.

5.4. Agroinfiltração em *N. benthamiana*

5.4.1. Cultivo de *N. benthamiana*

As plantas foram cultivadas em BOD até sua emergência, sendo transferidas posteriormente para uma câmara com fotoperiodicidade e umidade controlados, com 12 horas de claro e 12 horas de escuro, umidade na faixa de 70% e temperatura de aproximadamente 25°C (Figura 8), até completarem as 5 semanas necessárias para agroinfiltração.



Figura 8. Cultivo de *N. benthamiana* em local com umidade e fotoperiodicidade controlados.

5.4.2. Agroinfiltração de *R. radiobacter* em *N. benthamiana*

Uma colônia transformada de cada placa foi colocada em 125mL de meio LB líquido com 0,01% de canamicina e submetida à agitação de 150rpm, a 28°C por dois dias.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 8000rpm por 3 minutos, sendo o *pellet* lavado duas vezes em 20mL de meio MES/MgCl₂ (10% MES pH: 5,6, 1% MgCl₂ 1M). O pellet então foi ressuspensionado em 10mL desse meio, sendo diluído até alcançar a absorbância de 0,3 em um comprimento de onda de 600nm. Após esse estágio, foi adicionado acetoseringona em uma concentração de 100μM.

A infiltração ocorreu a partir de uma pequena lesão nas maiores folhas das plantas com melhor crescimento, onde fora injetada a suspensão com as bactérias transformadas nessa região a partir de uma seringa.

5.4.3. Extração da proteína da folha vegetal

Para extração da proteína, após 5 dias decorridos da agroinfiltração, foram pesados 2g de folha de três amostras: selvagem, planta infiltrada com *R. radiobacter* transformada com SPBP1, e planta infiltrada com *R. radiobacter* com SPBP1(-). As folhas foram maceradas com nitrogênio líquido e colocadas em 5mL de tampão constituído de 5% de Tris-HCl 1M de pH 7,5, 200μL de triton X-100, 1,5% de NaCl 5M, 1% de glicerol, 0,8% de EDTA 0,5M, 0,8% de benzamidina e 0,8% de PMSF. A solução foi vortexada seis vezes por um minuto, com intervalos de um minuto no gelo.

Posteriormente as amostras foram sonicadas seis vezes por 30 segundos, com intervalos de um minuto no gelo, sendo, após esse processo, centrifugadas por 30 minutos a 8000rpm a 4°C, sendo o sobrenadante estocado a -80°C.

5.4.4. Análise de proteínas em gel desnaturante SDS Page

As amostras foram colocadas a 100°C por 7 minutos para então serem então pipetadas em gel de poliacrilamida 12.5%, sendo utilizados 30µL de amostra e 10µL de tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilenocianol, 25% ficoll 400) em cada poço.

A eletroforese ocorreu a partir de 30 minutos em uma corrente de 80V e aproximadamente duas horas em uma corrente de 100V. Após o término da eletroforese, este foi colocado por 30 minutos em solução fixadora (40% de metanol e 2% de ácido acético), e fora deixado *overnight* com a solução corante (30% de metanol, 8% de sulfato de amônio, 8% de ácido fosfórico e 0,08% de Comassie Blue). Além disso, o gel foi feito com as amostras em duplicata, sendo um desses géis obtidos submetido à transferência para a membrana de *Western blotting* com uma corrente de 100mA *overnight*.

5.4.5. Análise da expressão da proteína em *Western Blotting*

A membrana foi bloqueada com 20mL de PBS 1x (0,8% de NaCl, 0,02% de KCl, 0,2% de Na₂HPO₄ e 0,02% de KH₂PO₄) E 1g de leite, sendo deixada agitando por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, esta foi lavada com PBST 0,1% (PBS e 0,1% de Tween 20) cinco vezes por cinco minutos cada lavagem, sendo então sensibilizada com o anticorpo primário anti-his na proporção 1:2000 com 0,2g de leite, a membrana ficando em agitação com essa solução por duas horas à temperatura ambiente.

Após esse período a membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente, sendo então sensibilizada com o anticorpo secundário anti-mouse IgG na proporção 1:1000 com 0,2g de leite, ficando em agitação por uma hora à temperatura ambiente.

Posteriormente, a membrana foi lavada cinco vezes com PBST 0,1% novamente, sendo então levada para revelação em câmara escura.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exploração de compostos encontrados em peçonhas de serpentes é uma vertente promissora para o descobrimento de potenciais princípios ativos para a produção de novos medicamentos, sendo um exemplo destes compostos, a classe de enzimas serinoprotease *thrombin-like*. Essas enzimas têm a capacidade de atuar de maneira similar à trombina na coagulação sanguínea, tendo demonstrado resultados promissores em modelos animais para sua utilização em futuros fármacos pró-coagulantes (SWENSON; MARKLAND JUNIOR, 2005).

As serinoproteases para serem ativadas, necessitam de mudanças pós-traducionais como a glicosilação (NEURATH; DREYER, 1955), sendo essa etapa presente apenas em organismos eucariotos, impossibilitando, assim, que essa proteína seja expressa em sistemas procariontes.

Por essa limitação, estudos propõem a expressão de proteínas em sistemas de expressão eucariotos, com o objetivo de aperfeiçoar a produção em larga escala dessas moléculas (IDIRIS et al., 2010). Nesse contexto, tem-se que serinoproteases presentes em peçonhas de serpentes foram expressas satisfatoriamente em fungos como *Pichia pastoris* (ISABEL et al., 2016).

Para essa expressão, primeiramente os genes de interesse SPBP1, SPBP1 (-) e o plasmídeo pEAQ-HT foram eletroporados em células competentes de *E. coli* DH5 α , essa metodologia sendo utilizado objetivando o aumento do número de cópias das sequências de interesse (XISTO, 2015). Após a observação do crescimento de colônias no meio com antibiótico, o material genético das colônias transformadas foi digerido e submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% (Figura 9).

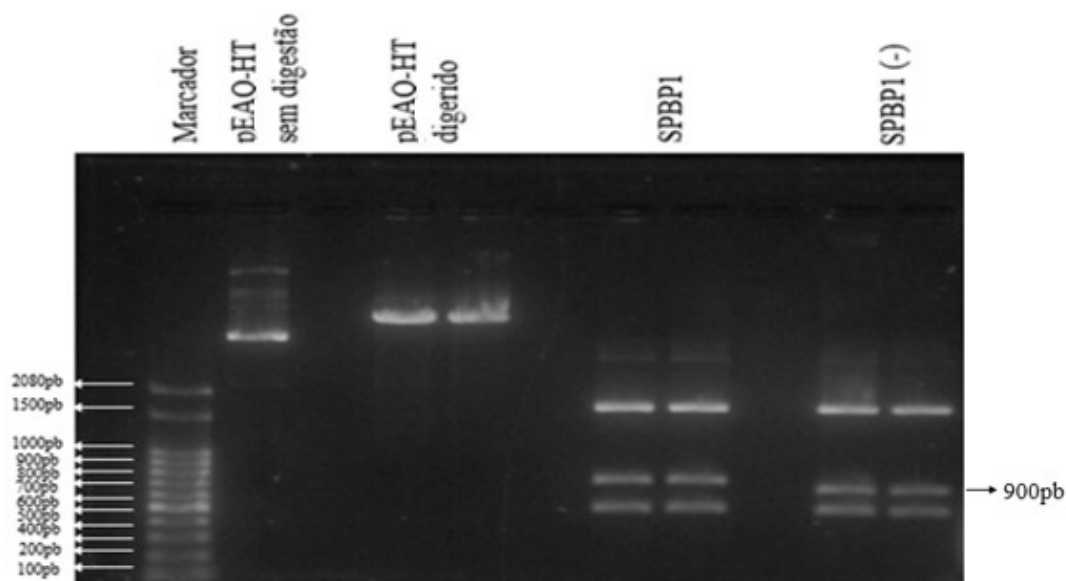


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,2% de amostras digeridas de DNA plasmidial extraídas de DH5 α transformada. Da esquerda para a direita; marcador de pares de base, vetor pEAQ-HT sem digestão, dois poços deste mesmo vetor digerido, dois poços do gene da serinoprotease de *B. pauloensis* com peptídeo sinal (SPBP1) e dois poços desse gene sem peptídeo sinal (SPBP1(-)).

De acordo com a figura 9, pode-se analisar que o vetor pEAQ-HT digerido e sem digestão têm massa molecular acima de 2800pb, o que corresponde à região do vetor digerido que será utilizado para inserção dos genes no vegetal.

O gene da serinoprotease com o peptídeo sinal da alfa amilase do arroz tem massa molecular de 902pb, o que corresponde à segunda banda visualizada no gel realizado de acordo com o marcador. As bandas de tamanho aproximado de 1500pb e 700pb correspondem a sequências do vetor pUC57-Kan, onde os genes da serinoprotease foram sintetizados.

É importante salientar que o surgimento de uma sequência de 700pb visualizada no gel proveniente do vetor ocorreu pela presença em sua sequência de sítios de restrição para as enzimas XhoI e NruI, que, portanto, clivaram a sequência isolada dos genes de interesse e uma região não utilizada do vetor.

O gene da serinoprotease sem o peptídeo sinal da alfa amilase do arroz tem peso molecular de 827pb, correspondendo portanto a segunda banda visualizada nas canaletas desse gene no gel. No caso a separação das sequências da amostra desse gene em três bandas ocorre similarmente ao explicado para o gene com o peptídeo sinal, onde as duas outras bandas visualizadas correspondem ao vetor pUC57-Kan.

Em experimentos para transformação de *R. radiobacter* e infiltração desta no vegetal, a técnica de eletroforese em gel de agarose para amostras digeridas dos genes de interesse é utilizada a fim de isolar as sequências de massa molecular de interesse do gene para posterior purificação (XISTO, 2015). Nesse caso, as sequências isoladas selecionadas para purificação foram as de massas moleculares acima de 2800 para o vetor, e a de aproximadamente 900pb para os dois genes.

Após a ligação do vetor pEAQ-HT aos genes de interesse (SPBP1 e SPBP1 (-)), as amostras foram eletroporadas em células de *E. coli* DH5 α , sendo observado o crescimento das colônias em meio contendo antibióticos e as colônias transformadas posteriormente submetidas à extração do DNA plasmidial.

Após esse processo, as amostras foram digeridas e submetidas a análise em eletroforese de gel de agarose 1,2%, para confirmação das colônias transformadas com o inserto de interesse (Figura 10).

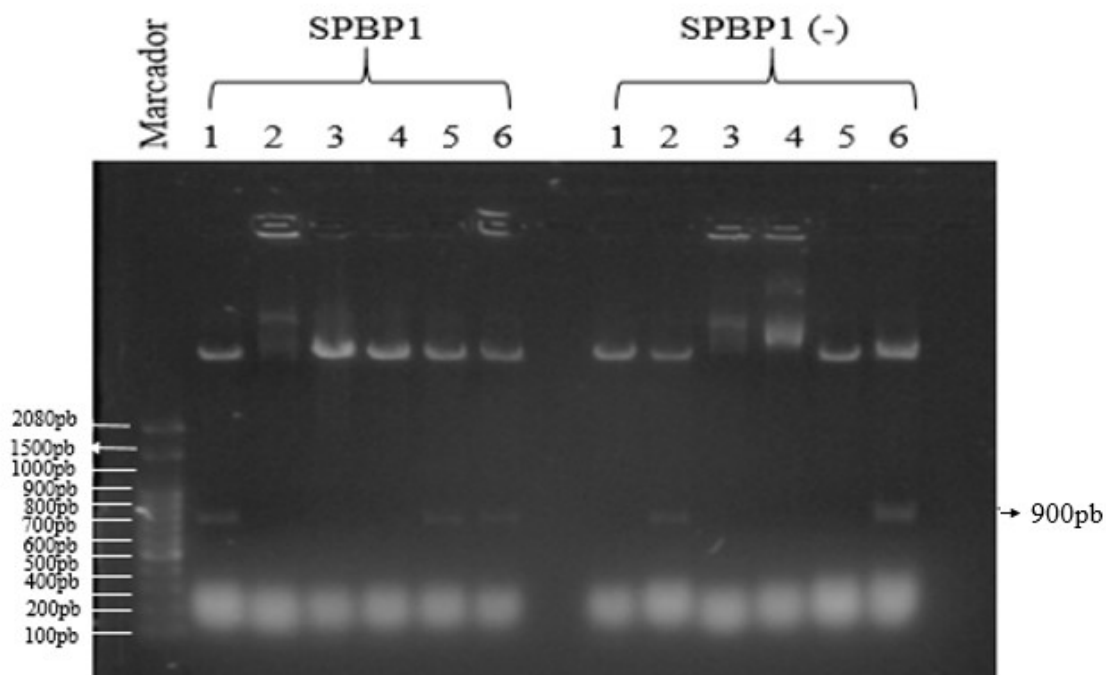


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,2% de DNA plasmidial de colônias transformadas de DH5α. Na imagem, tem-se as bandas do marcador de pares de base, seis amostras de colônias transformadas de DH5α com SPBP1 e seis amostras de colônias transformadas com SPBP1(-).

Nesse procedimento, pode-se analisar que as colônias 1, 5 e 6 para o gene com peptídeo sinal e as colônias 2 e 6 para o gene sem peptídeo sinal apresentam uma banda de peso molecular de aproximadamente 900pb correspondendo a banda visualizada anteriormente para as sequências dos genes da serinoprotease com e sem peptídeo sinal anteriormente. A presença dessa banda indica, portanto, que as colônias indicadas foram transformadas com o gene de interesse.

Após a verificação das colônias transformadas de DH5α, estas tiveram seu DNA plasmidial extraído e eletroporado em células competentes de *R. radiobacter* EHA105.

Foi verificado o crescimento das colônias de *R. radiobacter* eletroporadas em meio contendo antibiótico, sendo estas posteriormente cultivadas e infiltradas em folhas

de *N. benthamiana*, as folhas sendo coletadas após cinco dias para análise da expressão da proteína recombinante.

As folhas foram submetidas à extração e posterior análise dos peptídeos em gel de poliacrilamida, sendo posteriormente realizada a coloração deste com Comassie Blue (Figura 12).

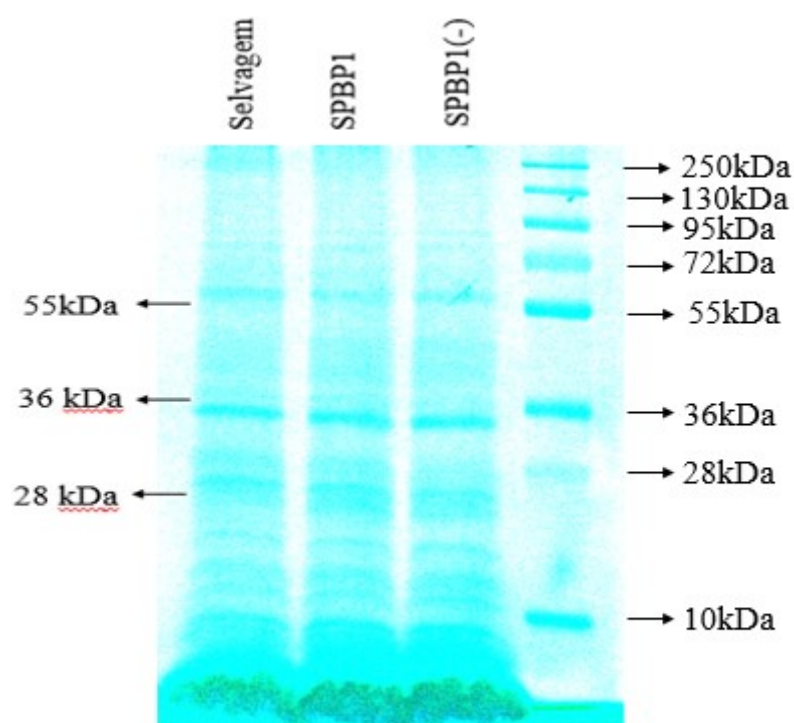


Figura 11. Coloração do gel de poliacrilamida 12,5% contendo o extrato de folhas de *Nicotiana benthamiana*. Sendo as amostras o marcador, a amostra de folhas selvagens, ou seja, que não sofreram agroinfiltração nem das amostras transformadas nem do vetor vazio, amostra de folhas infiltradas com SPBP1 e amostra de folhas infiltradas com SPBP1 (-).

Além disso, o gel foi submetido à transferência para membrana e realização de *Western blotting* (Figura 12).

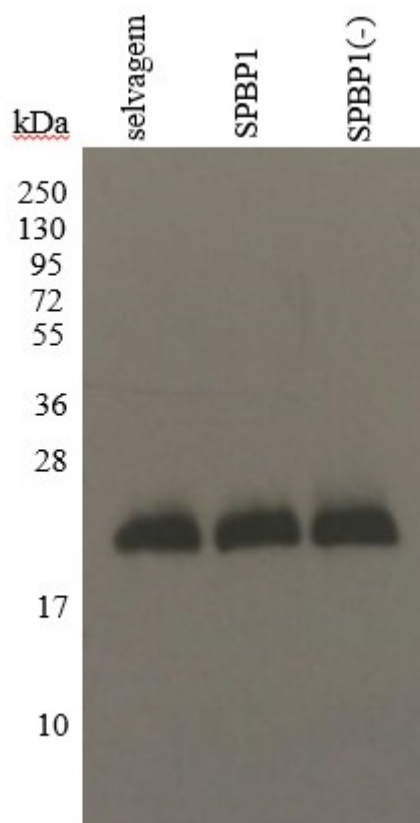


Figura 12. Revelação de *Western blotting* com tempo de exposição de cinco minutos. Na imagem, tem-se o marcador de massa molecular em kDa, a amostra de folhas selvagens, as folhas agroinfiltradas com SPBP1 e as folhas infiltradas com SPBP1(-).

Na figura 12 pode-se inferir a presença de uma banda de massa molecular aproximada de 20kDa. Sabe-se que o gene infiltrado codifica uma serinoprotease de 40 kDa, portanto o *Western blotting* realizado não foi capaz de detectar a proteína de interesse expressa pela planta.

Esse resultado inconclusivo pode ter ocorrido pela utilização de uma colônia de *Agrobacterium thumefaciens* não transformada, pois a presença de colônias em meio com antibiótico não é suficiente para provar que todas as colônias foram transformadas com o plasmídeo de interesse, como visto com as colônias de *E. coli* transformadas. Além disso, a não verificação de quais colônias apresentaram uma transformação de sucesso, pode ter acarretado na agroinfiltração de uma colônia que não apresentava os genes da serinoprotease para sua expressão pelo sistema vegetal.

Além disso, a concentração de colônias de *R. radiobacter* utilizadas na agroinfiltração pode ser baixa (OD de 0,3 em absorbância de 600nm), pois estudos apresentaram resultados de expressão de proteínas heterólogas a partir da transformação com *R. radiobacter* com OD de 0,6 a 0,8 na mesma absorbância (TORRES, 2000).

O período de tempo escolhido para produção da proteína pelo vegetal, sendo esse no experimento realizado de cinco dias, também pode influenciar na detecção da proteína, pois nesse período até a extração das folhas agroinfiltradas a proteína pode ser expressa pelo vegetal e degradada, ocasionando a ausência da detecção dessa proteína. Segundo Figueiredo 2003, em um experimento com transformação transiente de vegetal com *R. radiobacter* transformada com o gene GFP, o período de espera para expressão da proteína foi de dois a três dias.

Por último, como um dos genes utilizados codifica a serinoprotease com o peptídeo sinal da alfa amilase do arroz, que direciona a proteína para o apoplasto do vegetal, a utilização da extração da proteína das folhas do vegetal sem lise das células vegetais pode torna-se uma alternativa para extração dessa proteína expressa fora das células. Em estudo para produção de eritropoietina por *Arabidopsis thaliana*, a análise do meio de cultura onde as células vegetais estavam *in vitro* para produção da proteína reflete esta técnica de extração de proteínas heterólogas sem a lise celular (DIAS, 2009).

As perspectivas futuras desse projeto são, com a expressão da serinoprotease recombinante em *N. bentamiana*, a proteína poderá ser submetida à purificação, para posterior análise de sua capacidade coagulante e fibrinogenolítica. Essa análise auxiliará em estudos comparativos entre a atividade realizada pela proteína bruta (encontrada na peçonha de *B. pauloensis*) e pela expressa em modelo *P. pastoris*. Essas análises podem contribuir para a caracterização e posterior produção desta proteína por um novo sistema

de expressão heterólogo, nesse caso, o sistema vegetal, contribuindo assim para a elucidação desta molécula para aplicação na indústria farmacêutica.

7. CONCLUSÃO

Com o presente estudo, têm-se que foi detectada a transformação das bactérias *E. coli* e *R. radiobacter* com o gene codificante da serinoprotease *thrombin-like* derivada da peçonha de *B. pauloensis*. A partir dessa transformação, ocorreu a agroinfiltração em *N. bentamiana*, sem a detecção ainda da proteína recombinante expressa pelo vegetal. Tal resultado inconclusivo leva à maiores estudos variando diferentes aspectos da técnica utilizada, como a concentração de *R. radiobacter* utilizada na agroinfiltração, o período de espera para expressão da proteína pelo vegetal, e a técnica de extração da proteína, para, assim, ocasionar a detecção e purificação da proteína expressa para suas posteriores análises.

Dado o importante potencial farmacológico que toxinas de peçonha de serpente como a serinoprotease têm para o tratamento de doenças como câncer, trombose, dentre outros, a caracterização e produção em maior escala dessas proteínas torna-se um fator essencial para a aplicabilidade satisfatória desses compostos no mercado. Nesse âmbito, é importante salientar a utilização do sistema vegetal para produção da proteína de uma maneira rápida e de baixo custo, tanto para realização de seus estudos quanto para sua aplicação em escala industrial. Visto isso, torna-se claro o potencial desse seguimento de pesquisa para o desenvolvimento e esclarecimento de novas moléculas que poderão tornar-se futuros medicamentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, G. M. et al. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, [s.i.], v. 28, n. 5, p.465-476, 2003.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B.. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, [s.i.], v. 54, n. 7, p.949-957, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.014>.
- BERNARDE, P. S. **Serpentes Peçonhentas: E acidentes ofídicos no Brasil**. Curitiba: Anolis Books, 2014.
- BEVAN, M. W. Binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, London, v. 12, p. 8711-8721, 1984.
- CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, [s.i.], v. 42, n. 11, p.1405-1414, 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1242>.
- CANIZARES, M. C. et al. Use of viral vectors for vaccine production in plants. **Immunology and Cell Biology**, [s.i.], v. 83, n. 3, p.263-270, 2005.
- CARDOSO, J. L. C.; BRANDO, R. B. **Acidentes por animais peçonhentos**. 1a. Ed. Santos, São Paulo, 1982.
- CARDOSO, J.L.C. et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 338-338, 2003. Disponível em: <<http://www.periodicos.usp.br/rimtsp/article/view/30767>>. Acesso em: 27 nov. 2017.
- CASTRO, H. C. et al. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p.843-856, 2004.
- CONN, H. J. Validity of the Genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, [s.i.], v. 3, n. 44, p.353-360, 1942.
- COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**, São Paulo, v. 4, n. 3, p.75-93, 2015.
- DIAS, S. M. C. **Produção de eritropoietina em culturas de células de *Arabidopsis thaliana***. 2009. 84 f. Mestrado. Curso de Biotecnologia. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2009.
- EMBRAPA. **Doenças causadas por vírus, bactérias e nematóides e medidas de controle**. 2003.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Belo Horizonte, v. 5, n. 32, p.416-421, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n5/aop101010.pdf>>. Acesso em: 9 nov. 2017.

FIGUEIREDO, A. R. S. **Expressão de proteínas heterólogas em plantas: Estudo do Pepper Ringspot Virus como vetor de expressão; expressão da proteína verde fluorescente em *Solanum tuberosum* L. por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. 2003. 121 f. Mestrado. Curso de Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal. Universidade do Porto, Porto. 2003.

FRANCO R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.34, p.229-237, 2001.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators of Inflammation**, [s.i.], v. 9, n. 2, p.101-107, 2000. <http://dx.doi.org/10.1080/096293500411569>.

GOODIN, M. M. et al. *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions. **The American Phytopathological Society**, Kentucky, v. 21, n. 8, p.1015-1026, 2008.

HOLT, E. J. G. **The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8. ed. [s.i]: [s.i], 1977.

IDIRIS, A. et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.i.], v. 86, n. 2, p.403-417, 2010.

ISABEL, T. F. et al. Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, [s.i.], v. 115, p.49-54, 2016.

KUSNADI, A. R. et al. Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants: Practical Considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.i.], v. 56, n. 5, p.473-484, 1997.

KNAPP, S. et al. Nomenclatural Changes and a New Sectional Classification in *Nicotiana* (Solanaceae). **Taxon**, [s.i.], v. 53, n. 1, p.73-82, 2004.

LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal of Molecular Biology**, [s.i.], v. 258, p.501-537, 1996.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. [s.i]: Artmed Editora, 2016. 1032 p.

- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, [s.i.], v. 36, n. 12, p.1749-1800, 1998.
- MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, [s.i.], v. 45, n. 8, p.1171-1181, 2015.
- MARTA, R. et al. Peritonite por *Rhizobium radiobacter*. **Einstein**, [s.i.], v. 9, n. 3, p.389-390, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/eins/v9n3/pt_1679-4508-eins-9-3-0389.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2017.
- MASUDA, S. et al. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A2 enzymes in several human tissues. **Biochimica et Biophysica Acta (bba) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s.i.], v. 1736, n. 3, p.200-210, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – Sinan Net. **Acidente por animais peçonhentos – Notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação - Brasil**.
- NEURATH, H.; DREYER, W. J. Mechanism of activation of trypsinogen and chymotrypsinogen. **Discussions of The Faraday Society**, [s.i.], v. 20, n. 1, p.32-43, 1955.
- OBEMBE, O. O. et al. Advances in plant molecular farming. **Biotechnology Advances**, [s.i.], v. 29, n. 2, p.210-222, 2011.
- OLIVEIRA, M. F. **Expressão e caracterização antitumoral de uma protease clonada da peçonha de Bothropis pauloensis**. 2017. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- PORRO, D. et al. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.i.], v. 89, n. 4, p.939-948, 2010.
- RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, [s.i.], v. 75, n. 9, p.2707-2720, 2012.
- SAINSBURY, F. et al. PEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. **Plant Biotechnology Journal**, [s.i.], v. 7, n. 7, p.682-693, 2009.
- SÁNCHEZ, E. E. et al. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Archives of Toxicology**, [s.i.], v. 83, n. 3, p.271-279, 2008.
- SANTOS, Al. A. dos et al. Coagulação sanguínea e modelos de sinalização: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, João Pessoa, v. 11, n. 1, p.20-23, 2015. Disponível em: <https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150601_090212.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteases:: Sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, [s.i.], v. 45, p.1115-1132, 2005.

SMITH, E. F.; TOWNSEND, C. O. A plant-tumor of bacterial origin. **Science**, [s.i.], v. 25, n. 643, p.671-673, 1907.

SOUZA, A. C. **Expressão transiente de proteínas recombinantes utilizando sistema de planta**. 2014. 171 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.repositorio.unb.br/bitstream/10482/16859/1/2014_AnaClaudiadeSouza.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2017.

STOCKER, K. F. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: **STOCKER K.F. Medical use of snake proteins**. v. 2, p. 97-161. 1990.

STOCKER, K. et al. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, [s.i.], v. 20, n. 1, p.265-273, 1982.

SWENSON, S.; MARKLAND JUNIOR, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, [s.i.], v. 45, p.1021-1039, 2005.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, [s.i.], v. 54, n. 1, p.67-76, 2009.

TODESCO, M.; FELIPPES, F. F. Why Benthamiana Went Viral. **Trends in Plant Science**, [s.i.], v. 21, n. 1, p.4-6, 2016.

TORRES, A. C. Transformação genética da batata cultivar Achat via *Agrobacterium tumefaciens*. **Horticultura Brasileira**. [s.i.], v. 18, n.1, p. 41-45, 2000.

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s.i.], v. 3, n. 2, p.156-162, 2013.

WYDRO, M. et al. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. **Acta Bioquímica Polonica**, [s.i.], v. 55, p.289-298, 2006.

XISTO, M. F. **Expressão heteróloga da proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus Dengue-2 em *Arabidopsis thaliana***. 2015. 52 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/6696/texto_completo.pdf?sequence=1>. Acesso em: 29 nov. 2017.

ZENG, F. et al. Crystal structure and activating effect on RyRs of AhV_TL-I, a glycosylated thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* snake venom. **Archives of Toxicology**. [s.i.], p:535-545, 2012.

ZHU, J. et al. The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. **Journal of Bacteriology**. [s.i.], p. 3885-3995. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC94570/pdf/jb003885.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

ZUPAN, J. et al. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.11-28, 2000.