



DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM MICROALGAS

Palavras-Chave: [*Chlamydomonas reinhardtii*], [proteínas recombinantes], [mutagênese]

Autores:

Letícia Fudimori da Silva [UNICAMP]

Prof. Dr. Augusto Ducatti Luchessi (orientador) [UNICAMP]

Dr^a Karina Danielle Pereira Thomaz (co-orientadora) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

Os biofármacos compreendem um mercado em franco crescimento, sendo utilizados em diferentes classes de medicamentos (1). Existem centenas de proteínas recombinantes de aplicações farmacêuticas aprovadas para uso pelo Food and Drug Administration (FDA) e uma série de outras em desenvolvimento. No entanto, esses biofármacos estão entre os agentes terapêuticos mais onerosos. O alto custo de tratamento deriva de vários fatores, incluindo os custos de capital de investimento associados à instalação da infraestrutura para produção (2, 3). De fato, muitos dos novos medicamentos baseados em proteínas recombinantes, atualmente em desenvolvimento, exigirão substancial produção do biofármaco e terão grandes populações de pacientes.

Existem vários sistemas de expressão de proteínas heterólogas disponíveis para a produção de proteínas de aplicação farmacêutica, cada um desses sistemas oferece vantagens e desvantagens distintas em termos de rendimento de proteína, facilidade de manipulação e custo de operação (4). As algas verdes são organismos que vivem livremente (microalgas) ou em comunidades organizadas e multicelulares (macroalgas). As algas crescem muito mais rápido do que as plantas terrestres, dobrando o número de células em aproximadamente 12 horas e podem ser cultivadas em suspensão de maneira similar às bactérias e leveduras. Quando provida de acetato como fonte de carbono, a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* pode até crescer de maneira independente de fotossíntese. Como a maioria das algas se propaga por divisão vegetativa, o tempo desde a transformação do organismo até a produção da

proteína recombinante é significativamente menor do que em relação às plantas, requerendo em torno de um mês para avaliar a produção da proteína em escala laboratorial, com potencial para dezenas de milhares de litros entre um a dois meses. A purificação de proteínas recombinantes também é simplificada em relação às plantas terrestres, já que a população celular de algas é uniforme em tamanho e tipo (5). Portanto, não há gradiente de distribuição de proteína recombinante, simplificando a purificação e reduzindo a quantidade de biomassa que vai para fins não produtivos.

Assim, o objetivo geral do projeto é consolidar uma estratégia de detecção eficiente e mais simples de clones altamente produtores de proteínas recombinantes por meio da proteína fluorescente mCherry e aplicação de mutagênese com luz ultravioleta (UV) e Etil Metano Sulfonato (EMS).

METODOLOGIA

Linhagem de *Chlamydomonas reinhardtii* e condições de cultivo

As linhagens de *C. reinhardtii* (CC 124 e CC406) usadas neste estudo foram cedidas pelo Prof. Dr. Stephen P. Mayfield, California Center for Algae Biotechnology-USA e cultivadas em meio líquido Tris-acetato fosfato (TAP) sob agitação de 125 rpm, ou em placas contendo ágar. O meio líquido foi utilizado para amplificação das algas e o meio ágar para manutenção da cepa. As culturas foram incubadas a 25° C sob um ciclo constante de luz a 25 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Construções plasmidiais

A sequência de aminoácidos de rhSLPI humana foi traduzida reversamente em DNA otimizado para

expressão em *C. reinhardtii*. Posteriormente, as sequências de DNA correspondente foram sintetizadas e clonadas no vetor plasmidial de interesse (pAJB3) utilizando o método de Gibson Assembly (Gibson Assembly® Cloning kit, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). A construção plasmidial obtida (pAJB3-SLPI) expressa um gene marcador de resistência a Zeocina (Ble2A) em fusão com a sequência codificadora de peptídeo sinal para retículo endoplasmático de ARS1, região codificadora de SLPI contendo dois introns derivados de PSBR e FDX1. O gene marcador de resistência e a sequência codificadora do peptídeo de sinal para retículo endoplasmático estão separados por um sítio de auto-clivagem F2A. A partir da construção pAJB3-SLPI, foram obtidas as construções pAJB3-S-L-mCherry pelo método de Gibson Assembly de forma a inserir a sequência produtoras de SLPI (amplificada por PCR a partir do vetor pAJB3-SLPI), uma nova sequência de autoclivagem T2A, LCI1 fusionada a FLAG (sintetizada pela empresa IDT) e da proteína fluorescente mCherry fusionada a FLAG (amplificada por PCR a partir do vetor pJP32mCherry). Os genes Ble2A, ARS1 e o sítio de auto clivagem F2A, foram mantidos na nova construção.

Digestão do vetor plasmidial

Os plasmídeos pAJB3-SLPI-FLAG e pJP32mCherry foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e XhoI, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific, Inc, La Jolla, Califórnia). A seguir, os vetores de interesse foram purificados após eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o Kit GFX PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare, Inc., Nova Jersey, EUA)

Reação em cadeia pela polimerase (PCR) das sequências

Para amplificação dos genes codificadores de rhSLPI e mCherry, foi realizado a PCR a partir dos vetores plasmidiais pAJB3-SLPI e pJP32mCherry. As reações foram realizadas em 33 µL de água ultrapura contendo 1 µL do vetor (diluído 500×), 10 µM oligonucleotídeos (sense e antisense), 0,2 mM de dNTPmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 µL de 5X SuperFi™II buffer with 15 mM MgCl₂ e 1 µL de Platinum SuperFi™II DNA Polymerase. Em seguida, a reação foi realizada utilizando: 98°C por 30 segundos, seguida por 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, 63°C por 10 segundos e 72°C por 20 segundos, seguido por um ciclo de 72°C por 5 minutos. Ao término da reação, as amostras foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose 1 %.

Reação Gibson Assembly e transformação de *E. coli* competente

A clonagem foi realizada utilizando-se a reação isotérmica de Gibson Assembly. Foram utilizados 3 µl do vetor pAJB3-SLPI (15 ng/µl), 2,15 µl do cDNA de SLPI (66,6 ng/µl), 3,15 µl do cDNA de LCI1 (38,6 ng/µl), 1,8 µl do cDNA de mCherry (70,42 ng/µl) e 10 µl do Master Mix 2X. A reação foi incubada a 50°C por 20 minutos. Células de *E. coli* estocadas a -80°C foram descongeladas em gelo. Em um tubo de microcentrifuga contendo ~100 µl das células competentes foi adicionado 10 µl da reação de Assembly dos vetores com o inserto de interesse, já realizada anteriormente. Os tubos foram mantidos em gelo por 30 minutos, seguido de banho-maria a 42°C por 50 segundos, seguido de incubação no gelo por 2 minutos. A seguir, 1 ml de meio LB-broth high salt (LB) líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado a 37°C por 1 hora. 100 µl da cultura foram plaqueadas em placa de petri contendo meio LB ágar acrescido de ampicilina (100 mg/mL). Como controle negativo, foram utilizadas células competentes transformadas com a reação de Assembly apenas do vetor, sem ter sido adicionado o inserto. As placas foram incubadas a 37°C overnight.

Preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em pequena escala (Miniprep)

Colônias isoladas de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foram inoculadas e purificadas utilizando o kit PlasmidPrep Mini Flow (GE Healthcare, Inc., Nova Jersey, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição XhoI e KpnI, e purificados após eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o Kit GFX PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare, Inc., Nova Jersey, EUA) para sequenciamento.

Transformação de microalgas *C. reinhardtii* através de eletroporação e técnica de glass beads

As transformações das cepas de *C. reinhardtii* CC124 e CC406 foram feitas seguindo o protocolo do kit GeneArt® MAX Efficiency® Transformation Reagent for Algae (Publication Number MAN0009795). Para a transformação com Glass Beads, foi utilizado o protocolo Glass Bead Transformation⁸.

Reação em cadeia pela polimerase (PCR) das microalgas positivas

Para amplificação do DNA dos clones positivos, foi coletado a biomassa de 4 clones transformados a partir da CC124 e 2 clones da CC406, colocados em água ultrapura e aquecidos por 10min a 90°C. Em seguida, foram preparados dois tubos de PCR para

cada amostra, um para identificar a sequência de rhSLPI, com os primers 1F e 1R, e mCherry, com os primers 2F e 2R. As reações foram realizadas de acordo com o protocolo de PCR já descrito.

Microscopia de fluorescência

Os inóculos dos clones positivos foram crescidos em 5mL de meio TAP sob agitação constante por 3 dias. Em seguida, 1 mL de células foi centrifugado a 2500 rpm por 5 min e ressuspensão em 100 µL. As células foram adicionadas nos poços da placa de 48 well e ficaram em repouso durante 20 min. Em seguida o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 200 µL de formaldeído 1,8% por 20 min. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se com PBS 1x e adicionou-se o anticorpo primário Anti-FLAG (1:250) por 2 horas. Após a lavagem foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a FITC (Alexa Fluor 488) por 1 hora. Após a última lavagem, a placa foi observada no microscópio. O espectro de emissão utilizado para clorofila foi de 651-735nm, para mCherry de 577-622nm e FITC 415-520nm.

Quantificação de fluorescência por espectrofotometria

Inóculos dos 4 clones derivados da cepa CC124 e 2 inóculos da cepa CC406, bem como dos controles, foram crescidos em 5mL de meio TAP sob agitação por 3 dias. A seguir, foi calculado uma suspensão de células de 1×10^6 cel/mL em 1 mL. Adicionou-se 200 µL de cada amostra em uma placa branca e fez-se a leitura de fluorescência em espectrofotômetro Multimode Microplate Reader, BioTek Synergy H1 com excitação 575 e emissão 608⁷.

SDS-PAGE e immunoblotting

As amostras protéicas foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) contendo SDS (SDS-PAGE), utilizando tampão de corrida (50 mM Tris; 0,38 M Glicina; 1,8 mM EDTA; 0,1% SDS) a 90V. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose sob diferença de potencial de 100V por 1 hora, utilizando tampão de transferência (24,8 mM Tris; 192 mM Glicina; 10% Metanol). A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 45 minutos em tampão TBS-T (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl e 0,02% Tween-20), contendo 5% de leite desnatado. Em seguida, a membrana foi incubada a temperatura ambiente por 4 horas com anticorpo anti-SLPI ou anti-FLAG diluídos em TBS-T contendo 5% de BSA. Após esse período, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com TBS-T e incubada a temperatura ambiente por 1 hora com anticorpos secundário anti-rabbit conjugados à

peroxidase diluídos em TBS-T contendo 5% de leite desnatado. Após as lavagens, a membrana foi tratada com ECL e visualizada em SYNGENE G:BOX.

Elisa

O ensaio de ELISA foi feito seguindo o protocolo Quantikine®ELISA Human SLPI Immunoassay (Catalog Number DPI00).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Digestão plasmidial, PCR das sequências e reação de Gibson Assembly

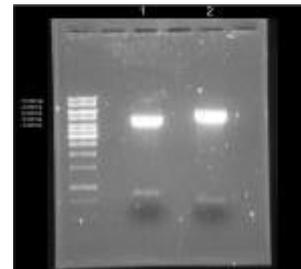


Figura 1

Após a digestão dos vetores plasmidiais pAJB3-SLPI (1) e pJP32mCherry (2) com as enzimas XhoI e BamHI, as bandas esperadas eram de 4.397 bp (1) e 4.900 bp (2) (Figura1). Os vetores foram digeridos para adaptar a sequência a estratégia do trabalho, assim, rhSLPI foi removida para posterior modificação e reintrodução no vetor.

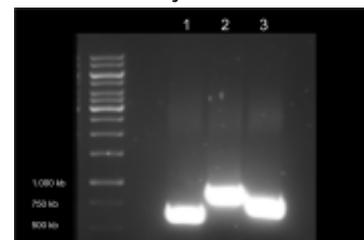


Figura 2

A partir das reações de PCR das sequências de interesse, esperava-se visualizar no gel rhSLPI+FDX1 com 608 bp (1), rhSLPI+PSBR+FDX1 com 836 bp (2) e mCherry com 708 bp (Figura 2).

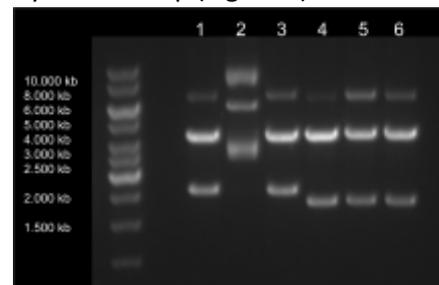


Figura 3

A seguir, a reação de Gibson Assembly e posterior transformação de bactérias competentes. A avaliação do plasmídeo de colônias positivas foi feita a partir de eletroforese em gel de agarose 1 %. Os três primeiros poços são de amostras que continham os íntrons FDX1 e PSBR e os três últimos

poços de plasmídeos contendo apenas FDX1. A altura esperada a partir da digestão plasmidial com as enzimas XhoI e KpnI são de 4.153 bp (vetor), 2.485 kb e 2.257 kb respectivamente. Portanto, a única colônia que não tinha o plasmídeo com tamanho esperado foi o 2 (Figura 3). Somente o plasmídeo 1 foi utilizado para a próxima etapa de transformação das microalgas.

PCR dos clones positivos

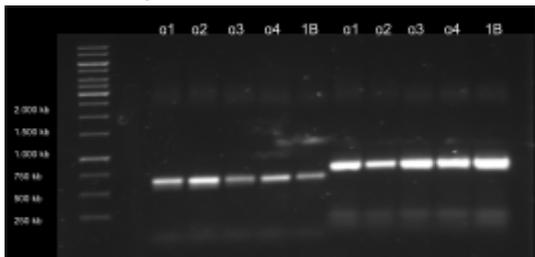


Figura 4

Os clones transformados “ α ” são provenientes da cepa CC124 e seguiram o protocolo de transformação do kit. Já os clones 1A, 1B, 1C e 1D são provenientes da cepa CC406 linearizados utilizando uma única enzima de restrição através da técnica de Glass Beads (Figura 4).

Espectrofotometria

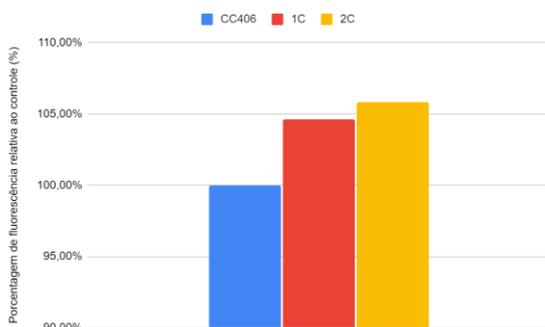


Gráfico 1 - espectrofotometria de fluorescência clones da cepa CC406

Os gráficos de espectrofotometria foram feitos considerando que o máximo de fluorescência (100%) corresponde a célula selvagem, assim as porcentagens de fluorescência dos clones foram calculados a partir desse parâmetro.



Gráfico 2 - espectrofotometria de fluorescência clones da cepa CC124

A partir da análise dos clones provenientes da cepa CC124, denota-se que os clones mais fluorescentes e, conseqüentemente mais positivos são $\alpha 1$ e $\alpha 4$ (Gráfico 2).

Microscopia de fluorescência

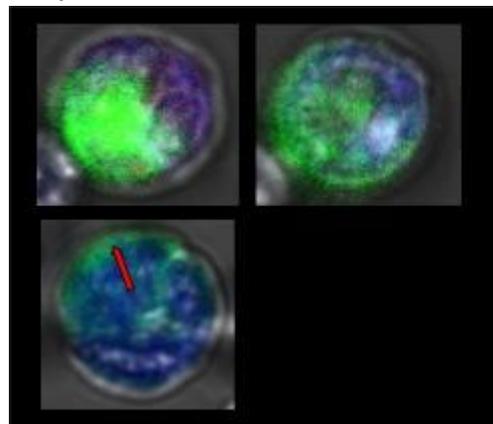


Figura 5

A partir dos resultados da espectrofotometria, foi possível dizer que os clones selecionados para as próximas etapas do projeto não são super fluorescentes e que, portanto, não estão produzindo em abundância a proteína de interesse. Assim, a visualização da localização da estratégia foi dificultada, uma vez que os espectros de emissão da mCherry e clorofila são próximos, sendo que a última apresenta autofluorescência forte. Por isso, foi feito o tratamento das células com anticorpos para visualização de FITC, possibilitando a confirmação de que a proteína ancorada na membrana LCI1 estava funcionando (Figura 5)⁶.

SDS-PAGE e imunoblotting

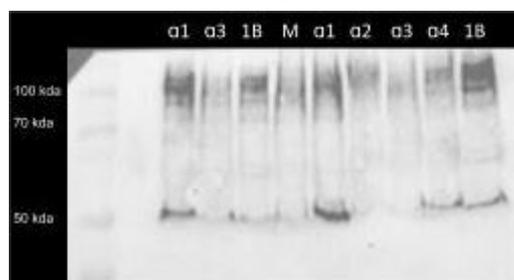


Figura 6

Os três primeiros poços representam $\alpha 1$, $\alpha 3$ e 1B com 3 dias de crescimento, M um mix dos clones da cepa CC124, seguidos pelos clones $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ e 1B com 7 dias de crescimento (Figura 6).

Esperava-se que as proteínas da estratégia FLAG+LCI1+mCherry+FLAG marcassem a membrana na altura de 50kda, assim, foi possível fazer uma relação dos resultados da espectrofotometria com o imunoblotting uma vez que as bandas mais fortes foram dos clones $\alpha 1$ e $\alpha 4$.



Figura 7
No imunoblotting dos clones tratados, percebe-se a presença de bandas mais fortes nas amostras que receberam algum tratamento mutagênico, principalmente do clone α1 (Figura 7).

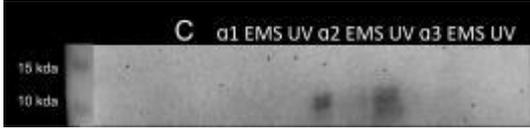


Figura 8
Contraditoriamente, os resultados positivos de imunoblotting para a proteína de interesse, rhSLPI, apareceu nos clones α2 e tratamento.

Elisa

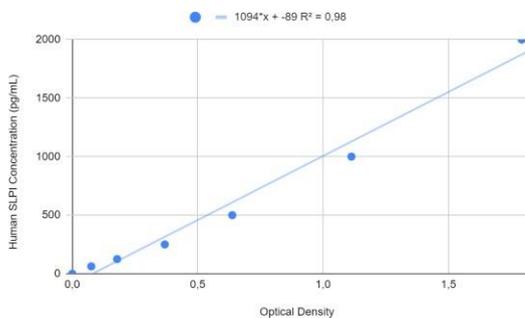


Gráfico 3 - curva standart kit elisa human rhSLPI

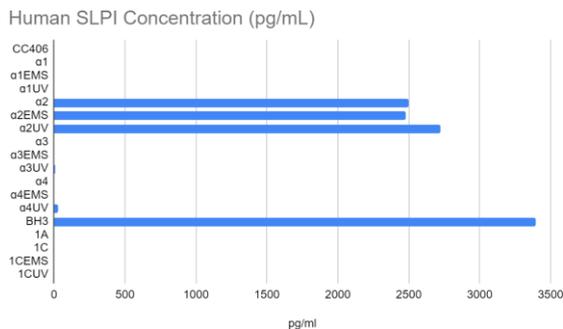


Gráfico 4 - concentração baseada na equação de tendência do kit elisa
Para averiguar o resultado do immnublotting para rhSLPI, foi feito um teste mais específico com kit de ensaio ELISA específico para essa proteína. A partir do gráfico 4, pode-se confirmar a presença mais marcante de rhSLPI no clone α2 e tratamentos. Também foi possível observar pequena presença nos clones α3 e α4 tratados com UV. O principal marcador para alta produção de rhSLPI foi o clone βH3, que foi transformado apenas para produzir rhSLPI e rastreado por dot blot anteriormente a esse projeto.

CONCLUSÕES

Conclui-se que foi possível executar a estratégia experimental proposta no projeto, uma vez que toda etapa de construção plasmidial até a

transformação das microalgas estava de acordo com o planejado. A intensidade de fluorescência dos clones detectada pelo espectrofotômetro foi compatível com os resultados de imunoblotting referente às proteínas LCI1 e mCherry, em que α1 é o clone que mais produz a sequência da estratégia, denotando a possibilidade de se trabalhar com essa perspectiva para rastreio de clones. Além disso, resultados positivos para o impacto dos tratamentos mutagênicos na produtividade das proteínas de interesse. No entanto, os testes específicos da proteína de interesse são mais positivos para o clone α2, sugerindo que a estratégia como um todo não é tão eficiente para rastrear rhSLPI. Assim, o projeto cria abertura para uma continuação direcionada para aplicação de mutagênese e CRISPR-CAS9 a partir da proteína fluorescente.

BIBLIOGRAFIA

1. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(1):21-39.
2. Tran M, Van C, Barrera DJ, Pettersson PL, Peinado CD, Bui J, et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(1):E15-22.
3. Rasala BA, Mayfield SP. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynthesis research*. 2015;123(3):227-39.
4. Dove A. Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nature biotechnology*. 2002;20(8):777-9.
5. León R, Cejudo AG, Fernández E. Transgenic microalgae as green cell factories: Springer Science & Business Media; 2008.
6. Ohnishi, Norikazu et al. "Expression of a low CO₂-inducible protein, LCI1, increases inorganic carbon uptake in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Plant cell* vol. 22,9 (2010): 3105-17. doi:10.1105/tpc.109.071811
7. Molino, João Vitor Dutra. Produção de proteínas heterólogas em microalga. Tese Doutorado, USP, São Paulo, 131p, 2017.
8. Pal Maliga (ed), Chloroplast Biotechnology: Methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol 1132, DOI: 10.1007/978-1-62703-995-6_27, 2014.