

Clonagem do gene Core do vírus da Hepatite C em vetores binários para direcionamento a diferentes compartimentos da célula vegetal

Arnaldo Solheiro Bezerra (1) ; Bruno Bezerra da Silva (2); Maria Izabel Florindo Guedes (3).

(Universidade Estadual do Ceará, solheirobr@hotmail.com)

(Universidade Estadual do Ceará, brunoxbezerra@gmail.com)

(Universidade Estadual do Ceará, florinfo@uol.com.br)

INTRODUÇÃO

A Hepatite C é uma doença de caráter agudo ou crônico e que acomete globalmente 71 milhões de pessoas. Por ser assintomática na forma crônica, muitos indivíduos só são diagnosticados em estágios avançados da doença, após o desenvolvimento de cirrose ou câncer hepático, resultando no óbito de aproximadamente 400 mil pessoas por ano (WHO, 2017).

O agente etiológico da doença é o vírus da Hepatite C (HCV), um vírus envelopado, de RNA de senso positivo e que se apresenta sob a forma de 6 genótipos diferentes. O RNA viral é composto por aproximadamente 9400 pares de base e apresenta genoma constituído por três proteínas estruturais (core, E1, E2) e sete não-estruturais (p7, NS2-NS5B). Uma característica importante nesse vírus é a sua alta variabilidade e capacidade de adaptação, possibilitando que este burle a resposta imunológica do hospedeiro (SIMMONDS, 2014).

A World Health Organization (2017) apresenta como meta, reduzir até 2030 o percentual de portadores crônicos não diagnosticados dos atuais 80 % para 10 %, demandando o desenvolvimento de kits para diagnóstico simples, portáteis e de baixo custo. O diagnóstico precoce e o desenvolvimento de vacinas para grupos de risco (usuários de drogas injetáveis, prisioneiros, profissionais de saúde) possibilitaria a redução dos altos custos terapêuticos da doença (WHO, 2017).

A produção de proteínas recombinantes em planta surge como alternativa aos métodos tradicionais para a produção simples, segura e de baixo custo de proteínas candidatas vacinais assim como de aplicação em testes de imunodiagnóstico (TSCHOFEN, *et. al* 2016)

Dentro desse sistema de produção, diferentes estratégias tem sido empregadas como forma de melhorar o rendimento e a estabilidade das proteínas produzidas. O direcionamento celular da proteína de interesse a organelas específicas é uma forma de favorecer sua produção e acúmulo em

ambientes bioquimicamente distintos (TSCHOFEN, *et. al* 2016; VIEGAS, OCAMPO, PETRUCCELLI, 2017)

O presente trabalho apresentou como objetivo portanto, a clonagem molecular do gene codificante para a proteína do Core do HCV em vetores binários com direcionamento para diferentes compartimentos da célula vegetal.

MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência codificante para o gene do Core foi obtida a partir da base de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e sintetizada pela empresa BioBasic (Ontario, Canadá). A sequência foi construída de forma a tornar o plasmídeo vetor apto ao sistema de clonagem Gateway®.

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

Para tanto, 100 ng do plasmídeo de clonagem foram utilizados para cada reação de recombinação utilizando a enzima LR Clonase (Gateway LR Clonase II Enzyme mix, Invitrogen), juntamente com 100 ng de cada um dos cinco vetores binários. As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e inativados por incubação a 37 °C com a enzima Proteinase K, conforme orientação do fabricante.

Todo o volume da reação de recombinação foi então empregado para transformar células de *Escherichia coli* DH10b. Brevemente, cada alíquota de célula competente foi descongelada em gelo e então adicionada a cada produto de recombinação. Para o choque térmico, cada alíquota foi incubada a 37 °C por 90 segundos, seguida novamente de incubação em gelo. Após esse processo, as células foram transferidas para 200 uL de meio de cultura LB e então incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação de 240 rpm. As culturas obtidas foram então aplicadas em placas de Petri com LB Ágar adicionado do antibiótico de seleção e mantidas a 37 °C *overnight*.

Das colônias obtidas em cada placa, três foram selecionadas para confirmação do processo de clonagem utilizando a técnica de PCR. Para isso, cada uma das colônias foi inoculada e homogeneizada em 20 µL de água ultrapura estéril. A reação de PCR continha concentração final

de 0,2 μM de cada primer, 200 μM de dNTPs, 2 mM de MgCl_2 e uma unidade de Taq DNA Polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega) diluída no tampão de reação do fabricante. A cada reação foi adicionado 1,0 μL da colônia diluída em água estéril ou somente água (controle negativo). A amplificação do material seguiu a seguinte programação: 95 °C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos (95 °C – 30” / 60 °C – 60” / 72 °C – 60”) e extensão final de 72 °C por 10 minutos.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1, são mostradas as placas de Petri em que as colônias transformadas, agora contendo o gene de resistência ao antibiótico de seleção, cresceram após o período de incubação.

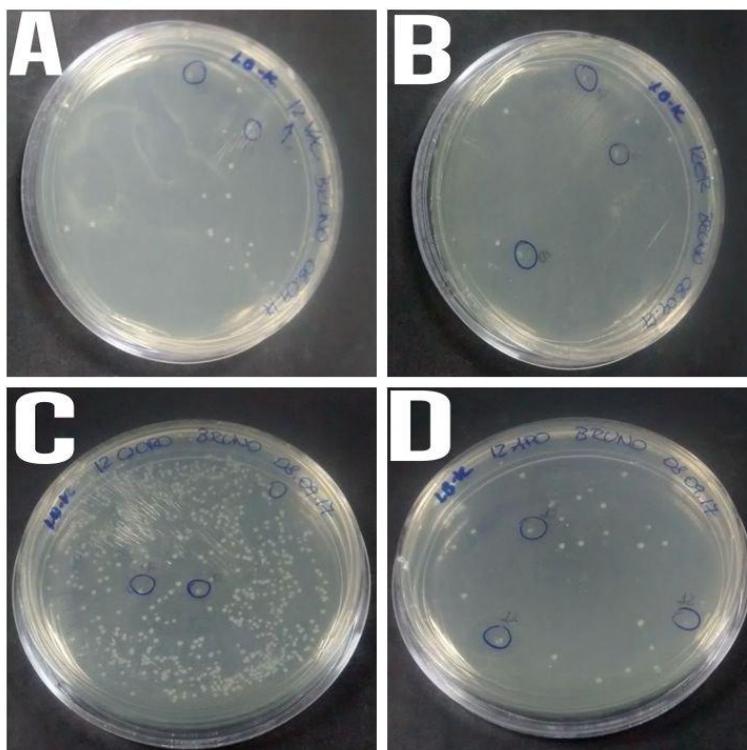


Figura 1: Placas com bactérias transformadas sendo A, B, C e D com insertos de direcionamento para o Vacúolo, Retículo Endoplasmático, Cloroplasto e Apoplasto respectivamente.

Fonte: Autores

Devido a possibilidade de ocorrência de falso positivos, prosseguiu-se com a seleção de três colônias aleatórias de cada placa para análise por meio de PCR e eletroforese em gel de agarose. Como pode ser visualizado na figura 2, todas as colônias mostraram-se positivas pela amplificação de fragmentos de aproximadamente 700 pb.

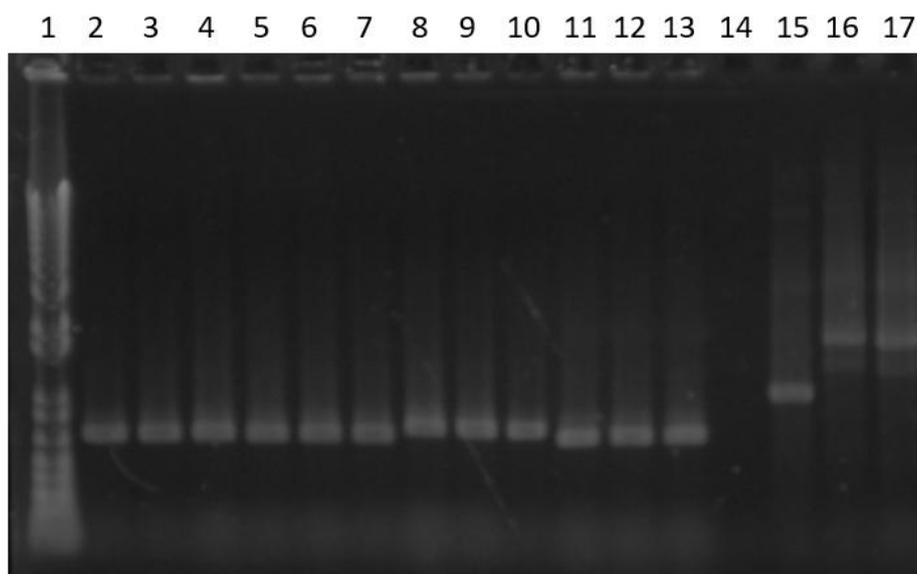


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificados para confirmação das colônias transformadas.

Fonte: Autores

Observa-se ainda pequena variação nas bandas resultantes dos produtos de amplificação em decorrência dos diferentes tipos de cauda de direcionamento celular empregadas. Nos poços 2-4 estão as que continham o plasmídeo de direcionamento ao vacúolo, do 5-7 para o retículo endoplasmático, do 8-10 para o cloroplasto, do 11-13 para o apoplasto.

As reações de controle são as presentes nos poços 14 (controle negativo), 15 (controle positivo com plasmídeo previamente recombinado com inserto distinto), 16 e 17 (controles positivos contendo os plasmídeos nativos para direcionamento ao cloroplasto e ao retículo endoplasmático, respectivamente).

CONCLUSÃO

Ao término do presente estudo foi possível a clonagem de uma proteína estrutural do vírus da hepatite C em vetores para direcionamento a diferentes compartimentos da célula vegetal, o que tornará possível expressar tais plasmídeos e verificar se existem diferenças quanto a quantidade e/ou qualidade da proteína produzida, viabilizando o uso destas para o desenvolvimento de kits de diagnóstico ou o seu uso como candidatas vacinais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3173-3188, 2004.

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

VIEGAS, V. S. M.; OCAMPO, C. G.; PETRUCCELLI, S. Vacuolar deposition of recombinant proteins in plant vegetative organs as a strategy to increase yields. **Bioengineered**, v. 8, n. 3, p. 203-211, 2017.

WHO - World Health Organization. Hepatitis C. 2015. Fact sheet N° 164. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> acesso em 13 de setembro de 2017.