

Proteínas recombinantes modulares como plataformas de combate às células tumorais

F.S. OLIVEIRA¹, P.A.L. CALABRIA³, M.T.P. FAVARO², G.S. MAGALHÃES³ e A.R. AZZONI¹

¹ Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química

² Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia

³ Instituto Butantan, Laboratório de Imunopatologia

E-mail para contato: fernanda.santos.oliveira@usp.br

RESUMO – *Novas terapias com ácidos nucleicos (mRNAs, siRNAs, micro RNAs) são uma alternativa potencialmente importante para o combate ao câncer. Porém, um dos principais problemas está na dificuldade da entrega gênica direcionada para as células tumorais, levando à baixa eficiência do tratamento. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e caracterização de proteínas recombinantes multifuncionais capazes de formar nanopartículas com ácidos nucleicos e transportar o material genético para o interior de células tumorais. Para esse fim, a proteína repórter GFP foi fusionada a uma desintegrina (Echistatina) que serve como domínio de direcionamento para células tumorais, e uma sequência poliarginina (R6), que condensa o material genético a ser entregue. Os genes foram sintetizados, clonados e as proteínas foram expressas em E. coli linhagem BL21(DE3) Star. Três diferentes proteínas modulares foram eficientemente expressas e então purificadas por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, com pureza adequada para os ensaios seguintes de interação com RNAs e entrega para células tumorais.*

1. INTRODUÇÃO

A baixa eficiência de transferência de ácidos nucleicos para células tumorais é um problema recorrente em estudos de terapia gênica para o tratamento do câncer. Isso surge, principalmente, pela dificuldade de direcionamento e transporte das moléculas terapêuticas do exterior para o interior das células alvo, devido à presença de inúmeras barreiras físicas, enzimáticas e difusionais. Nosso grupo de pesquisa, tem ao longo dos últimos anos, desenvolvido proteínas recombinantes multifuncionais especialmente desenhadas para entrega gênica, buscando mimetizar a habilidade dos vírus de explorar as sinalizações e respostas extra- e intra-celulares para infectar as células (Favaro et al, 2018 a,b).

Nesse contexto, interações moleculares podem facilitar o direcionamento e alguns estudos focaram na utilização de peptídeos que se ligam a receptores específicos presentes na superfície celular. As integrinas $\alpha\beta3$ estão presentes em maiores quantidades em vários tipos de células tumorais, células endoteliais ativadas e vasos recém-formados que nutrem o tumor, mas não em células endoteliais quiescentes. Integrinas são receptores reconhecidos pelos peptídeos RGD,

dentre os quais a desintegrina Echistatina, presente em proteínas do veneno de cobra, é uma antagonista. Por isso a Echistatina pode ser interessante como domínio de direcionamento para receptores integrina $\alpha\beta3$ presentes em vários tipos de tumores (Lima-dos-Santos et al., 2015).

Além do direcionamento mediado por receptores específicos, peptídeos ricos em arginina, como a R6 utilizada nesse trabalho, são interessantes como facilitadores da entrega gênica. “Clusters” de resíduos de arginina são conhecidos por interagir e condensar DNA e RNA, além de eventualmente atuarem na transposição de membranas, facilitando assim a internalização nas células alvo. Podem também criar partículas toroidais estáveis e capazes de penetrar em células de mamífero. O uso de nanopartículas protéicas para a entrega de genes possui inúmeras vantagens, como a elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade, processos de produção bem estabelecidos, e capacidade de desempenhar funções relevantes, mimetizando o papel exercido pelos vírus na introdução de genes em células (Favaro et al., 2018a).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Clonagem e expressão das proteínas: Na proteína modular produzida, a proteína repórter GFP (proteína verde fluorescente) está no centro da construção. A proteína contém no N-terminal uma sequência de seis histidinas (H6) com a finalidade de facilitar a purificação e o escape endossomal, além de uma sequência de seis argininas (R6). No C-terminal, a proteína modular tem a proteína de direcionamento para células tumorais (Echistatina). Foram construídas ainda outras duas variantes desta proteína de forma a atuarem como controles para a avaliação das diferentes capacidades (direcionamento e interação com RNA), como apresentado na Figura 1.

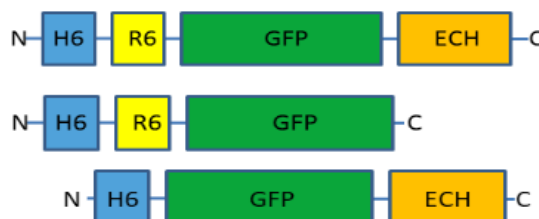


Figura 1 - Proteínas modulares construídas e nomeadas (de cima para baixo) como construção 1 (completa), construção 2 (sem a Echistatina) e construção 3 (sem a R6).

As construções foram clonadas em vetor pET28a, introduzido em células *E. coli* BL21(DE3) Star. As células foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 1 L, no volume de 150 mL de meio de cultura LB (Luria-Bertani) e 30 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina, à 37°C, sob agitação de 230 rpm. Ao atingir DO_{600} de 0,6, a expressão das proteínas foi induzida com IPTG na concentração de 1,0 mM. Após 4 horas, as células foram recolhidas por centrifugação.

2.2. Purificação: As células foram suspensas em tampão e rompidas por ultrassom. Após o rompimento, as células foram centrifugadas a 4500g por 30 minutos, o pellet foi separado e as etapas de purificação prosseguiram com o sobrenadante. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia IMAC em resina de agarose-IDA- Ni^{2+} por meio de interação com o

His-tag. Posteriormente, foram dialisadas em tampão PBS pH 7,2 e armazenadas para utilização futura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que todas as construções possuem a proteína verde GFP, a coloração esverdeada das bactérias após o final do cultivo foi um indicador do sucesso da expressão, como pode ser visto na Figura 2. A coloração se manteve no sobrenadante após o rompimento das células, indicando que as proteínas estavam majoritariamente presentes no sobrenadante (solúveis), como pode ser visto na Figura 3.

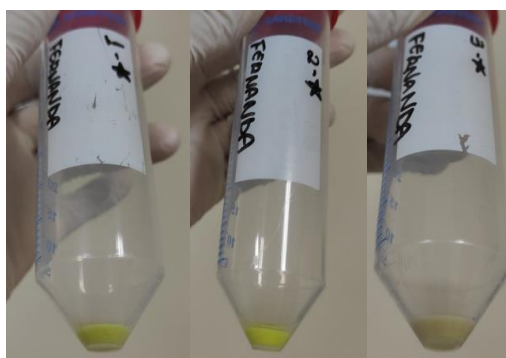


Figura 2 - Tubos contendo os “pellets” das bactérias após expressão, centrifugação e descarte do sobrenadante. Da esquerda para a direita: construção 1, construção 2 e construção 3.

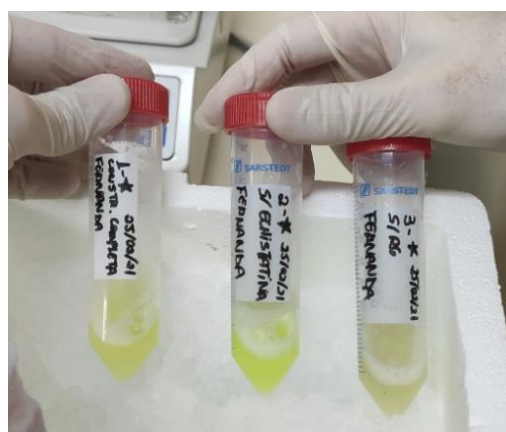


Figura 3 - Tubos contendo os lisados clarificados após rompimento das células. Da esquerda para a direita: construção 1, construção 2 e construção 3.

O gel de SDS-PAGE (Figura 4) apresenta as amostras das proteínas antes e depois de serem dialisadas. Podemos observar que não ocorreram perdas expressivas de proteína na diálise e que a cromatografia foi bem sucedida resultando em proteínas com bom nível de pureza.

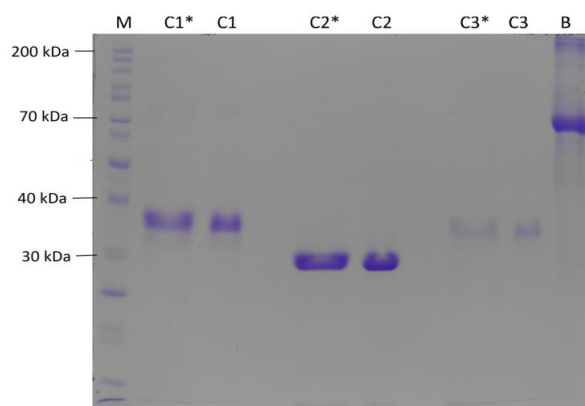


Figura 4 – Análise das proteínas por meio de SDS-PAGE comparando as proteínas antes (C1*: construção 1; C2*: construção 2; C3*: construção 3) e depois da diálise (C1: construção 1; C2: construção 2; C3: construção 3) e com BSA na concentração de 1,0 mg/ml (B). M: marcador de massa molecular.

4. CONCLUSÃO

As três construções baseadas na proteína GFP foram expressas em *E. coli* e purificadas sem dificuldades, mas com menor nível de expressão da construção 3 (sem o R6). O fato de as células cultivadas adquirirem coloração esverdeada, devido à expressão de proteína GFP, facilita o controle da produção, por ser um indicativo simples e visual da eficiência na expressão. As proteínas foram obtidas com pureza adequada para os ensaios seguintes de interação com RNAs, caracterização das nanopartículas e entrega para células tumorais cultivadas *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS

- Favaro MT, Unzueta U, de Cabo M, Villaverde A, Ferrer-Miralles N, Azzoni AR. Intracellular trafficking of a dynein-based nanoparticle designed for gene delivery. *European J. Pharm. Sciences*, 112 (2018a) 71-78.
- Favaro MT, Serna N, Sánchez-García L, Cubarsi R, Roldán M, Sánchez-Chardi A, Unzueta U, Mangués R, Ferrer-Miralles N, Azzoni AR, Vázquez E, Villaverde A. Switching cell penetrating and CXCR4-binding activities of nanoscale-organized arginine-rich peptides. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, v. 14, (2018b) 1777-1786.
- Lima-dos-Santos, I., Della-Casa, M. S., Portes-Junior, J. A., Calabria, P. A. L., Magalhães, G. S., & Moura-da-Silva, A. M. (2015). Characterization of Neuwiedin, a new disintegrin from *Bothrops neuwiedi* venom gland with distinct cysteine pattern. *Toxicon*, 104, 57–64.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho está sendo realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo N° 2020/00616-5, e com apoio financeiro do CNPq (N° 430205/2018-0 e N° 304125/2018-0) e CAPES /PROEX – Código de financiamento 001.