

RESUMO EXPANDIDO
XXVI Congresso de Iniciação Científica

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEASES Mpro e TMPRSS2 ENVOLVIDAS NA INFECTIVIDADE DO SARS-CoV-2

Lucas Murillo Queiroz da Silva¹

Taiz dos Reis Santos²

Mariana Nascimento Romero Trujilho³

Wagner Alves de Sousa Júdice⁴

1. Discente do curso de biomedicina; e-mail: lucas_mqs1@hotmail.com
2. Discente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: taiz_reis18@hotmail.com
3. Discente da Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: marianatrujilho@hotmail.com
4. Docente na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.com.br

Área de Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-Chave: SARSCOV-2-Mpro; TMPRSS2; Clonagem; Síndrome respiratória; Proteases humana e SARS-CoV-2

Como citar:

da Silva LMQ, Santos T dos R, Trujilho MNR, Judice WA de S. Clonagem, expressão e purificação das proteases Mpro e TMPRSS2 envolvidas na infectividade do SARS-CoV-2. Revista Científica UMC [Internet]. 27 de outubro de 2023;8(2):e080200044.

Disponível em: <https://revista.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/1928>

Fluxo de revisão: o presente resumo expandido foi revisado por pares pela comissão do evento.

Recebido em: 11/09/2023

Aprovado em: 26/10/2023

ID publicação: e080200044

DOI:

Licença CC BY 4.0 DEED

INTRODUÇÃO

A O coronavírus (CoVs) são um grupo diversificado de vírus de RNA de fita positiva envelopados pertencentes a família Coronaviridae. Os CoV foram identificados em uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos e aves, e demonstraram causar uma série de doenças respiratórias e entéricas. Em 2003, a epidemia global de uma forma atípica de pneumonia denominada síndrome respiratória aguda grave (SARS) levou à descoberta do SARS-CoV, um CoV até então desconhecido, como o patógeno etiológico (FENGHUA et al., 2016). A proteína spike (S) medeia a entrada nas células-alvos ligando-se a receptor celular e posteriormente fundindo o envelope viral com a membrana da célula hospedeira. A proteína SARS-CoV S (SARS-S) utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor para entrada na célula hospedeira (ADELINE HEURICH et al., 2014). A enzima 3CLpro, também chamada de protease principal (Mpro), é indispensável ao processo de replicação e infecção viral, tornando-se assim um alvo ideal para a terapia antiviral (THANIGAIMALAI PILLAIYER et al., 2006). TMPRSS2 é uma serina protease vital para infectiosidade do SARS-CoV-2 porque causa ativação proteolítica e introdução do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras (ABASSI et al., 2021). A TMPRSS2 possui um domínio de protease extracelular capaz de clivar um domínio de proteína spike para iniciar a fusão da membrana. Considerando o papel vital desempenhado pelo TMPRSS2 no ciclo de vida viral (KAZUYA SHIRATO et al., 2013)

OBJETIVO

Efetuar a clonagem, expressão e purificação das proteases Mpro e TMPRSS2 envolvidas na infectividade do SARS-CoV-2

METODOLOGIA

A Realizou-se a transformação bacteriana utilizando células competentes E. coli DH5 Alpha, foi utilizado plasmídeo comercial contendo o inserto das proteases Mpro (Major protease), TMPRSS2 (Transmembrane serine protease 2) e a TEV (Tobacco Etch Virus). Para a transformação foi utilizado 0,5 uL de cada plasmídeo comercial das proteases, e colocadas individualmente na bactéria, esse método de choque térmico consistem em 30 minutos no gelo, em seguida 1 minuto e 30 segundo e finalizando em 2 minutos no gelo, nisso que permite aumentando a permeabilidade da membrana célula e conseqüentemente a entrada do

plasmídeo. As Bactéria já transformadas foram plaqueadas em meio LB com antibiótico Canamicina e incubadas por 16h a 37°C. Colônias foram selecionadas e feito o pré inoculo, logo após sendo extraído os plasmídeos para amplificar o gene específico com o método de PCR utilizando os primers reverse e forward que foram desenhados especificamente para cada um dos insertos, e assim feito também com o vetor pET28(a).

As ampliações do pET-28a (+) e dos genes Mpro, TMPRSS2 e a TEV para a realização da T5 exonuclease-dependent assembly (TEDA), foram realizadas usando primers específicos baseando-se na metodologia TEDA, nas mesmas condições para a amplificação do gene. Com a amplificação do pET28(a) e os genes amplificados, foi realizado o procedimento TEDA, no qual usamos uma proporção de 1:4 (vetor/inserto). Nessa reação foi utilizado 100 ng do vetor pET-28a(+), a parte dos insertos a Mpro na concentração de 18,49 ng, a TMPRSS2 em 21,84 ng e a TEV definido em 14,19 ng, essa concentração foi baseada no protocolo TEDA na qual a uma proporção (concentração vetor x incerto pb/ pb vetor). Em seguida colocado 4 µL da solução 2X TEDA contendo T5 exonuclease e então foi homogeneizada e incubada a 37°C e depois incubada no gelo por 10 minutos. Essa reação foi então transformada em cepas da E.coli DH5a em gelo durante 30 minutos, seguido por choque térmico durante 90 segundos a 42°C e 2 minutos no gelo, plaqueamos 100 mL da mistura em meio LB ágar contendo a Canamicina, foram incubadas a 37° C durante 16 horas. Colônias foram selecionadas para a realização de uma PCR utilizando os primers de reconhecimento do promotor e do terminador T7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os plasmídeos dos insertos da Mpro , TMPRSS2 e a TEV (Figura 1-A), e o vetor pET28a(+) (Figura 1-B) sendo amplificados por PCR, usando os primers reverse (RV) e Forward (FW) de seus respectivos genes para se ligarem no material genético. Sendo assim, foi utilizado o material genético (plasmídeo) direto no mix (DNTPs, tampão, Pfu, água) com a concentração de 15ng/µL do DNA de cada gene em cada reação da PCR e temperaturas diferentes de anelamento, e obtivemos resultados positivos ao extrair o gene e feito uma eletroforese.

As ampliações do pET28(a) e dos genes Mpro (Major protease), TMPRSS2 (Transmembrane serine protease 2) e a TEV (Tobacco Etch Virus) para a realização da T5 exonuclease-dependent assembly (TEDA) baseando-se na metodologia TEDA, foi realizado o procedimento TEDA, no qual usamos uma proporção de 1:4 (vetor/inserto). Em seguida colocado 4 µL da solução 2X TEDA contendo T5 exonuclease e nisso foi homogeneizada e essa reação é incubada na estufa e finalizada colocando-a em gelo, e a solução da reação foi então utilizada para transformação em bactérias competente DH5 Alpha. Colônias foram

selecionadas para a realização de uma PCR, utilizando os primers de reconhecimento do promotor e do terminador T7 do pET28a(+). As reações da PCR de colônia foram visualizadas em eletroforese, tendo em vista que algumas colônias deram resultados positivas, na quais as positivas tiveram aproximadamente 1500 bp DNA para cada plasmídeo pois o primers T7 se anela em um ponto específico do pET28 na temperatura de 47°C e assim amplificando o vector e incerto, e houve algumas colônias que obteve os resultados falso positivo (Figura 2)

Figura 1. Eletroforese em agarose da Mpro , TMPRSS2 e a TEV (A) e do pET-28a(+) (B).

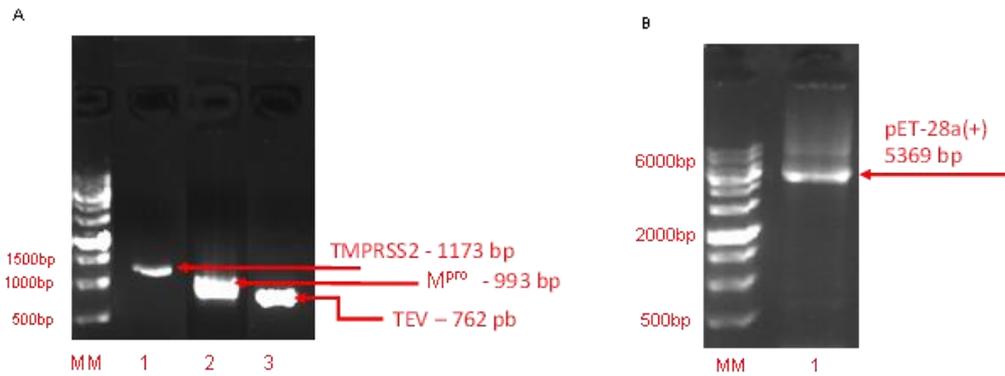
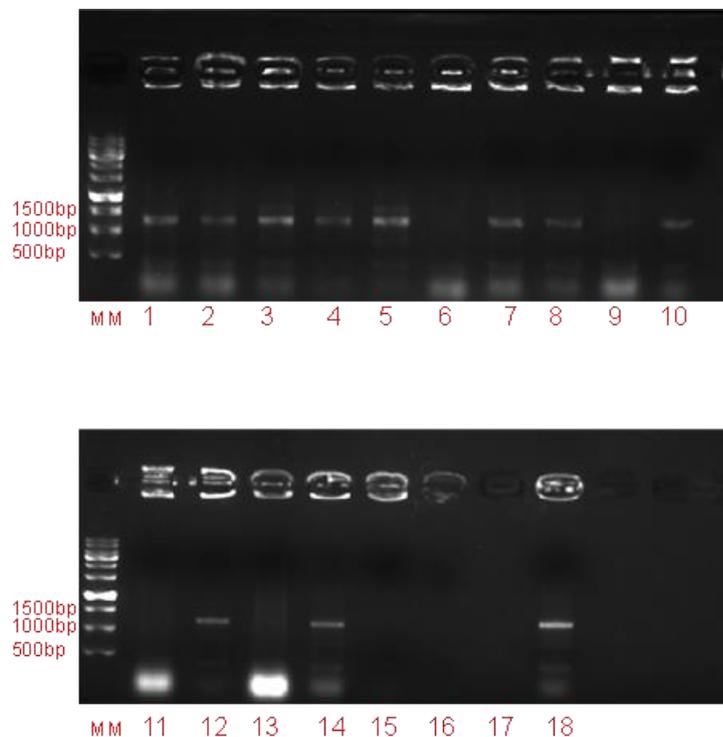


Figura 2. Eletroforese da PCR de Colônia do TEDA da Mpro , TMPRSS2 e a TEV



Cada coluna numerada nos dois retângulos de 1 a 19 são as reações da PCR de colônia dos plasmídeos da TMPRSS2, TEV e a Mpro, sendo respectivamente a TMPRSS2 a coluna 1, a TEV a coluna 2 até 7 e da coluna 7 até a 18 sendo a Mpro na temperatura de 49°C.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante o trabalho realizado foi bem sucedido a amplificação na bactéria E. coli DH5 Alpha e a clonagem dos genes Mpro e TMPRSS2 através método TEDA (T5 exonuclease-dependent assembly), tendo em vista agora com os clones, os ensaios de expressão e purificação será o próximo passo para concluir todo protocolo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi AZ, Kiyani DA, Hamid SM, Saalim M, Fahim A, Jalal N. Spiking dependence of SARS-CoV-2 pathogenicity on TMPRSS2. *J Med Virol.* 2021;1-14.
- Dhama, K., Khan, S., Tiwari, R., Sircar, S., Bhat, S., Malik, Y. S., ... Rodriguez-Morales, A. J., Coronavirus Disease 2019–COVID-19. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020, 33(4). doi:10.1128/cmr.00028-20
- Dong, M., Zhang, J., Ma, X., Tan, J., Chen, L., Liu, S., ... Zhuang, L., ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 131, 110678. doi:10.1016/j.biopha.2020.110678
- Heurich, A., Hofmann-Winkler, H., Gierer, S., Liepold, T., Jahn, O., & Pohlmann, S. TMPRSS2 and ADAM17 Cleave ACE2 Differentially and Only Proteolysis by TMPRSS2 Augments Entry Driven by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein. *Journal of Virology*, (2013), 88(2), 1293–1307. doi:10.1128/jvi.02202-13
- Hung, H.-C., Ke, Y.-Y., Huang, S. Y., Huang, P.-N., Kung, Y.-A., Chang, T.-Y., ... Hsu, J. T.-A. (2020). Discovery of M Protease inhibitors encoded by SARS-CoV-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi:10.1128/aac.00872-20
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Namasivayam, V., Hayashi, Y., & Jung, S.-H.,. An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome–Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(14), 6595–6628. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01461
- Shirato, K., Kawase, M., & Matsuyama, S. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *Journal of Virology*, 2013, 87(23), 12552–12561. doi:10.1128/jvi.01890-13
- Xue, X., Yu, H., Yang, H., Xue, F., Wu, Z., Shen, W., ... Rao, Z.. Structures of Two Coronavirus Main Proteases: Implications for Substrate Binding and Antiviral Drug Design. *Journal of Virology*, 2007, 82(5), 2515–2527. doi:10.1128/jvi.02114-07

Yongzhen Xia, Kai Li, Jingjing Li, Tianqi Wang, Lichuan Gu, and Luying Xun., T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research* 2018. doi:10.1093/nar/gky1169