

LINA MARIA SALAZAR ECHEVERRI

Construção de uma biblioteca proteica sintética do tipo kunitz por *phage display*.

Dissertação apresentada ao Programa multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Gustavo Felipe da Silva

**LAGES
2018**

Salazar Echeverri, Lina Maria
Construção de uma biblioteca proteica sintética
do tipo kunitz por phage display. / Lina Maria
Salazar Echeverri. - Lages , 2018.
54 p.

Orientador: Gustavo Felipe da Silva
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular, Lages, 2018.

1. Biblioteca de proteínas. 2. Kunkel mutagênese.
3. ELISA. I. da Silva, Gustavo Felipe . II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UDESC

RESUMO

A técnica *phage display* é uma estratégia versátil para exibir proteínas de interesse, com técnicas de DNA recombinante, na superfície do bacteriófago M13, como um componente extra fusionado a uma de suas proteínas de superfície naturais, mais comumente a proteína pIII. Após a expressão em uma bactéria especificamente susceptível à infecção pelos fagos geneticamente modificados, grandes populações de fagos carregam, individualmente, uma proteína exclusiva em sua superfície, e no conjunto geral, formam uma gigante biblioteca de variantes de uma proteína de interesse, enquanto o material genético respectivo de cada proteína variante está integrado ao material genético da partícula do fago. O objetivo do nosso trabalho foi produzir bibliotecas de proteínas específicas com milhões de proteínas distintas usando a tecnologia *phage Display* associada à mutagênese. Esta biblioteca tem como estrutura base para as mutações, uma proteína derivada de uma toxina do tipo “*Kunitz*” que se caracteriza por grande estabilidade e potência biológica. O complexo cálcio calmodulina cinase cinase II (CaMKKII) está envolvido na regulação de diversos processos metabólicos críticos, promovendo a regulação de processos dependentes de cálcio, incluindo balanço energético, regulação da remodelação do citoesqueleto neuronal associada a formação da memória, participação na adipogênese e no metabolismo hepático da glicose, está envolvida no controle da formação de células sanguíneas e resposta inflamatória assim como no câncer de próstata. O descobrimento de novos inibidores específicos para a CaMKKII é importante para aprofundar estudos de função desta enzima em diversas áreas de pesquisa. Nossa biblioteca contendo mais de um milhão de proteínas, foi testada contra CaMKKII. Os fagos que não ligam são descartados por lavagem e os que ligaram são recuperados e usados para infectar novas bactérias. Estes clones foram testados individualmente e identificados por sequenciamento.

Palavras chave: Biblioteca de proteínas. *Kunkel* mutagênese. ELISA

ABSTRACT

The phage display technique is a versatile strategy to display proteins of interest with recombinant DNA techniques on the surface of bacteriophage M13 as an extra component fused to one of its natural surface proteins, most commonly the PIII protein. Upon expression in a bacterium specifically susceptible to infection by genetically modified phages, large populations of phages individually carry a unique protein on their surface, and in the general set, form a giant library of variants of a protein of interest, while the material gene of each variant protein is integrated into the genetic material of the phage particle. The goal of our work was to produce specific protein libraries with millions of distinct proteins using the phage display technology associated with mutagenesis. This library has the basic structure for the mutations, a protein derived from a "Kunitz" type toxin that is characterized by great stability and biological potency. Calmodulin kinase kinase II complex (CaMKKII) is involved in the regulation of several critical metabolic processes, promoting the regulation of calcium dependent processes, including energy balance, regulation of neural cytoskeleton remodeling associated with memory formation, participation in adipogenesis and hepatic glucose metabolism, is involved in the control of blood cell formation and inflammatory response as well as in prostate cancer. The discovery of new inhibitors specific for CaMKKII is important to deepen studies of the function of this enzyme in several areas of research. Our library containing more than one million proteins was tested against CaMKKII. Non-binding phages are discarded by washing and those that bind are recovered and used to infect new bacteria. These clones were individually tested and identified by sequencing.

Key words: Peptide library. Kunkel mutagenesis. ELISA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação gráfica do bacteriófago M13 com DNA fita simples (ssDNA) expressando um peptídeo na superfície. O gene que codifica o peptídeo encontra-se inserido no genoma do fagomídeo, sendo expressa junto a proteína 3 do capsídeo. 16
- Figura 2 - Representação esquemática dos rounds de seleção da biblioteca. A biblioteca de peptídeos é transformada em bactérias. Os fagos contendo os peptídeos na sua superfície são incubados contra uma proteína alvo, os fagos não ligantes são descartados por lavagens, e os fagos ligantes são eluídos e amplificados em bactérias para iniciar um novo ciclo de seleção. 18
- Figura 3 - Predição da proteína BTK-2mut, utilizada como esqueleto para construção da biblioteca P3LMS. Em laranja α -hélice; em azuis folhas β ; em verde cisteínas e em vermelho loop maior, região utilizada para inserir as mutações. 21
- Figura 4 - Representação esquemática do *helper phage*, bacteriófago que contém todas as proteínas originais dos bacteriófagos para montagem dos fagos. 25
- Figura 5 - Fagomídeo contendo o gene da proteína BTK-2mut junto a proteína III original do bacteriofago M13. 28
- Figura 6 - Esquema representativo da kunkel mutagêneses. Fagomídeo e helper phage infectam bactérias com deficiência em enzimas DUG, DUT que permite a incorporação de uracila no DNA. Adição de primer de oligonucleotídeos sintéticos para inserção das mutações. Após a replicação se obtém a heteroduplex, e em seguida é degradado o DNA uracilado. 30
- Figura 7 - Esquema da amplificação por círculo rolante seletivo. Tratamento da heteroduplex com UDG para eliminar DNA uracilado, amplificado por círculo rolante com adição de *primers* aleatórios, as cadeias resultantes são posteriormente cortadas e ligadas para posterior transformação em bactérias. 31
- Figura 8 - Placa de petri mostrando nos lugares mais claros da placa células E. coli XL1Blue infectadas pelo *helper phage*. Estas células foram utilizadas para realização de células eletrocompetentes contendo o *helper phage*. 35
- Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed da kunkel mutagêneses. Em 1) marcador de massa molecular de 1kb; 2) dU-ssDNA utilizado como molde para realizar as mutações; 3) resultado da kunkel mutagêneses, dsDNA heteroduplex. 36

Figura 10 - Placa de petri com as diluições da biblioteca P3LMS utilizada para quantificar o tamanho real. Foram utilizadas as colônias da diluição 3 para realizar os cálculos.....	37
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR, corado com GelRed e utilizando um marcador de massa molecular de 100pb. DNA das colônias 1,2,3,4,5 nas colunas correspondentes, em 6 controle negativo.....	38
Figura 12 - Representação gráfica em fase logarítmica dos fagos recuperados após realizados rounds de entrada e rounds de saída.....	40
Figura 13 - Representação gráfica da evolução da biblioteca P3LMS na recuperação dos fagos após 4 rounds de seleção.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

DUT	dUTPase
UDG	Uracil-DNA Glicosilase
SsDNA	DNA de fita simples
dU-ssDNA	DNA de fita simples uracilado
dsDNA	DNA de fita dupla
ccc-ds (U) DNA	heteroduplex de DNA de cadeia dupla circular covalentemente fechada
RF	forma replicativa
Ca ²⁺	cálcio
CaM	complexo cálcio calmodulina
K ⁺	potássio
CaMKKII	cálcio calmodulina cinase cinase II
LB	Luria Bertani
OD	densidade ótica
UFP	unidade formadora de placa
PEG	polietilenglicol
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST	Phosphate-buffered saline with tween 20
BSA	albumina de soro bovino
ACRS	amplificação por círculo rolante seletivo
PBT	Phosphate-buffered saline com tween 20 e BSA
PCR	reação da polimerase em cadeia
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HRP	Horseradish peroxidase
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	PRODUÇÃO DE BACTÉRIAS	25
3.1.1	<i>Helper phage</i> (M13KO7)	25
3.1.2	Titulação do <i>helper phage</i> M13KO7	26
3.1.3	Células <i>E. coli</i> XL1 Blue eletrocompetentes com <i>helper phage</i>	26
3.1.4	Eficiência das células <i>E. coli</i> XL1B eletrocompetentes com <i>helper phage</i>	27
3.2	TRANSFORMAÇÃO DO FAGOMÍDEO E MONTAGEM DO FAGO	27
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA FITA SIMPLES URACILADO (SSDNA)	29
3.4	MUTAÇÃO SITIO DIRIGIDA (<i>KUNKEL</i> MUTAGÊNESE)	29
3.5	AMPLIFICAÇÃO POR CÍRCULO ROLANTE SELETIVO (ACRS)	31
3.6	TRANSFORMAÇÃO DA BIBLIOTECA.....	31
3.7	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO.....	32
3.8	<i>ROUNDS</i> DE SELEÇÃO	33
3.9	ELISA MONOCLONAL DE FAGOS	33
4	RESULTADOS	35
4.1	CÉLULAS ELETROCOMPETENTES COM <i>HELPER PHAGE</i>	35
4.2	MUTAÇÃO SITIO DIRIGIDA OU <i>KUNKEL</i> MUTAGÊNESE	36
4.3	TRANSFORMAÇÃO DA BIBLIOTECA EM XL1B E OBTENÇÃO DO TAMANHO REAL DA BIBLIOTECA.....	37
4.3.1	Valor estimado da biblioteca	37
4.4	PREPARAÇÃO PARA SEQUENCIAMENTO	38
4.5	<i>ROUNDS</i> DE SELEÇÃO CONTRA CAMKKII	39
6	CONCLUSÃO	46
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	48
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A técnica de *phage display* está baseada na expressão de proteínas exibidas na superfície de bacteriófagos, um vírus que infecta bactérias (SMITH, 1985). Desde sua invenção em 1985 por SMITH, *phage display* tem sido aplicada com sucesso em diversas áreas de pesquisa, incluindo imunologia, pesquisa de câncer, descoberta de drogas, mapeamento de epítomos, interações proteína-proteína, estudo com plantas e doenças infecciosas. A técnica tem sido utilizada para identificar pequenos ligantes peptídicos e anticorpos que inibem a função de receptores alvo para uma ampla gama de aplicações (HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012).

Os bacteriófagos mais usados nesta técnica são fagos filamentosos que pertencem ao grupo de fagos não líticos. Na técnica de *phage display* o fago M13 é o mais usado (SMEAL et al., 2017). O bacteriófago M13 possui um genoma com DNA de cadeia simples (ssDNA) e tem um diâmetro de (6–7) nm e 900 nm de comprimento. Como uma vantagem para outros fagos, o M13 pode ser facilmente purificado e manuseado com excelente viabilidade (PRATT; ERDAHL, 1968).

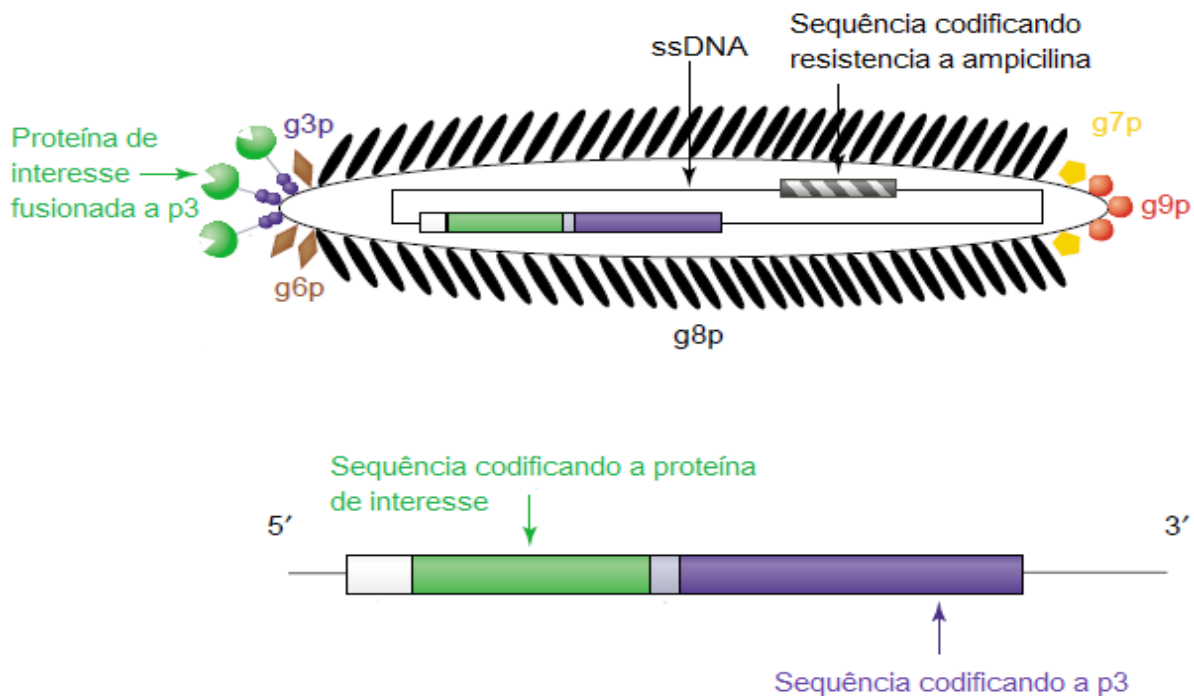
A infecção do fago M13 se inicia através do reconhecimento da proteína pIII do fago pelo seu receptor cognato na superfície da célula bacteriana (F-pilus) *E.coli* (SIDHU, 2001). Após o material genético do vírus entrar na célula, a cadeia viral é convertida pelas enzimas do hospedeiro numa forma replicativa super-helicoidal de cadeia dupla chamada de forma replicativa (RF), seguida de transcrição e tradução, expressando a proteína pII. Esta proteína corta a cadeia viral RF em um local específico, criando assim uma extremidade livre 3'-OH que serve como um *primer* para a replicação de círculos rolantes (ZAMAN; SCHOENMAKERS; KONINGS, 1990).

Os fagos M13 não matam as células hospedeiras, mas retardam o crescimento celular devido ao estresse na produção fagos. As proteínas pI, pIV e pXI são importantes na montagem do fago e as proteínas pVII e pIX são importantes na secreção dos fagos. A pIII é a proteína mais usada para a exibição de proteínas. Cada fago contém três a cinco proteínas pIII em uma extremidade (RAMI et al., 2017).

Outro fator de grande valor para a técnica, além da possibilidade de fusionamento entre o gene de interesse e o gene da proteína natural de superfície do fago, comumente pIII ou pVIII, é a

possibilidade de diversificação do gene de interesse, com conseqüente formação de bibliotecas derivadas a partir de uma proteína de interesse (FIGURA 1).

Figura 1 - Representação gráfica do bacteriófago M13 com DNA fita simples (ssDNA) expressando um peptídeo na superfície. O gene que codifica o peptídeo encontra-se inserido no genoma do fagomídeo, sendo expressa junto a proteína 3 do capsídeo.



Fonte: Adaptada de Fernandez-Gacio et al. (2003)

Uma técnica amplamente utilizada para produção de bibliotecas proteicas por *phage display* é a "mutagênese de "Kunkel" ou mutação sitio dirigida (KUNKEL; ROBERTS; ZAKOUR, 1987)

Este método usa uma cepa de *Escherichia coli* CJ236, deficiente em duas enzimas de reparo Uracil-DNA Glicosilase (udg^-) e dUTPase (dut^-), a qual é passível de infecção e propagação do M13e, sob altas concentrações de uridina, produz fagomídeos de fita simples contendo uridina (U-ssDNA). Este fagomídeo U-ssDNA juntamente com oligonucleotídeos "sintéticos" especificamente direcionados e complementares a códons de resíduos específicos da fita molde, serve como molde para a síntese de uma cadeia complementar mutante.

O DNA de fita simples (ssDNA) é convertido em DNA de fita dupla (dsDNA) pela ação da T7 DNA polimerase e finalmente circularizado pela T4 DNA-ligase (HUOVINEN et al., 2012). Com isto é formado um DNA conhecido como heteroduplex de cadeia dupla circular covalentemente fechada (ccc-ds (U) DNA), o qual possui a fita molde com a sequência original rica em uracilas e uma fita complementar com as mutações, sem uracilas. Esta fita heteroduplex pode ser transformada em cepas de *E.coli* não tolerantes a DNA uracilado e neste procedimento gera uma maior vantagem seletiva da fita mutada sobre o DNA molde. Além disso, para otimizar a população mutante sobre a sequência original, o cccds (U) DNA pode ser tratado previamente com a enzima UDG, a qual digere a cadeia molde rica em uracila. Após o tratamento com UDG, a DNA polimerase phi29 amplifica seletivamente a cadeia mutada intacta, produzindo várias cópias do fagomídeo (HUOVINEN et al., 2012).

Após modificações genéticas no DNA, um bacteriófago expressa na sua proteína do capsídeo, uma única proteína, mas, o conjunto de bacteriófagos, cada um expressando uma proteína diferente é conhecido como bibliotecas de proteínas.

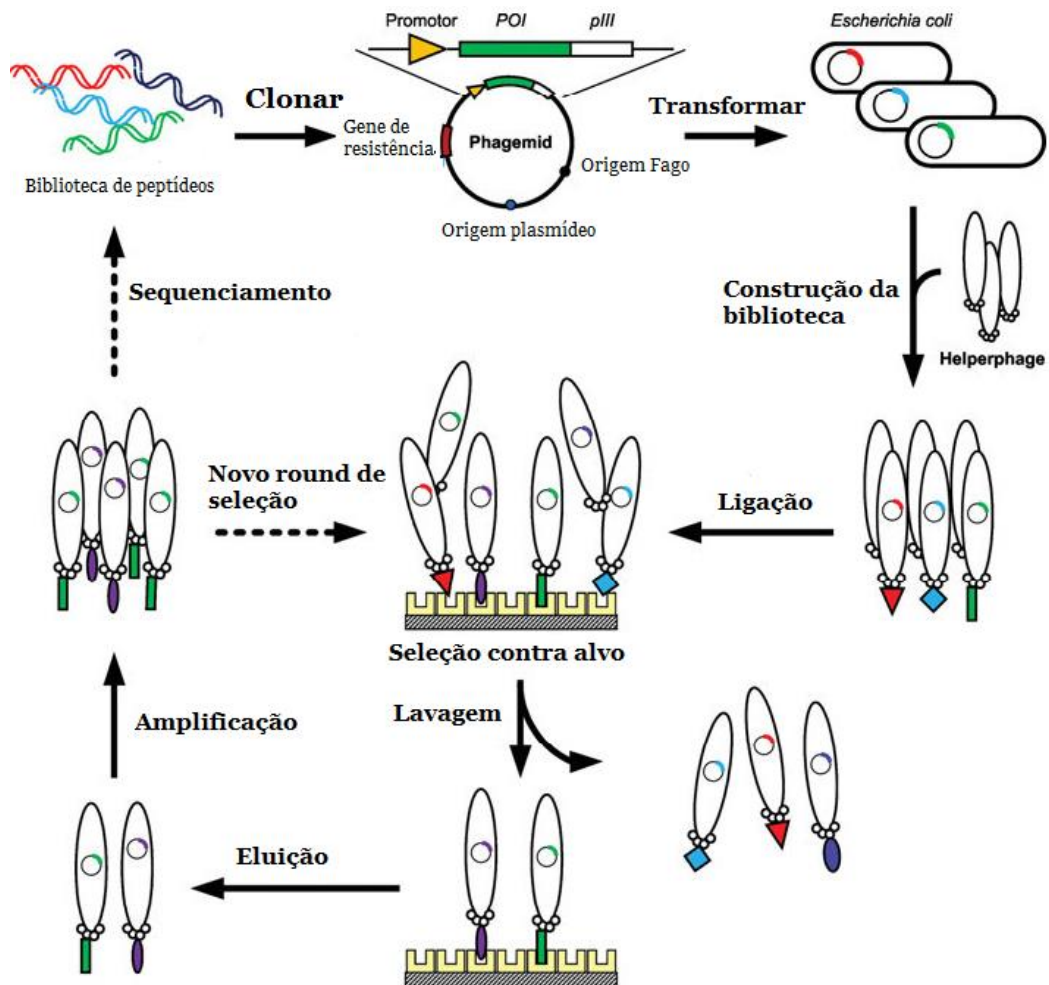
Bibliotecas de *phage display* oferecem um conjunto de opções que podem ser utilizadas para analisar grandes populações de peptídeos, proteínas ou domínios de proteínas e entender o comportamento para um determinado alvo desejado, por meio de estratégias seletivas variadas, *in vivo* e *in vitro*. Os fagos ligantes são isolados em ciclos de seleção e amplificação. A seleção possui uma população de fagos de entrada (*round in*) para produzir uma subpopulação de saída (*round out*) para populações cujos peptídeos exibidos apresentam o comportamento desejado, geralmente de afinidade ao alvo. Após a seleção, o fago de saída normalmente deve ser amplificado pela infecção de bactérias e este amplificado serve como entrada para novas rodadas de seleção. As saídas amplificadas dos *rounds* finais de seleção são infectadas em um hospedeiro bacteriano para propagação e caracterização de fagos individuais (Clones) (FIGURA2) (THOMAS; GOLOMB; SMITH, 2010).

Uma biblioteca pode ter mais de 10 bilhões de proteínas distintas exibidas e associadas fisicamente a um fago. Cada clone e, portanto, cada proteína distinta, é representado por milhares a milhões de cópias idênticas. Desde sua invenção, *phage display* tem sido aplicada com sucesso em diversas áreas de pesquisa, incluindo imunologia, pesquisa de câncer, descoberta de drogas, mapeamento de epítomos (DA SILVA, 2010), interações proteína-proteína, estudo com plantas e doenças infecciosas. A técnica tem sido utilizada para identificar pequenos ligantes peptídicos e

anticorpos que inibem a função de receptores alvo para uma ampla gama de aplicações (HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012).

Entre as aplicações mais bem sucedidas da técnica de *phage display* estão os estudos de isolamento de anticorpos monoclonais e seus fragmentos, utilizando grandes bibliotecas de anticorpos (WINTER et al., 1994). Para geração de novos medicamentos, é importante que os testes *in vitro* estejam bem definidos e se aproximem o máximo possível ao comportamento do alvo, como fármaco, nas condições *in vivo*.

Figura 2 - Representação esquemática dos rounds de seleção da biblioteca. A biblioteca de peptídeos é transformada em bactérias. Os fagos contendo os peptídeos na sua superfície são incubados contra uma proteína alvo, os fagos não ligantes são descartados por lavagens, e os fagos ligantes são eluídos e amplificados em bactérias para iniciar um novo ciclo de seleção.



Fonte: Adaptada de Ruigrok et al. (2011)

As metodologias que utilizam bibliotecas de peptídeos, oferecem muitas rotas alternativas e poderosas, aproveitando a geração de bilhões de componentes que pode ser combinada com um procedimento rápido de seleção para conseguir identificar os candidatos líderes mais interessantes (BENHAR, 2001). Estas bibliotecas podem expressar uma ampla diversidade de proteínas, das quais tem sido utilizadas proteínas do tipo kunitz.

Usando *phage display*, Markland et al. modificou o primeiro domínio do tipo “Kunitz” do inibidor de coagulação associado à lipoproteína para produzir um inibidor de plasmina e o composto resultante (DX-1000) inibiu a plasmina com um K_i de 0,087 nM (MARKLAND; LEY; LADNER, 1996).

Ao substituir um único aminoácido no local P20 no inibidor da via do fator tecidual-2 (TFPI-2), Bajaj et al. produziu um potente inibidor de plasmina KD1-L17R com um valor de K_i de 0,9 nM (Bajaj et al., 2011). Foi estudada a atividade de inibição de plasmina de oito toxinas de escorpião conhecidas com dobra do tipo “Kunitz” e foi encontrado um potente inibidor de plasmina BmKTT-2 (DING et al., 2015).

Outro exemplo de uma toxina sintética que foi projetada usando toxinas de escorpião como modelos estruturais é a mokatoxina-1. Foi projetado e identificado usando uma biblioteca de *phage display* de 11.200 proteínas, usando o esqueleto de α -KTx de 31 seqüências de toxinas de escorpião conhecidas ou previstas para se ligar a canais de potássio. A bioengenharia de peptídeos de escorpião representa uma valiosa área de pesquisa e uma potencial ferramenta de esqueletos bioativos para o desenvolvimento de novas drogas utilizadas no tratamento de várias patologias em que os canais de potássio estão envolvidos. (ORTIZ et al., 2015).

Os principais componentes no veneno de animais são pequenos peptídeos ricos em pontes dissulfeto. Os alvos celulares destes peptídeos são, na maioria das vezes, canais ligados à membrana responsáveis pelo transporte de íons de sódio, potássio, cálcio e cloreto. O estudo e caracterização de toxinas presentes no escorpião, tornou evidente que vários desses peptídeos são biologicamente ativos e provaram ser ferramentas valiosas para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de muitas doenças importantes.

Para a descoberta de possíveis inibidores foram usadas bibliotecas de fagos apresentando o domínio I do inibidor de protease Kunitz, este levou a descoberta de um potente inibidor usado no tratamento do angioedema hereditário (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010). Os

inibidores do tipo Kunitz ligam-se firmemente no sitio ativo do alvo através de alças específicas (GUO et al., 2015).

Pela alta estabilidade e potencial biológico utilizamos nesta biblioteca uma proteína que pertence ao grupo de proteínas tipo kunitz, a proteína BTK-2 identificada no veneno do escorpião vermelho indiano, *Mesobuthus tamulus*, que é um dos mais venenosos entre todas as espécies de escorpião (DHAWAN et al., 2003). BTK-2 é um poderoso inibidor do canal de potássio hKv1.1e possui uma semelhança de sequência de 40-70% com outras toxinas de escorpião curtas específicas para canais K⁺. BTK-2 é um peptídeo hidrófilo e está desprovido de aminoácidos aromáticos. (KUMAR et al., 2011).

Conhecendo a sequência primária da proteína BTK-2, um estudante de doutorado do nosso laboratório como parte de sua tese de doutorado construiu a estrutura da proteína utilizando 5 *primers*. Por se tratar de uma proteína que possui toxicidade, os *primers* foram construídos com mutações em aminoácidos específicos quando comprados a sequência original para inativar a toxicidade desta proteína. Na montagem, além dos aminoácidos mutados para inativar a toxicidade, os aminoácidos correspondentes ao *loop* maior da proteína apresentou mutação, pelo que a proteína resultante foi chamada de BTK-2mut. Esta proteína foi utilizada como estrutura proteica de uma biblioteca de proteínas por *phage display* que foi testada contra *Trypanossoma evansi* e a biblioteca foi funcional (MORAES,J.C, 2017).

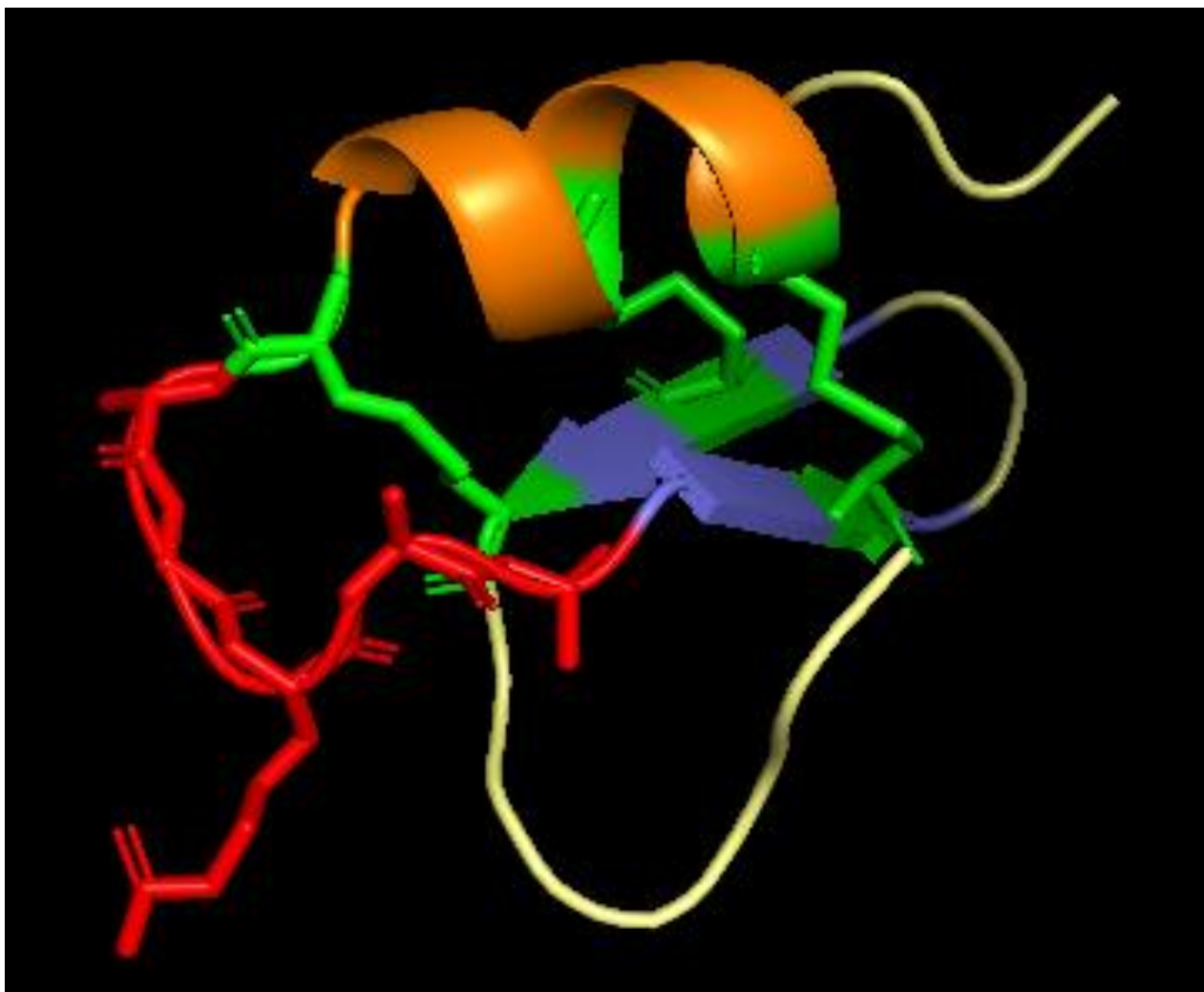
Neste trabalho produzimos uma biblioteca de *phage display*, na qual, utilizamos como estrutura proteica a proteína BTK-2 mutada (BTK-2mut) (FIGURA 3) que possui como estrutura primária a sequência de aminoácidos VGCAECPMHCCAGRAAPTCENEVCKCNIGKKD e possui um peso molecular de aproximadamente 3,4 KDa.

Sua estrutura secundária está formada por duas fitas β , uma α -hélice, um *loop* maior e outro menor. Na sua estrutura primária contem seis cisteínas; Cys3- Cys9; Cys6- Cys24; Cys10- Cys3 que formam três pontes dissulfeto entre si, fazendo dela uma proteína com alta estabilidade e potência biológica (DHAWAN et al., 2003).

Foi escolhida como região de mutação o *loop* maior da proteína, mostrado em vermelho na FIGURA 3, região que está formada na sua estrutura primária por 5 aminoácidos, e flanqueada por duas cisteínas, CAGRAAPTC. Ao realizar as mutações, as cisteínas foram mantidas, já que são um pilar importante para manutenção da estabilidade da proteína. Consideramos o *loop* maior uma região interessante a ser mutada, por ser uma área da proteína com uma maior área de

contato e uma maior exposição no meio, fatores que podem facilitar a ligação desta com outras proteínas.

Figura 3 - Predição da proteína BTK-2mut, utilizada como esqueleto para construção da biblioteca P3LMS. Em laranja α -hélice; em azuis folhas β ; em verde cisteínas e em vermelho loop maior, região utilizada para inserir as mutações.



GSVGC AACRRRCAGRAAPTCENEVCKCNIGKKD

Fonte: Elaborada pela autora utilizando os programas Phyre2 e Pymol, 2018

A validação da biblioteca é importante e para isto foi escolhida uma enzima que está envolvida em importantes rotas metabólicas. Em pesquisas que levam ao desenvolvimento de medicamentos, as cinases tem sido importante. Estudos recentes mostram que elas estão envolvidas em processos de proliferação celular e sua inativação poderia servir para fabricação de medicamentos que poderiam ser utilizados no tratamento do câncer (ASQUITH et al., 2018).

A enzima escolhida como alvo foi a calmodulina cinase cinase II (CaMKKII), enzima cedida pelo Doutor Opher Gileadi da universidade de Oxford, Reino Unido.

Para CaMKKII se ativar totalmente é preciso a presença de cálcio. O cálcio (Ca^{2+}) tem um lugar importante na regulação da função intracelular e extracelular. (VETERINARIA, 2014). Este íon e sua proteína primária calmodulina são essenciais para que as células sobrevivam e cresçam (TAKUWA; ZHOU; TAKUWA, 1995). O aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico faz com que este se ligue a uma proteína denominada calmodulina (CaM), um componente das células eucariotas (BURGOYNE; CLAGUE, 2003).

A calmodulina regula atividades biológicas de proteínas celulares e transportadores de membrana dependentes de Ca^{2+} , controla numerosos processos fisiológicos como sínteses de neurotransmissores, motilidade e proliferação de células, apoptose, homeostase metabólica, controle osmótico, processos reprodutivos, transporte de íons, contração muscular, expressão de genes entre outras (FERNANDES; OLIVEIRA-BRETT, 2017).

O complexo Ca^{2+} /calmodulina liga proteínas alvo iniciando diversas cascatas de sinalização. Quando a calmodulina forma o complexo com o íon cálcio aumenta a sua afinidade a uma grande abundância de proteínas CaM cinases, incluindo a cálcio calmodulina cinase I, II e IV (CaMKI, CaMKII, CaMKIV). A fosforilação das CaMKI e CaMKIV por medio das cálcio calmodulina cinase I e II (CaMKKI, CaMKKII) faz com que estas tenham uma ativação total (RACIOPPI; MEANS, 2012). CaMKKII está envolvida em importantes processos biológicos. Tem se mostrado que a CaMKKII é altamente expressa no núcleo arqueado do hipotálamo e desempenha um papel fundamental na homeostase energética do corpo. Tem se observado uma ampla participação da CaMKKII em diversos processos e como sua participação nestes pode afetar o metabolismo, é por esse motivo que o desenvolvimento de inibidores para a CaMKKII torna a busca de novas alternativas importante. Assim, a CaMKKII foi utilizada como alvo para nossa biblioteca, devido a sua importância no metabolismo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construção de uma biblioteca de proteínas de alta estabilidade, capaz de identificar ligantes específicos para CaMKKII utilizando *phage display* e *kunkel* mutagênese.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) realizar mutações sitio específicas do DNA da proteína BTK-2mut, especificamente na alça maior desta;
- b) confirmar as mutações realizadas na alça maior da proteína por sequenciamento;
- c) produção da biblioteca de fagos e seleção (Biopanning) contra CaMKKII;
- d) identificar fagos monoclonais ligantes específicos à enzima CaMKKII.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

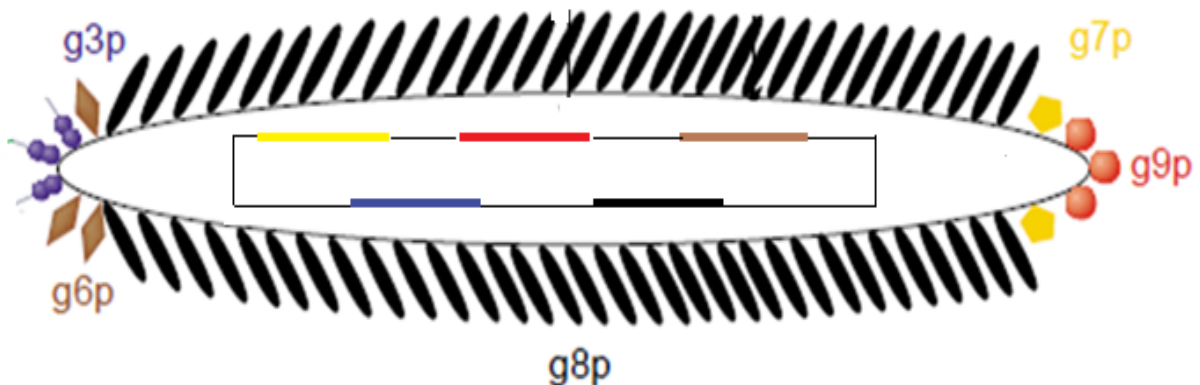
3.1 PRODUÇÃO DE BACTÉRIAS

3.1.1 *Helper phage* (M13KO7)

Foi semeada *E. coli* XL1 Blue em uma placa de LB ágar (1% Triptona; 0,5% Extrato de levedura; 1% NaCl; 1% Agar) com tetraciclina (10µg/ml) e incubada na estufa a 37°C durante uma noite. Uma colônia proveniente dessa placa, foi inoculada em 30ml de meio 2YT (1% extrato de levedura, 1,6% triptona e 0,5% NaCl) com tetraciclina (10µg/ml) e mantida a 37°, 250 rpm por um dia.

Em 50ml de meio 2YT com tetraciclina (10µg/ml) foi adicionado 1ml do crescimento do dia anterior mantido a 37°C, 250 rpm por 2 horas. Foram adicionados ao meio 100µl de *helper phage* M13KO7 (FIGURA 4), incubado 1h e em seguida, foi adicionado kanamicina (100µg/ml), com posterior incubação por 4 horas. O crescimento foi centrifugado em centrífuga Aventi J-E (Beckman coulter) a 2500g durante 15 min e posteriormente o sobrenadante foi transferido de tubo e adicionado 7% de dimetilsulfoxido (DMSO) e guardado a -80°C em alíquotas de 1ml.

Figura 4 - Representação esquemática do *helper phage*, bacteriófago que contém todas as proteínas originais dos bacteriófagos para montagem dos fagos.



Fonte: Adaptada de Fernandez-Gacio et al. (2003)

3.1.2 Titulação do *helper phage* M13KO7

Em 90µl de meio 2YT foram adicionados 10µl do *helper phage* e foram realizadas 10 diluições seriadas assim; 10µl do *helper phage* foi adicionado em 90µl de meio 2YT, sendo essa a diluição 10^{-1} , desta foram pegos 10µl e adicionados em 90µl de meio 2YT, sendo essa a diluição 10^{-2} , seguindo o mesmo procedimento até chegar na diluição 10^{-10} , em seguida, 1µl de cada diluição foi acrescentado em 100µl de cultivo de *E. coli* XL1B com densidade ótica a 600nm (OD_{600}) 0,4-0,6, somado em 3ml de Top ágar pré-aquecido (1% Triptona; 0,5% Extrato de levedura; 1% NaCl; 0,6% agarose) e distribuído em placas de LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte foram quantificadas as unidades formadoras de placas (UFP).

3.1.3 Células *E. coli* XL1 Blue eletrocompetentes com *helper phage*

Foram produzidas células de XL1B eletrocompetentes contendo o *helper phage* para a produção da biblioteca. Da placa da sétima diluição do dia anterior, uma unidade formadora de placa foi retirada e inoculada em 1ml de meio 2YT contendo kanamicina (30µg/ml) e tetraciclina (10µg/ml), foi mantida 8 horas a 37°C. Após, o inóculo foi adicionado em 125ml de meio 2YT contendo kanamicina (30µg/ml) e incubado durante a noite a 37°C, 250 rpm.

No dia seguinte, 2,5ml do inóculo do dia anterior foram adicionados em 450ml de meio super caldo (2,4% extrato de levedura, 1,2% triptona, 5ml de glicerol e 10% MKH_2PO_4/MK_2HPO_4) contendo tetraciclina (5µg/ml) e kanamicina (25µg/ml) e mantido a 37°C, em agitação de 200 rpm até alcançar OD_{550} 0,8; em seguida, o meio foi resfriado em gelo durante 5 minutos e transferido para frasco de centrífuga de 500ml. A cultura foi centrifugada a 3500g, 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado com 500ml de HEPES 1mM pH=7,4 e centrifugado novamente nas condições iniciais. Foram feitas duas lavagens com HEPES nas mesmas condições já descritas. Após a segunda lavagem o precipitado foi solubilizado em 100ml de glicerol 10% e centrifugado a 3500g, 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi realizada mais uma lavagem com glicerol. Após as lavagens, foram adicionados ao precipitado 3ml de glicerol 10% e após solubilização foram feitas alíquotas de 350µl. As alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido por 20 minutos e em seguida, armazenadas a -80°C.

3.1.4 Eficiência das células *E. coli* XL1B eletrocompetentes com *helper phage*

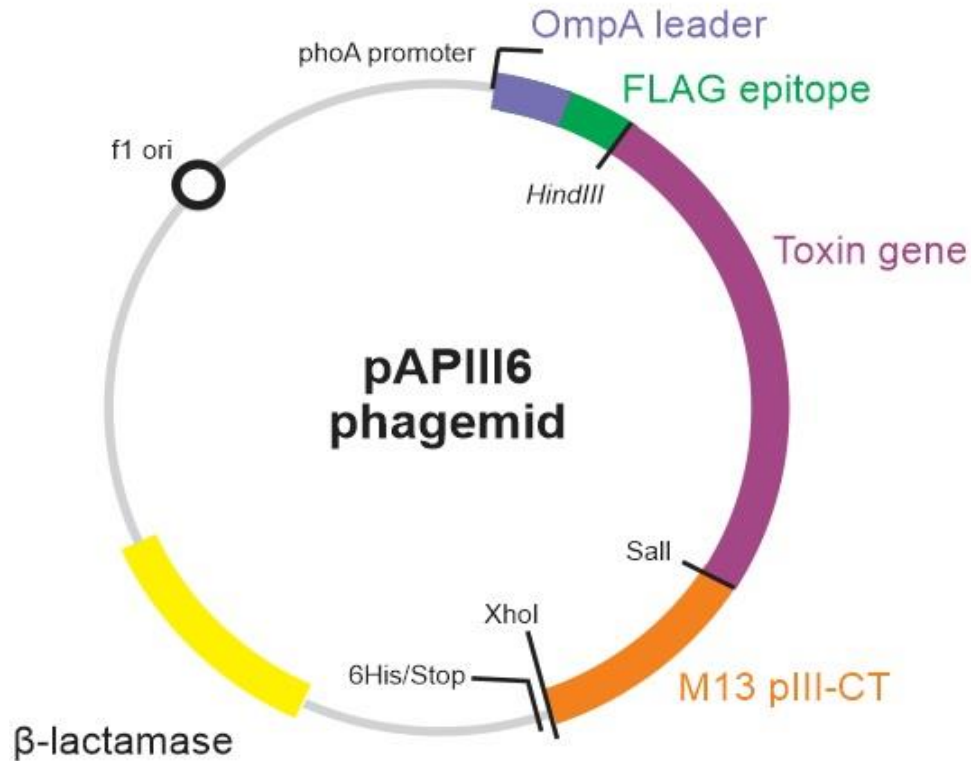
Uma alíquota com 350µl foi descongelada em gelo por 15 minutos e adicionado 1µl de DNA (10pg/µl), homogeneizado e mantido no gelo por mais 10 minutos. As células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2cm e aplicada uma descarga de 2500V em eletroporador Eporator (Eppendorf®) e imediatamente lavadas com 1ml de meio SOC; o cultivo foi transferido para um microtubo e incubado a 37°C, 250 rpm por 1 hora. Após este passo, foram plaqueados 1µl, 10µl e 100µl do cultivo em placas de LB ágar contendo ampicilina (100µg/µl) e incubados uma noite a 37°C.

3.2 TRANSFORMAÇÃO DO FAGOMÍDEO E MONTAGEM DO FAGO

Uma alíquota com 350µl de *E. coli* XL1B eletrocompetente que estava armazenada a -80°C, foi descongelada em gelo por 10 minutos e usada para eletroporar 1µl do fagomídeo pAPIIIK2 (Vetor pAPIII6 com o gene da BTK-2mut) (FIGURA 5) em eletroporador a 2500V. O produto da transformação foi adicionado a 1ml de meio SOC pré-aquecido a 37°C e incubado em shaker com agitação em 250 rpm por 1 hora. Numa placa de LB ágar contendo ampicilina (100µg/ml) e tetraciclina (10µg/ml) foram adicionados 100µl do produto da transformação e incubada a 37°C durante a noite.

Após o crescimento, uma colônia da placa foi adicionada em 50ml de LB líquido com tetraciclina (10µg/ml) e incubada a 37°C, 200 rpm para posterior montagem dos fagos. Após uma hora de crescimento foi adicionado ao meio ampicilina (100µg/ml) e incubado nas condições iniciais por 2 horas; em seguida foram adicionados ao meio 100µl do *helper phage* ($8,7 \times 10^{11}$ fagos/ml) e após uma hora foi adicionado kanamicina (50µg/ml) com posterior incubação durante a noite mantendo as condições iniciais.

Figura 5 - Fagomídeo contendo o gene da proteína BTK-2mut junto a proteína III original do bacteriófago M13.



Fonte: Adaptada de da Silva. (2010)

No dia seguinte o cultivo foi centrifugado em centrífuga Aventi J-E (Beckman coulter) a 6500g, 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 3% NaCl e 4% PEG 8000, incubado por 15 minutos a 37°C, 200 rpm para solubilização dos sólidos, em seguida, foi incubado em gelo durante 1 hora para precipitação dos fagos. Após a precipitação o tubo foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o tubo deixou-se secar invertido a temperatura ambiente. Os fagos foram resuspendidos em 600µl de tampão PBST (PBS pH 7,2; 0,5% de BSA; 0,05% de tween 20), transferidos para microtubo de 1,5ml e centrifugado a 10000 rpm por 5min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5ml, com posterior adição de 5% de glicerol e armazenado a -80°C.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA FITA SIMPLES URACILADO (SSDNA)

Para gerar o DNA uracilado foi utilizada uma linhagem de *E. coli* CJ236 deficiente em enzimas dUTPase e uracil deglicosidase (*dut⁻* ; *ung⁻*) com resistência a cloranfenicol e infectadas pelo fago pAPIIIK2. Foi semeada numa placa de LB ágar com cloranfenicol (7.5µg/ml) uma alíquota de CJ236 que estava armazenada a -80°C e em seguida, foi incubada a 37°C durante a noite. Após o crescimento, uma colônia fresca da placa foi inoculada em 100ml de 2YT líquido contendo cloranfenicol (7,5µg/ml) a 37°C, 200 rpm por 5 horas.

Após, foram adicionados ao meio 100µl dos fagos, e o meio foi incubado nas condições iniciais durante 1 hora. Após esse passo, foi adicionado então ampicilina (100µg/ml) e as células foram mantidas em incubação; 1 hora depois fora adicionado um excesso de uridina (0,25µg/ml) ao meio e 100µl do *helper phage* com posterior incubação. Após 1 hora adicionou-se kanamicina (50µg/ml). As células então, permaneceram em incubação ininterrupta durante a noite, nas mesmas condições iniciais.

Para obtenção dos fagos o crescimento do dia anterior foi centrifugado a 6500g por 20min, o sobrenadante foi transferido de tubo e adicionado 3% de NaCl e 4% de PEG 8000, mantido por 15 minutos a 37°C, 200 rpm para solubilização dos sólidos, em seguida, foi incubado em gelo durante 1h para precipitação dos fagos. Após a precipitação o tubo foi centrifugado 10000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e em seguida o tubo deixou-se secar invertido a temperatura ambiente. O fago foi resuspendido em 1ml de tampão PBST, transferido para microtubo de 1,5ml e centrifugado a 10000 rpm por 5min.

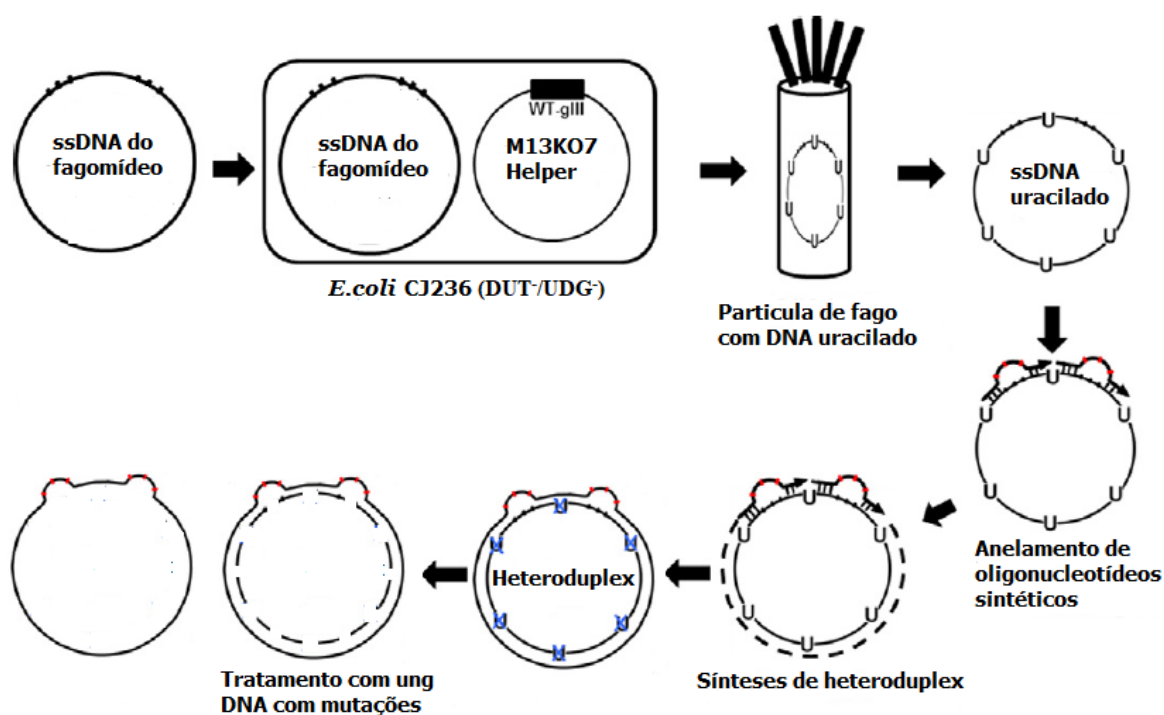
O DNA simples fita uracilado (ss (U) DNA) foi obtido por extração do DNA do fago utilizando o kit QIAprep spin M13 Kit® (QUIAGEN®).

3.4 MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA (*KUNKEL* MUTAGÊNESE)

Para inserir as mutações (FIGURA 6) no *loop* maior da proteína BTK-2mut, foi usado um *primer* sintético inserido na porção C-terminal da proteína. O *primer* (IDT®) está fosforilado na região 5'. O *primer* P3 foi diluído até uma concentração final 0,01µg/µl 5' TTC GTT TTC GCA CGT CGG SNN SNN SNN SNN SNN GCA CCT CCT CGT GCA TGC^{3'} (S=G/C e N=A/G/C/T), foi utilizado em uma proporção 3:1 molar em relação ao vetor pAPIIIK2 (4217 pb). Para a reação foram utilizados 10µl de ssDNA (312,6ng/µl); 11,29µl P3 (0,1129µg); 0,5x tampão

T4 DNA ligase (Ludwing Biotec®) e 0,5x tampão T7 DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific®). Em termociclador Biocycler® foi mantida a reação a 90°C por 2min; 50°C por 3min e 20°C por 5min, em seguida foram adicionados 10mM de dNTPs; 5 U de T4 DNA ligase (Ludwing Biotec®); 10 U de T7 DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific®) e a reação foi mantida por 3 horas a 20°C.

Figura 6 - Esquema representativo da kunkel mutagêneses. Fagomídeo e helper phage infectam bactérias com deficiência em enzimas DUG, DUT que permite a incorporação de uracila no DNA. Adição de primer de oligonucleotídeos sintéticos para inserção das mutações. Após a replicação se obtém a heteroduplex, e em seguida é degradado o DNA uracilado.



Fonte: Adaptada de Huang, R. et al. (2012)

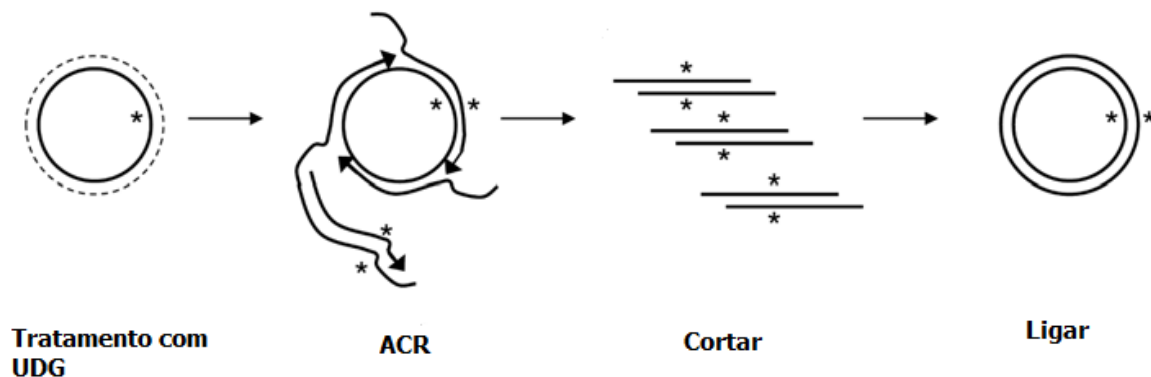
Foi feito um gel de agarose 1% utilizando como marcador GelRed para verificação do resultado da mutação, a banda de interesse foi cortada do gel e feita uma purificação do gel para extração de DNA (Reagentes produzidos no próprio laboratório). Para realizar a amplificação foram utilizados 20µl do DNA heteroduplex, obtido da reação da kunkel mutagêneses, assim; 1x do tampão da enzima UDG e 1U de enzima UDG (Thermo Fisher Scientific®), mantido a 37°C por 15min. A purificação da reação foi feita utilizando miniprep e o DNA foi eluído em 15µl de água Milli-Q.

3.5 AMPLIFICAÇÃO POR CÍRCULO ROLANTE SELETIVO (ACRS)

A ACRS (FIGURA 7) foi feita utilizando 5µl do DNA heteroduplex tratado com UDG, 2µl de dNTPs 10mM, 1x do tampão da phi29 DNA polimerase; 10U de phi29 DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific®), e 50µM de primer randômico (Thermo Fisher Scientific®), a reação foi mantida a 30°C, 24h e posteriormente foi inativada a 70°C por 10min. Do DNA obtido foram utilizados 20µl para realizar a digestão assim: 1x tampão D; 20U de XhoI (Promega®), 0,2µl de BSA e foi mantida a 37°C durante 4h.

Foi feita uma purificação utilizando miniprep e o DNA linear foi eluído em 50µl de água Milli-Q. A ligação dos fragmentos lineares de DNA obtidos da digestão foi feita utilizando 3µl do DNA linear, 1x do tampão da T4 DNA ligase, 10U de T4 DNA ligase (Ludwing Biotec®), mantido a temperatura ambiente por 4h e posteriormente a 4°C uma noite. A reação foi inativada a 65°C por 10min.

Figura 7 - Esquema da amplificação por círculo rolante seletivo. Tratamento da heteroduplex com UDG para eliminar DNA uracilado, amplificado por círculo rolante com adição de *primers* aleatórios, as cadeias resultantes são posteriormente cortadas e ligadas para posterior transformação em bactérias.



Fonte: Adaptada de Huovinen et al. (2012)

3.6 TRANSFORMAÇÃO DA BIBLIOTECA

Em 4 alíquotas de 350µl cada uma de células eletrocompetentes contendo *helper phage* foi adicionado 3µl (201,2ng/µl) do produto da ligação e eletroporada em um eletroporador Eporator® (Eppendorf®) a 2500V. As cubetas foram lavadas com 1ml de meio SOC pré-

aquecido a 37°C e adicionadas para completar 30ml de meio SOC e mantido a 37°C, 200rpm por 1h. Após o crescimento foram feitas diluições com 10µl do crescimento em 90µl de meio SOC, deste foi retirado 10µl e adicionado em 90µl de meio SOC, até completar 10 diluições. De cada uma das diluições foi pego 10µl e plaqueado em placa de LB ágar com tetraciclina (10µg/ml) e ampicilina (100µg/ml) e deixado uma noite a 37°C para obter assim o tamanho real da biblioteca.

Em 250ml de meio 2YT contendo kanamicina (5µg/ml), tetraciclina (10µg/ml) e ampicilina (100µg/ml) foi adicionado 15ml dos 30ml do pré-inoculo do SOC e mantido a 37°C, 200rpm por uma noite. No dia seguinte, os meios foram centrifugados a 6500g por 20min, o sobrenadante foi transferido de tubo e foi adicionado 3% de NaCL e 4% de PEG8000 para precipitação dos fagos, mantido a 37°C por 15min para solubilização dos sólidos e deixado em gelo por 1 hora. Os meios foram centrifugados a 10000rpm por 10 minutos e os fagos foram resuspendidos em PBT com 5% de glicerol e armazenados em alíquotas a -80°C. O nome dado a biblioteca foi P3LMS.

3.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO

Da placa de LB contendo tetracilcina (10µg/ml) e ampicilina (100µg/ml) feitas para quantificar o tamanho real da biblioteca, foram selecionadas 6 colônias, cada colônia foi inoculada em 25ml de meio LB contendo tetraciclina (10µg/ml) e ampicilina (100µg/ml) e deixadas uma noite a 37°C, 200rpm. No dia seguinte, os meios foram centrifugados a 6000g por 15min e o pellet foi utilizado para realizar a extração do DNA plasmidial com soluções e protocolo do próprio laboratório. Após a obtenção do DNA plasmidial, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar presença de DNA. Após a obtenção do DNA, foi feito um PCR de colônia assim: 5µl Tampão 10x KOD, 2µl DNTPs, 1,5µl primer F, 1,5µl primer R, 1µl DNA plasmidial, 12µl Agua Milli Q e 1µl enzima KOD (Produzida no próprio laboratório).

Foram utilizadas as seguintes condições no termociclador: 94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto; durante 25 ciclos. Após o PCR, foi realizado uma eletroforese em gel utilizando agarose low melting 1%, e a banda de interesse foi retirada do gel, purificada com protocolo e reagentes do próprio laboratório. As amostras foram preparadas e mandadas para sequenciamento para determinar se a mutação foi realizada.

3.8 ROUNDS DE SELEÇÃO

Em 25ml de meio LB contendo tetraciclina (10µg/ml) foi inoculada uma colônia de *E. coli* XL1 Blue, crescida até OD₆₀₀ 0,4-0,6 e foi infectada com 100µl da biblioteca P3LMS (9,0x10⁶fagos/µl), após 1 hora foi adicionado ao meio ampicilina (100µg/ml), após 2 horas foi adicionado 100µl do *helper phage* (8,7x10¹¹fagos/µl) e deixado 1 hora, por último foi adicionado kanamicina (5µg/ml) e deixado uma noite. O crescimento do dia anterior foi centrifugado 6500g por 20 minutos, o sobrenadante foi transferido de tubo y os fagos foram precipitados com 3% de NaCl e 4% de PEG, mantido por 15 minutos a 37°C, 200 rpm para solubilização dos sólidos e deixado em gelo por 1h. Em seguida, foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, os fagos foram resuspendidos em 1ml de PBT. Foi obtido o *round 1 in*.

Numa placa de 96 poços com afinidade de ligação media, foi ligado 0,2 µg/poço de estreptavidina e deixada a 4°C durante a noite. Foram feitas 3 lavagens com 100µl/poço de PBST (PBS+0,05% Tween 20). Cada poço foi bloqueado com 200µl de PBS+1% BSA e deixado 2 horas na bancada. Após, foram realizadas 5 lavagens com 200µl/poço de PBST. Para fazer a ligação da enzima alvo, foi adicionado 100µl/poço de CaMKKII (10µg/ml) em PBS e deixado 1 hora. Foram feitas 5 lavagens com 100µl/poço de PBST. Foi adicionada 1µg/poço de biotina em PBST e deixada 20 minutos. Foram feitas 3 lavagens com 100µl/poço de PBST. Foi adicionado 100µl/poço da biblioteca P3LMS e deixado 1h. Foram feitas 10 lavagens com 100µl/poço de PBST. Os fagos ligantes foram eluídos com 87,5µl de HCl 100mM durante 5min e a reação foi inativada com tampão 12,5µl de Tris base pH=11,00.

No terceiro round foi feita uma contra seleção contra outra enzima cinase da seguinte forma: na biblioteca 30 minutos antes de ser adicionados na placa, foi adicionada a enzima GAK para uma concentração final de 10 µg/ml. Os outros passos foram realizados igual aos dois primeiros rounds de seleção. Foram realizados 3 rounds de seleção. Após cada round, para amplificação dos fagos, o eluído foi usado para infectar novas bactérias.

3.9 ELISA MONOCLONAL DE FAGOS

Em 25ml de meio LB com tetraciclina, foi inoculada uma colônia de XL1B e crescida até OD₆₀₀ 0,4-0,6. O meio foi infectado com o *round 3 out* obtido anteriormente, mantido por uma hora a 37°C, 250 rpm e 10µl foram plaqueados em placa de LB com tetraciclina (10µg/ml) e

ampicilina (100µg/ml), mantida uma noite a 37°C. No dia seguinte foram inoculadas 30 colônias da placa em 2ml de meio LB com tetraciclina (10µg/ml) e ampicilina (100µg/ml), deixado a 37°C, 250 rpm durante uma noite. No dia seguinte, os meios foram centrifugados a 6500g durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um microtubo.

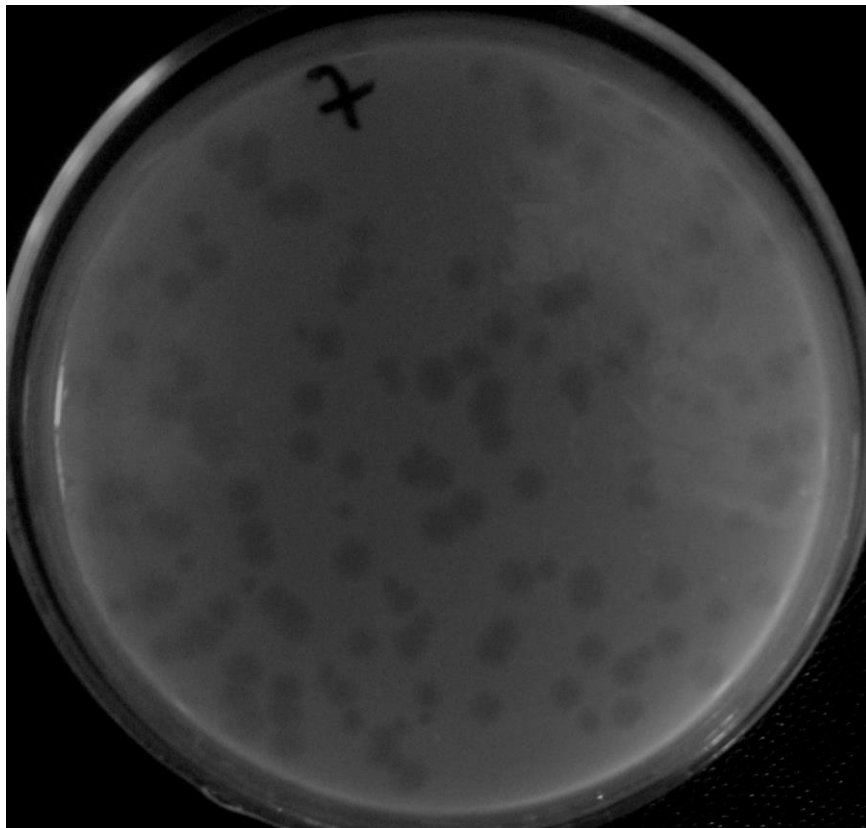
Numa placa de 96 poços, foram usados 90 poços para realizar o teste assim: nos 90 poços foram ligados 0,2 µg/poço de estreptavidina durante uma noite a 4°C. No dia seguinte os 90 poços foram bloqueados com 200 µl/poço de PBS+1%BSA durante 2 horas, após foram realizadas 3 lavagens com 200 µl/poço de PBST. No teste foi usada a CaMKKII como enzima alvo e estreptavidina e a enzima GAK como controle. Em 30 dos 90 poços que foi ligada estreptavidina foram adicionados 100 µl de PBS, em 30 poços foram adicionados 100µl/poço da enzima GAK (10 µg/ml) e nos 30 poços restantes foram adicionados 100µl/poço da enzima alvo CaMKKII (10 µg/ml). As enzimas foram deixadas nos poços por 1 hora e em seguida foram feitas 3 lavagens com PBST. Foi adicionado biotina com PBST em todos os poços e deixado durante 20 minutos, após, foram feitas 3 lavagens com PBST. Para a biblioteca foi feita uma diluição em PBST (30/70) e adicionado 100 µl/poço da diluição nos 90 poços e deixado por 1 hora. Foram feitas 10 lavagens com PBST e em seguida foi adicionado o Anti M-13 conjugado com HRP (1:5000), 100 µl/poço e deixado por 1 hora. Após foram realizadas 3 lavagens e adicionado 50 µl do substrato TMB, deixado por 15 minutos, inativado com H2SO4 0,16M e lido a 450nm.

4 RESULTADOS

4.1 CÉLULAS ELETROCOMPETENTES COM *HELPER PHAGE*

Para realizar as células eletrocompetentes foi preciso primeiro realizar uma infecção do *helper phage* nas células de *E. coli* XL1 Blue e fazer uma diluição. Foram realizadas 10 diluições seriadas e na sétima diluição (FIGURA 8) foram contabilizadas 27 unidades formadoras de placa. Uma unidade formadora de placa foi utilizada para realizar as células eletrocompetentes.

Figura 8 - Placa de petri mostrando nos lugares mais claros da placa células *E. coli* XL1Blue infectadas pelo *helper phage*. Estas células foram utilizadas para realização de células eletrocompetentes contendo o *helper phage*.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018

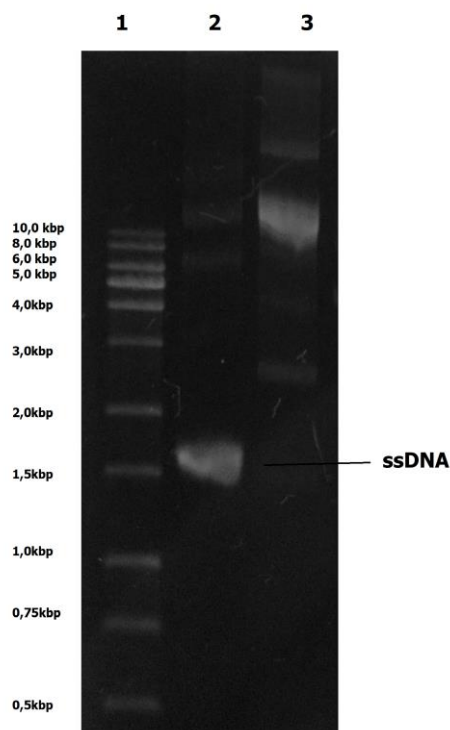
As células eletrocompetentes *E. coli* XL1 Blue contendo o *helper phage* foram testadas para medir sua eficiência na eletroporação, para isto foram usadas 10pg de DNA plasmidial e transformadas por eletroporação em 100µl de células. Foram plaqueados então 10µl e 100µl e no

dia seguinte foram contadas 17 colônias na placa, por tanto a eficiência das células foi estimada em $2,3 \times 10^7$ células por μg de plasmídeo.

4.2 MUTAÇÃO SITIO DIRIGIDA OU KUNKEL MUTAGÊNESE

O fagomídeo foi introduzido em células *E. coli* CJ236 deficientes em enzimas dUTPase e uracil-DNA glicosilase. O ssDNA do fago foi extraído e junto com oligonucleotídeos sintéticos foram realizadas mutações em locais desejados. As mutações foram examinadas utilizando eletroforese em gel de agarose 1% como pode-se observar na FIGURA 9. O DNA foi tratado com enzimas que degradam a fita que contém as uracilas, resultando em uma fita de DNA que contém as mutações no local desejado. O DNA é amplificado e transformado em bactérias *E. coli* XL1Blue.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed da kunkel mutagênese. Em 1) marcador de massa molecular de 1kb; 2) dU-ssDNA utilizado como molde para realizar as mutações; 3) resultado da kunkel mutagênese, dsDNA heteroduplex.



4.3 TRANSFORMAÇÃO DA BIBLIOTECA EM XL1B E OBTENÇÃO DO TAMANHO REAL DA BIBLIOTECA

Com a biblioteca de peptídeos já pronta, o passo seguinte foi a eletroporação na cepa de *E. coli* XL1 Blue eletrocompetente contendo o *helper phage*. Diluições foram realizadas e plaqueadas. Foram contadas 3 colônias na diluição número 3 (FIGURA 10), obtendo o valor real da diversidade da biblioteca.

Figura 10 - Placa de petri com as diluições da biblioteca P3LMS utilizada para quantificar o tamanho real. Foram utilizadas as colônias da diluição 3 para realizar os cálculos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018

4.3.1 Valor estimado da biblioteca

O valor real das mutações realizadas na biblioteca foi obtido multiplicando o número de aminoácidos possível a ser inserido pelo número de posições a ser mutada. No nosso trabalho o *primer* foi desenhado para introduzir qualquer um dos 20 aminoácidos em cada posição, e

tínhamos 5 posições a ser mutadas, dando como resultado uma biblioteca teórica de $3,2 \times 10^6$ proteínas distintas.

$$20^5 = 3,2 \times 10^6 \text{ possíveis mutantes}$$

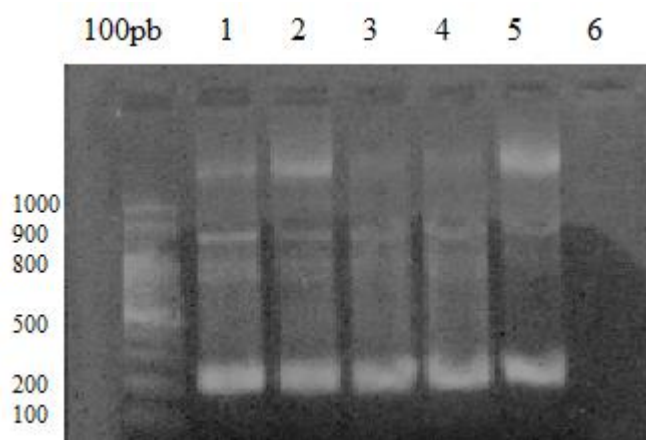
Após, o valor teórico da biblioteca foi comparado com o valor real. O valor real, foi obtido na terceira diluição da placa mostrada na FIGURA 10.

$$\text{Valor real da biblioteca} = 9,0 \times 10^6 \text{ mutantes}$$

4.4 PREPARAÇÃO PARA SEQUENCIAMENTO

Após a eletroporação, além da placa de quantificação foi feita uma placa da qual foram escolhidos clones aleatórios, foi feita a extração de DNA plasmidial, realizado um PCR de colônia (FIGURA 11) e as amostras purificadas do gel de agarose 1% para ser enviadas para sequenciamento. O resultado mostra que a mutação no loop maior da proteína BTK-2mut foi realizada, como pode-se observar na TABELA 1, que mostra as sequencias obtidas após o sequenciamento. O sequenciamento realizado foi do tipo Sanger.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR, corado com GelRed e utilizando um marcador de massa molecular de 100pb. DNA das colônias 1,2,3,4,5 nas colunas correspondentes, em 6 controle negativo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018

Tabela 1 - Sequência de aminoácidos dos clones obtidos para verificação da inserção da mutação no *loop* maior da proteína BTK-2mut da biblioteca P3LMS; a região da mutação encontra-se sublinhada

CLONE	SEQUENCIAS
BTK-2mut	GSVGCAACTRRC <u>CAGRA</u> APTCENEVCKCNIGKKD
1	GSVGCAACTRRC <u>ARRA</u> APTCENEVCKCNIGKKD
2	GSVGCAACTRRC <u>TRAHL</u> PTCENEVCKCNIGKKD
3	GSVGCAACTRRC <u>CAGRA</u> APTCENEVCKCNIGKKD
4	GSVGCAACTRRC <u>CAGRA</u> APTCENEVCKCNIGKKD
5	GSVGCAACTRRC <u>CAGRA</u> APTCENEVCKCNIGKKD

Fonte: Elaborada pela autora, 2018

4.5 ROUNDS DE SELEÇÃO CONTRA CAMKKII

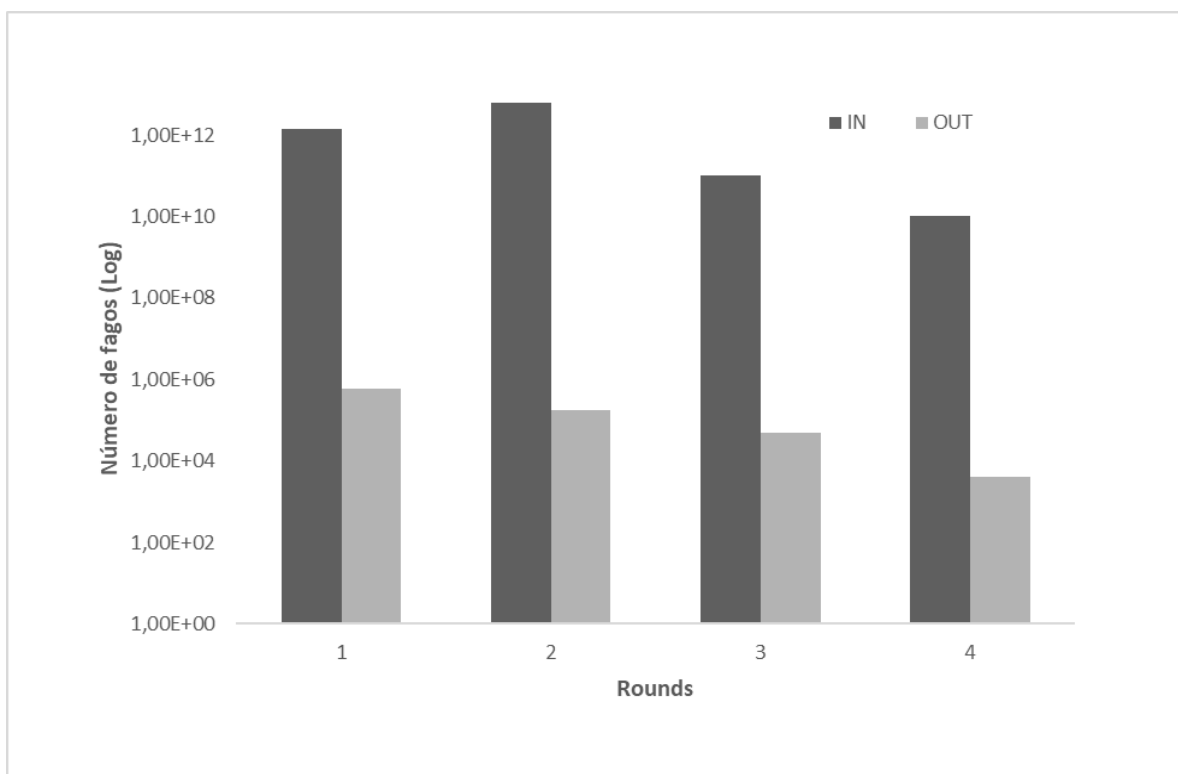
Para testar a eficiência da biblioteca foi escolhido como alvo a enzima CaMKKII. A biblioteca foi amplificada em células *E. coli* da cepa XL1Blue, no dia seguinte foram recuperados os fagos do meio, chamado *round in*. Os fagos recuperados foram incubados em microplacas de 96 poços com a enzima alvo, foram feitas lavagens para descartar fagos não ligantes e os fagos ligantes foram eluidos, chamado *round out*. Foram realizados quatro *rounds* de seleção e após cada round foram feitas diluições seriadas e plaqueadas em placa de LB ágar contendo ampicilina e tetraciclina para quantificar os fagos recuperados após cada *round*. Os valores obtidos são mostrados na TABELA 2 e representados graficamente na FIGURA 12.

Tabela 2 - Quantificação dos clones recuperados após quatro rounds de seleção da biblioteca P3LMS contra CaMKKII.

	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>
<i>IN</i>	$1,4 \times 10^{12}$	$6,0 \times 10^{12}$	$1,0 \times 10^{11}$	$1,0 \times 10^{10}$
<i>OUT</i>	$6,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$4,8 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Figura 12 - Representação gráfica em fase logarítmica dos fagos recuperados após realizados rounds de entrada e rounds de saída.



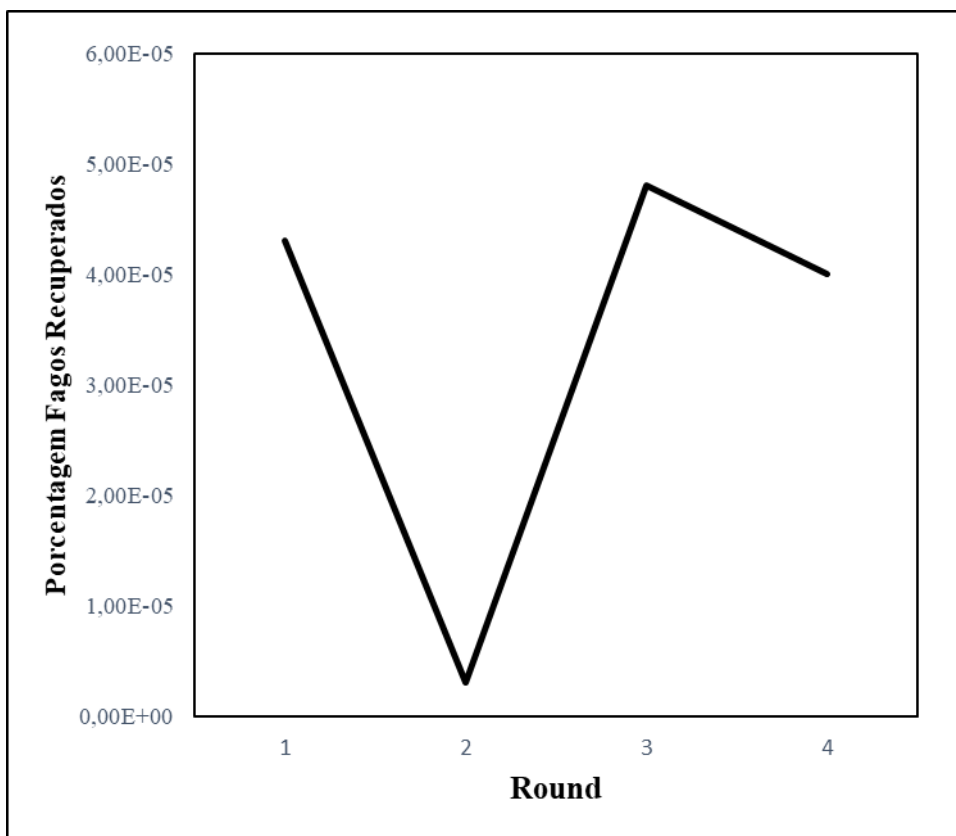
Fonte: Elaborada pela autora, 2018

Para saber si a biblioteca estava sendo enriquecida foi feita uma relação entre os *rounds in* e *out* (*out/in*), estes valores estão especificados na TABELA 3 e representados graficamente na FIGURA 13.

Tabela 3 - Evolução da biblioteca P3LMS em quatro rounds de seleção

<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>
4,3X10 ⁻⁵ %	3,0x10 ⁻⁶ %	4,8x10 ⁻⁵ %	4,0x10 ⁻⁵ %

Figura 13 - Representação gráfica da evolução da biblioteca P3LMS na recuperação dos fagos após 4 rounds de seleção.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018

Para testar a biblioteca foi feito um ELISA monoclonal com clones selecionados do terceiro *round* e mandados para sequenciamento. O resultado do sequenciamento mostrou que todos os clones continham a sequência original., GSVGCAACTRRCCAGRAAPTCENEVCKCNIGKKD.

5 DISCUSSÃO

A técnica de *Phage display* tem se mostrado eficiente na busca ligantes proteicos contra uma variedade de alvos biológicos. Utilizando *phage display* e *kunkel* mutagênese, construímos uma biblioteca de proteínas variantes de uma toxina com estrutura kunitz, a BTK-2mut, com mutações aleatórias direcionadas a uma alça específica, frequentemente envolvida em interações contra alvos proteicos relevantes. Estas variantes são todas fusionadas a proteína pIII do bacteriófago M13 e produzidas em culturas de *E.coli*. Como hipótese, propusemos que esta biblioteca fosse gerar uma ferramenta biotecnológica capaz de identificar ligantes proteicos potentes e altamente estáveis contra diversos alvos biológicos.

Para obtenção do ssDNA que seria posteriormente utilizado para realizar as mutações, nós usamos a cepa CJ236 de *E. coli*, que tem deficiência das enzimas dUTPase e uracil-N glicosilase, desempenham um papel importante no reparo do DNA e garante a fidelidade da replicação. A deficiência nessas enzimas permite a incorporação de uracila no lugar de timinas, obtendo assim um DNA uracilado (dU-DNA) (PAI; ENTZMINGER; MAYNARD, 2012). A construção de bibliotecas com uma alta diversidade de proteínas possui necessidade de uma monitoração cuidadosa a cada passo, como o crescimento bacteriano precisamente controlado, levando em consideração temperatura ideal de crescimento, pH, volume de meio utilizado, entre outras condições.

A literatura relata que se obtém um melhor resultado na obtenção de ssDNA utilizando uma temperatura de crescimento de 25°C e uma agitação de 200 rpm quando usada a cepa CJ236 de *E.coli*, (HUANG et al., 2018). Uma alta temperatura de incubação acompanhada de alta agitação, favorecem o crescimento celular, porém aumentam a morte celular, condição que não favorece a infecção dos fagos (HUANG et al., 2012).

No crescimento da cepa CJ236, utilizamos uma temperatura de 37°C e uma agitação de 250 rpm, condições que estavam padronizadas no laboratório, porem podem ter favorecido a morte celular, o que, resultaria em poucas bactérias disponíveis para os fagos infectar e replicar assim seu material genético, levando a uma extração de dU-ssDNA diminuída para a construção da biblioteca. A quantidade e qualidade do DNA obtido, é um fator importante para obtenção de uma mutação exitosa.

Após obtenção da heteroduplex (dsDNA), onde uma das cadeias contém as mutações introduzidas pelos *primers* sintéticos e a outra DNA molde uracilado, o dsDNA foi previamente digerido com UDG e propagado em *E.coli* (udg^+ dut) (PAI; ENTZMINGER; MAYNARD, 2012). Eliminar a cadeia original é importante quando se quer amplificar somente a cadeia que contém as mutações inseridas. A falha neste processo, leva a prevalência do clone molde sobre os mutantes, mesmo com melhor afinidade contra o alvo, de evoluírem significativamente em população e em relação ao clone molde, durante os *rounds* de seleção.

Em nosso caso, foi realizada digestão previa com a enzima UDG e provavelmente a cadeia molde uracilada não foi degradada eficientemente, por isto, na hora da amplificação, tivemos a presença significativa de clones não mutados, afetando a diversidade da nossa biblioteca inicial. Além disso, a inserção das uracilas através da produção da fita molde em cultivo com células CJ236 tenha sido ineficiente, assim, a enzima UDG não conseguiu degradar a cadeia original, deixando então, que esta recebesse vantagem sobre as cadeias mutadas.

Quando não se trata o DNA uracilado com UDG ou quando este tratamento é ineficiente, diminuições populacionais de mutantes relativas a fita molde são evidentes. Conseqüentemente, na amplificação com a DNA polimerase phi29, já que esta enzima também consegue estender a cadeia uracilada o favorecimento da população molde fica ainda mais evidenciada sobre a cadeia nascente (HUOVINEN et al., 2012).

Realizamos à amplificação do produto de mutagênese, após digestão com UDG, com a DNA polimerase phi29 juntamente com *primers* randômicos para executar o método de amplificação por círculo rolante. Evidenciou-se a eficácia do método, já que houve um aumento de 537,31 vezes sobre a quantidade inicial de DNA da biblioteca. Porém, devido aos resultados do nosso sequenciamento de clones de diferentes *rounds* (TABELA 1), concluímos que uma grande quantidade do DNA amplificado foi do clone molde. A quantidade e qualidade do DNA obtido é importante para realização da *kunkel* mutagêneses.

Após a extração do ssDNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose, na qual conseguiu-se observar duas bandas além do ssDNA. Isto pode significar que o DNA obtido não estava totalmente puro, fator que pode ter interferido na hora de realizar as mutações.

Como descrito no resultado 4.3.1, em nosso trabalho a diversidade teórica na biblioteca foi estimada em $3,2 \times 10^6$ proteínas distintas, que indica o número de possíveis mutações a ser

inseridas. Já, o nosso tamanho real da biblioteca foi estimado em até $9,0 \times 10^6$ proteínas distintas, mostrando que a biblioteca real cobre o valor teórico.

Após a transformação da biblioteca na bactéria, foi realizado o sequenciamento de 5 clones aleatórios. Destes 5 clones observamos apenas uma sequência totalmente mutada e outra sequência contendo uma mutação pontual, desta forma podemos considerar que em torno de 20% da biblioteca, aproximadamente $1,8 \times 10^6$ fagos possuem mutações distintas. No entanto, aproximadamente 80% de toda a biblioteca seria do clone original.

Sendo que o clone original possui as sequências de aminoácidos AGRAA, observou-se no sequenciamento um clone mutado com a sequência TRAHL de aminoácidos, observou-se também uma mutação pontual ARRAA, que, no entanto, consideramos uma mutação casual não relacionada a *kunkel* mutagênese, por apresentar apenas uma mutação das 5 possíveis.

Apesar de observarmos mutações na região desejada da proteína BTK-2mut, no *loop* maior na biblioteca antes da seleção, observamos no sequenciamento de clones selecionados aleatoriamente após quatro *rounds* de seleção contra CaMKK2 a presença exclusiva de sequências da proteína original. Isto pode se explicar pela massiva presença inicial do clone original o qual durante os *rounds* sempre se sobrepôs ao percentual de proteínas mutadas.

Outra explicação para o insucesso da evolução de mutantes com maior afinidade a CaMKKII é a natureza estrutural inata dos mutantes na alça da proteína BTK-2 desta biblioteca criada. Já que várias toxinas Kunitz naturais se ligam através destas alças em proteínas do tipo canais iônicos, que possuem orifícios acentuados para a interação com as alças. Logo, para esta biblioteca evoluir contra uma proteína alvo, esta talvez necessite possuir tal cavidade. Portanto, esta cavidade pode não estar presente na CaMKK2.

Para manter a diversidade de sequências entre os fagos com melhor ligação ao alvo, não se devem realizar mais de quatro *rounds* de seleção. *Rounds* adicionais de seleção possuem uma alta probabilidade de selecionar fagos que crescem, infectam ou eluem melhor, e não os fagos que se ligam melhor a seus alvos (KAY; KASANOV; YAMABHAI, 2001). Nós realizamos quatro *rounds* de seleção, e após cada *round* foi feita a quantificação dos fagos recuperados na eluição (*round out*) e na amplificação (*round in*) mostrado na tabela 2. Foi quantificado também o fator de enriquecimento mostrado na tabela 3, mas não conseguimos obter evolução na biblioteca, já que a maioria dos clones contém a mesma sequência, não havendo competição de um para outro.

6 CONCLUSÃO

Uma biblioteca de proteínas foi construída usando a estrutura primaria de uma proteína de alta estabilidade do tipo Kunitz, a BTK-2mut. Esta biblioteca revelou ter mutações inseridas no local desejado, o *loop* maior desta proteína, porém a degradação da cadeia original foi ineficiente, pois apresentou uma quantidade maior de clones com a sequência original.

Concluimos que a biblioteca de proteínas que possui uma alta quantidade de clones que apresentam na sua estrutura primaria a sequência original, não consegue uma evolução significativa nos *rounds* de seleção realizados contra a enzima alvo.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma nova *kunkel* mutagênese junto com amplificação por círculo rolante foi realizada e células eletrocompetentes de alta competência foram transformadas com o produto final para obtenção de uma nova biblioteca de peptídeos. Alguns dos clones, escolhidos de forma aleatória, resultantes desta transformação foram enviados para o sequenciamento.

Novos testes serão realizados para verificar se a enzima UDG não perdeu sua eficiência na degradação de dU-ssDNA. Experimentos separados serão realizados tanto para dU-ssDNA quanto para dU-dsDNA heteroduplex.

Após a construção de uma nova biblioteca que apresente ao menos noventa por cento de clones diferentes, comprovados por sequenciamento, novos testes serão realizados. Nesses testes serão incluídos a enzima CaMKKII e uma outra proteína com características de proteína de canal, para verificar se algum clone desta nova biblioteca apresenta uma ligação específica a alguma das proteínas, tanto para CaMKKII quanto para a outra proteína.

REFERÊNCIAS

- ASQUITH, C. R. M. et al. 1,2,6-thiadiazinones as novel narrow spectrum calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) Inhibitors. **Molecules**: [S.i]. v. 23, n. 5, Maio. 2018.
- BENHAR, I. Biotechnology applications of phage and cell surface display. **Biotechnol. Adv**: [S.i]. v. 19, p. 1–33, 2001.
- DA SILVA, G. F.; HARRISON, J. S.; LAI, J. R. Contribution of light chain residues to high affinity binding in an hiv-1 antibody explored by combinatorial scanning mutagenesis. **Biochemistry**, Washington. v. 49, n. 26, p. 5464–5472, Jun. 2010.
- DHAWAN, R. et al. BTK-2, a new inhibitor of the Kv1.1 potassium channel purified from Indian scorpion *Buthus tamulus*. **FEBS Letters**, v. 539, n. 1–3, p. 7–13, Mar 2003. (Bangalore)
- DING, L. et al. A new Kunitz-type plasmin inhibitor from scorpion venom. **Toxicon**; [S.i]. v. 106, p. 7–13, Mar 2015.
- FERNANDES, I. P. G.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Calcium-induced calmodulin conformational change. Electrochemical evaluation. **Bioelectrochemistry**: [S.i]. v. 113, p. 69–78, Oct 2017.
- FERNANDEZ-GACIO, A.; UGUEN, M.; FASTREZ, J. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. **Trends in Biotechnology**: [S.i] v. 21, n. 9, p. 408–414, Set 2003.
- GUO, J. et al. Structure of a Kunitz-type potato cathepsin D inhibitor. **Journal of Structural Biology**, San Diego. v. 192, n. 3, p. 554–560, Out 2015.
- HUANG, G. et al. Construction of synthetic phage displayed fab library with tailored diversity. **Journal of Visualized Experiments**: [S.i]. v. 2018, n. 135, p. 1–16, Jan 2018.
- HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. Development of anti-infectives using phage display: Biological agents against bacteria, viruses, and parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**: [S.i]. v. 56, n. 9, p. 4569–4582, Set 2012.
- HUANG, R.; FANG, P.; KAY, B. K. Improvements to the Kunkel mutagenesis protocol for constructing primary and secondary phage-display libraries. **Methods**, [S.i] v. 58, n. 1, p. 10–17, Ago 2012.
- HUOVINEN, T. et al. Primer extension mutagenesis powered by selective rolling circle amplification. **PLoS ONE**: Italy. v. 7, n. 2, Feb 2012.
- KAY, B. K.; KASANOV, J.; YAMABHAI, M. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. **Methods**: [S.i] v. 24, n. 3, p. 240–246, 2001.

KUMAR, G. S. et al. Solution structure of BTK-2, a novel hKv1.1 inhibiting scorpion toxin, from the eastern Indian scorpion *Mesobuthus tamulus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S.i] v. 1814, n. 4, p. 459–469, Jan 2011.

KUNKEL, T. A.; ROBERTS, J. D.; ZAKOUR, R. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. **Methods in enzymology**: [S.i] v. 154, n. 2, p. 367–382, Jan 1987.

MARKLAND, W.; LEY, A. C.; LADNER, R. C. Iterative optimization of high-affinity protease inhibitors using phage display. 2. Plasma kallikrein and thrombin. **Biochemistry**: [S.i] v. 35, n. 24, p. 8058–67, Feb 1996.

ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, [S.i] v. 93, p. 125–135, Nov 2015.

PAI, J. C.; ENTZMINGER, K. C.; MAYNARD, J. A. Restriction enzyme-free construction of random gene mutagenesis libraries in *Escherichia coli*. **Analytical Biochemistry**, v. 421, n. 2, p. 640–648, Nov 2012.

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**, [S.i]. v. 28, n. 6, p. 849–858, Jul 2010.

PRATT, D.; ERDAHL, W. S. Genetic control of bacteriophage M13 DNA synthesis. **Journal of Molecular Biology**, [S.i]. v. 37, n. 1, p. 181–200, April 1968.

RACIOPPI, L.; MEANS, A. R. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: Roles in signaling and pathophysiology. **Journal of Biological Chemistry**, [S.i]. v. 287, n. 38, p. 31658–31665, Jul 2012.

RAMI, A. et al. An overview on application of phage display technique in immunological studies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [S.i]. v. 7, n. 7, p. 599–602, Jun 2017.

RUIGROK, V. J. B. et al. Alternative affinity tools: more attractive than antibodies? **Biochemical Journal**, [S.i]. v. 436, n. 1, p. 1–13, Maio 2011.

SIDHU, S. S. Engineering M13 for phage display. **Biomolecular Engineering**, [S.i]. v. 18, n. 2, p. 57–63, Jun 2001.

SMEAL, S. W. et al. Simulation of the M13 life cycle II: Investigation of the control mechanisms of M13 infection and establishment of the carrier state. **Virology**, [S.i]. v. 500, p. 275–284, Ago 2017.

SMITH, G. P. Filamentous phage fusion: novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion. **Science**, [S.i]. v. 228, n. 1984, p. 1315–1317, 1985.

TAKUWA, N.; ZHOU, W.; TAKUWA, Y. Calcium, calmodulin and cell cycle progression. **Cellular Signalling**, [S.i]. v. 7, n. 2, p. 93–104, Fev 1994.

THOMAS, W. D.; GOLOMB, M.; SMITH, G. P. Corruption of phage display libraries by target-unrelated clones: Diagnosis and countermeasures. **Analytical Biochemistry**, [S.i]. v. 407, n. 2, p. 237–240, Jul 2010.

VETERINARIA, M. D. M. **Monografías de Medicina Veterinaria**, Vol. 11, No. 1 (1989).

WINTER, G. et al. Making Antibodies by Phage Display Technology. **Annual Review of Immunology**, v. 12, n. 1, p. 433–455, 1994.

ZAMAN, G. J. R.; SCHOENMAKERS, J. G. G.; KONINGS, R. N. H. Translational regulation of M13 gene II protein by its cognate single-stranded DNA binding protein. **European Journal of Biochemistry**, v. 189, n. 1, p. 119–124, Dez 1990.