



Expressão heteróloga em *Escherichia coli* do peptídeo inibidor de proteases GORE 1, 2 T fusionado a GST

Milena G. Lima (PG)^{1*}, Rafael A. Júnior (PG)¹, Humberto J. de O. Ramos (PQ)¹, Maria G. A Oliveira (PQ)¹

milena.godoi@ufv.br

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil .

RESUMO (Times New Roman, tam 12)

RESUMO - A *Anticarsia gemmatilis* é uma importante praga da soja, combatida por inibidores de proteases como SKTI e SBBI. Visando novas estratégias, este trabalho buscou expressar os peptídeos inibidores GORE 1 e GORE 2 na forma da quimera GORE 1,2T em *Escherichia coli* Arctic Express, utilizando o vetor pET-41a(+) com fusão à GST. A expressão foi induzida com IPTG e analisada por SDS-PAGE. Observou-se uma banda intensa em ~35 kDa na fração insolúvel, indicando que a maior parte do peptídeo foi produzida em forma agregada, como corpo de inclusão. Embora estratégias para aumentar a solubilidade tenham sido adotadas, a alta hidrofobicidade do peptídeo comprometeu sua expressão na forma solúvel.

Palavras-chave: expressão heteróloga, solubilidade, *Escherichia coli*

Introdução

A *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Erebididae), também conhecida como lagarta da soja, é uma das principais pragas de soja no Brasil (1); ela ataca essencialmente as folhas da planta, diminuindo sua área fotossintética e, consequentemente, prejudicando seu desenvolvimento (2). Uma conhecida estratégia para o controle desta praga é a inibição de enzimas do sistema digestivo da lagarta. As proteínas SKTI (Soybean Kunitz trypsin inhibitor) e SBBI (soybean Bowman-Birk trypsin-chymotrypsin inhibitor), por exemplo, são inibidores de proteases tripsina-like que ocorrem naturalmente na soja (3).

Com isso em vista, estudos anteriores do grupo resultaram no desenvolvimento dos peptídeos inibidores de tripsina GORE 1 e GORE 2, que apresentaram resultados promissores quanto à inibição em testes *in vitro*, assim como a mortalidade dos insetos em testes *in vivo* (4, 5). Eles foram desenhados de forma a interagir com o centro ativo de proteases tripsina-like de insetos inibindo-as competitivamente. Esta região é altamente hidrofóbica em insetos, sendo assim os peptídeos têm em sua composição majoritariamente aminoácidos apolares. O objetivo deste trabalho é produzir os peptídeos GORE 1 e GORE 2 através de expressão heteróloga em *Escherichia coli* na forma da quimera GORE 1, 2 T, combinando estratégias que visam aumentar sua solubilidade.

Experimental

Expressão em *Escherichia coli*

A cepa utilizada de *E. coli* foi a Arctic Express, ela conta com chaperonas, que auxiliam no enovelamento de proteínas de difícil solubilização, além de realizar a expressão a temperaturas mais baixas, o que diminui a chance da agregação de proteínas. A bactéria foi transformada com o vetor plasmidial pET-41a(+), contendo a sequência de DNA que codifica o peptídeo GORE 1, 2 T fusionado à sequência que codifica a glutatona-S-transferase (GST). Para o pré-inóculo, as células foram adicionadas ao meio LB seletivo

(com gentamicina a 100 µg/mL e kanamicina a 20 µg/mL) mantidas a 37°C sob agitação de 210 rpm por 14h. O inóculo foi realizado passando o conteúdo do pré-inóculo para um volume maior de meio LB, que foi mantido a 30°C sob agitação de 210 rpm até OD₆₀₀ ~0,5. Por fim, foi feita a indução adicionando 0,1 mM de IPTG ao meio, o conteúdo foi mantido a 13°C sob agitação de 210 rpm e alíquotas foram retiradas após 12, 18 e 24h. A bactéria não transformada foi usada como controle negativo.

Lise celular

Passado o período de indução, foi feita a centrifugação (4100 rpm a 4°C por 30 minutos), o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em tampão PBS (NaCl 37 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM; pH 7.3) + 5% de glicerol. A lise celular foi feita mecanicamente utilizando um sonicador de sonda na amplitude de 80%, intervalo

s de 10s on e 10s off por 5 minutos. O lisado foi novamente centrifugado e as fases coletadas para posterior análise.

Análise por SDS-page

A confirmação da expressão foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-page). O gel foi preparado com espessura de 1,5 mm, com o gel de empilhamento tendo 4% de poliacrilamida e o gel de separação, com 15%; a eluição ocorreu a 120V por 1h20. Após a corrida, o gel foi corado com corante Comassie Blue R por 20 minutos e descorado com solução descorante (etanol 20% e ácido acético 5%) por 16h.

Resultados e Discussão

A análise do gel confirmou a expressão do peptídeo recombinante (Figura 1). Embora a amostra da bactéria não transformada apresentasse uma proteína endógena com massa molecular semelhante (~35 kDa), a bactéria transformada exibiu uma banda



mais intensa nessa mesma região, indicando a expressão do peptídeo de interesse.

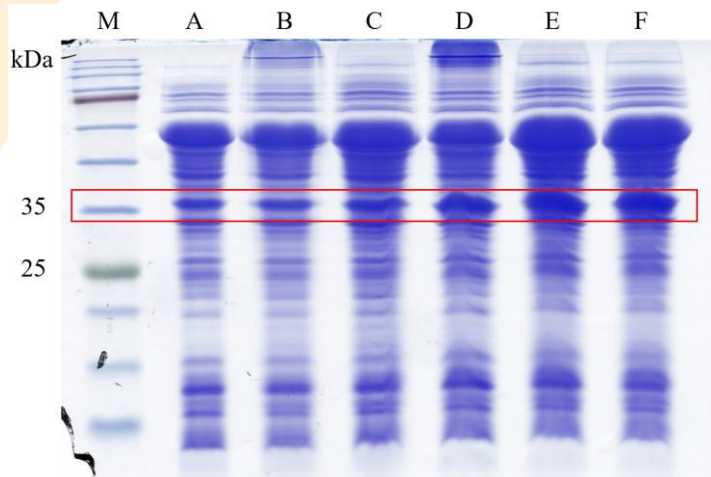


Figura 1. Lisados da célula não transformada e transformada. M: marcador molecular, A, B e C: célula não transformada após 12, 18 e 24 h de indução, respectivamente, D, E e F: célula transformada após 12, 18 e 24h de indução.

Após a separação das frações solúvel e insolúvel, observou-se uma banda proeminente em torno de 35 kDa na fração insolúvel, ausente ou pouco intensa na fração solúvel, sugerindo que a maior parte da proteína foi produzida na forma agregada. Além disso, foi possível observar um aumento na intensidade da banda com o aumento do tempo de indução (Figura 2).

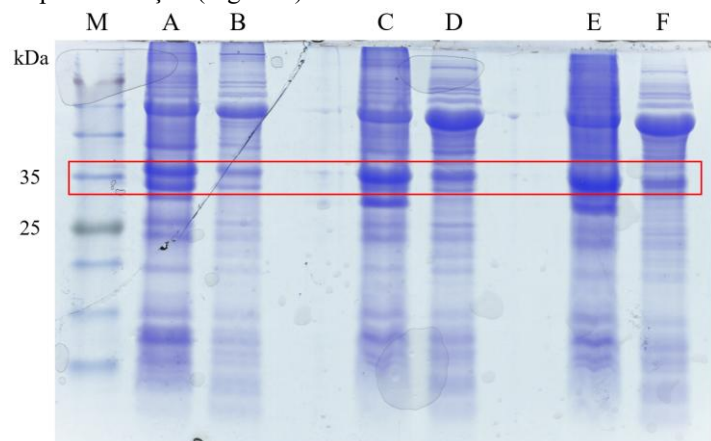


Figura 2. Frações insolúveis e solúveis da célula transformada. M: marcador molecular, A e B: frações insolúvel e solúvel, respectivamente, após 12h de indução; C e D: frações insolúvel e solúvel após 18h de indução; E e F: frações insolúvel e solúvel após 24h de indução.

Conclusões

A cepa de *E. coli* Arctic Express se mostrou eficiente para a expressão do peptídeo GORE 1, 2 T, o que foi constatado pela intensidade da banda ~35kDa no gel de SDS-page. No entanto, embora tenham sido utilizadas estratégias para aumentar a solubilidade do peptídeo (Arctic Express e GST), sua composição aminoacídica altamente apolar induziu a formação de corpos de inclusão, inviabilizando a sua expressão na forma solúvel.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. L.F. Pezenti; D.R. Sosa-Gómez; R.F. Souza; L.A. Vilas-Boas; K.B. Gonçalves; C.R.M. Silva; G.T. Vilas-Bôas; A. Baranowski; M.S. Mantovani; R. Rosa, *Genomics*, **2021**, 113, 2264-2275.
2. E.W. Hodgson; R.L. Koch; J.A. Davis; D. Reisig; S.V. Paula-Moraes, *Journal of Integrated Pest Management*, **2021**, 12, 13.
3. N.R.S. Júnior; E.G. Mendonça; R.A. Barros; G. Cordeiro; C.R. Silva; W.G. Campos; J.A. Oliveira; M.G.A. Oliveira, *Insect Biochem.* **2019**, 10, 477-489.
4. R.A. Barros; Y. Meriño-Cabrera; C.E. Vital; N.R.S. Júnior; C.N. Oliveira; S.L. Barbosa; J.V.M.G. Assis; H.J.O. Ramos; M.G.A. Oliveira, *Pest Management Science*, **2021**, 77, 1714-1723.
5. H. Schultz; Y. Meriño-Cabrera; L.S. Carneiro; R.J. de Andrade; J. Aguilar; J. Severiche-Castro; H.J.O. Ramos; J.E. Serrão; M.G.A. Oliveira, *Phytoparasitica*, **2024**, 52, 9.