



Procedimento de Biossegurança: Inativação de Bactéria Geneticamente Modificada Sem Alteração da Estrutura Tridimensional da Proteína Recombinante

Maria Clara Tavares Astolfi¹; Itanei Sarah Farias Nóbrega²; Giovanna Carolina Resk Maklouf Corrêa³; Jonathan Luiz Wohlke⁴, Carlos Gustavo Nunes-Silva⁵; Spartaco Astolfi-Filho⁶

Resumo

O desenvolvimento da biotecnologia moderna, fundamentado na engenharia genética e mais recentemente na biologia sintética, só foi possível com a construção e uso de grande número de organismos geneticamente modificados (OGMs), por isso o desenvolvimento de métodos de biossegurança, de controle e prevenção da difusão destes em ecossistemas naturais é um aspecto fundamental a ser abordado pela comunidade científica. O presente artigo apresenta dois métodos simples e eficazes para inativação de bactérias geneticamente modificadas, baseados na exposição a diferentes concentrações de formaldeído ou diferentes temperaturas, conservando a estrutura nativa-terciária tridimensional da proteína recombinante (GFP). Os resultados demonstram a possibilidade de produção de proteínas recombinantes, em determinadas condições, com o simultâneo controle da proliferação do OGM, no intuito de proporcionar uma manipulação segura durante a rotina laboratorial ou industrial.

Palavras-Chave: biossegurança, OGM, GFP, proteína recombinante.

A Biosafety Procedure: Genetically modified bacteria inactivation conserving three-dimensional structure of recombinant protein. The development of modern biotechnology, based on genetic engineering and more recently on synthetic biology, was only possible with the construction and use of large number of genetically modified organisms (GMOs). Because of this the development of methods of biosafety, of control and prevention of diffusion of these in natural ecosystems is a fundamental aspect to be addressed by the scientific community. This article presents simple and effective methods for inactivating genetically modified bacteria, based on exposure to different concentrations of formaldehyde or different temperatures, conserving the three-dimensional native-tertiary structure of the recombinant protein (GFP). The results demonstrate the possibility of producing recombinant proteins, under certain conditions, with the simultaneous control of the proliferation of GMOs, to provide safe handling during the laboratory or industrial routine.

Keywords: biosafety, GMO, GFP and recombinant protein.

¹ Biotecnóloga, LT-DNA/CAM/ UFAM, Manaus, AM, Brasil, mctastolfi@gmail.com

² Esp Microbiologia, LT-DNA/CAM/UFAM, Manaus, AM, Brasil, itanei.sarah@gmail.com

³ Biotecnóloga, LT-DNA /CAM/UFAM, Manaus, AM, Brasil, giomaklouf@gmail.com

⁴ MSc Biotecnologia, LT-DNA. CAM/UFAM Manaus, Brasil, AM.

⁵ Prof Adjunto, Depto Genética, ICB/UFAM, Manaus, AM, Brasil, cgmanaus@gmail.com

⁶ Prof Titular, LT-DNA /CAM/UFAM, Manaus, AM, Brasil, spartaco.biotec@gmail.com



1. Introdução

O desenvolvimento da biotecnologia moderna, fundamentado na engenharia genética (COHEN et al., 1973) e mais atualmente pela biologia sintética (ENDY, 2005) tem possibilitado a construção de novas funções biológicas programadas pelo código genético, abrindo caminho para grandes inovações tecnológicas e descobertas científicas (CHURCH et al., 2014). A aplicação de organismos geneticamente modificados na indústria se expande mundialmente, como na produção em larga escala de medicamentos como insulina, hormônio de crescimento humano, artemisinina, antibióticos, anticorpos monoclonais, na síntese de enzimas para produção de álcool e produtos de limpeza, no tratamento de resíduos através de biorremediação, entre outros.

As técnicas de biologia molecular e engenharia genética que baseiam a tecnologia do DNA recombinante e a abordagem da biologia sintética também são cruciais na investigação científica dos mecanismos e funções não decifrados de uma gama de comportamentos e componentes celulares (e.g. novas enzimas e proteínas envolvidas em vias metabólicas, complexos gênicos, dinâmica da regulação da expressão gênica, ativação e repressão da síntese de genes, etc.) (CHURCH et al., 2014; WANG e ZHANG, W., 2019). Portanto, estas ferramentas são de uso rotineiro em laboratórios científicos e didáticos ao redor do mundo.

Diante da ascensão do uso de organismos geneticamente modificados (OGMs) e artificiais, construídos a partir de informações genéticas sintéticas e estranhas à natureza, debates acerca do impacto e

efeito caso estes OGMs sejam amplamente utilizados e liberados no meio-ambiente surgem e são imprescindíveis para o avanço ético e seguro da biotecnologia (DE LORENZO, 2010; KELLE, 2009; SCHMIDT et al., 2009; TORRANCE, 2010; WRIGHT et al., 2013). Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos de biossegurança, de controle e prevenção da proliferação em ecossistemas naturais são aspectos fundamentais a serem abordados pela comunidade científica.

Diversas estratégias para garantir o não escape para o meio ambiente de microrganismos geneticamente modificados (i.e. *biocontainment*) já foram desenvolvidas, como: sistema toxina-antitoxina sensível à sinais ambientais externos ao ambiente laboratorial/industrial; origens de replicação de plasmídeos recombinantes condicionadas a indutores específicos presentes na hospedeira; controle de genes essenciais para viabilidade celular; entre outros (WRIGHT et al., 2013).

Nesta direção, o presente artigo apresenta métodos simples e eficazes para inativação de bactérias geneticamente modificadas, porém conservando a estrutura nativa-terciária tridimensional da proteína recombinante. Assim, ao passo que a função codificada pela informação genética heteróloga é preservada e pode ser substrato de investigação científica (e.g. em bioensaios visando sua caracterização funcional), há o controle da proliferação do organismo geneticamente modificado.

Como prova de conceito, a bactéria geneticamente modificada *E. coli* JM110, expressando o gene da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) clonado no

plasmídeo p26G, foi submetida à condições de morte celular. A GFP (Figura 1), que emite fluorescência verde com seu cromóforo (i.e., resíduos de aminoácidos serina 65, tirosina 66 e glicina 67 localizados no centro da molécula) dependente de sua estrutura terciária 3D nativa, foi utilizada com a função de sinalizar o impacto dessas condições na sua estrutura nativa (3D). Juntos, os presentes resultados demonstram a possibilidade de inativar células transgênicas conservando a estrutura molecular nativa de proteínas recombinantes, permitindo uma manipulação segura de OGMs durante a rotina laboratorial.

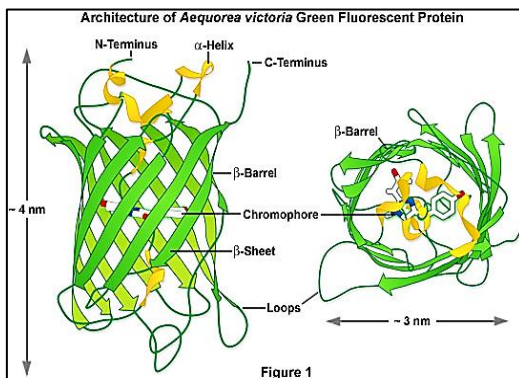


Figura 1: Estrutura molecular de B-barril da proteína GFP, mostrando seu fluoróforo 3D nativo. Fonte: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/print/properties/jellyfishfps-print.htmlccc>.

Esse trabalho especificamente foi realizado em decorrência da necessidade real de utilizar, em ambiente público, células de *E. coli* recombinantes super-produtoras de GFP em serpentinas fluorescentes para ornamentar uma discoteca de concepção futurista no âmbito de uma competição na “Feira de Ciências” de turmas de ensino do 2º grau na Escola FUCAPI (Manaus – AM). Para essa utilização, de acordo com as normas de biossegurança

brasileiras (CTNBio), as células bacterianas deveriam estar mortas, mas as moléculas de GFP em seu interior deveriam continuar fluorescendo e para tal deveriam manter suas estruturas 3D nativas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Linhagem de *E. coli*, plasmídeo, transformação genética e meio de cultura

A linhagem de *E. coli* utilizada no presente artigo foi a JM110 (*rpsL thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm glnV44 Δ(lac-proAB) e14-[F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)*), foi obtida do banco de bactérias do Laboratório de Tecnologias de DNA, localizado no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O meio de cultura utilizado foi o LB (Luria Bertani), composto por peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L; pH 7,0, esterilizado por autoclavagem. As transformações genéticas foram realizadas pelo método de quimio-competência com CaCl₂ (COHEN et al., 1972)

O plasmídeo recombinante utilizado para transformação genética e análise experimental do presente trabalho foi o p26G (Figura 2), obtido do Banco de Plasmídeos do Laboratório de Tecnologias de DNA (CAM/UFAM), é composto por: 1) origem de replicação do pUC19 de alto número de cópias (300~500 por célula); 2) gene Amp^R, marcador de seleção, que sintetiza a enzima beta-lactamase, conferindo resistência ao antibiótico ampicilina; 3) gene codificante da proteína GFP, alvo do presente estudo, sob controle do promotor forte JK26, que interage com fator sigma S para alta expressão em fase estacionária e da

sequência Shine-Dalgarno do gene da proteína 10 do fago T7.

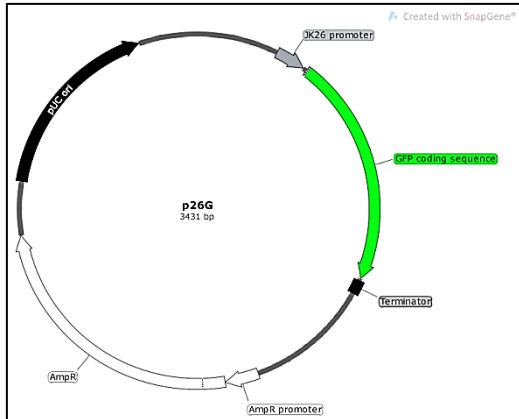


Figura 2: Ilustração do mapa do vetor plasmidial p26G, gerada pelo software SnapGene.

2.2 Análise de inativação de *E. coli* JM110 transgênica e conservação da estrutura 3D da proteína recombinante por meio de tratamento com formaldeído

A partir de uma colônia isolada, foi feito pré-inóculo de *E. coli* JM110 recombinante com o plasmídeo p26G em 5mL de meio LB líquido suplementados com 100µg/ml de ampicilina. A cultura foi incubada em shaker orbital a 120 rpm e 37°C overnight. Após o crescimento, foi feito inóculo com 500µL da suspensão bacteriana em 50mL de meio LB líquido. O crescimento da cultura foi acompanhado quantificando-se a absorbância de alíquotas de 1mL em espectrofotômetro em comprimento de onda 600nm (BloMate3 da Thermo Electron Corporation - USA). Após atingir a densidade óptica de 1, alíquotas de 1mL da suspensão bacteriana foram distribuídas em 5 tubos de eppendorfs de 1,5ml em triplicata, as quais foram adicionados formaldeído 37% (m\V) nas seguintes concentrações finais, em triplicata: 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05% e 0.025% (m\V). Visando

identificar a conservação da estrutura nativa-terciária da proteína recombinante GFP, foram analisados os efeitos das diferentes concentrações de formaldeído na fluorescência desta. Após 15 minutos da adição do formaldeído, as amostras foram diluídas 1:2 e 100µL de cada foram adicionados em placa de fundo preto de 96 poços para quantificação da fluorescência em espectrofluorímetro Chamaleon Multiplate Reader da HIDEX - Finlândia (excitação em 405nm; emissão em 500nm). Posteriormente, cada amostra foi diluída sucessivamente em meio LB líquido e plaqueada em meio LB sólido suplementados com 100µg/ml de ampicilina, a fim de ser quantificada a ação do formaldeído na inativação bacteriana (morte celular). As placas invertidas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C overnight. A inativação celular foi computada contando-se as unidades formadoras de colônias (UFCs). Os dados foram processados e analisados utilizando o software GraphPadPrism 7.

2.3 Análise de inativação de *E. coli* JM110 transgênica e conservação da estrutura 3D da proteína recombinante por meio de elevação da temperatura

A partir de uma colônia isolada, foi realizado pré-inóculo de *Escherichia coli* JM110 recombinante com o plasmídeo p26G em 5mL de meio LB líquido suplementados com 100µg/ml de ampicilina. A cultura foi incubada em shaker orbital a 120 rpm e 37°C overnight. Após o crescimento, foi feito inóculo com 500µL da suspensão bacteriana em 50mL de meio LB líquido. O crescimento da cultura foi acompanhado quantificando-se a absorbância de

alíquotas de 1mL em espectrofotômetro (BloMate3 da Thermo Electron Corporation - USA) em comprimento de onda 600nm. Após atingir a densidade óptica de 1, alíquotas de 1 mL da suspensão bacteriana foram distribuídas em 7 microtubos (Eppendorf) de 1,5ml, as quais foram submetidas em triplicata em banho-seco às seguintes temperaturas em triplicata: 40°C, 42°C, 50°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C. Visando analisar a conservação da estrutura nativa-terciária da proteína recombinante GFP, foram analisados os efeitos das diferentes temperaturas na fluorescência desta. Após 15 minutos de exposição, as amostras foram diluídas 1:2 e 100µL de cada foram adicionados em placa de fundo preto de 96 poços para quantificação da fluorescência em espectrofluorímetro Chamaleon Multiplate Reader da HIDEX - Finlândia (excitação em 405nm; emissão em 500nm). Posteriormente, cada amostra foi diluída sucessivamente em meio LB líquido e plaqueada em meio LB sólido suplementado com 100µg/ml de ampicilina, a fim de ser quantificada a ação da temperatura na inativação bacteriana (morte celular). As placas invertidas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C *overnight*. A inativação celular foi averiguada contando-se as unidades formadoras de colônias (UFCs). Os dados foram processados e analisados utilizando o software GraphPadPrism 7.

3. Resultados e Discussão

3.1. Expressão de GFP em *E. coli* JM110

Com objetivo de caracterizar o impacto da inativação celular na estrutura nativa 3D de proteínas recombinantes, inicialmente a bactéria *E. coli* JM110 foi transformada geneticamente com o

plasmídeo p26G, contendo a informação para expressão gênica de GFP (Figura 3).

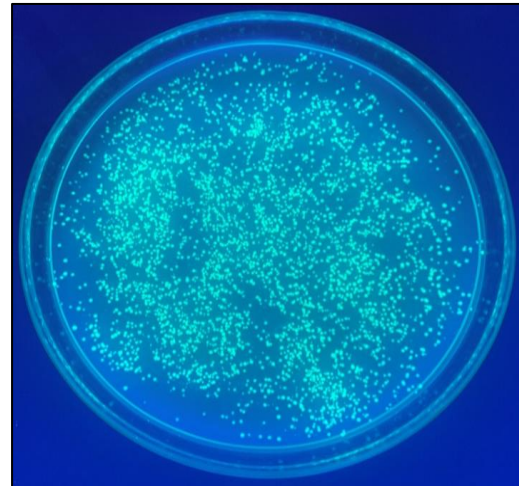


Figura 3: Fotografia de colônias de *E. coli* JM110 geneticamente modificadas, expressando em altos níveis a proteína GFP, codificada no plasmídeo p26G exposta à luz azul.

Pode-se analisar que por conta do seu circuito genético ser controlado pelo promotor sintético forte JK26, resultando em altos níveis celulares da proteína GFP no citoplasma, a bactéria geneticamente modificada apresenta elevada emissão de fluorescência verde, quando excitada por luz azul.

3.2 Análise de inativação de *E. coli* JM110 transgênica e conservação da estrutura 3D da proteína recombinante por meio de tratamento com formaldeído

Visando o estabelecimento de um protocolo eficaz e simples para inativação de organismos geneticamente modificados com conservação da estrutura terciária 3D nativa da proteína recombinante, foi analisado o efeito da exposição da *E. coli* recombinante a diferentes concentrações de formaldeído na viabilidade celular e fluorescência emitida pela GFP, os resultados obtidos

estão apresentados na Figura 4 a seguir.

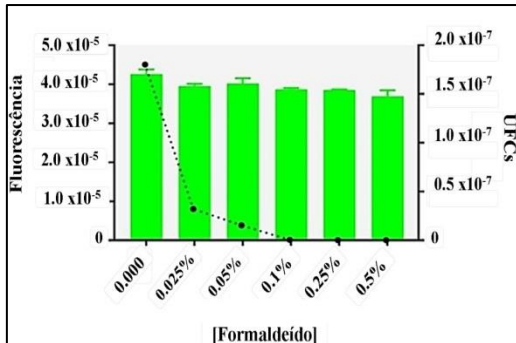


Figura 4: Gráfico do efeito de diferentes concentrações de formaldeído na fluorescência da GFP (barras verdes) e na viabilidade celular, mensurada pelo o número de UFCs de células sobreviventes (linhas pontilhadas).

Pode-se verificar que a exposição a formaldeído nas concentrações de 0,025% e 0,050% por 15 minutos influenciou parcialmente (i.e., em 80% e 91%, respectivamente) a viabilidade celular da *E. coli* JM110 geneticamente modificada, ao passo que na concentração de 0,10% ocorre total inativação bacteriana (morte celular), com diminuição de apenas 9% da fluorescência, em comparação com a fluorescência emitida sem adição do composto químico. Esse resultado indica que a adição de formaldeído nessas concentrações pouco afeta a estrutura 3D da GFP, pois seu fluoróforo continua funcional o que depende da manutenção de sua estrutura 3D.

É importante ressaltar que esse procedimento de inativação celular não deve ser usado, em princípio, para processos de produção industrial de proteínas para uso em humanos pois o formaldeído reage de diversas formas com grupamentos laterais dos aminoácidos modificando as proteínas e que devido às alterações, dependendo das proteínas, podem apresentar características

indesejáveis como por exemplo perda de sua atividade biológica ou indução da resposta imune. Por exemplo, esse procedimento não seria possível de ser utilizado nos processos industriais de produção de insulina ou hormônio de crescimento humano por fermentação de células de *E.coli* recombinantes. Exceções existem, por exemplo quando inativar a proteína e elicitar a resposta imune é uma característica desejável, como no caso de produção de toxóides tetânicos e diftéricos utilizados como vacinas, tratando as respectivas toxinas com formaldeído, inativando-as porém mantendo suas características imunológicas (COSTA, 2010; THAYSEN-ANDERSEN et al., 2007).

3.3 Análise de inativação de *E. coli* JM110 transgênica e conservação da estrutura 3D da proteína recombinante por meio de elevação da temperatura

Após a análise com formaldeído, foi analisado o impacto da variação de temperatura na viabilidade celular da *E. coli* e fluorescência emitida pela GFP recombinante. Os resultados obtidos de viabilidade celular e fluorescência emitida, que estão apresentados na Figura 5.

Os resultados mostram que a exposição da *E. coli* JM110 geneticamente modificada à temperatura de 50°C por 15 minutos causou a morte de 86% das bactérias, com a conservação da conformação nativa-terciária de 86% da proteína recombinante GFP (analisada a partir da fluorescência emitida), e que a exposição a 60°C por 15 min, resultou na morte de todas as bactérias recombinantes com a conservação da conformação nativa-terciária de 63% da proteína recombinante GFP.

Temperaturas mais altas que também inativam as bactérias alteram bem mais a estrutura 3D da GFP, como por exemplo a 70°C apenas 20% da estrutura 3D da GFP é mantida.

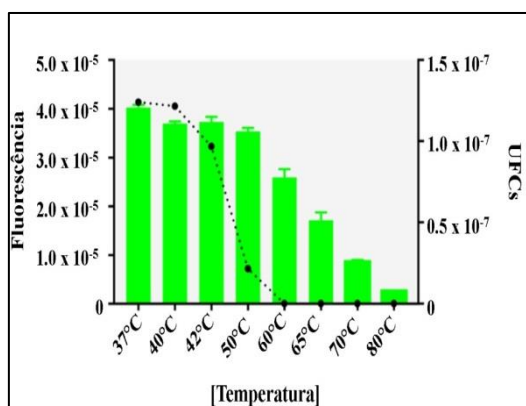


Figura 5: Gráfico do efeito da temperatura na fluorescência da GFP (barras verdes) e na viabilidade celular, mensurada pelo o número de UFCs (linhas pontilhadas).

Embora o aquecimento a 60°C por 15 min., que é muito parecido com o tipo clássico de pasteurização lenta (ORDÓÑEZ et al., 2005), tenha diminuído parcialmente a fluorescência da GFP e portanto ter afetado a estrutura terciária de parte de suas moléculas, os resultados indicam que esse procedimento de inativação pode ser utilizado especialmente para produção em *E. coli* de proteínas mais termoestáveis que a GFP, como por exemplo enzimas de microorganismos termofílicos, como a Taq DNA polimerase e a Pfu DNA Polimerase (BOUZAS et al., 2006)

Como métodos de descontaminação microbiológica de alimentos por irradiação com raios-x ou gama têm sido usados por décadas (FARKAS, 1998), pode-se considerar que a aplicação dessa metodologia para os propósitos desse trabalho também deva funcionar.

Os dois procedimentos descritos nesse artigo são métodos eficazes de inativação de células recombinantes de *E. coli* sem alterar a estrutura 3D de uma proteína recombinante (GFP) após sua expressão. A escolha de um dos métodos depende do objetivo do experimento e das características da proteína recombinante, como por exemplo sua termoestabilidade.

4. Conclusão

Os resultados mostram que a exposição à 0,1% de formaldeído por 15 min. mata todas as células de *E. coli* recombinantes e praticamente não afeta a fluorescência da GFP, ao passo que a exposição da *E. coli* recombinante à 60°C por 15 min. também mata todas as *E. coli* recombinantes afetando parcialmente a fluorescência da GFP.

Os dois procedimentos agregam seguridade às atividades de manipulação genética de microrganismos e nos processos de purificação e caracterização de proteínas recombinantes.

Agradecimentos

Agradecemos as agências financiadoras CNPq, CAPES e FAPEAM pelo suporte financeiro. Agradecemos a Kerollen Runa e ao Diego da Silva Moreira por ajuda na melhoria da fotografia e na formatação desse artigo.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem



a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

- BOUZAS, T.M., BARROS-VELÁZQUEZ, J. & VILLA, T.G. Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review. **Protein & Peptide Letters**, v. 13, p. 645-651, 2006.
- CHURCH, G. M., ELOWITZ, M.B., SMOLKE, C.D., VOIGT, C.A. & WEISS, R. Realizing the potential of synthetic biology. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 289-294, 2014.
- COHEN, S. N., CHANG, A.C.Y. & HSU, L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 69, n. 8, p. 2110-2114, 1972.
- COHEN, S. N., CHANG, A.C., BOYER, H.W. & HELLING, R.B. of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, 1973.
- COSTA, G. M. Caracterização molecular do processo de inativação da toxina tetânica. *Rev. Pesq. Inov. Farm.* v. 2, n. 1, p. 03-13, 2010.
- DE LORENZO, V. Environmental biosafety in the age of Synthetic Biology: Do we really need a radical new approach?: Environmental fates of microorganisms bearing synthetic genomes could be predicted from previous data on traditionally engineered bacteria for in situ bioremediation. **BioEssays**, v. 32, n. 11, p. 926-931, 2010.
- ENDY, D. Foundations for engineering biology. **Nature**, v. 438, n. 7067, p. 449-453, 2005.
- FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: A review. **International Journal of Food Microbiology** v. 44, p. 189-204, 1998
- KELLE, A. Synthetic biology and biosecurity: From low levels of awareness to a comprehensive strategy. **EMBO Reports**, v. 10, n. SUPPL. 1, 2009.
- ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de alimentos. Componentes dos alimentos e procesos**. Ed. Artmed, Porto Alegre – RS, 2005.
- SCHMIDT, M., MITRA, A.G., TORGERSEN, ., KELLE, A., ZEMP, A.D. & BILLER-ANDORNO, N. . A priority paper for the societal and ethical aspects of synthetic biology. **Systems and Synthetic Biology**, v. 3, n. 1, p. 3-7, 2009.
- THAYSEN-ANDERSEN, M., JORGENSEN, S.B., WILHELMSSEN, E. S., PETERSEN, J.W. & HOJRUP, P. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2213-2227, 2007.
- TORRANCE, A. W. Synthesizing Law for Synthetic Biology. **Minnesota Journal of Law, Science & Technology**, v. 11, n. 2, p. 629, 2010.
- WANG, F. & ZHANG, W. Synthetic biology: Recent progress, biosafety and biosecurity concerns, and possible solutions. *Journal of Biosafety and Biosecurity*. v. 1, p. 22-30, 2019
- WRIGHT, O., STAN, G. B. & ELLIS, T. Building-in biosafety for synthetic biology. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. 7, p. 1221-1235, 2013.