

Obtenção da proteína Leucemia/Linfoma de células T 1B (TCL1B) de *Homo sapiens* por expressão heteróloga

Homo sapiens T-cell leukemia/lymphoma protein 1B (TCL1B) obtained by heterologous expression

RESUMO

Maria Laura Rudnik
marialaurarudnick@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Marcio Silva
marcios@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Sheila Boreiko Sánchez
Sheila.boreiko@gmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

A proteína Leucemia/Linfoma de células T 1B de *Homo sapiens* é ativada por translocações cromossômicas em células T imaturas, células B imaturas e virgens. Em interação com a proteína quinase B aumenta a sua atividade quinase, e em contato com células T causa leucemia. O objetivo deste trabalho é produzir a proteína TCL1B recombinante de maneira heteróloga em *Escherichia coli* e adicionalmente um modelo por homologia. No teste de expressão heterólogo, primeiramente realizou-se a transformação bacteriana por eletroporação utilizando o vetor pET-15b. Os clones obtidos com resistência ao antibiótico ampicilina foram selecionados por meio do crescimento bacteriano. Porém, não foi testada a expressão da proteína TCL1B, nesse sentido é necessária à continuação do projeto. Para a construção do modelo foi escolhida a seguinte estrutura molde, de código PDB: 1JNP, a qual apresenta 33,61% de identidade com a proteína TCL1B. O melhor modelo feito a partir do programa MODELLER apresentou DOPE igual a -1,426, sendo modificados os ângulos phi e psi do aminoácido GLU125 em comparação com outro modelo, atualizando o DOPE igual a -1,304 e o gráfico de Ramachandran gerado pelo programa PROCHECK indicou que 87.2% dos aminoácidos se encontram nas regiões mais favoráveis e 12.8% em regiões adicionalmente permitidas.

PALAVRAS-CHAVE: Estrutura. Homologia. Modelagem.

ABSTRACT

Homo sapiens t-cell leukemia / lymphoma protein is activated by chromosomal translocations in immature T cells, immature and virgin B cells. Interaction with protein kinase B increases its kinase activity, and in contact with T cells causes leukemia. The objective of this work is to produce heterologously recombinant TCL1B protein in *Escherichia coli* and additionally a homology model. In the heterologous expression test, bacterial transformation was first performed by electroporation using the pET-15b vector. Clones obtained with ampicillin resistance were selected by bacterial growth. However, the expression of the TCL1B protein was not tested, in this sense it is necessary for the continuation of the project. For the construction of the model the following PDB code structure was chosen: 1JNP, which has 33.61% identity with the TCL1B protein. The best model made with MODELLER program presented DOPE equal to -1,426, being modified the phi and psi angles of amino acid GLU125 in comparison with another model, updating the DOPE equal to -1,304 and the Ramachandran graph generated by the PROCHECK program indicated that 87.2% of amino acids are in the most favorable regions and 12.8% in the additionally permitted regions.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



KEYWORDS: Structure. Homology. Modeling.

INTRODUÇÃO

Os Genes são segmentos específicos de DNA e estão contidos nos cromossomos, eles são responsáveis por produzirem proteínas que desempenham funções típicas no corpo. Pelos genes são herdadas as características genéticas capazes de determinar as especificidades dos seres vivos.

Com 46 cromossomos, cada célula do corpo humano possui aproximadamente 25 mil genes, sendo uma grande área para pesquisas e estudos. O gene TCL1B está localizado no cromossomo 14q.32 e é ativado por translocações cromossômicas em células T imaturas, células B imaturas e virgens, que através de um padrão de splicing alternativo complexo é responsável pela proteína TCL1B. Está depositado no “*National Center for Biotechnology Information*” sob o código Gene ID: 004918.3.

A proteína Leucemia/Linfoma de células T 1B (TCL1B) de *Homo sapiens* composta por 4 éxons é considerada um potencial alvo terapêutico para doenças neoplásicas humanas. Sendo uma das principais isoformas do proto-oncogene TCL, interage com a proteína quinase B (Akt) aumentando a sua atividade quinase, e em contato com células T causa leucemia.

A maioria das leucemias e linfomas humanos possui rearranjos cromossômicos, predominantemente translocações. Esses rearranjos iniciam um processo de várias etapas que resulta em transformação maligna, embora possam também estar envolvidos na progressão do tumor. O papel das translocações cromossômicas na patogênese de leucemias e linfomas humanos foi demonstrado pela primeira vez nos estudos de linfomas de Burkitt, um alto grau de malignidade infantil de células B (PEKARSKY; HALLAS; CROCE, 2001).

Apesar de sua grande importância os estudos sobre a TCL1B são escassos, sua estrutura elucidada será significativa para estudos posteriores. O objetivo deste trabalho é o estudo teórico da proteína TCL1B por meio de um modelo por homologia e também produzir a proteína recombinante de maneira heteróloga em *Escherichia coli* BL21-DE3 visando contribuir com os estudos sobre a TCL1B.

MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência de nucleotídeos do gene TCL1B de *Homo sapiens*, está disponível no NCBI NM_004918.35.

Essa sequência foi utilizada para a definição dos parâmetros de construção do DNA recombinante e para a definição das enzimas de restrição utilizou-se a

ferramenta NEBcutter V2.0. Os parâmetros definidos foram encaminhados a empresa GenScript que sintetizou o DNA recombinante (pET15b-TCL1B).

Foram preparadas células Eletrocompetentes *E.coli* BL21 DE3 seguindo o protocolo *Molecular cloning: A laboratory manual*, para a inserção da pET15b-TCL1B por eletroporação. Primeiramente as células e o gene foram descongelados em gelo para evitar o choque térmico, em seguida em um eppendorf foram misturados 40µL de suspensão de células e 2µL de DNA. Após, foram transferidos para uma cubeta azul com capacidade para 90µL para ser feita a eletroporação, preparada a partir do manual BIO RED. Nesse processo ocorre a abertura de poros na parede celular para que o plasmídeo seja inserido nas bactérias. Após o choque elétrico é necessário a introdução de 1 ml de meio SOC rapidamente para a recuperação das células.

Foi transferido a suspensão de células para um tubo eppendorf e incubado a 37°C por 1 hora a 225 rpm. E após plaqueado em meio seletivo(LA) contendo 5µL de ampicilina(de acordo com as especificações do pET15b), foram preparados controles positivo (células eletrocompetentes em meio sem ampicilina) e negativo(células eletrocompetentes em meio com ampicilina) para controle do experimento.

Logo após o crescimento, foram selecionados alguns clones na placa para testar a expressão da TCL1B em experimento piloto, utilizando 5mL de meio LB e 1mM de IPTG.

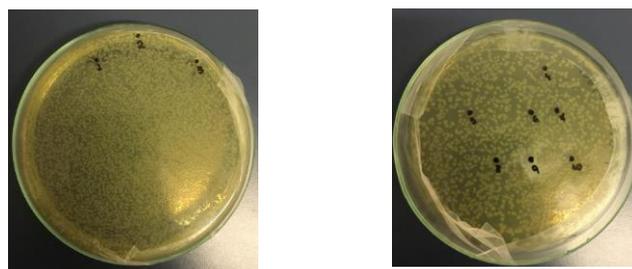
Para a construção do modelo foram selecionadas estruturas depositadas no PDB com a utilização da ferramenta BLAST para escolher um molde com maior identidade. Utilizando o programa MODELLER foram construídos 15 modelos teóricos da proteína TCL1B, para a análise de qualidade dos modelos foram utilizadas as seguintes ferramentas WHATIF e PROCHEK, após ser escolhido o melhor modelo, foram feitas algumas modificações manuais comparadas a outros modelos.

Para a validação da estrutura foi utilizada a ferramenta PDBsum.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira transformação bacteriana foram obtidos clones nas duas placas feitas, mostrando uma efetividade na eletroporação (Figura 1 e 2).

Figura 1 e 2- Meio LB seletivo (com ampicilina) contendo colônias de células *E. coli* BL21 DE3 após a eletroporação.



Fonte: autoria própria (2018).

Foram utilizados 10 clones para testar a expressão da TCL1B. Porém os experimentos foram atrasados por falta de equipamento. Isso fez com que o experimento fosse descartado antes de testar a real expressão da TCL1B.

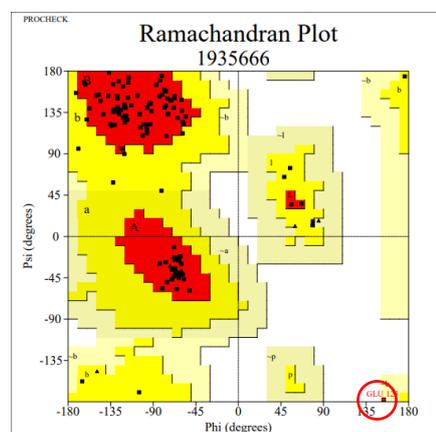
Recentemente os experimentos foram retomados com a volta do Shaker, uma nova transformação bacteriana foi feita, porém houve um crescimento no controle negativo, o que fez com que o experimento fosse novamente descartado. Diante disso, buscou-se entender quais foram as falhas durante o procedimento que levaram a esse crescimento. Chegou-se a conclusão da ineficiência da ampicilina, e o experimento foi recomeçado com uma nova ampicilina. Na terceira tentativa, ocorreu tudo como esperado, não crescendo no controle negativo, assim sendo contornado o ultimo problema. Após isso deverá ser feito o teste de expressão da TCL1B e futuramente sua estrutura cristalográfica.

Para a construção do modelo foram selecionadas estruturas depositadas no PDB com a utilização da ferramenta BLAST para escolher um molde com maior identidade.

Foi escolhida a seguinte estrutura molde, de código PDB: 1JNP, a qual apresenta 33,61% de identidade com a proteína TCL1B. 15 modelos TCL1B foram obtidos com o programa MODELLER.

O modelo escolhido apresentou DOPE normalizado igual a -1,436, no gráfico Ramachandran (Figura 3), porém indicou um aminoácido (GLU125) na região generosamente permitida.

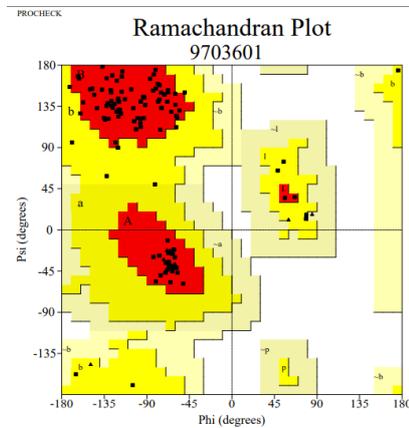
Figura 3- Gráfico de Ramachandran antes da modificação, apontando o aminoácido GLU125 na região desfavorável



Fonte: PROCHECK (2019).

Assim, foram modificados os ângulos phi e psi do aminoácido GLU125 manualmente no programa SPDB em comparação com outro modelo criado inicialmente com o MODELLER que obtinha esse aminoácido com a angulação correta segundo o gráfico de Ramachandran, atualizando o DOPE igual a -1,304 e o gráfico de Ramachandran gerado pelo programa PROCHECK indicou que 87.2% dos aminoácidos se encontram nas regiões mais favoráveis e 12.8% em regiões adicionalmente permitidas, não tendo nenhum em regiões generosamente permitidas e em regiões desfavoráveis (Figura 4).

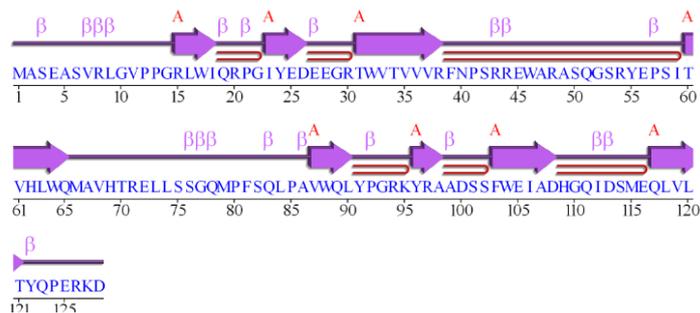
Figura 4- Gráfico de Ramachandran após a modificação, mostrando nenhum aminoácido em áreas desfavoráveis



Fonte: PROCHECK (2019).

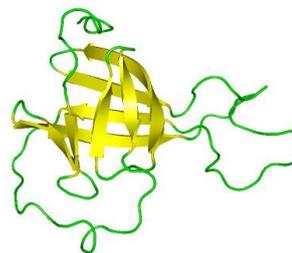
O modelo apresentado apresenta 8 fitas β , formando 2 folhas β antiparalelas e nenhuma alfa hélice (Figura 5 e 6).

Figura 5- Disposição da estrutura secundária da proteína construída.



Fonte: PDBsum (2019).

Figura 6- Modelo homólogo da proteína TCL1B.



Fonte: Autoria própria (2019).

CONCLUSÃO

Diante disso, conclui-se que há uma necessidade de continuação no projeto para a concretização da expressão da proteína TCL1B.

Com estudos estruturais escassos sobre essa proteína, o modelo homólogo construído acrescenta conhecimentos sobre a estrutura da proteína TCL1B, pois com DOPE normalizado de -1,304 é considerado um bom modelo. Com a importância desse gene, pode ser utilizado como um futuro alvo terapêutico para doenças neoplásicas humanas.

REFERÊNCIAS

U.S. Department of Energy (Org.). **Human Genome Project**. Disponível em: <http://www.ornl.gov/hgmis>. Acesso em: 08 set 2018.

PEKARSKY, Yuri; HALLAS, Cora; CROCE, Carlo M. The role of TCL1 in human T-cell leukemia. **Nature**, [S. l.], 8 out. 2001. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1204596>. Acesso em: 17 out 2018.

NCBI (Org.). **TCL1B T cell leukemia/lymphoma 1B [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=nm_004918.3. Acesso em: 08 set. 2018.

HASHIMOTO, M; SUIZU, F; TOKUYAMA, W; NOGUCHI, H; HIRATA, N; MATSUDA-LENNIKOV, M; EDAMURA, T; MASUZAWA, M; GOTOH, N; TANAKA, S; NOGUCHI, M. Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase coactivator that exhibits oncogenic potency in vivo. **Nature**, [S. l.], 16 set. 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/oncsis201330#discussion>. Acesso em: 17 out 2018.

GenScript. TCL1B cDNA ORF clone, *Homo sapiens*(human). 2010. Disponível em: <https://www.genscript.com/gene/homo-sapiens/9623/tcl1b.html#protein>. Acesso em: 8 set 2018.

APA (6th ed.) Maniatis, T., Fritsch, E., & Sambrook, J.(1982). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.

BIORAD. In: MICROPULSER electroporator. [S.l.: s.n]. Disponível em: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2751.pdf. Acesso em: 15 abr 2019.

NATIONAL SCIENCE FOUNDATION. Protein Data Bank. US, 2004. Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em: 19 set. 2018.

NCBI (Org.). Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 19 nov. 2018.