

AlgAranha

Time 2016 | iGEM USP-UNIFESP

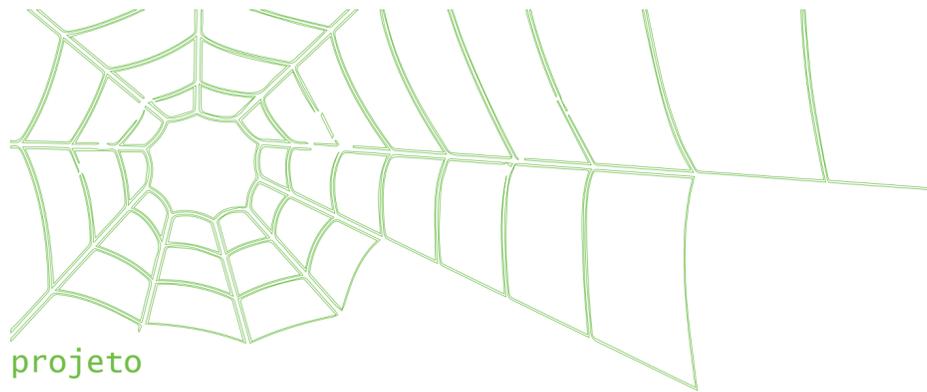
introdução

Enzimas são proteínas capazes de realizar reações químicas e são largamente utilizadas em diversas áreas da sociedade. As aplicações incluem desde processos industriais - como na produção de alimentos, biocombustíveis e tecidos - até aplicações terapêuticas mais complexas, como biofármacos (eg: Asparaginase, usado no tratamento de Leucemia Linfoblástica aguda). O mercado mundial de enzimas foi avaliado em US\$ 4,2 bilhões no ano de 2014 e o crescimento esperado é de 7% ao ano entre 2015 e 2020 (1). Enzimas são amplamente estudadas e aplicadas no mundo e diversas tecnologias são desenvolvidas visando ampliar seu espectro de aplicação. Por exemplo, a bioprospecção em extremófilos busca enzimas resistentes as mais diversas condições ambientais. Já a evolução dirigida visa adicionar ou remover características da enzima, como aumento da velocidade de reação. Outras linhas de pesquisa direcionam seus esforços em técnicas de imobilização em diferentes matrizes, buscando aumentar a estabilidade, recuperação e reciclabilidade dessas moléculas (2).

principais referências

- 01 //Salgarkar R. Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, Proteases, Non-starch Polysaccharides & Others), Application (Food & Beverage, Cleaning Agents, Animal Feed & Others), Brands & by Region - Global Trends and Forecasts to 2020 [Internet]. Markets and Markets. 2015. Recuperado de: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/industrial-enzymes.asp>
- 02 //Tran DN, Balkus Jr. KJ. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *Acs Catal* [Internet]. 2011;1(8):956-68. Recuperado de: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cs200124a#citing>
- 03 //Tokareva O, Jacobsen M, Buehler M, Wong J, Kaplan DL. Structure-function-property-design interplay in biopolymers: spider silk. *Acta Biomater* [Internet]. abril de 2014 [citado 12 de março de 2016];10(4):1612-26. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706113004121>
- 04 //Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis* [Internet]. 15 de outubro de 2007 [citado 25 de fevereiro de 2016];196(8):1237-47. Recuperado de: <http://jid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/196/8/1237>
- 05 //Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 20 de janeiro de 2009 [citado 19 de março de 2016];4(3):e4944. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004944>
- 06 //George S, K G B, A R H. Bacteriological Study of Burns Infection. *J Evol Med Dent Sci* [Internet]. 2015;4(81):14216-24. Recuperado de: http://www.jemds.com/data_pdf/2_sherin_george_GU-bhav-final.pdf
- 07 //Baoyong L, Jian Z, Denglong C, Min L. Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models. *Burns* [Internet]. setembro de 2010 [citado 19 de março de 2016];36(6):891-6. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030541790900583X>
- 08 //Mayfield SP, Franklin SE, Lerner R A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(2):438-42. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=141013&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 09 //Dove A. Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nat Biotechnol* [Internet]. agosto de 2002;20(8):777-9. Recuperado de: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nbt0802-777>
- 10 //Amer L, Adhikari B, Pellegrino J. Technoeconomic analysis of five microalgae-to-biofuels processes of varying complexity. *Bioresour Technol* [Internet]. outubro de 2011 [citado 19 de março de 2016];102(20):9350-9. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411010960>
- 11 //Recuperado de: http://www.alibaba.com/product-detail/Mulberry-raw-silk-100-pure-silk_60383157982.html?spm=a2700.7724857.29.85.zQ8LBX

A imobilização de enzimas em matrizes insolúveis possibilita aumentar a produtividade de processos industriais e reduzir custos. Além disso, permite aplicações inovadoras. A escolha da matriz varia de acordo com a aplicação e a união matriz-enzima se vale de diferentes estratégias, desde interações eletrostáticas até ligações covalentes. Nesse contexto, as teias de aranha podem ser utilizadas na imobilização de enzimas. Proteínas de teia variam em composição, estrutura e propriedade de acordo com a composição de domínios presentes em sua sequência, assim características físicas, químicas e biológicas podem ser moduladas variando os domínios empregados de acordo com a finalidade desejada (eg: aumentar a resistência a tensão ou a elasticidade) (3). Esse polímero possui naturalmente boas características em termos de elasticidade, tensão, adesão, resiliência, biocompatibilidade e baixa degradação, todas propriedades interessantes para uma matriz de imobilização (3).



projeto

O projeto consiste na produção de proteínas de teia de aranha para a imobilização de enzimas - como endolisinas - em um polímero proteico similar a uma seda, expresso em microalgas recombinantes. Endolisinas é um grupo de enzimas capaz de combater bactérias resistentes à antibióticos, como MRSA, VRSA e VISA (4), problemas graves e recorrentes em hospitais. Terapias baseadas em fagos estão sendo avaliadas como opção terapêutica, como o teste clínico que está sendo realizado na Bélgica (5). A principal molécula ativa - endolisina - vem sendo estudada como uma nova classe de agentes antimicrobianos capazes de provocar a morte de bactérias por ruptura da parede celular (4). Vários estudos demonstram o seu potencial terapêutico em modelos de infecções em animais e não têm sido reportado efeitos adversos. Entre as endolisinas estudadas temos a chamada MV-L que mostrou-se ativa contra *Staphylococcus aureus* - um dos principais patógenos presentes em infecções (6) - incluindo suas linhagens resistentes à antibióticos. Essas enzimas têm o potencial de aplicação em queimaduras, onde há susceptibilidade à colonização de microrganismos oportunistas (5). Associadas às teias, sua ação antimicrobiana poderá atuar sinergicamente com a atividade nativa de teias nos processos de regeneração celular da pele (7).

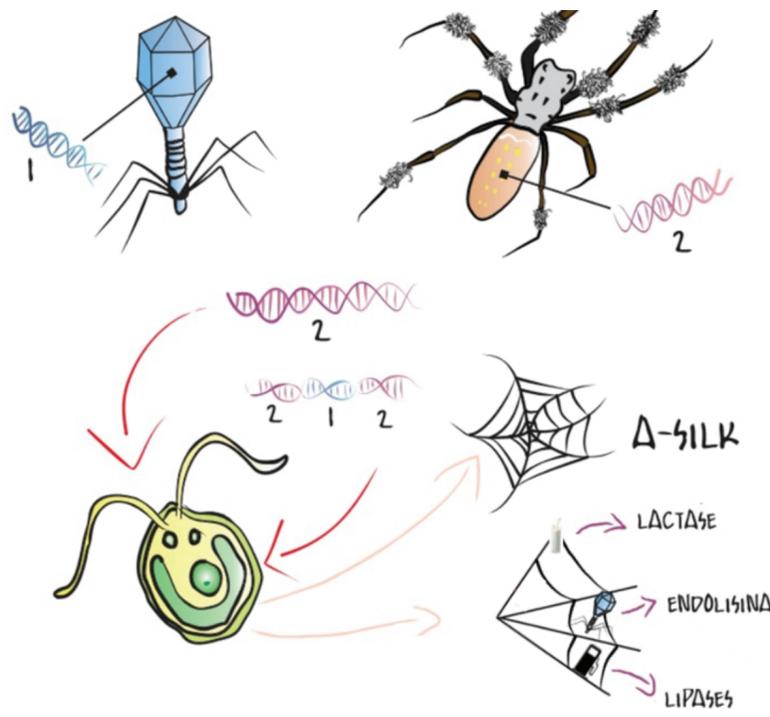


figura 01. Esquema das construções gênicas a serem inseridas e expressas em microalga. A microalga transformada irá conter genes que codificam proteínas de seda, produzindo-as sem associação com endolisinas. Será também transformada com uma sequência de DNA híbrida formada por genes de proteínas de teia e genes de endolisinas. 1: sequências gênicas codificadoras de endolisinas provenientes de bacteriófagos. 2: sequências gênicas codificadoras de proteínas de seda provenientes de aranhas.

funcionamento do sistema //plataforma e construção gênica

O microrganismo que será utilizado no projeto é a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, organismo modelo em recombinação gênica e com alto conteúdo CG (Citosina e Guanina) em seu genoma, característica favorável à expressão das proteínas de teia de aranha que possuem alto conteúdo CG (~80%). Além disso, é possível obter produtos finais a preços competitivos, visto que o custo médio estimado de seu cultivo é de US\$0,002 por litro (8), comparado aos US\$0,005 para plantas e US\$150 para células de mamíferos (9). Em adição, temos a possibilidade de secreção das moléculas desejadas para o meio extracelular, facilitando o processo de captura e purificação de proteínas alvo. Entre outras vantagens associadas à aplicação de microalgas na produção de proteínas recombinantes, temos a facilidade na obtenção de linhagens transgênicas estáveis, escalonabilidade e ausência de contaminações por agentes patogênicos durante seu cultivo. São também intituladas “GRAS” (Generally recognized as safe) (8).

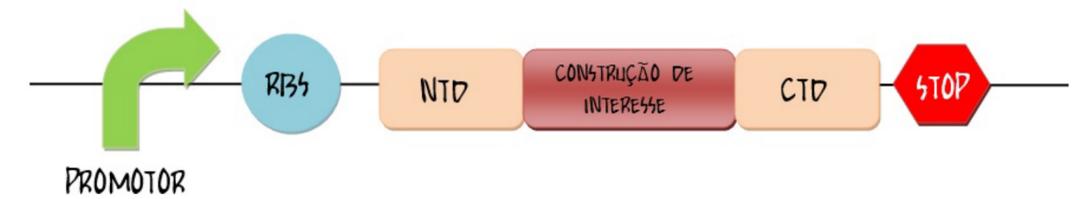


figura 02. Esquema da sequência híbrida de DNA a ser inserida na microalga. Promotor: iniciador do processo de transcrição. RBS (“ribossomal binding site”): região de ligação de ribossomos necessários ao processo de tradução. NTD (“N-terminal domain”): sequência codificante da região N-terminal proteica. Construção de interesse: genes a serem inseridos na região central da sequência codificante de proteínas de seda, como de endolisinas. CTD: (“C-terminal domain”): sequência codificante da região C-terminal proteica. STOP: códon de parada de tradução.

//problemas a serem resolvidos

O principal desafio científico a ser enfrentado pelo projeto é a expressão de proteínas com alto conteúdo de repetições nucleotídicas de citosina e guanina. Alguns sistemas de expressão heterólogos - como *Escherichia coli* - apresentaram dificuldades em sua expressão, porém a habilidade de lidar com esse tipo de sequência torna a *Chlamydomonas reinhardtii* uma possível solução. Além disso, o escalonamento e custo final do produto são fatores importantes considerando os possíveis produtos a serem desenvolvidos a partir desse projeto, como as endolisinas imobilizadas em seda para a aplicação em queimaduras. Pois, produtos de aplicações médicas possuem altos valores finais aumentando as chances de alcançar a sustentabilidade econômica do projeto. Outras aplicações terão valores finais menos favoráveis porém apresentam volume de mercado muito superiores, tornando um sistema barato e escalonável como microalgas essencial novamente. Aplicações para a indústria de biocombustíveis (US\$ 1,5 trilhões) e a própria indústria têxtil de sedas são bons exemplos. Nesse caso, o desafio consiste em conseguir alta produtividade dessas proteínas para atingir valores competitivos. A estratégia de iniciar com um produto de maior valor agregado permite testar a viabilidade do processo e estimar com maior embasamento a aplicação para outros mercados. Uma estimativa do custo de produção da grama da proteína de teia expressa em microalgas alcançou valores de US\$ 0,07-0,35 em diferentes modelos de fotobioreatores. Essa estimativa foi baseada em uma análise tecno-econômica de sistemas de produção de microalgas (10) e em valores médios de produção de proteínas nesse sistema, sem considerar etapas de captura da proteína. Para colocar em perspectiva, a grama da seda crua custa na ordem de US\$ 0,04-0,06/grama (11). Em resumo, pretendemos desenvolver um sistema personalizável para imobilização de proteínas de interesse em teia de aranha recombinante com propriedades moduláveis às aplicações desejadas. Utilizando um sistema de expressão de proteínas heterólogas ideal para a complexidade das proteínas de teia, além de barato, escalonável e com alto potencial de otimização.

Sabemos que as fibras de teias são polímeros proteicos e que para serem polimerizadas necessitam de domínios N e C terminais intactos, embora a região central possa apresentar sequências alternativas àquelas encontradas em suas formas nativas, permitindo construções gênicas conforme a aplicação desejada. Nesse projeto optamos por colocar a endolisina na região central como um modelo dessa plataforma de imobilização de enzimas, cujo objetivo é desenvolver um curativo biossintético com propriedades antimicrobianas para aplicação em pacientes queimados. Contudo, outras proteínas podem ser imobilizadas nesse sistema e aplicadas industrialmente como: lactase com potencial para indústria de alimentos para degradação seletiva de lactose no leite; lipases com aplicações na indústria de alimentos e biocombustível; domínios funcionais para processos de purificação como o domínio de ligação de albumina (ABD), de avidina (AvBD) e de imunoglobulina G (ImGBD).