

## EXPRESSÃO E OTIMIZAÇÃO DE VLPS (*VIRUS LIKE PARTICLES*) EM DIFERENTES CEPAS DE *Escherichia coli*

RAFFAELA DE HOLLEBEN CAMOZZATO BENETTI<sup>1</sup>; YASMIN BRAGA FARIA<sup>2</sup>;  
PEDRO LOPES REISSER<sup>3</sup>; ANA VITÓRIA COSTA<sup>4</sup>; VANESSA GALLI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [raffaela.cbenetti@gmail.com](mailto:raffaela.cbenetti@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [yasminbragafar@gmail.com](mailto:yasminbragafar@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [reisser.pedro@gmail.com](mailto:reisser.pedro@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [anavitoriacost4@gmail.com](mailto:anavitoriacost4@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [vane.galli@yahoo.com.br](mailto:vane.galli@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

As Partículas semelhantes a vírus (VLPs - *Virus Like Particles*) são estruturas proteicas não-infeciosas formadas a partir da interação espontânea entre proteínas estruturais virais, assemelhando-se morfológicamente aos vírus. Porém, não apresentam material genético viral, o que as torna incapazes de se replicar (NOORAEI et al., 2021).

A utilização de VLPs têm emergido como uma abordagem promissora para diversas aplicações, como o desenvolvimento de vacinas, terapias gênicas e dispersão de antígenos (WIJESUNDARA et al., 2022). As VLPs são capazes de penetrar a célula, mediando a passagem de compostos pela membrana para o espaço intracelular, o que as torna um dispositivo ideal para entrega de fármacos e genes (HE et al., 2022). Assim, uma de suas principais aplicações está na área da vacinologia, devido à sua estrutura altamente organizada e sua capacidade de imitar padrões estruturais patogênicos, o que facilita o reconhecimento pelo sistema imunológico e promove a indução a respostas imunes sem o risco de replicação viral, oferecendo segurança adicional especialmente para indivíduos imunocomprometidos (TARIQ et al., 2022). Apesar disso, de acordo com a revisão sistemática realizada por PIRES (2023), a aplicação de VLPs na área vegetal não tem sido muito explorada. Considerando a sua capacidade de automontagem, encapsulação de materiais exógenos, proteção contra degradações e transporte direcionado de materiais, as VLPs se tornam uma alternativa promissora para a entrega de material genético e agroquímicos por spray em plantas.

VLPs podem ser formadas a partir da síntese de proteínas estruturais virais *in vitro*. Isso envolve o uso de um sistema de expressão heterólogo, sendo a bactéria *Escherichia coli* uma das mais comumente usadas para VLPs não envelopadas (NOORAEI et al., 2021). Esta bactéria é um modelo de pesquisa de baixo custo que garante uma taxa de crescimento rápida e alto rendimento, além de possuir diferentes cepas que se adequam a aplicações específicas de acordo com suas características genéticas, como a BL21(DE3), BL21 STAR, BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE e Rosetta, usadas para expressão de proteínas heterólogas (HAYAT et al., 2018).

Desta forma, o presente trabalho busca analisar qual das cepas de expressão proteica de *Escherichia coli* apresenta um maior potencial para expressão heteróloga de VLPs, buscando otimizar a sua síntese.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Transformação bacteriana

Inicialmente, foi realizada uma transformação bacteriana por choque térmico nas cinco cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21 STAR, BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE e Rosetta, conforme o protocolo de SAMBROOKE; RUSSE (2001), na qual se inoculou separadamente 50 µL de cloreto de cálcio 100 mM com três colônias previamente estriadas de cada cepa, acrescidos de 5 µL de plasmídeo purificado contendo a sequência codificadora do capsídeo viral MS2 acrescido da calda de histidina (plasmídeo MS2). Este plasmídeo encontra-se depositado no repositório da Addgene ([www.addgene.org](http://www.addgene.org)) sob o número 179156.

Para a confirmação da presença do plasmídeo de interesse (MS2) em cada cepa, foi realizada uma lise alcalina seguida de eletroforese em gel de agarose 1%.

## 2.2 Expressão e caracterização de VLPs

Cada cepa de *E. coli* transformada foi inoculada em 100 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido e incubada a 37 °C até atingir a densidade ótica (DO<sub>600</sub>) de 0,6. As cepas BL21(DE3) e BL21 STAR foram inoculadas com o antibiótico Canamicina 50 µg/mL e a BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE e Rosetta com Canamicina 50 µg/mL e Cloranfenicol 25 µg/mL. As amostras foram induzidas com 1 µM de IPTG (Isopropil-β-D-Tiogalactopiranosídeo) e incubadas por 16 horas a 25 °C. Cada volume foi transferido para um Falcon de 50 mL e centrifugado por 10 minutos a 6000 x g até a formação de um pellet bacteriano. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuspensos em 10 mL de tampão de lavagem (200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8,0). Então, foi realizada uma lise celular na qual se adicionou 1 µL de lizozima às amostras, que foram incubadas por 1 hora a 37 °C e, posteriormente, submetidas ao processo de sonicação em banho de gelo por 6 vezes com amplitude de 60° 20s “ON” 20s “OFF”.

A caracterização da expressão proteica das amostras foi realizada pela técnica de SDS-PAGE 12%. As proteínas foram separadas com base no seu peso molecular, e as bandas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie. Para o teste foram usadas amostras de cepas não transformadas e de cepas contendo o plasmídeo MS2, para comparação. Em seguida, foi realizado um *Western Blot*.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme observado na Figura 1, que representa um SDS-PAGE 12%, houve expressão de proteínas tanto nas cepas contendo o plasmídeo MS2 quanto em cepas não transformadas. Porém, os resultados obtidos não foram satisfatórios devido à baixa visualização da banda de ~28 kDa da proteína de interesse (VLPs), não sendo possível distingui-la de forma clara devido a sua similaridade com outras proteínas não-específicas. Ainda assim, é possível ver a banda nas cepas BL21(DE3)pLysS+MS2 e Rosetta+MS2, indicando que houve expressão de VLPs.

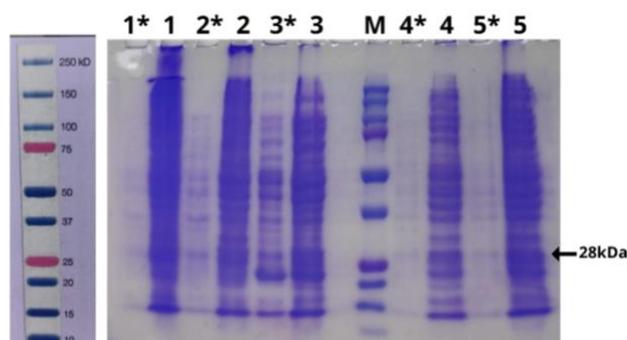


Figura 1. SDS-Page 12%. 1\*, BL21(DE3) não transformada; 1, BL21(DE3) + MS2; 2\*, BL21 STAR não transformada; 2, BL21 STAR + MS2; 3\*, Rosetta não transformada; 3, Rosetta + MS2; M, marcador de peso molecular; 4\*, BL21(DE3)pLysS não transformada; 4, BL21(DE3)pLysS + MS2; 5\*, BL21(DE3)pLysE não transformada; 5, BL21(DE3)pLysE + MS2.

Procurando se obter resultados mais específicos, foi realizado o teste de *Western blot*. Através desta técnica foi possível identificar as bandas de aproximadamente 28 kDa, correspondentes à proteína de interesse (VLPs), de maneira satisfatória em três das amostras: BL21(DE3), BL21 STAR e Rosetta (Figura 2).

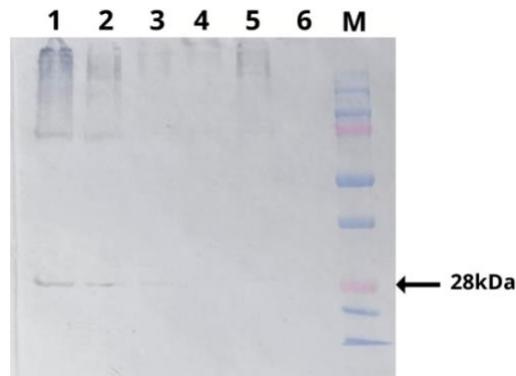


Figura 2. Caracterização da expressão de VLPs por *Western blot*. 1, BL21(DE3); 2, BL21 STAR; 3, Rosetta; 4, BL21(DE3)pLysS; 5, BL21(DE3)pLysE; 6, *E. coli* não transformada; M, marcador de peso molecular.

A intensidade da banda foi visivelmente maior na amostra de BL21(DE3), indicando uma maior aptidão para expressão de VLPs, também descrito na literatura por WIJESUNDARA et al. (2022) e HASHEMI et al. (2021), que analisam o uso dessa cepa para otimização da síntese de VLPs MS2. Uma banda pouco visível também foi identificada na cepa BL21(DE3)pLysE, indicando que houve expressão, mas de maneira consideravelmente inferior às outras.

Em CRONE; FREEMONT (2022), é descrito o uso da cepa Rosetta2(DE3) pLysS para a produção de VLPs MS2 de forma simples; por isso, buscou-se avaliar os resultados da Rosetta e da BL21(DE3)pLysS para esse mesmo fim. Os resultados obtidos com a Rosetta indicaram uma boa capacidade de expressão, sendo possível visualizar a banda de interesse no *Western Blot*, enquanto os da BL21(DE3)pLysS não foram satisfatórios, não sendo possível visualizar de forma clara a banda de 28kDa, indicando pouca ou nenhuma expressão das partículas proteicas.

#### 4. CONCLUSÕES

Cada cepa de *Escherichia coli* utilizada para expressão proteica heteróloga neste trabalho apresentou resultados distintos, indicando diferenças na síntese de VLPs. Com base nos resultados obtidos pela técnica de *Western Blot* e evidenciados pela literatura, conclui-se que a cepa BL21(DE3) apresenta maior aptidão para expressão de VLPs, podendo ser usada para otimizar esse processo. Ainda assim, outras cepas como a BL21 STAR e a Rosetta também apresentaram resultados satisfatórios.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRONE, M. A.; FREEMONT, P. S. Simple Low-Cost Production of DNA MS2 Virus-Like Particles As Molecular Diagnostic Controls. **GEN biotechnology**, v. 1, n. 6, p. 496-503, 2022.

HASHEMI, K.; SENO, M. M. G.; AHMADIAN, M. R.; MALAEKEH-NIKOUEI, B.; BASSAMI, M. R.; DEGHANI, H.; AFKHAMI-GOLI, A. Optimizing the synthesis and purification of MS2 virus-like particles. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 19851, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98706-1>

HAYAT, S.M.G.; FARAHAANI, N.; GOLICHENARI, B.; SAHEBKAR, A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. **Current Pharmaceutical Design**, v.4, n.6, p.718-725, 2018. DOI: 10.2174/1381612824666180131121940.

HE, J.; YU, L.; LIN, X.; LIU, X.; ZHANG, Y.; YANG, F.; DENG, W. **Virus-like Particles as Nanocarriers for Intracellular Delivery of Biomolecules and Compounds**. *Viruses*, v. 14, n. 9, p. 1905, 2022. DOI: 10.3390/v14091905.

NOORAEI, S.; BAHRULOLUM, H.; HOSEINI, Z.S.; KATALANI, C.; HAJIZADE, A.; EASTON, A.J. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. **Journal of Nanobiotechnology**, v.19, p.59, 2021. DOI: 10.1186/s12951-021-00806-7.

PIRES, R. A. **Uso de partículas semelhantes a vírus para a entrega de RNAs: uma revisão sistemática**. 2023. 44f. TCC (Graduação em Biotecnologia) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Universidade Federal de Pelotas. Disponível em: <https://pergamum.ufpel.edu.br/pergamumweb/vinculos/0000f0/0000f0c0.pdf>.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

TARIQ, H.; BATOOL, S.; ASIF, S.; ALI, M.; ABBASI, B.H. Virus-like particles: revolutionary platforms for developing vaccines against emerging infectious diseases. **Frontiers in Microbiology**, v.12, p.790121, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2021.790121.

WIJESUNDARA, Y.H.; HERBERT, F.C.; KUMARI, S.; HOWLETT, T.; KOIRALA, S.; TRASHI, O.; TRASHI, I.; AL-KHARJI, N.M.; GASSENSMITH, J.J. Rip it, stitch it, click it: a chemist's guide to VLP manipulation. **Virology**, v.577, p.105-123, 2022. DOI: 10.1016/j.virol.2022.10.008.