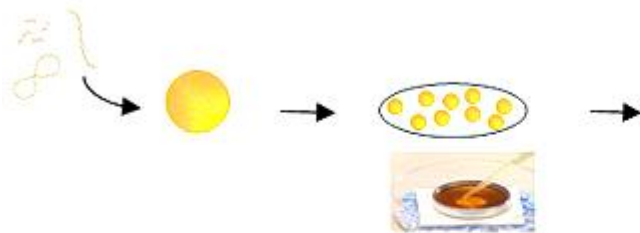


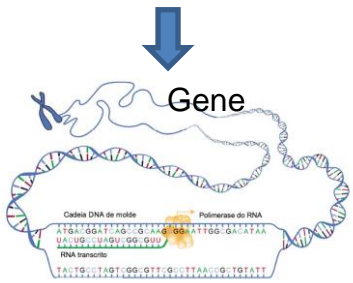
Métodos de transformação genética para expressão transiente de proteínas

Aula teórico-prática

Novembro 2022
smserrazina@fc.ul.pt



Organismo

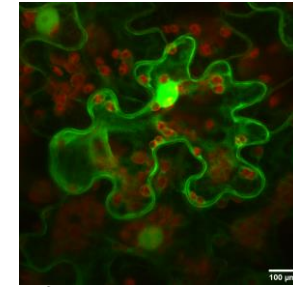


plasmídeo



Métodos de transformação genética

Expressão e detecção da proteína repórter



Serrazina S., Malhó R. et al. (2021), Front. Plant Sci. 12:628697

Epiderme folha *Nicotiana benthamiana*: GFP

Expressão transiente: de curta duração, não é relevante passar à descendência. O material genético introduzido pode estar bem integrado no ADN ou não. Tem que haver um gene repórter associado ao gene de interesse para seguimento.

Expressão definitiva ou estável: inserção do material genético introduzido no ADN genómico. Tem que haver um gene de seleção (resistência a antibiótico/herbicida) e tem que se aplicar métodos de seleção para isolar o tecido transformado.

cultura *in vitro* de *Nicotiana tabacum* em condições seletivas



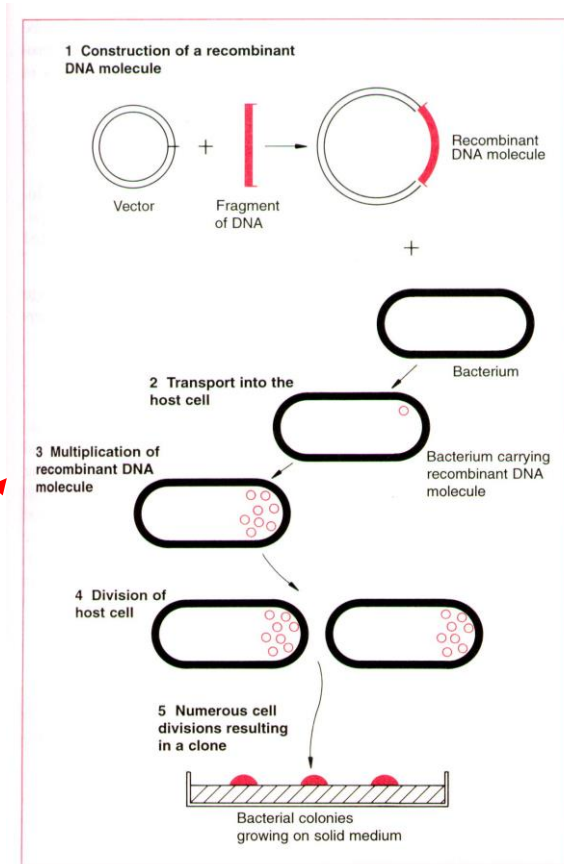
Análises moleculares



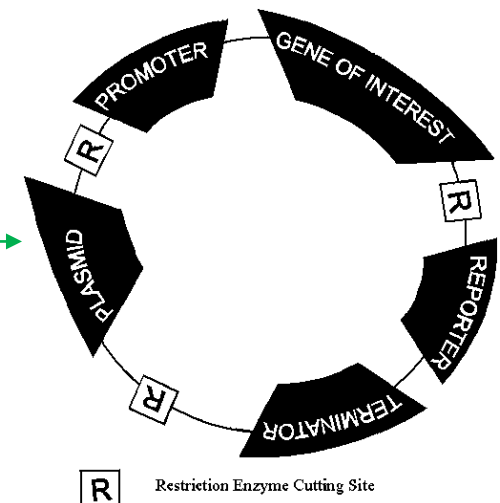
Gene – Proteína de Interesse: GDI, PDI

Isolamento a partir do ADN, ARN (ex.º PCR) – muitas cópias do GDI

Clonagem: inserção do GDI em **plasmídeo bacteriano** e em *E. coli* – muitas cópias do plasmídeo e stock para armazenamento



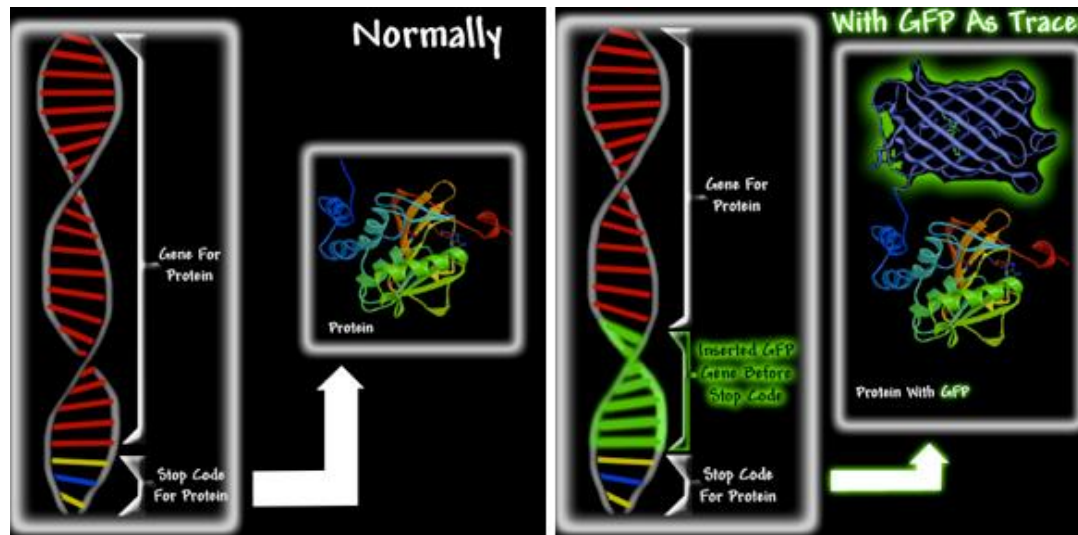
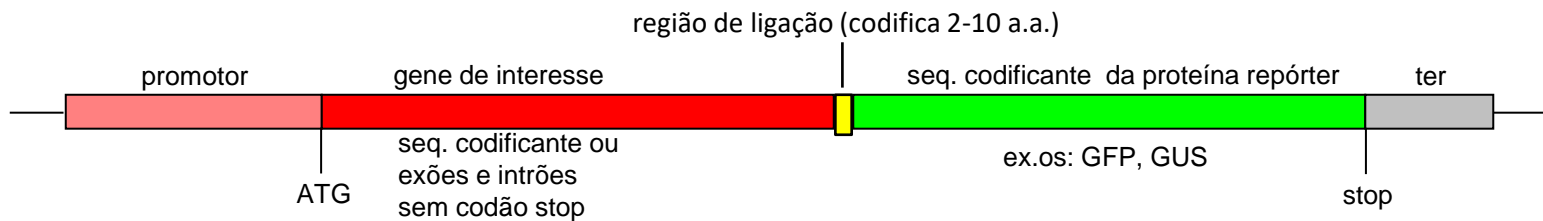
GDI no plasm. bac. ou plasm. de clonagem: transferência para **vector de transformação genética**, numa cassete de expressão



Construção da **cassete de expressão**

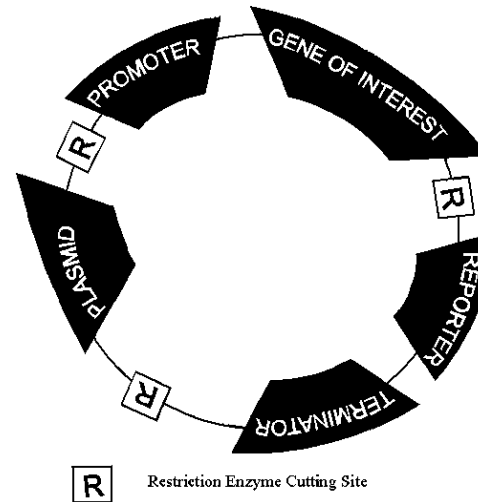
GDI no plasmídeo de clonagem \Rightarrow isolamento do plasmídeo (mini-prep) \Rightarrow uso de enzimas de restrição + ligases \Rightarrow transferência do GDI para **vector de transformação**

Requisitos: GDI *in frame* com gene da proteína repórter – **Proteína de fusão**
 \Rightarrow localização sub-celular de proteínas através de **co-localização com a proteína repórter**;
tráfego da proteína; interacção proteína-proteína; **caracterização, função.**



Cassete de expressão no vector de transformação → inserção em *E. coli* → muitas cópias

→ isolamento do vetor (mini/midi-prep)



Inserção do vector no agente de transformação **Agrobacterium**
→ **infiltração de folhas de *Nicotiana benthamiana***

Ou

Inserção directa do vector em tecido/células por **Biolística**

Métodos de
transformação
genética

Proteína repórter

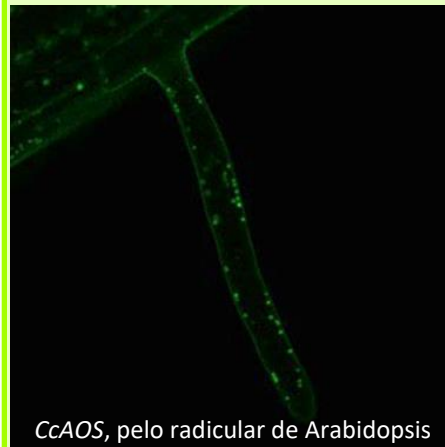
fácil detecção (expressão forte)
não presente no organismo em estudo



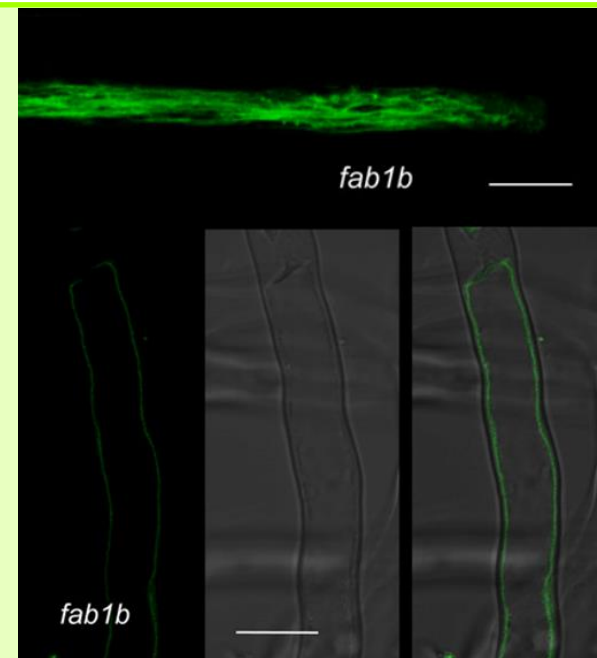
Flor (A) e pólen (B) de *Arabidopsis*. Sousa E., Malhó R. (2008). *The Plant Cell*, 20: 3050–3064.

- detecção de **GUS (β -glucuronidase)**
- Gene de *E. coli*
- localização *in situ*, após teste histoquímico
- detecção destrutiva
- muito usada em **estudos de promotores.**

- detecção de **GFP (green fluorescent protein)**
- Gene do cnidário *Aequorea victoria* e modificado
- localização *in vivo* por fluorescência (ex: azul; em: verde)
- detecção progressiva em tempo real
- muito usada em **detecção subcelular.**



CcAOS, pelo radicular de *Arabidopsis*



Tubo polínico de tabaco. Serrazina S., Malhó R. (2014). *New Phytologist*, 203(3): 784-793.

Serrazina S., Malhó R. et al. (2021), *Front. Plant Sci.* 12:628697

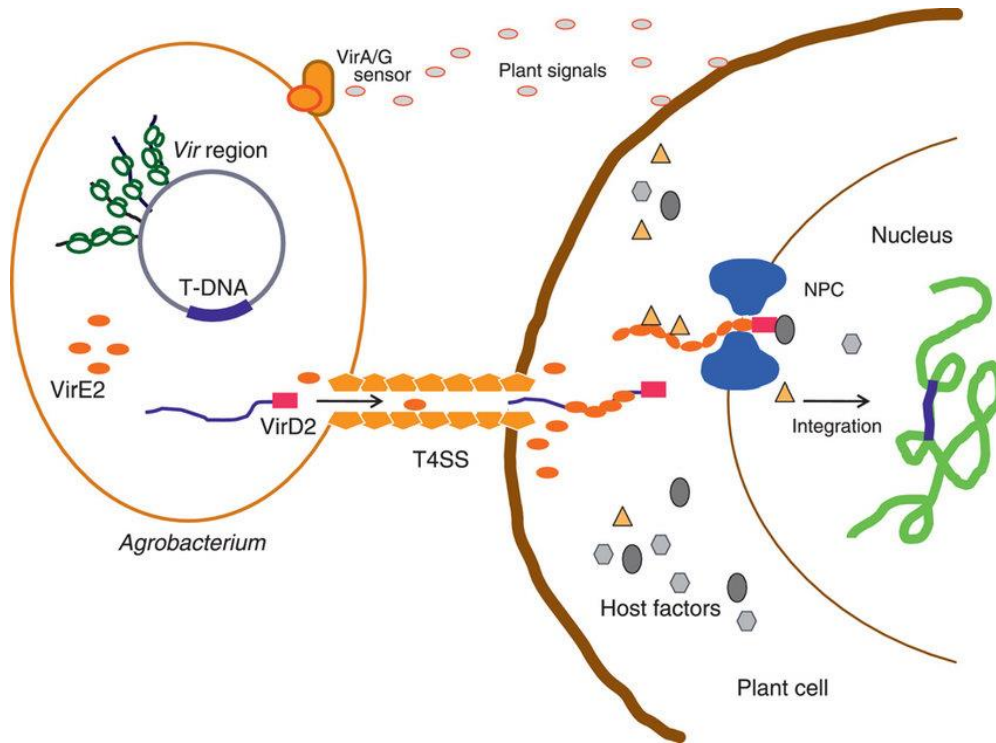
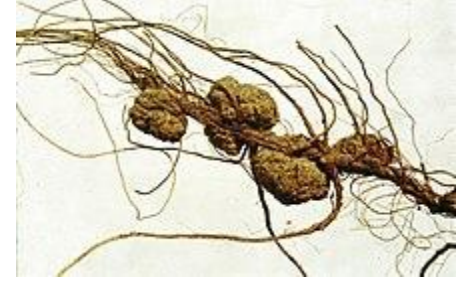
CcAOS, cloroplastos, folha *N. benthamiana*



6 μ m

Agrobacterium: bactérias Gram-negativas

A. *tumefaciens* pode transferir parte do DNA (T-DNA) do plasmídeo Ti (tumor-inducing) para plantas



T-DNA em wild-type:

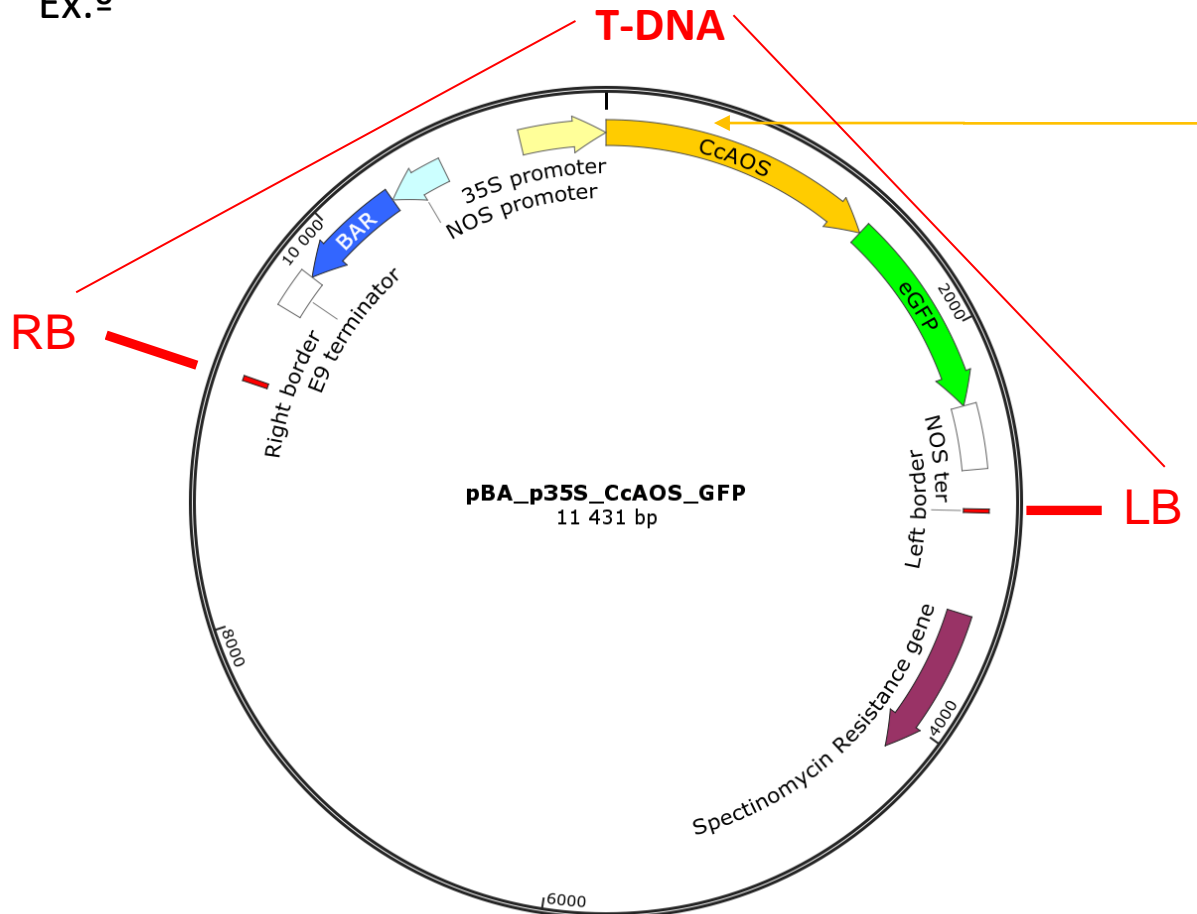
Enzimas para a produção dos A.A. octopina e nopalina, fontes de C e N para a bact.

Hormonas vegetais: auxinas e citocininas → desregulação hormonal → tumor

Agrobacterium geneticamente modificado - ferramenta de Eng.^a Genética

Plasmídeo Ti: deleção dos genes do T-DNA em wild-type; ficam as extremidades LB e a RB; inserção de **cassetes de expressão** promotor - gene repórter e promotor – gene de selecção → **vector de transformação**

Ex.º

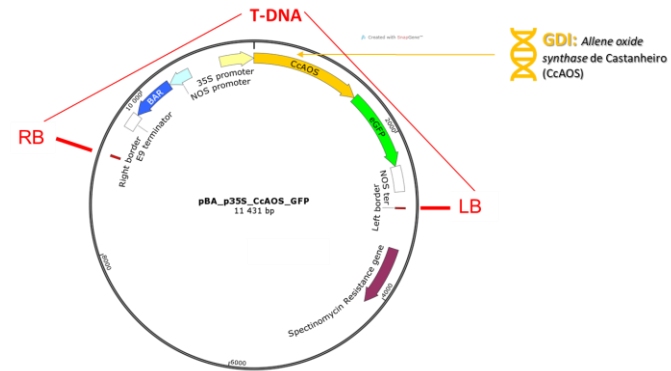


 **GDI:** *Allene oxide synthase* de Castanheiro (CcAOS)

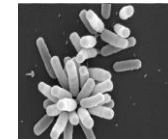
Promotores 35S e Nos: constitutivos.

Gene BAR: resistência ao herbicida Bialaphos, precursor do glufosinato.

Vector de transformação



Introdução em *Agrobacterium* estirpe GV3101



Agroinfiltração em folhas de *Nicotiana benthamiana*

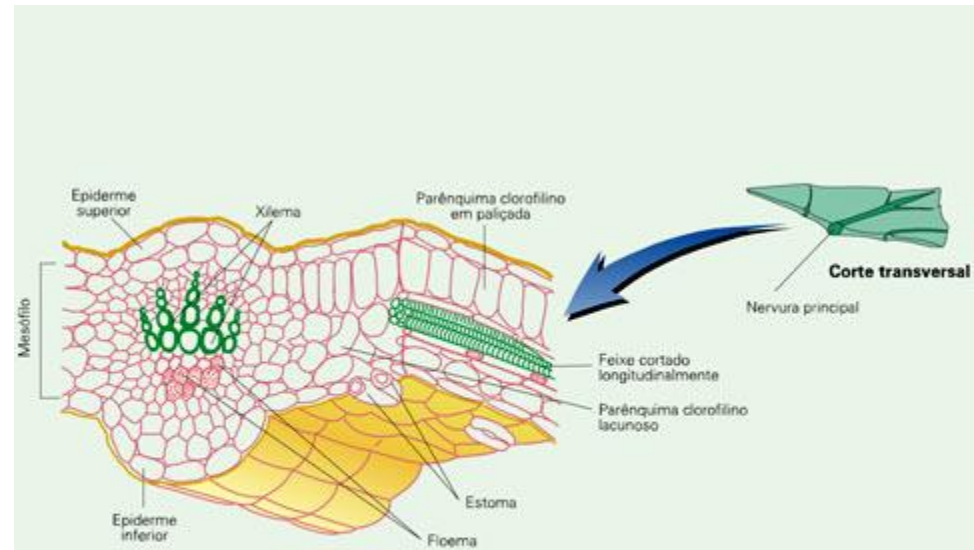


Agroinfiltração

Uma suspensão de *Agrobacterium* com acetoseringona é injectada no interior do tecido foliar, na página abaxial, passa através dos estomas para o parênquima lacunoso. A bactéria fica nos espaços intercelulares e transfere a cassette de expressão no T-DNA para as células da planta.

Verificação da expressão da PDI: 2 a 4 dias d.a.i.

Vantagem: rapidez.



Acetoseringona: promotor da transferência do T-DNA. Composto fenólico secretado por plantas dicotiledóneas em locais de ferida. Envolvimento no reconhecimento da planta pelo *Agrobacterium*. Adicionada juntamente com a bact. em técnicas de transformação, confere mais virulência → aumenta a taxa de transformação (e de expressão da PDI).

Uso da Agroinfiltração em “Pharming”: as plantas como produtoras de proteínas recombinantes usadas como fármacos



Table 1 Examples of plant derived biopharmaceuticals (antibodies, vaccine antigens and enzymes) included in clinical trials or approved for therapeutic use

Product	Disease	Plant/expression system	Clinical trial stage	Company/Consortium	URL	References
Antibodies						
Chimeric mAb (CaroRX)	Dental caries	Tobacco/ stable transformation	Phase 2	Planet Biotechnology	http://www.planetbiotechnology.com	(Weintraub et al. 2005)
Idiotypic IgG Based vaccine	Non-Hodgkin's lymphoma	<i>N. benthamiana</i> / Agroinfiltration	Phase 1	Icon Genetics		(Tusé et al. 2015)
Anti-HIV IgG	Prevention of HIV infection	Tobacco/ stable transformation	Phase 1	Pharma- Planta Consortium	http://www.pharma-planta.net	(Ma et al. 2015)
Anti-Ebola IgG cocktail (ZMAp IgG (ICAM1))	Treatment of Ebola virus infection	<i>N. benthamiana</i> / Agroinfiltration	Phase 2/3	Mapp Biopharmaceutical	http://mappbio.com	(PREVAIL II Writing Group et al. 2016)
	Common cold	Tobacco/ stable transformation	Phase 1	Planet Biotechnology	http://www.planetbiotechnology.com	–
Radiolabeled anti-Ep-CAM IgG	Cancer treatment	Maize/ stable transformation	Phase 2	<i>NeoRx Corporation</i>	–	(Gavilondo and Larrick 2000)
Vaccine antigens						
VLP-based Vaccine	Seasonal flu	<i>N. benthamiana</i> / Agroinfiltration	Phase 3	Medicago	http://medicago.com	(Pillet et al. 2016)
VLP-based vaccine (H5N1)	Pandemic flu	<i>N. benthamiana</i> / Agroinfiltration	Phase 2	Medicago	http://medicago.com	(Hendin et al. 2017)
Enzymes						
Glucocerebrosidase enzyme (ELELYSO)	Therapy of Gaucher's disease	Carrot/cell suspension culture	FDA Approved	Protalix Biotherapeutics	http://www.protalix.com	(Mor 2015)
Alpha-galactosidase-A (Fabrazyme)	Therapy of Fabry disease	Tobacco/cell suspension culture	Phase 2	Protalix Biotherapeutics	http://www.protalix.com	(Kizhner et al. 2015)
Alpha-galactosidase-A (moss-aGal)	Therapy of Fabry disease	Moss cultures	Phase 1	Greenovation Biopharmaceuticals	http://www.greenovation.com	(Shen et al. 2016)
Human deoxyribonuclease I (Alidornase alfa)	Treatment of cystic fibrosis	Tobacco/cell suspension culture	Phase 2	Protalix Biotherapeutics	http://www.protalix.com	–

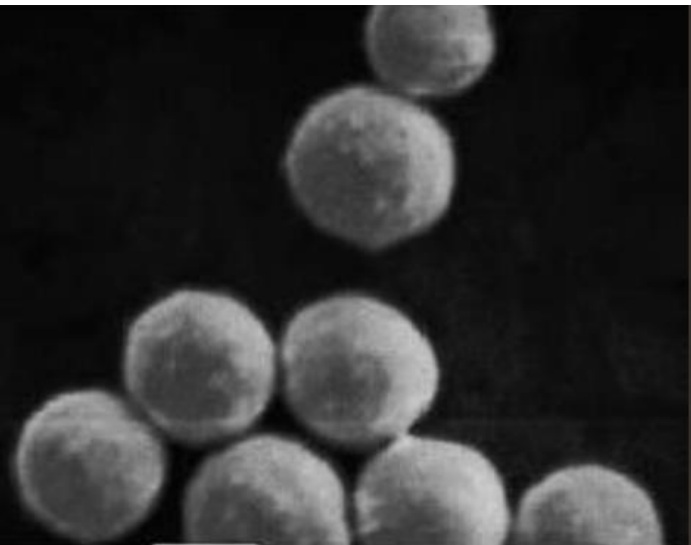
Biolística

Técnica desenvolvida nos anos 80 do séc. XX (EUA)

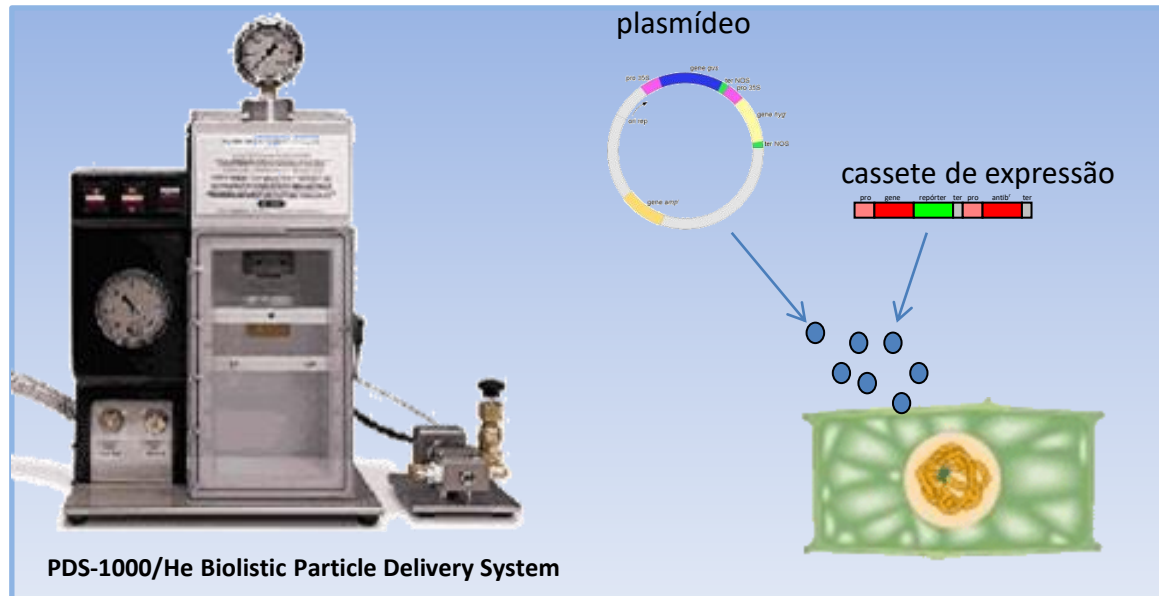
Objetivo: melhoramento de arroz (monocotiledónea), resistência a insectos, salinidade e seca

Inserção directa de material genético em células através da cobertura de micropartículas (Au, W) e bombardeamento direccionado das células/tecido.

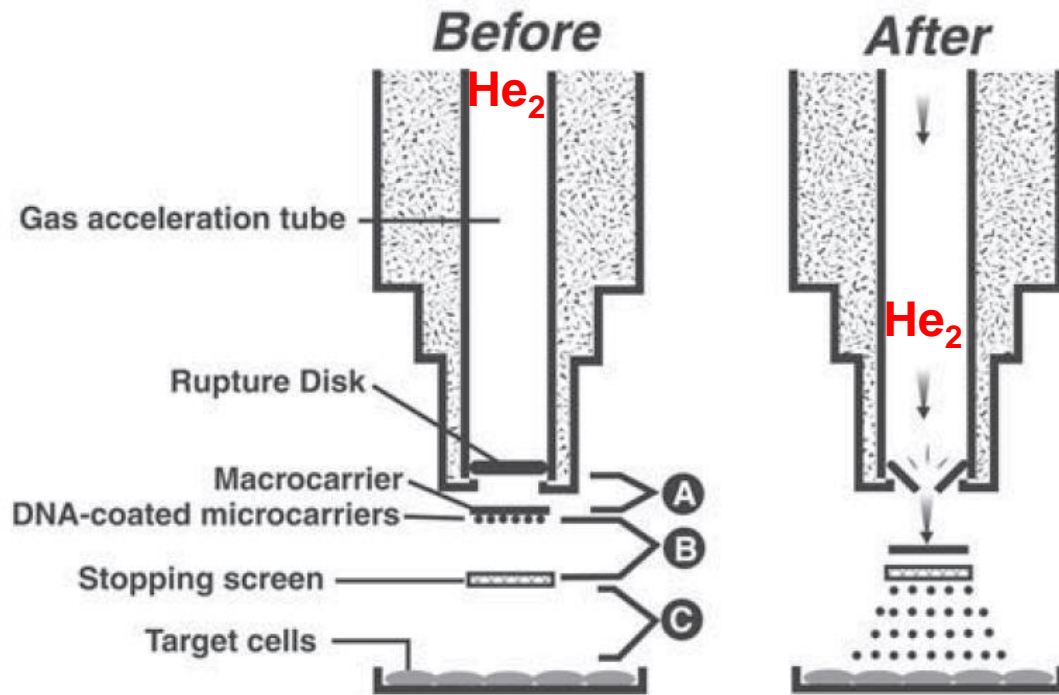
Material genético: **vector de transformação** ou só **cassete de expressão** (ex^o promotor-GDI-GRep-ter)



Microscopic nucleic acid-coated gold particles.



PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System



Gás hélio pressurizado - inerte

Células/tecidos em vácuo

Partículas revestidas ao entrar e sair da célula deixam o material genético → ressuspensão no interior da célula (nucleoplasma, citosol...)

Integração ao acaso no gDNA

Expressão da PDI a partir de 1 dia após o bombardeamento.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Ex^o: células neuronais de rato

Optimized heterologous transfection of viable adult organotypic brain slices using an enhanced gene gun

Jason Arsenault and John A O'Brien*

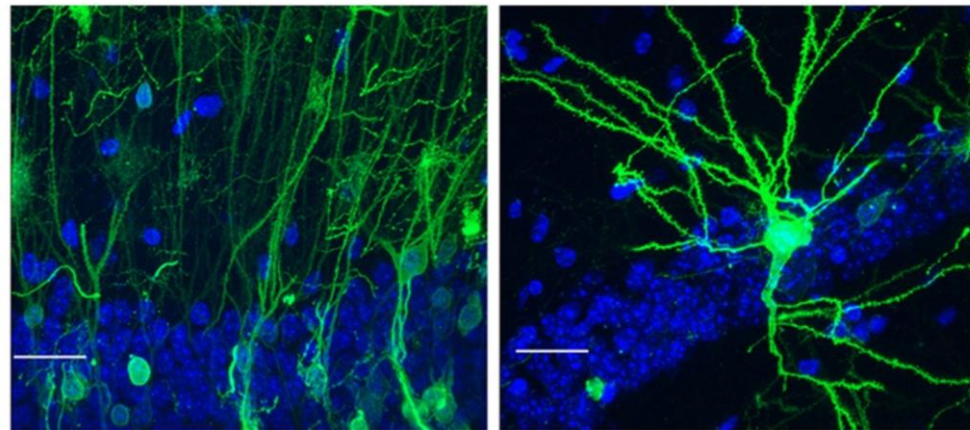
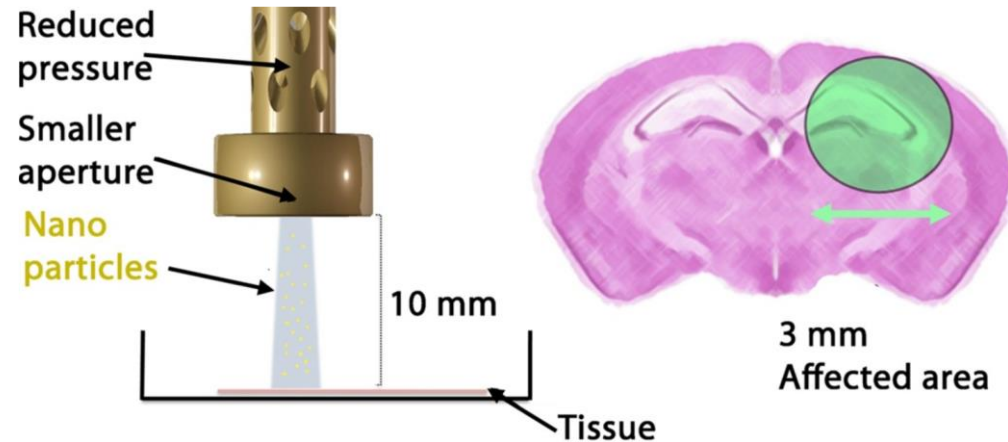
Abstract

Background: Organotypic brain slices (OTBS) are an excellent experimental compromise between the facility of working with cell cultures and the biological relevance of using animal models where anatomical, morphological, and cellular function of specific brain regions can be maintained. The biological characteristics of OTBS can subsequently be examined under well-defined conditions. They do, however, have a number of limitations; most brain slices are derived from neonatal animals, as it is difficult to properly prepare and maintain adult OTBS. There are ample problems with tissue integrity as OTBS are delicate and frequently become damaged during the preparative stages. Notwithstanding these obstacles, the introduced exogenous proteins into both neuronal cells, and cells imbedded within tissues, have been consistently difficult to achieve.

Results: Following the *ex vivo* extraction of adult mouse brains, mounted inside a medium-agarose matrix, we have exploited a precise slicing procedure using a custom built vibroslicer. To transfect these slices we used an improved biolistic transfection method using a custom made low-pressure barrel and novel DNA-coated nanoparticles (40 nm), which are drastically smaller than traditional microparticles. These nanoparticles also minimize tissue damage as seen by a significant reduction in lactate dehydrogenase activity as well as propidium iodide (PI) and dUTP labelling compared to larger traditional gold particles used on these OTBS. Furthermore, following EYFP exogene delivery by gene gun, the 40 nm treated OTBS displayed a significantly larger number of viable NeuN and EYFP positive cells. These OTBS expressed the exogenous proteins for many weeks.

Conclusions: Our described methodology of producing OTBS, which results in better reproducibility with less tissue damage, permits the exploitation of mature fully formed adult brains for advanced neurobiological studies. The novel 40 nm particles are ideal for the viable biolistic transfection of OTBS by reducing tissue stress while maintaining long term exogene expression.

Keywords: Organotypic brain slices, Vibroslicer, Gene gun, Biolistic transfection, Nanoparticles, Tissue slicer



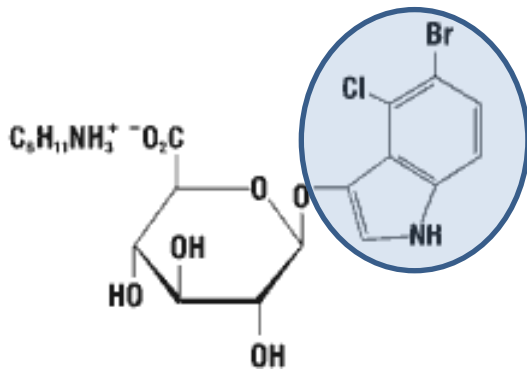
Plasmídeo Jic200 e ensaio GUS

Gene repórter *gus* guiado pelo promotor constitutivo CaMV35S

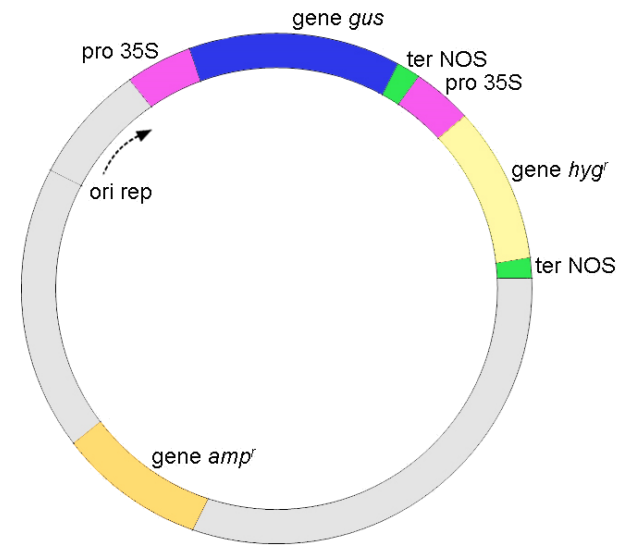
Na presente demonstração explantes de folha de *N. benthamiana* são sujeitos a bombardeamento com Jic200

Após o teste histoquímico observam-se pontos de cor azul correspondentes a células/áreas de tecido com o produto de reação da β -glucuronidase no citoplasma \rightarrow células com expressão da GUS (e putativamente transformadas)

β -D-glucurónido + H₂O \rightarrow Cl Br-indigo + ácido D-glucurónico (reação muito simplificada)

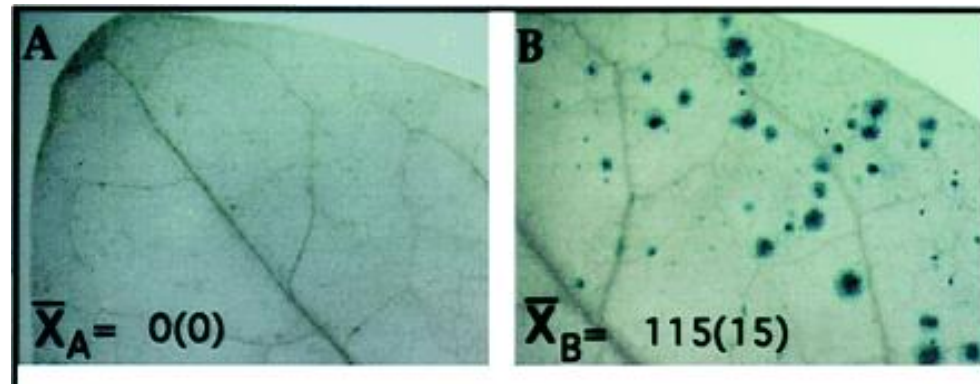


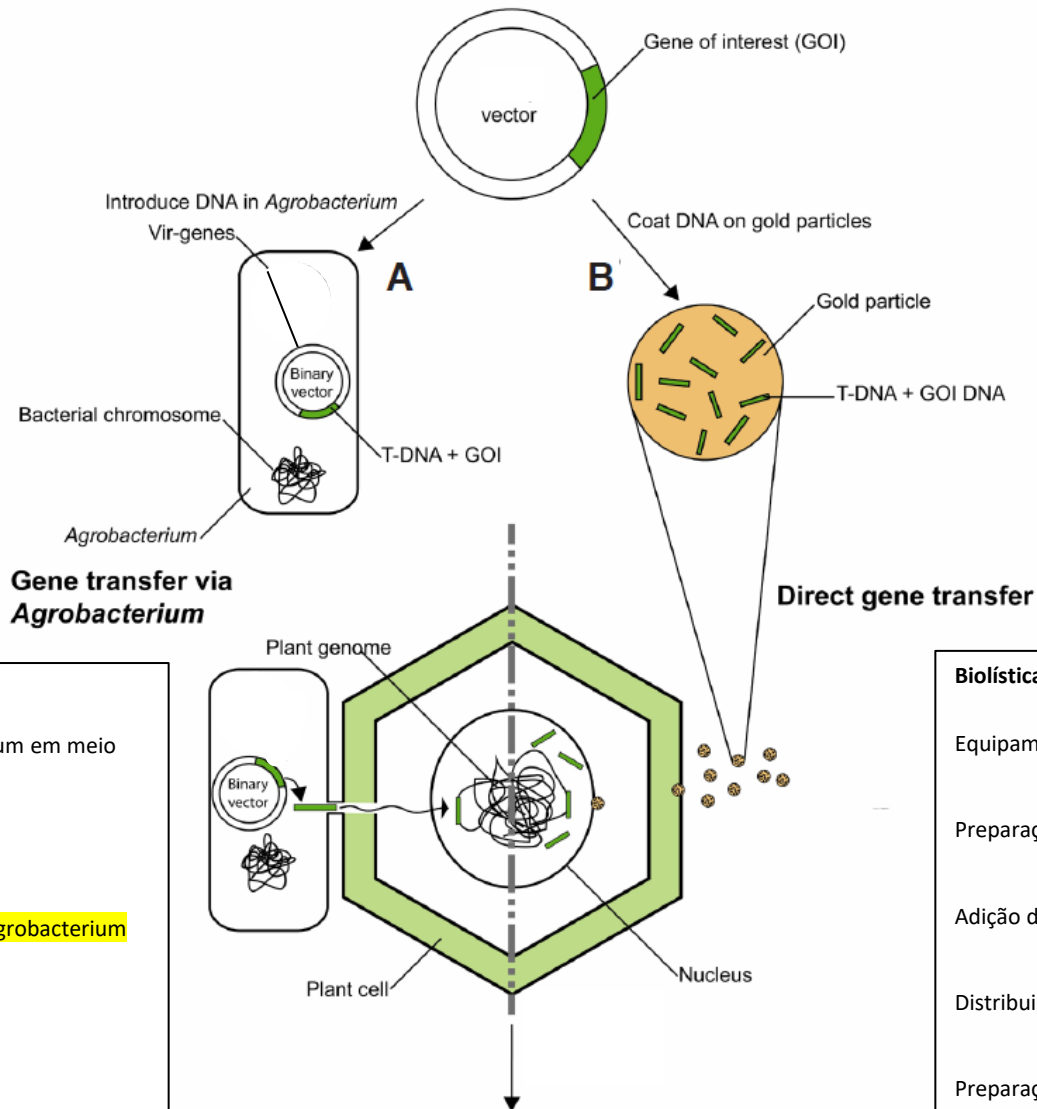
substrato X-gluc: tóxico, permite análise *in situ* mas não *in vivo*.



Não bombardeado

Bombardeado





Gene transfer via *Agrobacterium*

Direct gene transfer

Biolística (demonstração):

- Equipamento e amostra
- Preparação das partículas de Au
- Adição do plasmídeo Jic200 e revestimento
- Distribuição por carregadores (carriers)
- Preparação do bombardeamento e disparos
- Observação do teste histoquímico (GUS)

Agroinfiltração:

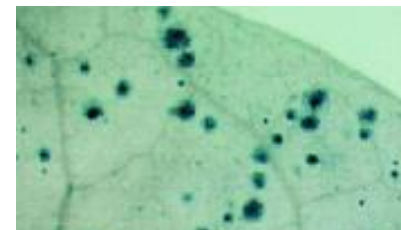
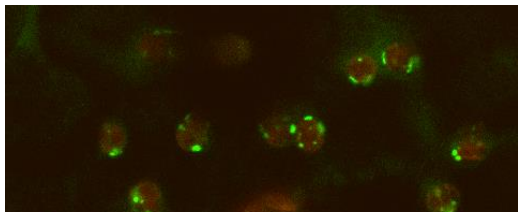
1º dia (ontem) - Crescimento do *Agrobacterium* em meio líq. com agentes de seleção.

2º dia (hoje!)

- Preparação da solução de infiltração
- Adição da solução de infiltração ao *Agrobacterium*
- Medição da densidade óptica (DO)
- Acerto da DO
- Infiltração das folhas

Observação da expressão da PDI em aula futura (CcAOS-GFP)

Expressão transiente
(microscopia confocal, mic. fluorescência, histoquímica...)



https://www.youtube.com/watch?v=GHc7PU_jG2M

Protocolo de Agroinfiltração (simplificado)

1. Preparação da solução de infiltração

0,050 g D-Glucose

1 mL MES (stock a 10x)

1 mL Na₃PO₄.12H₂O (stock a 10x)

25 uL acetoseringona (stock a 200 mM)

Prefazer para 10 mL com dH₂O.

2. Preparação do Agrobacterium

Centrifugar a cultura de Agrobacterium 5-10 min. a 3500-4000 rpm.

Remover o sobrenadante invertendo cuidadosamente o tubo.

Adicionar 1 mL de meio de infiltração e ressuspender o pellet (agitar ou usar o vórtex).

Fazer uma diluição 1:10 para uma cuvette de plástico: 100 uL de suspensão e 900 uL de meio. Medir a densidade óptica a 600 nm (OD600).

Com o objectivo de fazer uma diluição da suspensão do Agrobacterium em meio de infiltração para a OD=0.1, num volume final de 1 mL (1000 uL), usar o valor obtido de absorvância na fórmula

$$\text{Abs}_i \times V_i = \text{Abs}_f \times V_f$$

$$(\text{Abs}_i \times 10) \times V_i = 0,1 \times 1000$$

Preparar a diluição usando os tubos de 2 mL.

3. Infiltração

Escolher as folhas 3, 4 e 5, contando a partir da mais nova.

Encher a seringa (sem agulha) com cerca de 0,5 mL de suspensão de infiltração.

Pressionar gentilmente na página abaxial (inferior), fora da zona da nervura central e pressionar o embolo devagar, até aparecer uma zona infiltrada, ou a totalidade da área foliar. Repetir noutra zona da mesma folha ou mudar de folha. Podem ser necessárias 1-4 infiltrações por folha.

Marcar com um marcador a zona de infiltração ou a folha.