



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
BACHARELADO EM QUÍMICA

IRIS DE ARAUJO

**Padronização da metodologia de expressão do peptídeo  
recombinante microplusina, contendo modificações da sequência  
original**

Professora orientadora: Dra.Fernanda Dias da Silva

SANTO ANDRÉ

2015



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS



**Padronização da metodologia de expressão do peptídeo recombinante  
microplusina, contendo modificações da sequência original**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal do ABC como parte dos  
requisitos necessários para se obter o título de  
Bacharel em Química.

---

Aluna: Iris de Araujo

---

Orientadora: Dra. Fernanda Dias da Silva

SANTO ANDRÉ

2015

## Sumário

1. Introdução .....	1
1.1. A importância em se desenvolver novos agentes antimicrobianos .....	1
1.2. Peptídeos Antimicrobianos .....	1
1.3. Agentes quelantes e seu uso terapêutico .....	2
1.4. Microplusina: peptídeo antimicrobiano e quelante de cobre e ferro .....	3
2. Justificativa .....	5
3. Objetivo .....	6
4. Materiais e Métodos.....	6
4.1. Obtenção da variante da microplusina .....	6
4.2. Inserção da sequência de nucleotídeos da MPm7 no plasmídeo de expressão .....	9
4.2.1.Reação de digestão com enzimas de restrição .....	9
4.2.2.Eletroforese em gel de agarose e purificação do DNA.....	9
4.2.3.Reação de ligação.....	9
4.3. Expressão recombinante da variante MPm7 .....	10
4.3.1. Protocolo 1 .....	10
4.3.2. Protocolo 2 .....	11
4.3.3. Protocolo 3 .....	11
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	12
5. Resultados .....	12
5.1. Inserção da sequência de nucleotídeos da MPm7 no plasmídeo de expressão .....	12
5.2. Expressão recombinante da variante MPm7 .....	14
5.2.1.Protocolo 1 .....	14
5.2.2.Protocolo 2 .....	16
5.2.3.Protocolo 3 .....	17
6. Discussão .....	19
7. Conclusões .....	22
8. Referências Bibliográficas .....	23

## Resumo

A microplusina é um peptídeo antimicrobiano (PAM), quelante de cobre e ferro, presente no carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Possui estrutura globular, arranjada em cinco  $\alpha$ -hélices e é rica em resíduos de cisteína e histidina. As histidinas H-1, H-2 e H-74 estão entre os possíveis aminoácidos envolvidos na formação do sítio de ligação ao cobre. Seu amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos pode estar associado à sua capacidade de quelar cobre e estudos com *Micrococcus luteus* e *Cryptococcus neoformans*, mostraram que a adição de cobre ao meio anula o seu efeito bacteriostático e fungistático *in vitro*, respectivamente. A microplusina ao ligar cobre, possivelmente, diminui a disponibilidade deste metal no meio, o que pode afetar a atividade de enzimas dependentes de cobre. Culturas de *M. luteus* e *C. neoformans* tratadas com o peptídeo apresentaram uma redução no seu consumo de oxigênio e dados sugerem que a depleção de cobre pode ter afetado a atividade de heme cobre oxidases pertencentes a uma das vias da cadeia transportadora de elétrons. A microplusina também interfere na síntese de melanina e na formação da cápsula de polissacarídeos, dois importantes fatores de virulência de *C. neoformans*. A redução da melanização está relacionada a uma diminuição da atividade da lacase, uma enzima cobre dependente. As atividades da microplusina indicam o seu enorme potencial como fármaco e estudos sobre quais aminoácidos de sua sequência são importantes para manutenção de sua estrutura e atividades tornam-se essenciais. Para viabilizar tais investigações, a expressão recombinante de variantes da microplusina contendo a remoção e/ou substituição de aminoácidos possivelmente envolvidos na formação do sítio ligante de cobre da molécula apresenta-se como uma ferramenta essencial. Contudo, a metodologia empregada na expressão da microplusina recombinante em sua sequência original pode não ser adequada para a expressão dessas variantes. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo padronizar a metodologia de expressão recombinante de uma das variantes da microplusina, contendo as seguintes modificações na mesma molécula: substituição da histidina 74 por uma alanina, remoção dos quatro primeiros aminoácidos da região amino-terminal [H-1, H-2, Q-3 e E-4] e dos oito últimos aminoácidos da região carboxi-terminal [E-83, A-84, H-85, H-86, E-87, H-88, D-89 e H-90].

**Palavras-Chave:** microplusina, peptídeo antimicrobiano, peptídeo quelante, expressão recombinante.

## 1. Introdução

### 1.1. A importância em se desenvolver novos agentes antimicrobianos

A descoberta da penicilina abriu caminho para uma nova era de terapias antimicrobianas, dando origem a uma infinidade de antibióticos para o tratamento de doenças infecciosas. No entanto, devido ao seu uso exacerbado e, por vezes inadequado, surgiram micro-organismos resistentes à penicilina, conduzindo ao desenvolvimento de outros antibióticos, tais como a metilina, uma droga de espectro estreito usada para tratar infecções causadas por bactérias gram-positivas. Porém, apenas um ano após a sua utilização clínica, surgiu uma espécie de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. Pode-se dizer que, nas últimas quatro décadas, tem havido uma explosão de bactérias resistentes a antibióticos, incluindo a ocorrência frequente das chamadas superbactérias, como as cepas do gênero *Enterococcus* resistentes à vancomicina, as bactérias multi-resistentes pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Acinetobacter* e as resistentes a fluoroquinolonas do gênero *Pneumococcus* (MANSOUR *et al*, 2014).

Diante deste quadro, há uma extrema necessidade de descobrir novas abordagens de terapias antimicrobianas, sendo o estudo dos peptídeos antimicrobianos uma abordagem muito promissora.

### 1.2. Peptídeos Antimicrobianos

O sistema imunológico de organismos multicelulares compreende um vasto arsenal de mecanismos para proteger o hospedeiro a partir das constantes interações com micro-organismos infecciosos (GUANÍ-GUERRA *et al*, 2010).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas que atuam nas barreiras primárias do sistema imune, com ação direta contra micro-organismos (BAHAR e REN, 2013). Estes peptídeos são produzidos por diversas espécies, incluindo bactérias, insetos, plantas, crustáceos, moluscos, anfíbios, peixes e mamíferos, e têm sido reconhecidos evolutivamente como moléculas que foram eficazmente preservadas em mamíferos (GUANÍ-GUERRA *et al*, 2010; LAI e GALLO, 2009).

Até o momento, foram identificados 2.439 peptídeos antimicrobianos de diferentes origens e atividades. Um banco de dados atualizado de peptídeos antimicrobianos (*The Antimicrobial Peptide Database*) está disponível *on-line* em: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>.

A maioria dos PAMs estudados apresentam característica catiônica e anfipática e essas propriedades são relacionadas ao seu modo de ação, através de sua interação eletrostática com os fosfolipídios de membrana e outras moléculas carregadas negativamente na superfície celular externa dos micro-organismos. Essa interação pode causar danos como permeabilização, despolarização de membrana, liberação de conteúdos intracelulares e lise celular (BROGDEN, 2005; NAKATSUJI e GALLO, 2012). Alguns PAMs podem também atravessar a membrana e interferir em processos como síntese de proteínas, síntese de DNA/RNA, atividades enzimáticas, dentre outros (PUSHPANATHAN *et al*, 2013).

As bactérias possuem diversos mecanismos de resistência aos PAMs, porém a estrutura de suas membranas em bicamada lipídica impossibilita que essa resistência seja completa. Além disso, estudos mostram que a resistência contra os PAMs, reportada até o momento, não é tão forte quanto à resistência contra os antibióticos e que abrange apenas um número limitado de PAMs (BAHAR e REN, 2013).

Assim como os PAMs catiônicos, os PAMs aniônicos também têm sido identificados em vários organismos, incluindo plantas, animais invertebrados e vertebrados. Porém, relatos sobre estes peptídeos têm sido mais escassos na literatura, com pouco mais de 100 moléculas identificadas até o momento. Especula-se que os PAMs catiônicos tenham sido selecionados ao longo do processo evolutivo, entretanto, a hipótese de que os PAMs aniônicos complementam a ação dos catiônicos não pode ser descartada (HARRIS *et al*, 2009).

Entre os PAMs catiônicos e aniônicos estão aqueles que são capazes de interagir com íons metálicos (BROGDEN, 2005; KAVANAGH e DOWD, 2004; CORBIN *et al*, 2008; SILVA *et al*, 2009). Esta propriedade quelante pode estar intimamente ligada à sua ação antimicrobiana.

### 1.3. Agentes quelantes e seu uso terapêutico

Estudos que envolvem terapia com uso de agentes quelantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas, tem destacado a relação de diversos metais e o aparecimento de doenças como Mal de Parkinson, Alzheimer e doença de Wilson com destaque para desregulação em metais como o cobre, ferro e zinco. O cobre, por exemplo, atua em diversas funções intracelulares como síntese de neurotransmissores e hormônios, como co-fator para enzimas, como antioxidante, na formação de pigmentos entre outras. A terapia com o uso de quelante de metais poderia prevenir e reduzir o excesso de metais sem afetar as regiões que deles necessitam (WARD *et al*, 2012).

Estudos recentes mostram que agentes quelantes também podem atuar em modelos de tratamento de câncer. Agentes quelantes de ferro, por exemplo, podem afetar proliferações tumorais em diferentes modelos de células cancerígenas, aumentando a função de p53 e reduzindo a quantidade de diversas ciclinas que atuam no ciclo celular (YU *et al*, 2012).

### 1.4. Microplusina: peptídeo antimicrobiano e quelante de cobre (Cu<sup>2+</sup>) e ferro (Fe<sup>2+</sup>)

A microplusina é um peptídeo antimicrobiano aniônico, com pI estimado de 5,2 em pH fisiológico, encontrada na hemolinfa e ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Possui massa molecular igual a 10.204 Da e faz parte de uma família de peptídeos de carrapato que compartilham seis resíduos de cisteína bem conservados e vários resíduos de histidina nas porções amino e carboxi-terminal e na posição 74, além de outros resíduos hidrofóbicos e aromáticos. Os seis resíduos de cisteínas formam três pontes de dissulfeto (Cys-6/Cys-52; Cys-19/Cys-80 e Cys-41/Cys-46) e regiões em *loop* estão presentes nas porções amino e carboxi-terminal. As pontes de dissulfeto são essenciais para sua estabilidade e ação antibacteriana, uma vez que a redução e alquilação das mesmas aboliu completamente a atividade do peptídeo (SILVA *et al*, 2009).

A molécula consiste em um domínio globular arranjado em cinco  $\alpha$ -hélices e para todas elas, a maioria dos resíduos hidrofóbicos estão agrupados em um núcleo hidrofóbico e os hidrofílicos estão posicionados em contato com o solvente. Por espectrometria de massas verificou-se que a microplusina

é um quelante de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , nas razões molares de 1:3 e 1:1, respectivamente (SILVA *et al*, 2009; REZENDE *et al*, 2009).

A atividade antimicrobiana da microplusina foi detectada pela primeira vez contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (FOGACA *et al*, 2004). Estes estudos foram realizados com a molécula nativa e, posteriormente, utilizando-se a molécula recombinante, foi detectado que a microplusina possui um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos, incluindo gêneros de importância médica, como *Aspergillus* e *Cryptococcus*. Entre os micro-organismos testados, *M. luteus* e *C. neoformans* apresentaram-se como os mais susceptíveis à ação da microplusina, com mínima concentração que inibiu 50% do crescimento microbiano ( $\text{MIC}_{50}$ ) igual a 0,09  $\mu\text{M}$ . Este efeito foi bacteriostático e fungistático, respectivamente (SILVA *et al*, 2009; SILVA *et al*, 2011).

Estudos sobre o mecanismo de ação da microplusina contra *M. luteus* mostraram que a capacidade quelante de cobre da microplusina está intimamente ligada à sua atividade antimicrobiana. Supõe-se que ao ligar o  $\text{Cu}^{2+}$  do meio, a microplusina diminua a disponibilidade deste metal para os micro-organismos (SILVA *et al*, 2009).

O cobre é essencial para a maioria dos organismos aeróbicos e serve como cofator para enzimas envolvidas na geração de energia, aquisição de ferro, transporte de oxigênio, metabolismo celular, entre outros processos (SILVA *et al*, 2011). Na respiração, o cobre é necessário para o funcionamento das principais oxidases que atuam na cadeia transportadora de elétrons (HORN e BARRIENTOS, 2008). A microplusina reduz o consumo de oxigênio em *M. luteus* e *C. neoformans* e os dados observados sugerem que as vias afetadas da cadeia transportadora de elétrons são aquelas que dependem de heme cobre oxidases, uma vez que não houve inibição de complexos respiratórios que utilizam enzimas não dependentes de cobre (SILVA *et al*, 2009; SILVA *et al*, 2011).

A microplusina também afeta os dois mais importantes fatores de virulência de *C. neoformans*: a melanização do fungo e a formação de sua cápsula de polissacarídeos (SILVA *et al*, 2011). A melanização protege o fungo contra o estresse oxidativo, extremos de temperatura, degradação enzimática e compostos antimicrobianos (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2006). Já a cápsula protege o

fungo contra fagocitose e induz forte resposta imunomodulatória que permite a evasão do sistema imune e a sobrevivência da levedura no hospedeiro (ZARAGOZA *et al*, 2009).

A síntese de melanina depende da atividade da lacase, uma oxidase que contém quatro moléculas de cobre ligadas a ela (ZHU e WILLIAMSON, 2004). A microplusina parece afetar diretamente a atividade da lacase, uma vez que se observou uma redução de 50% de sua atividade na presença do peptídeo, sugerindo que a microplusina reduz o aporte de moléculas de cobre pela apo-enzima lacase (SILVA *et al*, 2011). O efeito sobre a cápsula de polissacarídeos também pode estar relacionado a interferências da microplusina em um ou mais processos metabólicos que dependem de enzimas que utilizam cobre como cofator.

## **2. Justificativa**

A microplusina é um peptídeo antimicrobiano quelante de cobre e ferro, rico em resíduos de histidina, que apresenta potencial terapêutico para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas e fungos, incluindo a levedura patogênica *Cryptococcus neoformans* (FOGAÇA *et al*, 2004; SILVA, *et al*, 2009; SILVA, *et al*, 2011) que é responsável por mais de 600.000 mortes (PARK *et al*, 2009) e no Brasil é a causa primária de mortes por micoses sistêmicas em pacientes infectados com HIV (PRADO *et al*, 2009). Além disso, a sua propriedade quelante indica que essa molécula pode ter aplicação em modelos de doenças relacionadas a um excesso de cobre corporal, tais como as doenças neurodegenerativas de Alzheimer e Parkinson, em determinados tipos de câncer como de próstata, mama, pulmões e cérebro, e na doença de Wilson (WARD *et al*, 2012).

Porém, para que o potencial terapêutico da microplusina seja totalmente explorado, estudos sobre sua estrutura e atividade devem ser aprofundados.

Estudos realizados com *Micrococcus luteus* e *C. neoformans* indicam que a atividade antimicrobiana da microplusina está relacionada à remoção do cobre do meio de cultura, o que afetaria a atividade de enzimas cobre-dependentes nestes micro-organismos (SILVA, *et al*, 2009; SILVA, *et al*, 2011).

Dados obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) indicam que as histidinas amino-terminais H-1 e H-2, a H-74, junto com outros resíduos de aminoácidos situados nestas regiões, podem estar envolvidos na estrutura do sítio ligante de cobre da microplusina (SILVA, *et al*, 2009; REZENDE, *et al*, 2009). Além disso, estudos realizados com o peptídeo antimicrobiano hebraína (que possui 61% de identidade com a microplusina), mostraram que a remoção dos resíduos de histidina da região carboxi-terminal reduziu sua atividade contra *Escherichia coli* e *Candida glabrata* (LAI *et al*, 2002).

No caso da microplusina, não se pode afirmar se a remoção ou substituição das diferentes histidinas alteraria sua estrutura e, conseqüentemente, sua atividade. Portanto, torna-se fundamental investigar quais resíduos de histidina presentes na microplusina são essenciais para a estruturação de seu sítio de ligação ao cobre, assim como, investigar se a remoção e/ou substituição destes resíduos afetam sua atividade antimicrobiana, indicando inclusive se este efeito antimicrobiano da microplusina é de fato, apenas nutricional.

Para viabilizar tais investigações, uma série de variantes da sequência original do gene da microplusina contendo remoções e/ou substituições de resíduos de aminoácidos possivelmente envolvidos na formação do sítio quelante de cobre e na sua atividade antimicrobiana, foram comercialmente sintetizados para posterior expressão recombinante. Contudo, a metodologia empregada na expressão da microplusina recombinante em sua sequência original pode não ser adequada para a expressão da microplusina com sua sequência alterada sendo, portanto, de fundamental importância, padronizar a metodologia para sua expressão, adequando parâmetros já utilizados e inserindo novos conforme for necessário.

### **3. Objetivo**

Padronizar a metodologia de expressão recombinante de uma das variantes da microplusina, contendo as seguintes modificações em relação à sua sequência original: substituição da histidina 74 por uma alanina, remoção dos quatro primeiros aminoácidos da região amino-terminal [H-1, H-2, Q-3 e E-4] e dos oito últimos aminoácidos da região carboxi-terminal [E-83, A-84, H-85, H-86, E-87, H-88, D-89 e H-90].

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Obtenção da variante da microplusina

A construção que corresponde à modificação da sequência de nucleotídeos original da microplusina foi cedida pelo Prof. Dr. José Ricardo M. Pires (Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ/RJ), colaborador deste projeto. Foi sintetizada pela empresa GenScript (NJ – EUA) e inserida no plasmídeo pUC57 com as extremidades 5' e 3' contendo sítios para as endonucleases de restrição BamHI e EcoRI, respectivamente.

As **Figuras 1A** e **1B** indicam as sequências originais de nucleotídeos e aminoácidos da microplusina, respectivamente. Já as **Figuras 2A** e **2B** indicam a construção correspondente à modificação da sequência de nucleotídeos e aminoácidos original da microplusina, respectivamente. As alterações na construção consistiram em: substituição da histidina 74 por uma alanina, remoção dos quatro primeiros aminoácidos da região amino-terminal [H-1, H-2, Q-3 e E-4] e dos oito últimos aminoácidos da região carboxi-terminal [E-83, A-84, H-85, H-86, E-87, H-88, D-89 e H-90]. Nesse trabalho a variante do peptídeo foi denominado MPm7.

**A.**

5'GGATCCATTGAGGTTGTCATCACCAGGAGCTTTGCACAAAGGGGGACGACGCATTGGTAACGGA  
ACTGGAATCGCATTAGGTGCGTATTAGTCCAGAGACCAACGCCGATTTCGACAATGCCGTGCAACAAC  
TGAAGTGAAGTGCCTCAACCGTGCTTGTGCCTACCGCAAAATGTGTGCCACAAACAACCTGGAACAA  
GCGATGTCCGTTTACTTCACCAACGAGCAAATCAAAGAAATC**CAC**GACGCAGCCACTGCCTGTGACC  
CCGAAGCC**CACCATGAGCACGACCATTAAGAATTC**-3'

**B.**

**HHQELCTKGDDALVTELECIRLRISPETNAAFDNAVQQLNCLNRACAYRKMCAATNNLEQAMSVYFTNEQI**  
KEI**H**DAATACDPE**AHHEHDH**

**Figura 1:** **A.** Sequência original de nucleotídeos da microplusina. Em vermelho estão destacadas as sequências que correspondem aos oligonucleotídeos utilizados para clonagem da microplusina (ESTEVES *et al.*, 2009). Os sítios para as enzimas de restrição BamHI e EcoRI, regiões 5' e 3', respectivamente, estão sublinhados em vermelho. A trinca de nucleotídeos que codifica para a histidina 74 está destacada em azul. **B.** Sequência original de aminoácidos da microplusina. A histidina 74 está destacada em azul. Os quatro primeiros aminoácidos da região amino-terminal e os oito últimos aminoácidos da região carboxi-terminal estão destacados em negrito.

**A.**

5'GGATCCATTGAGGTTGTCATCACCAGGAGCTTTGCACAAAGGGGGACGACGCATTGGTAACGGA  
ACTGGAATCGCATTAGGTGCGTATTAGTCCAGAGACCAACGCCGATTTCGACAATGCCGTGCAACAAC  
TGAAGTGAAGTGCCTCAACCGTGCTTGTGCCTACCGCAAAATGTGTGCCACAAACAACCTGGAACAA  
GCGATGTCCGTTTACTTCACCAACGAGCAAATCAAAGAAATC**CGA**GACGCAGCCACTGCCTGTGACC  
CCGAAGCC**CACCATGAGCACGACCATTAAGAATTC**-3'

**B.**

**HHQELCTKGDDALVTELECIRLRISPETNAAFDNAVQQLNCLNRACAYRKMCAATNNLEQAMSVYFTNEQI**  
KEI**A**DAATACDPE**AHHEHDH**

**Figura 2:** **A.** Sequência de nucleotídeos da variante da microplusina MPm7. Em vermelho estão destacadas as sequências que correspondem aos oligonucleotídeos utilizados para clonagem da microplusina (ESTEVES *et al.*, 2009). Os sítios para as enzimas de restrição BamHI e EcoRI, regiões 5' e 3', respectivamente, estão sublinhados em vermelho. A trinca de nucleotídeos que codifica para a alanina (que substituiu a histidina 74) está destacada em azul. **B.** Sequência de aminoácidos da variante da microplusina MPm7. A alanina, que substituiu a histidina 74 presente na sequência original, está destacada em azul. A sequência dos quatro primeiros aminoácidos da região amino-terminal e dos oito últimos aminoácidos da região carboxi-terminal que foram removidos estão tachados em negrito.

A fim de amplificar a construção pUC57 + MPm7, realizou-se uma transformação utilizando bactérias *E. coli* SURE (*Stratagene*) através do seguinte protocolo: 20µL de bactérias competentes foram descongeladas e mantidas no gelo. Em seguida 1µL de plasmídeo foi adicionado às bactérias. As células permaneceram no gelo por 30 minutos, e após esse período, foram submetidas à etapa de choque térmico (42°C durante 45 segundos) e acondicionadas novamente no gelo, por mais três minutos. Às bactérias transformadas, foram adicionados 80 µL de meio de cultura LB, seguido de incubação a 37°C, sob forte agitação, por uma hora. Posteriormente, 100 µL de bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar acrescido de ampicilina (100 µg/mL). Uma das colônias obtidas foi então inoculada em 3 mL de caldo LB com ampicilina (100 µg/ml). Após incubação *overnight* a 37° C (sob agitação), os plasmídeos foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante. Ao final do processo, o material foi quantificado em espectrofotômetro (BioDrop µLITE, *Isogen Life Science*).

#### **4.2. Inserção da sequência de nucleotídeos da variante MPm7 no plasmídeo de expressão**

##### **4.2.1. Reação de digestão com enzimas de restrição**

O plasmídeo pUC57 contendo o gene da microplusina modificada (MPm7) e o vetor de expressão pRSET A (Invitrogen) foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI (*Thermo Scientific*), separadamente. A reação de digestão com a primeira enzima (BamHI) foi incubada *overnight* a 37° C, com tampão específico para essa enzima. Após este período as amostras foram submetidas a uma reação de precipitação com etanol/acetado de sódio (70%/10%). Após a precipitação realizou-se a reação de digestão com a segunda enzima (EcoRI), sendo as amostras incubadas *overnight* a 37° C com o tampão específico para esta enzima.

##### **4.2.2. Eletroforese em gel de agarose e purificação do DNA**

As amostras foram então diluídas em tampão de corrida para DNA e submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), utilizando o tampão de corrida Tris-acetato 1X (TAE; 40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA; pH 8,0) . O gel foi corado com uma solução de

SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) (0,5 µg/ml) e as bandas correspondentes aos fragmentos de DNA esperados foram visualizadas através de um transiluminador de luz-ultra-violeta. Para extração e purificação do DNA presente no gel, foi utilizado o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Invitrogen).

#### **4.2.3. Reação de ligação**

A reação de ligação foi realizada utilizando-se o vetor pRSET A e o inserto (MPm7) obtidos após a reação de digestão e purificação do DNA presente no gel de agarose, na proporção de 3:1 (inserto:plasmídeo), com uso da enzima T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*), seguindo as instruções do fabricante, sendo as amostras incubadas a 22°C por 1 hora. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes *E. coli* SURE (*Stratagene*), conforme protocolo descrito no item 4.1. Realizou-se então uma reação de digestão teste com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI (*Thermo Scientific*), separadamente e, posteriormente, uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), ambos já descritos anteriormente, para constatar a presença do inserto MPm7 no vetor pRSET A.

#### **4.3. Expressão recombinante da variante MPm7**

Após a inserção do inserto MPm7 no vetor de expressão pRSET A, o material foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* BL-21, a fim de se induzir a expressão do peptídeo de interesse. Para a expressão, foram utilizados três protocolos:

##### **4.3.1. Protocolo 1**

A indução da expressão recombinante do peptídeo foi realizada como previamente descrito (ESTEVES *et al.* 2009), modificando-se apenas o meio de cultura utilizado.

Para a expressão piloto, uma colônia de *E. coli* BL-21 (DE3) transformada foi inoculada em 5 mL de meio CIRCLEGROW® Broth (Bio 101) acrescido com ampicilina (100 µg/ml) e incubada *overnight* a 37° C, sob agitação. Após este período, 1 mL da cultura de bactérias foi re-inoculado em 100 mL de meio CIRCLEGROW® Broth e mantida a 37° C, sob agitação. Quando a cultura alcançou um valor de

Densidade Óptica (DO) entre 0,4 - 0,6 unidades a 600 nm, 0,8 mM de isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) foi adicionado para induzir a expressão gênica. Foi coletado 1 mL da cultura antes da indução e nos intervalos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas de indução. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g/ 10 min/ 4° C, sendo o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em solução de lise *BugBuster Plus Lysonase*<sup>™</sup> (Merck Millipore), segundo protocolo do fabricante. Após centrifugação a 10.000 x g/ 10 min/ 4° C, o sobrenadante foi coletado em tubo de propileno limpo e os *pellets* foram ressuspensos em tampão fosfato salino 20 mM, pH 7,0. Tanto o sobrenadante (proteínas solúveis) quanto o *pellet* (proteínas insolúveis) foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a fim de verificar a expressão ou não do peptídeo, como descrito no item 4.5.

#### **4.3.2. Protocolo 2**

Este protocolo de expressão apresentou as seguintes modificações em relação ao Protocolo 1: 3 mL da cultura de bactérias foram re-inoculados em 500 mL de meio *CIRCLEGROW*<sup>®</sup> *Broth* acrescido com ampicilina (100  $\mu$ g/ml) e mantidos a 24° C, sob agitação, até que o valor de DO<sub>600</sub> chegasse em ~1,0. Após retirar 1 mL da cultura antes da indução, 0,5 mM de IPTG foi adicionado para induzir a expressão gênica, incubando-se *overnight* a 24° C, sob agitação. No dia seguinte, 1 mL da cultura induzida foi coletada para análise, seguindo-se o mesmo protocolo de lise celular descrito no item 4.3.1.

#### **4.3.3. Protocolo 3**

Este protocolo de expressão foi similar ao Protocolo 1, com as seguintes alterações: utilizou-se a bactéria de expressão *E. coli* BL-21 (DE3) *pLysS*. Como controle, 1 ml de uma cultura de bactérias não induzidas foi coletado nos tempos, 0, 1, 2, 3 e 4 horas. Para análise, utilizou-se um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 16%.

Os três protocolos estão resumidos na Tabela 1:

**Tabela 1.** Condições da expressão peptídica nos diferentes protocolos utilizados.

	<b>Bactéria de expressão</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>DO inicial (600 nm)</b>	<b>IPTG [mM]</b>	<b>Tempo de indução</b>	<b>Temperatura</b>
<b>Protocolo 1</b>	<i>E.coli</i> BL-21 (DE3)	CircleGrow®	0,4 – 0,6	0,8	5 horas	37 °C
<b>Protocolo 2</b>	<i>E.coli</i> BL-21 (DE3)	CircleGrow® com ampicilina (100 µg/ml)	~1,0	0,5	<i>overnight</i>	24°C
<b>Protocolo 3</b>	<i>E. coli</i> BL-21 (DE3) <i>pLysS</i>	CircleGrow® com ampicilina (100 µg/ml)	0,4 – 0,6	0,8	4 horas	37 °C

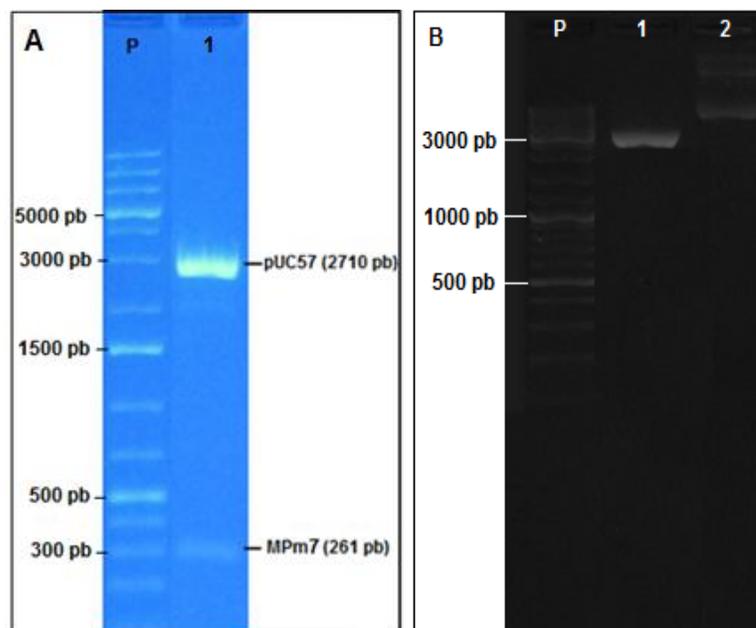
#### 4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970)

Os sobrenadantes obtidos após a lise celular foram diluídos em tampão de amostra 2 vezes concentrado (25 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 2% de duodecil sulfato de sódio (SDS), 20% de glicerol, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,025% de azul de bromofenol) e os *pellets* ressuspensos em 100  $\mu$ L tampão de amostra 1x. As amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em um gel de poliacrilamida 15% imerso em uma cuba de eletroforese contendo tampão de corrida diluído 10 vezes (250 mM de Tris-base, 1,92 M de glicina e 1% de SDS). Após uma corrida de aproximadamente 1,5 h a 100 mV, os géis foram corados com solução *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Scientific).

## 5. Resultados

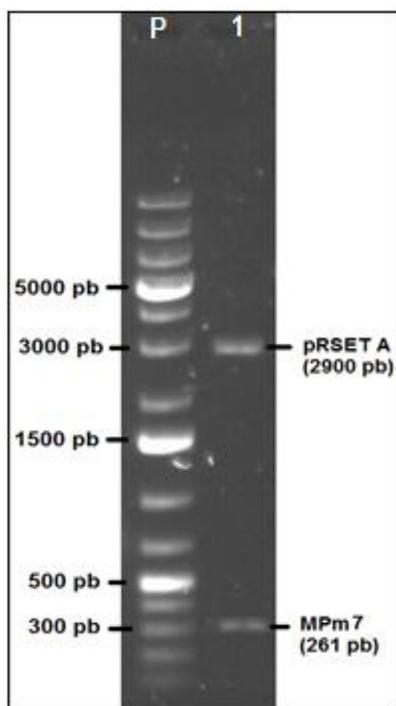
### 5.1. Inserção da sequência de nucleotídeos de MPm7 no vetor de expressão pRSET A

A **Figura 3A** apresenta o resultado da reação de digestão com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI da construção pUC57 + MPm7. Pode-se observar a presença de banda na faixa dos 300 pares de bases (pb), o que corresponde ao esperado para a variante MPm7 que possui 261 pb. A **Figura 3B** apresenta o resultado da reação de digestão do vetor de expressão pRSET A digerido com as mesmas enzimas e condições, apresentando banda esperada na faixa de 3000 pb, já que o plasmídeo pRSET A possui 2897 pb.



**Figura 3:** Géis de agarose 1,5% corados com SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies). Bandas correspondentes aos fragmentos de DNA visualizadas através de um transiluminador de luz-ultra-violeta. **A.** P - padrão (DNA ladder 1 Kb, GeneRuler™ Thermo Scientific); 1 – Construção pUC57 + MPm7 digerida com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI; **B.** P - padrão (DNA ladder 1 Kb, Invitrogen); 1- pRSET A digerido; 2 - pRSET A não digerido (controle).

Em seguida, foi realizada a extração e purificação da banda contendo o fragmento de DNA localizado na altura de 300 pb (**Figura 3A**), referente a sequência gênica codificante para MPm7, e da banda localizada na altura de 3000 pb (**Figura 3B**), referente ao plasmídeo de expressão pRSET A digerido, conforme descrito nos Materiais e Métodos (Item 4.2.1). As bandas purificadas foram então quantificadas e utilizadas para reação de ligação na proporção molar inserto:vetor igual a 3:1. O produto dessa ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* SURE, para posterior realização de preparações da construção pRSET A + MPm7, conforme descrito nos Materiais e Métodos (Item 4.1). A presença do inserto MPm7 nessas preparações foi confirmada através de reação de digestão (**Figura 4**). Pode-se observar a presença de banda na faixa de 300 pb, correspondente ao inserto com 261 pb, e banda na faixa de 3000 pb correspondente ao vetor. Esse dado confirma que o inserto foi inserido satisfatoriamente no vetor de expressão pRSET A. Sendo assim, o material foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* BL-21 (DE3), a fim de se induzir a expressão de MPm7.

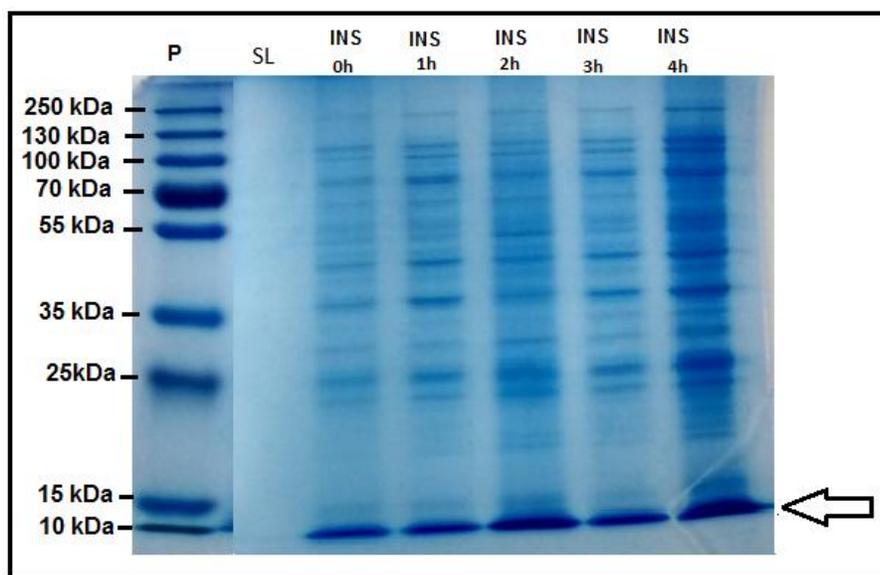


**Figura 4:** Digestão teste do produto da reação de ligação entre pRSET A e MPm7, amplificado em bactérias *E. coli* SURE. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR® *Safe DNA gel stain* (Life Technologies). Bandas correspondentes aos fragmentos de DNA visualizadas através de um transiluminador de luz-ultra-violeta. **P** - padrão (DNA *ladder* 1 Kb, *GeneRuler™ Thermo Scientific*); **1**- pRSET A + MPm7 digerido com as enzimas de restrição BamHI e EcoR.

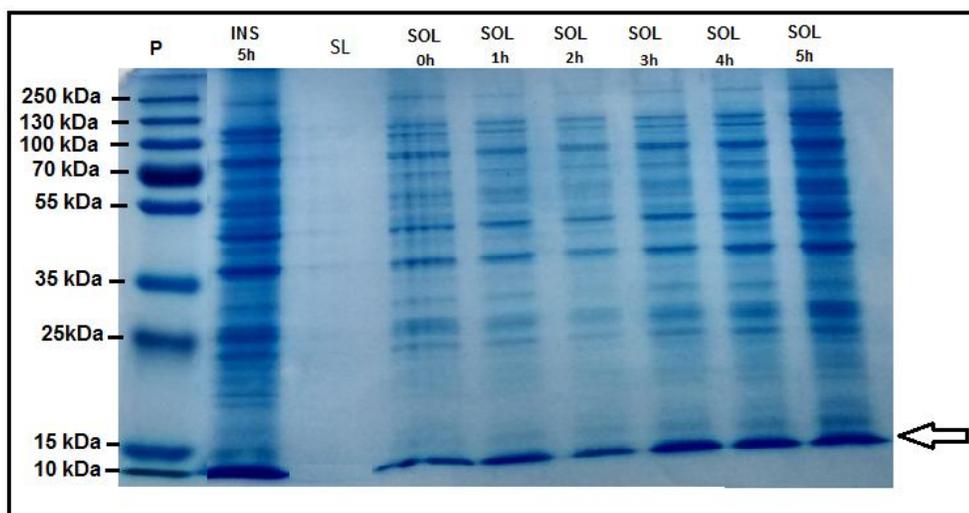
## 5.2. Expressão recombinante da variante MPm7

### 5.2.1. Protocolo 1

As **Figuras 5 e 6** apresentam os resultados da indução para expressão do peptídeo recombinante MPm7 utilizando o Protocolo 1, descrito no item 4.3.1, para os tempos de indução em 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas, nas frações insolúvel (INS) e solúvel (SOL), respectivamente.



**Figura 5:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15 % corado com *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Scientific). **P:** padrão (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific*); **SL:** Solução de Lise; **INS 0h:** Amostra insolúvel não induzida; **INS 1h:** Amostra insolúvel induzida com 1 hora; **INS 2h:** Amostra insolúvel induzida com 2 horas; **INS 3h:** Amostra insolúvel induzida com 3 horas; **INS 4h:** Amostra insolúvel induzida com 4 horas. **Seta:** indicando as bandas no tamanho esperado do peptídeo recombinante (14,9 kDa).

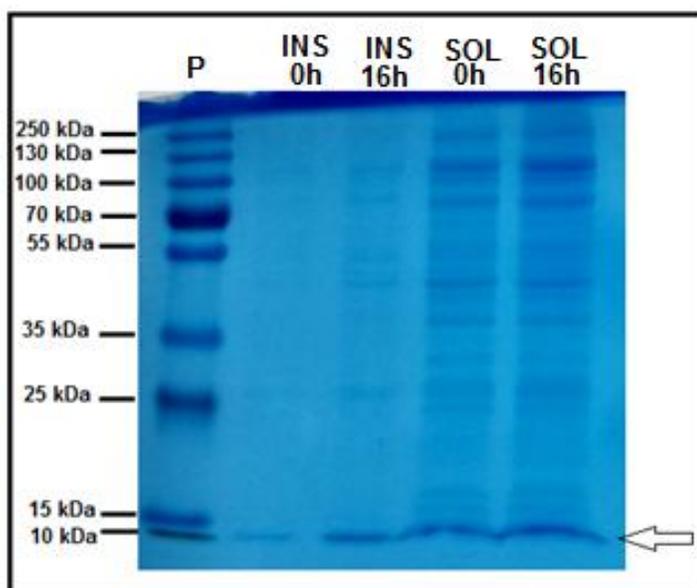


**Figura 6:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15 % corado com *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Scientific). **P:** padrão (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific*); **INS 5h:** Amostra insolúvel induzida com 5 horas; **SL:** Solução de Lise; **SOL 0h:** Amostra solúvel não induzida; **SOL 1h:** Amostra solúvel induzida com 1 horas; **SOL 2h:** Amostra solúvel induzida com 2 horas; **SOL 3h:** Amostra solúvel induzida com 3 horas; **SOL 4h:** Amostra solúvel induzida com 4 horas; **SOL 5h:** Amostra solúvel induzida com 5 horas. **Seta:** indicando as bandas no tamanho esperado do peptídeo recombinante (14,9 kDa).

Tanto para a fração insolúvel quanto para a solúvel (**Figuras 5 e 6**), pode-se notar que há um aumento na intensidade das bandas na altura da molécula de 15 kDa do padrão, o que está próximo à massa molecular esperada para MPm7 + peptídeo de fusão, que é de 14,9 kDa. Esse aumento indica que houve expressão da molécula e que a mesma foi proeminente a partir do tempo de 2 horas de indução para as amostras da fração insolúvel (**Figura 5**) e a partir de 3 horas de indução para as amostras da fração solúvel (**Figura 6**). Por outro lado, uma expressão basal para a amostra não induzida (**tempo de 0h nas Figuras 5 e 6**) também foi detectada.

### 5.2.2. Protocolo 2

A fim de se diminuir a expressão basal do peptídeo foram realizados dois protocolos alternativos. A **Figura 7** apresenta os resultados da indução para expressão do peptídeo recombinante MPm7 utilizando o Protocolo 2 (Meio de cultura acrescido com ampicilina (100 µg/ml); DO<sub>600</sub> inicial em ~1,0 ; 0,5 mM de IPTG; Temperatura de indução em 24°C e Tempo de indução em 16 horas), descrito no item 4.3.2, nas frações solúvel (SOL) e insolúvel (INS).

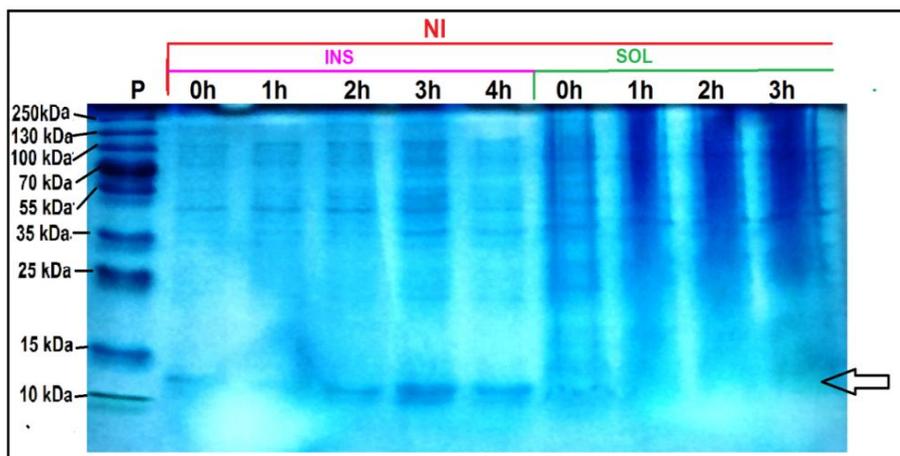


**Figura 7:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15 % corado com *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Scientific). **P:** padrão (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific*); **INS 0h:** Amostra insolúvel não induzida; **INS 16h:** Amostra insolúvel induzida; **SOL 0h:** Amostra solúvel não induzida; **SOL 16h:** Amostra solúvel induzida. **Seta:** indicando as bandas no tamanho esperado do peptídeo recombinante (14,9 kDa).

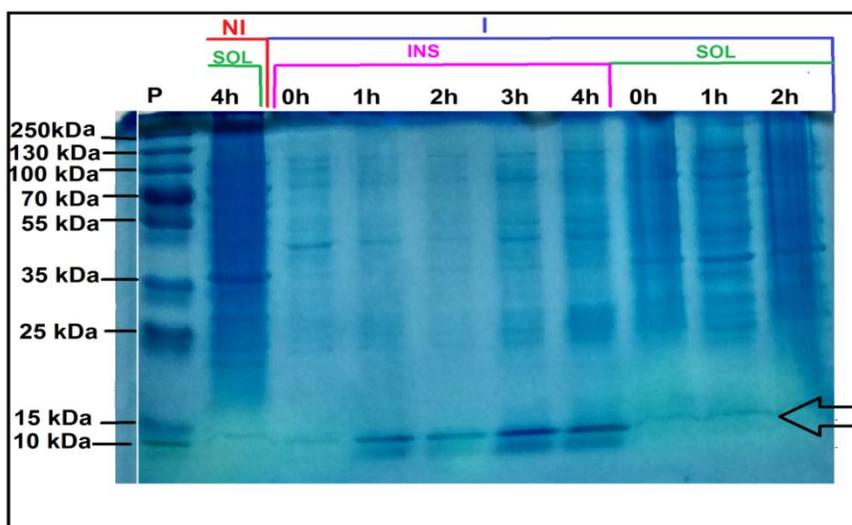
Pode-se observar na **Figura 7** que a amostra na fração insolúvel coletada no tempo 0 hora, ou seja, que não foi induzida (**INS 0h**), apresentou banda com baixa intensidade, indicando grande redução da expressão basal quando comparada a amostra induzida, coletada após 16 horas (**INS 16h**), que apresentou banda mais intensa na altura de 15 kDa. As frações insolúveis também apresentaram ausência quase completa de outras bandas, referentes a expressão de proteínas da própria bactéria. Porém, o mesmo não ocorreu nas frações solúveis, que apresentaram a mesma intensidade de banda nas amostras induzida (**SOL 16h**) e não induzida (**SOL 0h**).

### 5.2.3. Protocolo 3

As **Figuras 8 e 9** apresentam os resultados da indução para expressão do peptídeo recombinante MPm7 utilizando o Protocolo 3 (Bactéria de expressão *E. coli* BL-21 (DE3) *pLysS*, meio de cultura acrescido com ampicilina (100 µg/ml); DO<sub>600</sub> inicial em 0,4 - 0,6 ; 0,8 mM de IPTG; Temperatura de indução em 37°C e Tempo de indução em 4 horas), descrito no item 4.3.3, para os tempos de indução em 0, 1, 2, 3 e 4 horas, nas frações solúvel (SOL) e insolúvel (INS), para amostras induzidas e não induzidas.



**Figura 8:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 16 % corado com *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Scientific). **P:** padrão (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific*); **NI INS 0h:** Amostra não induzida solúvel com 0 hora; **NI INS 1h:** Amostra não induzida solúvel com 1 hora; **NI INS 2h:** Amostra não induzida solúvel com 2 horas; **NI INS 3h:** Amostra não induzida solúvel com 3 horas; **NI INS 4h:** Amostra não induzida solúvel com 4 horas; **NI SOL 0h:** Amostra não induzida insolúvel com 0 hora; **NI SOL 1h:** Amostra não induzida insolúvel com 1 hora; **NI SOL 2h:** Amostra não induzida insolúvel com 2 hora; **NI SOL 3h:** Amostra não induzida insolúvel com 3 hora. **Seta:** indicando as bandas no tamanho esperado do peptídeo recombinante (14,9 kDa).



**Figura 9:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 16 % corado com *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Scientific). **P:** padrão (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific*); **NI SOL 4h:** Amostra não induzida solúvel 4 horas; **I INS 0h:** Amostra induzida insolúvel 0 hora; **I INS 1h:** Amostra induzida insolúvel 1 hora; **I INS 2h:** Amostra induzida insolúvel 2 horas; **I INS 3h:** Amostra induzida insolúvel 3 horas; **I INS 4h:** Amostra induzida insolúvel 4 horas; **I SOL 0h:** Amostra induzida solúvel 0 hora; **I SOL 1h:** Amostra induzida solúvel 1 hora; **I SOL 2h:** Amostra induzida solúvel 2 horas. **Seta:** indicando as bandas no tamanho esperado do peptídeo recombinante (14,9 kDa).

Os resultados dessa expressão (**Figuras 8 e 9**) mostraram-se inconclusivos, devido à presença de machas nos géis exatamente na altura esperada das bandas do peptídeo de interesse (15kDa). Pode-se apenas observar que houve expressão nas frações insolúveis das amostras induzidas, não sendo possível afirmar se houve ou não maior expressão em uma das frações.

## 6. Discussão

O presente trabalho teve como objetivo padronizar a metodologia de expressão de uma variante (MPm7) do peptídeo, antimicrobiano e quelante de cobre, denominado microplusina. A microplusina é rica em resíduos de histidina e estas, juntamente com outros resíduos de aminoácidos, podem estar envolvidos na formação de seu sítio quelante de cobre. O sequestro de cobre do meio de cultura parece ser um dos principais mecanismos pelo qual a microplusina inibe o crescimento microbiano, tornando este metal indisponível para enzimas cobre dependentes (SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011). A

variante MPm7 não possui as histidinas amino-terminais H1 e H2, a histidina H-74 e as histidinas presentes em sua cauda carboxi-terminal (SILVA *et al.*, 2009), o que pode afetar a sua atividade.

Para expressão de MPm7, inicialmente foi utilizado o Protocolo 1 de expressão recombinante, protocolo este utilizado em estudos anteriores para a expressão da microplusina em sua sequência original (ESTEVES *et al.* 2009). A intenção foi analisar se o peptídeo, mesmo com sua sequência alterada, poderia ser expresso nas mesmas condições. Esse protocolo utilizou como bactéria de expressão a *E.coli* BL-21 DE3, um meio altamente enriquecido (*CircleGrow*®), temperatura de indução de 37°C, densidade celular inicial entre DO<sub>600</sub> 0,4 - 0,6 e concentração do indutor IPTG em 0,8 mM. Analisando os resultados dessa expressão (**Figuras 5 e 6**) pode-se notar que houve expressão da proteína, mas sem grandes diferenças entre as frações solúveis e insolúveis. Também foi detectada uma expressão basal na amostra não induzida (**tempo de 0h nas Figuras 5 e 6**).

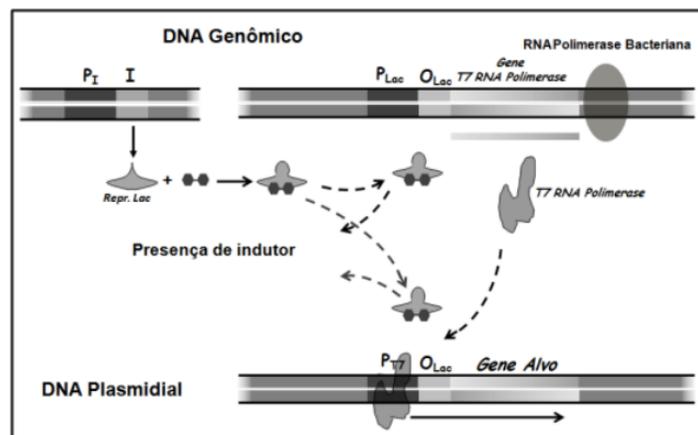
A expressão basal pode causar toxicidade ao meio, levando a uma baixa expressão do peptídeo. Já uma expressão predominante na fração solúvel viabiliza um maior rendimento protéico na etapa de purificação (GERMAN e CECCARELLI, 2014). Portanto, com o intuito de otimizar o Protocolo 1 para obter uma metodologia de expressão mais eficiente, parâmetros relacionados à redução da expressão basal e à expressão predominante na fração solúvel foram modificados no Protocolo 2.

O Protocolo 2 foi elaborado com base na metodologia de expressão descrita por SIVASHANMUGAM *et al.* (2009), utilizando uma menor temperatura de indução (24°C), uma densidade celular inicial elevada (DO<sub>600</sub> ~1), uma concentração menor do agente indutor IPTG (0,5 mM) e um tempo de indução mais prolongado (*overnight* : ~16 horas).

Segundo GRÄSLUND *et al.* (2008) uma característica do sistema que possui promotor T7 é que frequentemente ocorre a precipitação de proteínas recombinantes quando a indução ocorre na temperatura de 37 °C, porém quando a indução ocorre em temperaturas entre 15-25 ° C a expressão das proteínas ocorre predominantemente nas frações solúveis, isso porque menores taxas de produção de proteína permitem que o tempo de transcrição de proteínas recombinantes dobre. Como a T7 RNA polimerase é 20 X mais ativa, é aconselhável que sua indução ocorra no final da fase logarítmica da

curva de crescimento ( $DO_{600} \sim 1,0$ ) para assegurar um rendimento máximo, evitando os problemas associados com as células em condições de superpopulação da fase estacionária, onde pode inclusive ocorrer à indução de proteases (GRÄSLUND *et al*, 2008).

Os principais plasmídeos de expressão utilizam os promotores Lac, Tac e T7. O vetor pRSET (plasmídeo de expressão utilizado neste trabalho) possui alto nível de expressão procariótica controlada pelo promotor T7. A expressão utilizando o vetor pRSET é induzida pela produção da T7 RNA polimerase em células BL21 (DE3) de *E. coli* (Manual *pRSET A, B and C, Invitrogen*). A vantagem deste promotor é que esta RNA polimerase é 20X mais ativa do que a bacteriana e, conseqüentemente, o nível de expressão protéica é bem maior. Neste sistema, a indução da expressão da proteína de interesse é indireta. Primeiramente, ocorre a indução direta do gene da T7 RNA polimerase, presente no DNA genômico, que está sob controle do promotor Lac. Na presença de indutor (IPTG), o repressor Lac não se liga no promotor Lac e a T7 RNA polimerase é expressa. Ao ser traduzida, a proteína T7 RNA polimerase se liga em sua região promotora presente no plasmídeo pRSET e, então, o gene de interesse é transcrito, sendo a seguir expressa a proteína (GRÄSLUND *et al*, 2008). A **Figura 10** exemplifica esse sistema.



**Figura 10:** Esquema de indução do sistema PRSET. Na presença de indutor (●●), o repressor Lac (Repr.Lac) não se liga no promotor Lac (OLac) e a T7 RNA polimerase é expressa. Esta então se liga em seu promotor presente no DNA plasmidial, transcrevendo o gene de interesse e expressando a proteína (MIYAMOTO, 2013).

Analisando o resultado da expressão com o Protocolo 2 (**Figura 7**) pode-se observar que a expressão basal da fração insolúvel reduziu significativamente, porém não houve diferença na fração solúvel entre induzido e não induzido, indicando inclusive baixa expressão do peptídeo de interesse se comparado ao Protocolo 1.

Segundo SIVASHANMUGAM *et al.* (2009), a otimização das condições de expressão bacteriana parece ser dependente da proteína. Grande parte dos esforços tem sido concentrada na melhoria da densidade celular no ambiente de fermentação, porém as condições de expressão bacteriana, tais como o nível de O<sub>2</sub>, pH, e nutrientes, pode ser melhor controlada usando um fermentador, alcançando uma densidade celular elevada. Em contraste, estas condições de expressão são difíceis de controlar usando uma incubadora com agitação normal, e, portanto, obtém-se uma densidade de células muito mais baixa. Até mesmo sistemas onde se consegue atingir uma alta densidade celular inicial, sem as condições de laboratório adequadas, ocorrem várias desvantagens, incluindo a perda de plasmídeo, limitada disponibilidade de oxigênio dissolvido, e aumento dos níveis de dióxido de carbono, reduzindo significativamente o pH do meio. Esses problemas muitas vezes causam uma baixa, ou mesmo ausência, de expressão peptídica, mesmo com uma cultura celular de alta densidade, como pode ter ocorrido nos resultados obtidos com o Protocolo 2, que apresentaram baixa expressão peptídica mesmo utilizando-se inicialmente uma elevada densidade celular. Essa baixa expressão do peptídeo também pode ser consequência da expressão basal ainda presente na fração solúvel, que pode ter sido tóxico à bactéria.

O problema da toxicidade pode surgir quando a proteína recombinante executa uma função desnecessária e prejudicial na célula hospedeira. Esta função interfere com a proliferação normal do microrganismo e o resultado é uma taxa de crescimento mais lenta, uma baixa densidade celular final e, por fim, a morte celular. Por isso é necessário o monitoramento do crescimento celular antes da indução, pois se a taxa de crescimento da estirpe recombinante for mais lenta em comparação com uma estirpe de vetor vazio, pode significar que há uma toxicidade genética ou uma expressão basal do mRNA tóxico (GERMAN e CECCARELLI, 2014).

Segundo GERMAN e CECCARELLI (2014), a expressão basal pode ser controlada pela co-expressão da T7 lisozima, que é um inibidor natural da T7 RNA polimerase. A T7 lisozima se liga a T7

RNA polimerase, inibindo assim o início da transcrição do gene de interesse a partir do promotor T7, suprimindo a expressão basal antes da indução. Deste modo, se pequenas quantidades de T7 RNA polimerase eram produzidas antes da indução por causa da expressão basal do seu gene, a T7 lisozima irá efetivamente controlar a expressão não intencional de genes heterólogos colocados sob o promotor de T7. A T7 Lisozima é produzida por um plasmídeo da estirpe da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ou pLysE. Após a indução, o montante de T7 RNA polimerase produzido acaba por inibir a T7 lisozima, liberando a expressão do peptídeo de interesse. Sendo assim, o Protocolo 3 teve por intuito verificar se a expressão basal seria controlada utilizando-se a bactéria de expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Este protocolo manteve as mesmas condições do Protocolo 1 (Temperatura de indução de 37°C, densidade celular inicial entre DO<sub>600</sub> 0,4 - 0,6 e concentração do indutor IPTG em 0,8 mM), afim de ter parâmetros para comparar apenas a eficiência da bactéria.

Os resultados dessa expressão (**Figuras 8 e 9**) mostraram-se inconclusivos, devido uma baixa resolução do gel de poli-acrilamida 16%, não sendo possível avaliar efetivamente se a expressão com a bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foi capaz de controlar a expressão basal. Na altura do tamanho esperado do peptídeo recombinante não foi possível visualizar as bandas nas frações solúveis devido à presença de manchas no gel, sendo possível observar bandas apenas nas frações insolúveis, o que neste caso não é possível afirmar se houve ou não maior expressão em uma das frações.

## 7. Conclusão

As metodologias empregadas para a expressão recombinante da variante da microplusina (MPm7) se mostraram adequadas, pois em todos os resultados pode-se observar a presença de bandas mais intensas na altura esperada do peptídeo (15 kDa), com exceção das frações solúveis no Protocolo 3 devido a baixa resolução do gel de poli-acrilamida. Porém, os resultados mostraram-se inconclusivos com relação ao melhoramento da expressão na fração solúvel e no controle da expressão basal nas amostras não induzidas. Será necessário correr novamente as amostras da expressão do Protocolo 3 em gel de poli-acrilamida ou então repetir a indução nas mesmas condições, a fim de obter resultados mais conclusivos sobre o papel da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS na redução da expressão basal de MPm7.

Contudo, para fins de expressão do peptídeo recombinante MPm7, pode-se concluir que o Protocolo 1 até o momento mostrou-se o mais adequado, podendo-se dar prosseguimento a purificação do peptídeo e posteriores análises estruturais e funcionais da variante da microplusina.

## 8. Referências Bibliográficas

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel)**, New York, v.6, n.12, p. 1543-1575, nov. 2013.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Microbiol**, [s.l.], v.3, n.3, p. 238-50, dez. 2005.

CORBIN, B.D. *et al.* Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. **Science**, [s.l.], v.319, n.5865, p. 962-5, jan. 2008.

ESTEVEZ, E. *et al.* Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Dev Comp Immunol**, [s.l.], v.33, n.8, p. 913-9, jan.2009.

FOGAÇA, A. C. *et al.* Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, São Paulo, v.28, n.3, p.191-200, mar. 2004.

GERMAN, L.; CECCARELLI, E. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 5, n.172 , p.1-17 , abr.2014.

GRÄSLUND, S. *et al.* Protein production and purification. **Nat Methods**, New York, v.5, n.2, p.135-146, fev.2008.

GUANÍ-GUERRA, E. *et al.* Antimicrobial peptides: general overview clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, León Guanajuato, v.135, p.1-11, jan.2010.

HARRIS, F. *et al.* Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Curr Protein Pept Sci**, [s.l.], v.10, n.6, p. 585-606, jul.2009.

HORN, D. ; BARRIENTOS, A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. **IUBMB Life**, [s.l.], v. 60, n.7, p. 421-9, jul.2008.

KAVANAGH, K. *et al.* Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **J Pharm Pharmacol**, [s.l.], v. 56, n.3, p. 285-9, mar.2004.

LAI, R. *et al.* An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Kunming, v.295, n.4, p.796-799, jul.2002.

LAI, Y ; GALLO, R. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, San Diego, v.30, n.3, p.131-141, mar.2009.

MANSOUR, S.C. *et al.* Host defense peptides: front-line immunomodulators. **Trends in Immunology**, Vancouver, v.35, n.9, p.443-450, set.2014.

MIYAMOTO, C. Produção de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli*. **Revista Conexão Eletrônica**, Três Lagoas, v.10, n.1, p.220-233, 2013. Disponível em: <<http://www.aems.edu.br/conexao/educacaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/1/21.pdf>>. Acesso em: 10 abril de 2015.

NAKATSUJI, T.; GALLO, R.L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. **J Invest Dermatol**, [s.l.], v.132, n.3, p. 887-95, set. 2012.

NOSANCHUK, J.D. ; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother**, [s.l.], v. 50, n.11, p. 3519-28, mar.2006.

PARK, B.J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, [s.l.], v.23, n.4, p. 525-30, mar.2009.

PRADO, M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [s.l.], v.104, n.3, p. 513-21, jan.2009.

*Life Technologies* (2010), “*Manual of pRSET A, B and C - Invitrogen by Life Technologies*”. Disponível em: <[https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/prset\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/prset_man.pdf)>. Acesso em: 10 abril de 2015.

PUSHPANATHAN, M. *et al.* Antimicrobial Peptides: versatile biological properties. **International Journal of Peptides**, [s.l.], v.2013, p.1-15, jun.2013.

REZENDE, C.A. *et al.* (1)H, (15) N and (13)C assignments of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* anti-microbial peptide microplusin. **Biomol NMR Assign**, [s.l], v. 3, n.2, p.187-9, jan.2009.

SILVA, F.D. *et al.* Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, São Paulo, v.284, n.50, p.34735-34746, dez.2009.

SILVA, F.D. *et al.* Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiol Lett**, São Paulo, v. 324, n.1, p.64-72, nov.2011.

SIVASHANMUGAM *et al.* Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Science**, Detroit, v.18, p.936-948, mar.2009.

WARD, R.J.; DEXTER, D.T.; CRICHTON, R.R. Chelating Agents for Neurodegenerative Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l], v.19, p.2760-2772, jan.2012.

YU, Y. *et al.* Iron Chelators for the Treatment of Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l], v.19, p.2689-2702, jan.2012.

ZARAGOZA, O. *et al.* The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, [s.l], v. 68, p. 133-216, jan.2009.

ZHU, X. ; WILLIAMSON, P.R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, [s.l], v. 5, n.1, p. 1-10, mar.2004.