



Universidade Federal do ABC

Centro de Ciências Naturais Humanas - CCNH

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE
SERINO PEPTIDASES PROCARIÓTICO**

Bernard Robin Carneiro de Rezende

RA 11016308

Santo André

2014



Universidade Federal do ABC

Centro de Ciências Naturais Humanas - CCNH

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE
SERINO PEPTIDASES PROCARIÓTICO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel
em Química, Centro de Ciências Naturais
Humanas, Universidade Federal do ABC.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Puzer

Santo André

4 de fevereiro de 2014

Agradecimentos

Ao professor Luciano pela confiança e dedicação.

Aos meus amigos no laboratório 407-3 pela descontração.

Aos meus amigos Lucas, Silvia e Jocélia também pela colaboração e paciência.

Aos professores Sérgio e Márcia pelo apoio em etapas cruciais do trabalho.

“Você vê as coisas e pergunta ‘por quê?’ Mas eu sonho com o que nunca foi e pergunto
‘por que não?’ .”

George Bernard Shaw

Sumário

Resumo.....	6
1. Introdução	7
2. Objetivos	11
3. Materiais e Metodologia.....	12
3.1 Clivagem do plasmídeo pBS-k ecotina 9	12
3.2 Clonagem dos fragmentos da ecotina no vetor de expressão pET-28a(+)	13
3.3 Transformação da bactéria <i>E. coli</i> BL21 (D3) com os plasmídeos recombinantes.....	13
3.4 Expressão da proteína recombinante ecotina 9	13
3.5 Purificação da proteína recombinante ecotina 9.....	14
3.6 Repetição da expressão e purificação em células de <i>E. coli</i> linhagem Rosetta.....	15
3.7 Repetição da expressão e purificação em células Rosetta com protocolo de recuperação de corpos de inclusão	15
4. Resultados e Discussão	16
4.1 Clivagem do plasmídeo pBS-k ecotina 9	16
4.2 Clonagem dos fragmentos da ecotina no vetor de expressão pet-28a(+)	17
4.3 Expressão da proteína recombinante ecotina 9	18
4.4 Purificação da proteína recombinante ecotina 9.....	19
4.5 Repetição da expressão e purificação em células de <i>E. coli</i> linhagem Rosetta.....	21
4.6 Repetição da expressão e purificação em células Rosetta com protocolo de recuperação de corpos de inclusão	24
5. Conclusão	25
6. Bibliografia	26

Resumo

As serino peptidases são proteínas membros de uma família de enzimas proteolíticas que inclui tripsina, quimotripsina e elastase. Ecotinas são proteínas que pertencem a uma família de inibidores de serino peptidases limitadas a bactérias e protozoários. Em bactérias, apesar de algumas poucas exceções, proteínas semelhantes às ecotinas são exclusivamente encontradas nas diferentes espécies de proteobactérias, especialmente na subdivisão gama, classe constituída, entre outras, pela *Escheria Coli*, *Salmonella*, *Yerstinia Pestis*, *Vibrio Cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, organismos envolvidos respectivamente na disenteria, salmonela, peste negra, cólera e pneumonia. Atualmente sabe-se que as ecotinas apresentam uma estrutura dimérica onde cada monômero tem cerca de 120 resíduos de aminoácidos . Desta forma, as ecotinas são capazes de interagir com duas proteases ao mesmo tempo, formando uma estrutura tetramérica. Neste trabalho a ecotina de *Prochlorococcus marinus* foi expressa em linhagens BL21(DE3) e Rosetta de *E. coli* através da ligação de seu gene em plasmídeo de expressão pet-28a(+), transformação destas células por sensibilização utilizando cloreto de cálcio e cloreto de magnésio e indução utilizando IPTG. Foram feitas 3 tentativas de purificação da ecotina por FPLC com coluna His-Trap, na linhagem BL21(DE3), linhagem Rosetta e na linhagem Rosetta com tratamento de recuperação de corpos de inclusão de Burgess. Não foi possível a purificação da proteína e pretende-se realizar novos ensaios para verificação da presença da calda de histidina na proteína, modelagem molecular desta, e estudo de outras técnicas de recuperação de corpos de inclusão.

1. Introdução

As serino peptidases são proteínas membros de uma família de enzimas proteolíticas que inclui tripsina, quimotripsina e elastase. Seu nome deriva da cadeia lateral de um aminoácido serina ser parte do centro reativo de todas as enzimas desta família, participando diretamente na reação de quebra de ligações peptídicas.¹ Enzimas desta família são encontradas em eucariontes, procariontes, archaea e vírus, estando envolvidas em diversos processos fisiológicos importantes, incluindo digestão, homeostasia, apoptose, reprodução e resposta imune. Quase um terço de todas as proteases conhecidas pode ser classificado como serino peptidases.²

A quebra das ligações peptídicas pelas serino peptidases é uma hidrólise catalisada pelo seguinte mecanismo:

- Ativação da ligação amida entre os peptídeos do substrato por um grupo ácido da enzima, o que pode também distorcer esta ligação peptídica e interferir com sua estabilização por ressonância;
- Aumento da nucleofilicidade da água por um grupo básico e
- Protonação dos grupos amino dos peptídeos envolvidos antes de sua expulsão.

Nas serino peptidases “clássicas”, como tripsina e quimotripsina, essa catálise é realizada por um sistema de troca de carga, a tríade catalítica ácido aspártico-histidina-serina (Asp-His-Ser), presente no cerne do centro reativo destas enzimas (Figuras 1 e 2):

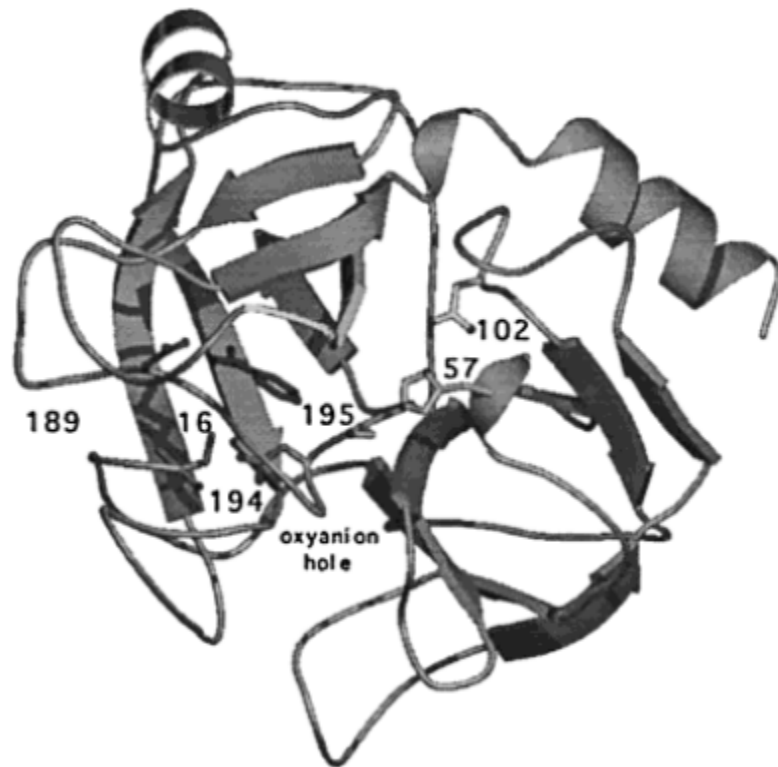


Figura 1: Estrutura da quimotripsina, os resíduos 195, 102 e 57 indicam respectivamente a serina, ácido aspártico e histidina da tríade catalítica. ²

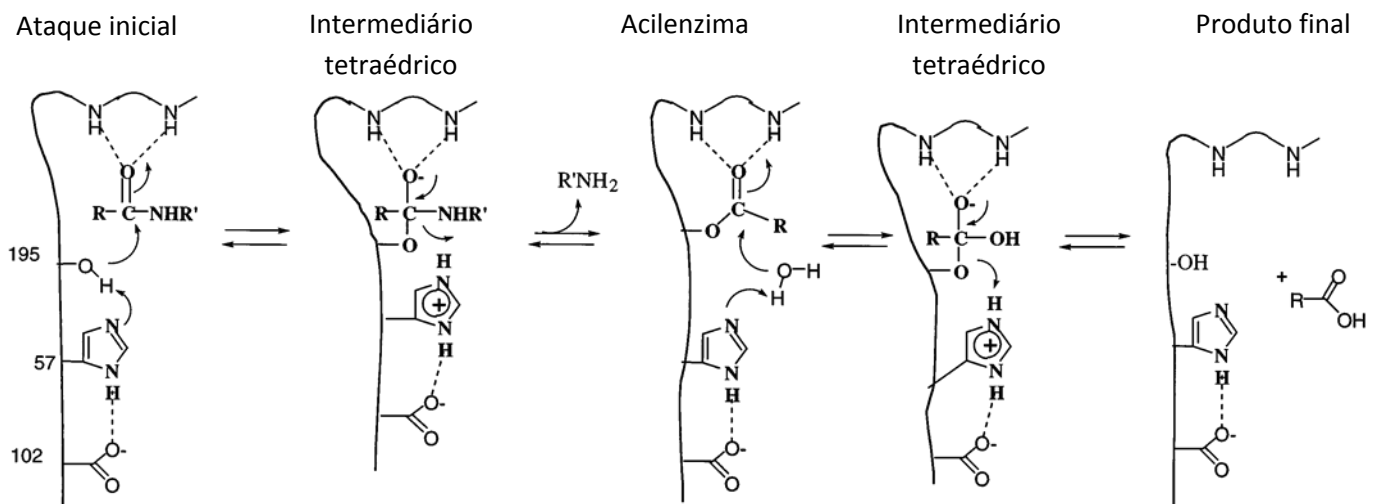


Figura 2: Mecanismo da hidrólise de ligações peptídicas catalisada por quimotripsina. Os resíduos 195, 57 e 102 referem-se respectivamente a Ser, His, e Asp, os grupos amino indicados são de resíduos da cadeia principal da enzima. ²

Ecotinas são proteínas que pertencem a uma família de inibidores de serino peptidases limitadas a bactérias e protozoários. Em bactérias, apesar de algumas poucas exceções, proteínas semelhantes às ecotinas são exclusivamente encontradas nas diferentes espécies de proteobactérias, especialmente na subdivisão gama, classe constituída, entre outras, pela *Escheria Coli*, *Salmonella*, *Yerstinia Pestis*, *Vibrio Cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, organismos envolvidos respectivamente na disenteria, salmonela, peste negra, cólera e pneumonia. A primeira ecotina descoberta foi isolada a partir de extratos de *E. coli* e caracterizada como uma proteína periplasmática de 38 kDa resistente à fervura e estável em pH 1,0 que inibiu a tripsina, quimotripsina e elastase pancreática, envolvidas no processo de digestão do ser humano ³. Posteriormente outros trabalhos surgiram mostrando a capacidade dessas proteínas para inibir a ação de enzimas como o fator Xa e elastase de neutrófilos humanos ⁴ envolvidos na cascata de coagulação e na resposta de anti-corpos ; caliceína plasmática, uroquinase e fator XII ⁵; colagenase e granzima B ⁶. Além disso, recentemente mostrou-se que ecotinas podem contribuir para a patogenicidade da *Yersinia pseudotuberculosis* pela inibição de serino proteases do hospedeiro. ⁷

Atualmente sabe-se que as ecotinas apresentam uma estrutura dimérica onde cada monômero tem cerca de 120 resíduos de aminoácidos (Figura 3) ⁸. Desta forma, as ecotinas são capazes de interagir com duas proteases ao mesmo tempo, formando uma estrutura tetramérica (Figura 4). As ecotinas possuem uma alça, chamada alça do centro reativo, responsável pela interação com o sitio de catálise da protease. A especificidade primária pela alça do centro reativo, nas ecotinas, parece não representar um fator determinante para a inibição. A posição P1 dessa alça, que é a posição ocupada pelo aminoácido cuja ligação peptídica será clivada pela protease, é ocupada por um resíduo de metionina (Met) que, a princípio, seria um fator impeditivo para a interação com

enzimas do tipo semelhante à tripsina, que preferem resíduos básicos nessa posição P1, como arginina (Arg) e lisina (Lys). No entanto, a ecotina isolada de *E. coli* possui uma constante de inibição $K_i = 0,91$ nM para a inibição da tripsina de rato. Mutações sítio dirigidas nessa posição, substituindo a Met por Arg, Lys, fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp), modificaram o valor de K_i para 0,4 nM, 0,6 nM, 4,4 nM e 2,2 nM, respectivamente ⁹.

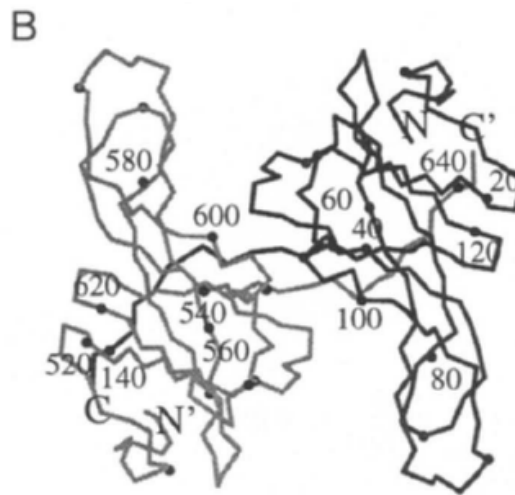


Figura 3: Estrutura do dímero da ecotina de *E. coli*. ⁸

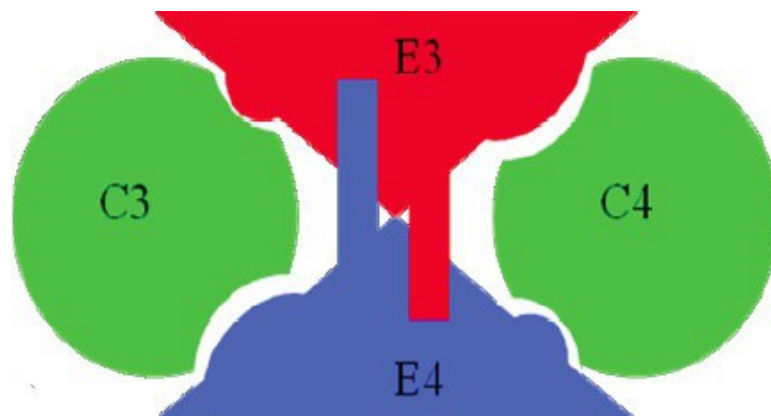


Figura 4: Ilustração do complexo tetramérico do dímero de ecotinas, identificadas como E3 e E4, com duas serino peptidases, identificadas como C3 e C4. ⁷

O inibidor de que se trata este trabalho é uma ecotina encontrada em *Prochlorococcus marinus*, uma cianobactéria marinha cujo gênero *Prochlorococcus* responde pela produção de aproximadamente 50% do oxigênio atmosférico ¹⁰ e tem a distinção de possuir uma arginina na posição P2 (logo antes do sítio reativo na sequência em direção ao C-terminal da proteína), um aminoácido hidrofílico em vez da metionina hidrofóbica presente na ecotina de *E. coli* e sítios alostéricos diferentes dos encontrados nesta (Figura 5), características que alteraram sua especificidade e intensidade de inibição de proteases, podendo ser utilizada no desenvolvimento de inibidores sintéticos de serino peptidases envolvidas em processos patológicos ou de fármacos contrários a sua ação, lembrando-se do papel das ecotinas em processos infecciosos de alguns organismos que as possuem.

```

E. coli          MKT ILPAVLFAAF ATTSAWAAES VQPLEKIAPY PQAEGMKRQ
P. marinus      MQASIQNRIF FGLVVLWSTT VL----EPLR AIPRMDLNDY PQPIAGHQRW VIQLPGLLAK

E. coli          VIQLTPQEDE STLKVELLIG QTLEVDCNLH RLG-GKLENK TLEGWGYDY- YVFDKVS SPV
P. marinus      SSDPGLSTNA VDWRVQLIVG RTIQLVCNQY HLAGQGLRME RFQGAEQFML YSVAGAVKVM

E. coli          *120
                STMMACP-DG KKEKKFVTAY LGDAGMLRYN SKLPIVVYTP DNVDVKYRVW KAE-EKIDNA
P. marinus      STRMVCP PDE PKRESFLVLG -SKPYLV PYN ASFPIVVDVP DGLEVRWRLW KAEITQREAI

```

Figura 5: Alinhamento das sequências de ecotina de *E. coli* e *P. marinus*. As regiões em amarelo indicam os sítios de interação primária e as em verde os sítios alostéricos. O ponto de clivagem está indicado em vermelho e os aminoácidos P2 estão indicados em azul.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram a expressão, purificação e caracterização da ecotina de *Prochlorococcus marinus*.

3. Materiais e Metodologia

3.1 Clivagem do plasmídeo pBS-k ecotina 9

Inicialmente a sequência de DNA da ecotina de interesse, denominada ecotina 9 para fins de organização no laboratório, foi obtida no banco de dados online MEROPS¹¹ e o plasmídeo, vetor de estoque *pBlueScript-K* (pBS-k) com o inserto da ORF (região de abertura de leitura) da proteína, encomendado à empresa Epoch Life Science, Inc, EUA.

Esta construção pBS-ecotina 9, foi subclonada em bactérias DH5- α competentes segundo protocolo 1.25 descrito em “The Condensed Protocols,” 2006, p. 58-59¹². Para amplificação do plasmídeo, em tubo estéril de 50 mL, 5 mL de meio líquido LB (Luria-Bertani broth - Sigma-Aldrich, EUA) contendo 5 μ L de antibiótico ampicilina 50 mg/mL (pré-inóculo) foram inoculados com uma colônia isolada e submetidos a crescimento por 12h a 37°C em estufa com agitação contínua de 140 RPM.

Após o crescimento, as células tiveram seus DNA plasmidiais extraídos através do kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen, Alemanha).

O plasmídeo pBS-ecotina 9, juntamente com os plasmídeos pBS-ecotina 6 e pBS-ecotina 8 também testados na época e o vetor de expressão pET-28a(+) foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição NdeI e HindIII. Os produtos da digestão dos genes das ecotinas apresentam extremidades que permitem a ligação ao vetor de expressão pET-28a(+) digerido com as mesmas enzimas de restrição. As reações de digestão foram mantidas em banho a 37 °C por 24 horas para o gene e vetor. As digestões foram analisadas por eletroforese em gel de agarose ultrapura *TopVision Low Melting Point Agarose* (Fermentas, Canada) 1% (m/v) e os produtos de interesse purificados do gel utilizando-se kit *Wizard SV Gel and PCR clean-Up System* (Promega, EUA) e a quantificação de DNA foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis de microvolumes NanoDrop 2000.

3.2 Clonagem dos fragmentos da ecotina no vetor de expressão pET-28a(+)

As reações de ligação dos plasmídeos com os fragmentos de interesse foram realizadas variando-se as proporções de vetor e inserto, de modo a maximizar as chances de sucesso do experimento: 1:3 e 3:1 (vetor : inserto). As reações de ligação foram feitas na presença de T4 DNA ligase (Invitrogen) nas quantidades indicadas no protocolo descrito pelo fabricante. Primeiramente deixaram-se as reações incubadas em temperatura ambiente por uma hora e após esse período as reações foram mantidas a 4°C durante 24 horas. As ligações foram utilizadas para transformar células DH5 α competentes segundo protocolo já mencionado na seção 3.1.

A verificação da ligação foi realizada através da extração dos plasmídeos utilizando kit, incubação destes com as enzimas de restrição HinIII e NdeI e eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) de acordo com o mesmo procedimento seguido na seção 3.1, na época também estava sendo verificada a ligação dos plasmídeos pet28-ecotina 6 e pet28-ecotina 8.

3.3 Transformação da bactéria *E. coli* BL21 (D3) com os plasmídeos recombinantes

As transformações das células de *E. coli* da linhagem BL21 (D3) com os plasmídeos recombinantes das serpinas foram realizadas por choque térmico da mesma forma descrita no item 3.1. Essas células foram armazenadas para os experimentos de expressão.

3.4 Expressão da proteína recombinante ecotina 9

Os ensaios de expressão foram realizados na melhor condição de expressão para o gene da serpina, maximizando o seu rendimento. A expressão foi feita utilizando como pré-inóculo 5 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina (50 μ g/mL) e mantido a 37°C sob agitação de 250 rpm. Após 16 horas o pré-inóculo foi diluído 1:100 em 250

mL de meio LB contendo canamicina e incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm até atingir a densidade ótica a 550 nm de 0,5, quando então foi retirada uma alíquota de 10 mL da cultura (fração não induzida) e adicionado o indutor IPTG a 0,1 mM na cultura restante, ambas mantidas sob agitação nas mesmas condições por 20 horas. Foram separadas alíquotas antes da indução (0h), após 4h sem indutor, após 4h com indutor, após 20h sem indutor, após 20h com indutor.

Após as 20 horas, a cultura com indução foi dividida em 5 volumes de 25 mL e centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall Legend XTR. As células foram armazenadas a -20°C e os sobrenadantes descartados.

Na etapa seguinte as células foram ressuspensas em 10 mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0). As células foram rompidas utilizando-se um sonicador Vibra cell™ (Sonis & Materials Inc.) em uma amplitude de 50 mA durante 1 minuto, com intervalos de 30 segundos, em um total de 9 pulsos. O produto lisado foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm e 4°C para a separação das frações solúvel e insolúvel que em seguida foram analisadas em SDS-PAGE 12% para verificar a solubilidade da ecotina. Após esse teste foi possível verificar que a maior parte da proteína estava presente na parte solúvel, o que possibilitou a purificação através da cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel.

3.5 Purificação da proteína recombinante ecotina 9

A purificação pela técnica de cromatografia de afinidade visa separar as proteínas de acordo com suas diferentes afinidades por um ligante específico. A proteína ecotina 9 foi expressada ligada a um peptídeo contendo seis aminoácidos histidinas (6xHis), denominada cauda de histidina e que possibilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade. Foi utilizada nessa etapa uma coluna His-Trap

5 mL (GE, EUA) acoplada a um FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography* – cromatografia líquida e rápida de proteína) AKTA (GE, EUA).

O sobrenadante (extrato bruto) obtido após a lise foi carregado na coluna previamente lavada com tampão de carregamento (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 20 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0). Para a remoção de possíveis contaminantes que possam interagir com a resina de forma menos específica, a mesma foi lavada com um gradiente crescente de tampão de eluição (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 20 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). É feita a leitura da absorção a 255 nm das frações de saída do cromatógrafo, este comprimento de onda é aquele em que há máxima absorção pelas ligações peptídicas. As frações obtidas nessa purificação foram analisadas por SDS-PAGE 12%.

3.6 Repetição da expressão e purificação em células de *E. coli* linhagem Rosetta

Repetiu-se os métodos descritos nas seções 3.3 a 3.5 substituindo-se as bactérias BL21 (DE3) por bactérias Rosetta.

3.7 Repetição da expressão e purificação em células Rosetta com protocolo de recuperação de corpos de inclusão

Repetiu-se os métodos descritos nas seções 3.3 a 3.5 substituindo-se as bactérias BL21 (DE3) por bactérias Rosetta seguido do tratamento de corpos de inclusão descrito por Burgess ¹³ utilizando o tampão indicado com a adição de ureia a 8 M e depois fazendo a renaturação da proteína pela sua adição gota a gota ao mesmo tampão sem ureia diluindo a amostra 40 vezes antes da aplicação na coluna com níquel para purificação.

4. Resultados e Discussão

4.1 Clivagem do plasmídeo pBS-k ecotina 9

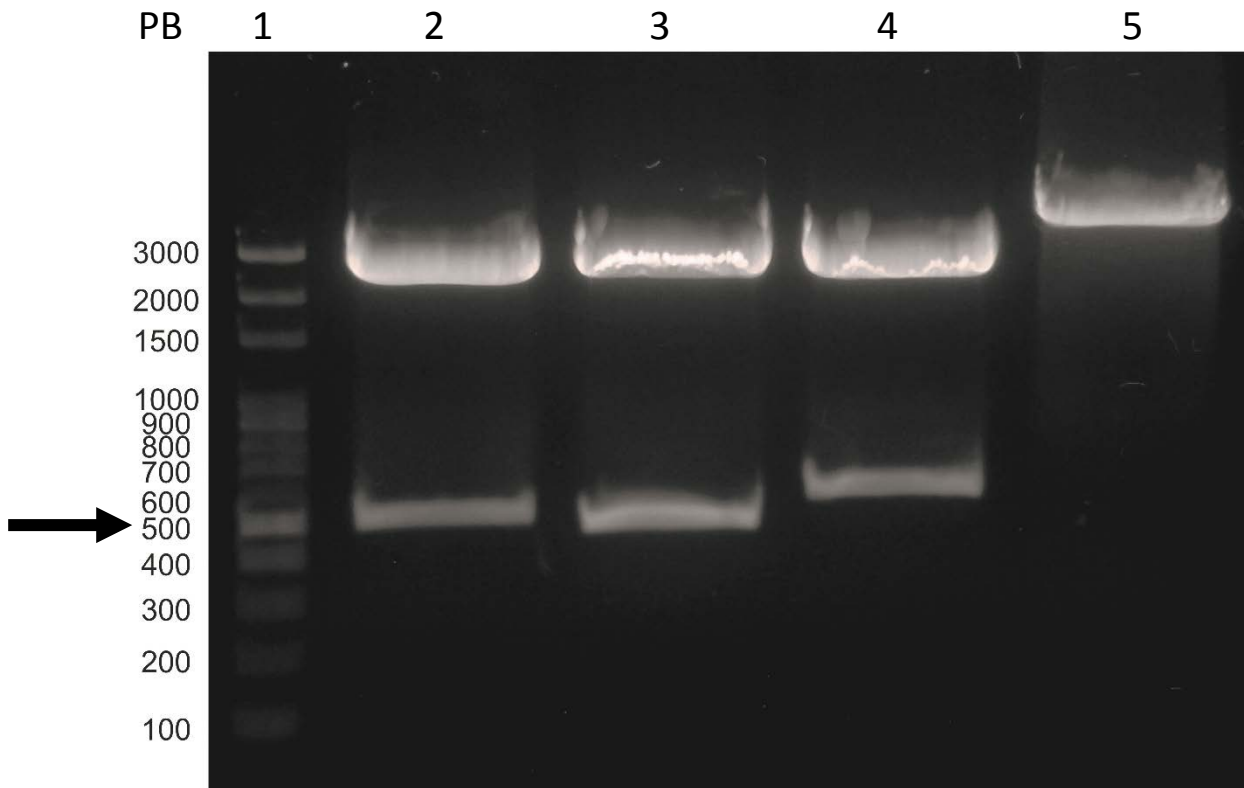


Figura 6. Gel de agarose 1% da clivagem de 3 ecotinas diferentes ligadas ao plasmídeo pBS e o plasmídeo pet-28a(+) para escala. (1) marcador de peso molecular, (2) pBS-ecotina 6, (3) pBS-ecotina 8, (4) pBS-ecotina 9, (5) pet28a. A seta indica o peso estimado dos genes de ecotina livres em pares de base.

Como se pode observar no gel da Figura 6, a clivagem dos plasmídeos estoque para liberação dos genes de interesse foi bem sucedida.

4.2 Clonagem dos fragmentos da ecotina no vetor de expressão pet-28a(+)

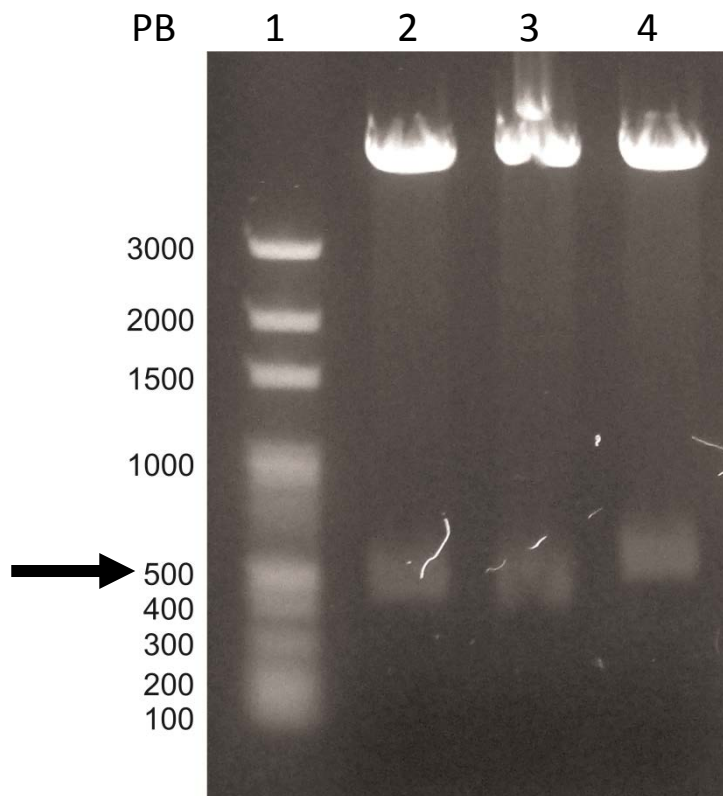


Figura 7. Gel de agarose 1% da clivagem de 3 ecotinas diferentes ligadas ao plasmídeo pet-28a(+). (1) marcador de peso molecular, (2) pet28a-ecotina 6, (3) pet28a -ecotina 8, (4) pet28a -ecotina 9. A seta indica o peso estimado dos genes de ecotina livres em pares de base.

Verifica-se no gel da Figura 7 que a ligação no plasmídeo pet-28a(+) e a subclonagem nas células DH5 α competentes foi realizada com sucesso.

4.3 Expressão da proteína recombinante ecotina 9

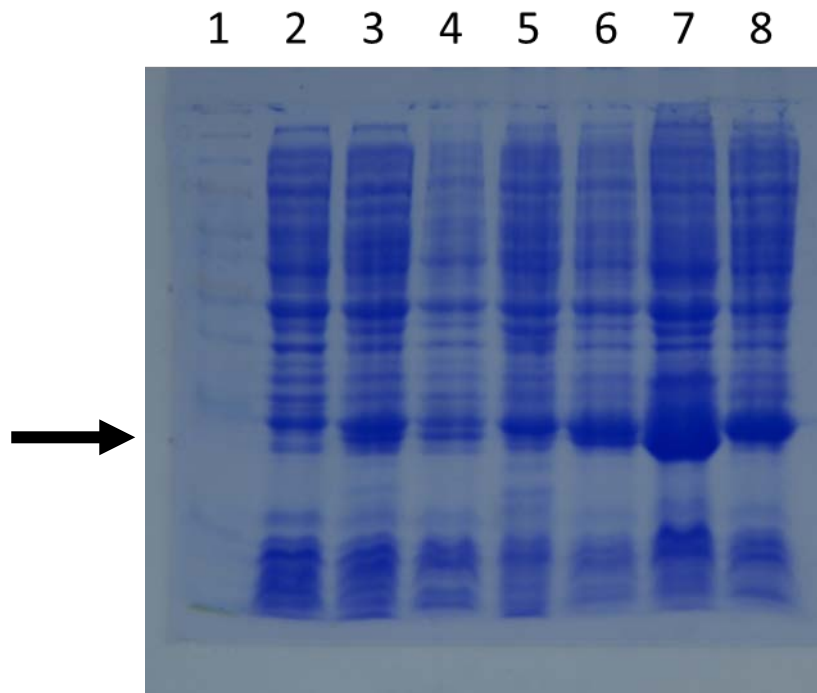


Figura 8. Gel de poliacrilamida 12% com alíquotas induzidas e não induzidas das células BL21-ecotina 9. (1) marcador de peso molecular, (2) fração não induzida 0h, (3) fração não induzida após 4h, (4) fração induzida após 4h, (5) fração não induzida após 20h, (6) fração induzida após 20h, (7) fração insolúvel da lise, (8) fração solúvel da lise. A seta indica a massa molecular da ecotina 9, 20 kDa.

Observa-se no gel de poliacrilamida da Figura 8 que há maior concentração da proteína de interesse na fração insolúvel e na fração solúvel após 20h de expressão. Visto a dificuldade de purificação de frações insolúveis, decidiu-se pela purificação da fração solúvel.

4.4 Purificação da proteína recombinante ecotina 9

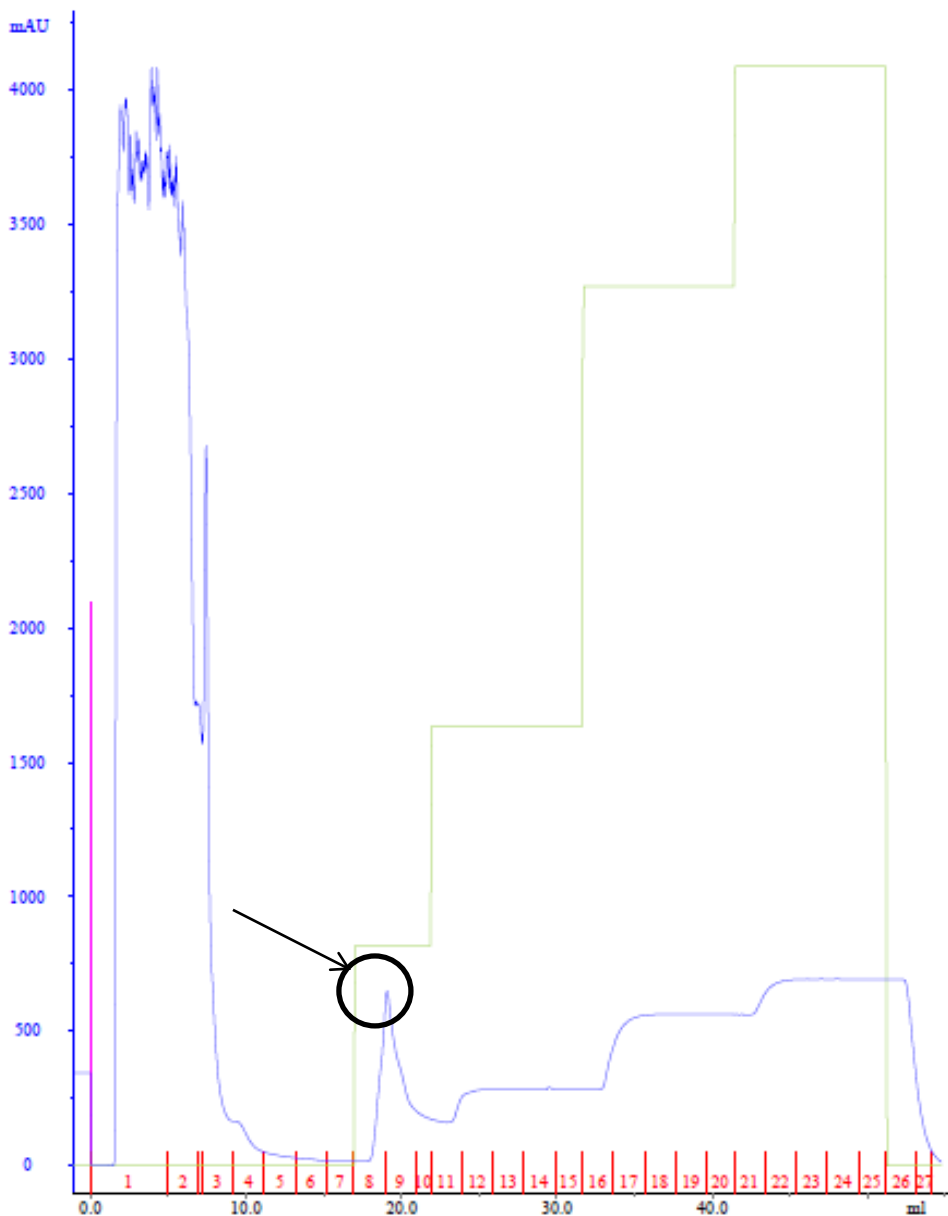


Figura 9. Cromatograma da purificação da fração solúvel da expressão da ecotina 9 com indicação do pico suspeito de conter a proteína pura. O eixo Y é a absorção das frações de saída do cromatógrafo a 255 nm.

Observa-se no cromatograma da Figura 9 um pico entre as frações 8 e 9 da eluição da coluna suspeito de conter a proteína purificada. Decidiu-se realizar um SDS-PAGE 12% com as frações 1,2, 8, 9, 10, 14, 19 e 24 da cromatografia para verificar se a proteína foi realmente purificada e se seu pico não estaria sendo mascarado pelo imidazol, que absorve no mesmo comprimento de onda que as ligações peptídicas.

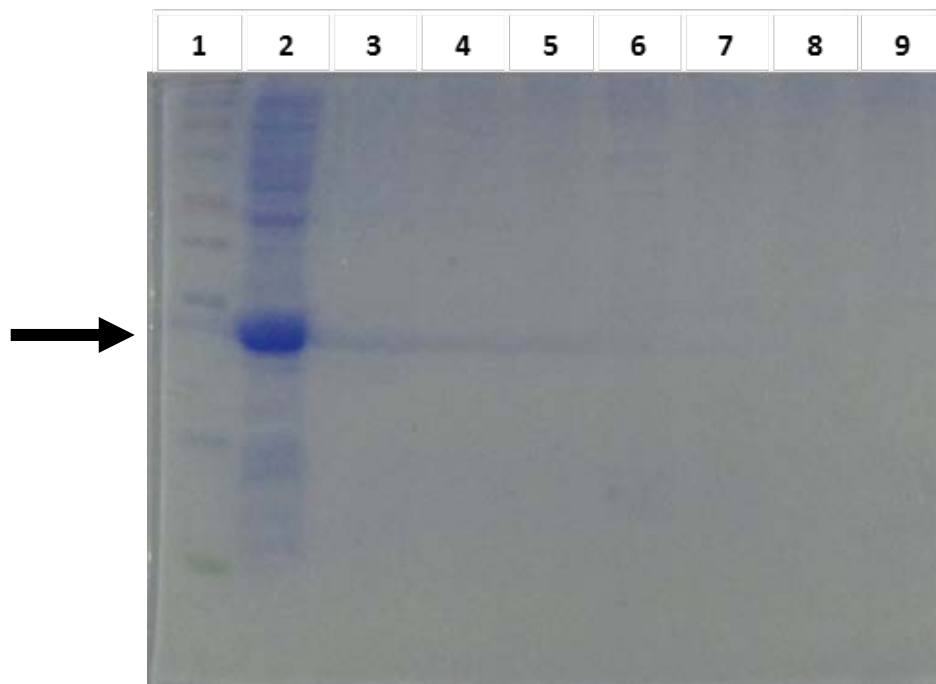


Figura 10. Gel de poli-acrilamida 12% com as frações de saída da purificação. (1) marcador de peso molecular, (2) fração 1, (3) fração 2, (4) fração 8, (5) fração 9, (6) fração 10, (7) fração 14, (8) fração 19, (9) fração 24. A seta indica a massa molecular da ecotina 9, 20 kDa.

Observa-se no gel de poli-acrilamida da Figura 10 que a única fração que continha a ecotina 9 era a fração 1, porém esta fração representa a primeira lavagem da coluna, o que significa que a proteína não conseguiu se ligar a coluna.

Com a chegada de novas linhagens de *E. coli* ao laboratório, foi escolhida a linhagem Rosetta para nova tentativa de expressão esperando-se que desta forma seria possível a purificação da ecotina 9.

4.5 Repetição da expressão e purificação em células de *E. coli* linhagem

Rosetta

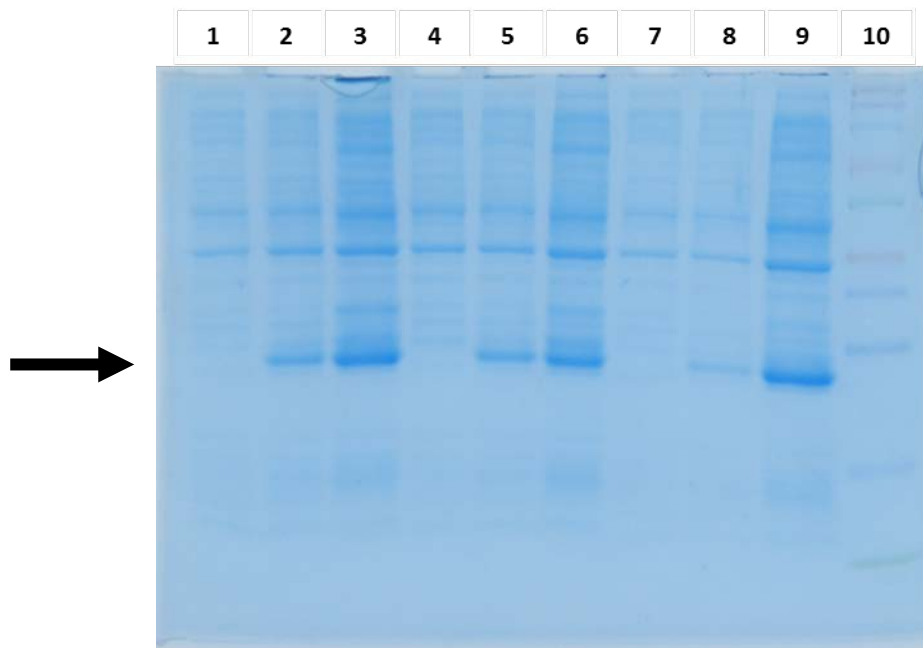


Figura 11. Gel de poliacrilamida 12% da expressão de três colônias transformadas Rosetta-ecotina 9. (1) colônia 1 sem indução, (2) colônia 1 após 4h de indução, (3) colônia 1 após 20h de indução, (4) colônia 2 sem indução, (5) colônia 2 após 4h de indução, (6) colônia 2 após 20h de indução, (7) colônia 3 sem indução, (8) colônia 3 após 4h de indução, (9) colônia 3 após 20h de indução, (10) marcador de peso molecular. A seta indica o peso molecular da ecotina 9, 20 kDa.

Observando-se o gel da Figura 11 percebe-se que as células Rosetta-ecotina 9 foram cultivadas com sucesso e que a expressão da ecotina 9 tem melhor desempenho após 20h de indução. Prosseguiu-se então com a lise e purificação do sobrenadante da expressão da colônia 3.

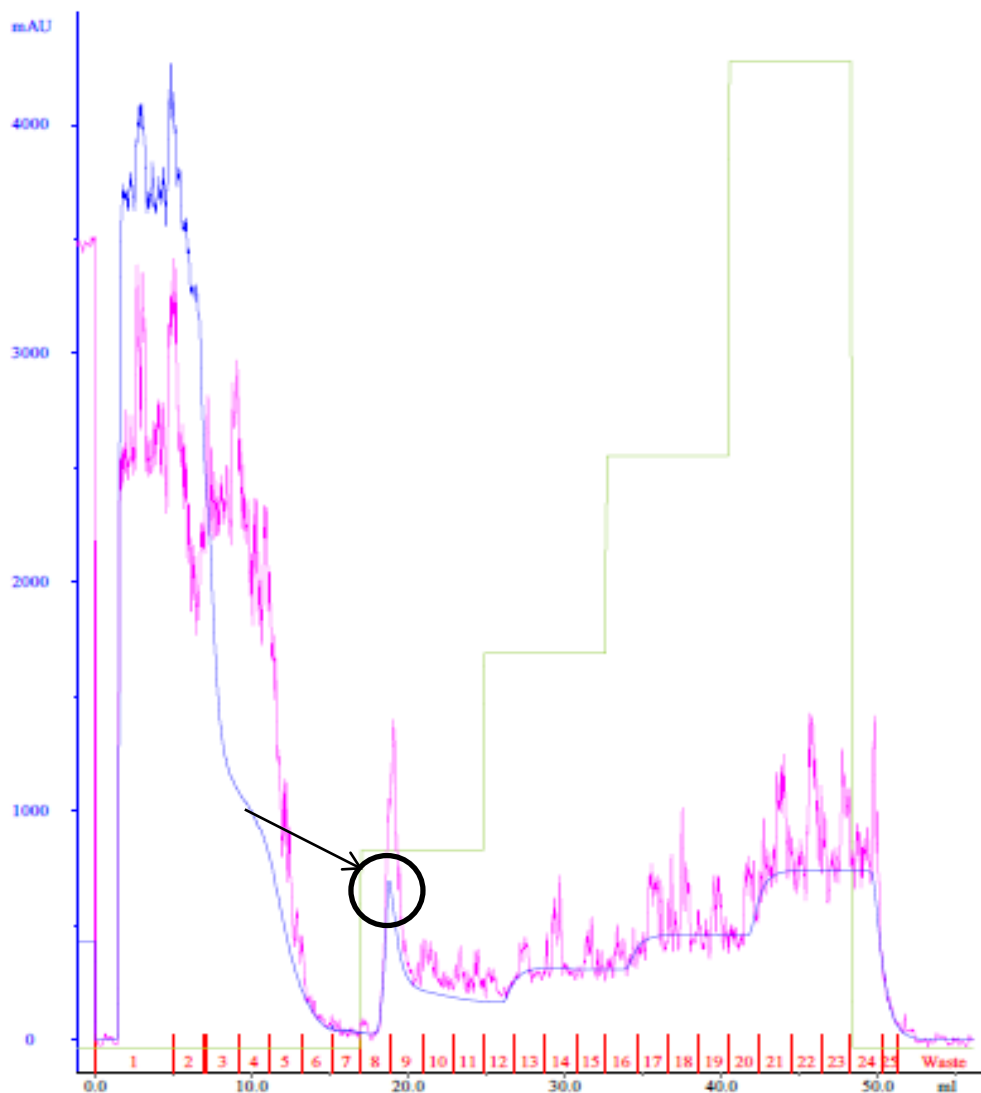


Figura 12. Cromatograma da purificação da fração solúvel da expressão da Rosetta-ecotina 9 com indicação do pico suspeito de conter a proteína pura. O eixo Y é a absorção das frações de saída do cromatográfico a 255 nm.

Observando-se o cromatograma da Figura 12 percebe-se novamente um pico entre as frações 8 e 9. Desta forma realizou-se um SDS-PAGE 15% com a cultura não induzida, a cultura com 20h de indução, as frações insolúvel e solúvel da lise e as frações 1,2, 4, 8 e 9 da cromatografia.

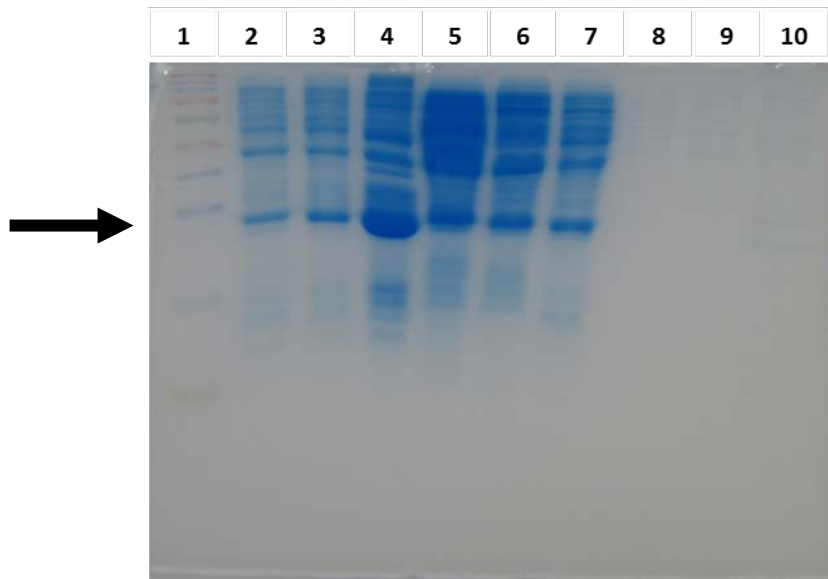


Figura 13. Gel de poliacrilamida 15% das frações purificadas e não purificadas da expressão das células Rosetta-ecotina 9. (1) marcador de peso molecular, (2) cultura não induzida, (3) cultura induzida por 20h, (4) fração insolúvel da lise, (5) fração solúvel da lise, (6)-(10) respectivamente frações 1, 2, 4, 8 e 9 da cromatografia. A seta indica o peso molecular da ecotina 9, 20 kDa.

Como na cromatografia realizada para a purificação da ecotina 9 expressa pelas células BL21, observa-se no gel da Figura 13 que só há proteína nas frações de lavagem da cromatografia, o que indica que não houve ligação de qualquer proteína à coluna com níquel. Novamente a maior concentração de proteína de interesse encontra-se na fração insolúvel da lise. Decidiu-se então pela tentativa de recuperação das proteínas contidas na fração insolúvel, os chamados corpos de inclusão, pelo protocolo de Burgess.

4.6 Repetição da expressão e purificação em células Rosetta com protocolo de recuperação de corpos de inclusão

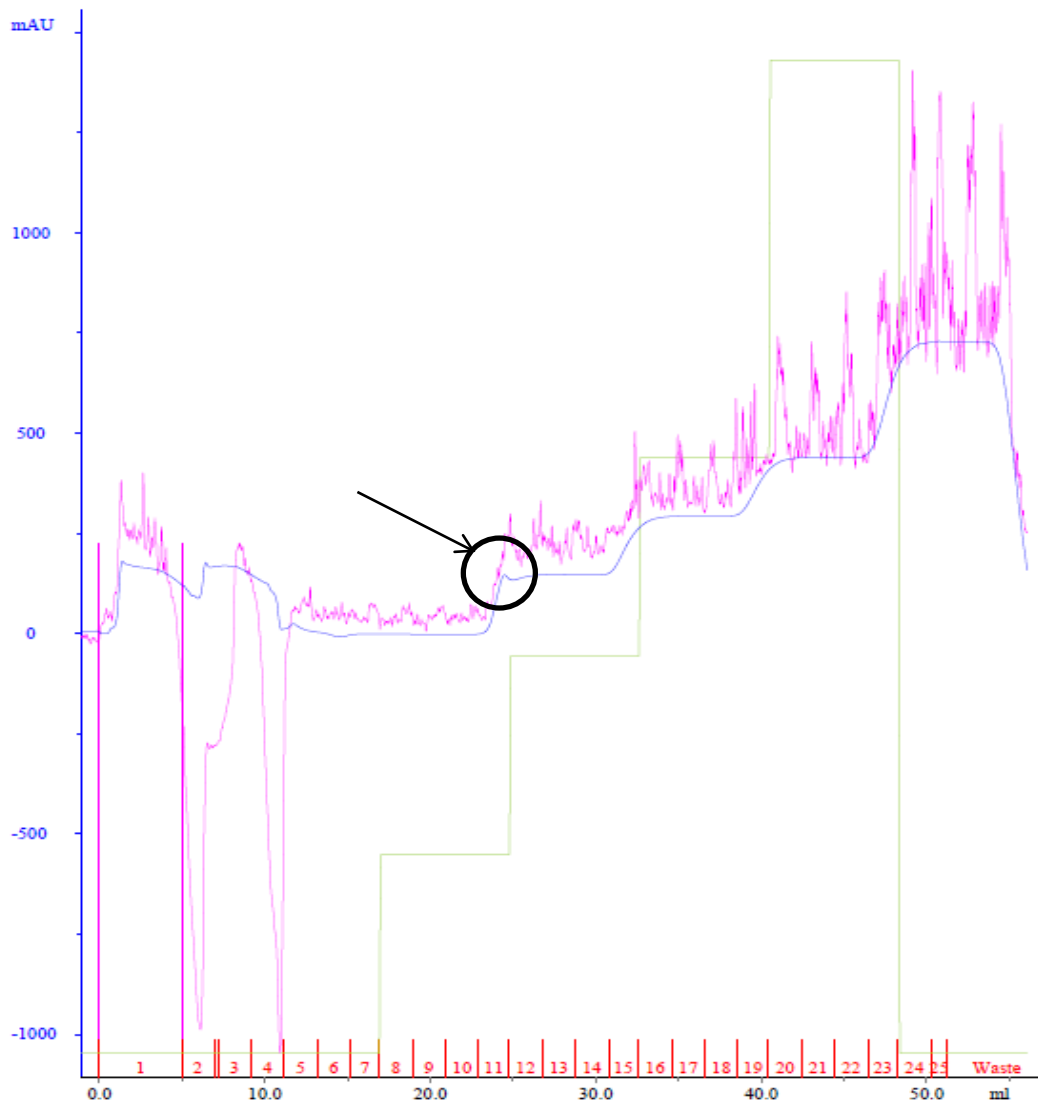


Figura 14. Cromatograma da purificação da fração solúvel da expressão da Rosetta-ecotina 9 após tratamento de recuperação de corpos de inclusão com indicação do pico suspeito de conter a proteína pura. O eixo Y é a absorção das frações de saída do cromatográfico a 255 nm.

Foi realizado então um SDS-PAGE 15% com a fração insolúvel da expressão, as frações insolúvel e solúvel do tratamento de recuperação de corpos de inclusão e as frações 1, 2, 10, 11, 12 e 13 da cromatografia.

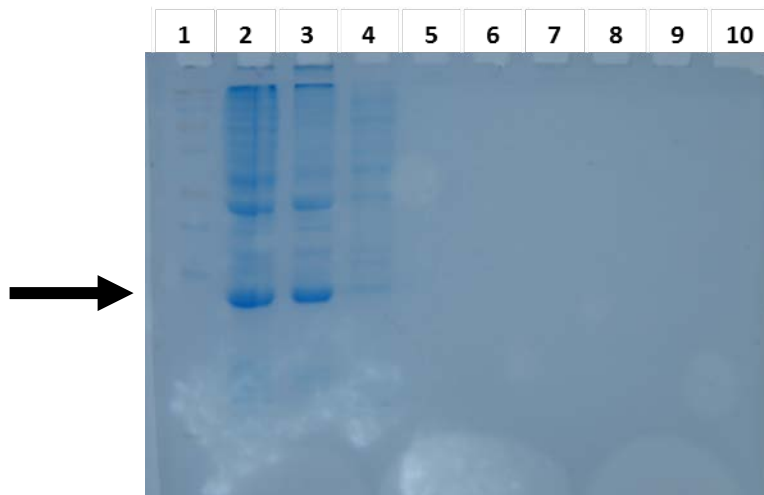


Figura 15. Gel de poliácridamida 15% das frações tratadas, não tratadas e purificadas da expressão da ecotina 9 por células Rosetta-ecotina 9. (1) marcador de peso molecular, (2) fração insolúvel da expressão, (3) fração insolúvel do tratamento, (4) fração solúvel do tratamento, (5)-(10) respectivamente frações 1, 2, 10, 11, 12 e 13 da cromatografia. A seta indica o peso molecular da ecotina 9, 20 kDa.

A partir da análise do gel de poliácridamida da Figura 15 determina-se que a expressão da ecotina 9 ocorreu corretamente, estava contida na fração insolúvel da expressão mas o tratamento de recuperação de corpos de inclusão não conseguiu solubilizar estes e a fração solúvel deste tratamento possui uma concentração muito baixa de proteínas. Assim, visto a purificação ter sido realizada com a fração solúvel do tratamento diluída 40 vezes para renaturação da ecotina 9, é justificada a ausência de proteínas nas frações da cromatografia aplicadas.

5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos nas eletroforeses em gel de agarose, a ligação da ecotina no pet-28a(+) e sua posterior transformação em linhagens DH5 α , BL21 e Rosetta é possível.

A expressão da proteína foi observada nas linhagens BL21 e Rosetta testadas, porém a purificação não foi possível, pois a proteína está concentrada em corpos de inclusão

insolúveis. Outra hipótese é que a calda de histidina feita para se ligar à coluna não esteja numa posição que permita sua interação com o níquel da coluna.

Portanto conclui-se que é possível a clonagem da ecotina de *Prochlorococcus marinus* em linhagens de *E. coli* DH5 α , BL21 e Rosetta e sua expressão em linhagens BL21 e Rosetta porém não foi possível purificar ou caracterizar esta ecotina como proposto no objetivo deste trabalho.

Os próximos passos deste trabalho serão a verificação da presença da calda de histidina pela técnica de *Western Blotting*, a modelagem molecular por meio de um pacote de ferramentas computacionais em Unix e o estudo de novas metodologias de solubilização de corpos de inclusão

6. Bibliografia

1. ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of The Cell*. 5ª edição. Nova Iorque: Garland Science, 2008.
2. HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity, *Chem. Rev.*, v. 102, p. 4501-4523, 2002.
3. CHUNG, C. H. et al. Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases, *J Biol Chem*. v. 258 (18), p. 11032, 1986.
4. SEYMOUR, J. L. et al. Ecotin is a potent anticoagulant and reversible tightbinding inhibitor of factor Xa. *Biochemistry* v. 33, p. 3949, 1994.
5. ULMER, J. S. et al. Ecotin is a potent inhibitor of the contact system proteases factor XIIa and plasma kallikrein. *FEBS Lett*. v. 365, p. 159, 1995.
6. TSU, C. A. et al. Structural basis for the broad substrate specificity of fiddler crab collagenolytic serine protease 1. *Biochemistry* v. 36, p. 5393, 1997.
7. CLARK, E. A. et al. Molecular recognition of chymotrypsin by the serine protease inhibitor ecotin from *Yersinia pestis*. *J Biol Chem*. Epub ahead of print, 2011.
8. SHIN, D. H. et al. Crystal structure analyses of uncomplexed ecotin in two crystal forms: implications for its function and stability. *Protein Sci*. v. 5 (11), p. 2236, 1996.
9. YANG, S.Q. Ecotin: a serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites. *J Mol Biol*. v. 279 (4), p. 945, 1998.

10. MUNN, C. *Marine Microbiology: ecology and applications*. 2ª edição. Nova Iorque: Garland Science, 2011.
11. RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* v. 40, p. 343-350, 2012.
12. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. *The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
13. BURGESS, R. R.; Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. *Methods in Enzymology*, v. 463, p. 259-282, 2009