

**Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**  
**Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP**  
**“Dr. Antônio Guilherme de Souza”**  
**Instituto Butantan**

**Expressão do peptídeo recombinante Defb-Lm02, uma  $\beta$ -defensina da serpente *Lachesis*  
*muta***

**Priscilla Araujo Balbino da Silva**

**São Paulo**

**2019**

**Priscilla Araujo Balbino da Silva**

**Expressão do peptídeo recombinante Defb-Lm02, uma  $\beta$ -defensina da serpente *Lachesis***

***muta***

Monografia de Conclusão do Curso de Especialização  
Toxinas de Interesse em Saúde do Instituto Butantan, sob  
orientação de Nancy Oguiura.

**São Paulo**

**2019**

## Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Silva, Priscilla Araujo Balbino da

Expressão do peptídeo recombinante Defb-Lm02, uma  $\beta$ -defensina da serpente *Lachesis muta* / Priscilla Araujo Balbino da Silva ; orientadora Nancy Oguiura ; coorientador Geraldo Santana Magalhães – São Paulo, 2019.

24 p.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Assunto. I. Oguiura, Nancy. II. Magalhães, Geraldo Santana. III. Instituto Butantan. IV. Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde. V. Título.

**Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**  
**Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP**  
**“Dr. Antônio Guilherme de Souza”**  
**Instituto Butantan**

**AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO**

Eu, Priscilla Araujo Balbino da Silva, aluna do curso **Toxinas de Interesse em Saúde**, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:


- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 28 de Março de 2019

*Priscilla Araujo Balbino da Silva*

.....  
aluno(a): Priscilla Araujo Balbino da Silva

De acordo: ..  ..  
Orientador(a): Nancy Oguiura

“Que nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistas daquilo que parecia impossível”

**Charles Chaplin**

**Dedico este trabalho:**

**Aos meus pais, Antonio e Marinita, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.**

**Ao meu esposo Victor, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.**

## RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) fazem parte do sistema imune inato, presente em praticamente todas as formas de vida, age de maneira rápida e inespecífica, como uma barreira química e possuem atividade antimicrobiana. As  $\beta$ -defensinas são uma importante família de PAMs com características ricas em folhas  $\beta$ , seis Cys conservadas com espaçamento particular e ligações intramoleculares, são extensivamente estudadas em mamíferos, mas raramente em serpentes, e podem refletir uma adaptação de peptídeos de defesa epitelial do hospedeiro. A Defb-Lm02, uma defensina da serpente *Lachesis muta*, é codificada por um gene estruturado em três exons cuja tradução ao peptídeo maduro consiste em 38 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 4,6 kDa, carga líquida de +8 em pH 7, ponto isoelétrico (pI) de 10,35. Esse peptídeo foi sintetizado na forma linear e testado para atividade antimicrobiana, resultando nas seguintes concentrações inibitórias mínima contra bactérias Gram negativa: *Escherichia coli* 16  $\mu\text{g/mL}$  e *Citrobacter freundii* 16  $\mu\text{g/mL}$ ; contra Gram positiva: *Micrococcus luteus* 4  $\mu\text{g/mL}$  e *Staphylococcus aureus* 32  $\mu\text{g/mL}$ . Não inibiu o crescimento das bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri* e *Morganella morganii* até a concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$ . Estes resultados podem ser devido à linearidade do peptídeo sintético. Sabemos que algumas atividades biológicas das  $\beta$ -defensinas são dependentes da sua estrutura 3D, portanto, a obtenção dessa toxina na forma recombinante pode potencializar sua atividade antimicrobiana ou até sugerir novas funções. O gene sintético, codificando a fusão proteína de ligação à maltose (MBP) - sítio de reconhecimento da protease TEV – DefbLm02, foi clonado no vetor de expressão pET28a. A proteína de fusão foi expressa em duas cepas de *E. coli*, BL21 Star e C43, em duas temperaturas, 30°C e 37°C. Após 4 horas de indução com IPTG 1 mM, a combinação BL21 Star e 30°C foi a que apresentou a melhor eficiência de expressão. A maior proporção da proteína foi obtida solúvel após purificação por cromatografia de afinidade, como também após a digestão com TEV. A proteína de fusão foi verificada por Western Blotting, utilizando anticorpo anti-MBP.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -defensina recombinante; Expressão em *Escherichia coli*; Serpente; Peptídeo antimicrobiano.

## ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are components of innate immune system, are present in all living organisms, acting quickly and in unspecific way as a chemical barrier and they have antimicrobial activity.  $\beta$ -defensins is a major family of AMPs with characteristic  $\beta$ -sheet-rich fold, six conserved Cys with particular spacing and intramolecular bonds. They are extensively studied in mammals but scarcely in snakes. The  $\beta$ -defensin Defb-Lm02, of *Lachesis muta* snake, is codified by a gene structured in three exons and has 38 amino acid residues, molecular weight of 4.6 kDa, net charge of +8 at pH 7 and isoelectric point (pI) of 10.35. The synthetic linear peptide of Defb-Lm02 was tested to antimicrobial activity: it presented the minimum inhibitory concentration against Gram negative bacteria: *Escherichia coli* 16  $\mu$ g/mL and *Citrobacter freundii* 16  $\mu$ g/mL; and Gram positive: *Micrococcus luteus* 4  $\mu$ g/mL and *Staphylococcus aureus* 32  $\mu$ g/mL. It did not inhibit the growth of Gram-negative *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri* and *Morganella morganii* until the concentration of 64  $\mu$ g/mL. These results may be due to the linearity of synthetic peptide. As the defense tasks of  $\beta$ -defensin could be dependent on their 3D structure, the production of recombinant  $\beta$ -defensin may potentiate its antimicrobial activity or suggest a new function. The synthetic gene, maltose binding protein (MBP) – TEV protease recognition site – DefbLm02, was cloned into the pET28a expression vector. The protein was expressed in *E. coli* BL21 Star and C43, at two temperatures 30 ° C and 37 ° C. After 4 hours of induction with IPTG 1 mM, which showed the best condition of expression was BL21 Star at 30 °C. The major part of fusion protein was soluble after purification by affinity chromatography and after proteolysis. The protein fusion was checked by Western blot using an antibody anti-MBP.

**Keywords:** Recombinant  $\beta$ -defensin; Expression in *Escherichia coli*; Snake; Antimicrobial peptide.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>9</b>
<b>3. MÉTODOS</b>	<b>9</b>
4.1 pET28-a .....	9
4.2 INSERTO.....	9
4.3 CLONAGEM.....	11
4.4 TRANSFORMAÇÃO (SAMBROOK et al., 1989).....	11
4.5 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS .....	11
4.6 SEQUENCIAMENTO.....	12
4.7 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	12
4.7.1 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS BL21 STAR E C43 .....	12
4.7.2 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO.....	12
4.7.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	13
4.7.4 DIÁLISE .....	13
4.7.5 CLIVAGEM COM TEV .....	13
4.7.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) .....	13
4.7.7 WESTERN BLOT.....	14
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
5.1 CLONAGEM.....	15
5.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	15
5.2.1 PURIFICAÇÃO E DIÁLISE DE PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	16
5.2.2 WESTERN BLOTTING .....	17
5.2.3 CLIVAGEM.....	18
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>21</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>21</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O sistema imune protege contra organismos invasores e é historicamente dividido em adaptativo e inato. Sendo este primeiro presente somente em vertebrados, é específico e requer certo tempo para agir, por possuir memória imunológica protege o indivíduo contra reexposições ao mesmo patógeno. Por outro lado, a imunidade inata age de maneira rápida e inespecífica, através de células dendríticas, células assassinas naturais (“natural killers”), células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos), barreiras físicas, como epitélios, e barreira química (Machado e Ottolini, 2015). Os Peptídeos Antimicrobianos (PAMs), que compõem a barreira química, são compostos por 12 a 100 aminoácidos que apesar de variar em estrutura, composição aminoacídica e tamanho, compartilham as características de serem pequenas moléculas catiônicas e anfipáticas (ou seja, são positivamente carregados e contém domínios hidrofóbicos e hidrofílicos), também possuem importante atividade antimicrobiana, por estarem envolvidos na morte de organismos invasores patogênicos, como bactérias, fungos e vírus envelopados em geral pela ruptura de suas membranas citoplasmáticas negativamente carregadas. Os PAMs são agrupados pela semelhança estrutural, onde os que possuem estrutura  $\alpha$ -hélice anfipática ou estrutura flexível são chamados PAMs lineares, e aqueles que contem uma ou mais pontes dissulfeto com um laço ou estrutura em folha- $\beta$  são chamados de PAMs cíclicos, dentre estes estão as defensinas, considerada uma das famílias de antimicrobianos mais estudados (Jenssen et al., 2006).

As defensinas são constituídas por um motivo característico de seis cisteínas e três folhas beta pregueada. Há três diferentes subfamílias de defensinas: alpha ( $\alpha$ ), teta ( $\theta$ ) e beta ( $\beta$ ), sendo  $\alpha$  e  $\beta$  consideradas as principais subfamílias de defensinas de vertebrados. Diferem no comprimento dos segmentos peptídicos entre as seis cisteínas e no emparelhamento das cisteínas que estão ligadas por ligações dissulfeto. Portanto as pontes de  $\alpha$ -defensinas são formadas por ligações no padrão Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>6</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>4</sup> e Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>5</sup>, enquanto nas  $\beta$ -defensinas o padrão das ligações são Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>5</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>4</sup> e Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup> (Correa e Oguiura, 2013).

Há um grupo de toxinas com homologia às  $\beta$ -defensinas dentre a família das pequenas miotoxinas básicas de cascavéis, sendo a crotamina uma das principais proteínas presente no veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Oguiura et al., 2005). Em serpentes peçonhentas brasileiras foram descritos genes que codificam  $\beta$ -defensinas

crotamina símile com três éxons e dois íntrons, onde o íntron 1 corresponde à fase um, dividindo um códon após o primeiro nucleotídeo, e o segundo íntron sendo de fase dois, dividindo um códon após o segundo nucleotídeo (Correa e Oguiura, 2013).

Entre esses genes, o de *Lachesis muta* (Defb-Lm02) codifica um peptídeo maduro de 38 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 4,6 kDa, carga líquida de +8 em pH 7, ponto isoelétrico (pI) de 10,35 e potencial de hidrofobicidade +36,9 kcal/mol. Esse peptídeo foi sintetizado na forma linear e testado para atividade antimicrobiana, observou-se ser mais ativos contra as bactérias, resultando nas seguintes concentrações inibitórias mínima contra bactérias Gram negativa: *Escherichia coli* 16 µg/mL e *Citrobacter freundii* 16 µg/mL; contra Gram positiva: *Micrococcus luteus* 4 µg/mL e *Staphylococcus aureus* 32 µg/mL. Não inibiu o crescimento das bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri* e *Morganella morganii* até a concentração de 64 µg/mL (Correa, 2013). Contudo sabe-se que algumas atividades biológicas das β-defensinas são dependentes da sua estrutura 3D, a obtenção dessa defensina na forma recombinante pode potencializar sua atividade antimicrobiana ou apontar novas funções.

A estratégia de expressão utilizada neste trabalho consiste de:

1. Expressão heteróloga em bactéria, pois é facilmente cultivável e de crescimento rápido, além dos resultados positivos obtidos na expressão da crotamina (Vu et al., 2014; Yamane et al., 2013).

2. A fusão com outra proteína para a expressão na bactéria auxilia tanto para minimizar os efeitos tóxicos da defensina para a bactéria quanto para evitar a sua degradação no citoplasma, como também para facilitar a estruturação correta das pontes dissulfeto das defensinas. Optamos por tentar a mesma estratégia de Vu et al., 2014, a fusão da crotamina com a proteína ligante de maltose – MBP que apresentou o maior nível de expressão além de maior solubilidade e disponibilidade para posterior purificação por resina de afinidade dentre as estratégias adotadas neste artigo.

3. Para a liberação da r-DefbLm02 da MBP, optamos por inserir um sítio de reconhecimento da protease TEV (sítio\_TEV), pois esta protease vendida comercialmente possui cauda poli-Histidina (poli-His) permitindo a sua retirada da solução juntamente com a MBP, após a proteólise.

4. Optamos em utilizar o vetor de expressão pET28a pela sua disponibilidade no laboratório, pela sua forte expressão resultante do promotor T7, já

codificar a cauda de poli-His junto ao seu cassete de enzimas de restrição e pelo sistema de indução com Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

A construção do plasmídeo de expressão pET28a+DefbLm02 encontra-se ilustrada na Figura 1.

## **2. OBJETIVO**

A finalidade deste trabalho é obter uma grande quantidade de Defb-Lm02 recombinante utilizando um sistema de expressão bacteriano.

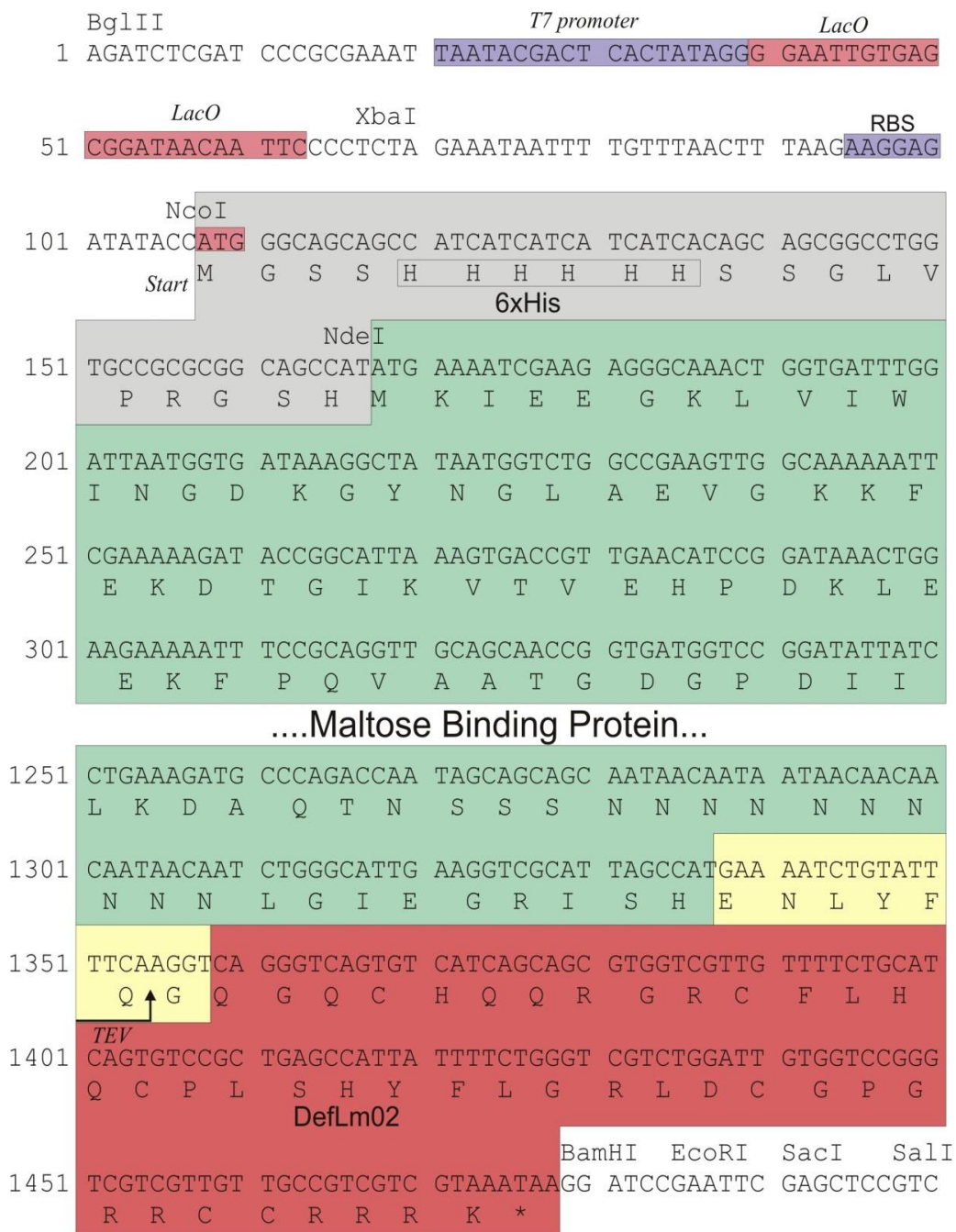
## **3. MÉTODOS**

### **4.1 pET28-a**

O plasmídeo pET28a, que possui tamanho de 5369 pb e gene de resistência à Canamicina, foi gentilmente cedido pelo Dr. Alvaro R.P. da Silva, do Lab. de Genética do Instituto Butantan.

### **4.2 INSERTO**

O inserto que foi sintetizado pela ThermoFisher Scientific possui cerca de 1320 bases, com a sequência: sítio de restrição Nde I –(MBP) - sítio\_TEV – DefbLm02 - sítio de restrição *Bam* HI clonada no plasmídeo pMA-T.



**Figura 1.** Sequência de nucleotídeos do vetor pET28a+DefLm02. Os nucleotídeos sem realce pertencem ao plasmídeo pET28a. Realçado em roxo, sítio de ligação da T7 RNA polimerase e sítio de ligação ribossomal (RBS). Realce rosa: operador Lac, sítio onde se liga o inibidor da lactose. Em cinza, cauda poli-His e aminoácidos resultantes da sequência do cassete de expressão do pET28a. Em verde, a sequência que codifica a proteína de ligação a maltose. Em amarelo, o sítio de reconhecimento da protease TEV (tobacco etch vírus). Em vermelho, a sequência da proteína DefLm02 com o códon de terminação indicado por asterisco (\*).

### 4.3 CLONAGEM

Tanto o pMA-T (0,5 µg) quanto o pET28-a (160 ng) foram digeridos com 10 unidades de *Nde* I e *Bam* HI, respectivamente, num volume final de 25 µL em Tampão CutSmart 1X (New England Biolabs), a 37°C, por 1 hora no termociclador Mastercycler Ep Gradient da Eppendorf. As digestões foram fracionadas por eletroforese em gel de agarose Type I Low EEO 0,8% em tampão TAE 1X novo, a 75 V por uma hora. Tanto o inserto quanto o pET 28-a linear foram recortados do gel para serem purificados com o kit Gel DNA Recovery da ZymoResearch seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos foram ligados numa proporção 1:3 de extremidade molar de inserto:vetor utilizando a T4 DNA ligase em temperatura ambiente (22 °C) por uma hora.

### 4.4 TRANSFORMAÇÃO (SAMBROOK et al., 1989)

Utilizamos bactérias competentes *Escherichia coli* congeladas, crescidas até  $DO_{(600nm)}$  de 0,6, ressuspensas em solução de  $CaCl_2$  0,1 M e glicerol 10 % e estocadas a -80 °C. A transformação foi realizada por choque térmico, os microtubos contendo as bactérias competentes, as reações de ligação ou DNA, ficaram em repouso no gelo por 15 minutos, para que ocorresse o descongelamento. Em seguida, foi adicionada a reação de ligação às bactérias competentes, então, deixadas no gelo por 20 minutos. Para o controle negativo foi utilizado bactérias competentes sem reação ligação. Após este período, foi realizado o choque térmico por 2 minutos a 37 °C e os tubos mantidos no gelo novamente. Foram adicionados SOC (2 % de Bacto-triptona, 0,5% de Extrato de levedura, 12,5 mM de NaCl, 2 mM KCl, 50 mM  $Mg^{2+}$ , 20 mM glicose), os tubos foram deixados sob agitação (120 rpm) por uma hora a 37°C. Posteriormente as bactérias transformadas foram plaqueadas com auxílio de alça de Drigalski em meio Luria Bertani (LB) sólido contendo Canamicina 30 mg/mL (Km30).

### 4.5 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Colônias isoladas foram cultivadas em 5 mL de LB líquido + Km30, durante a noite a 37 °C. O plasmídeo foi purificado utilizando o kit Zyppy™ Plasmid Miniprep da

ZymoResearch, segundo o manual do fabricante, e a sua concentração estimada no espectrofotômetro NanoDrop ND-2000c em 260 nm.

## **4.6 SEQUENCIAMENTO**

Para o sequenciamento da amostra, realizado no Laboratório de Bacteriologia Unidade 2 do Instituto Butantan pelo método de Sanger, eram entregues uma solução de 10 µL contendo 1,6 pmol primer T7 e cerca de 150 ng de DNA.

## **4.7 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

### **4.7.1 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS BL21 STAR E C43**

Alíquotas de bactérias competentes BL21 Star e C43 (100 µl), cedidas pelo Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, foram descongeladas em gelo, e a elas adicionados 5 µl de plasmídeo purificado (24 ng/µL). As misturas foram mantidas em gelo por 20 minutos e então submetidas a choque térmico a 42 °C por 45 segundos, voltando ao banho de gelo por mais 2 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio LB sem antibiótico e estas foram mantidas por 30 minutos a 37°C sob agitação 180 RPM. Após esse período todo o conteúdo foi transferido para erlenmeyer contendo 12 mL de meio LB e Km30 e mantidos por toda noite a 30°C sob agitação 180 RPM.

### **4.7.2 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO**

A expressão de proteína recombinante foi testada em duas temperaturas, 30 °C e 37 °C, em duas cepas bacterianas competentes BL21 star e C43. As bactérias transformadas por choque térmico com o plasmídeo de interesse pET28a + Lm02, foram cultivadas em 100 mL de LB + Km30 e mantidas a 30°C ou a 37°C sob agitação de 170 RPM por 2 horas. Após esse período, a cultura atingiu a densidade óptica desejada entre 0,5 e 0,6, então, foi adicionado 1 mM IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) e a cultura continuou por mais 4 horas a 30°C sob agitação. Após esse período as amostras foram diluídas 1:2 com meio LB para que fossem lidas as respectivas densidades ópticas denominadas como tempo induzido

### **4.7.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

O pellet bacteriano de 50 mL de cultura induzida foi ressuspenso em 5 mL de tampão 20 mM fosfato de sódio, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, e permaneceu 15 minutos em gelo com 0,2 g de lisozima (Sigma-Aldrich) e posteriormente submetido a sonicação, lisando a parede bacteriana. A proteína recombinante foi purificada in batch utilizando Ni Sepharose<sup>®</sup> 6 Fast Flow GE<sup>®</sup> Healthcare, 17-531801, equilibrada com tampão 20 mM de fosfato de sódio, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol pH 7,4. Para 5 mL de extrato foi utilizado 2 mL de resina.

Após 40 minutos de inversão, em temperatura ambiente (22 °C) e três lavagens com tampão 20 mM fosfato de sódio, 500 mM NaCl, 50 mM imidazol pH 7,4, a proteína recombinante foi eluída com tampão contendo 500 mM de imidazol.

### **4.7.4 DIÁLISE**

Uma vez que a proteína purificada estava em tampão contendo 500 mM de imidazol, foi necessário remove-lo por diálise. A qual foi realizada utilizando a membrana SnakeSkin Dialysis Tubing 3.5 kDa de Cut-Off e duas trocas utilizando 600 mL de tampão Tris HCl 20 mM pH 8, Glicerol 5 %, NaCl 100 mM, DTT 2 mM em geladeira. Fez-se a dosagem da proteína através da medida da absorbância a 280 nm pelo equipamento Nanodrop ND-2000c.

### **4.7.5 CLIVAGEM COM TEV**

A proteína de fusão foi clivada através da proteólise com TEV. Testes de clivagem foram feitos a 30 °C, em 3 horas e 6 horas, em tampão TEV 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT. A purificação pós clivagem foi realizada como descrito no item 4.7.3 A clivagem foi verificada através de eletroforese em SDS-PAGE.

### **4.7.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

O SDS-PAGE foi preparado com gel de separação (12%) em 375 mM de Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % Persulfato de amônio, TEMED 8 µL em 10 mL; e gel de empacotamento (4%) em 130 mM Tris-HCL pH 6,8.

Vinte microlitros de amostra foram homogeneizados com 5  $\mu$ L de tampão de amostra 6X (SDS 10%; Tris-HCl 0,35 M pH 6,8; azul de Bromofenol 0,012 %; 2- $\beta$ -mercaptoetanol 2,6 %, glicerol 30 %), fervidas no bloco Dry Bath Incubator por 5 minutos e aplicadas às canaletas do gel de concentração. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida 1x (Tris 0,025 M; Glicina 0,192 M; SDS 0,1%; pH 8,3) em voltagem constante de 100 V. Após corrida, o gel foi corado por toda noite em azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1%; metanol 50%; ácido acético 10%) e descorados em solução descorante (metanol 40%; ácido acético 7%), ou então submetido a ensaio de Western Blotting.

#### 4.7.7 WESTERN BLOT

As amostras separadas através de SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose, sendo a montagem no aparelho Semi-Dry Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer System, durante 30 minutos sob voltagem de 25 V, 1 A. Em seguida a membrana foi lavada com TBS 1X, e corado com Ponceau (1/20 em TBS) e descorado com TBS 1X. Posteriormente as membranas foram bloqueadas durante 2 horas com tampão TBS 1X contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé) sob agitação em temperatura ambiente.

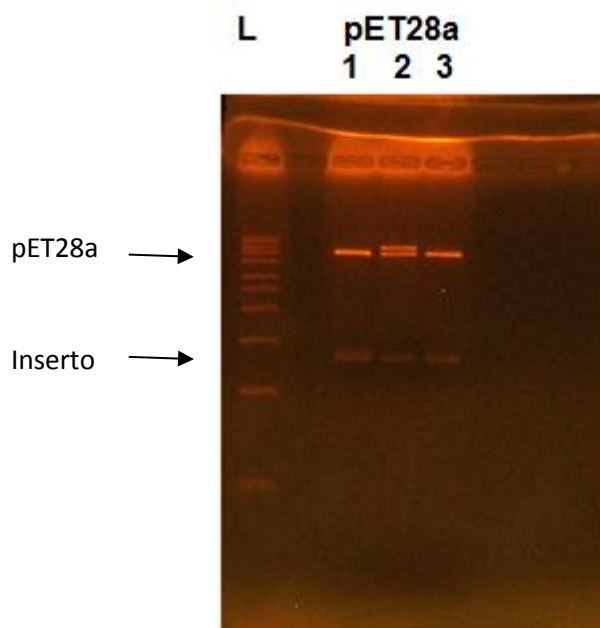
A membrana foi incubada como anticorpo primário MBP-probe R29.6 (IgG monoclonal de camundongo 200  $\mu$ g/mL, Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:1000 em tampão de bloqueio, por toda noite sob agitação na geladeira. No dia seguinte, foram feitas três lavagens de 15 min com TBS+Tween (0,1 % Tween 20, Tris 20 mM, NaCl 150 mM). Em seguida, utilizamos o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com Peroxidase (Sigma), diluído 1:1000 em tampão de bloqueio, por 2 horas sob agitação, em temperatura ambiente (22°C). Após três lavagens, a revelação foi realizada com 85 % de TBS 1X, 15 % de 4-cloro-1-naftol (1 pastilha, Sigma Chemical Company C6788, LOT 030K-8200), diluída em 10 mL de metanol) e 0,05% de Peróxido de Hidrogênio.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 CLONAGEM

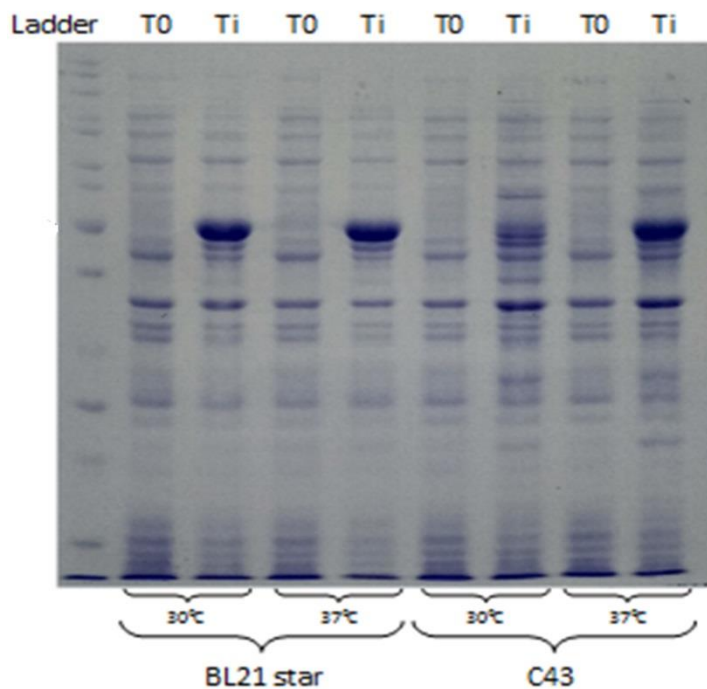
Após a clonagem, os plasmídeos purificados pET28a+Lm02 foram digeridos com enzimas de restrição *Nde* I e *Bam*H I para checar a presença e o tamanho dos insertos (Figura 2). Para prosseguir com os experimentos de expressão, foi selecionada a amostra 3.



**Figura 2.** Gel de Agarose 1% de vários clones do plasmídeo pET28+DefbLm02 digeridos com *Nde* I e *Bam*H I. Eletroforese realizada em tampão TAE 1X, Ladder de 1 Kb, Invitrogen.

### 5.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

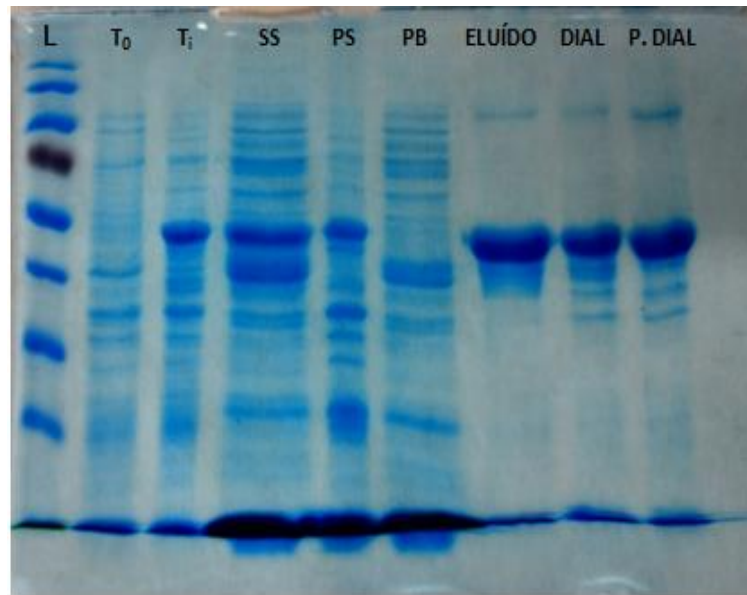
Para expressão da proteína de interesse, foram testadas duas cepas, BL21 Star e C43, de bactérias *E. coli*; assim como, duas temperaturas, 30°C e 37°C. Observamos que após a indução por IPTG 1 mM, a proteína recombinante foi expressa em BL21 Star nas duas temperaturas, porém na linhagem C43 apenas a 37°C. A expressão foi verificada em gel de poliacrilamida pela presença da banda com cerca de 50 kDa, tamanho estimado para a proteína de fusão (Figura 3). Optamos por utilizar o BL21 Star a 30°C, pois a expressão da proteína recombinante foi mais eficiente sob essas condições.



**Figura 3.** Expressão da proteína de fusão utilizando as cepas de *E. coli* BL21 Star e C43. O SDS-PAGE 12%, Ladder Page Ruler Unstained Protein 5 - 250 kDa; T0 - tempo antes da indução; Ti - após 4 horas de indução com IPTG 1 mM.

### 5.2.1 PURIFICAÇÃO E DIÁLISE DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

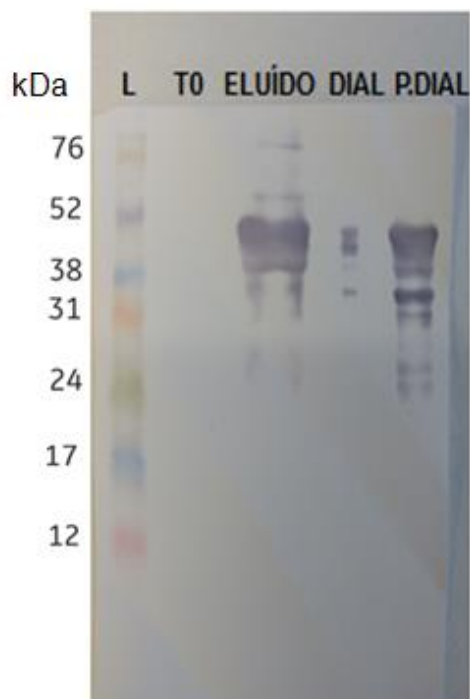
Cinquenta mililitros de cultura de BL21 Star transformada com o pET28-a+ Lm02 e induzida com IPTG, foi centrifugada e sonicada. O pellet ressuspendido foi purificado com resina de Ni-Sepharose equilibrada e em seguida, o eluído foi dialisado para posterior proteólise. Na figura 4, observamos que após a indução a proteína recombinante, com cerca de 50 kDa, tamanho esperado da fusão, foi recuperada nas formas solúvel (SS), no sobrenadante, e insolúvel (PS), no resíduo bacteriano após centrifugação do sonicado. Após a diálise, com a diminuição da concentração de imidazol, observamos que metade da proteína recombinante permaneceu parte solúvel (DIAL), mas parte precipitou (P. DIAL) (Figura 4).



**Figura 4.** Expressão da proteína de fusão em BL21 Star 30°C. SDS-PAGE 12%, Ladder PageRuler™ Prestained Protein, 10 to 180 kDa. T<sub>0</sub> – Tempo antes da indução; T<sub>1</sub> – Após 4 horas de indução com IPTG 1 mM; SS – Sobrenadante Sonicado, PS – Pellet Sonicado. PB – Pós Binding: sobrenadante pós-ligação à resina, ELUÍDO – Antes da diálise, DIAL – Dialisado, P.DIAL – Pellet da Diálise.

### 5.2.2 WESTERN BLOTTING

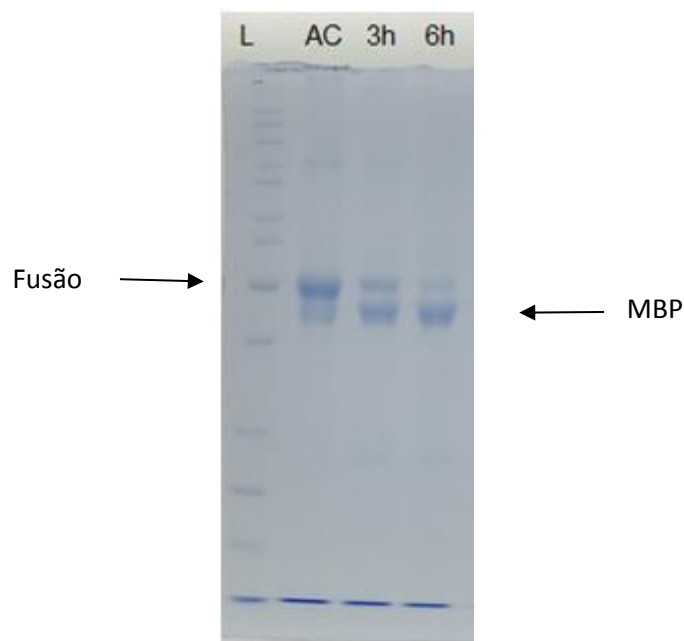
Foi realizado Western Blotting a fim de confirmar a identidade da proteína de fusão. O anticorpo específico anti-maltose, reconheceu a proteína de fusão com aproximadamente 50 kDa, previamente identificada no gel de poliacrilamida-SDS, como também várias proteínas menores.



**Figura 5.** Western Blotting utilizando anticorpo primário anti-maltose e anticorpo secundário Anti-Mouse IgG conjugado a peroxidase. L = Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (12-22.5 kDa), GE Healthcare; T0 – tempo antes da indução, ELUÍDO – Antes da diálise, DIAL – Diálise, P. DIAL – Pellet de Diálise.

### 5.2.3 CLIVAGEM

A quantidade de proteína na amostra dialisada foi estimada por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm, resultando em cerca de 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $A_{280\text{nm}} = 0,804$ ). Este valor foi estimado para a clivagem com TEV, onde foi utilizado 1 U de enzima para 3  $\mu\text{g}$  de proteína de fusão a 30 °C. Observamos uma proteólise parcial em 3 h que continuou até 6 h, porém não houve digestão completa da fusão (Fig. 6).



**Figura 6.** Clivagem com TEV a 30°C. L= Ladder – Page ruler Unstained Protein Ladder 250  $\mu$ L, Thermo Scientific™; AC = Antes da clivagem; 3h = coleta de amostra com 3 horas de clivagem; 6h = coleta de amostra com 6 horas de clivagem.

## 6. DISCUSSÃO

A clonagem foi checada pelo sequenciamento do plasmídeo utilizando primer T7 (dados não mostrados). Sabendo-se que não haviam mutações na sequência que atrapalhariam os experimentos seguintes, prosseguimos com a transformação para expressão, utilizando cepas BL21 Star e a C43, escolhidas por seu alto rendimento de produção da proteína recombinante. Característica obtida pelo fato do gene que codifica T7 RNA polimerase estar sob controle do promotor lacUV5, forte variante do promotor *lac* selvagem; e pela T7 RNA polimerase ser controlada apenas pelo repressor *lac* fazendo com que esta transcreva 8 vezes mais rápido que qualquer polimerase de *E. coli* (Wagner et al., 2008).

Para a expressão da proteína de fusão MBP-DefbLm02, a melhor expressão foi com a cepa BL21 Star a 30 °C e 37 °C. Indicando que as características da proteína recombinante é mais importante, visto que para a expressão da proteína de membrana YidC fusionada a GFP, a cepa C43 foi a mais eficiente (Wagner et al., 2008). Vu et al., 2014, observaram diferenças de expressão nas diferentes proteínas de fusão testadas na mesma bactéria. Neste artigo, os autores também observaram que o uso de temperatura de 20 °C por mais tempo favoreceu a expressão. Portanto, como a eficiência de

expressão na BL21 Star foi semelhante nas duas temperaturas, optamos trabalhar com 30 °C nas próximas etapas.

Podemos observar que a proporção utilizada de extrato bacteriano ressuspendido e resina de Ni-Sepharose foi adequada, pois, na canaleta referente ao pós-binding (PB, Figura 4), sobrenadante pós-ligação à resina, não observamos a banda relativa à proteína de fusão. Após a diálise, observamos que metade da proteína de fusão precipita (P.Dial, Figura 4) pois mostra-se na mesma proporção que a parte solúvel (DIAL, Figura 4).

A confirmação pelo Western Blotting foi importante para seguir com a clivagem, uma vez que podíamos ter mais confiança sobre a identidade da proteína, pois o anticorpo monoclonal anti-MBP, foi capaz de reconhecer a proteína de fusão (Figura 5).

Podemos observar que a clivagem foi efetiva, pois há a banda de MBP pouco abaixo de 50 kDa, porém não foi possível visualizar a DefbLm02, provavelmente por ter escapado do gel pela baixa concentração de acrilamida, ou incapacidade do corante em identificá-la, seja pela proteína recombinante estar em baixa quantidade e/ou as características bioquímicas do recombinante caracterizar uma baixa afinidade do mesmo pelo corante (Figura 6). Para observarmos o a r-DefbLm02 podemos aumentar a concentração do PAGE-SDS, alteração da coloração para prata, ou utilizar um sistema para peptídeos para acompanhar a presença da r-DefbLm02.

As várias bandas abaixo de 50 kDa que aparecem tanto no SDS-PAGE quanto no Western blot indicam que tanto a transcrição quanto a tradução não é 100 % eficiente, pois são observadas várias proteínas menores. Como a cauda poli-His encontra-se na extremidade N-terminal, todas as proteínas mesmo incompletas, são purificadas com a resina de Ni-Sepharose. O que não representa um problema grave, uma vez que serão retiradas após a proteólise.

A reação de proteólise com TEV deve ser melhorada para que toda a proteína de fusão seja clivada, provavelmente aumentando-se a quantidade de enzima para não aumentarmos o tempo de digestão.

A obtenção de uma grande quantidade de r-DefbLm02 permitirá o prosseguimento para testes de atividade antimicrobiana como também para inferir a sua sequência utilizando espectrometria de massa.

## 7. CONCLUSÃO

A fusão da DefbLm02 com a maltose expressada na bactéria BL21 Star a 30 °C permitiu a obtenção de quantidade significativa de proteína de fusão solúvel, adequada para o prosseguimento dos experimentos com o aumento de volume de cultura.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORREA, P.G; OGUIURA, N. Phylogenetic analysis of  $\beta$ -defensin-like genes of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* snakes. **Toxicon – Elsevier**, v. 69, p. 65-74, Jul.2013. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113000834>>. Acesso em: 29 janeiro 2019.

CORREA, P.G. **Prospecção gênica e atividade antimicrobiana de  $\beta$ -defensina-símiles em viperídeos**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP, Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2013.

JENSSEN, H; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E.W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, Jul.2006. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/cmr/19/3/491.full.pdf>>. Acesso em: 29 janeiro 2019.

MACHADO, L.R; OTTOLINI, B. An Evolutionary History of Defensins: A Role for Copy Number Variation in Maximizing Host Innate and Adaptive Immune Responses. **Molecular Innate Immunity – Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 115, Mar.2015. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00115/full>>. Acesso em: 29 janeiro 2019.

OGUIURA, N; BONI-MITAKE, M; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon – Elsevier**, v. 46, n. 4, p. 363–370, Set.2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105002047>>. Acesso 29 janeiro 2019.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (Eds). **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

VU, T.T. et al. Soluble prokaryotic expression and purification of crotamine using an N-terminal maltose-binding protein tag. **Toxicon – Elsevier**, v. 92, p. 157–165, Out.2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010114003481?via%3Dihub#tbl1>>. Acesso em 29 janeiro 2019.

WAGNER, S. et al. Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS**, v. 105, n. 38, p. 14371 – 14376, Set.2008. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/105/38/14371>>. Acesso 30 janeiro 2019.