



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Expressão heteróloga de uma osmotina laticífera e desenvolvimento de protocolos para extração da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão.

CAMILA TAUANE MONTEIRO DO NASCIMENTO

FORTALEZA

2016

CAMILA TAUANE MONTEIRO DO NASCIMENTO

Expressão heteróloga de uma osmotina laticífera e desenvolvimento de protocolos para extração da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão.

Dissertação submetida à Coordenação do curso de pós graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Viana Ramos.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N194e Nascimento, Camila Tauane Monteiro do.
Expressão heteróloga de uma osmotina laticífera e desenvolvimento de protocolos para extração da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão / Camila Tauane Monteiro do Nascimento. – 2016.
92 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Marcio Viana Ramos.
1. Proteínas do Látex. 2. Expressão heteróloga. 3. Corpos de Inclusão. 4. Solubilização. I. Título.

CDD 572

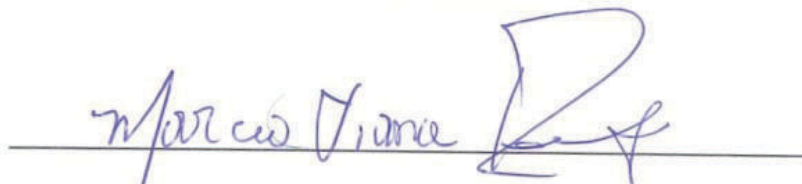
CAMILA TAUANE MONTEIRO DO NASCIMENTO

Expressão heteróloga de uma osmotina laticífera e desenvolvimento de protocolos para extração da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão.

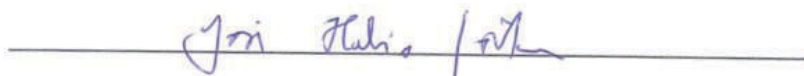
Dissertação submetida à Coordenação do curso de pós graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 18 / 03 /2016.

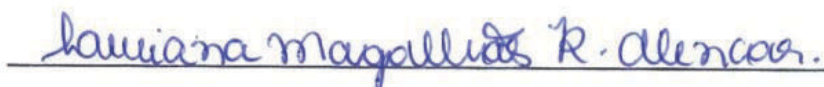
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. José Hélio Costa
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof.ª Dr.ª Luciana Magalhães Rebelo Alencar
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFCE

A Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus primeiramente que me concedeu o dom da vida e que sem sua luz e bênçãos eu não teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço aos meus queridos pais Nascimento e Jane que me deram todo apoio que puderam e ainda me dão e, sempre, sem cessar, estimularam-me aos estudos. Isso é impagável. Amo vocês. Aproveito pra agradecer também minha irmã que sempre se dispõe a me ajudar.

Agradeço ao meu queridíssimo marido Pedrinho e minha amada filha Maricota que sempre estão do meu lado. Que compreendem meus momentos de ausência e tornam minha estada nessa vida mais prazerosa e acolhedora. Com certeza vocês fazem a diferença na minha vida, vocês são hoje meu alicerce e sou muito feliz por isso.

Agradeço, de forma especial, ao meu orientador Professor Marcio Viana Ramos que me acolheu como sua aluna de mestrado, sempre me respeitou profissionalmente (“aspirante” à pesquisadora), confiou no meu trabalho me desafiando com essa dissertação. Desafio esse que adorei ter sido submetida, aprendi bastante. Agradeço ainda por ter sido além de um orientador, um guia, um pai científico, um amigo. Espero continuar reta nesses passos que você sombreia pra nós.

Agradeço ao professor Thalles Barbosa Granjeiro, ao professor Cleverton Diniz e professor Renato de Azevedo Moreira por contribuírem com suas experiências profissionais e elevarem o nível dessa pesquisa, além de cederem espaço em seus laboratórios para essa pesquisa ter sido concluída com sucesso.

Agradeço DEMASIADAMENTE minhas amigas Rafaelita, Zelinha, Carolita e Bialita que foram de uma delicadeza, gentileza e amizade incomparáveis nesses dois últimos anos, não quero esquecer o que vocês fizeram por mim e até

o que aguentaram por mim. Essa nossa relação só mostra o quanto uma amizade saudável e firme contribui para o desenvolvimento de um ser humano.

Agradeço também aos meus queridos Suelen e Ednésio por terem contribuído significativamente com um ombro amigo, conselhos e até mesmo como babás.

Agradeço, em especial, a minha primeira e querida “IC” Raíssa pelos momentos de ajuda incessante e aprendizagem.

Ao laboratório, em peso, do professor Marcio, agradeço, João Pedro, Wallace, Daniel, Hugo, Júnior, Isabel, Filipe, Mirele e Juliany. Agradeço também ao Juscelino, Paulo, Simone, Antônio Rocha e Antônio Viana.

Aos meus amigos de graduação Acrísio, Robertas Laiz, Cris, Marina e George que estiveram sempre preocupados com meus passos nessa dissertação e deixaram meus dias mais felizes.

Agradeço às minhas orientadoras da iniciação científica Profas Vânia Maria e Denise Hissa que se não tivessem me estimulado o suficiente, não teria feito nem um mestrado.

Agradeço à todos que mesmo não tendo sido citados e tiverem contribuído para essa pesquisa, estão em meu coração e em minhas orações com certeza.

Agradeço aos órgãos de fomento Capes e CNPq e à Universidade Federal do Ceará por contribuir com seu apoio financeiro e técnico.

RESUMO

Em etapa anterior a este trabalho, uma proteína identificada como osmotina (CpOsm) foi purificada do látex de *Calotropis procera* a qual apresentou forte atividade antifúngica. A proteína foi expressa em sistemas procarionte e eucarionte, mas um protocolo adequado para sua purificação não foi alcançado. No presente trabalho, partindo de corpos de inclusão (CI), obtidos de *E. coli* BL21(DE3) procedeu-se uma prospecção por diferentes protocolos de solubilização de suas proteínas, na tentativa de obter a proteína recombinante (rCpOsm) solúvel, para então avaliá-la quanto a sua atividade e por fim, prospectar novos métodos para sua purificação. A cultura bacteriana foi induzida em diferentes condições de temperatura e tempo de indução. Após 3 horas de indução a 37 °C, 180 rpm, os CI foram lisados e submetidos a tratamentos químicos com surfactantes (CTAB; Cetrimida; ARG-12: um surfactante derivado de argenina) e um agente desnaturante (Cloridrato de Guanidina); tratamento físico por sonicação (4 ciclos de 2,5 min. cada a 50% de potência) e tratamento enzimático com protease nativa do látex de *C. procera*. Ensaio de eletroforese sugeriram que os dois surfactantes químicos foram eficientes na solubilização de rCpOsm enquanto que ARG-12 não. Ainda, estes compostos catiônicos solubilizaram rCpOsm mais do que as demais proteínas dos CI, enquanto que o processo de sonicação produziu amostras com maior diversidade de proteínas solúveis, incluindo rCpOsm. O tratamento enzimático mostrou que proteínas de CI são, em algum alcance, digeridas enquanto que rCpOsm não. O efeito do tratamento dos CI com protease foi analisado por imagens de microscopia de força atômica e as diferenças de estrutura entre os CI tratados e não tratados documentados. Todas as amostras foram avaliadas quanto à ação sobre *Colletotrichum gloeosporioides* após diálise e liofilização. Os produtos dos tratamentos com surfactantes apresentaram atividade antifúngica, demonstrando atividade inibitória de germinação de esporos e crescimento micelial. Entretanto, foi demonstrado que a atividade poderia estar relacionada aos agentes solubilizantes. Proteínas insolúveis obtidas de *E. coli* contendo o plasmídeo íntegro, tomadas como controle negativo, não apresentaram atividade nestes ensaios. A rCpOsm solubilizada com CTAB foi submetida a cromatografia em

coluna de Ni⁺⁺ (Ni Sepharose 6 Fast Flow) pH 7,0; em meio hidrofóbico (FenilSepharose CL-4B) e troca iônica (Resource-S). Nenhum dos protocolos aplicados resultou na purificação de rCpOsm e estes dados repetem o que foi observado previamente para a rCpOsm purificada a partir de *Pichia pastoris*.

Palavras chave: Corpos de inclusão, expressão heteróloga, proteínas do látex, solubilização

ABSTRACT

In the previous step to this work, a protein identified as osmotin (CpOsm) was purified from *Calotropis procera* latex which showed strong antifungal activity. The protein was expressed in prokaryotic and eukaryotic systems, but a suitable protocol for purification has not been achieved. In the present work, from inclusion bodies (IB) obtained from *Escherichia coli* BL21 (DE3) proceeded to a survey by different solubilization protocols of proteins in an attempt to obtain the recombinant protein (rCpOsm) soluble, and then evaluates it as its activity and finally, exploring new methods for purification. The bacterial culture was induced at different conditions of temperature and time of induction. IB were subjected to chemical treatments with surfactants (CTAB; Cetrimide; ARG-12, a derivative surfactant Argenine) and a denaturing agent (guanidine hydrochloride); physical treatment by sonication and the enzymatic treatment with protease native *C. procera* latex. Electrophoresis assays suggested that two chemical surfactants were effective in solubilizing rCpOsm while not ARG-12. Although these cationic compounds solubilized rCpOsm more than other proteins of IB, while the sonication process samples produced with a greater variety of soluble proteins including rCpOsm. The enzymatic treatment showed that IB proteins are, in some range, digested while rCpOsm did not. All samples were evaluated for action on *Colletotrichum gloeosporioides* after dialysis and lyophilization and showed inhibitory activity of spore germination and mycelial growth. However, it was shown that the activity could be related to the solubilising agents. Insoluble proteins obtained from *E. coli* containing the plasmid integrity, taken as a negative control showed no activity in these assays. The rCpOsm solubilized by CTAB was subjected to chromatography on Ni ++ column (Ni Sepharose 6 Fast Flow) pH 7.0; in hydrophobic media (FenilSepharose CL-4B) and ion exchange (Resource-S). None of the applied protocols resulted in the purification of rCpOsm and these data repeated what was observed previously for rCpOsm purified from *Pichia pastoris*.

Key words: Heterologous expression, inclusion bodies, latex protein, solubilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vetor Champion™ pET303/CT-His.....	21
Figura 2: Imagens de corpos de inclusão de <i>E. coli</i>	22
Figura 3: Desenho esquemático de arquitetura interna de corpos de inclusão bacteriano.....	24
Figura 4: Esquema de estratégias gerais aplicadas para solubilização de proteínas depositadas em corpos de inclusão.....	26
Figura 5: Sumário de dados sobre a proteína alvo desta pesquisa.....	30
Figura 6: Esquema para uma produção eficiente de proteínas solúveis a partir de corpos de inclusão bacterianos usando método suave de solubilização.....	43
Figura 7: Perfil eletroforético de clones de uma cultura de <i>E.coli</i> ArcticExpress (DE3) transformadas com pET303 :: CpOsm.....	52
Figura 8: Perfil eletroforético de células de <i>E.coli</i> ArcticExpress (DE3) induzidas em diferentes meios nutritivos.....	52
Figura 9: Peptídeos identificados por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) das frações solúvel e insolúvel obtidas do lisado celular de <i>E.coli</i> BL21(DE3).....	55
Figura 10: Perfil eletroforético de células de <i>E.coli</i> BL21 (DE3) induzidas em diferentes temperaturas.....	55
Figura 11: Perfil eletroforético das frações, solúvel e insolúvel, de uma cultura de <i>E.coli</i> BL21(DE3) induzida por diferentes períodos e imunodeteção de rCpOsm por <i>Western Blot</i>	56
Figura 12: Perfil eletroforético dos produtos de PCR de colônia.....	57
Figura 13: Avaliação do efeito de corpos de inclusão, solubilizados com detergentes e submetidos à sonicação, sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	59
Figura 14: Perfil eletroforético de uma cultura de <i>E.coli</i> BL21(DE3) transformada com o vetor pET303 :: CpOsm e solubilizada com Cetrimida e CTAB 0,1%, 0,5% e 1%.....	62

Figura 15: Perfil eletroforético de uma cultura de <i>E.coli</i> BL21(DE3) transformada com o vetor pET303 :: CpOsm solubilizadas com Arg12 e cetrimida a 55 °C.....	62
Figura 16: Perfil eletroforético da fração insolúvel de uma cultura de <i>E.coli</i> BL21(DE3) transformada com o vetor pET303 :: CpOsm e solubilizada com tampão de lavagem.....	64
Figura 17: Perfil eletroforético da fração solúvel e insolúvel de uma cultura de <i>E.coli</i> BL21(DE3) solubilizada por método de ultrassom.....	65
Figura 18: Cromatografia IMAC (Sephacrose carregada com Niquel imobilizado) e perfil eletroforético da fração intracelular insolúvel de células de <i>E.coli</i> BL21(DE3) solubilizada com CTAB 1%.....	67
Figura 19: Cromatografia hidrofóbica FenilSephacrose CL-4B e perfil eletroforético da fração intracelular insolúvel de células de <i>E.coli</i> BL21(DE3) solubilizada com CTAB 1%.....	68
Figura 20: Cromatografia de troca iônica em coluna Resource S, acoplada a sistema FPLC e perfil eletroforético da fração intracelular insolúvel de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) solubilizada com CTAB 1%.....	68
Figura 21: Inibição da germinação de esporos pelas soluções controles dos agentes surfactantes (CTAB 1%, Arg12, Cetrimida) e o agente desnaturante Cloridrato de Guanidina sobre <i>C. gloeosporioides</i>	70
Figura 22: Inibição da germinação de esporos pela fração insolúvel do plasmídeo íntegro solubilizados com agentes surfactantes (CTAB1%, Arg12, Cetrimida), o agente desnaturante Cloridrato de Guanidina e a amostra sonicada sobre <i>C. gloeosporioides</i>	71
Figura 23: Inibição da germinação de esporos pelos corpos de inclusão (plasmídeo recombinante) solubilizados com agentes surfactantes (CTAB 1%, Arg12, Cetrimida), o agente desnaturante Cloridrato de Guanidina e a amostra sonicada sobre <i>C. gloeosporioides</i>	72
Figura 24: Perfil eletroforético da fração insolúvel de <i>E.coli</i> BL21(DE3) tratadas com a protease do látex de <i>C. procera</i> (CpCP-1).....	73
Figura 25: Atividade proteolítica (A) dos corpos de inclusão (rCpOsm -1 mg/mL) tratados com CpCP-1 (1 mg/mL) a 37 °C por 24 h. (B) das frações insolúveis tanto do plasmídeo íntegro como do recombinante tratados com IAA (20 mM) após incubados por 24 h a 37 °C.....	75
Figura 26: Avaliação do efeito de corpos de inclusão, solubilizados com CpCP-1 sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	76
Figura 27: Cromatografia de afinidade em matriz contendo anticorpo Anti CpOsm nativa imobilizada.....	77

Figura 28: Imagens de microscopia de força atômica de corpos de inclusão.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições utilizadas para a amplificação da região codificante da rCpOsm.....40

Tabela 2: Peptídeos do clone 9.4 de BL21(DE3) de *E.coli* identificados por Espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).....54

Tabela 3: Esquema estrutural dos surfactantes catiônicos. Detergentes utilizados como agentes solubilizantes dos corpos de inclusão íntegros e recombinantes.....63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Sistema de expressão procarioto (<i>Escherichia coli</i>)	18
2.2 Proteínas Recombinantes	20
2.3 Vetor de expressão	21
2.4 Corpos de inclusão	22
2.5 Solubilização	26
2.6 Osmotinas.....	28
3. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivo Geral	33
4.2 Objetivos Específicos.....	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Reagentes	34
5.2 Bactérias.....	34
5.3 Fungos.....	35
5.4 Expressão da proteína recombinante em <i>Escherichia coli</i>	35
5.4.1 <i>Parâmetros de Cultivo</i>	36
5.4.2 <i>Lise celular</i>	37
5.5 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida	37
5.6 Análise das frações protéicas de E. coli BL21 (DE3) por Espectrometria de massas	38
5.6.1 <i>Seleção e processamento dos spots</i>	38
5.6.2 <i>Espectrometria de massas</i>	39
5.6.3 <i>Pesquisa em bancos de dados</i>	39
5.7 PCR de Colônia.....	40
5.7.1 <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	41
5.8 Imunodeteção de proteínas imobilizadas em membranas (western blotting).....	42
5.9 Solubilização dos corpos de inclusão.....	42

5.9.1	<i>Agentes surfactantes</i>	42
5.9.2	<i>Agente desnaturante</i>	45
5.9.3	<i>Tratamento por ultrassom</i>	45
5.9.4	<i>Solubilização do corpo de inclusão utilizando uma protease do látex de</i> <i>Calotropis procera</i>	46
5.9.4.1	<i>Atividade proteolítica total utilizando azocaseína como substrato</i>	46
5.10	Cromatografia IMAC com Niquel Imobilizado	47
5.10.1	<i>Protocolo com CTAB 1%</i>	47
5.10.2	<i>Protocolo com Cloridrato de Guanidina</i>	47
5.11	Cromatografia Hidrofóbica	48
5.12	Cromatografia de troca iônica em Resource-S acoplada a sistema FPLC 48	
5.13	Ensaio antifúngicos	49
5.13.1	<i>Cultivo dos fungos e obtenção das suspensões de esporos</i>	49
5.13.2	<i>Inibição do crescimento micelial</i>	50
5.13.3	<i>Inibição da germinação de esporos</i>	50
5.14	Microscopia de Força Atômica (MFA)	51
6.	RESULTADOS	52
6.1	Expressão da proteína recombinante em <i>Escherichia coli</i>	52
6.1.1	<i>Parâmetros de Cultivo</i>	52
6.1.2	<i>Análise das frações de E. coli BL21 (DE3) por Espectrometria de massas</i>	54
6.2	PCR de Colônia.....	58
6.3	Solubilização dos corpos de inclusão.....	61
6.3.1	<i>Agentes surfactantes</i>	61
6.3.2	<i>Agente desnaturante</i>	65
6.3.3	<i>Tratamento por ultrassom</i>	66
6.4	Purificação da rCpOsm	67
6.5	Ensaio antifúngicos.....	70
6.6	<i>Solubilização do corpo de inclusão utilizando uma protease do látex de</i> <i>Calotropis procera</i>	73
6.7	Microscopia de Força Atômica	78
7.	Discussão.....	81
8.	Conclusão	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1. INTRODUÇÃO

O organismo procariótico *Escherichia coli* é amplamente usado como sistema de produção de proteínas recombinantes e apresenta uma maquinaria celular bem estabelecida, além de ferramentas celulares e protocolos disponíveis para a síntese de elevados níveis de proteínas heterólogas. A expressão e a purificação de uma proteína recombinante desejada, em grande quantidade, é uma excelente estratégia que permite o estudo mais completo e detalhado de moléculas, cuja ocorrência no organismo de origem é baixa, limitando sua obtenção em quantidades satisfatórias para estudos e mesmo aplicações. No entanto, um problema recorrente durante o processo de expressão de proteínas recombinantes em *E.coli*, sistema procariótico universalmente utilizado, é a formação de estruturas macromoleculares de proteínas densamente empacotadas e, algumas vezes, desnaturadas, fruto de enovelamentos inadequados. Estas estruturas são chamadas de corpos de inclusão (CI). Esse produto gênico tem sua importância baseada na alta expressão protéica e na sua resistência ao ataque proteolítico por proteases celulares. Porém, essas proteínas empacotadas, muitas vezes, encontram-se parcialmente dobradas e frequentemente são insolúveis, o que não apenas se torna indesejável, mas também representa um desafio a ser resolvido.

Atualmente, os métodos de solubilização de proteínas de corpos de inclusão dispõem do uso de agentes caotrópicos em altas concentrações, que geram nas proteínas empacotadas uma estrutura onde as interações hidrofóbicas ficam expostas, aumentando a propensão de agregação durante o dobramento, o que causa decréscimos nos rendimentos e dificulta a recuperação.

Em muitos casos é possível solubilizar e redobrar proteínas agregadas para seu estado nativo, mas cada caso é um caso. Características intrínsecas de cada proteína empacotada, tais como hidrofobicidade/hidrofilicidade, presença de pontes dissulfeto, e grau de oligomerização são apenas algumas considerações que exigem estratégias bem planejadas para recuperar em estado solúvel e ativo a proteína desejada, e ainda iniciar o processo de sua purificação. Embora diversas abordagens para o redobrimento de proteínas recombinantes tenham

sido desenvolvidas, estudos continuam buscando protocolos relativamente simples, de baixo custo e adequados a cada proteína em questão.

Ressalta-se ainda que, a recuperação e o redobramento de proteínas de corpos de inclusão, obtidos usando métodos suaves de solubilização, são considerados por muitos autores, maiores do que quando comparados com a solubilização realizada com altas concentrações de agentes caotrópicos. Esse método suave mantém, até certo ponto, a existência de estruturas secundárias de proteínas.

No contexto apresentado, este trabalho teve por meta obter uma proteína recombinante, depositada em corpos de inclusão de *E. coli* solubilizada, ativa e passível de purificação. Considerando a meta, os objetivos incluíram testar protocolos inovadores para solubilizar a proteína desejada, de modo a contribuir para a pluralidade de estratégias possíveis para recuperação de proteínas recombinantes, retidas em corpos de inclusão. Dentre as inovações destacam-se o uso de surfactante sintético, derivado do aminoácido arginina, e do uso de protease vegetal, oriunda da mesma fonte biológica da qual a proteína recombinante foi obtida de forma nativa, sendo esta resistente à proteólise pela protease usada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema de expressão procarioto (*Escherichia coli*)

A biotecnologia moderna tem avançado bastante após a descoberta da estrutura de dupla hélice do ácido desoxirribonucléico, das enzimas de restrição, do desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). O advento da tecnologia do DNA recombinante revolucionou as estratégias para a produção de proteínas heterólogas. Devido ao genoma bem caracterizado e uma variedade de ferramentas bem estabelecidas e disponíveis para manipulação genética, *Escherichia coli* é, ainda, a alternativa mais escolhida para a produção de proteínas recombinantes (BANEYX; MUJACIC, 2004).

De fato, havendo todos os insumos necessários para a transformação, este sistema bacteriano oferece a oportunidade de rapidamente se responder questões iniciais a cerca da transgenia da proteína desejada, tais como: a estabilidade gênica no sistema heterólogo; a expressão correta e em níveis adequados; dentre outras. No entanto, a produção heteróloga para aplicações industriais ou para fins de pesquisa, na maioria das vezes, apresenta condições de crescimento celular significativamente diferente ao ambiente natural do microorganismo, resultando numa limitação da produtividade (CHOU, 2007).

Comparado com outros sistemas de expressão bem estabelecidos como o eucariótico, por exemplo, leveduras e células mamárias, o sistema de expressão procariótico oferece várias vantagens como: acúmulo rápido de biomassa; fácil manuseio; processo simples de *scale-up*¹. Por causa de sua longa história como um sistema modelo, a genética desse organismo é muito bem caracterizada e, muitas ferramentas foram desenvolvidas para engenheirar seus cromossomos e facilitar a clonagem e expressão de seus genes (LEE, 1996, BANEYX; MUJACIC, 2004).

¹A extrapolação (scale-up) é o processo de trabalho que permite passar de uma escala de laboratório ou piloto de desenvolvimento, para uma escala ampliada de produção.

Estratégias como criação de vetores de expressão, dosagem do gene, força do promotor (regulação da transcrição), estabilidade do mRNA, regulação traducional e design do hospedeiro são os principais desafios à obtenção de um rendimento elevado de proteína a baixo custo (JANA, 2005).

Mesmo apresentando desvantagens como incapacidade de realizar modificações pós traducionais, bem como capacidade limitada de refazer pontes dissulfeto presentes em algumas estruturas proteicas, além de um elevado conteúdo de endotoxinas, comercialmente, a bactéria *E.coli* é classificada como organismo seguro, e provou ser economicamente viável na produção de produtos proteicos, o que não descarta a necessidade de otimização do processo. Essa otimização se dá pela maior quantidade de proteína recombinante funcional produzida por unidade de volume e unidade de tempo (BROEDEL *et al.*, 2001).

2.2 Proteínas Recombinantes

Proteínas superexpressas referem-se à síntese de grandes quantidades de proteínas desejadas. A produção heteróloga de proteínas e enzimas envolve dois passos principais. São eles (1) A introdução de DNA exógeno em células hospedeiras e (2) Fatores que afetam a expressão de DNA exógeno para a síntese de proteínas no sistema de expressão escolhido. O passo (1) possui três considerações principais. São elas: (a) Identificação e isolamento do DNA a ser introduzido; (b) A identificação do vetor e construção de vetor recombinante; (c) Identificação do sistema de expressão adequado para receber rDNA (RAI; PADH, 2001).

O desafio para a produção de proteínas na escala e a qualidade necessária para aplicações experimentais, terapêuticas e comerciais tem levado ao desenvolvimento de um conjunto diversificado de métodos para a produção de proteína heteróloga (ZERBS; FRANK; COLLART, 2009).

Para uma otimização na expressão recombinante de uma proteína, a escolha do vetor de expressão deve ser feita de acordo com as peculiaridades da proteína de interesse. Dentre os mais variados organismos hospedeiros, podemos citar as bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas unicelulares (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Da mesma forma, existe uma grande quantidade de catálogos de plasmídeos de expressão: eles são resultantes de múltiplas combinações de *replicons*, promotores, marcadores de seleção, múltiplos sítios de clonagem e estratégias para remoção e secreção da proteína (SCHMIDT, 2004; TERPE, 2006).

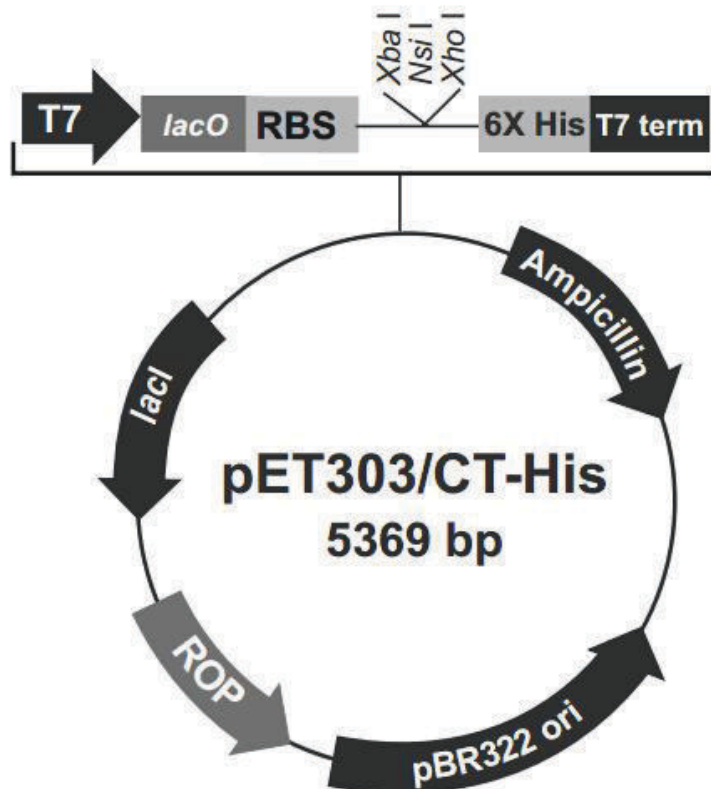
As proteínas recombinantes são necessárias em pesquisas biológicas para investigar a atividade de enzimas, de ligação ao ligante, as interações ou outras funções *in vitro*. Muitas vezes, um obstáculo encontrado no estudo e na utilização de proteínas é sua extrema sensibilidade a condições as quais são sujeitas (BONDOS; BICKNELL, 2003). Então, uma condição não favorável durante a expressão, purificação ou armazenamento pode alterar a estrutura da proteína, favorecer a formação de agregados protéicos irreversíveis ou a perda de atividade da mesma (LU *et al.*, 2001).

2.3 Vetor de expressão

Um vetor de expressão de genes baseado na RNA polimerase do bacteriófago T7, como é o caso do plasmídeo pET303::CT-His, é altamente seletivo para os seus próprios promotores, que não ocorrem naturalmente em *E. coli*. Quando o mRNA é traduzido eficientemente, uma proteína alvo pode acumular-se a mais do que 50% da proteína celular total em três horas ou menos (STUDIER; MOFFATT,1986). Este desempenho é altamente favorável do ponto de vista de produção. Pode ser, entretanto, desfavorável se toda a proteína recombinante se depositar em corpos de inclusão totalmente insolúveis.

O sistema pET foi originamente desenvolvido para possuir vantagens, como alta atividade e especificidade a RNA polimerase do bacteriófago T7, que permitem uma expressão regulada de genes heterólogos em *E. coli* a partir do promotor T7. Esse vetor de expressão possui: promotor Lac T7 para um alto nível de expressão de um gene de interesse, múltiplo sítio de clonagem para digestão por enzimas de restrição e ligação do gene de interesse, uma cauda N- ou C-terminal com 6 histidinas (*6x His tag*) para detecção e purificação da proteína, um gene de resistência à ampicilina para seleção em *E.coli*, uma origem de replicação pBR322 para replicação de um baixo número de cópias e manutenção do plasmídeo em *E. coli*, gene Lac I que codifica o repressor lac para reduzir a transcrição basal do promotor lac T7 e um operador onde se ligue o repressor lac na ausência do IPTG (Figura 1)(INVITROGEN, 2010).

Figura 1: Vetor Champion™ pET303/CT-His.



Vetor para um alto nível de expressão de proteínas induzíveis e fusionadas no N- ou C- terminal com uma cauda adicional de 6 histidinas em *E.coli*.

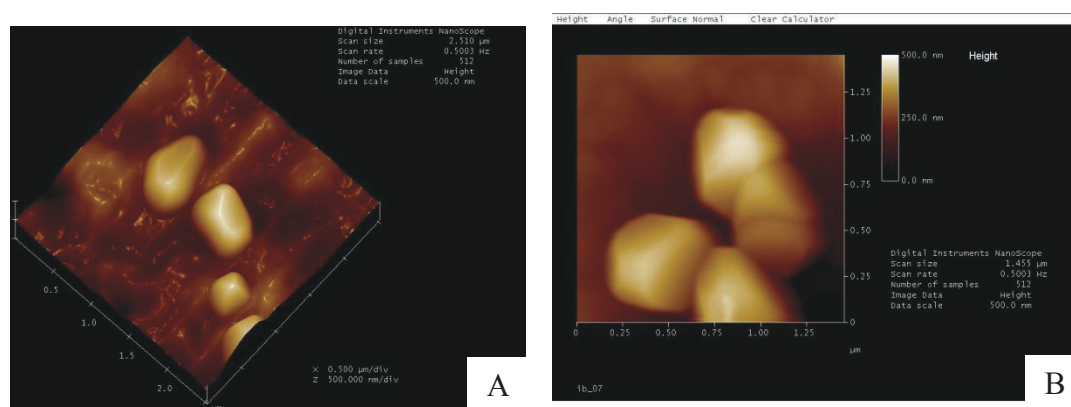
2.4 Corpos de inclusão

Maximizar a solubilidade de uma proteína heteróloga tem sido o objetivo número um de uma biomanufatura de grande escala. Nas fábricas de células bacterianas, proteínas recombinantes superexpressas, geralmente, não conseguem assumir corretamente sua conformação nativa e se acumulam como partículas insolúveis de elevada pureza chamadas corpos de inclusão (GONZÁLEZ-MONTALBÁN *et al.*, 2007). A superexpressão de proteínas eucarióticas em microorganismos transformados resulta num acúmulo de

proteínas recombinantes com conformação diferente da nativa, na maioria das vezes, mal enoveladas ou inativas.

Corpos de inclusão são agregados proteicos, insolúveis, presentes na maioria das vezes, no citoplasma de um organismo procarioto recombinante, resultante de uma superexpressão do plasmídeo que possui a região codificadora de um gene de interesse. Segundo Prouty, Karnovsky e Goldberg (1975), os CI são grânulos intracelulares densos e amorfos, visíveis por micrografia eletrônica. Isso pode ser explicado pelo fato de que, dependendo da localização celular, os corpos de inclusão exibem diferenças na composição de proteína, embora eles sejam formados pela expressão da mesma cadeia de polipeptídeos. Os corpos de inclusão periplásmicos são essencialmente amorfos, enquanto que os citoplasmáticos são altamente regulares (BOWDEN *et al.*, 1991). A Figura 2 mostra imagens de corpos de inclusão contendo a proteína recombinante alvo deste trabalho. As imagens foram obtidas por meio de análises de Microscopia de Força Atômica (AFM), no modo contato de operação.

Figura 2: Imagens de corpos de inclusão de *E. coli* por Microscopia de Força Atômica.



Imagens obtidas por meio de Microscopia de Força Atômica. (A) AFM tridimensional dos corpos de inclusão obtidos de bactérias transformadas (*E.coli*) expressando a proteína recombinante (CpOsm). (B) Imagem 2D de 1,25 x 1,25 µm. Fonte: autora.

Carrió e Villaverde (2001) mostram que corpos de inclusão não são agregados proteicos inertes, produtos de um acúmulo oriundo de um crescimento, pelo contrário, são o resultado de um desbalanço no equilíbrio entre a agregação da proteína *in vivo*, durante sua síntese, e sua solubilização. Os autores

consideraram esses agregados como o principal obstáculo na produção de proteínas recombinantes solúveis e funcionais. No entanto, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos de formação dos corpos de inclusão, mas sabe-se que proteínas presentes nesses agregados proteicos podem, a partir de procedimentos de redobramento *in vitro*, ser recuperadas.

Uma solubilização eficiente é o passo inicial na recuperação da proteína. Walther *et al.*(2013) visualizaram que após a solubilização, os corpos de inclusão foram penetrados pelo agente de solubilização, diminuindo os núcleos densamente empacotados, bem como a proteína, difundindo-se para fora. Apesar de ser um processo complexo, a solubilização pode ser descrita por um modelo de camada homogênea com uma alta ordem de reação.

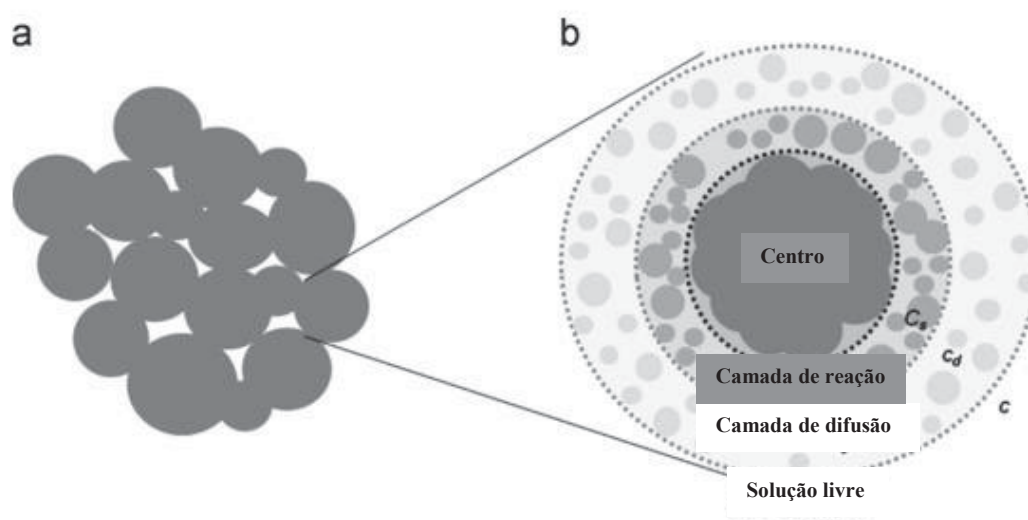
Corpos de inclusão não são exclusividade de sistemas hospedeiros de expressão procarióticos, pode-se encontrar a formação desses agregados insolúveis tanto em leveduras como em eucarióticos superiores, resultado de uma superexpressão de proteínas recombinantes (LILIE; SCHWARZ; RUDOLPH, 1998). Até mesmo proteínas endógenas, se superexpressas, podem se acumular em corpos de inclusão (GRIBSKOV; BURGESS, 1983). Por outro lado, Buchner e Rudolph (1991) afirmam que, os agregados resultantes obtidos a partir do processo de expressão heteróloga, chamados corpos de inclusão, são o principal obstáculo para a produção de proteínas recombinantes numa forma solúvel e funcional.

A organização estrutural interna dos corpos de inclusão não é inteiramente conhecida e sua arquitetura estrutural pode certamente ser influenciada pelas características moleculares da proteína recombinante depositada em sua estrutura. Uma representação esquemática do que seria esta organização está representada na Figura 3, adaptada de Walther *et al.* (2013).

A expressão de proteínas por meio de qualquer sistema heterólogo se constitui conceitualmente em um bioprocesso, mesmo que este não tenha fins de produção comercial. Assim, a palavra-chave de qualquer bioprocessos chama-se rendimento. Em última instância, por mais desprezível que seja um processo de transgenia em procariotos, o operador interpreta como sucesso a obtenção do produto gênico solúvel, estável, ativo, em um protocolo reprodutivo, com o maior

redimento possível. Assim, todo protocolo de expressão tem na fase de recuperação de seu produto transgênico, a fase crítica do processo.

Figura 3: Desenho esquemático de arquitetura interna de corpos de inclusão bacteriano.



(a) Agregados de corpos de inclusão. (b) Zoom em uma das estruturas presente no aglomerado proteico, evidenciando sua estrutura interna. Adaptado de (Walther *et al.*, 2013).

Estudos mostram que rendimentos mais altos de proteínas solúveis foram conseguidos, seja por redução da temperatura de cultivo, como pela sequência engenheirada de proteínas, pela adição de parceiros de fusão ou a produção de chaperonas selecionadas. Em geral, estas abordagens provaram ser particularmente ineficientes no que diz respeito às proteínas de membrana e proteínas de difícil expressão. Na pressa para melhorar a solubilidade, a qualidade conformacional tem sido, muitas vezes, ignorada ou assume-se estar intimamente ligada à solubilidade (GONZÁLEZ-MONTALBÁN *et al.*, 2007).

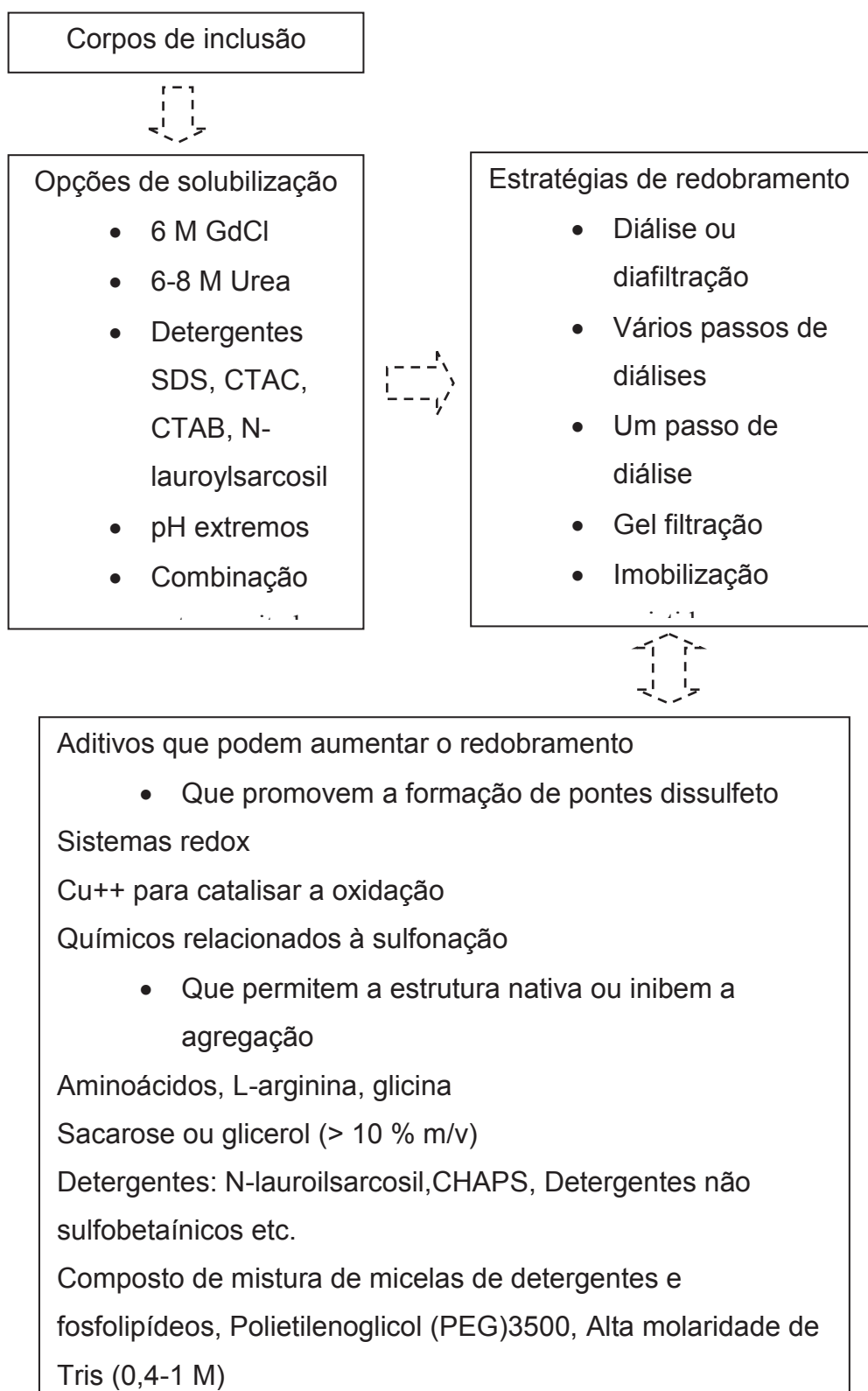
A solubilização de agregados de proteínas, tais como corpos de inclusão, não segue as regras de processos de solubilização comuns, conseqüentemente, a potência e a frequência de mistura não são relevantes para o processo (WALTHER *et al.*, 2013).

2.5 Solubilização

A expressão solúvel de proteínas, de forma relevante para os estudos funcionais e estruturais, muitas vezes, é considerado um desafio. Embora muitos fatores bioquímicos sejam conhecidos por afetar a solubilidade, uma investigação completa de fatores limitantes à produção, normalmente, não se torna viável quando se aumenta essa escala. No estudo de Vernet *et al.* (2011) podem ser observadas estratégias de busca para a expressão de proteínas relevantes para a medicina em *E.coli*, usando seis variações genéticas diferentes. Outros autores reportam fatores que afetam a expressão solúvel de proteínas recombinantes, como o efeito da composição do meio, a escolha do hospedeiro de expressão, tempo e temperatura de indução, concentração do indutor de expressão, dentre outros parâmetros (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014).

Corpos de inclusão são solubilizados por exposição à desnaturantes com molaridades elevadas, detergentes, tampões ácidos ou alcalinos, ou através de combinações de reagentes. Em geral, a presença de resíduos de Cys nas proteínas de interesse, muitas vezes, requer a utilização de um agente redutor na solubilização e tampões de redobramento (NOVAGEN, 1998). Na Figura 4, pode-se observar várias estratégias de redobramento que foram utilizadas para otimizar a recuperação da proteína de interesse.

Figura 4: Esquema de estratégias gerais aplicadas para solubilização de proteínas depositadas em corpos de inclusão.



Adaptado de (NOVAGEN, 1998).

A solubilização é uma das etapas mais importantes do processo de *refolding* de uma proteína presente nos corpos de inclusão. O uso de agentes solubilizantes do tipo surfactante é muito aplicado (KLICOVA *et al.*, 2012). Muito raramente haverá um protocolo pré-estabelecido para iniciar o trabalho. Mais corrente é a elaboração de um conjunto inicial de estratégias por meio das quais será avaliado o sucesso de solubilização da proteína desejada. É importante ter em mente que a etapa de solubilização consiste em solubilizar proteínas insolúveis e o resultado esperado é a obtenção de um extrato proteico no qual a proteína recombinante esteja presente. Uma estratégia ideal produziria majoritariamente a solubilização da proteína recombinante e minoritariamente as demais proteínas presentes no material inicial de trabalho, mas isto é uma situação atípica.

2.6 Osmotinas

Na natureza, todos os organismos interagem em algum grau entre si, e estas interações incluem condições favoráveis a uns e desfavoráveis a outros. Por isto, todos os organismos possuem mecanismos diversos de defesa utilizados em situações adversas, que seja em face de outro organismo, ou ao ambiente físico no qual se encontram. As plantas são expostas a diferentes tipos de estresses ambientais e bióticos, como o ataque de patógenos de plantas e insetos predadores. Em resposta a esses ataques, as plantas desenvolveram vários mecanismos de defesa. A indução destes mecanismos resulta na ativação de diferentes genes relacionados com o estresse, em última instância, conduzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a acumulação de fitoalexinas, resposta de hipersensibilidade e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (KOMBRINK; SOMSSICH, 1997).

Universalmente, as proteínas são instrumentos de defesa biológica de qualquer organismo. Nas plantas, uma diversidade de proteínas já foi catalogada como associada a eventos de defesa, quer seja em resposta a adversidades abióticas, quer em resposta a adversidades bióticas. No segundo caso, estas proteínas têm sido classificadas em grupos numerados e chamados com o prefixo

“PRP” do inglês “*Pathogenesis Related Proteins*”, uma menção de que a expressão e/ou atividade destas proteínas é modificada qualitativa ou quantitativamente sob alguma ou várias condições de estresses bióticos (WYPYCH, 2016).

Esta classificação e estes agrupamentos ainda não são consolidados, sofrem frequentes alterações em propostas, resultado do atual dinamismo que a pesquisa científica propicia.

Osmotina, uma proteína relacionada com patogênese antifúngica, é de relevante importância. Pertence ao grupo taumatina semelhante de proteínas (TLPs). Proteínas do tipo taumatina (TLPs) constituem uma família homogênea na qual seus níveis são produzidos ou aumentados pela planta em resposta a diferentes tipos de estresses. Osmotinas têm sido descritas como proteínas únicas devido ao fato de responderem a estresses abióticos e bióticos. Estresses abióticos, especialmente salinidade e seca, são os principais fatores limitantes para o crescimento das plantas e produtividade das culturas. Na tentativa de desenvolver cultivares tolerantes a tais estresses, alternativas biotecnológicas foram desenvolvidas para tentar superar essas barreiras naturais, como por exemplo, o desenvolvimento de genes contendo um promotor forte que codificam proteínas com características agrônomicas desejáveis, como resistência a salinidade ou atividade antifúngica, que serão, então, transferidos para um cultivar de interesse, e esse, por sua vez, apresentará superação de tais barreiras (GOEL *et al.*, 2010; SUBRAMANYAM *et al.*, 2012).

Uma osmotina, aqui denominada de CpOsm, foi purificada do látex de *Calotropis procera* por cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose (pH = 5,0) e Resource-S (pH = 6,0), respectivamente (FREITAS *et al.*, 2011a,b). Embora duas isoformas tenham sido observadas em eletroforese de duas dimensões (pI = 8,9 e 9,1), uma única sequência N-terminal de aminoácidos foi determinada [ATFTIRNNCPYTIWAAA VPGGRRLLNSGGTWTINVAPGTA]. Quando submetida à eletroforese em condições desnaturantes, CpOsm migra como uma única banda de ~20,1 kDa. Entretanto, duas isoformas com massas moleculares de 22,340 Da e 22,536 Da foram detectadas por espectrometria de massas (FREITAS *et al.*, 2011a). CpOsm apresentou atividade antifúngica sobre *Fusarium solani* (IC₅₀= 67,0 µg/mL), *Neurospora sp.* (IC₅₀= 57,5 µg/mL) e *Colletotrichum gloeosporioides*

(IC₅₀= 32,1 µg/mL), inibindo a germinação de esporos e o crescimento vegetativo de hifas. Esta atividade foi perdida quando a proteína foi tratada com DTT, sugerindo que as pontes dissulfeto são fundamentais para que a proteína seja biologicamente ativa.

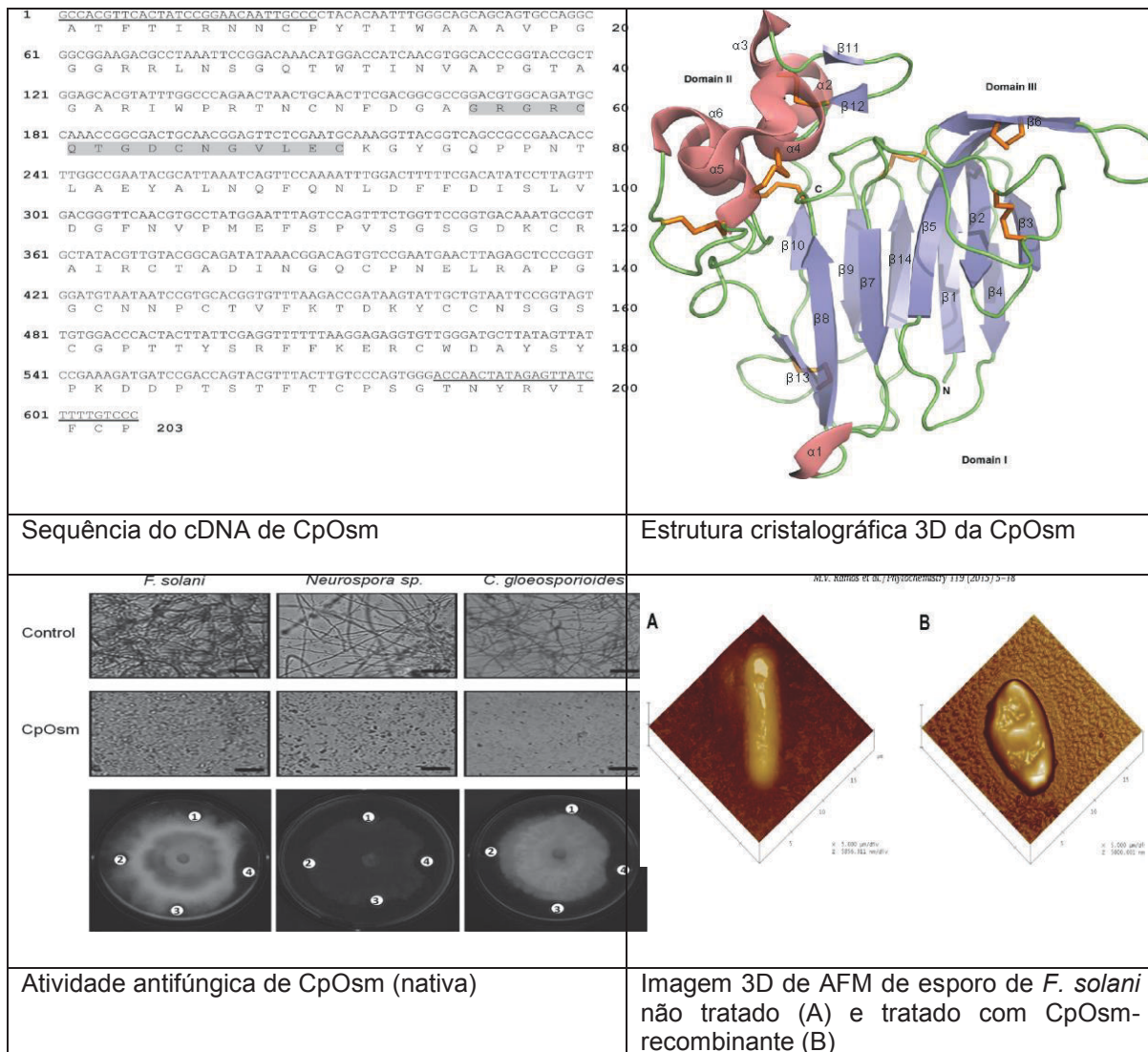
Um estudo posterior descreveu alguns aspectos estruturais da proteína, assim como seu mecanismo de ação sobre fungos. Por meio de ensaios com marcadores de fluorescência, foi possível demonstrar que CpOsm interage com a membrana dos fungos causando extravasamento de conteúdo citoplasmático. Esta atividade foi também evidenciada por análise espectroscópica da interação da proteína com vesículas artificiais. Por fim, os autores descreveram que CpOsm é uma proteína de estrutura muito estável frente a variações de temperatura e pH (FREITAS *et al.*, 2011b).

Este conjunto de observações confirmou que CpOsm possui atividade antifúngica importante sobre fungos fitopatogênicos e esta proteína representa uma ferramenta a ser explorada em estudos genômicos com direta potencialidade de benefícios em culturas agrônômicas. Estes achados estimularam a fase seguinte da pesquisa na qual essa dissertação foi inserida. Ao concluir o projeto, alcançamos com sucesso a clonagem e sequenciamento gênico da CpOsm; expressamos a proteína recombinante em sistemas procarionte (*E. coli*) e eucarionte (*P.pastoris*) e ainda estabelecemos a estrutura cristalográfica da proteína nativa, purificada do látex de sua planta. Ainda como ponto relevante, foi mostrado por meio de Microscopia de Força Atômica que CpOsm expressa e purificada em *P. pastoris* era capaz de lesar irreversivelmente a estrutura de esporos de *Fusarium solani*, e estes resultados foram todos publicados recentemente (RAMOS *et al.*, 2015) (Figura 5).

As potencialidades de CpOsm para uso como proteína de defesa em sistemas eucariontes heterólogos parecem promissoras. Entretanto, o caminho até esta realidade é cientificamente longo. É preciso um detalhado estudo científico prévio para entender esta molécula em condição recombinante. Por isto, obter rCpOsm recombinante, em um sistema de expressão estável e de rendimento favorável é muito importante. Este trabalho nasceu desta motivação e para cumprir as etapas de obtenção, extração e purificação da proteína

recombinante em estado solúvel e ativo. Estas foram as metas norteadoras de todas as estratégias e ensaios elaborados.

Figura 5: Sumário de dados sobre a proteína alvo desta pesquisa.



CpOsm teve sua sequência gênica estabelecida, sua sequência de aminoácidos deduzida e estrutura cristalográfica resolvida. A proteína purificada do látex de *Calotropis procera*, assim como a proteína recombinante expressa em *Pichia pastoris*, apresentaram ação antifúngica.

3. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Uma osmotina superexpressa heterologamente em *Escherichia coli* acumula-se em agregados densos e insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. Com isso, esse estudo propõe a solubilização de uma proteína de látex de *Calotropis procera* produzida em corpos de inclusão de *E. coli* (rCpOsm) e sua potencial aplicação biotecnológica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Este projeto tem por objetivo utilizar o sistema de expressão heteróloga *E. coli* para investigar a produção de uma osmotina recombinante solúvel, utilizando diferentes métodos de solubilização, redobramento e de caracterização da proteína, visando posteriores aplicações biotecnológicas.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes parâmetros de cultivo para produção de corpos de inclusão em *E.coli* e estabelecer a condição ideal;
- Fazer indução de expressão em sistema heterólogo *E. coli*;
- Produzir e solubilizar corpos de inclusão para a realização de atividade anti-fúngica;
- Estabelecer melhor condição de solubilização e redobramento da proteína presente nos corpos de inclusão;
- Caracterizar morfológicamente os corpos de inclusão por microscopia de força atômica;
- Avaliar a estrutura das linhagens de bactérias quando na presença ou ausência de agregados proteicos por espectrometria de massas e microscopia de força atômica;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL

5.1 Reagentes

Marcadores de massa molecular, persulfato de amônio, membrana de diálise com poro de exclusão de 8.000 Da, acrilamida, bis-acrilamida, triton X-100, CTAB, IPTG e glicerol foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. A coluna de troca iônica Resource-S foi obtida da GE HealthCare, Brasil. Ditioneitol (DTT), EDTA, dodecil sulfato de sódio (SDS), iodoacetamida e ureia foram obtidos da Amersham Bioscience, USA. Tripsina (EC 3.4.21.4) grau sequenciamento e DNase I foram obtidas da Promega, Brasil.

Cetrimida e ARG 12 foram obtidos do CIPROVE (Centro de Investigación de Proteínas Vegetales) da UNLP (Universidad Nacional de La Plata).

Os meios de cultura para fungos Agar Sabouraud Dextrose (SDA) e Yeast Peptone Dextrose (YPD) foram obtidos da DIFCO e Himedia, respectivamente. Todas as amostras utilizadas nos ensaios antifúngicos foram esterilizadas utilizando filtros para seringa de 0,22 µm (Millipore®).

Os meios de cultivo bacteriológico LB Agar e LB caldo foram obtidos da Invitrogen e os meios turbo broth, power broth, hyper broth, glicose M9Y foram obtidos da AthenaES™.

Os demais reagentes foram de grau analítico e de diferentes fornecedores.

5.2 Bactérias

As linhagens utilizadas foram ArcticExpress (DE3) e BL21(DE3) do sistema heterólogo *Escherichia coli*. Em cada uma das linhagens foram utilizadas tanto as células com o plasmídeo íntegro, como células com o plasmídeo recombinante (rCpOsm). Essas células foram obtidas do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As células bacterianas são mantidas sob armazenamento a -80 °C em caldo LB

(composição por litro: triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 5 g) suplementado com 20 % de glicerol (v/v).

5.3 Fungos

O fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* foi obtido da micoteca do laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC.

MÉTODOS

5.4 Expressão da proteína recombinante em *Escherichia coli*

A construção do plasmídeo recombinante (plasmídeo íntegro (pET 303::CT-His) com adição da sequência codificadora para a proteína osmotina de *Calotropis procera* (CpOsm), bem como sua inserção no vetor de expressão foi realizada em trabalho anterior (OLIVEIRA, 2014).

A partir da obtenção destes plasmídeos transformados procedeu-se a indução da expressão de rCpOsm. Primeiramente foi realizado um screen dos clones tanto de ArcticExpress (DE3) como de BL21(DE3).

Para a indução em ArcticExpress (DE3), as células foram estriadas em placas estéreis contendo LB ágar (composição por litro: triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 5 g e ágar bacteriológico 1,5%) e carbenicilina 100 µg/mL e gentamicina 20 µg/mL, a partir de uma cultura estoque em glicerol. As placas foram incubadas a 37 °C por 12-16 h, para obtenção de colônias isoladas. Com a ajuda de uma ponteira estéril, uma colônia isolada foi inoculada em erlenmeyers de 50 mL contendo 10% do seu volume (5 mL) de meio caldo LB suplementado com os mesmos antibióticos, nas mesmas concentrações finais utilizadas anteriormente.

As células foram incubadas a 37 °C, sob agitação orbital constante (180 rpm), *overnight*. Alíquotas de 3 mL dessa cultura foram adicionadas em 300 mL de caldo LB, contendo os antibióticos apropriados. Após padronização dos inóculos (DO_{600nm} 0,4), a cultura foi centrifugada em tubos tipo “falcon” de 50 mL,

estéreis, e o *pellet* obtido foi ressuspenso em caldo LB, estéril, contido em outro erlenmeyer estéril com o antibiótico apropriado. Nesse momento, a cultura de ArcticExpress (DE3) foi incubada a 12 °C, 180 rpm, por 30 min. Em seguida, foi adicionado o IPTG (Isopropil β-D-1thiogalactopiranosídeo), um indutor artificial de expressão gênica, para uma concentração final de 0,5 mM e a incubação procedeu-se a 12 °C, 180 rpm, por 24 h.

Após as 24h de indução, as culturas foram centrifugadas a 10.000 x *g*, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células lavado duas vezes com tampão TES (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 2,0 mM; NaCl 0,15 M) centrifugado, em cada lavagem, a 5.000 x *g*, por 10 min a 4 °C.

O protocolo de indução em BL21(DE3) foi o mesmo de ArcticExpress (DE3), diferenciando somente o antibiótico utilizado, no caso, apenas carbenicilina com concentração final de 100 µg/mL e a temperatura de indução para BL21(DE3) foi de 37 °C.

Plasmídeos íntegros (pET 303::CT-His) foram utilizados como controle experimental e as condições foram as mesmas realizadas para os plasmídeos recombinantes descritos anteriormente, tanto em ArcticExpress(DE3) como em BL21(DE3).

5.4.1 Parâmetros de Cultivo

Com o objetivo de verificar a influência de diferentes composições dos meios de cultivo frente ao processo de indução da expressão de proteínas recombinantes, foram testados 6 diferentes meios de cultivo: Turbo Broth (composição por litro: 47,6 g), Power Broth (composição por litro: 52 g), Hyper Broth (composição por litro: 44,5 g), LB suplementado com glicose (composição por litro: 19,8g para 990 mL acrescido de 10 mL de glicose 10%), Superior (composição por litro: 35 g), Glicose M9Y (composição por litro: 15,5 g). Os meios foram preparados seguindo as instruções do fabricante.

Da mesma forma, para avaliar o nível de expressão da proteína recombinante, as células contendo os plasmídeos íntegros e recombinantes foram submetidas a três temperaturas diferentes 25, 30 e 37 °C.

5.4.2 Lise celular

Após o cultivo, centrifugação e lavagem das células recombinantes, as células foram ressuspensas em 1/10 do volume de TES (5 mL), acrescidas de 1/10 do seu volume de Triton X-100 1% v/v (para uma concentração final de 0,1 % v/v) e lisozima para uma concentração final de 100 µg/mL (a partir de uma solução estoque 10 mg/mL). Procedeu-se a incubação em banho-maria a 30 °C por 30 min, até o aparecimento de viscosidade da solução durante a incubação, a solução foi homogeneizada por inversão. Ao lisado celular, foram adicionados CaCl₂ (para uma concentração final de 10 mM) e MgCl₂ (para uma concentração final de 8 mM) e 5 U de DNase I (RQ1 RNase-free DNase). O material foi incubado em banho-maria a 30 °C por 30 min., até o desaparecimento da viscosidade. Centrifugou-se a 12.000 x g, por 30 min a 4 °C e o material precipitado (corpos de inclusão) coletado. Uma pequena amostra do sobrenadante (material solúvel) foi igualmente recuperada.

Uma alíquota foi tirada da fração solúvel (3:1) e da insolúvel (10 mg/mL) e foram submetidas a eletroforese unidimensional. Para tanto, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min, resfriadas à temperatura ambiente (25 °C) e submetidas à corrida eletroforética, em gel de poliacrilamida (15%). Após a centrifugação do material lisado e a separação do sobrenadante, o *pellet* contendo os corpos de inclusão foi lavado duas vezes com TES contendo Triton X-100 1% e deixado em repouso por 30 min antes de cada centrifugação (12.000 x g, por 30 min a 4 °C) (NOGUEIRA, 1999). Em seguida, as amostras foram analisadas ou congeladas em freezer até o passo posterior de uso, de acordo com o procedimento previsto.

5.5 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

Eletroforeses unidimensionais foram utilizadas nesse estudo para acompanhar os processos de lise celular de *E. coli* BL21(DE3), solubilização dos corpos de inclusão e purificação da rCpOsm. As eletroforeses foram feitas em gel de poliacrilamida 15%, em condições desnaturantes, na presença de β-

mercaptoetanol 5%. A técnica foi conduzida de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placas.

Foram utilizados géis de aplicação com 5% de poliácridamida, em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 1%. Os géis de separação foram feitos com tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9, SDS 1% e 15% de poliácridamida. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, contendo SDS 1%, azul de bromofenol 0,02%, β -mercaptoetanol 5% e cristais de sacarose e foram aquecidas por 5 minutos a 100 °C.

Para a estimativa da massa molecular das proteínas em análise, foram utilizados os seguintes marcadores de massa molecular: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa).

As corridas foram realizadas sob as condições de 15 mA por placa e 120 V, por um período médio de 2 horas, a 25 °C, utilizando a solução de Tris 0,025 M (pH 8,3) contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. As bandas proteicas foram visualizadas após coloração dos géis com uma solução de metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v) contendo o corante *Coomassie Brilhante Blue R-250* (PhastGel Blue R) e revelação com uma solução contendo os mesmos componentes, porém, sem o corante.

5.6 Análise das frações protéicas de *E. coli* BL21 (DE3) por Espectrometria de massas

Para verificar a presença da proteína recombinante (rCpOsm) nas frações solúvel e insolúvel de *E. coli* BL21 (DE3) induzidas por 24 h, eletroforeses em gel de poliácridamida 15% foram realizadas e as bandas referentes à proteína de interesse foram excisadas e analisadas por espectrometria de massas.

5.6.1 Seleção e processamento dos spots

As proteínas, referentes às bandas de rCpOsm coradas com *Coomassie Brilhante Blue*, foram retiradas dos géis de poliácridamida com o auxílio de um bisturi e transferidas para tubos do tipo eppendorf de 1 mL, onde foi realizada a

digestão com tripsina, de acordo com o método descrito por Hellman e colaboradores (1995). Os *spots* foram descorados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM com acetonitrila (1:1) e, posteriormente, desidratados com acetonitrila 100% por 5 minutos. Estes foram reidratados em banho de gelo, por 1 hora, com 15 µL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 0,2 µg de tripsina. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas. Em seguida, os peptídeos foram extraídos dos géis com uma solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético (TFA) 5%, com auxílio de um sonicador, por 30 minutos e foram concentrados em *Speed-Vac* (JUNQUEIRA, 2005).

5.6.2 Espectrometria de massas

A mistura de peptídeos da digestão trípica foi dissolvida em 2 µL de TFA 0,5%. Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 C18 (75 µm x 200 mm) utilizando um gradiente de acetonitrila de 7% a 40%, contendo 0,1% de ácido fórmico, a partir de um fluxo de 500 nL/minuto (PANIS *et al.*, 2013).

Os espectros de massa foram adquiridos em um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema NanoUPLC-ESI. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por electrospray no modo ESI (+) através da fonte NanoLockSpray. O canal de coleta do analito foi fechado a cada 30 segundos para passagem do íon de referência. O espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução de GFP (320 fmol/mL) injetado através do spray de referência da fonte NanoLockSpray. O íon duplamente carregado ($[M + 2H]^2+$) foi usado para a calibração de um ponto inicial (Lteff), e a fragmentação iônica de GFP em MS/MS foi usada para obter a calibração final do instrumento.

5.6.3 Pesquisa em bancos de dados

Os dados obtidos pelo ESI-QUAD-TOF foram processados usando o *software* ProteinLynx Global Server v. 2.4 (Waters). O processamento incluiu a correção automática dos valores de m/z dos espectros MS e MS/MS segundo a

massa do íon de referência do lockspray. Conjuntamente, os dados de MS e MS/MS foram submetidos ao programa de busca MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com). A fim de identificar as proteínas, as buscas foram realizadas utilizando banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) restringido para *Viridiplantae (Green Plants)* e, posteriormente, para todas as entradas. Os critérios de busca foram baseados considerando carbamidometilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação das metioninas como modificação variável. Na hidrólise por tripsina, foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos foi de $\pm 0,05$ Da. As proteínas que não foram identificadas pela espectrometria de massas tiveram suas sequências manualmente submetidas ao programa proteinBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), no intuito de compará-las com outras proteínas vegetais.

5.7 PCR de Colônia

Com o objetivo de amplificar a região codificadora do gene que sequencia a proteína rCpOsm e com o objetivo de avaliar a viabilidade dos plasmídeos recombinantes, 100 μ L de culturas de células bacterianas, em diferentes períodos de cultivo, que estavam armazenadas a -80 °C em caldo LB (composição por litro: triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 5 g) suplementado com 20 % de glicerol (v/v) foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 5min, e lavadas com água deionizada estéril três vezes consecutivas, adicionados 10 μ L de água estéril e dessas amostras foram tirados 2 μ L e transferidos para microtubos do tipo eppendorfs. Posteriormente, foram adicionados 1,5 μ L do tampão da enzima GoTaq DNA polimerase flexi (Promega®), 1,2 μ L de $MgCl_2$, 3 μ L de dNTP, 0,6 μ L do *primer* senso (CpOsmFXbalEc 5'- CCGG TCTAGA ATGGCCACGTTCACTATCCGG -3'), 0,6 μ L de *primer* antisenso (CpOsmRXhoIEc 5'- CCGG CTCGAG GGGACAAAAGATAACTCTATAG - 3') na concentração de 5 mM, 0,25 μ L (5U/ μ L) de GoTaq DNA polimerase (Promega®) e água (q.s.p) livre de RNase para um volume final de 15 μ L.

A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research PTC-200 Thermo Cycle), ocorrendo uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 5

minutos e 33 ciclos subsequentes de desnaturação a 95 °C por 45 s, seguida de pareamento a 65 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 1,5 min. Após completar os 33 ciclos, uma etapa de extensão final a 72 °C durante 8 min foi realizada (Tabela 1). Os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e visualizados com brometo de etídio (SAMBROOK *et.al* 1989). A imagem foi capturada com o auxílio de uma luz ultravioleta (302 nm) em um transluminador (Macrovue™ Transluminator, Pharmacia Biotec).

Tabela 1 - Condições utilizadas para a amplificação da região codificante da rCpOsm

Etapas	Estágio	Repetição	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	1	95 °C	5 min.
Amplificação	2	33	95 °C	45 s
			65 °C	45 s
			72 °C	1,5 min.
Extensão final	3	1	72 °C	8 min.

5.7.1 Eletroforese em gel de agarose

A integridade dos plasmídeos foi constatada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) preparado com tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). As amostras foram preparadas, para um volume de 10 µL, adicionando-se 60% (v/v) de azul de bromofenol [0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v)], preparados com tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0)], 1 µL de brometo de etídio (1 mg/mL) e 1 µg da amostra. Em seguida, a amostra foi aplicada no gel de agarose. As bandas correspondentes ao cDNA da osmotina recombinante foram visualizadas por meio de um transiluminador (Gel Transilluminator Bio-Rad) de UV e uma câmera acoplada ao microcomputador dotado de *software* de captura e análise de imagens.

5.8 Imunodeteção de proteínas imobilizadas em membranas (western blotting)

Primeiramente realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) com as amostras de interesse. Após, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, GE healthcare), em um sistema TE 70 Semi-dry Transfer Unit (Amersham Biosciences) a 100 mA por 1 h. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das proteínas imobilizadas na membrana com vermelho de Ponceau 0,2 % (m/v), diluído em ácido acético 1% (v/v). Em seguida, a membrana foi incubada em solução bloqueadora (PBS pH 7,4– NaCl 0,13 M, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM e 5% leite desnatado) sob agitação constante de 40 rpm a 25 °C por 2 h. Após o período estabelecido, a membrana foi retirada da solução bloqueadora e lavada 3 vezes consecutivas com PBS. Os anticorpos primários foram adicionados numa proporção de 1:5000 (v/v) à solução PBS acrescido de leite desnatado 5% e submetidos à uma agitação constante de 40 rpm a 25 °C por 2 h. Novamente, a membrana foi retirada da solução bloqueadora e lavada 3 vezes consecutivas com PBS. Os anticorpos secundários (Anti-IgG de coelho) foram adicionados numa proporção de 1:10000 (v/v) à solução de PBS acrescido de leite desnatado 5% e submetidos à agitação constante a 25 °C por 2 h. A membrana foi lavada com tampão PBS e à membrana foi adicionado o substrato (5-bromo-4-cloro-3-indoilsfato/nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT)) e esperou-se a formação de bandas arroxeadas. A reação foi interrompida adicionando água à membrana.

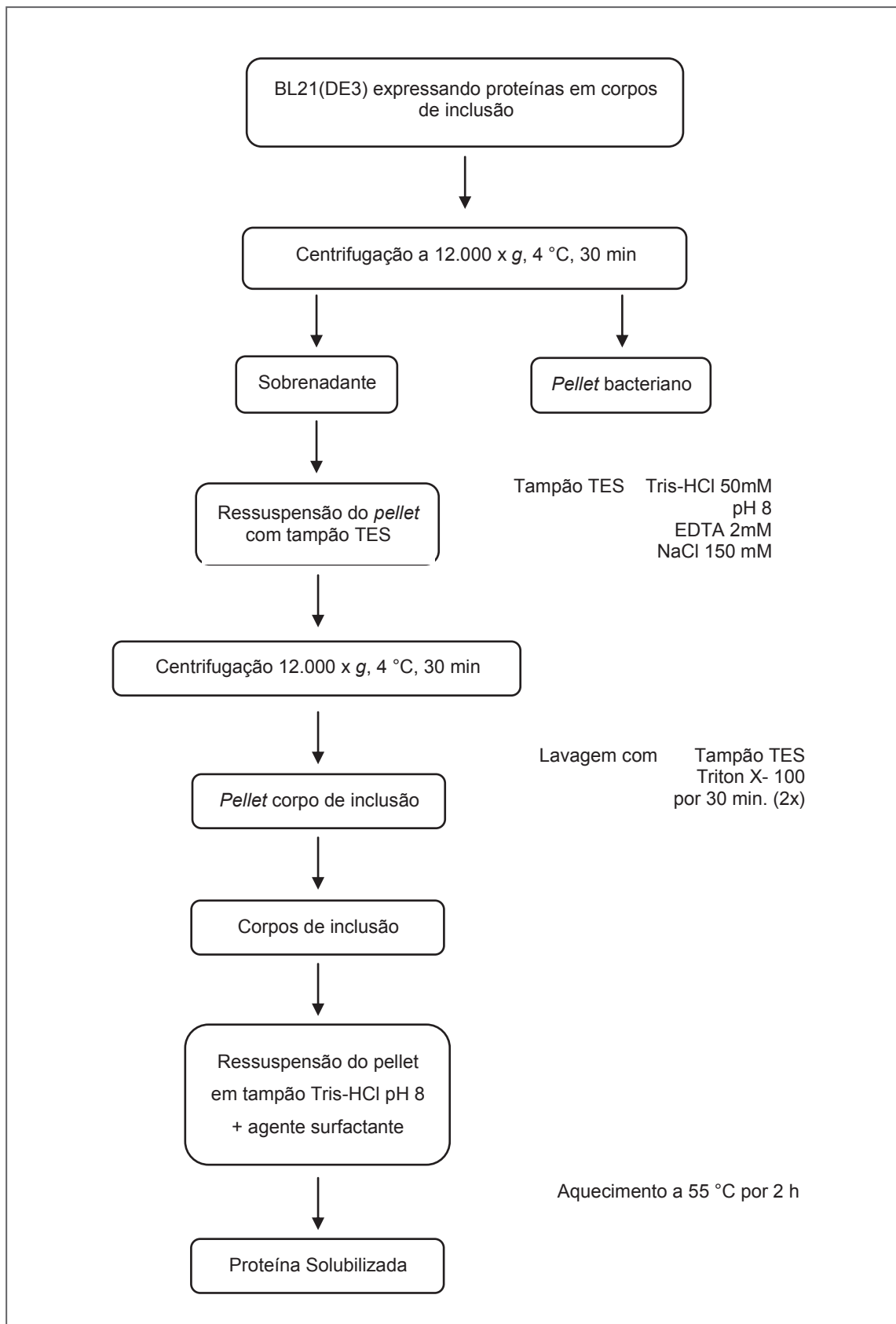
5.9 Solubilização dos corpos de inclusão

5.9.1 Agentes surfactantes

Os corpos de inclusão foram solubilizados com diferentes agentes surfactantes considerados agentes solubilizantes suaves. Foram utilizados Arg12, Cetrimida, CTAB em concentrações crescentes (0,1, 0,5 e 1%) presentes em tampão de solubilização Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M. Esse tampão foi

adicionado em corpos de inclusão na proporção de 0,2 g/mL de surfactante, e então, incubados a 55°C por 2h. Procedeu-se com a centrifugação a 8.000 x g por 30 min a 4 °C e com a eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 15% para avaliar qualitativamente se a proteína recombinante estava na fração solúvel ou na fração insolúvel (Figura 6).

Figura 6: Esquema para uma produção eficiente de proteínas solúveis a partir de corpos de inclusão bacterianos usando método suave de solubilização.



5.9.2 Agente desnaturante

Outro protocolo químico de ressolubilização dos corpos de inclusão foi adaptado de Palmer e Wingfield (2012). O procedimento possuía o agente desnaturante Cloridrato de Guanidina. O *pellet* contendo proteínas em corpos de inclusão foi lavado três vezes com 15 mL de tampão de lavagem (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, Urea 2 M, Triton X-100 2%) e centrifugado três vezes por 30 min, 12.000 x *g*, a 4 °C. O passo seguinte de lavagem foi realizado somente com 15 mL de tampão TrisHCl 100 mM pH 8,0, o qual o *pellet* foi lavado duas vezes, seguido de centrifugações iguais a do passo anterior. Os sobrenadantes resultantes das lavagens foram guardados e alíquotas foram retiradas para análise em eletroforese de poliacrilamida 15%. O *pellet* final foi ressuspenso em 4 mL de tampão de extração (50 mM TrisHCl pH 8, 3 M Cloridrato de Guanidina) e deixado em repouso a temperatura ambiente por 30 min. Centrifugou-se esse material a 4 °C, 30 min 8.000 *g*. Essa amostra foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

5.9.3 Tratamento por ultrassom

Para avaliar se esse método físico seria eficaz para desestruturar os corpos de inclusão e desagregar suas proteínas, possivelmente liberando a osmotina recombinante, o volume de suspensão celular da fração insolúvel do plasmídeo recombinante (corpos de inclusão) bem como do plasmídeo íntegro foi ajustado para 10% do volume de cultivo em tampão TrisHCl 50 mM pH 8. Após suspensão e homogeneização da amostra, as células foram submetidas ao tratamento de sonicação em banho de gelo, de 4 ciclos de 2,5 min cada, a 50% de potência (Bandelin Sonoplus Mini20). As amostras foram submetidas posteriormente à centrifugação a 4 °C por 30 min a 12.000 x *g*. O perfil de proteínas solúveis foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

5.9.4 Solubilização do corpo de inclusão utilizando uma protease do látex de *Calotropis procera*

A protease cisteínica CpCP-1 do látex de *Calotropis procera*, purificada e caracterizada por RAMOS *et al.* (2013) foi utilizada como um método enzimático de solubilização de corpos de inclusão. A proposta seria que a protease seria capaz de digerir proteínas dos corpos de inclusão, porém não a osmotina, proteína co-existente com a protease do látex de *C. procera*. CpCP-1 foi utilizada na concentração de 1mg/mL acrescida de DTT 3 mM como agente ativador da enzima e 100 µL dessa solução foi incubada com 40 mg de corpos de inclusão a 37 °C por 24 h. Ao final utilizou-se IAA (iodoacetamida) 20 mM para inativar a atividade da enzima. Os resultados foram avaliados por eletroforese de poli(acrilamida) 15% bem como a atividade enzimática por atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato.

5.9.4.1 Atividade proteolítica total utilizando azocaseína como substrato

Para avaliar a estabilidade da atividade enzimática da protease CpCP-1, após 24h a 37 °C, a atividade proteolítica foi realizada de acordo com o método de Xavier-filho (1989), utilizando azocaseína, um substrato inespecífico para proteases. CpCP-1 foi utilizada na concentração de 1 mg/mL e papaína foi utilizada como controle positivo, na concentração de 0,1 mg/mL, e dissolvidas em tampão acetato 50 mM (pH 5,0). Foram retiradas alíquotas de 80 µL de cada solução, as quais foi adicionado tampão acetato e 40 µL de DTT (3 mM) de forma que o volume final fosse 500 µL, para iniciar a reação enzimática.

Os ensaios proteolíticos foram feitos na presença de ditioneitol 3 mM, o DTT, um ativador de proteases que age reduzindo as pontes dissulfeto das proteases cisteínicas. Este permaneceu em contato com a amostra por 10 min antes da adição dos outros reagentes. Em seguida, foram adicionados 200 µL de azocaseína 1% a esta solução que foi posteriormente incubada a 37 °C por 1 h. A reação foi finalizada com a adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%.

As amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 x *g* por 10 min a 25 °C e os sobrenadantes separados foram alcalinizados com 500 µL de NaOH 2 N.

Neste ensaio, o grupo controle foi conduzido com os mesmos reagentes, contudo as amostras somente foram adicionadas à reação após a adição de TCA. Esse procedimento garante que não há reação proteolítica no controle negativo. As leituras espectrofotométricas dos produtos da reação foram realizadas a 440 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que incrementa em 0,01 nm a absorvância a 440 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em Unidade de Atividade (UA) ou Unidades de Atividade por micrograma de proteína (UA/µgP).

5.10 Cromatografia IMAC com Níquel Imobilizado

5.10.1 Protocolo com CTAB 1%

A fração solubilizada com o CTAB 1% foi dialisada com o tampão de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 500 mM) e aplicada na matriz Sepharose carregada com Níquel imobilizado (Ni Sepharose 6 *fast flow*, GE Healthcare) que foi previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Após 1 h de contato com a matriz, o tampão de equilíbrio foi novamente aplicado na matriz e o primeiro pico (PI) foi coletado (proteínas que não interagiram com a coluna). Em seguida, foi aplicado à coluna sequencialmente o tampão de equilíbrio acrescido de 50 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM de imidazol.

5.10.2 Protocolo com Cloridrato de Guanidina

A fração solubilizada com o tampão de lavagem foi submetida à cromatografia em matriz de Sepharose carregada com níquel (Ni Sepharose 6 *Fast Flow*, GE Healthcare). A coluna foi lavada primeiramente com tampão de ressuspensão (50 mM TrisHCl pH 8 e NaCl 150 mM) e em seguida a amostra foi adicionada. Novamente a coluna, com a amostra, foi lavada com o tampão de ressuspensão o qual eluiu proteínas que não interagiram com a matriz (PI) e o pico 2 (PII) foi eluído com o tampão de ressuspensão contendo 250 mM de

imidazol. As cromatografias foram realizadas em fluxo constante de 1mL/min e as frações coletadas foram monitoradas por medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning*. Os picos foram dialisados contra água destilada, liofilizados e analisados por SDS-PAGE 15%.

5.11 Cromatografia Hidrofóbica

Outra cromatografia utilizada como alternativa para que a rCpOsm ficasse retida numa coluna cromatográfica e pudesse, então, ser purificada foi a cromatografia hidrofóbica. De acordo com Ramos *et al.* (2015) essa proteína apresenta domínios de hidrofobicidade bem evidentes. A fração solubilizada com o CTAB 1% foi dialisada com o tampão de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M) e aplicada na matriz FenilSepharose CL4B- Sigma Aldrich, que foi previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Após 1h de contato com a matriz, o tampão de equilíbrio foi novamente aplicado na matriz e o primeiro pico (PI) foi coletado (proteínas que não interagiram com a coluna). Em seguida, foi aplicado à coluna, sequencialmente, o tampão de equilíbrio com concentrações decrescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,2; 1; 0,9; 0,6; 0,3 M). Em seguida, a coluna foi lavada com NaOH 0,1 M seguido de bastante água destilada e, por fim, etanol 20%. As frações coletadas foram dialisadas, liofilizadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

5.12 Cromatografia de troca iônica em coluna Resource-S acoplada a sistema FPLC

Os corpos de inclusão solubilizados com CTAB 1% e exaustivamente dialisados contra água destilada foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna Resource-S acoplada ao sistema de FPLC "*Fast Performance Liquid Chromatography*". A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Os corpos de inclusão foram dissolvidos no tampão de equilíbrio da coluna, centrifugados a 10.000 x g, a 4 °C, por 10 minutos, filtrados em filtros de 0,22 µm (Millipore ®) e 1 mL da solução de amostra foi aplicado à cada corrida cromatográfica. As proteínas retidas na matriz foram eluídas

utilizando um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl, durante 40 minutos, a um fluxo de 1 mL/minuto, e o conteúdo proteico determinado a 280 nm. Os picos obtidos foram reunidos e dialisados contra água destilada, liofilizados e submetidos a eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 15%.

5.13 Ensaio antifúngicos

5.13.1 Cultivo dos fungos e obtenção das suspensões de esporos

O cultivo dos fungos foi realizado em placas de Petri (100 x 15 mm), contendo 25 mL do meio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) estéril. As placas inoculadas foram mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D. a 27 ± 2 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro). Os fungos foram renovados mensalmente através da transferência de *pellets* de uma placa contendo os fungos para outra placa contendo apenas meio de cultura SDA. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Os meios de cultura foram constituídos de 65 g de SDA dissolvido em 1 L de água destilada e autoclavados por 15 minutos, a 121 °C, 1,5 kgf.

A obtenção das suspensões de esporos foi realizada de acordo com o método descrito por Melo e colaboradores (1997), com algumas modificações. Os esporos foram coletados a partir da adição de 5 mL de água destilada estéril sobre os meios de culturas contendo os respectivos fungos, crescidos por duas semanas. Com o auxílio de uma alça de Drigalski (previamente flambada), foram realizados movimentos suaves na superfície do micélio para a liberação dos esporos. As suspensões obtidas foram filtradas em malhas finas de nylon estéreis, para a remoção das hifas remanescentes. O filtrado resultante foi denominado de suspensão padrão de esporos. Para a realização dos ensaios de inibição de crescimento micelial e da germinação de esporos, as suspensões contendo os esporos foram ajustadas para uma concentração de 2×10^5 esporos/mL. Os esporos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olimpus System Microscope BX 60).

5.13.2 Inibição do crescimento micelial

Para avaliar o efeito das frações submetidas aos processos de solubilização descritos anteriormente, em relação ao crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, o ensaio de inibição do crescimento foi realizado conforme a metodologia descrita por Broekaert, Cammue e Vanderleyden (1990), com algumas adaptações. Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (estéreis) de 96 poços. Cada poço continha 10 µL de uma suspensão de esporos (2×10^5 esporos/mL) e 90 µL de meio YPD (“*Yeast Peptone Dextrose*”). Após 16 horas na ausência de luz, a 27 °C, 100 µL de solução contendo as frações (2 mg/mL em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) foram adicionados. Os controles negativos e positivos para inibição do crescimento micelial foram o tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e o peróxido de hidrogênio 200 mM, respectivamente. Soluções contendo Cetrimida (800 µg/mL), Arg12 (200 mg/mL), CTAB (1% m/v), Tampão de lavagem, CpCP-1 (1 mg/mL) contendo IAA (20 mM) também foram utilizadas a título de comparação. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm. O crescimento micelial foi monitorado através de leituras de absorbância a 620 nm, em intervalos de 8 horas, até um total de 48 horas, em leitor de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

5.13.3 Inibição da germinação de esporos

Para avaliar o efeito das frações submetidas aos processos de solubilização descritos anteriormente, sobre a germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, o ensaio de inibição da germinação foi conduzido segundo método descrito por Souza e colaboradores (2011). Para tanto, 10 µL da suspensão de esporos (2×10^5 esporos/mL) foram incubados com 10 µL das frações (2 mg/mL em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) em placas de polietileno reticuladas estéreis por 24 horas a 27 °C, mantendo umidade relativa de 70%. Após o período de incubação, as placas foram avaliadas quanto à inibição da germinação de esporos sob microscópio ótico (Olimpus System Microscope BX 60). As microfotografias de cada preparação foram obtidas e a

taxa de germinação de esporos foi avaliada visualmente. Foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e peróxido de hidrogênio 200 mM. Soluções contendo Cetrimida (800 µg/mL), Arg12 (200 mg/mL), CTAB (1% m/v), Tampão de lavagem, CpCP-1 (1 mg/mL) contendo IAA (20 mM) também foram utilizadas a título de comparação. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm.

5.14 Microscopia de Força Atômica (MFA)

Amostras de corpos de inclusão contendo rCpOsm, bem como corpos de inclusão tratados com a protease CpCP-1 por 24 h a 37 °C foram analisadas por Microscopia de Força Atômica no Laboratório de Microscopia Avançada do Departamento de física da UFC. As amostras foram diluídas na proporção de 1:4 com água destilada (MilliQ). Uma alíquota de 10 µL de cada solução foi colocada sobre uma lâmina e foi realizado um esfregão dessas amostras, o esfregão foi deixado em repouso até que secassem. As imagens foram obtidas no equipamento MFP 3 BIO (Asylum Research). O método utilizado foi de varredura por contato intermitente (*tapping mode*) utilizando uma sonda Nano World NCHR-50 com constante de molar de 42 N/m. As imagens foram obtidas com varreduras de 500nm – 10 µm e resolução de 256x256 pixels. As imagens foram obtidas em temperatura ambiente.

6. RESULTADOS

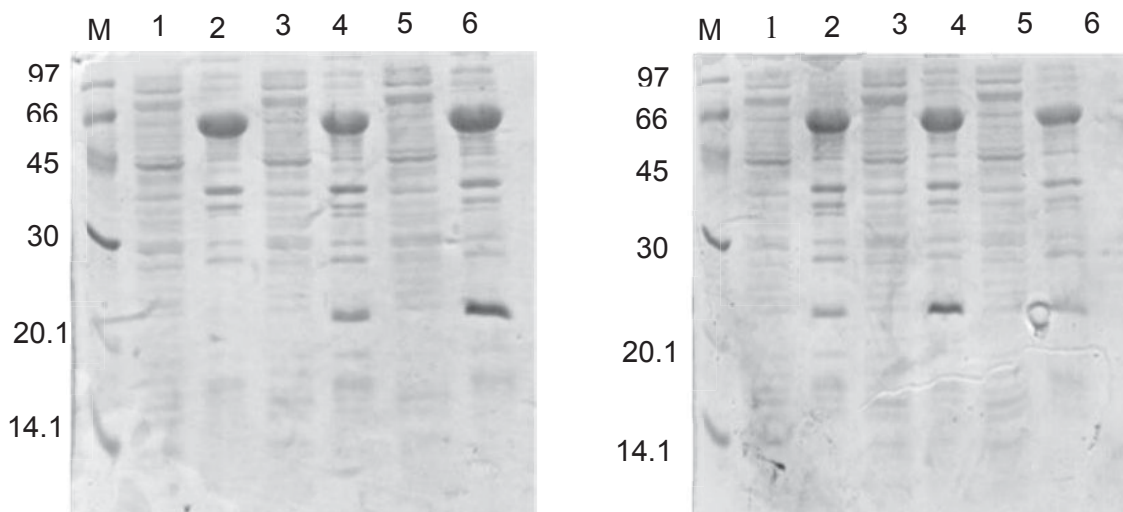
6.1 Expressão da proteína recombinante em *Escherichia coli*

6.1.1 Parâmetros de Cultivo

No presente trabalho, foram utilizadas as linhagens de *E.coli* ArcticExpress (DE3) e BL21(DE3) com os plasmídeos íntegros e recombinantes (pET303 :: CT-His e pET303 :: CpOsm, respectivamente), que foram transformadas em etapa anterior (OLIVEIRA, 2014). Os clones transformados de ArcticExpress(DE3), que estavam armazenados a -80°C em caldo LB, suplementado de glicerol 20%, foram cultivados em caldo LB, induzidos a 12 °C, de acordo com as recomendações do fabricante. A expressão de rCpOsm foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. Apesar de ter sido induzida a baixas temperaturas, a proteína recombinante foi expressa de forma insolúvel e os clones 9.2 e 9.4 apresentaram maior nível de expressão de rCpOsm (Figura 7).

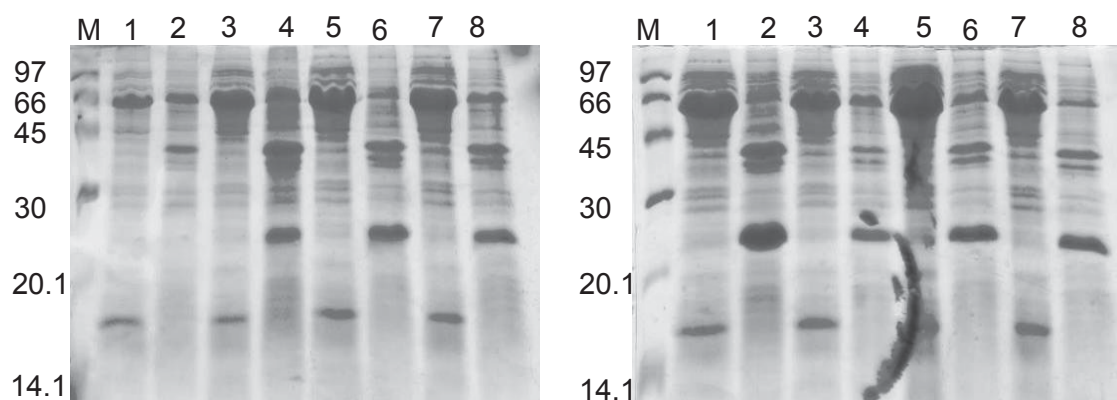
Após a seleção do clone 9.4 de ArcticExpress (DE3) como promissor para a expressão heteróloga, neste trabalho, foram utilizados diferentes meios de cultivo e indução (LB, LB suplementado com glicose, Turbo, Power, Hiper e M9Y) com o objetivo de avaliar qual seria o melhor para a produção da proteína recombinante. Por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), pode-se observar que o meio de cultivo e indução Turbo apresentou a maior produção de proteínas recombinantes (Figura 8), ou seja, houve maior expressão da proteína heteróloga do que quando comparado com a indução em meio LB, meio utilizado tradicionalmente. O meio Turbo utiliza o glicerol como fonte de carbono e possui um meio rico em aminoácidos, vitaminas e minerais inorgânicos, o que pode ser considerado um fator adicional para uma maior indução da expressão (BROEDEL *et al.*, 2001).

Figura 7: Perfil eletroforético de clones de uma cultura de *E.coli* ArcticExpress (DE3) transformadas com pET303:: CpOsm.



A- Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). (1 e 2) Fração solúvel e insolúvel, respectivamente, de bactérias transformadas com pET303/CT-His (íntegro). (3 e 4) Fração solúvel e insolúvel de bactérias transformadas com pET303:: CpOsm-clone 9.1; (5 e 6) clone 9.2; B - (1 e 2) clone 9.3; (3 e 4) clone 9.4; (5 e 6) clone 9.5. (M) Marcadores de massa molecular. Foram aplicados 30 μ L das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

Figura 8: Perfil eletroforético de células de *E.coli* ArcticExpress (DE3) induzidas em diferentes meios nutritivos.



A- Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). (1 e 2) Fração solúvel e insolúvel, respectivamente, de bactérias transformadas com pET303/CT-His (controle) – meio LB. (3 e 4) Células de *E. coli* ArcticExpress (DE3) transformadas com pET303-CpOsm - clone 9.4 - meio LB+Glicose, (5 e 6) meio LB, (7 e 8) meio Glicose M9Y. B – Fração solúvel e insolúvel, respectivamente, de células transformadas com pET303-CpOsm - clone 9.4 (1 e 2) meio Turbo, (3 e 4) meio Hyper, (5 e 6) meio Power, (7 e 8) meio Superior. (M) Marcadores de massa molecular. Foram aplicados 30 μ L das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

6.1.2 Análise das frações de *E. coli* BL21 (DE3) por Espectrometria de massas

Considerando que havia dois sistemas de expressão clonados e havia o desejo de que a proteína fosse expressa na fração solúvel para facilitar tanto a sua recuperação como a sua purificação, o sistema BL21(DE3) também foi submetido ao cultivo e indução, só que este se realizou a 37 °C, de acordo com as recomendações do fabricante.

A análise por eletroforese unidimensional 15% mostrou que rCpOsm foi majoritariamente expressa na fração insolúvel, porém, uma banda proteica situada na mesma altura, de aproximadamente 23,1 kDa, correspondente ao tamanho da rCpOsm também apareceu na fração solúvel. Portanto, uma análise por espectrometria de massas foi realizada para verificar se a banda proteica na fração solúvel era referente à osmotina recombinante.

Os *spots*, referentes às bandas proteicas de 23,1 kDa, foram excisados do gel e submetidos a um tratamento de extração de proteínas e digestão com tripsina, sendo por fim analisados por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF). Os dados obtidos, após o processamento dos *spots*, foram submetidos ao programa de busca MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com), utilizando o NCBI (National Center for Biotechnology Information) como banco de dados, restringido para Viridiplantae (*Green Plants*). A análise confirmou que os peptídeos referentes à rCpOsm estavam nas frações solúvel e insolúvel (Tabela 2 e Figura 9).

Com base nos resultados obtidos, dentre as duas linhagens testadas, a BL21 (DE3) foi selecionada para a continuação dos ensaios, uma vez que apresentou a proteína recombinante na fração insolúvel e também na fração solúvel, onde rCpOsm poderia ter também um potencial uso. Porém, nos posteriores ensaios realizados, somente a proteína recombinante presente nos corpos de inclusão (fração insolúvel), mostrou-se expressiva.

Após a escolha do sistema de expressão BL21(DE3), resolveu-se avaliar a influência da temperatura durante as 24 h de indução nesta linhagem como mais uma metodologia que proporcionasse uma maior indução da proteína recombinante. Por isso as células com os plasmídeos íntegros e recombinantes

foram submetidos a indução em temperaturas de 25 °C, 30 °C e 37 °C (Figura 10).

Tabela 2: Peptídeos do clone 9.4 de BL21(DE3) de *E.coli* identificados por Espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).

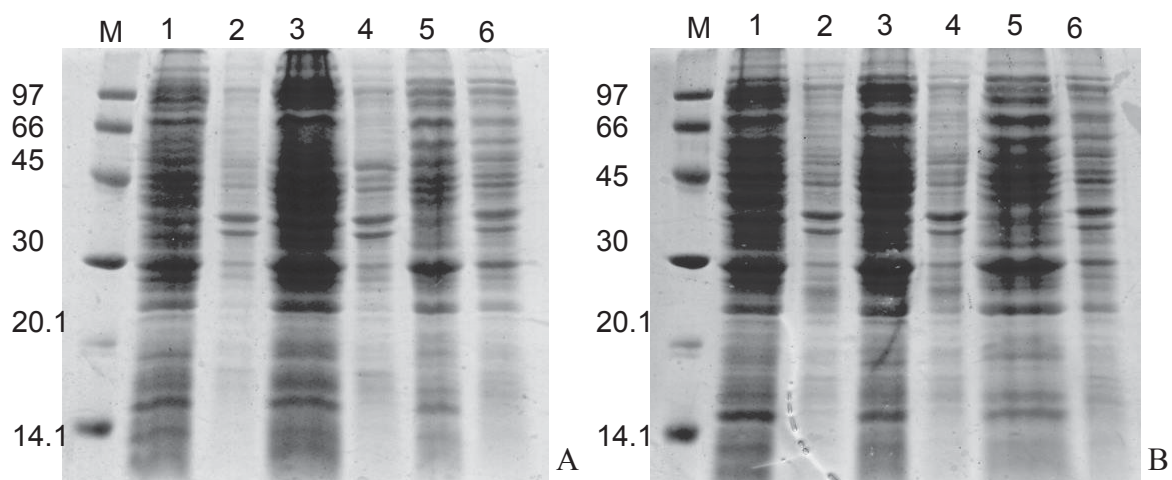
Spot	Massa molecular	pI	Escore proteico	Sequência dos Peptídeos Identificados	ID (NCBI)	Descrição e Origem das proteínas identificadas
Fração Insolúvel	23,2	8,2	699	TNCNFDGAGR, CWDAYSYPK, APGGCNNPCTVFK, CQTGDCNGVLECK, CTADINGQCPNELR, NNCPYTIWAAAVPGGGR, DDPTSTFTCPSGTNYR, LNSGQWTINVAPGTAGAR, RLNSGQWTINVAPGTAGAR, TDKYCCNSGSCGPTTYSR, CWDAYSYPKDDPTSTFTCPSGTNYR	gi 64598572 1	Cadeia A, Estrutura do cristal da osmotina (<i>Calotropis procera</i>)
Fração Solúvel	23,2	8,2	801	NNCPYTIWAAAVPGGGR, RLNSGQWTINVAPGTAGAR, LNSGQWTINVAPGTAGAR, LNSGQWTINVAPGTAGAR, TNCNFDGAGR, CQTGDCNGVLECK, CTADINGQCPNELR, APGGCNNPCTVFK, TDKYCCNSGSCGPTTYSR, CWDAYSYPK, CWDAYSYPKDDPTSTFTCPSGTNYR e DDPTSTFTCPSGTNYR	gi 64598572 1	Cadeia A, Estrutura do cristal da osmotina (<i>Calotropis procera</i>)

Figura 9: Peptídeos identificados por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) das frações solúvel e insolúvel obtidas do lisado celular de *E.coli* BL21(DE3).

1 PATFTIR**NNC** **PYTIWAAAVP** **GGRR****LNSGQ** **TWTINVAPGT** **AGAR**IWPR**TN**
 51 **CNFDGAGR**GR **CQTGDCNGVL** **ECK**GYGQPPN TLAEYALNQF QNLDDFFDISL
 101 VDFGNVPMEF SPVSGSGDKC RAIR**CTADIN** **GQCPNELRAP** **GGC**NPCTVF
 151 **KTDKYCCNSG** **SCGPTTYSRF** FKER**CWDAYS** **YPKDDPTSTF** **TCPSGTNYR**V
 201 IFCPPG

Os peptídeos encontrados pela análise realizada por espectrometria de massas estão evidenciados em diferentes cores, demonstrando uma correlação com a sequência relacionada à estrutura da osmotina de *Calotropis procera*, depositada no PDB com o código de acesso 4L2J. Foi identificado 63% de cobertura da sequência da proteína recombinante (rCpOsm) nas frações analisadas.

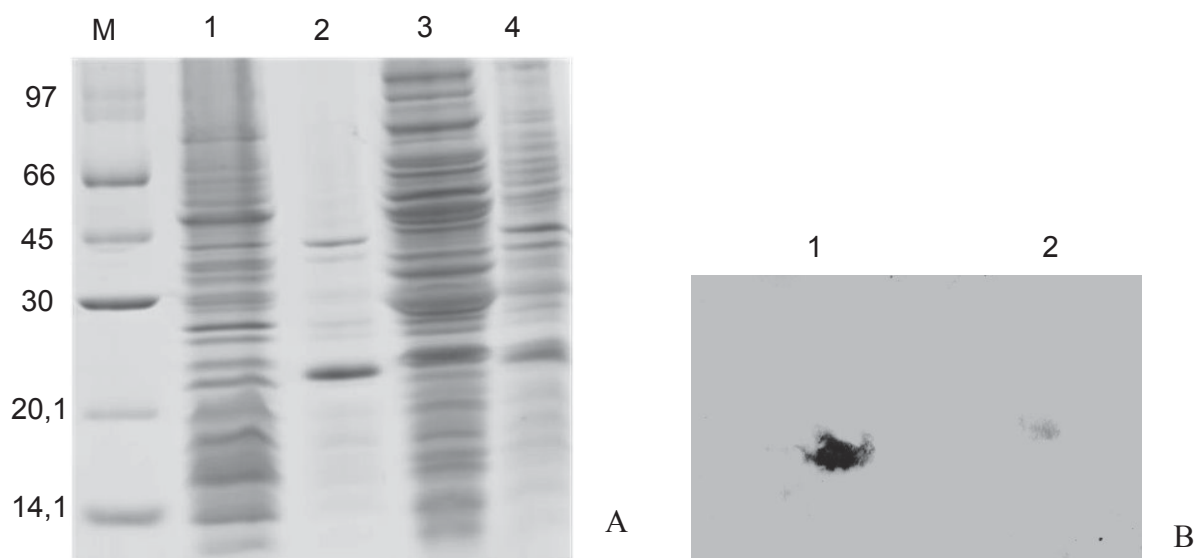
Figura 10: Perfil eletroforético de células de *E.coli* BL21 (DE3) induzidas em diferentes temperaturas.



Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). A - Fração intracelular solúvel e insolúvel, respectivamente de culturas de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET303/CT-His (controle). (1 e 2) indução a 25 °C, (3 e 4) indução a 30 °C (5 e 6) indução a 37 °C. B - Fração intracelular solúvel e insolúvel, respectivamente, de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET303-CpOsm - clone 9.4. (1 e 2) indução a 25 °C, (3 e 4) indução a 30 °C, (5 e 6) indução a 37 °C. (M) Marcadores de massa molecular. Foram aplicados 30 µL das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%. A banda de 23,1 kDa corresponde a osmotina recombinante.

Diante dos resultados observados com as induções em diferentes temperaturas e a consequente indiferença na produção de proteína recombinante nas três diferentes temperaturas testadas, resolveu-se avaliar os tempos de indução de 3 h e de 24 h na produção de proteína recombinante. O tempo de 3 h de indução se mostrou mais promissor, visto que as bandas proteicas referentes à proteína expressa por *E. coli* estavam menos evidentes do que a banda proteica referente à osmotina recombinante (rCpOsm), o que resultou num corpo de inclusão com a osmotina recombinante mais expressa do que as proteínas do próprio sistema *E. coli*, as quais aparecem em maior quantidade com a indução de 24 h (Figura 11).

Figura 11: Perfil eletroforético das frações, solúvel e insolúvel, de uma cultura de *E.coli* BL21(DE3) induzida por diferentes períodos e imunodeteção de rCpOsm por Western Blot.

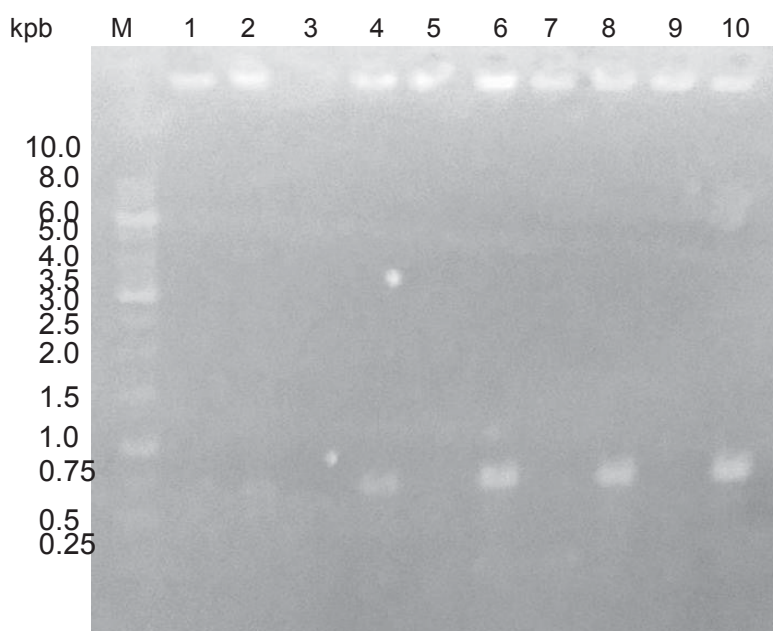


Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). A - (1 e 2) Frações intracelulares solúvel e insolúvel, respectivamente, coletadas após por 3 h de indução. (3 e 4) Frações intracelulares solúvel e insolúvel, respectivamente, coletadas após 24 h de indução. M- marcador molecular. Foram aplicados 30 μ L das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue* R-350 0,1%. B- Imunodeteção da osmotina recombinante em corpos de inclusão induzida por 3 h, por western blotting. 1) Osmotina nativa purificada. 2) Corpo de inclusão com rCpOsm após 3 h de indução. Foram utilizados anticorpos anti-CpOsm nativa.

6.2 PCR de Colônia

Após alguns meses de induções sucessivas a partir do mesmo material inicial, a expressão de osmotina recombinante passou a estar menos expressiva quando avaliada no controle por meio de géis de poliacrilamida 15%. O que preocupou os envolvidos com a pesquisa. Então uma PCR de colônia foi realizada com as culturas estoque em glicerol a -80°C (culturas estoque armazenadas em cada indução bimestral). Essa PCR permitiria confirmar a presença dos plasmídeos clonados nas culturas bacterianas, no caso, de *E. coli* BL21(DE3) tanto com a sequência que codifica para a rCpOsm como a dos plasmídeos íntegros. As colônias de *E.coli* BL21(DE3) contendo os plasmídeos foram submetidas à PCR de colônia e amplificadas com os *primers* específicos senso (CpOsmFXbaIEc 5'- CCGGTCTAGAATGGCCACGTTCACTATCCGG-3') e antisenso (CpOsmRXhoIEc 5'- CCGGCTCGAG GGGACAAAAGATAACTCTATAG - 3'). Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 12).

Figura 12: Perfil eletroforético dos produtos de PCR de colônia.



Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Produtos amplificados a partir de colônias que continham DNA plasmidial íntegro (pET303::CT-His) e recombinante (pET303::CpOsm) utilizando primers específicos desenhados. Poços 1,3,5,7 e 9 contém o controle negativo de cada amostra correspondente ao lado, referente às colônias com os plasmídeos íntegros. Já os poços 2,4,6,8 e

10 correspondem as colônias que possuem o plasmídeo recombinante. As bandas de, aproximadamente, 600 pb correspondem aos produtos de PCR amplificados a partir de colônias estocadas a -80 °C em caldo LB acrescido de glicerol. O poço M contém o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

O que se observou no gel de agarose, feito após a PCR, foi que com o passar do tempo (bimestres), os plasmídeos recombinantes perderam sua viabilidade. As bandas referentes aos dois primeiros bimestres estavam muito fracas, a sequência codificante para a proteína recombinante quase não foi amplificada, o que pode-se inferir uma quantidade menor de plasmídeos com a sequência codificante para a osmotina no sistema de expressão BL21(DE3), o mesmo não aconteceu nos últimos bimestres, cujas sequências foram amplificadas com sucesso. E a partir de então, as novas induções foram realizadas com as colônias armazenadas a -80 °C mais recentes para seguir no trabalho.

Esta primeira etapa do trabalho foi concluída estabelecendo-se que a linhagem BL21(DE3) seria cultivada/induzida a 37 °C, agitação orbital constante de 180 rpm por 3 horas. Os corpos de inclusão foram recuperados após lise celular com lisozima para testes de solubilização e extração da proteína recombinante.

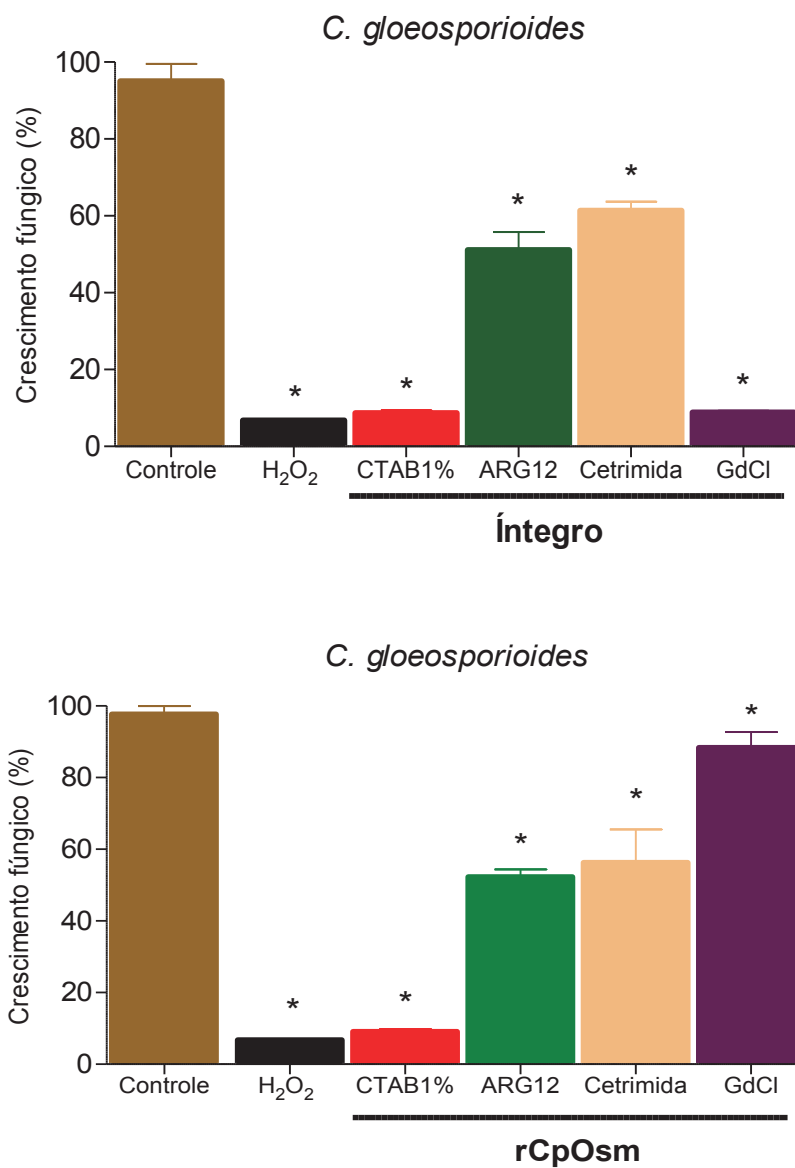
Em um segundo grupo de ensaios foi avaliado o desempenho das amostras frente ao crescimento micelial do fungo, desta feita em testes de dose-dependência.

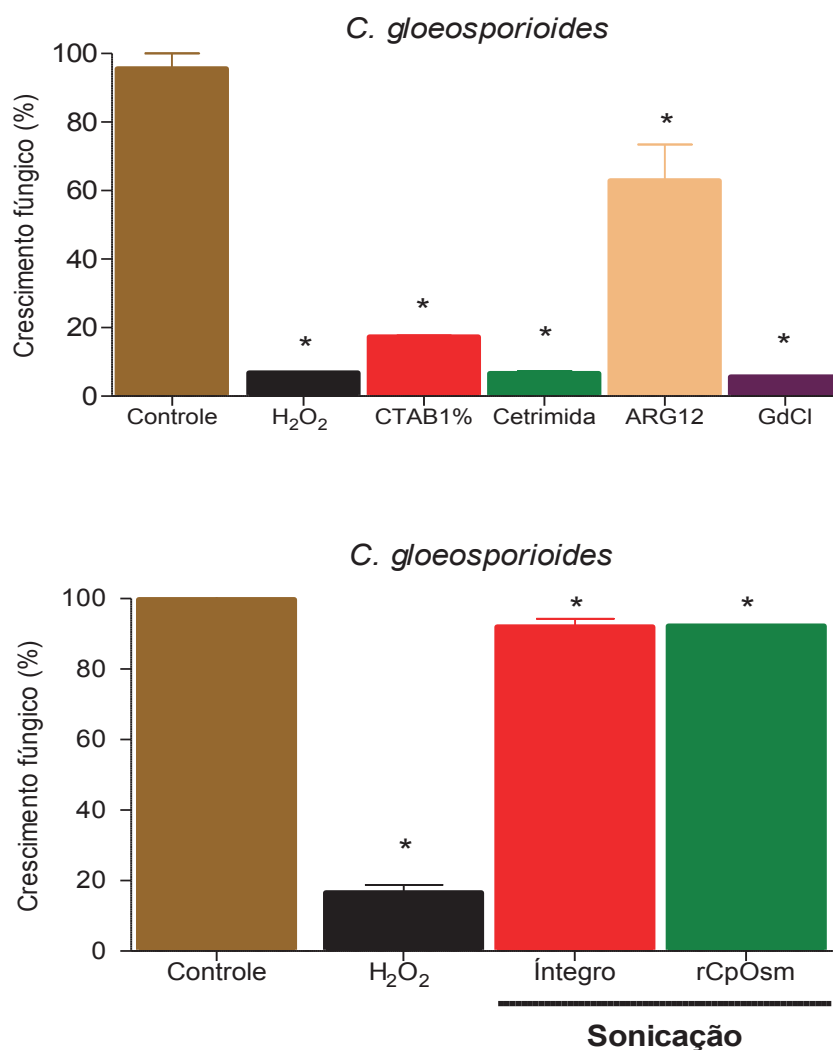
O crescimento micelial de *C. gloeosporioides* foi inibido por todas as amostras que apresentavam somente as soluções dos detergentes, havendo uma leve inibição por ARG12 quando comparado com o controle do tampão (Figura 13). Já com as proteínas dos corpos de inclusão íntegros, houve inibição maior com os agentes CTAB 1% e realizado com Urea e Triton (GdCl), comparando-se com o controle peróxido. Os CI contendo a osmotina recombinante apresentaram maior atividade contra o fungo somente quando solubilizado com o CTAB 1%.

Após observar os resultados obtidos das atividades antifúngicas, em que tanto proteínas oriundas do plasmídeo íntegro, utilizado como controle, como o plasmídeo recombinante (rCpOsm), bem como as soluções surfactantes na ausência de amostra apresentaram, em sua maioria, atividade antifúngica contra o fungo *C. gloeosporioides*, infere-se que os surfactantes interferiram nos

resultados obtidos e que os demais tratamentos não foram eficientes em promover atividade de rCpOsm perceptível.

Figura 13: Corpos de inclusão solubilizados com detergentes e submetidos à sonicação, sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.





Os valores percentuais correspondem à atividade antifúngica de cada amostra, sobre o desenvolvimento de hifas, determinado após 48 horas do ensaio. As amostras (1 mg/mL) foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5. Foram utilizadas como soluções controle tampão acetato de sódio - negativo e H₂O₂ 200 mM – positivo. Os ensaios foram realizados a 27 °C, por 24 horas e 70% de umidade relativa. O efeito sobre o crescimento micelial foi observado a partir da leitura de absorbância a 620 nm em leitor de placas Elisa (ELX800 Absorbance microplate reader – BIOTEK ®). *p<0,05 indica diferença estatística comparado com controle negativo (n=3, ANOVA, Teste de Tukey).

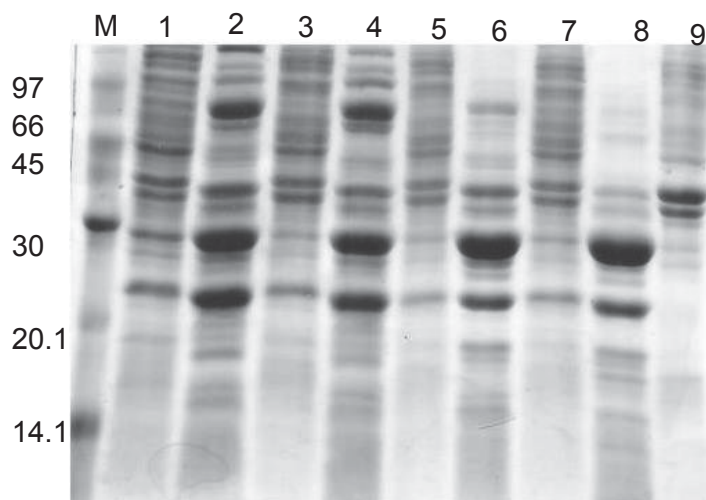
6.3 Solubilização dos corpos de inclusão

6.3.1 Agentes surfactantes

Existem diversos protocolos de solubilização para proteínas presentes em corpos de inclusão. O uso de surfactantes como agentes solubilizantes tem por princípio criar uma interface entre o meio aquoso e a estrutura proteica de inclusão. O detergente catiônico CTAB (brometo cetiltrimetiamônio) foi escolhido como uma molécula facilitadora na recuperação da proteína recombinante (rCpOsm) dos corpos de inclusão (PURI *et al.*, 1992; NOVAGEN, 1998; SINGH e PANDA, 2005). Foram testadas três concentrações diferentes de CTAB (0,1%, 0,5%, 1%) e a fração solubilizada que apresentou rCpOsm solúvel e com menos proteínas do próprio sistema de expressão *E.coli* foi utilizada na concentração de 1% CTAB.

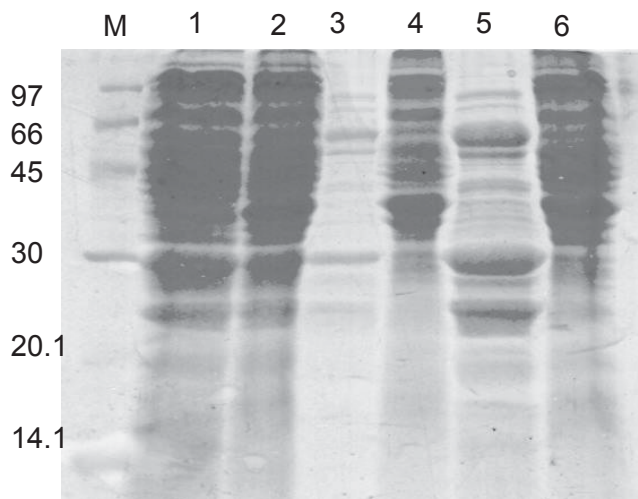
Outros agentes solubilizantes catiônicos também foram avaliados. Entre eles estão ARG12 (surfactante derivado do aminoácido argenina) e cetrimida, um produto comercial composto por uma mistura de diferentes sais quaternários de amônio, como CTAB e HTAB. As análises realizadas em eletroforese de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (Figuras 13 e 14) evidenciaram que a solubilização realizada nos corpos de inclusão com os detergentes cetrimida e CTAB foram similares e mais eficientes que as solubilizações realizadas com o surfactante derivado de argenina (ARG12). A Tabela 3 mostra as estruturas desses surfactantes o que permite comparar suas regiões hidrofóbicas e inferir sua ação solubilizante.

Figura 14: Perfil eletroforético de uma cultura de *E.coli* BL21(DE3) transformada com o vetor pET303:: CpOsm e solubilizada com Cetrimida e CTAB 0,1%, 0,5% e 1%.



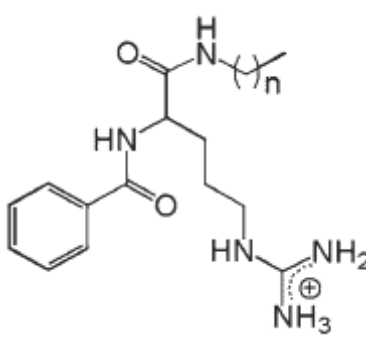
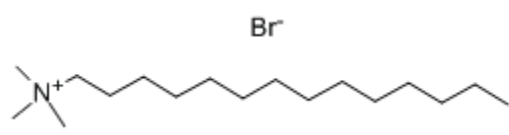
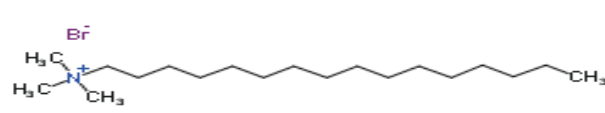
Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). As células de *E.coli* BL21(DE3) foram induzidas com 0,5 mM de IPTG. 1) Corpos de inclusão (fração intracelular insolúvel) coletados após 24h de indução que foram submetidos à solubilização. Frações solúveis e insolúveis, respectivamente após solubilização com cetrimida (2 e 3), CTAB 0,1%(4 e 5), CTAB 0,5%(6 e 7), CTAB 1%(8 e 9). A banda referente à ~23,1 kDa corresponde à osmotina recombinante. M- marcador molecular. Foram aplicados 30 µL das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

Figura 15: Perfil eletroforético de uma cultura de *E.coli* BL21(DE3) transformada com o vetor pET303::CpOsm solubilizadas com Arg12 e cetrimida a 55 °C.



Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Frações intracelulares solúvel e insolúvel, respectivamente. 1 e 2) coletada após 24h de indução e lise celular. 3 e 4) frações após solubilização a 37 °C com Arg12, 5 e 6) frações após solubilização a 37 °C com cetrimida. A banda de 23,1 kDa corresponde a osmotina recombinante. M- marcador molecular. Foram aplicados 30 µL das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

Tabela 3: Esquema estrutural dos surfactantes catiônicos. Detergentes utilizados como agentes solubilizantes dos corpos de inclusão íntegros e recombinantes.

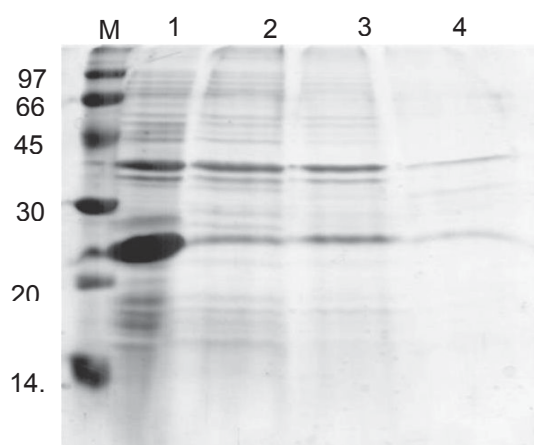
Composto	Estrutura	Características
Arg12(Bz-Arg-NHC12)		<p>F. M.:</p> <p>$C_{25}H_{44}N_5O_2$</p> <p>P. M.:</p> <p>446.34924 Da</p>
Cetrimida		<p>F.M: $C_{17}H_{38}BrN$</p> <p>P. M.: 336,39 Da</p> <p>Solubilidade em água: 20 g/ 100 mL</p> <p>Higroscópico</p> <p>Estável,</p> <p>incompatível com agentes oxidantes fortes</p>
CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide)		<p>F.M: $C_{19}H_{42}BrN$</p> <p>P.M.:364.448 Da</p> <p>Estável,</p> <p>incompatível com agentes oxidantes fortes</p>

6.3.2 Agente desnaturante

O tratamento dos corpos de inclusão com altas concentrações de agentes caotrópicos (agentes desnaturantes) é uma metodologia bastante usada para a solubilização dos CI, que permite desnaturar, dissolver os agregados proteicos formados ao longo da superexpressão heteróloga (HUBER e HUBER-WUNDERLICH, 1999; ROSANO e CECCARELLI, 2014).

Este trabalho também colocou em prática o protocolo de solubilização dos CI por agentes desnaturantes, no caso, Cloridrato de Guanidina (BANEYX e MUJACIC, 2004). Porém, foi observado por análises em SDS-PAGE 15% (Figura 16) que nos passos iniciais de lavagem, presente no protocolo de solubilização (passo anterior ao de solubilização com o agente desnaturante cloridrato de guanidina), já houve solubilização da proteína recombinante. Ou seja, a proteína recombinante foi novamente solubilizada por ação de detergentes como é o caso do Triton x-100 presente no tampão de lavagem (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, Urea 2 M, Triton X-100 2%). Por eletroforese unidimensional, também se pode observar que esse método de solubilização não foi tão eficiente quando comparado com os realizados com surfactantes anteriores.

Figura 16: Perfil eletroforético da fração insolúvel de uma cultura de *E.coli* BL21(DE3) transformada com o vetor pET303:: CpOsm e solubilizada com tampão de lavagem.

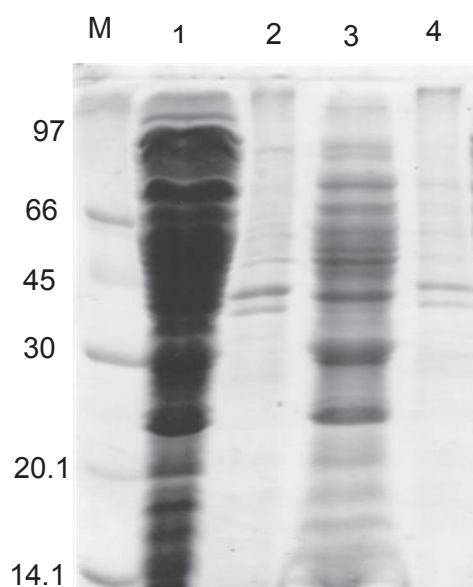


Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). 1) Corpos de inclusão (fração intracelular insolúvel) coletada após 3 h de indução que foi submetida à solubilização com agente desnaturante. 2,3 e 4) Lavagens consecutivas com tampão de lavagem (100mM TrisHCl pH 8,5 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 M Urea, 2% Triton X-100). M- marcador molecular. Foram aplicados 30 µL das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

6.3.3 Tratamento por ultrassom

A solubilização de corpos de inclusão realizada mecanicamente por sonicação é uma prática constante (KUMAR *et al.*, 2015). Ela foi usada como controle nesse estudo porque substitui o uso de agentes químicos solubilizantes, evitando então o aumento na heterogeneidade do extrato a ser obtido. Porém, neste trabalho, a solubilização dos corpos de inclusão por sonicação foi interpretada, de início como ineficiente, considerando que além de ter solubilizado a proteína recombinante de interesse (rCpOsm), o processo de sonicação solubilizou também as outras proteínas presentes nos corpos de inclusão (as proteínas de *E. coli* produzidas também durante a indução) e também por apresentar um rendimento de solubilização considerado inferior (Figura 17).

Figura 17: Perfil eletroforético da fração solúvel e insolúvel de uma cultura de *E.coli* BL21(DE3) solubilizada por método de ultrassom.



Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Frações intracelulares coletadas após 24 h de indução que foram submetidas à solubilização por sonicação. (1 e 2) Fração solúvel e insolúvel de *E.coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo íntegro, respectivamente. (3 e 4) Fração solúvel e insolúvel de *E.coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo recombinante. M- marcador molecular. Foram aplicados 30 μ L das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

6.4 Purificação da rCpOsm

Após a solubilização dos corpos de inclusão e considerando que a proteína recombinante foi encontrada com sucesso na fração solubilizada, diferentes métodos cromatográficos foram utilizados na tentativa de purificar a osmotina recombinante.

Primeiramente, os CI solubilizados com CTAB 1% foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de Níquel, devido a presença de uma cauda adicional de 6 histidinas (cargas positivas) presentes na sequência codificadora da proteína heteróloga o que propicia uma afinidade pelo metal. Os CI tratados foram exaustivamente dialisados com o tampão de equilíbrio da coluna (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 500 mM) e então aplicados na matriz Sepharose carregada com Níquel imobilizado (Ni Sepharose 6 *fast flow*, GE Healthcare) que foi previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Após 1 h de contato com a matriz, o tampão de equilíbrio foi novamente aplicado na matriz e o primeiro pico (PI) foi coletado (proteínas que não interagiram com a coluna). Em seguida, foi aplicado à coluna sequencialmente o tampão de equilíbrio acrescido de 50 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM de imidazol para a eluição do material retido à coluna (Figura 18). Como observado, o procedimento não foi bem sucedido, visto que nenhuma fração proteica referente à osmotina recombinante ficou retida na coluna.

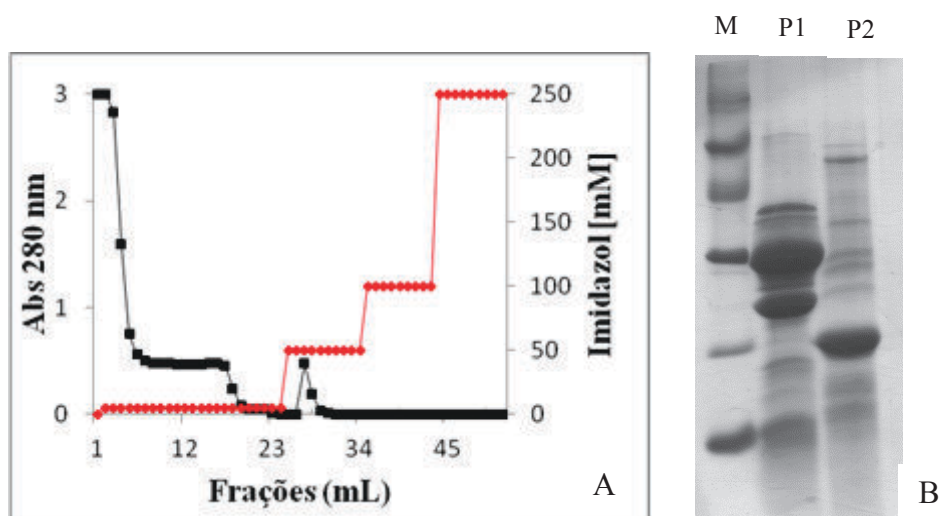
Depois dessa tentativa de purificação, os corpos de inclusão solubilizados com CTAB 1% foram submetidos à uma cromatografia de interação hidrofóbica na matriz FenilSepharose CL4B, devido a regiões de hidrofobicidade apresentadas em trabalho anterior (Figura 19) (RAMOS *et al.*, 2015). Também, esta estratégia não logrou sucesso. Entretanto, o resultado mostra que uma proteína com massa molecular da rCpOsm está majoritariamente presente na fração retida na coluna. Foi considerada, preliminarmente, como negativa sua presença porque o ensaio de *Western Blot* com anticorpos antiosmotina de *C. procera* não revelou positivamente esta banda.

As proteínas extraídas dos corpos de inclusão também foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna Resource-S acoplada ao sistema de

FPLC “*Fast Performance Liquid Chromatography*”. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (Figura 20).

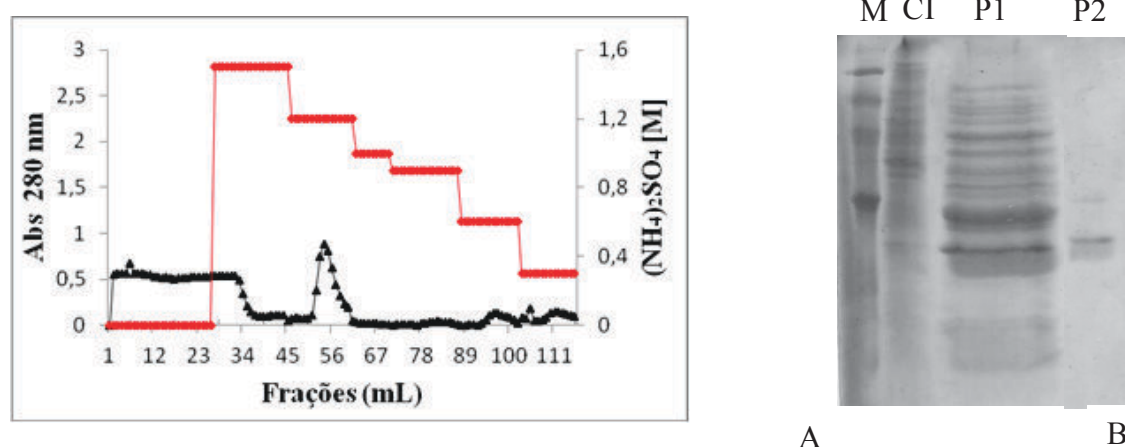
Apesar de todas estas tentativas de purificação em diferentes colunas e métodos cromatográficos, a osmotina recombinante (rCpOsm) não foi purificada. Neste caso foi evidente que o protocolo não foi eficaz.

Figura 18: Cromatografia IMAC (Sephacose carregada com Niquel imobilizado) e perfil eletroforético da fração intracelular insolúvel de células de *E.coli* BL21(DE3) solubilizada com CTAB 1%



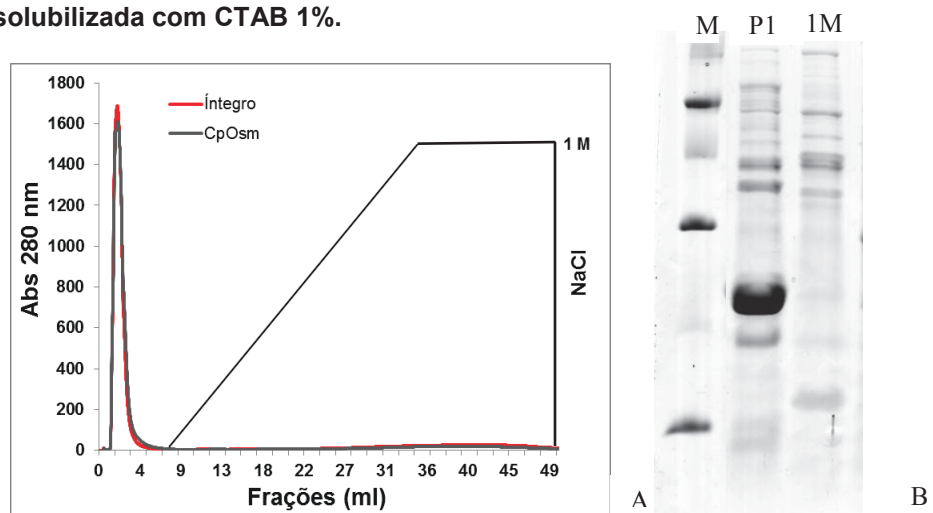
A - Perfil cromatográfico. A fração solubilizada foi aplicada à matriz cromatográfica equilibrada com o tampão de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 500 mM). Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio P1 e a matriz foi submetida à lavagem com tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de imidazol (50 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM). B – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) das sub-frações cromatográficas (P1 e P2) da fração insolúvel solubilizada com CTAB 1%. P1) Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio P1. P2) Proteínas que foram eluídas com 50 mM de imidazol. M- marcador de massa molecular. Foram aplicados 30 μ L das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

Figura 19: Cromatografia hidrofóbica FenilSepharose CL-4B e perfil eletroforético da fração intracelular insolúvel de células de *E.coli* BL21(DE3) solubilizada com CTAB 1%.



A - perfil cromatográfico. A fração solubilizada foi aplicada à matriz cromatográfica equilibrada com o tampão de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M). Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio P1 e a matriz foi submetida à lavagem com tampão de equilíbrio acrescido de concentrações decrescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,2; 1; 0,9; 0,6; 0,3 M). B – Eletroforese em gel de poli-acrilamida 15 % sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) das sub-frações cromatográficas (CI, P1 e P2) da fração insolúvel solubilizada com CTAB 1%. CI) Corpos de inclusão que foram submetidos à solubilização com CTAB 1%. P1) Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio P1. P2) Proteínas que foram eluídas com 1,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. M- marcador de massa molecular. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

Figura 20: Cromatografia de troca iônica em coluna *Resource S*, acoplada a sistema *FPLC* e perfil eletroforético da fração intracelular insolúvel de células de *E. coli* BL21(DE3) solubilizada com CTAB 1%.



A - perfil cromatográfico. A fração solubilizada foi aplicada à matriz cromatográfica equilibrada com o tampão de equilíbrio (Acetato de sódio 50 mM pH 5). Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio P1 e a matriz foi submetida à lavagem com tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl até 1 M. B – Eletroforese em gel de poli-acrilamida 15 % sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) das sub-frações cromatográficas (P1 e 1M NaCl) da fração insolúvel solubilizada com CTAB 1%. M- marcador de massa molecular. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

6.5 Ensaios antifúngicos

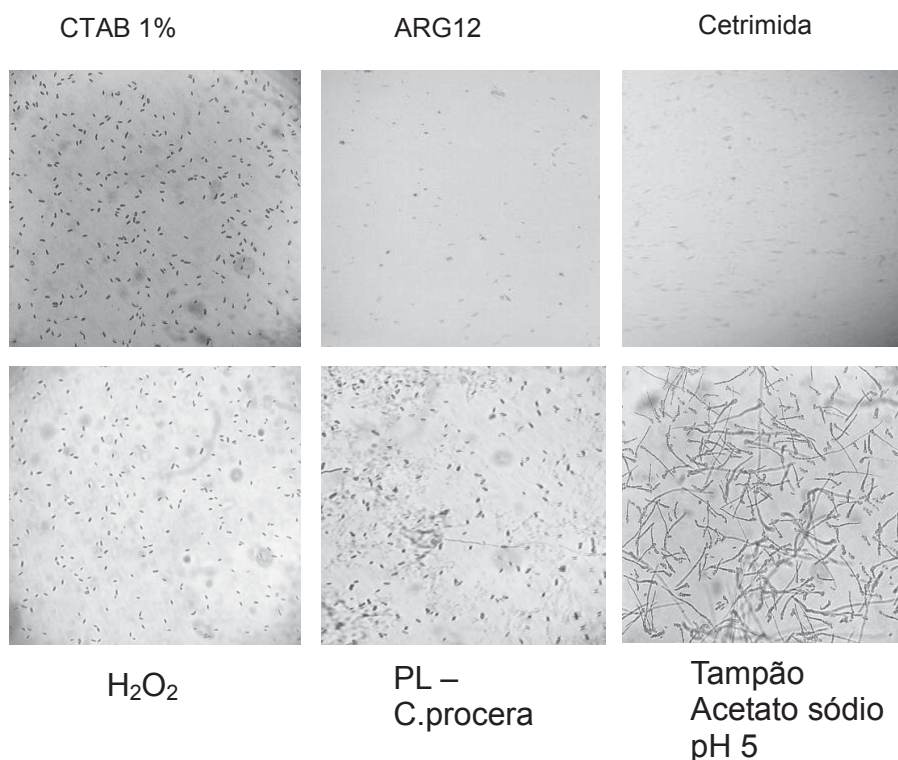
Não havendo êxito nas estratégias iniciais de purificação da proteína recombinante, foi questionado se a mesma estaria sendo expressa em forma ativa. A atividade de osmotina é medida primariamente por meio de sua ação sobre fungos e no caso da osmtina de *C. procera* está bem documentada sua atividade (FREITAS *et al.*, 2011). Após estabelecer os protocolos de solubilização, o questionamento que surgiu foi se a proteína estaria realmente solúvel e funcional. Então as proteínas solubilizadas dos corpos de inclusão contendo rCpOsm e dos corpos de inclusão íntegros, submetidos aos tratamentos de solubilização descritos, foram avaliados quanto a atividade antifúngica sobre a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 13).

Todos os agentes solubilizantes foram avaliados quanto à capacidade de inibir a germinação de esporos. Os três agentes surfactantes utilizados na solubilização das proteínas dos CI inibiram a germinação dos esporos nas concentrações utilizadas para a dissolução dos CI (Figura 21).

Entretanto, quando avaliado o efeito das proteínas extraídas dos corpos de inclusão transformados, solubilizados com ARG12 e cetrimida, sobre a germinação de esporos de *C. gloeosporioides*, estas não foram capazes de inibir a germinação, visto que os esporos se desenvolveram bem dentro de um período de 24 horas. Este resultado sugere que a rCpOsm se solúvel, não foi ativa, ou estava em concentração aquém do necessário para exercer sua atividade. CTAB 1% inibiu a germinação de esporos e as proteínas dos CI solubilizadas CTAB 1% inibiram também a germinação.

Considerando que esta amostra foi, assim como as demais citadas anteriormente, submetida à diálise e liofilização, é possível que a rCpOsm tenha exibido atividade antifúngica. Entretanto esta hipótese não é conclusiva porque há relatos na literatura de que CTAB 1% pode formar micelas em meio aquoso e não sofre diálise.

Figura 21: Inibição da germinação de esporos pelas soluções controles dos agentes surfactantes (CTAB 1%, Arg12, Cetrimida) e o agente desnaturante Cloridrato de Guanidina sobre *C. gloeosporioides*.



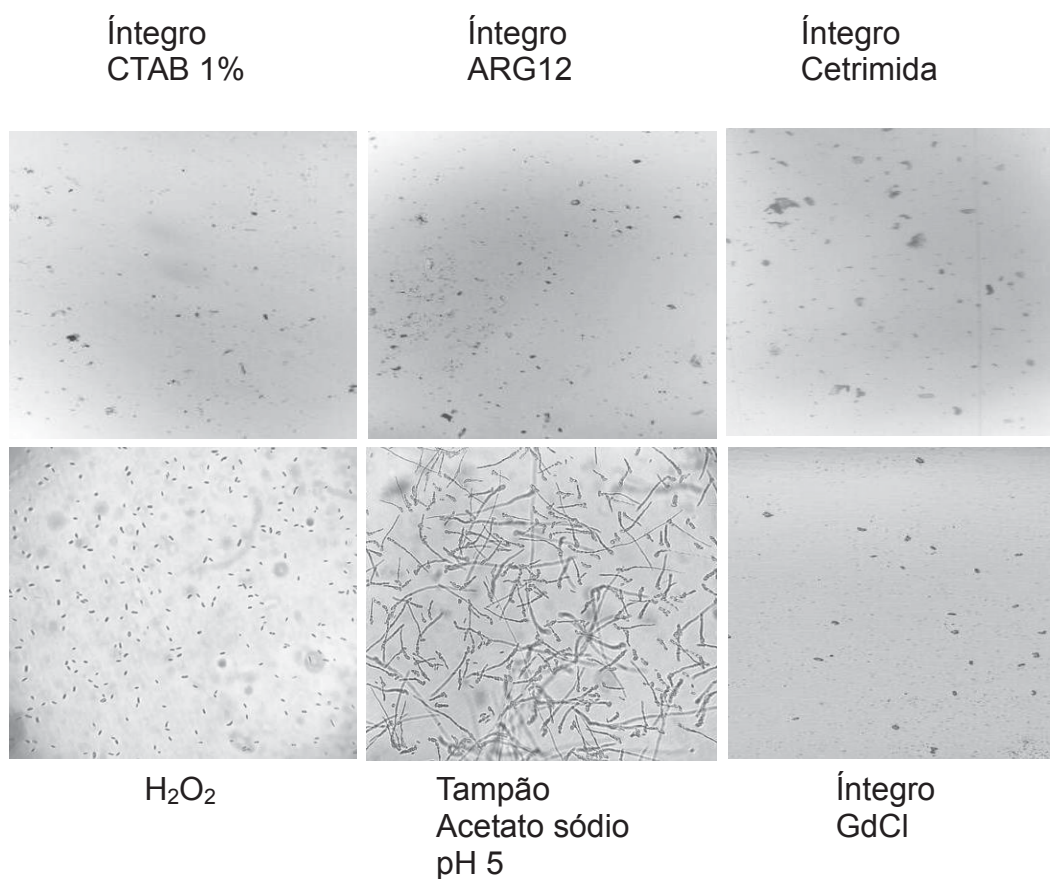
As amostras (1 mg/mL) foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5. O mesmo tampão foi usado como controle negativo e H₂O₂ 200 mM e PL de *C.procera* (1 mg/mL) foram usados como controle positivo. Os ensaios foram realizados a 27 °C por 24 horas e 70% de umidade relativa. A inibição da germinação foi observada por microscopia de luz em um microscópio Olympus BX60v.

Outro procedimento de solubilização, desta feita com agente caotrópico, usando ureia e triton (o protocolo é denominado como Cloridrato de Guanidina), em substituição aos agentes surfactantes, mostrou que tanto as amostras contendo o vetor pET303::CT-His(integro) como as amostras contendo o vetor pET303::CpOsm foram capazes de inibir a germinação de esporos. (Figuras 22 e 23).

Quando os ensaios foram realizados com as proteínas solubilizadas de Cl contendo rCpOsm, os resultados sugeriram novamente que o uso dos agentes surfactantes ou caotrópicos interferia nos ensaios. Foi novamente observada inibição em amostras onde a rCposm estava ausente e também ausência de inibição onde a mesma estava presente (Figura 22). A conclusão preliminar foi de que os agentes testados tinham atividade nos ensaios e que a ausência de

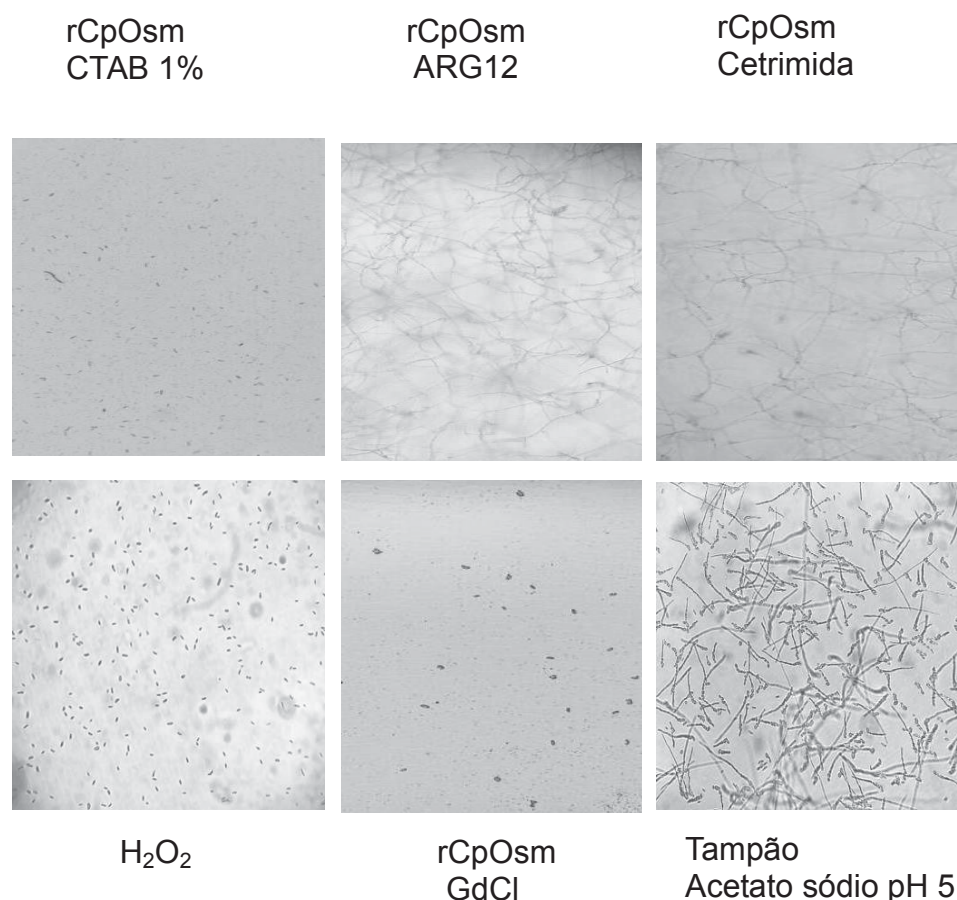
atividade antifúngica na presença de rCpOsm poderia ser por sua concentração inferior ao limite necessário para agir ou a mesma estava inativa.

Figura 22: Inibição da germinação de esporos pela fração insolúvel do plasmídeo íntegro solubilizados com agentes surfactantes (CTAB1%, Arg12, Cetrimida), o agente desnaturante Cloridrato de Guanidina e a amostra sonicada sobre *C. gloeosporioides*.



As amostras (1 mg/mL) foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5. O mesmo tampão foi usado como controle negativo e H_2O_2 200 mM e as proteínas do látex (PL) de *C. procera* (1 mg/mL) foram usados como controle positivo. Os ensaios foram realizados a 27 °C por 24 horas e 70% de umidade relativa. A inibição da germinação foi observada por microscopia de luz em um microscópio Olympus BX60v.

Figura 23: Inibição da germinação de esporos pelos corpos de inclusão (plasmídeo recombinante) solubilizados com agentes surfactantes (CTAB 1%, Arg12, Cetrimida), o agente desnaturante Cloridrato de Guanidina e a amostra sonicada sobre *C. gloeosporioides*.



As amostras (1 mg/mL) foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5. O mesmo tampão foi usado como controle negativo e H₂O₂ 200 mM e PL de *C. procera* (1 mg/mL) foram usados como controle positivo. Os ensaios foram realizados a 27 °C por 24 horas e 70% de umidade relativa. A inibição da germinação foi observada por microscopia de luz em um microscópio Olympus BX60v.

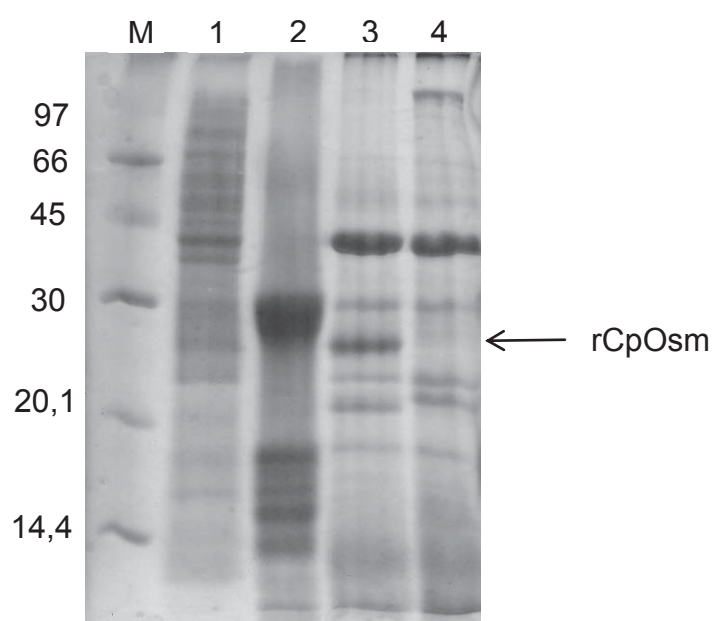
6.6 Solubilização do corpo de inclusão utilizando uma protease do látex de *Calotropis procera*

Uma estratégia inovadora foi idealizada como alternativa aos protocolos anteriores. Em um ensaio paralelo, incubamos as proteínas do látex de *C. procera* a 37 °C por 24 horas com o objetivo de avaliar se as proteases endógenas do látex promoveriam a hidrólise da CpOsm também presente na amostra. A análise por eletroforese evidenciou que a osmotina permanecia presente na amostra,

sugerindo que sua hidrólise por proteases endógenas não ocorria ou era imperceptível pelo método aplicado.

Como alternativa de solubilização, os corpos de inclusão contendo rCpOsm, bem como contendo o plasmídeo íntegro foram submetidos à hidrólise enzimática com uma protease purificada do látex de *C. procera*, segundo Ramos *et al.* (2013)(Figura 24).

Figura 24: Perfil eletroforético da fração insolúvel de *E.coli* BL21(DE3) tratadas com a protease do látex de *C. procera* (CpCP-1).

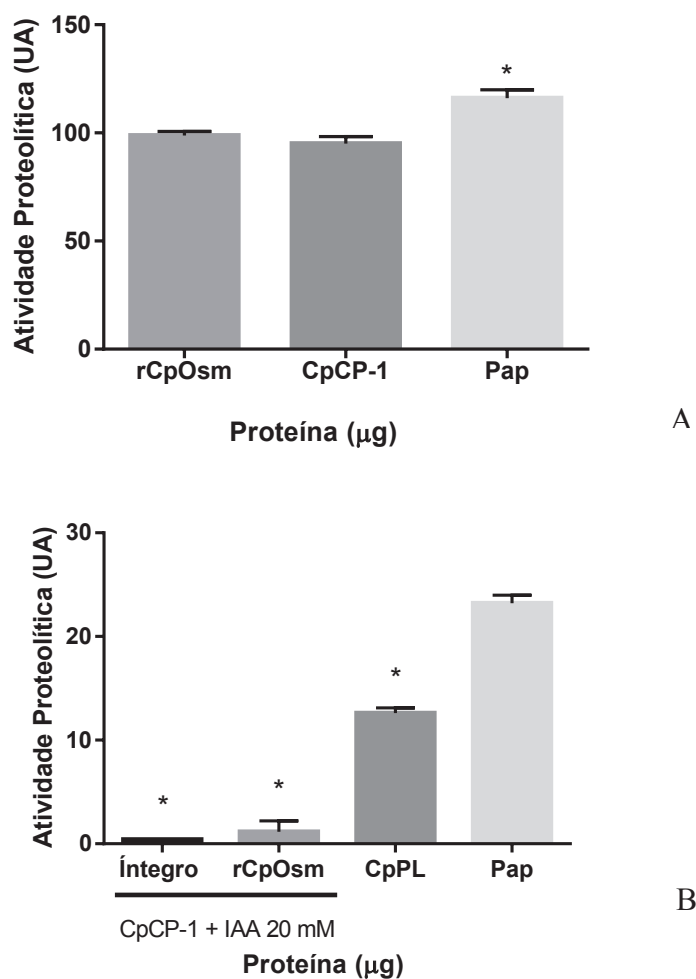


Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Corpos de inclusão induzidos por 3 h submetidos ao tratamento de solubilização com CpCP-1 a 37 °C por 24 h. 1) Corpos de inclusão contendo rCpOsm íntegro (sem tratamento), 2) Protease CpCP-1, 3) Corpos de inclusão após tratamento com protease, 4) Fração insolúvel do plasmídeo íntegro (sem rCpOsm) após tratamento com protease. A banda de 23,1 kDa corresponde a osmotina recombinante. M- Marcador de massa molecular. Foram aplicados 30 µL das frações no interior de cada poço. As proteínas foram visualizadas após coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1%.

A osmotina recombinante foi preservada após 24 h de tratamento com a protease do látex de *C. procera*, como pode-se observar uma banda proteica em aproximadamente 23,1 kDa, correspondente à osmotina recombinante. Ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato e IAA 20 mM como inibidor da protease mostraram que a protease (CpCP-1) se manteve ativa até a

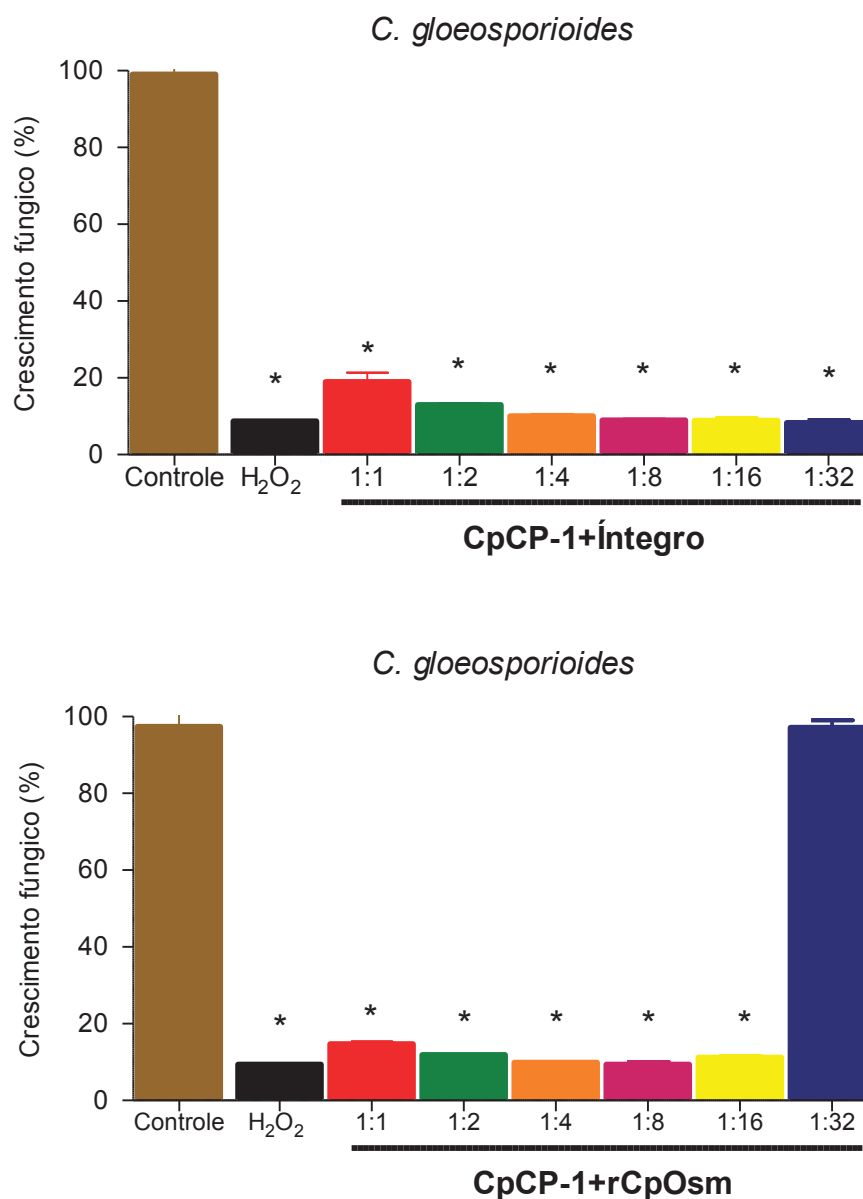
adição de 20 mM de IAA (Figura 25). A protease tratada com IAA não apresentou atividade sobre o crescimento micelial. Além disto, ensaios de inibição do crescimento micelial também foram realizados para verificar a eficácia da solubilização e atividade de rCpOsm (Figura 26). Contudo, semelhante ao que ocorreu com os CI solubilizados com os detergentes, tanto a fração insolúvel do plasmídeo íntegro (pET303::CT-His) como os corpos de inclusão contendo o plasmídeo recombinante (pET303::CpOsm), tratados com CpCP-1, inibiram o desenvolvimento micelial de *C. gloeosporioides*. Os resultados sugerem que proteínas bacterianas poderiam ter atividade antifúngica, o que, em todos os casos avaliados, estariam interferindo nos ensaios. A literatura, entretanto, não descreve dados que possam confirmar esta hipótese. Ao contrário, proteínas extraídas da fração insolúvel oriundas de plasmídeos íntegros não são descritas com controle negativo dos ensaios.

Figura 25: Atividade proteolítica de CpCP-1 (1 mg/mL) a 37 °C por 24 h.



As proteínas do látex de *C. procerca*, CpCP-1 e papaína purificada foram utilizados como controles positivos. (A) Corpos de inclusão (rCpOsm -1 mg/mL) tratados com CpCP-1 (1 mg/mL). (B) das frações insolúveis tanto do plasmídeo íntegro como do recombinante tratados com IAA (20 mM) após incubados por 24 h a 37 °C. Foram utilizados nos ensaios 80 µL (1 mg/mL) das amostras.

Figura 26: Avaliação do efeito de corpos de inclusão, solubilizados com CpCP-1 sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

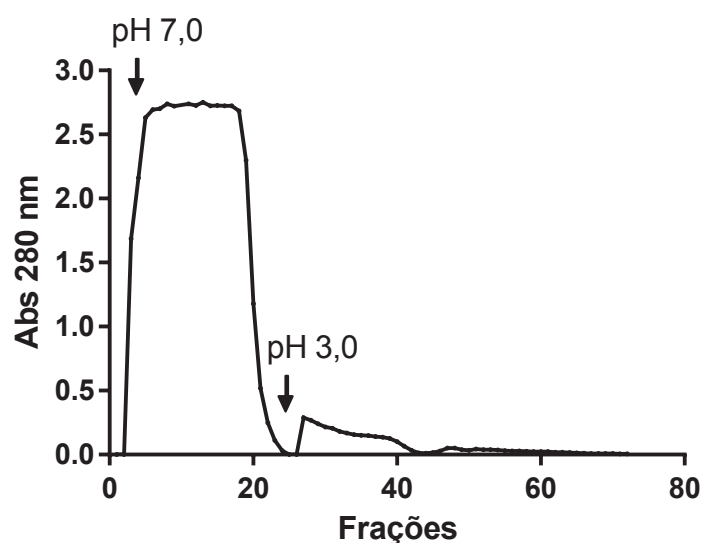


Os valores percentuais correspondem à atividade antifúngica de cada amostra, sobre o desenvolvimento de hifas, determinado após 48 horas do ensaio. As amostras (1 mg/mL) foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5. Foram utilizadas como soluções controle tampão acetato de sódio - negativo e H₂O₂ 200 mM – positivo. Os ensaios foram realizados a 27 °C, por 24 horas e 70% de umidade relativa. O efeito sobre o crescimento micelial foi observado a partir da leitura de absorbância a 620 nm em leitor de placas Elisa (ELX800 Absorbance microplate reader – BIOTEK ®). *p<0,05 indica diferença estatística comparado com controle negativo (n=3, ANOVA, Teste de Tukey).

Após ter observado o resultado positivo de inibição contra o fungo, os corpos de inclusão recombinantes tratados com a protease foram submetidos à

cromatografia de afinidade em matriz Anti-CpOsm, em mais uma tentativa de purificar a osmotina recombinante (Figura 27). Após a cromatografia, dois picos foram obtidos, um não retido e um retido, eluído em meio ácido. Esses picos foram avaliados em eletroforese com o objetivo de observar o perfil proteico após a cromatografia.

Figura 27: Cromatografia de afinidade em matriz contendo anticorpo Anti CpOsm nativa imobilizada.

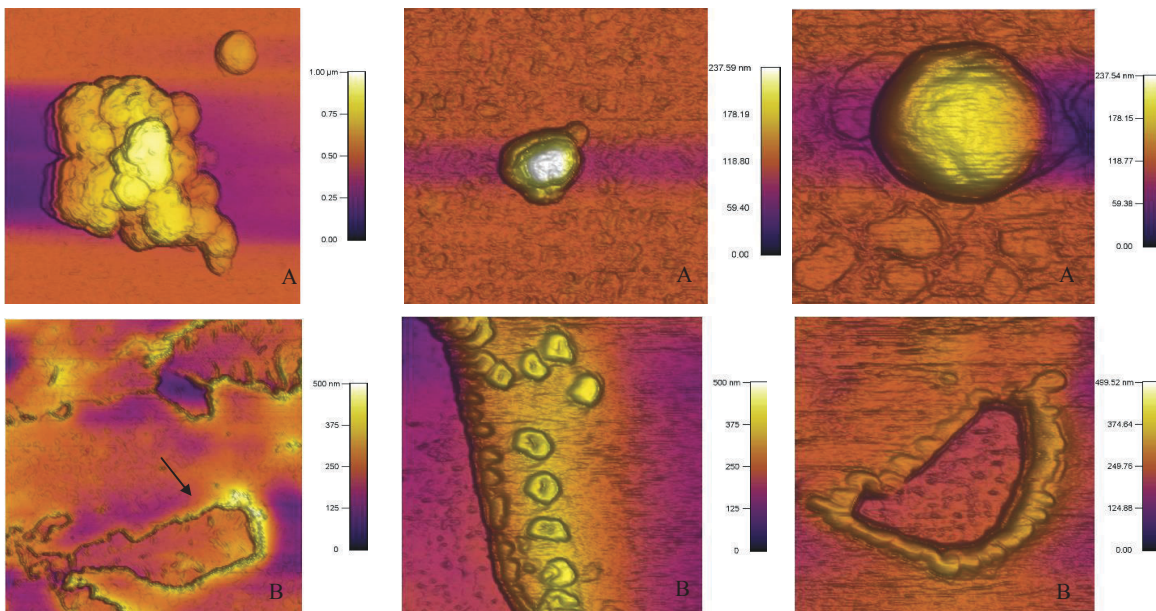


Perfil cromatográfico. Corpos de inclusão digeridos com a protease CpCP-1 foram aplicados à matriz cromatográfica equilibrada com o tampão de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7). Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com tampão de equilíbrio (pH7) – Pico I. E o pico retido (pH3) foi eluído após lavagem da matriz com tampão glicina 50 mM pH 3.

6.7 Microscopia de Força Atômica

Os corpos de inclusão contendo a osmotina recombinante foram analisados por Microscopia de Força Atômica. Estruturas circulares individualizadas e em aglomerados foram visualizados na escala de μm (Figura 28). Pode-se observar também que os corpos de inclusão após tratamento com CpCP-1 a 37 °C por 24 h foram desfeitos, desagregados, apresentando uma estrutura diferenciada, não mais circular.

Figura 28: Imagens de Microscopia de Força Atômica de Corpos de Inclusão.



(A) Os corpos de inclusão contendo o vetor pET303::CpOsm aparecem formando agregados, embora seja fácil visualizar estruturas individuais. As imagens capturadas por MFA estão nas escalas de (2,45 μm); (1,25 μm) e (450 nm), respectivamente. (B) Imagens de corpos de inclusão previamente tratados com protease de *C. procera*. As imagens capturadas por MFA estão nas escalas de (10,0 μm); (1,15 μm) e (870 nm), respectivamente. A imagem capturada em 870 nm é a aproximação da porção indicada pela seta na imagem de 10,0 μm.

As imagens sugerem que a ação da protease sobre os CI provocou a completa desestruturação dos CI e sugerem que houve um extravasamento do conteúdo interno da partícula. As imagens sugestivas indicam que os CI poderiam ser revertidos de alguma estrutura que foi rompida pela ação das proteases. Embora haja diversos dados em imagens de CI bacterianos na literatura, não foi encontrada referência que descrevesse em detalhes a estrutura de CI e não há relato da possível existência de uma camada de envoltório ou envelope que pudesse dar sustentação à estrutura dos CI. O inusitado é que as imagens e seu entorno sugere que houve uma espécie de explosão na estrutura com liberação de conteúdo.

7. Discussão

A literatura está repleta de artigos descrevendo a expressão heteróloga de proteínas em sistemas unicelulares, largamente predominando os modelos de *E. coli* (procarionte) e *P. pastoris* (eucarionte). Há também uma diversidade de protocolos, e mesmo de kits, a serem aplicados em protocolos de expressão heteróloga em sistemas unicelulares. Não há, entretanto, uma uniformidade de estratégias protocolares porque cada proteína, sendo uma entidade molecular única, não se enquadraria em protocolos padrões. A expressão heteróloga em qualquer sistema deve ser feita de acordo com um amplo conjunto de fatores que sejam adequados não somente ao produto desejado, mas também aos objetivos de uso posterior deste.

A expressão heteróloga em sistema procarionte oferece as vantagens de ser mais rápido, o nível de expressão ser elevado, o protocolo ser de menor custo, dentre outros fatores. Há, porém, um conjunto importante de adversidades. O sistema procarionte, embora cumpra com grande eficiência a síntese da cadeia polipeptídica, as etapas posteriores a esta frequentemente se constituem em problemas. O primeiro condiz no fato de que a síntese de proteínas eucariontes funcionais inclui etapas chamadas pós-traducionais as quais incluem eventos de processamento, modificações pontuais de resíduos de aminoácidos e ainda a atuação de proteínas acessórias que auxiliam no enovelamento correto da proteína recém-sintetizada. A presença de glicosilação é um capítulo a parte, visto que os sistemas procariontes não dispõem de mecanismos biossintéticos para reproduzir as informações requeridas para as glicoproteínas eucariontes. A utilização de um sistema procarionte pressupõe que o produto desejado não necessite destes eventos. Até mesmo a presença de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína em uma proteína é considerada uma etapa limitante na obtenção de um produto proteico recombinante funcional.

Em *E. coli*, modelo de expressão procarionte universalmente utilizado e aplicado neste trabalho, uma das consequências da expressão heteróloga é que o produto sintetizado pela célula tende a se acumular no citoplasma e formar agregados insolúveis que contribuem para o enovelamento incorreto/incompleto

da proteína heteróloga, que por sua vez, favorece sua insolubilidade. O acúmulo do produto gênico recombinante dá origem a corpos de inclusão densos.

Os corpos de inclusão são partículas densas de proteínas agregadas encontradas em ambos os espaços citoplasmáticos e periplasmáticos de *E. coli* durante a superexpressão de proteína heteróloga. É geralmente assumido que a superexpressão de proteínas heterólogas (maior do que 2% de proteína celular) e de proteínas altamente hidrofóbicas sejam mais propensas a uma acumulação como corpos de inclusão em *E. coli*. No caso de proteínas tendo ligações dissulfureto, a formação de agregados de proteínas como corpos de inclusão é previsível uma vez que o ambiente de redução do citosol bacteriano inibe a formação de ligações dissulfureto. Isto pode contribuir negativamente para o enovelamento correto da cadeia polipeptídica. Os corpos de inclusão, apesar de serem partículas densas, são altamente hidratados e possuem uma arquitetura porosa.

O desafio protocolar, portanto, é extrair na forma ativa e solúvel a proteína desejada para ser posteriormente purificada. Cumprir estas etapas implica inicialmente a seguir a protocolos pré-estabelecidos para outras proteínas, mas não há garantias de sucesso. O caso da osmotina de *C. procerca* é emblemático. A proteína recombinante expressa em *P. pastoris* (sistema eucarionte) não foi facilmente obtida e purificada, pois o rendimento do processo foi limitante. Entretanto, a estratégia conseguida na purificação foi inovadora (RAMOS *et al.* 2015). Portanto, a obtenção da mesma proteína, agora expressa em sistema procarionte anunciava-se como ainda desafiadora. Por outro lado, o estabelecimento de um protocolo que permitisse sua obtenção seria importantíssimo para os posteriores propósitos científicos, tornando esta etapa da pesquisa, também, um passo limitante em seu contexto mais amplo.

A diferença na expressão da proteína recombinante por diferentes linhagens pode ser explicada devido à influência da temperatura, tempo de indução bem como o tipo de plasmídeo usado no processo de clonagem (GOPAL e KUMAR, 2013). No caso, a temperatura de expressão mostrou diferença nos resultados obtidos por ArcticExpress(DE3), com indução a 12 °C com relação à indução a 37 °C de BL21(DE3)(Figuras 7 e 11).

Com o objetivo de aumentar a produção de proteína recombinante, foi realizado um mapeamento de meios de cultivo que induzem a expressão da proteína heteróloga. Pois é sabido que a composição do meio pode afetar no acúmulo de proteínas recombinantes. Diversas formulações de meios podem ser utilizadas como *screen* para o acúmulo de proteínas de interesse no extrato solúvel, bem como no insolúvel (BROEDEL *et al.*, 2001).

O tempo de indução pode influenciar na quantidade e na qualidade da proteína expressa, visto que quanto mais tempo um microorganismo estiver num meio com nutrientes disponíveis, ele produz tanto o material de interesse, como metabólitos secundários. Da mesma forma, com o passar do tempo, este ambiente já se torna tóxico, com limitação de nutrientes, e esta produção da proteína de interesse já não se torna tão desejável porque há o acúmulo de outros produtos gerados pelo sistema de expressão (SAN-MIGUEL; PÉREZ-BERMÚDEZ; GAVIDIA, 2013). A obtenção de rCpOsm após 3 horas de indução pode ser considerado como um passo de sucesso.

O agente solubilizante CTAB foi eficiente em sua ação solubilizante, porém como as células bacterianas que apresentavam o plasmídeo íntegro, usado como controle, também apresentaram atividade nos ensaios antifúngicos e, considerando que os surfactantes são detergentes e que agem sobre a membrana celular, esses compostos, em solução, também apresentaram atividade antifúngica na ausência da amostra, o que corroborou com a afirmativa: esses agentes solubilizantes surfactantes interferiram nos resultados apresentados. É importante citar que houve aparente interferência mesmo com todas as amostras sido dialisadas e liofilizadas antes dos testes.

Artigo publicado por Klicova e colaboradores (2012) relatou que com 1% de CTAB iniciava a formação de micelas (a partir de 40 mM), o que evidencia a dificuldade encontrada nesse estudo de dialisar, isolar a proteína desse agente surfactante. Com relação ao ARG12, no entanto, devido à região apolar de ARG12 possuir somente 12 resíduos de carbono, enquanto os demais surfactantes possuem região apolar maiores, esse surfactante apresentou baixa solubilização.

Os agentes solubilizantes interferem, de diversas formas, no estado conformacional das proteínas. Estudos de Singh e Panda (2005) sugeriram que

as proteínas do corpo de inclusão já existem num estágio intermediário de dobramento e tem uma quantidade de proteínas consideráveis em estado conformacional apenas de estrutura secundária. Se a proteína a partir de corpos de inclusão pode ser solubilizada sem causar distúrbio em sua estrutura secundária, ou seja, sem a consequente formação de um enrolamento amplamente aleatório da estrutura da proteína, a quantidade de agregação de proteínas durante o redobramento será baixa e resultará numa alta recuperação de proteína bioativa; completar o enovelamento (estrutura terciária e quaternária) é bastante possível.

Isso corrobora com o que foi encontrado neste trabalho. Os agentes surfactantes solubilizaram a proteína recombinante, mas interferiram de tal forma que os resultados foram inconclusivos. Certamente se a natureza dos ensaios para investigar a atividade da rCpOsm não sofressem interferência dos agentes solubilizantes o uso destes poderia ter sido favorecido.

Em geral, a proteína marcada com histidina é o ligante mais forte entre todas as proteínas numa amostra de extrato em bruto (por exemplo, um lisado bacteriano). Proteínas marcadas com histidina tem uma elevada afinidade seletiva para Ni²⁺ e vários outros íons metálicos que podem ser imobilizadas em suportes cromatográficos utilizando ligantes quelantes. Consequentemente, uma proteína que contém um marcador de histidina vai ser ligada seletivamente ao meio carregado com o íon, tal como Ni Sepharose 6 Fast Flow (FF), enquanto outras proteínas celulares ou não vão se ligar ou se vincularão fracamente. Porém, não foi o que este trabalho encontrou, tal qual aquele de Ramos *et al.* (2015) que não obteve sucesso na purificação de rCpOsm expressa em *P. pastoris*. Não houve ligação da proteína recombinante na matriz cromatografica com Niquel imobilizado. Acredita-se que a cauda de histidina não estava exposta de forma a se ligar corretamente, como citado em outros casos (GE HEALTHCARE, 2012).

Entretanto, examinando a posição (localização no plano tridimensional) da cauda de histidina na estrutura da osmtina estudada, não há aparente justificativa para algum impedimento estérico para a proteína recombinante ligar-se a coluna. Ao contrário, de acordo com a análise a região da cauda de histidina deve estar totalmente exposta na estrutura 3D. O resultado obtido na coluna de princípio hidrofóbico sugere que detalhando mais os parâmetros cromatográficos, seria

possível a purificação da rCpOsm, visto que o resultado sugere que a proteína foi retida na matriz, embora em conjunto com outras proteínas minoritárias.

Em uma segunda linha de estratégia, este trabalho utilizou a metodologia de ultrassom como uma alternativa de solubilização de corpos de inclusão, e o que se observou foi que as estruturas celulares foram rompidas, a qual além da proteína recombinante (rCpOsm) ter sido solubilizada, outras proteínas (*E.coli*) também o foram (Figura 17). Essa é uma metodologia bastante usada para a lise celular (HUANG, 2011; KONG e GUO, 2014). Entretanto, mesmo havendo a liberação de proteína recombinante dos corpos de inclusão, a mesma não mostrou atividade antifúngica contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Este experimento não é conclusivo sobre a atividade da rCpOsm visto que a mesma pode não ter sido ativa por concentração inadequada e isto vale para outros ensaios. Desta forma, a obtenção da proteína purificada é uma condição sem a qual não dá para considerar, definitivamente, se a mesma está em forma ativa.

O insucesso nas tentativas de purificar a proteína a partir dos protocolos de solubilização, utilizando diferentes princípios cromatográficos incentivou a realização de ensaios com os extratos. A evidente interferência de alguns agentes solubilizantes testados não permitiu a inequívoca constatação de que a proteína recombinante estaria ativa. Mesmo se valendo de um protocolo isento de agentes químicos, aplicando-se o tratamento por ultrassom, não foi possível afirmar se a proteína recombinante estaria ativa, visto que a preparação de CI não transformados foi também capaz de inibir o fungo avaliado nos ensaios. Não foi observado na literatura dados que pudessem suportar estes achados.

A ideia de que proteases do látex poderiam ser utilizadas para desfazer os CI nasceu da hipótese de que sendo co-existent no látex, protease e osmotina deveriam ser estáveis quando em face uma da outra. De fato, os ensaios sugeriram que as proteases não afetavam a osmotina laticífera.

Segundo Ramos *et al.* (2013), A protease CpCP-1 tem sua atividade enzimática aumentada com 3 mM de DTT, possui atividade antifúngica, porém, tem até 96,80 % de inibição de sua atividade proteolítica (e antifúngica) com IAA (iodoacetamida). O que corrobora com o fato dessa protease estar inativa nos ensaios antifúngicos realizados aqui. Assim, a protease purificada foi usada como

agente de desestruturação dos CI e os resultados de eletroforese mostraram a rCpOsm presente na fração solúvel depois do tratamento.

O produto da digestão dos CI com a protease de *C. procera*, quando submetido à cromatografia em coluna de imunoafinidade, seguindo o protocolo de Freitas *et al.* (2015) e Ramos *et al.* (2015), teve uma fração proteica retida na coluna, o que poderia ser a rCpOsm. Isto repetiria o sucesso obtido na purificação de rCpOsm expressa em *P. pastoris*. Entretanto, o rendimento limitante do processo não permitiu a identificação por espectrometria de massas ou atividade antifúngica, o que será alvo imediato de análise.

Para interpretar como a protease agiria sobre os CI, estes íntegros e submetidos à proteólise foram avaliados por meio de Microscopia de Força Atômica. Embora a Microscopia de Força Atômica se constitui em uma extraordinária ferramenta para análises estruturais, a correta interpretação de seus dados, no contexto biológico, carece de muitas precauções.

As análises de CI por meio de MFA tinham por objetivo verificar as estruturas de CI remanescentes do tratamento com protease. As imagens obtidas de corpos de inclusão não tratados confirmam outros resultados obtidos por Microscopia Eletrônica de Transmissão, onde as imagens de corpos de inclusão mostram estruturas compactas e vistas tanto em aglomerados como individualizados (BOWDEN *et al.*, 1991; YAMAGUCHI e MIYAZAKI, 2014), densamente empacotadas e de formato arredondado, partículas refratíveis (CARRIÓ, CUBARSI, e VILLAVERDE, 2000; SINGH, UPADHYAY, e PANDA, 2015).

Entretanto as imagens de CI tratados enzimaticamente sugeriram que os CI poderiam estar empacotados sob-retensão em uma estrutura a ser rompida e isto poderia explicar muito do que se percebe da insolubilidade do conteúdo interno dos CI enquanto eles mesmos são bem hidratados. Denis *et al.* (2003), estudando a estrutura de corpos de inclusão de *Ralstonia eutropha* por meio de Microscopia de Força Atômica, demonstraram a presença de uma possível mono camada lipídica envolvendo o conteúdo dos corpos e que poderia ser desfeita por tratamento com SDS.

Não encontramos na literatura relatos similares para CI de *E. coli* formados a partir da superexpressão de proteínas recombinantes. Ressalte-se, entretanto,

que o estudo de Denis *et al.* (2003) demonstrou claramente a remoção da camada envolvente das partículas, mas sem afetar as partículas em sua forma ou conteúdo interno. O que se percebeu neste estudo em curso é que os CI foram completamente destruídos pelo tratamento proteolítico com sugestivo efeito explosivo sobre as partículas, o que é inusitado e inovador. As imagens sugerem ter havido um rompimento com grande estavassamento de conteúdo espalhado distante do suposto material envoltório remanescente. O tratamento enzimático de CI não é um protocolo usual para obtenção de proteínas recombinantes de *E. coli* mas pode-se propor que *screenings* proteolíticos poderiam ser aplicados no sentido de verificar se outras enzimas (principalmente comerciais) poderiam produzir efeitos similares. Neste sentido o trabalho abre importantes perspectivas em aspectos científicos inovadores.

8. Conclusão

A formação de agregados insolúveis em corpos de inclusão ainda não é um processo prático e nem tão fácil de realizar porque a busca é sempre para a purificação e solubilização total destas proteínas, reconhecido como o principal ponto de entrave (*bottleneck*) da produção de proteína recombinante. No entanto, as proteínas com atividade biológica podem ser encontradas nos corpos de inclusão e podem ser usadas como potenciais alvos biotecnológicos.

Embora não exista um protocolo universal que permita a recuperação destas proteínas presentes em corpos de inclusão, diversos protocolos são usados, e cada um segue de acordo com as características da proteína de interesse. Assim, este estudo mostra que tanto os métodos de solubilização com agentes surfactantes como o enzimático puderam solubilizar e remover a rCpOsm dos corpos de inclusão. O protocolo ideal para a purificação da proteína recombinante permanece indefinido, principalmente, a etapa cromatográfica, entretanto os dados finais obtidos foram animadores. O relato do uso de protease na desestruturação do CI e os efeitos observados sobre os CI são considerados inusitados e de relevante contribuição à literatura atual. Certamente, a partir dos resultados reportados aqui, abrem importantes perspectivas científicas inovadoras. A purificação da proteína recombinante deverá ser alcançada com modificações dos protocolos cromatográficos explorados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**; 22(11): 1399-1408. 2004.
- BONDOS, S.E.; BICKNELL, A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. **Analytical Biochemistry**; 316:223-231. 2003.
- BOWDEN, G.A.; PAREDES, A.M.; GEORGIU, G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Biotechnology**; 9(8): 725-730, 1991.
- BROEDEL, S.E.; PAPCIAK, S.M.; JONES, R.M. The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in *E.coli*. **Technical Bulletin-Athena Enzyme Systems™ Group**; 2: 8, 2001.
- BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, 69: 61-66. 1990.
- BUCHNER, J.; RUDOLPH, R. Routes to active proteins from transformed microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**; 2(4): 532-538. 1991.
- CARRIÓ, M.M.; CUBARSI, R.; VILLAVERDE, A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. **FEBS Letters**; 471(1): 7-11. 2000.
- CARRIÓ, M.M.; VILLAVERDE, A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. **FEBS Letters**; 489: 29-33. 2001.
- CHOU, C.P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**; 76: 521–532. 2007.
- DENNIS, D.; LIEBIG, C.; HOLLEY, T.; THOMAS, K.S.; KHOSLA, A.; WILSON, D.; AUGUSTINE, B. Preliminary analysis of polyhydroxyalkanoate inclusions using atomic force microscopy. **FEMS Microbiology Letters**; 226(1): 113-119. 2003.
- FREITAS, C.D.; LOPES, J.L.; BELTRAMINI, L.M.; OLIVEIRA, R.S.; OLIVEIRA, J.T.; RAMOS, M.V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta**; 1808(10):2501-2507, 2011b.
- FREITAS, C.D.; NOGUEIRA, F.C.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.; DOMONT, G.B.; RAMOS, M.V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**; 49(7): 738-743, 2011a.
- FREITAS, C.D.; SILVA, M.Z.; BRUNO-MORENO, F.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R.A.; RAMOS, M.V. New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity. **Plant Physiol Biochemistry**; 96: 45-52. 2015.

GOEL, D.; SINGH, A.K.; YADAV, V.; BABBAR, S.B.; BANSAL, K.C. Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum L.*). **Protoplasma**; 245(1): 133-141. 2010.

PROUTY, W.F.; KARNOVSKY, M.J.; GOLDBERG, A.L. Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**; 250(3): 1112-1122. 1975.

GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N.; GARCÍA-FRUITÓS, E.; VILLAVERDE, A. Recombinant protein solubility-does more mean better? **Nature Biotechnology**; 25(7): 718-720. 2007.

GOPAL, J.G.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**; 32(6): 419-25. 2013.

GRIBSKOV, M.; BURGESS, R.R. Overexpression and purification of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Gene**; 26(2-3): 109-118. 1983.

GE HEALTHCARE. Recombinant protein purification. **GE Handbook, Principles and Methods**; 18: 1142-75. 2012.

HELLMAN U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, J.; HELDIN, C.H. Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. **Anal Biochemistry**; 224(1): 451-455. 1995.

HUBER, O.; HUBER-WUNDERLICH, M. Recombinant Proteins. **Protein Liquid Chromatography**; 13: 557-586. 1999.

INVITROGEN. Champion pET 302/NT-His and pET 303/CT-His Vectors. **Manual Life Technologies Corporation**; 25: 1-27. 2010.

JANA, M.S.; DEB, J.K. Strategies for eficiente production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**; 67: 289–298. 2005.

JUNQUEIRA, M.R. Aplicação de técnicas proteômicas na caracterização do veneno da serpente *Bothrops insularis* (*Viperidae*). **Dissertação**, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 63p. 2005.

KLIČOVÁ, L.; ŠEBEJ, P.; ŠTACKO, P.; FILIPPOV, S.K.; BOGOMOLOVA, A.; PADILLA, M.; KLÁN, P. CTAB/Water/Chloroform Reverse Micelles: a closed or open association model? **Langmuir**; 28(43): 15185-15192. 2012.

KOMBRINK,E.; SOMSSICH, I.E. Pathogenesis-Related Proteins and Plant Defense. **The Mycota**; 5(16):107-128. 1997.

KONG, B.; GUO, G.L. Soluble expression of disulfide bond containing proteins FGF15 and FGF19 in the Cytoplasm of *Escherichia coli*. **PLoS ONE**; 9(1): 1-8. 2014.

KUMAR, S.; JAIN, K.K.; SINGH, A.; PANDA, A.K.; KUHAD, R.C. Characterization of recombinant pectate lyase refolded from inclusion bodies generated in *E. coli* BL21(DE3). **Protein Expression Purification**; 110: 43-51. 2015.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**; 22: 680-685. 1970.

LEE, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**; 14(3): 98-105. 1996.

LILIE, H.; SCHWARZ, E.; RUDOLPH, R. Advances in refolding of proteins produced in *E.coli*. **Current Opinion in Biotechnology**; 9: 497-501. 1998.

LU, H.; ZHANG, H.; WANG, Q.; YUAN, H.; HE, W.; ZHAO, Z.; LI, Y. Purification, refolding of hybrid hIFN gamma-kringle 5 expressed in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**; 42(3): 211-216. 2001.

MELO, V.M.M.; MEDEIROS, D.A.; RIOS, F.J.B.; CASTELAR, L.I.M.; CARVALHO, F.F.U. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**; 40: 281-284. 1997.

NOGUEIRA, N.A.P. Purificação e Caracterização biológica da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) produzida em *Escherichia coli*. **Tese**. Universidade Federal do Ceará. Centro de Ciências. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Fortaleza, Ceará. 1999.

NOVAGEN. Protein Refolding Kit. **Novagen, Inc**; 1-9. 1998.

OLIVEIRA, R.S.B. Expressão heteróloga, caracterização cristalográfica e análise funcional de uma osmotina antifúngica de *Calotropis procera*. Universidade Federal do Ceará. Centro de Ciências. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. **Tese**. Fortaleza. 2014.

PALMER, I.; WINGFIELD, P.T. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion Body) Proteins from *Escherichia coli*. **Current Protocol Protein Sci**; 1-25. 2012.

PANIS, C.; PIZZATTI, L.; HERRERA, A. C.; CECCHINI, R.; ABDELHAY, E. Putative circulating markers of the early and advanced stages of breast cancer identified by high-resolution label-free proteomics. **Cancer Letters**; 330(1): 57-66. 2013.

PAPANEOPHYTOU, C.P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. **Protein Expression and Purification**; 94: 22-32. 2014.

PURI, N.K.; CRIVELLI, E.; CARDAMONE, M.; FIDDES, R.; BERTOLINI, J.; NINHAM, B.; BRANDON, M.R. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. **The Biochemical Journal**; 285: 871-879. 1992.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Corrent Science**; 80(9): 1121-1128. 2001.

RAMOS, M.V.; OLIVEIRA, R.S.B.; PEREIRA, H.M.; MORENO, F.B.; LOBO, M.D.P.; REBELO, L.M.; BRANDÃO-NETO, J.; SOUSA, J.S.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; FREITAS, C.D.T.; GRANGEIRO, T.B. Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. **Phytochemistry**; 119: 5-18. 2015.

RAMOS, M.V.; ARAÚJO, E.S.; JUCÁ, T.L.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; VASCONCELOS, I.M.; MOREIRA, R.A.; VIANA, C.A.; BELTRAMINI, L.M.; PEREIRA, D.A.; MORENO, F.B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**; 58: 211-219. 2013.

ROSANO, G.L.; CECCARELLI, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**; 5: 1-17. 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2^a ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SAN-MIGUEL, T.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; GAVIDIA, I. Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. **Springer Plus**; 2(1): 89. 2013.

SCHMIDT, F.R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**; 65(4): 363-372. 2004.

SINGH, S.M.; PANDA, A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**; 99(4): 303-310. 2005.

SINGH, A.; UPADHYAY, V.; PANDA, A.K. Solubilization and Refolding of Inclusion Body Proteins. **Insoluble Proteins - Methods in Molecular Biology**; 1258(4): 283-291. 2015.

SOUZA, D. P., FREITAS, C. D., PEREIRA, D. A., NOGUEIRA, F. C., SILVA, F. D., SALAS, C. E., RAMOS, M. V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta**, 234(1): 183-93, 2011.

STUDIER, F.W.; MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**; 189(1): 113-130. 1986.

SUBRAMANYAM, K.; ARUN, M.; MARIASHIBU, T.S.; THEBORAL, J.; RAJESH, M.; SINGH, N.K.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Overexpression of tobacco osmotin (Tbosm) in soybean conferred resistance to salinity stress and fungal infections. **Planta**; 236(6): 1909-1925. 2012.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology Biotechnology**; 72(2): 211-222. 2006.

TZOU, Y.M.; HUANG, T.S.; HUGGINS, K.W.; CHIN, B.A.; SIMONNE, A.H.; SINGH, N.K. Expression of truncated tobacco osmotin in *Escherichia coli*: purification and antifungal activity. **Biotechnology Letter**; 33: 539-543. 2011.

VERNET, E.; KOTZSCH, A.; VOLDBORG, B.; SUNDSTRÖM, M. Screening of genetic parameters for soluble protein expression in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**; 77(1). 104-111. 2011.

WALTHER, C.; MAYER, S.; SEKOT, G.; ANTOS, D.; HAHN, R.; JUNGBAUER, A.; DÜRAUER, A. Mechanism and model for solubilization of inclusion bodies. **Chemical Engineering Science**; 101: 631-641. 2013.

WYPYCH, G. Handbook of Polymers. **Chemical Engineering**; 2nd Edition: 557-559. 2016.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F.A.P.; ARY, M.B.; SILVA, C.P.; CARVALHO, M.M.M.; MACEDO, M.L.M.; LEMOS, F.J.A.; GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 37 (4), 1139-1143.1989.

YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. **Biomolecules**; 4: 235-251. 2014.

ZERBS, S.; FRANK, A.M.; COLLART, F.R. Bacterial Systems for Production of Heterologous Proteins. **Methods Enzymology**; 463: 149-168. 2009.