



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOTECNOLOGIA**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA ENTEROQUINASE EM**  
***Escherichia coli***

**KEROLLEN RUNA PINTO**

**MANAUS-AM**

**2017**

**KEROLLEN RUNA PINTO**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA ENTEROQUINASE EM**  
***Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**

**MANAUS-AM**

**2017**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**KEROLLEN RUNA PINTO**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA ENTEROQUINASE EM**  
***Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

**Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO**

---

**Dr. CARLOS GUSTAVO NUNES DA SILVA**

---

**Dra. MARCIA NEIVA**

---

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P659e Pinto, Kerollen Runa  
EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA ENTEROQUINASE  
EM *Escherichia coli* / Kerollen Runa Pinto. 2017  
81 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. enteroquinase. 2. promotor th2. 3. expressão heteróloga. 4.  
escherichia coli. 5. morfologia. I. Astolfi Filho, Spartaco II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, a minha mãe dona Celina Clarice Runa de Barros por seu amor incondicional, a minha tia Elaine Runa de Barros seu carinho e amor a mim dedicado, ao meu irmão KervenLintton Runa Pinto por sua alegria e força e ao meu pai Sebastião Carvalho Pinto por toda oportunidade de sucesso que me ofereceu.*

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente agradeço ao Criador, pelo dom da vida e por sua infinita sabedoria.

Agradeço a minha família pelo amor, carinho e pela paciência que mesmo não compreendendo o que faço apoiaram-me e incentivaram-me a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho por toda dedicação e por todo conhecimento e segurança que me transmite, onde muitas vezes me segurou pela mão e me mostrou a direção correta.

Aos amigos do laboratório que sempre ajudaram na realização deste trabalho, ajudando-me com conselhos, ideias e até mesmo na parte experimental.

Aos amigos e colaboradores Diego Moreira e Maria Clara Astolfi pela concessão do vetor de expressão pDM02 utilizado neste trabalho.

A Dra. Elen Bethleen de Souza Carvalho pela ajuda tanto emocional quanto profissional para o desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Enedina Nogueira de Assunção por sua dedicação e por todo seu conhecimento técnico que sempre me ofereceu.

A FAPEAM pela concessão da bolsa de pesquisa.

## EPÍGRAFE

**"TUDO QUE VOCÊ PODE IMAGINAR É REAL."**

*"Everything you can imagine is real."*

**Pablo Picasso.**

## RESUMO

A enteroquinase (EC 3.4.21.9) é uma serino protease heterodimérica, ativadora natural do tripsinogênio, capaz de clivar especificamente a sequência Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. Devido à alta especificidade do sítio de reconhecimento tornou-se uma ferramenta de grande interesse biotecnológico. É comumente utilizada para a remoção *in vitro* de marcas de afinidade, como etiquetas de fusão (*tags*) de proteínas recombinantes. No presente trabalho, a estratégia de clonagem molecular resultou na construção do plasmídeo pDMK06, que é capaz de programar a expressão heteróloga regulada do gene ETK-Trx em *E.coli*. Por meio do processo de clivagem com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* foi possível obter a sequência codificadora da proteína de fusão entre enteroquinase e tiorredoxina (ETK-Trx) de aproximadamente 1259 pb partir do plasmídeo pENTK, a seguir essa sequência foi subclonada nos sítios de *NdeI* e *BamHI* do vetor de expressão pDM02, originando o plasmídeo recombinante pDMK06. Esse vetor contém o promotor TH2 que é regulado eficientemente pelo sistema operador/repressor Lac. Células de *E.coli* JM110 transformadas com o plasmídeo recombinante mostram menor crescimento em meio sólido quando a expressão da proteína heteróloga era induzida por IPTG em relação ao controle, porém esse efeito não foi detectado em meio líquido. Além disto foi analisado por microscopia ótica a morfologia das células de *E.coli* com o plasmídeo recombinante pDMK06, onde observou-se no decorrer do tempo de crescimento e indução, alterações na morfologia celular caracterizada de filamentação das células induzidas com IPTG quando comparadas com o controle. Para análise da expressão da proteína recombinante ETK-Trx utilizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE das amostras referentes a 8 horas de crescimento e indução com IPTG. Os resultados obtidos apresentaram a proteína ETK-Trx com tamanho aproximado de 47kDa com alto nível de expressão na fração insolúvel, provavelmente em forma de corpúsculo de inclusão. A expressão em altos níveis das proteínas ETK-Trx ocorreu de forma perfeitamente regulada mostrando a funcionalidade do sistema de expressão/regulação do plasmídeo pDM02.

**Palavras-chave:** Enteroquinase, promotor TH2, Expressão heteróloga.

## ABSTRACT

Enterokinase (EC 3.4.21.9) is a heterodimer serine protease, a natural activator of trypsinogen, capable of cleaving specifically the sequence Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. Due to the high specificity of the recognition site, it became a great tool of biotechnological interest. It is usually used to remove affinity tags in vitro, of recombinant proteins. In this work, the molecular cloning strategy resulted in the construction of the pDMK06, capable of programming the regulated expression of a heterologous gene ETK-Trx in *E. coli*. Through the cleavage process with restriction enzymes NdeI and BamHI, it was possible to obtain the coding sequence of the fusion protein between enterokinase and thioredoxin (ETK-Trx) of approximately 1259 bp from pENTK plasmid. Then, this sequence was subcloned at NdeI and BamHI sites of the expression vector pDM02, originating the recombinant plasmid pDMK06. This vector contains the TH2 promoter, which is efficiently regulated by Lac operator/repressor. *E. coli* JM110 cells transformed with the recombinant plasmid showed smaller growth in a solid medium when the expression of the heterologous protein was induced by IPTG in comparison with the control; however, this effect was not detected in the liquid medium. Furthermore, the *E. coli* cells morphology was analyzed through optical microscopy containing the recombinant plasmid pDMK06, when it was observed, all through the growth time, modifications on cell morphology, characterized by the formation of filaments in those induced with IPTG, in comparison with the control. For expression analysis of the recombinant protein ETK-Trx, polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE was performed with the samples that grew with IPTG induction for eight hours. The results showed that the protein ETK-Trx is about 47 kDa with a high level of expression at the insoluble fraction, probably as an inclusion corpuscle. The high levels of expression of ETK-Trx protein occurred in a perfectly regulated way, showing the functionality of the pDM02 plasmid expression/regulation system.

Keywords: Enterokinase, TH2 promoter, heterologous expression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Representação esquemática da atuação de endoproteases e exoproteases (FORTES, 2013). .....20
- Figura 2: Imagem de cristalografia de Raio-X da cadeia leve catalítica da enteroquinase bovina. Em azul mostra os dois barris de folhas  $\beta$  ( $\beta 1$  a  $\beta 6$  e  $\beta 7$  a  $\beta 12$ ); em vermelho estão as três estruturas  $\alpha$  hélice ( $\alpha 1$  a  $\alpha 3$ ); em verde mostra o sítio ativo ou tríade catalítica; e em amarelo as ligações de dissulfeto. Fonte: (WOLFGANG, 2012). .....22
- Figura 3: Ponto de clivagem da enteroquinase. A sequência de quatro ácido aspártico e uma lisina quando seguida de uma prolina não realiza sua função.....23
- Figura 4: Atividade da enteroquinase .....23
- Figura 5: Mapa físico do pBR322. Regiões importantes destacadas são os genes de resistência para ampicilina (Apr) e tetraciclina e (Tcr), a origem de replicação (ORI) e as posições de sítio de algumas enzimas que digerem o plasmídeo em apenas uma posição.....29
- Figura 6: Esquema da holoenzima RNA polimerase no sítio inicial de transcrição. A fita verde sendo reconhecida pela RNA polimerase representa o DNA. As cinco subunidades da holoenzima e os quatro domínios proteicos da subunidade  $\sigma$ . As sequências promotoras -10 (TATAAT) e -35 (TTGACA) são reconhecidos respectivamente pelos domínios 2 e 4 da subunidade  $\sigma$  (Fonte: BROWNING & BUSBY, 2004). .....32
- Figura 7: Desenho esquemático de um mRNA policistrônico. A figura mostra a região codificadora do gene repressor (i), a região promotora (p), o operador (o) e um operon constituído pelos genes Z, Y e A (MAYER, 2016). .....33
- Figura 8: Sequência nucleotídica e a organização controladora do óperon *lac*. As barras coloridas acima e abaixo do DNA mostram as regiões cobertas pela RNA-polimerase e por proteínas reguladoras (FONTE: WATSON, 2015). .....34

Figura 9: O repressor <i>LacI</i> , codificado pelo gene <i>lacI</i> , que se liga ao operador impedindo que ocorra a transcrição pela RNA polimerase. Na ausência de lactose, o repressor <i>LacI</i> está ligado ao operador. Na presença de lactose, o repressor <i>LacI</i> desliga-se do operador e assim ocorre a transcrição (Fonte: MARQUES, 2012). ....	36
Figura 10: Atividade de CAP/cAMP. A proteína CAP ligada com a cAMP reconhecendo uma sequência específica na região regulatória do gene e consequentemente estimulando a ligação da RNA polimerase ao promotor, ocasionado a transcrição (Fonte: MARQUES, 2012). .....	37
Figura 11: Macadores de peso molecular. ....	41
Figura 12: Mapa físico do plamídeo portador do gene codificador da enteroquinase-tiorredoxina (ETK-Trx); (AmpR) gene de resistência a ampicilina; (ORI pUC18) origem de replicação multicópia do plasmídeo pUC18; região codificadora da proteína de fusão enteroquinase-tiorredoxina. ....	42
Figura 13: Mapa físico do plasmídeo pDM02-GFP. Possui o promotor TH2; (RBS) sequência de reconhecimento do ribossomo; ( <i>rrnB</i> ) terminador de transcrição; região codificadora do gene da GFP; (KanR) gene de resistência a canamicina; (p15A ori) origem de replicação de baixo número de cópias. ....	43
Figura 14: Esquema representativo da subclonagem da região codificante de ETK-Trx no vetor pDM02. ....	45
Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos da digestão pelas enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> . (A) 1. Marcador Molecular. 2. pDM02-GFP intacto. 3. pDM02-GFP linearizado com <i>NdeI</i> 4. pDM02-GFP linearizado com <i>BamHI</i> . 5. pDM02 digerido com <i>NdeI/BamHI</i> . (B) 1. Marcador Molecular. 2. pENTK intacto. 3. pENTK linearizado com <i>NdeI</i> . 4. pENTK linearizado com <i>BamHI</i> . 5. pENTK digerido com <i>NdeI/BamHI</i> . ....	52
Figura 16: Perfil eletroforético do produto da digestão dupla do plasmídeo extraídos do clones transformantes (6) digeridos com <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> liberando a sequência codificadora ETK-Trx. ....	53
Figura 17: Mapa físico do plasmídeo recombinante pDMK06. (KanR) gene de resistencia a canamicina; (TH2) promotor regulado derivado do operon <i>Lac</i> ;	

(RBS)sequência de reconhecimento do ribossomo; (rrnB) terminador de transcrição; região codificadora da proteína de fusão enteroquinase-tiorredoxina (ETK-Trx) .....	54
Figura 18: Fotos de clones recombinantes de <i>Escherichia coli</i> cultivadas na presença e ausência do indutor (IPTG) ou glicose. ....	55
Figura 19: Curvas de crescimento bacteriano em função do tempo do clone recombinante pDMK06 em 37°C, em diferentes condições de cultivo. ....	56
Figura 20: Perfil eletroforético das proteínas do clone recombinante de <i>E.coli</i> /pDMK06 em diferentes condições de crescimento/indução em meio LB com canamicina (50µL/mL). MM- marcador de peso molecular; C.G- controle com glicose; C.A- controle com canamicina apenas; T(0)- induzido com IPTG em t=0; e OD_0,6- induzido com IPTG em OD600nm 0,6.....	57
Figura 21: Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelo clone recombinante <i>E. coli</i> /JM110-pDMK06 nas frações solúvel e insolúvel. C.A- controle com canamicina; OD_0,6- cultura induzida por IPTG em OD600nm = 0,6. ....	58
Figura 22: Observação das morfologias das células de <i>E.coli</i> JM110 cultivadas na presença de canamicina (50µL/mL) com e sem indutor (IPTG) por microscopia óptica (coloração GRAM). (A) controle com 2 horas de crescimento; (B) 2 horas indução com IPTG; (C) controle com 4 horas de crescimento; (D) 4 horas de indução com IPTG; (E) controle com 10 horas de crescimento; (F) 10 horas de indução com IPTG.....	60
Figura 23: Mostra a sequência do promotor sintético TH2. Da esquerda para a direita: em preto temos a sequência “up element”, em azul amarelo o operador <i>Lac</i> ; em amarelo a região -35 (sobreposta ao operador); em rosa a região -10 ou TATA box, em vermelho o elemento -10 estendido; em verde o ponto de início de transcrição e em cinza o primeiro nucleotídeo do codón de iniciação (protegido por patente). ....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências nucleotídicas de promotores utilizados em vetores de expressão.....	31
Tabela 2: Linhagens e genótipos de <i>Escherichia coli</i> utilizados no presente estudo.	39
Tabela 3: Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições. ....	40
Tabela 4: Componentes do tampão de corrida para análise em gel de SDS-PAGE.	81
Tabela 5: Composição do corante de Comassie blue de detecção de proteínas. ...	81
Tabela 6: Composição da solução descorante. ....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS

ETK-Trx – Sequência codificadora de proteína de fusão enteroquinase-tiorredoxina

TDR – Tecnologia do DNA recombinante

Asp – Ácidos Aspárticos

His – Histidina

Lys – Lisina

IPGT- isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopirosídeo

OD<sub>600nm</sub>- Densidade optica de 600 nanometros

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	19
	2.1 Enzimas proteolíticas .....	19
	2.1.1 Exopeptidases e endopeptidases .....	19
	2.1.2 Enteroquinase / enteropeptidase .....	20
	2.2 Proteínas de fusão .....	24
	2.3 Sistema de expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> .....	25
	2.4 Hospedeiras e Vetores .....	27
	2.5 Promotores e regiões de reconhecimento da RNA polimerase.....	30
	2.6 Regulação da expressão gênica de procariotos com base no operon <i>Lac</i> .....	32
3	OBJETIVOS.....	38
	3.1 Objetivo geral.....	38
	3.2 Objetivo específico.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
	4.1 Materiais.....	39
	4.1.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.....	39
	4.1.2 Reagentes, meio de cultura e kits .....	39
	4.1.3 Vetores utilizados .....	41
	4.2 Métodos .....	44
	4.2.1 Clonagem molecular do gene da enteroquinase.....	44
5	RESULTADOS .....	52
	5.1 Clonagem molecular do gene da enteroquinase.....	52
	5.2 Transformação genética e confirmação da clonagem.....	53
	5.3 Expressão heteróloga do gene da ETK-Trx em <i>Escherichia coli</i> (JM110)...	55
	5.3.1 A análise do crescimento de células de <i>Escherichia coli</i> (JM110) recombinantes em meio de cultivo sólido. ....	55
	5.3.2 Análise do crescimento da <i>Escherichia coli</i> recombinante em meio líquido.....	56
	5.3.3 Análise da expressão de ETK-Trx em <i>Escherichia coli</i> JM110/pDMK06 ..	57
	5.3.4 Análise da morfologia das células recombinantes por microscopia ótica.....	59
6	DISCUSSÃO.....	61

7	CONCLUSÕES.....	65
8	PERSPECTIVAS.....	66
9	REFERÊNCIAS .....	67
	ANEXO.....	81

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são moléculas especializadas na catálise de reações biológicas (biocatalisadores), ou seja, elas facilitam e aceleram a maior parte das reações bioquímicas que ocorrem no interior das células dos animais, dos vegetais e dos microrganismos (BARRET *et al.*, 2003; BEZERRA *et al.*, 2001; YIN, CHOU e JIANG, 2013).

As proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) são hidrolases que clivam moléculas de proteínas e peptídeos, são responsáveis por importantes funções fisiológicas intra e extra celulares, além de serem utilizados em diferentes processos biotecnológicos (MUSSATTO *et al.*, 2007).

No grupo das proteases encontra-se a enteroquinase que atua no processo da digestão metabolizando o tripsinogênio em tripsina e quimiotripsinogênio em quimotripsina, que em suas formas ativas clivam proteínas em regiões diferentes e específicas (BEZERRA *et al.*, 2001). Devido à importância biotecnológica deste grupo de enzimas, diversos estudos estão sendo realizados para sua produção em escala industrial (NIU *et al.*, 2015).

A utilização das enzimas em processos industriais, inclusive sua produção via Tecnologia DNA Recombinante (TDR), apresenta crescimento acelerado em diversas áreas, (alimentícia, farmacêutica, têxtil, de papel e celulose entre outras) e em métodos analíticos (químico e de diagnóstico) (BEZERRA *et al.*, 2001; MUSSATTO *et al.*, 2007 e KHAN *et al.*, 2016).

A TDR é uma potente alternativa que permite o melhoramento genético de espécies animais e vegetais com grande potencial biotecnológico. Na TDR realiza-se a clonagem molecular de genes, a qual consiste no isolamento de sequências de DNA específicas, recombinação *in vitro* e a propagação dessas moléculas (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2005; KHAN *et al.*, 2016).

A clonagem molecular compreende pelos menos dois estágios importantes. Primeiro, o fragmento do DNA contendo o gene de interesse (inserto) é ligado à

outra molécula de DNA chamado de vetor para formar o DNA recombinante. O segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida em uma célula hospedeira compatível, por um processo chamado transformação genética. A célula que adquiriu a molécula do DNA exógeno é chamada de recombinante ou transgênico (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2005).

A clonagem molecular de proteínas de fusão como estratégia para a produção de proteínas recombinantes é bem conhecida na biotecnologia industrial (CORTEZ, 2014), pois auxilia na solubilidade e na purificação de proteínas de interesse (GASPARIAN *et al.*, 2011).

Algumas proteases estão comercialmente disponíveis para clivar caudas de proteínas de fusão, dentre elas estão as endoproteases: enteroquinase, trombina e a fator Xa, que são as mais utilizadas para esse propósito (PUHL, 2008). Devido a sua alta especificidade em reconhecer a sequência (DDDDK-X) a enteroquinase vem sendo utilizada para a remoção de etiquetas de fusão clivando no lado carboxílico da lisina na proteína recombinante (CHOI *et al.*, 2001; ALBRECHT *et al.*, 2015). O fator limitante na purificação por cromatografia por afinidade é normalmente a clivagem proteolítica eficiente para remoção da cauda de afinidade da proteína recombinante a ser purificada (GASPARIAN *et al.*, 2011).

Embora a produção da enteroquinase já ocorra em escala comercial, o custo dessa enzima para a remoção de *tag* sem escala industrial chega a ser grande parte do custo total da produção industrial. Como a enteroquinase é uma protease e, portanto, sua expressão intracelular em altos níveis em *Escherichia coli* se apresenta tóxica para a célula, para contornar essa dificuldade nesse trabalho houve a necessidade de utilizar um vetor de expressão intracelular com regulação bem estridente, o pDM02, que foi idealizado e construído pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de DNA/UFAM, sob a coordenação e orientação do Prof.Dr. Spartaco Astolfi Filho.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Enzimas proteolíticas**

As enzimas proteolíticas atuam hidrolisando ligações peptídicas e exercem papel-chave no catabolismo de proteínas, coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, formação de tecidos, morfogênese, inflamações e crescimento de tumores, na ativação de zimogênios e liberação de hormônios (YIN, CHOU e JIANG, 2013).

As proteases dividem-se em dois grupos: exopeptidases (atuam próximo às extremidades das cadeias polipeptídicas) e as endopeptidase (atuam nas regiões internas das cadeias polipeptídicas) (BEZERRA *et al.*, 2001; BARRETT, 1994). De acordo com o seu sítio ativo, são divididas em seis classes: serino protease, cisteíno protease, aspártico protease, metalo protease, treonina protease e glutâmico protease (GOMES, 2004).

#### **2.1.1 Exopeptidases e endopeptidases**

As exopeptidases tem função de clivar ligações peptídicas nas extremidades das cadeias proteicas. Dependendo da sua atuação na região N- ou C-terminal da cadeia protéica, as exopeptidases podem ser classificadas em: (1) aminopeptidases, que atua nas extremidades na região N-terminal e (2) carboxipeptidases, com atuação nas extremidades C-terminal, liberando resíduo de aminoácido (FORTES, 2013).

As endopeptidases clivam internamente ligações peptídicas e seu mecanismo de ação baseia-se nas propriedades isoelétricas, na massa molecular e na especificidade em relação ao substrato, levando em consideração os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise proteica (figura 1) (TERRA, 1994; FORTES, 2013).

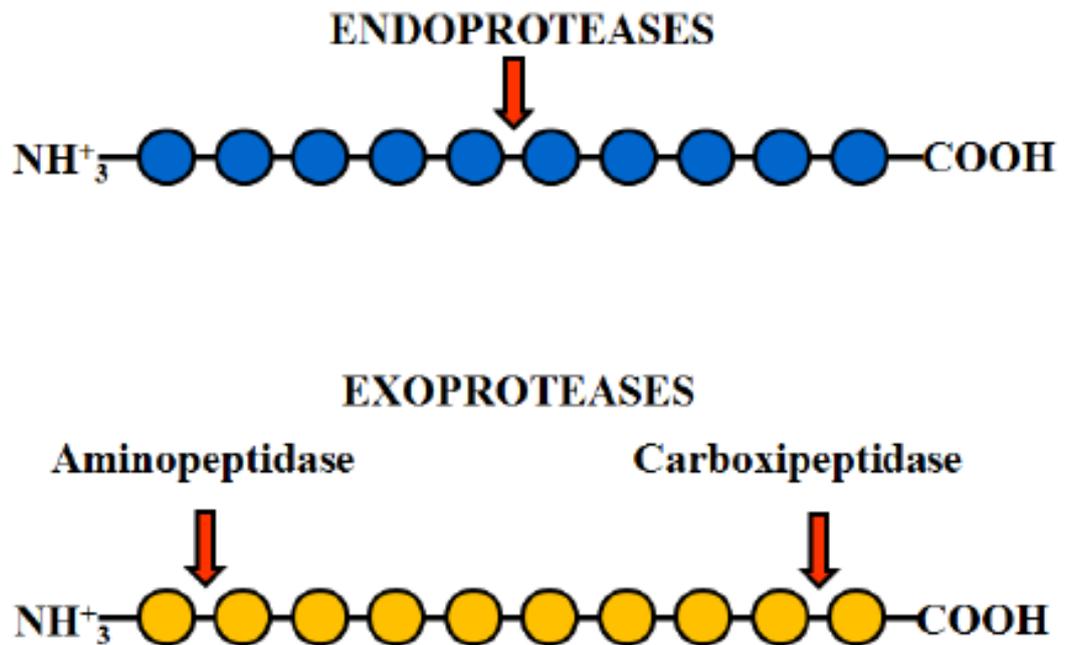


Figura 1: Representação esquemática da atuação de endoproteases e exoproteases (FORTES, 2013).

### 2.1.2 Enteroquinase / enteropeptidase

A enzima enteroquinase (enteropeptidase) foi descoberta por Pavlov em 1910 que a reconheceu como uma enzima importante para o processo de digestão e a nomeou de enteroquinase. Em 1930 o bioquímico Kunitz purificou parte da enzima a partir do suco intestinal e identificou a enteroquinase como o ativador fisiológico de tripsinogênio (LIGHT e JANSK, 1989).

Segundo a classificação da IUBMB - (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), desde 1972, a enteroquinase pertence ao catálogo de enzimas com a nomenclatura EC3.4.21.9. É uma serino protease transmembrana do tipo II, localizada na borda da escova da mucosa duodenal e jejunal, sendo sintetizada como um zimogênio (pro-enteropeptidase), que requer ativação por outra protease que pode ser uma duodenase ou tripsina (LIGHT e JANSK, 1989; FORTES, 2013).

As serino proteases são enzimas amplamente estudadas, sendo encontradas em eucariotos, vírus e bactérias participando no metabolismo desses organismos. Elas abrangem um grupo de proteínas que apresentam um alto grau de homologia e similaridade estrutural. A característica mais comum desse grupo de enzimas, é a tríade catalítica composta pelos resíduos de serina, histidina e ácido aspártico (OLIVEIRA, 2005; FORTES, 2013).

As serino proteases estão envolvidas em diversas atividades fisiológicas tais como: na digestão (representadas pela tripsina, quimotripsina e elastase), na coagulação sanguínea, no sistema imune de insetos e plantas e no desenvolvimento de peptídeos biologicamente ativos (FORTES, 2013 e GOMES, 2014).

A enteroquinase é constituída por duas subunidades ligadas por uma ponte dissulfeto, sendo que a cadeia pesada ancora-se nas membranas da borda das escovas do intestino, já a cadeia leve representado na (figura 2) é a subunidade catalítica que apresenta o mesmo mecanismo de ação da tripsina e quimotripsina e apresenta 246 aminoácidos. (LIGHT e JANSKA, 1989).

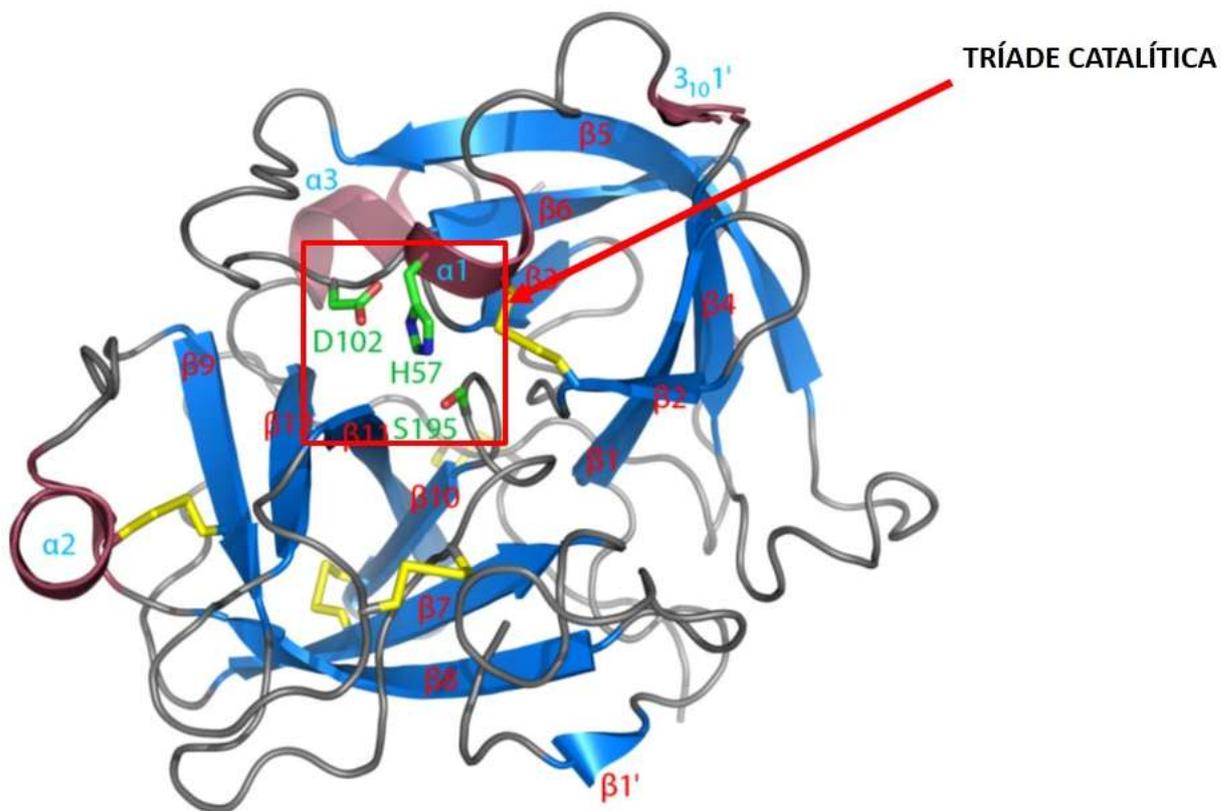


Figura 2: Imagem de cristalografia de Raio-X da cadeia leve catalítica da enteroquinase bovina. Em azul mostra os dois barris de folhas  $\beta$  ( $\beta 1$  a  $\beta 6$  e  $\beta 7$  a  $\beta 12$ ); em vermelho estão as três estruturas  $\alpha$  hélice ( $\alpha 1$  a  $\alpha 3$ ); em verde mostra o sítio ativo ou tríade catalítica; e em amarelo as ligações de dissulfeto. Fonte: (WOLFGANG, 2012).

Quanto ao mecanismo de ação enzimática da enteroquinase, no processo digestivo é responsável pela ativação do tripsinogênio à tripsina por clivagem do peptídeo de ativação específica, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, não clivando quando a lisina vier seguida de uma prolina, sendo altamente conservada em vertebrados (figura 3) (GASPARIAN *et al.*, 2011).

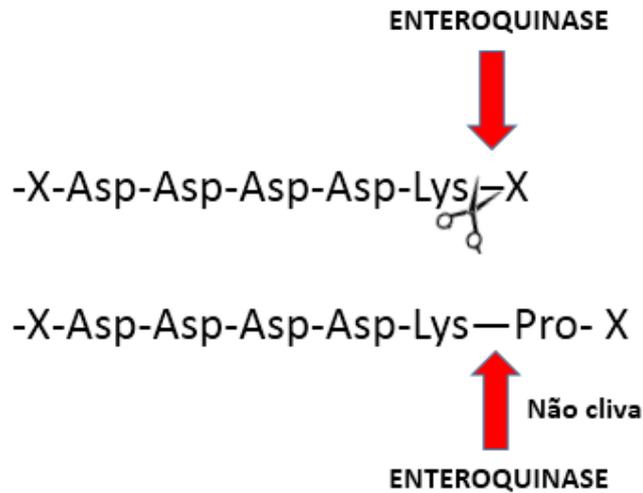


Figura 3: Ponto de clivagem da enteroquinase. A sequência de quatro ácido aspártico e uma lisina quando seguida de uma prolina não realiza sua função.

A tripsina, por sua vez, ativa outros zimogênios tais como quimiotripsinogênio, proelastase, procarboxipeptidase e prolipase no lúmen do intestino (figura 4) (ZAMOLODCHIKOVA *et al.*, 2000).

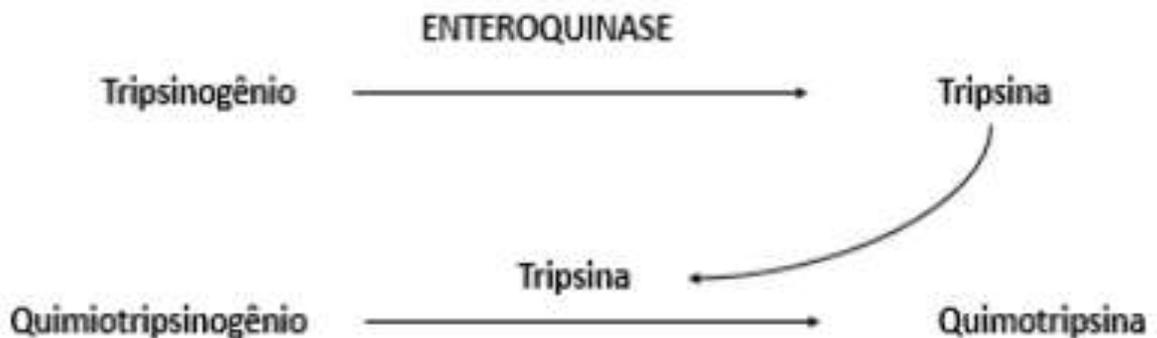


Figura 4: Atividade da enteroquinase

Estudos recentes utilizando a enteroquinase bovina recombinante purificada, demonstram que essa enzima é específica para clivar na sequência (Asp)<sub>4</sub>-Lys na

porção C- terminal da lisina. Sendo útil para remover etiquetas de fusão (LaVALLIE e McCOY, 1995).

## **2.2 Proteínas de fusão**

Proteínas de fusão são utilizadas para a produção de proteínas de interesse biotecnológico, como por exemplo, purificação, cristalização, imunodeteção, terapia proteica, desenvolvimento de novas vacinas e para estudos funcionais (TERPE, 2003; CORTEZ, 2014).

A produção de proteínas heterólogas complexas, que possuem várias ligações de dissulfeto, quando expressas em *E. coli*, costumam acumular-se em corpos de inclusão na forma insolúvel e inativa (YUAN e HUA, 2002). Uma das desvantagens da formação de corpos de inclusão para a indústria biotecnológica, é o alto custo para o enovelamento da proteína biologicamente ativa (CORTEZ, 2014).

Uma estratégia para evitar a formação de corpos de inclusão, é fusionar o gene de interesse a um segundo gene já conhecido, o que pode favorecer a solubilidade da proteína de interesse em sistemas de *E.coli*(HAMMARSTROM *et al.*, 2002).

O processo de fusão de proteínas e o seu uso na biotecnologia industrial, utiliza diferentes tipos de caudas (tags), ou marcas de afinidade que facilitam a purificação da proteína de interesse (CORTEZ, 2014).

As caudas são adicionadas na porção amino ou carboxi terminal durante o processo de subclonagem em plasmídeos e expressas como parte da proteína de interesse (PUHL, 2008). Após o processo de purificação, são removidas, pois aumentam o tamanho da proteína de interesse dificultando sua posterior análise, e também quando se objetiva produzir proteínas idênticas as naturais (CANDEL *et al.*, 2007).

O processo de remoção das caudas pode ocorrer por processos químicos e enzimáticos, sendo que os métodos químicos são menos utilizados devido à baixa especificidade, o que pode danificar a estrutura da proteína (CARTER, 1990).

Quanto ao uso de enzimas para a remoção de caudas adicionais encontram-se as proteases disponíveis no mercado, dentre elas estão as endoproteases: enteroquinase, trombina e o fator Xa utilizadas para esse propósito (PUHL, 2008).

A trombina e o fator Xa quebram ligações peptídicas em resíduos de arginina, no qual a sequência de clivagem da trombina é LVPR/GS ou LVPR/G, enquanto que o fator Xa cliva na região IEGR/A (JENNY, MANN, LUNDBLAD, 2003). Por outro lado, a enteroquinase é altamente específica e reconhece um polipeptídeo de aminoácidos (DDDDK) e a clivagem ocorre na porção carboxi terminal da lisina (CHOI *et al.*, 2001), isso permite liberar a sequência proteica fusionada a jusante com o aminoácido amino terminal que se deseja, exceto quando a sequência vier seguido de uma prolina.

A proteína de fusão tiorredoxina é extremamente útil para evitar a formação de corpos de inclusão, em particular para a produção de pequenas moléculas de citocinas em células de mamíferos (GASPARIAN *et al.*, 2003). Em sistemas bacterianos a tiorredoxina é uma proteína compacta e altamente solúvel e termicamente estável que possui características dobráveis em sistema de *Escherichia coli* (LaVALLIE *et al.*, 2000). Estas propriedades talvez permitam que a molécula, quando fundida com a proteína de interesse, desempenhe uma função de uma chaperona molecular. A tiorredoxina pode assim atuar para evitar agregados e precipitação da proteína a ela fundida proporcionando o dobramento correto da proteína de interesse (YUAN e HUA, 2002)

### **2.3 Sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli***

A disponibilidade de novos sistemas comerciais para expressão de proteínas recombinantes, combinado com o avanço de técnicas de purificação proteica, torna a produção de proteínas recombinantes procedimentos de uso corrente nas ciências biomédicas e biológicas bem como no setor biotecnológico industrial (FRANCIS e PAGE, 2010).

Os métodos utilizados que possibilitam a produção de proteínas heterólogas em grande quantidade, ajustam o sistema de expressão de acordo com a proteína a

ser produzida (MIYAMOTO, 2013). Embora peptídeos possam ser sintetizados quimicamente, as estratégias do DNA recombinante contornam vários problemas encontrados quando estes são produzidos por síntese química, por exemplo, a limitação no número de resíduos do peptídeo alvo (CASTILHO, 2004).

A expressão heteróloga em diferentes células hospedeiras é empregada na intenção de potencializar a produção de produtos biotecnológicos (GOPAL e KUMAR, 2013). Visando isto, diversos sistemas de expressão de gene heterólogos foram desenvolvidos para *Escherichia coli* (LADERMAN *et al.*, 1993; CASTILHO, 2004; TERPE, 2006; VAZ, 2008), *Bacillus sp.* (YANG *et al.*, 2001) e sistemas mais eficientes para leveduras (ADRIO e DEMAIN, 2010).

Outra característica importante para expressão em altos níveis de proteínas recombinantes, é a hospedeira ser deficiente em proteases e apresentar baixo potencial de proliferação no ambiente (KHAN *et al.*, 2016).

Para viabilizar a produção de proteínas recombinantes alguns critérios são essenciais, tais como: a facilidade na manipulação do hospedeiro; a estabilidade e solubilidade da proteína; velocidade e rendimento da purificação (WILLIAMSON *et al.*, 2000).

Apesar de todo o conhecimento adquirido sobre a *Escherichia coli*, isso não garante que o sistema de expressão seja eficiente para todas as proteínas recombinantes que serão produzidas por esse sistema.

Em relação as limitações no sistema de expressão utilizando a *Escherichia coli* como hospedeira, foram observados que determinados grupos de proteínas são produzidas na forma corpos de inclusão, são insolúveis e biologicamente inativas. Para torná-las ativa, é necessário uma série de procedimentos, o que gera aumento de custo e diminuição da produtividade. Outra dificuldade é a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais e por último, a ausência de um sistema de secreção que proporcione uma eficaz liberação da proteína recombinante para o meio de cultivo (TOMAZETTO *et al.*, 2007).

Gopal e Kumar (2013) realizaram um trabalho onde mostram cinco estratégias que podem ser utilizadas para aumentar a solubilidade e a expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, sendo a mudança dos vetores de expressão, mudança da hospedeira, alteração nos parâmetros de cultivo da hospedeira, co-expressão de outros genes, como os de chaperonas e alterações nos códons preferências de acordo com a hospedeira utilizada para a sequência genica, que pode aumentar a expressão e o dobramento correto da proteína de interesse.

#### **2.4 Hospedeiras e Vetores**

Em meados da década de setenta, a *Escherichia coli* não apresentava grande valor para a indústria, mas, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, essa perspectiva mudou, porque grande parte dessa metodologia foi desenvolvida utilizando este microrganismo (LIMA, 2004).

A *Escherichia coli* tornou-se o microrganismo melhor estudado e utilizado na produção de proteínas recombinantes (TIAN *et al.*, 2011), por possuir uma genética bem conhecida e de fácil manipulação (SORENSEN e MORTENSEN, 2005). Foi a primeira hospedeira utilizada para produzir uma molécula de DNA recombinante. Como exemplo, foi a produção da insulina humana realizada pela indústria biofarmacêutica Eli Lilly em 1982, a partir daí passou a ser a primeira escolha para produção de proteínas de interesse biotecnológicos. (GOPAL e KUMAR, 2013)

Quanto a massa celular total, a bactéria *Escherichia coli* é capaz de produzir cerca de 40% de proteínas heterólogas. Apresenta rápido crescimento celular o que proporciona um elevado índice de produção de proteínas, característica importante para a biotecnologia industrial, devido a produção da proteína de interesse a baixo custo (TRIPATHI *et al.*, 2009).

A escolha da célula hospedeira é fundamental para o funcionamento do sistema de expressão. Algumas características são necessárias para uma boa receptora de DNA exógeno, a qual pode ou não proporcionar alterações na sequência de DNA. Dentre as características que a fazem uma boa hospedeira está:

a presença de uma marca de seleção que facilite a seleção das células contendo a molécula recombinante, por exemplo, informação genética que confira resistência a um antibiótico. A célula precisa ser de fáceis condições de cultivo, tais como temperatura, pH, características nutricionais e meios de cultura bem conhecidos e acessível (PACHECO *et al.*, 2012).

Os vetores são veículos de clonagem utilizados pela engenharia genética para introduzir DNA exógeno para dentro de um hospedeiro (WAEGEMAN & SOETAERT, 2011; OVERTO, 2014). Com exceção dos vetores que se integram no genoma da bactéria, a grande maioria são moléculas com replicação independente e que apresentam marca de seleção, sítios únicos para enzimas de restrição que facilitam a sua ligação ao DNA exógeno (ASTOLFI-FILHO, 1985).

Por sua fácil manipulação e por possuir uma grande variabilidade de aplicações, os plasmídeos são vetores mais simples e de ampla utilização (BATAUS, 1991). Eles consistem de DNA dupla fita circular, extracromossomal não essenciais para a sobrevivência da bactéria, geralmente são multicópias, podendo ser encontrados em *Archaea*, *Bactéria*, quanto em *Eukarya* (WOESE *et al.*, 1990).

O plasmídeo pBR322 por Bolívar e Rodrigues construído no final da década de 70 é o precursor da maioria dos plasmídeos que hoje são utilizados (MOREIRA, 2009). O pBR322 possui genes de resistência aos antibióticos ampicilina (Ap) e tetraciclina (Tc), com sítios únicos de restrição para uso em experimentos de clonagem, origem de replicação (Ori) e um tamanho pequeno (4.363pb), razão pela qual é considerado um bom vetor de clonagem, (figura 1) (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2005).

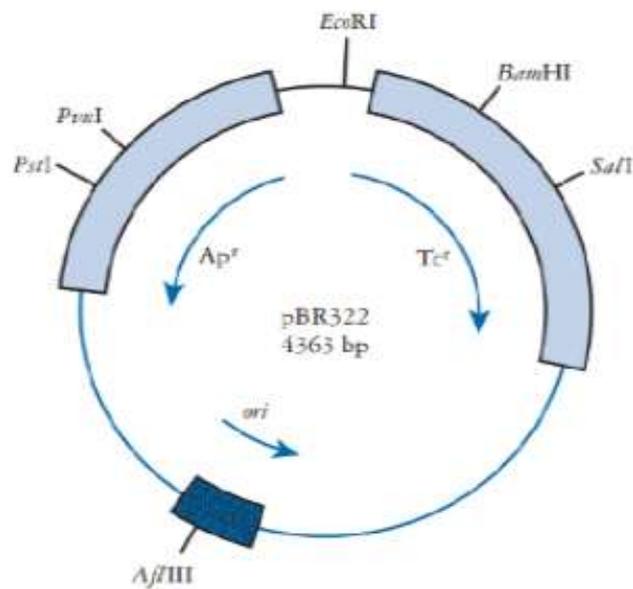


Figura 5: Mapa físico do pBR322. Regiões importantes destacadas são os genes de resistência para ampicilina (Apr<sup>r</sup>) e tetraciclina e (Tcr<sup>r</sup>), a origem de replicação (ORI) e as posições de sítio de algumas enzimas que digerem o plasmídeo em apenas uma posição.

Os vetores podem ser utilizados para inúmeras finalidades, como por exemplo, selecionar clones recombinantes, selecionar origens de replicação, para caçar promotores, para expressão e/ou para expressão e secreção da proteína de interesse (YI-YWAN *et al.*, 2011).

Para ser um bom vetor de clonagem é necessário que possua algumas propriedades como: habilidade de se replicar na célula hospedeira pela origem de replicação (ORI) a qual controla a taxa de replicação e o número de cópias da molécula na célula (BERLEC & STRUKELJ, 2013), deve ser capaz de acomodar insertos de vários tamanhos sem danificar as funções de replicação, deve ser de fácil inserção na célula hospedeira, possuir um ou mais genes marcadores de seleção para facilitar a captura de células que contém o plasmídeo recombinante (BERLEC & STRUKELJ, 2013), conter um sítio múltiplo de clonagem (MCS) fornecendo várias opções para a clonagem (BATISTA, 2008).

Outras importantes sequências estão presentes nos vetores de expressão como, a região do promotor, sequência que dirige a síntese de mRNA do gene que se quer expressar (WÖHLKE, 2012), região operadora local onde o repressor se liga e quando na presença de um indutor o repressor não se liga no operador e os genes estruturais são expressos (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2005), a região Shine-Dalgarno sendo conhecida também com (RBS) local onde o ribossomo se liga ao mRNA bacteriano localizado *upstream* ao códon de início de transcrição AUG e o terminador de transcrição que contém regiões palindrômicas que formam grampos variando em extensão de 7 a 20 pb. O grampo contém uma região rica em G+C e é seguido de uma carreira de U e a formação do grampo no RNA leva a RNA polimerase a diminuir sua velocidade, ou até parar a síntese de RNA. Esta pausa dá uma oportunidade para ocorrer a terminação de transcrição (terminador RO independente) (BROWNING e BUSBY, 2016).

## **2.5 Promotores e regiões de reconhecimento da RNA polimerase**

Os promotores são sequências de DNA que controlam a transcrição de todos os genes. É nessa região que ocorre a ligação da holoenzima RNA polimerase em sequências específicas conhecidas como “consensuais” localizadas antes do início da transcrição, geralmente localizadas nas regiões -10 e -35 conhecidas também como TATA box -10 (TATAAT) e a sequência -35 (TTGACA), (NAKAJIMA, 2015; BEA, *et al.*, 2015). A tabela 1 apresenta as sequências nucleotídicas de promotores utilizados em vetores de expressão.

Tabela 1: Sequências nucleotídicas de promotores utilizados em vetores de expressão.

<b>Promotor</b>	<b>Região -35</b>	<b>Região Espaçadora</b>	<b>Região-10</b>
<b><i>Plac</i></b>	TTtACA	18pb	TATgtT
<b><i>PlacUV5</i></b>	TTtACA	18pb	TATAAT
<b><i>P<sub>trp</sub></i></b>	TTGACA	17pb	TtaAct
<b><i>P<sub>tac</sub></i></b>	TTGACA	16pb	TATAAT
<b><math>\lambda</math>P<sub>L</sub></b>	TTGACA	17pb	gATAcT
<b><math>\lambda</math>P<sub>R</sub></b>	TTGAcT	17pb	gATAAT
<b>CONSENSO</b>	<b>TTGACA</b>	17pb	<b>TATAAT</b>

Os nucleotídeos presentes na sequência consenso são demonstrados em letras em negrito. Na sequência de promotores, os nucleotídeos idênticos à sequência consenso são mostrados em letras maiúsculas e os que não são idênticos estão mostrados em letra minúscula (Fonte: SCHUMANN & FERREIRA, 2004).

A iniciação da transcrição requer uma interação da RNA polimerase com a sequência promotora do DNA que proporciona a formação do complexo aberto (BROWNIG e BUSBY, 2004), essa interação se dá pelo posicionamento da RNA polimerase com o promotor na posição +1 e +2, local que ocorre o desenrolamento da dupla hélice de DNA formando o complexo aberto prosseguindo com a transcrição de fuga, alongamento e as etapas de terminação (BROWNIG e BUSBY, 2016).

Quatro elementos de ligação com sequências conhecidas de DNA foram identificadas (NAKAJIMA, 2015). As principais são os hexâmeros -10 e -35, localizados 10 e 35 pb a montante do local de início da transcrição (BROWNIG e BUSBY, 2004). Essas sequências são reconhecidas pelos domínios dos fatores sigma, onde o elemento -10 é reconhecido pelo domínio 2 da subunidade  $\sigma$  e o

elemento -35 é reconhecido pelo domínio 4 da subunidade  $\sigma$  (BROWNIG e BUSBY, 2004). Essas regiões desempenham um papel importante na seletividade da transcrição, a região -10 desempenha o papel para a formação do complexo aberto, enquanto a região -35 é alvo de ligação para ativadores de transcrição (RUFF *et al.*, 2015 e MOREIRA, 2016).

Existem dois outros elementos importantes, que são os elementos-10 estendido e o elemento UP (BAE *et al.*, 2015 e RUFF *et al.*, 2015). O elemento-10 estendido é um motivo de 3 a 4 pb localizados *upstream* do hexâmero -10 que é reconhecido pelo domínio 3 da subunidade sigma posicionando a holoenzima RNA polimerase (BROWNIG e BUSBY, 2016). Por outro lado, o elemento UP corresponde a uma sequência (ricas em AT) de aproximadamente de 20 pb localizado *upstream* do hexâmero -35, sendo reconhecido pelo domínio C-terminal da subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase (WÖHLKER, 2012). Dessa maneira o conjunto -10, -35, -10 estendido e elemento UP atuam na ligação da RNA polimerase ao promotor conforme ilustrada na figura 1 (BROWNIG e BUSBY, 2016).

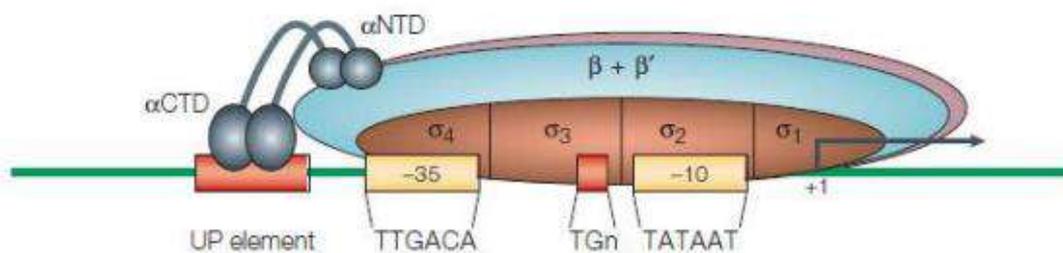


Figura 6: Esquema da holoenzima RNA polimerase no sítio inicial de transcrição. A fita verde sendo reconhecida pela RNA polimerase representa o DNA. As cinco subunidades da holoenzima e os quatro domínios proteicos da subunidade  $\sigma$ . As sequências promotoras -10 (TATAAT) e -35 (TTGACA) são reconhecidos respectivamente pelos domínios 2 e 4 da subunidade  $\sigma$  (Fonte: BROWNING & BUSBY, 2004).

## 2.6 Regulação da expressão gênica de procariontes com base no operon *Lac*

Seres procariontes frequentemente são submetidos a ambientes hostis, devido variações dos nutrientes, toxina, acidez, temperatura, pH. Por isso durante a evolução processos adaptativos em níveis intracelular e extracelular, ao mesmo tempo em que adaptações estruturais, fisiológicas e no comportamento celular foram

desenvolvidas, inclusive ajustes dos níveis de proteínas de acordo com a necessidade celular (ASSCHE *et al.*, 2015; BICH *et al.*, 2015).

O princípio que norteia a regulação gênica é o princípio da economia de energia (MARQUES, 2012), por isso apenas uma parte dos genes é transcritos em um dado momento, dessa forma a bactéria economiza na síntese proteica, produzindo apenas o que necessita no momento (BOSDRIESZ *et al.*, 2015).

A transcrição é o ponto chave na regulação da expressão gênica em procariotos, o qual possui um mecanismo relativamente simples na regulação de seus genes (SEMSEY *et al.*, 2013). Alguns genes possuem funções correspondentes e estão sob o controle de um único promotor, geralmente sendo transcritos juntos o conjunto é chamado de operon (HIJUN *et al.*, 2009).

Um operon é responsável pela expressão dos genes estruturais controlando sua transcrição e os mRNAs provenientes do processo de transcrição são policistrônicos, ou seja, mRNAs que promovem a síntese de mais de uma proteína (figura 7).

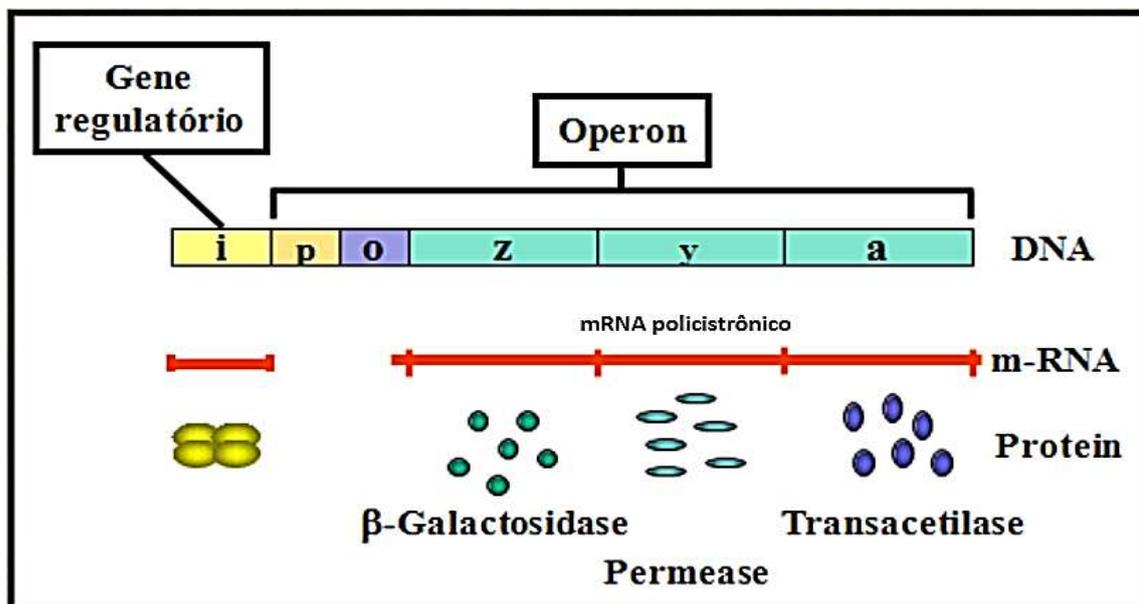


Figura 7: Desenho esquemático de um mRNA policistrônico. A figura mostra a região codificadora do gene repressor (i), a região promotora (p), o operador (o) e um operon constituído pelos genes Z, Y e A (MAYER, 2016).

Em 1961, François Jacob e Jacques Monod relataram seus experimentos do controle da expressão gênica em procariontes, no qual utilizou o microrganismo *Escherichia coli* para demonstrar a regulação da utilização da lactose (ROSANO e CECCARELLI, 2014). O operon *lac* foi o primeiro sistema de regulação descrito, mostrando a ação de um repressor controlando a transcrição, em resposta a uma molécula indutora, nesse caso um açúcar, a lactose (JACOB e MONOD, 1961).

O conhecimento da sequência nucleotídica e das regiões controladoras do operon *lac* (figura 8) serve como modelo para outros sistemas de expressão (BICH *et al.*, 2015).

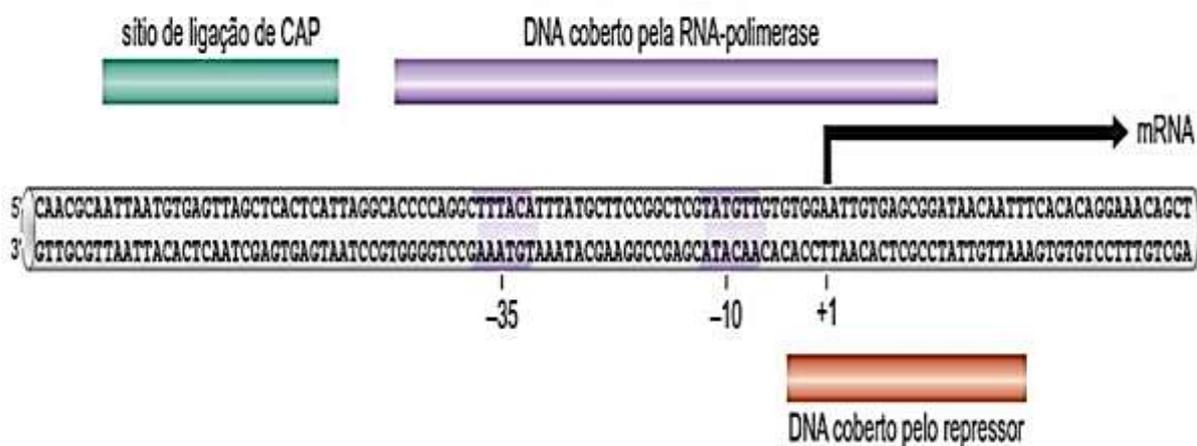


Figura 8: Sequência nucleotídica e a organização controladora do óperon *lac*. As barras coloridas acima e abaixo do DNA mostram as regiões cobertas pela RNA-polimerase e por proteínas reguladoras (FONTE: WATSON, 2015).

O operon *lac* é constituído por uma região regulatória que contém o promotor (P), região onde se inicia a transcrição pela RNA polimerase, o operador (O), local de reconhecimento do repressor seguidos de três sequências estruturais dos genes *lacZ*, *lacY*, *lacA*, genes que codificam as proteínas responsáveis para a utilização do açúcar lactose, quando este encontra-se disponível no meio (BICH *et al.*, 2015).

O gene *lacZ* é responsável por codificar a enzima  $\beta$ -galactosidase, que cliva o dissacarídeo lactose em seus monômeros, galactose, glicose e um isômero da lactose a alolactose. Quando a lactose entra na célula é convertida pela enzima  $\beta$ -

galactosidase em alolactose e é a alolactose que controla o repressor *Lac* não a lactose. A alolactose se liga ao repressor *Lac* provocando uma alteração na forma da proteína impedindo sua ligação ao DNA (operador). Na ausência de alolactose, o repressor em sua forma ativa se liga ao DNA e impede a transcrição dos genes *lac* (WATSON *et al.*, 2015).

Um análogo da lactose denominado IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopirósídeo) se ligam ao repressor inativando-o e libera a região operadora (O) para que a RNA polimerase se ligue ao promotor e a transcrição seja iniciada

O gene *lacY* é responsável por codificar a enzima permease, que realiza o transporte da lactose para dentro da célula e o gene *lacA* não se conhece perfeitamente seu papel (LEONARD *et al.*, 2015).

Na ausência da lactose, o operon *lac* é controlado pela proteína repressora *LacI*, que é produzida pelo gene *lacI* que está localizado um pouco antes do promotor (BICH *et al.*, 2015). Essa proteína se liga ao operador, impedindo que a subunidade sigma da RNA polimerase se ligue ao promotor, reprimindo a transcrição dos genes estruturais e dessa forma controlando a transcrição dos genes (MARQUES, 2012).

Quando a glicose se encontra presente no meio, desencadeia um processo chamado de repressão catabólica, ou seja, a lactose não é utilizada, mas quando os níveis de glicose diminuem ou se tornam ausentes, a lactose é novamente utilizada convertida em alolactose que ligando-se ao repressor *lac* mudando sua conformação de tal modo que ela solta-se do operador (O) permitindo que a RNA polimerase se ligue ao promotor e realize a transcrição dos genes do operon *Lac* (figura 9)(BICH *et al.*, 2015).

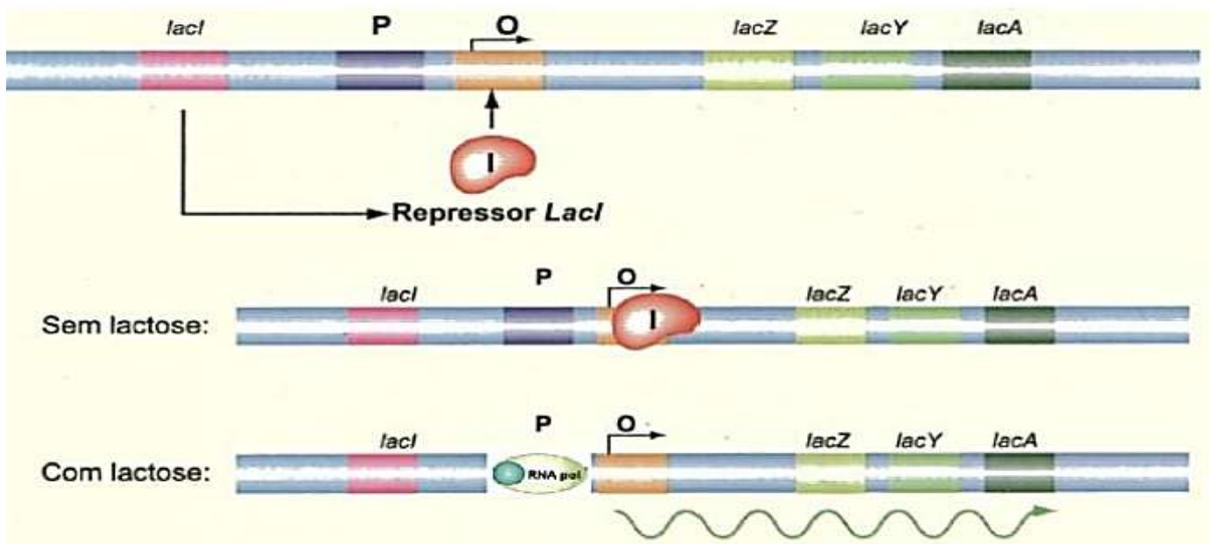


Figura 9: O repressor *LacI*, codificado pelo gene *lacI*, que se liga ao operador impedindo que ocorra a transcrição pela RNA polimerase. Na ausência de lactose, o repressor *LacI* está ligado ao operador. Na presença de lactose, o repressor *LacI* desliga-se do operador e assim ocorre a transcrição (Fonte: MARQUES, 2012).

A bactéria *Escherichia coli* quando cultivada em um meio contendo glicose e lactose, a expressão do operon *lac* permanece inativada, ou seja, enquanto houver glicose no meio a bactéria irá consumi-la, não utilizando a lactose como sua fonte de carbono, visto que o açúcar é preferencialmente metabolizado (LIWIS, 2013), no entanto, quando a glicose se torna ausente no meio é que o operon *lac* será ativado novamente voltando a fazer uso da lactose, liberando o operador e deixando que a RNA polimerase realize seu trabalho, expressando os genes Z, Y e A (LEONARD *et al.*, 2015).

Essa regulação do operon *Lac* é conhecida como regulação catabólica, e é decorrente de baixos níveis do cAMP (monofósforo cíclico de adenosina), sinalizador intracelular que indicam a ausência da glicose (WATSON *et al.*, 2015). Quando os níveis de glicose diminuem, os níveis de cAMP aumentam no citoplasma onde interagem com uma proteína conhecida como CAP (proteína ativadora catabólica) (BICH *et al.*, 2015). A CAP se liga ao cAMP na forma de um dímero, ativador de transcrição ligando-se em sequências específicas nas regiões regulatórias de vários genes, inclusive do operon *Lac* (LIWIS, 2013).

O sítio de ligação de CAP/cAMP localiza-se a montante do sítio de reconhecimento pela RNA polimerase e a ligação do ativador ao DNA favorece a interação da RNA polimerase com o promotor, ativando a transcrição (Figura 10) (MARQUES, 2012; BICH *et al*, 2015).

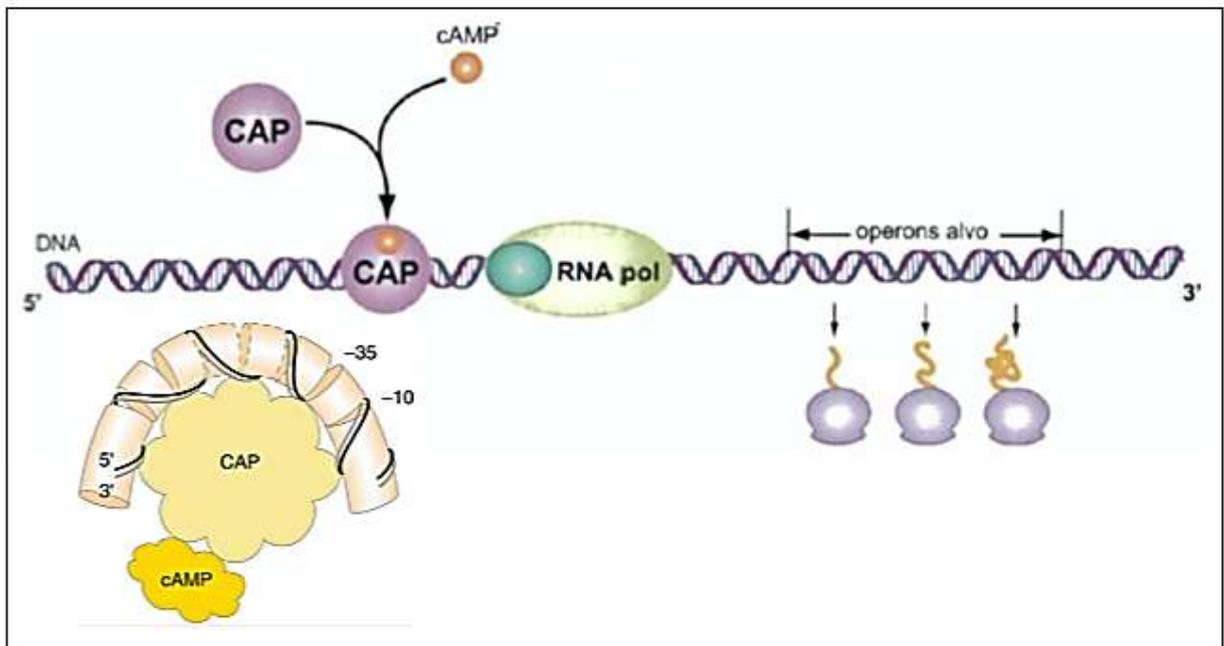


Figura 10: Atividade de CAP/cAMP. A proteína CAP ligada com a cAMP reconhecendo uma sequência específica na região regulatória do gene e conseqüentemente estimulando a ligação da RNA polimerase ao promotor, ocasionando a transcrição (Fonte: MARQUES, 2012).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Clonar e expressar a sequência codificadora da proteína ETK-Trx em *Escherichia coli*.

#### **3.2 Objetivo específico**

- Subclonar o gene da proteína de fusão enteroquinase – tiorredoxina (ETK-Trx) no cassete de expressão do vetor pDM02;
- Analisar a expressão do gene da ETK-Trx em *Escherichia coli* sob o controle do promotor TH2.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

Foram usadas para esta pesquisa duas linhagens de células diferentes de *Escherichia coli* que foram: DH5 $\alpha$ F'I<sup>Q</sup> e JM110 (tabela 2). Essas linhagens encontram-se no acervo de células hospedeiras do Centro de Apoio Multidisciplinar, Laboratório de Tecnologia de DNA Recombinantes da Universidade Federal do Amazonas-UFAM e são mantidas conservadas por criopreservação a uma temperatura de (-80°C) na presença de glicerol.

Tabela 2: Linhagens e genótipos de *Escherichia coli* utilizados no presente estudo.

Bactéria	Linhagem	Genótipo	Utilização
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$ F'I <sup>Q</sup>	<i>F'</i> , <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ ( <i>lacZ</i> ) <i>M15zzf::Tn10</i> , ( <i>Tet</i> <sup>R</sup> )/ <i>fhuA2</i> $\Delta$ , ( <i>argF-lacZ</i> ) <i>U169</i> , <i>phoA</i> , <i>glnV44</i> , $\Phi$ 80 $\Delta$ , ( <i>lacZ</i> ) <i>M15</i> <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	Clonagem
	JM110	<i>rpsL</i> , ( <i>Str</i> <sup>r</sup> ) <i>thr</i> <i>leu</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> $\Delta$ , ( <i>lac-proAB</i> )[ <i>F'</i> <i>traD36</i> <i>proABlac</i> I <sup>Q</sup> Z $\Delta$ M15	Clonagem e Expressão

#### 4.1.2 Reagentes, meio de cultura e kits

##### 4.1.2.1 Meios de cultura

Os meios utilizados para crescimento e cultivo das células foram o Luria Bertani (LB) líquido e sólido e suas composições estão apresentadas na (tabela 3).

Tabela 3: Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.

Meio	Composição	
LB líquido (Luria Bertani)	Triptona	10g\L
	Extrato de levedura	5,0g\L
	NaCl	5g\L
	pH	7,5
LB sólido (Luria Bertani)	Triptona	10g\L
	Extrato de levedura	5,0g\L
	NaCl	5g\L
	Agar	15g\L
	pH	7,0

#### 4.1.2.2 Marcadores moleculares

O marcador para peso molecular de DNA utilizado neste estudo foi o Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder, ready-to-use da Thermo Scientific (USA) para gel de agarose e para o gel de proteína SDS-PAGE foi utilizado o marcador PageRuler™ Presetained Protein Ladder Thermo Scientific (USA). Seus perfis eletroforéticos estão mostrados a seguir (figura 11).

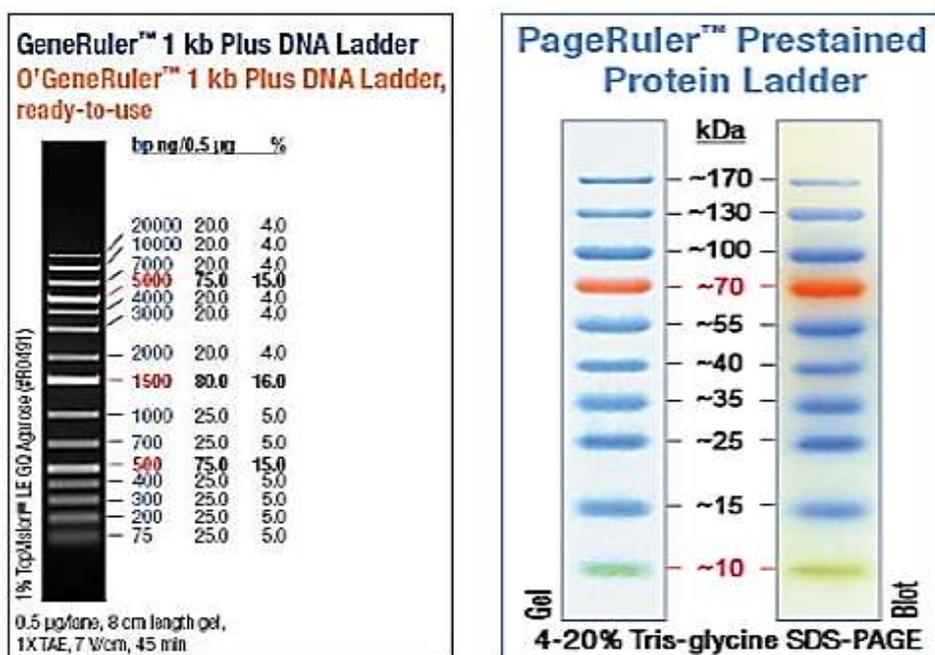


Figura 11: Macadores de peso molecular.

#### 4.1.2.3 Kits de extração e purificação de DNA plasmidial

Para a extração plasmidial foi utilizado o illustra™ plamidPrep Mini Spin Kit. A purificação de bandas ocorreu por eletroforese em gel de agarose, sendo o DNA extraído da agarose por meio do illustra™ GFX™ PCR DNA and gel Band Purification Kit da GE Healthcare (USA).

#### 4.1.2.4 Enzimas para clonagem e análise de restrição e sistema de ligação

As endonucleases de restrição e a DNA ligase utilizadas para a realização das construções genéticas foram *Bam*HI, *Nde*I, *T4 DNA ligase* eram provenientes da empresa *New England Biolabs® Inc.*(USA).

#### 4.1.3 Vetores utilizados

Os mapas de todos os vetores utilizados neste trabalho foram confeccionados a partir da ferramenta de bioinformática “SnapGene” software – GSL Biotech, USA.

#### 4.1.3.1 Plasmídeo pENTK portador do gene da fusão enteroquinase e tiorredoxina (ETK-Trx).

O plasmídeo pENTK que contém a sequência codificadora de enteroquinase bovina fusionada a sequência da tiorredoxina de *Homo sapiens*, que foi cedido pela empresa Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. E quando esse plasmídeo perde a sequência gênica ETK-Trx é chamado de pCEX (plasmídeo Cristália Expression) o mapa físico está mostrado na figura 12, a seguir.

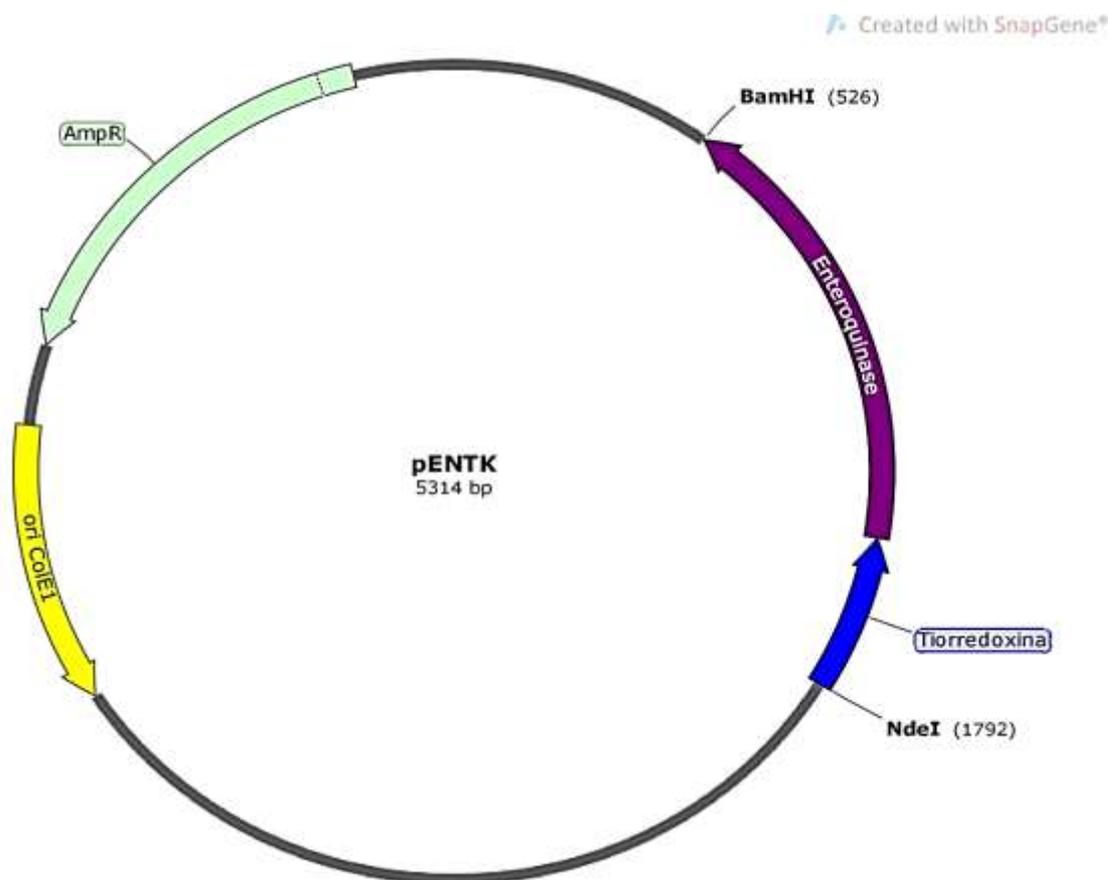


Figura 12: Mapa físico do plasmídeo portador do gene codificador da enteroquinase-tiorredoxina (ETK-Trx); (AmpR) gene de resistência a ampicilina; (ORI pUC18) origem de replicação multicópia do plasmídeo pUC18; região codificadora da proteína de fusão enteroquinase-tiorredoxina.

#### 4.1.3.2 Vetor pDM02-GFP

O vetor de clonagem e expressão denominado pDM02 foi construído pelo Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. O

vetor compreende o promotor TH2 (protegido por patente), um sítio de ligação ao ribossomo proveniente da proteína 10 do fago T7, a sequência codificante do gene repórter de GFP (*Green Fluorescent Protein*) clonado no seu “cassete de expressão” entre os sítios de *NdeI* e *BamHI* e um terminador de transcrição forte derivado de gene *rrnB* de *Escherichia coli*, no qual foi clonado no vetor que possui uma origem de replicação com baixo número de cópias (~10) e portador do gene de resistência a canamicina. Seu mapa físico está mostrado na figura 13, a seguir.

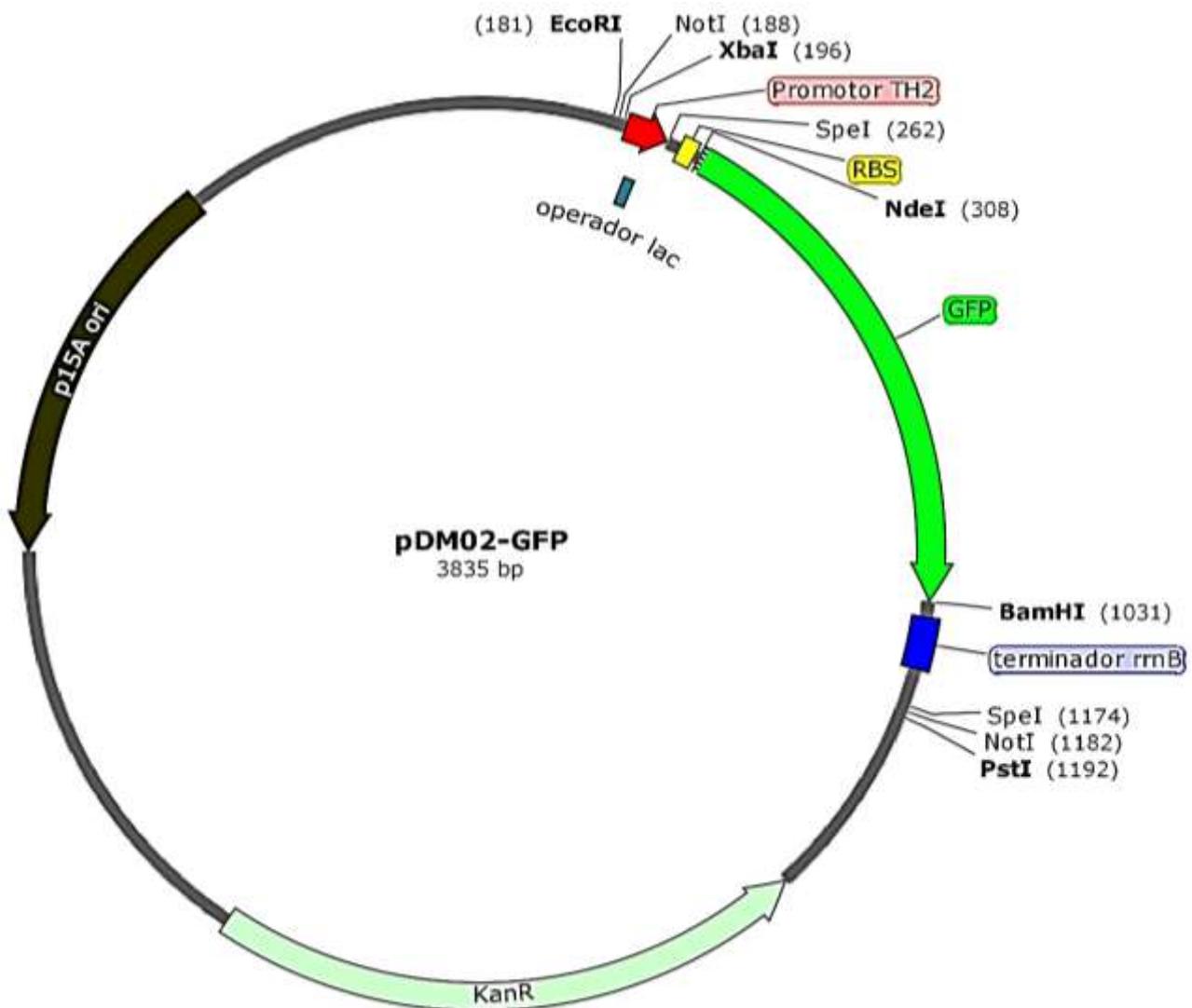


Figura 13: Mapa físico do plasmídeo pDM02-GFP. Possui o promotor TH2; (RBS) sequência de reconhecimento do ribossomo; (*rrnB*) terminador de transcrição; região codificadora do gene da GFP; (*KanR*) gene de resistência a canamicina; (*p15A ori*) origem de replicação de baixo número de cópias.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Clonagem molecular do gene da enteroquinase**

A estratégia de subclonagem da sequência codificadora da proteína na forma de fusão entre enteroquinase e tiorredoxina, doravante denominada ETK-Trx no vetor de expressão pDMK06 esta mostrada na figura 14, a seguir.

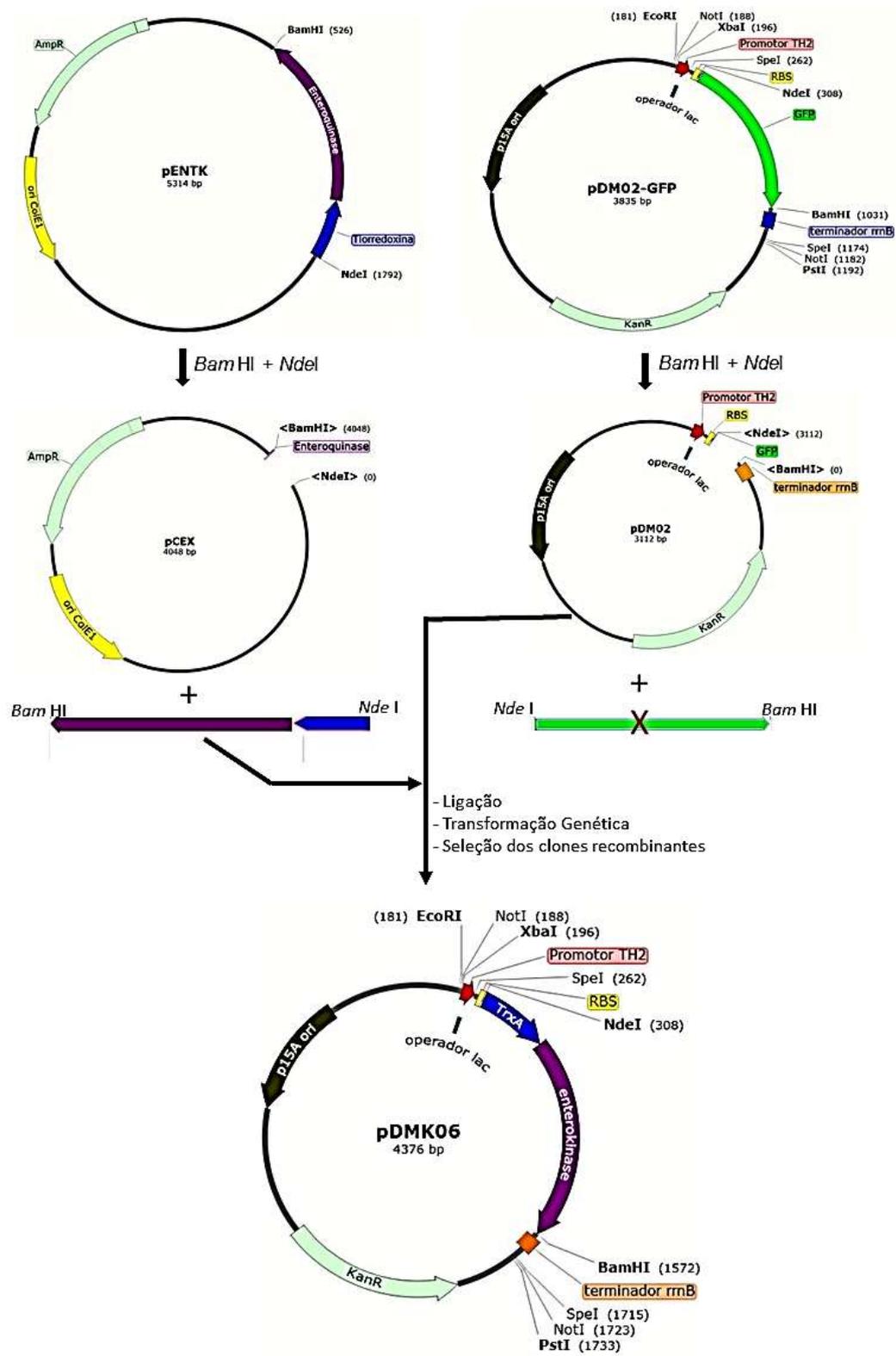


Figura 14: Esquema representativo da subclonagem da região codificante de ETK-Trx no vetor pDM02.

#### **4.2.1.1 Transformação genética da hospedeira**

Para a clonagem do gene que expressa enteroquinase os plasmídeos pDM02-GFP e pENTK foram utilizados para transformação de duas hospedeiras, sendo a linhagem DH5 $\alpha$ F'I<sup>Q</sup> para o vetor pENTK e a linhagem JM110 para o vetor pDM02. Para a transformação genética preparou-se previamente as células eletrocompetentes, para tal utilizou-se uma colônia recém isolada para pré-inoculo em 20mL de meio LB e incubou-se a 37°C por 150 rpm durante 16 horas (overnight). Transferiu-se 0,5mL do pré-inoculo para 250 mL de meio LB até atingir uma O.D<sub>600</sub> = 0,7. Para interromper o crescimento deixou-se em gelo por 40 minutos. Distribuiu-se o volume em tubos Falcon estéreis e centrifugou-se por 10 minutos a 4°C e 3, 500 g. Descartou-se o sobrenadante e realizou-se 3 lavagens do pellet com 20mL de glicerol a 10% gelado, por 3 vezes. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento (pellet) em volume 1mL de glicerol 10% e congelou-se alíquotas de 100 $\mu$ L com o auxílio de etanol 100% a -80°C e estocou-se a -80°C. Para a transformação genética, uma alíquota de 100 $\mu$ L de células competentes era degelada vagarosamente no gelo e depois se adicionava 1 $\mu$ L de cada plasmídeo (aproximadamente 100ng de DNA). O conjunto era transferido para uma cubeta de eletroporação e submetidos a 1900V durante milissegundos. Após o conteúdo era transferido para um microtubo de 1,5mL e adicionava-se 500 $\mu$ L de meio LB e incubava-se à 37°C com agitação de 150rpm para a recuperação das células e para expressão do gene de resistência ao antibiótico. Após essa etapa prosseguiu-se com a preparação das placas, na qual continham o meio LB sólido com o antibiótico correspondente (ampicilina 100ng/ml e canamicina 50ng/ml) e semeou-se alíquotas da suspensão de células com auxílio da alça de Drigalsky e incubou-se a 37°C durante 16 horas (overnight).

#### **4.2.1.2 Extração e Digestão dos plasmídeos pDM02-GFP e pENTK**

Para a extração plasmidial foram selecionadas 3 colônias transformadas com cada plasmídeo, que foram inoculadas em 5mL de meio LB líquido com antibiótico (ampicilina 100 $\mu$ g/ml para pENTK ou canamicina 50 $\mu$ g/ml pDM02-GFP) e incubadas por 16 horas (overnight) a 37°C a 150rpm.

Após o crescimento utilizou-se 3mL do meio contendo as células cultivadas para a extração plasmidial por lise alcalina (MANIATIS *et al.*, 1982), seguindo o protocolo de extração do illustra™ plamidPrep Mini Spin Kit e depois da extração foi realizada análise eletroforética em gel de 0,8% de agarose para verificar a qualidade e quantidade dos plasmídeos extraídos. Após o que, cada plasmídeo foi submetido a dupla digestão enzimática com *NdeI* e *BamHI*, em duas etapas. Na primeira etapa realizou-se a digestão analítica com um volume final menor, apenas para verificar se as enzimas estavam funcionando e liberando o inserto, na outra preparativa a digestão ocorria num volume maior para a purificação das partes de interesse: inserto (porção da proteína na forma de fusão entre a enteroquinase e tiorredoxina ETK-Trx) e vetor linearizado (pDM02). Na digestão analítica foram preparados separadamente para cada plasmídeo duplos digestões em volume final de 10µL, contendo: 5,0µL de água Milli-Q; 1,0µL de tampão 10X (NEB 3.1); 3,0 µl de capa plasmídeo (12,0ng/µl do pENTK e 10,2ng/µl do pDM02-GFP); 0,5µL da enzima *NdeI* (20U/µl) e 0,5µL da *BamHI* (20U/µl). E para a digestão preparativa o sistema de digestão com volume final de 60µL, continha: 28,0µL de água Milli-Q; 6,0µL de tampão 10X (NEB 3.1); 20µL de cada plasmídeo (12,0ng/µl do pENTK e 12,2ng/µl do pDM02-GFP); 3,0µL da enzima *NdeI* (20U/µl) e 3,0µL da *BamHI* (20U/µl). As digestões se processaram a 37°C por 2 horas. Após o tempo de reação as amostras analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo (1µL/mg) a 100V por 2 horas. Para fazer-se a purificação as sequências de interesse (ETK-Trx e do vetor pDM02 aberto sem o gene da GFP), após a corrida do gel preparativo, as bandas de interesse foram cortadas do gel e a extração do DNA da agarose ocorreu seguindo o protocolo da illustra™ GFX™ PCR DNA and gel Band Purification Kit e após a purificação os DNAs foram quantificados por espectrofluorimetria (Fluorímetro Qubit® da Invitrogen) - USA.

#### **4.2.1.3 Ligação do fragmento gênico da ETK-Trx ao vetor pDM02.**

Após a purificação e quantificação, prosseguiu-se com a elaboração do sistema de ligação. De acordo com as concentrações determinadas de DNA, foi estabelecida para o sistema de ligação uma proporção molecular de 3:1 na relação

de inserto/vetor. O sistema de ligação de volume final de 40µL continha: 8,0µL de água Milli-Q; 4,0µL de tampão 10X da ligase; 14,0µL do vetor (pDM0250ng/µL); 13,0µL de inserto (ETK-Trx 60ng/µL); 1,0µL da enzima T4 DNA ligase (50U/µl). A reação para a ligação ocorreu a 16°C por 14 horas, após a que para concentração do DNA e eliminação de sais o DNA foi precipitado e lavado da seguinte maneira: adicionou-se 2µL (4µg) de glicogênio, 0,1V de NaCl 3M e 2,5V de etanol absoluto, misturando bem e deixando em repouso no gelo por 1 hora. A seguir o material foi centrifugado a 12.000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o sedimento foi lavado com 500µL de etanol 70% gelado, seguindo de centrifugação a 12.000g por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante o sedimento foi secado em corrente de ar de fluxo laminar e redissolvido em 3µL de água Milli-Q estéril.

#### **4.2.1.4 Transformação genética em células de *Escherichia coli* JM110 com o sistema de ligação.**

Do sistema de ligação precipitado foi utilizado 1,5µl para a transformação de *E.coli* JM110 (100µL de célula competente) pelo método de eletroporação conforme descrito no item 4.2.1.1. Após a transformação foi adicionado 500µL de meio LB líquido as células e em seguida incubou-se a 37°C por 1 hora em agitação 150rpm. Foram confeccionadas duas placas com meio LB sólido contendo canamicina 50µg/ml e glicose 0,5%, e adicionou-se 250µl do princípio transformante em cada placa, que foram incubadas invertidas em estufa de 37°C por 16 horas para o crescimento bacteriano para posterior extração plasmidial e confirmação da subclonagem.

#### **4.2.1.5 Seleção dos clones recombinantes e confirmação da clonagem**

Os clones transformantes (6) foram inoculados em 5mL de meio LB líquido com canamicina 50µg/mL e glicose 0,5% e incubou-se a 37°C com agitação de 150rpm por 16 horas. A seguir foi realizada a extração do DNA plasmidial com o Kit do illustra™ plamidPrep Mini Spin (GE HealthcCare).

Para a confirmação da clonagem foi realizada análise de restrição dos 6 plasmídeos extraídos com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Foi preparado uma digestão analítica em um volume final de 10,0µL, contendo: contendo 5,0µL de água Milli-Q; 1,0 µL de tampão 10X (NEB 3.1); 3,0 µl de capa clone (aproximadamente 10-15ng/µL); 0,5µL da enzima *NdeI* (20U/µl) e 0,5µL da *BamHI* (20U/µl), que se processou por 2 horas a 37°C e os produtos analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo (1µg/mL). A clonagem da enteroquinase no vetor pDM02 originou o plasmídeo denominado de pDMK06.

#### **4.2.1.6 Crescimento em placas de clones recombinantes portadores do plasmídeo pDMK06.**

As colônias contendo o plasmídeo pDMK06 foram utilizadas para o experimento de indução que foi realizado em 3 placas de meio LB sólido com canamicina, glicose e do indutor IPTG. A primeira placa continha, o meio LB sólido com canamicina 50mg/mL e IPTG 1mM; a segunda placa continha, o meio LB sólido com canamicina 50mg/mL e glicose 0,5%; A terceira placa continha, o meio LB sólido com canamicina 50mg/mL apenas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e após 16 horas observou-se o crescimento das colônias.

#### **4.2.1.7 Expressão em meio líquido do plasmídeo pDMK06**

Um clone de *Escherichia coli* JM110 portador do plasmídeo pDMK06 foi utilizado para análise da expressão da proteína recombinante em meio líquido. O pré-inóculo foi realizado em recipiente contendo 50mL de meio LB líquido, canamicina 50µg/mL e glicose 0,5% e incubadas a 37°C com agitação de 150rpm durante 16 horas. Após o crescimento, realizou-se os inóculos em triplicatas em volume de 50mL de meio LB líquido e canamicina (50µg/ml), padronizando-se os inóculos para OD 0,1 a 600 nm. Foram realizados dois controles negativos, um que continha o meio LB líquido com canamicina 50mg/mL e glicose 0,5% e o outro controle contendo meio LB líquido apenas com canamicina 50mg/ml. Além dos controles foram realizadas duas induções em tempos diferentes, uma logo após o inóculo (t=0) e o outro quando as culturas atingiram OD 0,6, quando foi adicionado o

IPTG na concentração final de 1mM. A partir daí alíquotas de 1mL foram retiradas a cada 2 horas até o tempo de 8 horas e para as leituras das ODs para elaboração das curvas de crescimento. No final das 8 horas foram separadas alíquotas de 1mL para a análise das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (HARLOW e LANE, 1988), e análise da morfologia celular por microscopia ótica para acompanhar as possíveis mudanças na morfologia da célula bacteriana.

#### **4.2.1.8 Análise da produção de proteína recombinante por gel SDS-PAGE.**

A análise do conteúdo de proteína das células de *E.coli* foi realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE de acordo com Harlow e Lane (1988). Amostras de 1mL foram coletadas do experimento de expressão em meio líquido e centrifugadas por 12.000g por 5 minutos sendo os sobrenadantes descartados e os pellets ressuspensos em 100µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q e 250µl do tampão de corrida 2x para SDS-PAGE (tabela 4, em anexo), após o que foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese processou-se durante aproximadamente 2 horas e com voltagem de 200V. Após a eletroforese as proteínas foram coradas com a solução Azul de *Coomassie* (tabela 5, em anexo) durante 16 horas. Após o período de incubação em corante o gel foi imerso em uma solução descorante (tabela 6, em anexo) até atingir um contraste desejado para capturar a imagem via *scanner* (ImageScanner GE HealthCare – USA).

#### **4.2.1.9 Obtenção dos extratos de proteínas, solúveis e insolúveis.**

Para obtenção dos extratos totais utilizou-se 1ml de cada cultivo. O sedimento foi ressuspensado em 500µl de tampão TE (20 mM Tris-HCl pH 7,5; EDTA 5mM), utilizando-se agitador tipo vortex. Foram adicionados 10µl de lisozima (20mg/ml) e a mistura foi incubada durante 10 minutos a 37°C. As amostras foram mantidas em gelo e submetidas a três ciclos de ultrassom, após o que foram adicionados 4µl de Triton X-100 10% (v/v). As preparações foram centrifugadas a 12.000g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e denominado “fração solúvel” e o sedimento “fração insolúvel”. Para análise das frações em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, a fração solúvel foi coletada e estocada

à -20°C e a fração insolúvel foi ressuspensa em 400µl de tampão TE e 4µl de Triton X 100.

#### **4.2.1.10 Análise das células recombinantes por microscopia ótica.**

A análise em por microscopia ótica da cultura dos clones recombinantes ocorreu utilizando-se o método de coloração GRAM.

A preparação dos esfregaços ocorreu a partir das culturas de *Escherichia coli* (JM101) transformadas com o plasmídeo pDMK06 em diferentes fases de crescimento/indução. A preparação das lâminas foi realizada adicionando-se uma amostra de cada cultura bacteriana a uma lâmina de vidro limpa, espalhando-se até formar uma película fina que foi então fixada rapidamente pelo calor utilizando bico de Bussen.

A coloração foi realizada cobrindo-se o esfregaço fixado, com corante cristal violeta e solução aquosa de iodeto de potássio (Lugol) por um minuto, o excesso de corante foi retirado lavando-se a lâmina com água corrente. Em seguida adicionou-se a lâmina o etanol 95% por 30 segundos lavando-se a seguir com água corrente. E por último, cobriu-se o esfregaço com solução de fucsina por 30 segundos e removeu-se o excesso do corante lavando-se a lâmina com água corrente.

Após as etapas de coloração retirou-se o excesso de água da lâmina deixando-a secar a temperatura ambiente para posterior observação em microscópio óptico, utilizando-se objetiva de maior aumento (objetiva 100X).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Clonagem molecular do gene da enteroquinase

No presente trabalho, a estratégia de clonagem molecular utilizada está mostrada na figura 15, resultou na construção do plasmídeo pDMK06 que é capaz de programar a expressão heteróloga regulada do gene ETK-Trx em *E.coli*. Para o processo de clonagem molecular utilizou-se células hospedeiras, enzimas de restrição e os vetores plasmidiais que são ferramentas típicas da tecnologia do DNA recombinante. Por meio do processo de clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I foi possível obter a sequência codificadora da proteína de fusão entre enteroquinase e tiorredoxina (ETK-Trx) de aproximadamente 1259pb a partir do vetor de clonagem pENTK e simultaneamente realizou-se a remoção da sequência do gene da GFP (proteína verde fluorescente) (~750pb) presente no vetor pDM02-GFP para utilizá-lo como vetor de expressão. As análises de restrição dos respectivos vetores e os fragmentos liberados podem ser visualizadas na figura 14, com vetor pDM02 linearizado e ETK-Trx destacados em vermelho.

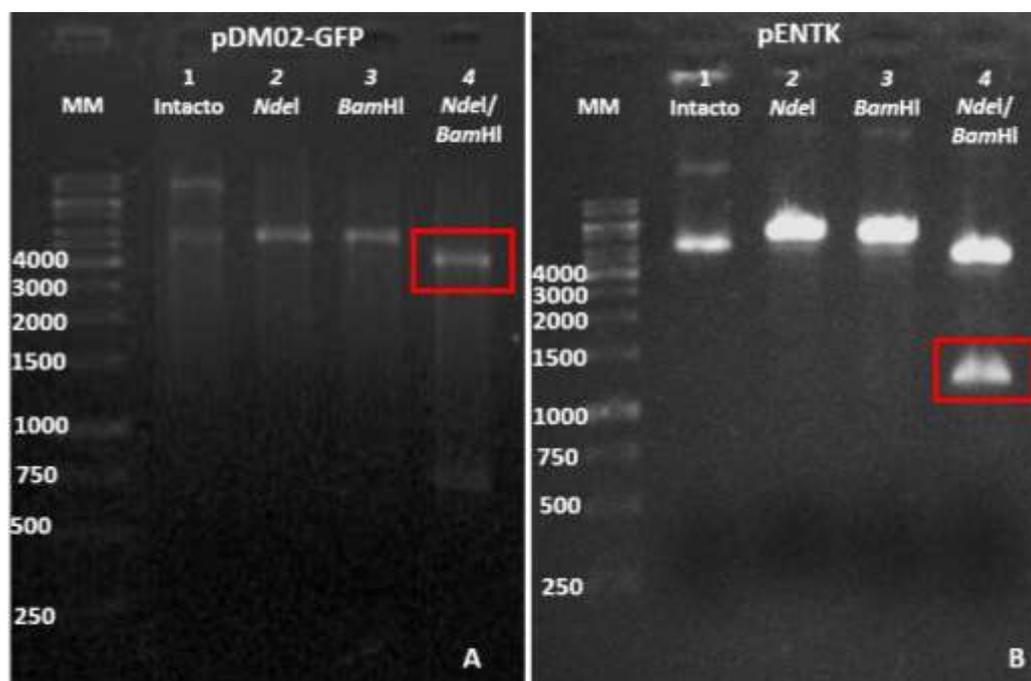


Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos da digestão pelas enzimas *Nde*I e *Bam*HI. (A) 1. Marcador Molecular. 2. pDM02-GFP intacto. 3. pDM02-GFP linearizado com *Nde*I. 4. pDM02-GFP linearizado com *Bam*HI. 5. pDM02 digerido com *Nde*I/*Bam*HI. (B) 1. Marcador Molecular. 2. pENTK intacto. 3. pENTK linearizado com *Nde*I. 4. pENTK linearizado com *Bam*HI. 5. pENTK digerido com *Nde*I/*Bam*HI.

3. pENTK linearizado com *NdeI*. 4. pENTK linearizado com *BamHI*. 5. pENTK digerido com *NdeI/BamHI*

O plasmídeo recombinante pDMK06 originou-se da ligação do vetor pDM02 linearizado ao inserto contendo a região codificadora da enteroquinase bovina fundida a da tiorredoxina humana (ETK-Trx).

## 5.2 Transformação genética e confirmação da clonagem

A transformação genética da *E.coli* JM110 com o sistema de ligação resultou na obtenção de doze clones transformantes, dos quais foram escolhidos apenas 6 clones, cujos plasmídeos foram extraídos e analisados por eletroforese em gel de agarose.

A ligação do gene da ETK-Trx no plasmídeo pDM02 foi confirmada por meio de dupla digestão dos plasmídeos pelas enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, que liberou fragmentos com aproximadamente 1.259 pb conforme mostrado na figura 16 referente ao clone 6 extraído escolhido para demonstrar a digestão e que foi escolhido para realizar os demais experimentos.

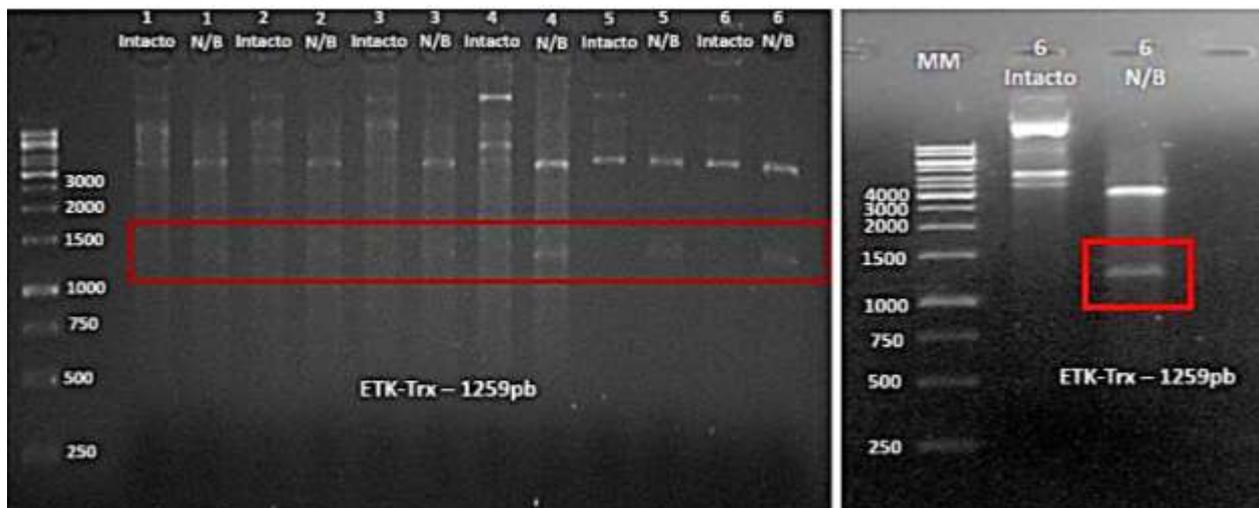


Figura 16: Perfil eletrofóretico do produto da digestão dupla do plasmídeo extraídos do clones transformantes (6) digeridos com *NdeI* e *BamHI* liberando a sequência codificadora ETK-Trx.

Após a confirmação da clonagem do gene da enteroquinase construiu-se o mapa físico do plasmídeo recombinante denominado de pDMK06, por meio das ferramentas de bioinformática (SnapGene), com seus elementos básicos, origem de

replicação de pUC 18, gene de resistência a canamicina, operador *Lac*, promotor TH2, terminador de transcrição *rrnB* T1 e o gene ETK-Trx, conforme mostra a figura 17

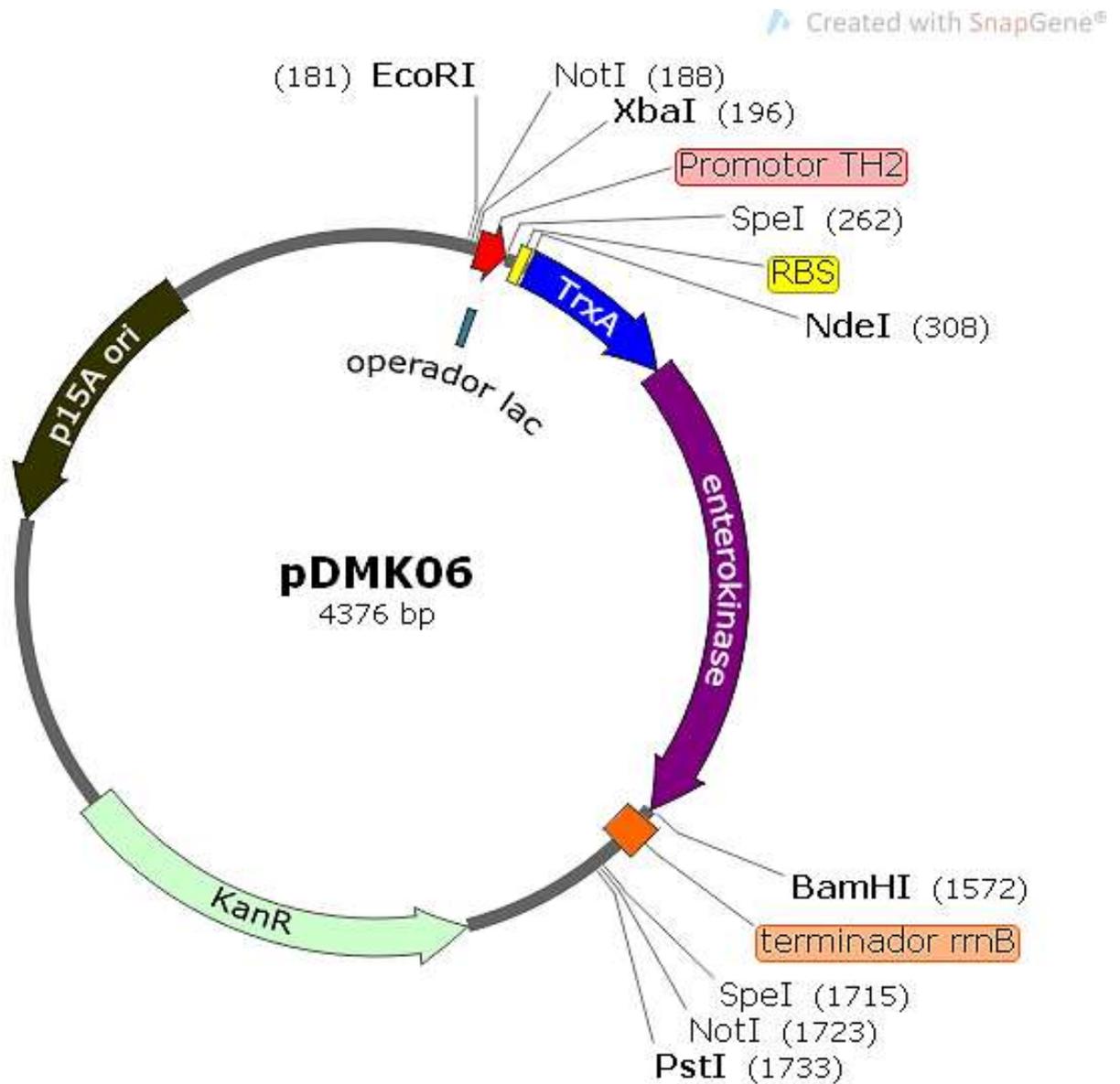


Figura 17: Mapa físico do plasmídeo recombinante pDMK06. (KanR) gene de resistência a canamicina; (TH2) promotor regulado derivado do operon *Lac*; (RBS) sequência de reconhecimento do ribossomo; (*rrnB*) terminador de transcrição; região codificadora da proteína de fusão enteroquinase-tiorredoxina (ETK-Trx)

### 5.3 Expressão heteróloga do gene da ETK-Trx em *Escherichia coli*(JM110)

#### 5.3.1 A análise do crescimento de células de *Escherichia coli* (JM110) recombinantes em meio de cultivo sólido.

Os clones selecionados foram plaqueados em sistema de cultivo sólido contendo o indutor IPTG (1mM) e canamicina (50µg/mL) e apresentaram o tamanho das colônias visualmente menor, quando comparados aos sistemas controle, que continham glicose 0,5% e canamicina (50µg/mL) ou somente com o antibiótico canamicina (50µg/mL). Os respectivos resultados podem ser visualizados na figura 18. Pode-se verificar que os clones contendo o plasmídeo pDMK06 apresentaram (visualmente) menor crescimento das suas colônias na placa com o indutor IPTG quando comparadas as placas controle.

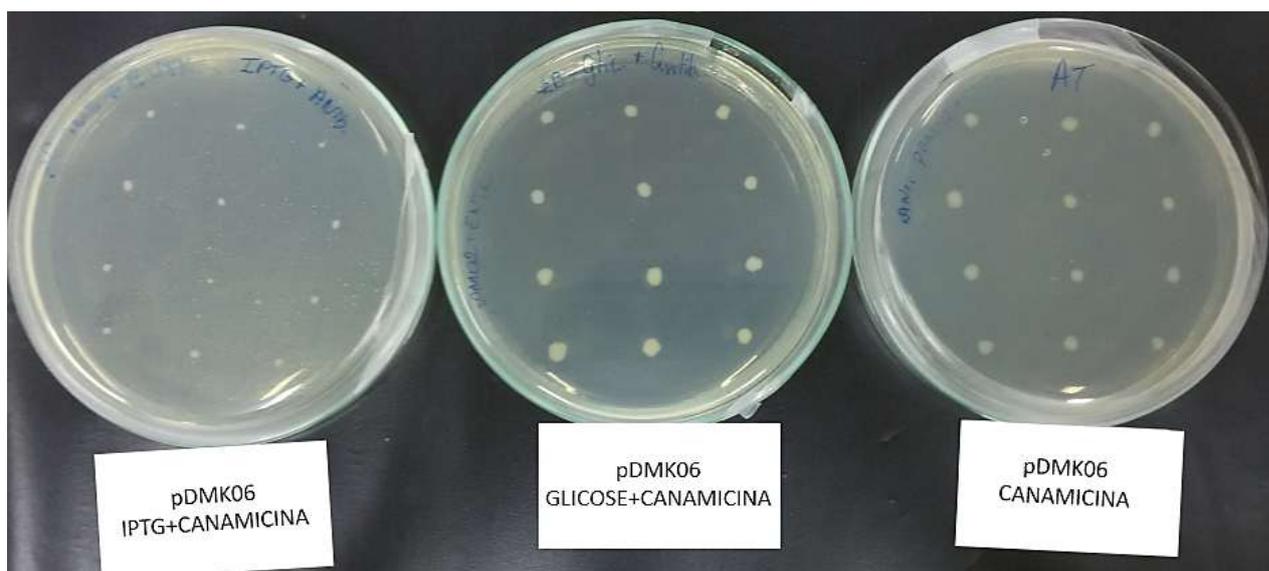


Figura 18: Fotos de clones recombinantes de *Escherichia coli* cultivadas na presença e ausência do indutor (IPTG) ou glicose.

### 5.3.2 Análise do crescimento da *Escherichia coli* recombinante em meio líquido.

A análise do crescimento da *Escherichia coli* JM110 recombinante, contendo o plasmídeo pDMK06 foi realizada em 4 condições:

- Controle apenas com o canamicina(50 $\mu$ L/mL);
- Controle contendo canamicina (50 $\mu$ L/mL) e glicose 0,5%;
- Cultura com canamicina (50 $\mu$ L/mL) e indução da expressão da ETK-Trx com adição de IPTG no início do cultivo (t=0) e;
- Cultura com canamicina (50 $\mu$ L/mL) e indução da expressão da ETK-Trx com adição de IPTG quando atingiu 0,6 OD<sub>600nm</sub>.

Os resultados estão mostrados na figura 19 a seguir. Diferentemente do que ocorreu com o crescimento das colônias em placa, pode-se afirmar que o perfil de crescimento em meio líquido não variou muito nas quatro condições testadas.

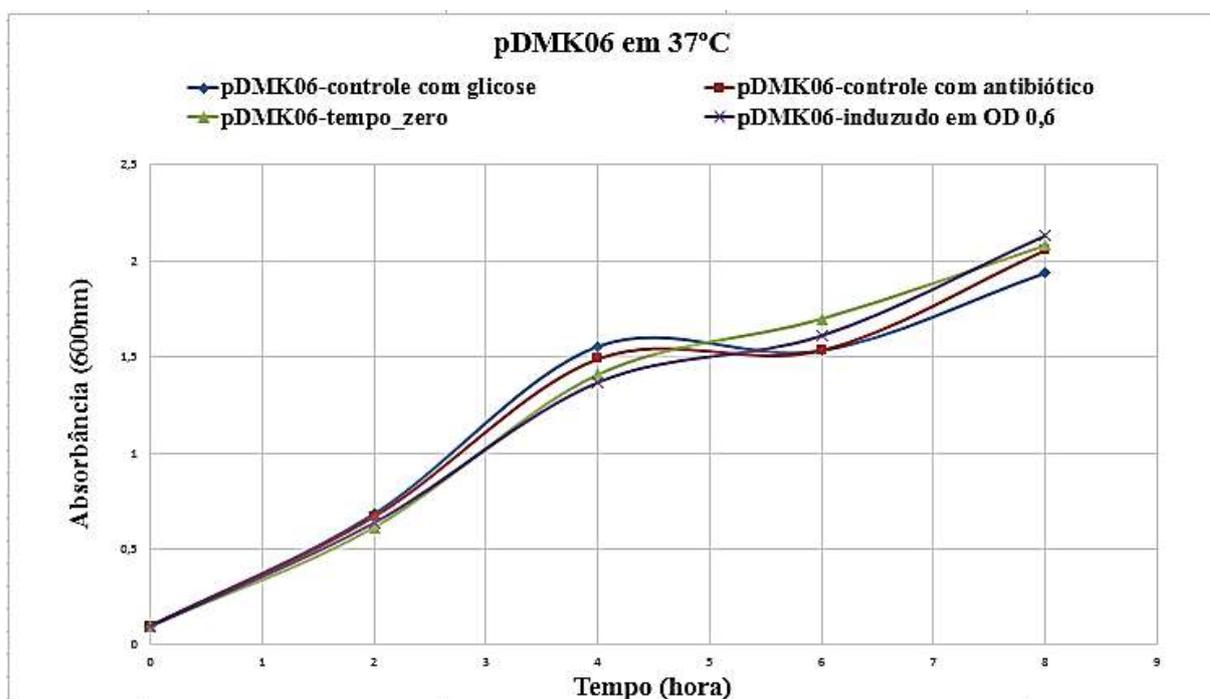


Figura 19: Curvas de crescimento bacteriano em função do tempo do clone recombinante pDMK06 em 37°C, em diferentes condições de cultivo.

### 5.3.3 Análise da expressão de ETK-Trx em *Escherichia coli* JM110/pDMK06

As células das culturas analisadas quanto ao crescimento em meio líquido, após 8 horas de crescimento foram centrifugadas e o conteúdo proteico foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Analisou-se as culturas controle (glicose + canamicina; canamicina) e as induzidas no tempo zero (t=0) e na OD<sub>600nm</sub> 0,6; o resultado está mostrado na figura 20.

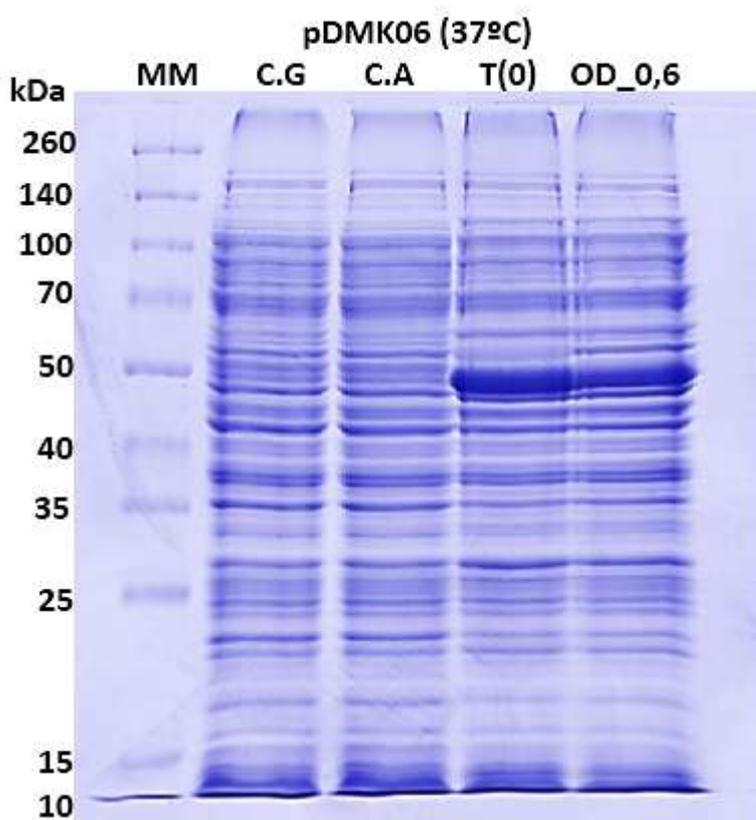


Figura 20: Perfil eletroforético das proteínas do clone recombinante de *E.coli*/pDMK06 em diferentes condições de crescimento/indução em meio LB com canamicina (50 $\mu$ L/mL). MM- marcador de peso molecular; C.G- controle com glicose; C.A- controle com canamicina apenas; T(0)- induzido com IPTG em t=0; e OD\_0,6- induzido com IPTG em OD<sub>600nm</sub> 0,6.

Pelo que se pode observar (figura 20), não existe praticamente diferenças detectáveis nos controles, porém a proteína ETK-Trx se expressa fortemente nas

condições de indução, aparentemente um pouco mais forte quando a cultura foi induzida no t=0.

A proteína expressa, como se pode estimar pelo gel, possui cerca de 50kDa (figura 20), possuindo uma massa molecular de 47,5 kDa quando calculada utilizando a ferramenta computacional Uni ProtKnowledgebase (Swiss- PrototrEMBL EXPASY- Bioinformatics Resource Portal) calculo teórico.

Com o objetivo de verificar em qual condição estrutural a proteína recombinante estava sendo produzida, se na forma solúvel (estrutura terciária correta) ou na forma insolúvel (como corpúsculo de inclusão), amostras com 6 horas de indução foram fracionadas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, o resultado está mostrado na figura 21, a seguir.

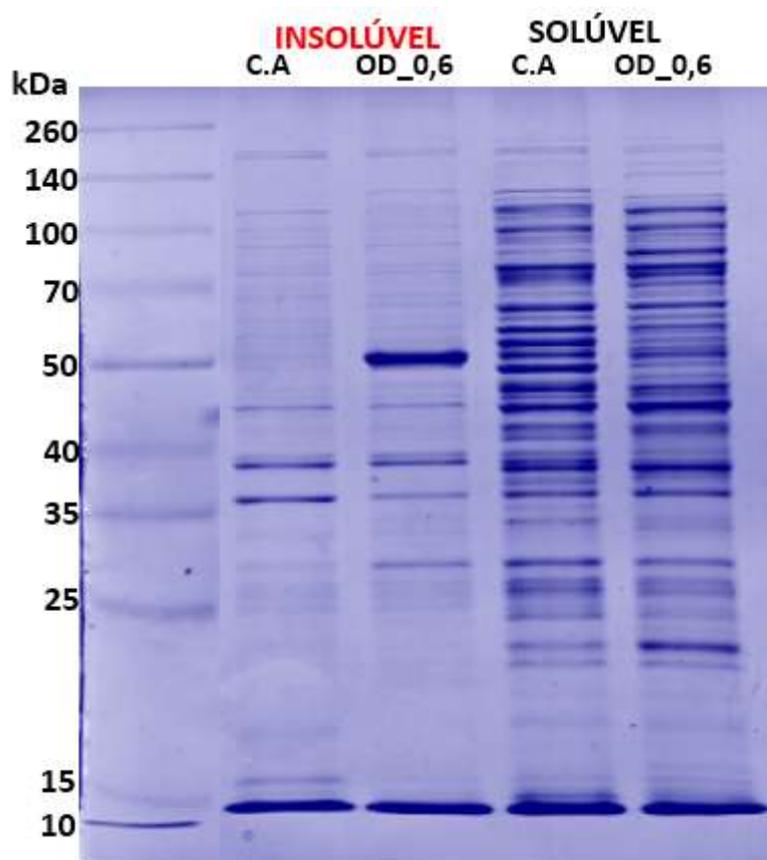


Figura 21: Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelo clone recombinante *E. coli*/JM110-pDMK06 nas frações solúvel e insolúvel. C.A- controle com canamicina; OD\_0,6- cultura induzida por IPTG em OD600nm = 0,6.

Pode-se observar que a proteína ETK-Trx, em cultura de *Escherichia coli* pDMK06 a 37°C é encontrada em sua grande maioria na “fração insolúvel”, possivelmente na forma de corpúsculo de inclusão.

#### **5.3.4 Análise da morfologia das células recombinantes por microscopia ótica.**

As microfotografias feitas das células recombinantes de *Escherichia coli* JM110/pDMK06 cultivadas em diferentes condições de indução e coradas pelo método de GRAM estão mostradas na figura 22, a seguir.

É possível visualizar na figura 22, que as amostras induzidas e que cresceram na presença do antibiótico, a partir de quatro horas de crescimento ocorre mudança na coloração, alterando a cor de rosa para roxo e as células parecem diminuir de tamanho diferindo quanto à morfologia das células não induzidas, que permanecem com a coloração rosa.

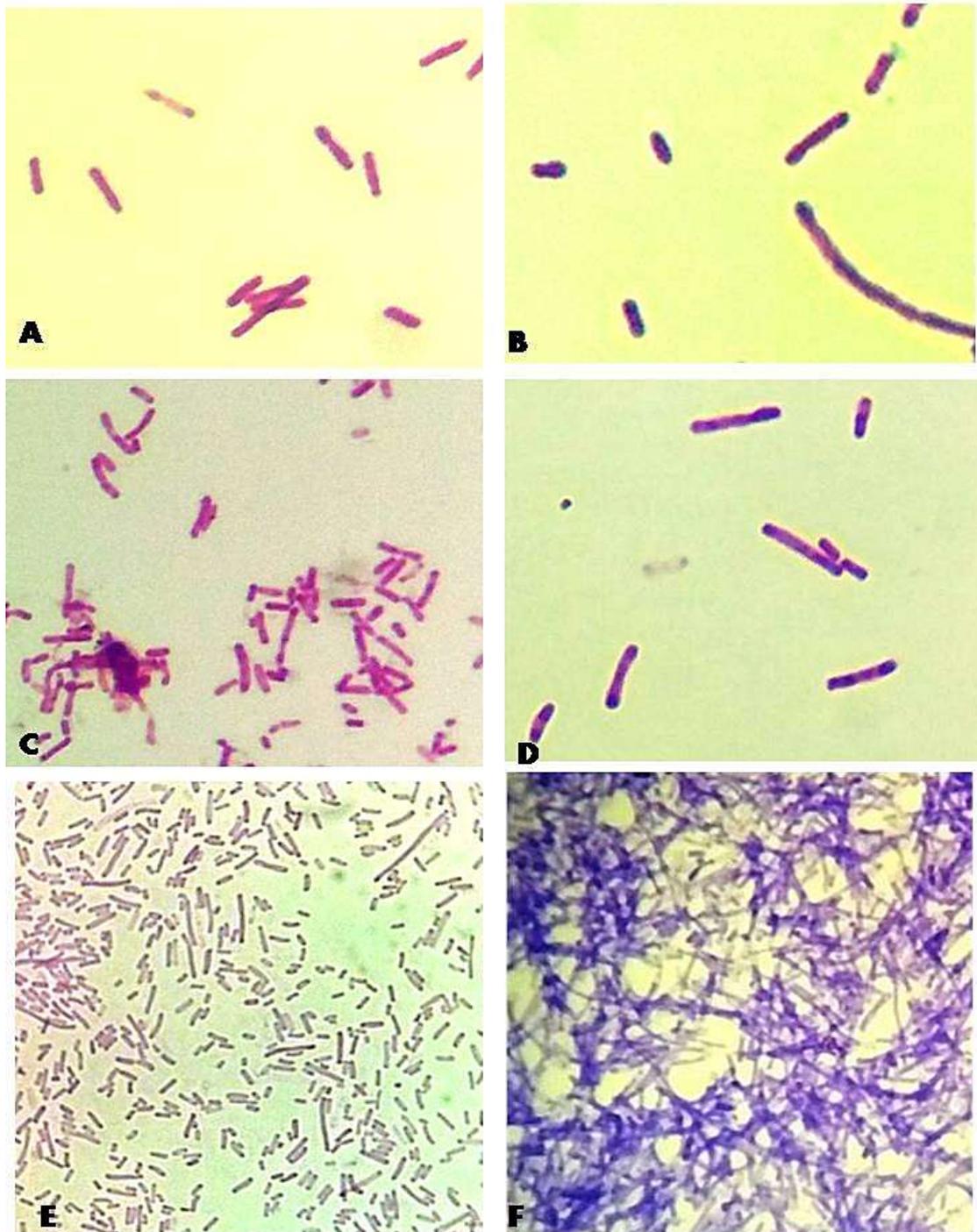


Figura 22: Observação das morfologias das células de *E.coli* JM110 cultivadas na presença de canamicina (50 $\mu$ L/mL) com e sem indutor (IPTG) por microscopia óptica (coloração GRAM).(A) controle com 2 horas de crescimento;(B) 2 horas indução com IPTG; (C) controle com 4 horas de crescimento; (D) 4 horas de indução com IPTG; (E) controle com 10 horas de crescimento; (F) 10 horas de indução com IPTG.

## 6 DISCUSSÃO

No processo de transferência da sequência ETK-Trx para o vetor pDM02, após a dupla digestão com pDM02, *NdeI* e *BamHI*, isolamento dos respectivos DNAs por eletroforese em gel de agarose, ligação dos DNAs e seleção dos clones recombinantes ocorrem adequadamente conforme mostrados nos resultados.

A figura 16, mostra a análise por digestão pelas enzimas (*NdeI* e *BamHI*) para confirmar a ligação. A imagem mostra a banda que corresponde o inserto de aproximadamente 1259 pb ficando na posição entre 1000 e 1500 pares de bases sendo liberados por todos os 6 clones extraídos, mas foi escolhido o clone de número 6 para repetir a digestão com maior quantidade de DNA para possibilitar a melhor visualização inserto que corresponde à sequência ETK-Trx. Uma das desvantagens de manipular o plasmídeo pDM02 e seus derivados se deve ao fato de sua origem de replicação (p15A) derivada do plasmídeo pACYC184 que produz de 10 a 12 cópias por célula de *E. coli*, ou seja, apresenta baixo número de cópia por célula (BANEYX, 1999).

No que diz respeito às análises do crescimento bacteriano, no experimento em placa, cujos resultados estão mostrados na figura 18, pode-se observar claramente que na placa que contém o agente indutor (IPTG), as colônias ficaram menores quando comparadas com o controle. Isso ocorre por que na presença do IPTG, as células que contém o plasmídeo recombinante passam a produzir grande quantidade da proteína recombinante, o que acarreta sobrecarga do sistema de síntese de proteínas e do metabolismo em geral. (SAÏDA *et al*, 2006; ROSANO e CECCARELLI, 2014).

A análise do crescimento em meio líquido em função do tempo, medido por meio de determinação da absorbância a 600nm, do clone recombinante de *Escherichia coli* JM110-pDMK06, mostrou que o experimento de indução mostrado na figura 15, não apresentou praticamente diferença entre os controles e os induzidos, ao contrário do que foi visto no crescimento em placa, onde as colônias

na presença do agente indutor cresceram menos quando comparado com os controles.

A análise da expressão da proteína de fusão ETK-Trx por SDS-PAGE (figura 16), mostra claramente alto nível de expressão da proteína recombinante e a expressão muito bem regulada por IPTG, uma vez que praticamente não existe expressão na ausência do indutor.

A alta expressão deve ser decorrente de dois principais fatores: ser o promotor TH2 (figura 23), um promotor forte, o que precisa ainda ser demonstrado quantificando-se o nível de expressão do mRNA da ETK-Trx; ou a expressão forte deve-se a excelente performance da sequência Shine-Dalgarno derivada do mRNA da proteína 10 do bacteriófago T7, utilizada para expressão da proteína recombinante. Não se pode descartar “a priori” que o alto nível de expressão deva-se aos dois fatores em conjunto.

A expressão bem regulada deve-se à estrutura do promotor TH2 ter sido especialmente desenhada para tal, pois tem diferentemente do promotor *Lac* (figura 23), o operador *Lac* sobreposto à sequência -35 (TTGTGA) um pouco diferente da consensual (TTGACA) (BROWNIG e BUSBY, 2016). Interpretamos que, como esperado, o repressor *Lac* ligado ao operador, sobreposto à sequência -35 (TTGTGA), impede eficientemente o reconhecimento do promotor pelo fator sigma da RNA Polimerases consequentemente o processo de transcrição.

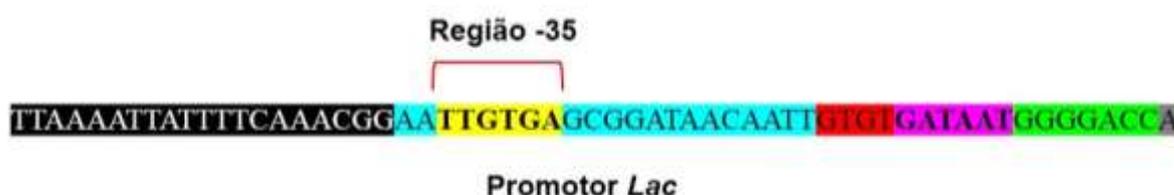


Figura 23: Mostra a sequência do promotor sintético TH2. Da esquerda para a direita: em preto temos a sequência “up element”, em azul amarelo o operador *Lac*; em amarelo a região -35 (sobreposta ao operador); em rosa a região -10 ou TATA box, em vermelho o elemento -10 estendido; em verde o ponto de início de transcrição e em cinza o primeiro nucleotídeo do codón de iniciação (protegido por patente).

Como já mencionado, a alta expressão do gene ETK-Trx foi bem evidenciado no gel de SDS-PAGE (figura 20), mas era necessário saber em que forma a proteína estava sendo produzida. Então foi realizada a separação das frações solúveis e insolúveis que por sua vez também foram analisadas por SDS-PAGE. Pode-se observar (figura 21), que a proteína em questão estava sendo produzida em maior quantidade na fração insolúvel, provavelmente na forma de corpúsculo de inclusão. A literatura relata que a fusão de proteínas com tiorredoxina ajuda a solubilização de proteínas que por si só são expressas na forma insolúvel (LaVALLIE, *et al.*, 2000; ROSANO e CECCARELLI, 2014), entretanto isso não ocorreu em nosso caso. Nosso caso é compatível com o descrito por alguns autores que utilizaram desse sistema, de fusão com tiorredoxina, para produzir a enzima enteroquinase e também não obtiveram produtos totalmente solúveis (YUAN e HUA, 2002; AZHA e SOMASHEKHAR, 2015).

A produção da proteína ETK-Trx em função do tempo foi acompanhada de análise da morfologia das células coradas pela técnica de GRAM e observadas por microscopia ótica. No final do crescimento celular, após 10 horas de cultivo foi possível observar, na cultura com o indutor IPTG, mudanças na morfologia das bactérias, onde as células apresentaram um alongamento conhecido como filamentação ou plasticidade morfológica (HORVATH *et al.*, 2011). Ocorre pelo crescimento bacteriano concomitante com a ausência da divisão celular, que resulta em células alongadas que possuem mais de uma cópia do genoma.

Ao longo da evolução, bactérias têm gerado sistemas complexos para manter sua morfologia, no entanto em algumas circunstâncias, elas alteram esse processo altamente regulado, para se transformar seres filamentosos (JUSTICE *et al.*, 2008). Isso está relacionado com a sobrevivência da bactéria quando exposta a ambientes de estresse, como baixo nível de nutrientes, e em alguns casos de bactérias patogênicas para enganar o sistema imunológico do hospedeiro (HORVATH Jr *et al.*, 2011). Essas alterações são favorecidas pelas mudanças metabólicas, danos no DNA a por alterações estequiométricas dos componentes da divisão celular (JUSTICE *et al.*, 2008). Nesse trabalho, a filamentação pode ter ocorrido pelo

estresse adicional causado pelo grande acúmulo da proteína heteróloga; ou como, uma pequena parcela dela parece ter ficado na fração solúvel, onde deve estar com a estrutura correta e conseqüentemente podendo estar ativa e pela sua atividade proteolítica ter degradado algum fator importante para que ocorra normalmente a divisão celular. Sabe-se que na fase exponencial tardia e na estacionária de crescimento bacteriano, genes relacionados à sobrevivência a condições de estresse são expressos, entre eles os que codificam chaperonas, que atuam garantindo a manutenção das estruturas proteicas corretas (HORVATH *et al.*,2011; ROSANO e CACCERELLI, 2014).

## 7 CONCLUSÕES

- A subclonagem da sequência codificadora da ETK-Trx no vetor de expressão pDM02 foi realizada com sucesso gerando o plasmídeo recombinante pDMK06;
- Células de *Escherichia coli* programadas com o plasmídeo recombinante pDMK06, na presença do indutor (IPTG), expressaram altos níveis da proteína ETK-Trx;
- A expressão em altos níveis da proteína ETK-Trx ocorreu de forma perfeitamente regulada mostrando a funcionalidade do sistema de expressão/regulação do plasmídeo pDM02

## **8 PERSPECTIVAS**

Produzir a proteína de enteroquinase ativa, para tal corpúsculos de inclusão contendo a ETK-Trx serão produzidos, dissolvidos com agentes desnaturante (ureia e cloridrato de guanidina), a partir do que será realizado o “refolding” em condições que a enteroquinase possa catalisar a clivagem nos sítios localizados entre as duas proteínas, seguido da purificação da enzima por cromatografia de afinidade e testar sua atividade enzimática.

## 9 REFERÊNCIAS

ALBRECHT, I; RHODEN, S.A; PAMPHILE, J.A. Industria biofarmacêutica e seu processo produtivo. **Evidência Joaçaba**, v. 15, n.1, p. 57-68, 2015.

ADRIO, J.L; DEMAIN, A.L. Recombinant organisms for the production of industrial products. **Bioeng. Erros**, v. 1, n. 2, p.116-131, 2010. [doi: 10.4161/bbug.1.2.10484](https://doi.org/10.4161/bbug.1.2.10484).

ALMEIDA, R.C.L.C. **Mecanismo de funcionamento da expressão gênica em procariotos de interesse na biotecnologia**. 2003. 23f. Monografia (Licenciatura em Biologia) – Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universidade de Brasília. UniCEUB, Brasília, 2003.

ALAM, J.; COOK, J. L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. **Anal Biochem**, v. 188, n. 2, p. 245-54, Aug 1 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121064> >.

ASSCHE E. V.; VAN PUYVELDE, S.; VANDERLEYDEN J.; STEENACKERS H. P. RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Front. Microbiol.* **6**:141. doi: 10.3389/fmicb.2015.00141. 2015.

ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, J. L.; AZEVEDO, M. O. Genética de microrganismos em Biotecnologia e Engenharia genética. Piracicaba: Fealq, 1985.

ASTOLFI-FILHO, S *et al.* Noções básicas de tecnologia do DNA recombinante. Manaus: EDUA, 2005, 61p.

AZHA, M; SOMASHEKHAR, R. Production and purification of recombinant enteropeptidase expressed in on insect-Baculovirus cell system. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 45, p. 268-278, 2015.ISSN: 1082-6068 print/1532-2297 online DOI: 10.1080/10826068.2014.907185

BAE, B., FEKLISTOV, A., LASS-NAPIORKOWSKA, A., LANDICK, R. & DARST, S. A. Structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme open promoter complex. **eLife** **4**, e08504, 2015.

- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr.Opin.Biotechnol**, v. 10, p.411-421, 1999.
- BARRETT, A. J. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*. New York, **Academic press**. n. 244, p.1-59, 1994.
- BARRETT, A. Classification of peptidases, proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. In: \_\_\_\_\_. *Methods in Enzymology*. Ed. Barrett AJ. **Academic Press**, San Diego, p.183-248, 1995.
- BARRETT, A.J; RAWLINGS, N.D; WOESSNER, J.F. The Handbook of Proteolytic Enzymes, **Academic Press**, 2Ed, 2003. ISBN 0-12-079610-4.
- BATAUS, L. A. M. 1991. *Construção de um vetor de seleção de promotores VSP) para Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 87pp.
- BATISTA, M. Construção de vetores para caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* em um sistema para clonagem em alta demanda. 124f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.
- BERLEC, A & STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.40, p. 257–274. February 2013.
- BEZERRA, R.S; VIEIRA, V.L.A; CARVALHO JR, L.B. Proteases no trato digestivo de peixes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 22, p.46-49, 2001.
- BICH, L; MOSSIO, M.; RUIZ-MIRAZO, K.; MORENO, A. Biological regulation: controlling the system from within. *Biol Philos*. SPRINGER. 2015. doi 10.1007/s10539-015-9497-8
- BOSDRIESZ, E.; MOLENAAR, D.; TEUSINK, B.; BRUGGEMAN, F. J. How fast-growing bacteria robustly tune their ribosome concentration to approximate growth-rate maximization *FEBS. Journal* 282:2029–2044. 2015.
- BROWNING, D. F. & BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nat Rev Microbiol** 2:57-65. 2004.

BROWNING, D. F. & BUSBY, S. J. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. **Nat Rev Microbiol**, p.1-13. 2016. Published online 8 Aug 2016. doi:10.1038/nrmicro.2016.103

CANDEL, A. M.; CONEJERO-LARA, F.; MARTINEZ, J. C.; VAN NULAND, N. A. J.; BRUIX, M. The high-resolution NMR structures of a single-chain chimeric protein mimicking a SH-3 peptide complex. **FEBS Lett**, v. 581, n. 4, p. 687-692, 2007.

CARTER, P. Site-specific proteolysis of fusion proteins. **ACS Sympos. Ser**, v. 427, p. 181-193, 1990.

CASES I, DE LORENZO V. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol*. 3(2):105-18, 2005.

CASTILHO, P.V. **Expressão heteróloga, purificação e caracterização estrutural do peptídeo (171-194) da p24 do HIV-1**. 2004. 81f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Paulo, 2004.

CHALFIE, M. Nobel Lecture: GFP: Lighting up Life. Disponível em: <[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/chalfie-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/chalfie-lecture.html)>.

CHALFIE, M; TU, Y; EUSKIRCHEN, G; WARD, W. W; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, v.263, Issue 5148, p. 802-805. Doi: 10.1126/science.8303295

CHOI, S.I.; SONG, H. M. ; MOON, J. W., SEONG, B. L. Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Sacharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. **Biotechnol. Bioeng**, v. 75, n. 6, p. 718-724, 2001.

COHEN, S. N. DNA cloning: A personal view after 40 years. **PNAS**. v. 110, n. 39, 2013.

CORTEZ, T.V. Expresión y purificación de proteínas recombinantes y biofármacos em *Escherichia coli* utilizando la proteína SMBP como proteína de fusión. 2014. 134f. Dissertación (Maestría en Ciencias) – Faculdade de Ciências Química – Universidade Autónoma de Nueva León, 2014.

DAY, R. N.; DAVIDSON, M. W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. **ChemSoc Rev**, v. 38, n. 10, p. 2887-921, Oct 2009. ISSN 1460-4744 (Electronic)0306-0012 (Linking).Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19771335> >.

DO CARMO, E. J. Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamoriem Pichia Pastoris*. 115f.Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Programa de pós-graduação em genética, conservação e biologia evolutiva - INPA. 2010.

FORTES, K.P. **Purificação e caracterização parcial de uma serino-protease tipo tripsina isolada do intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis*(Diptera, Psychodidae)**. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais UFMG, Belo Horizonte, 2013.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in E. coli.**CurrProtoc Protein Sci**, v. Chapter 5, p. Unit 5 24 1-29, Aug 2010. ISSN 1934-3663 (Electronic)1934-3655 (Linking).Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814932> >.

FORTES, K.P.**Purificação e caracterização parcial de uma serino-protease tipo tripsina isolada do intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis*(Diptera, Psychodidae)**. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais UFMG, Belo Horizonte, 2013.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in E. coli.**CurrProtocProteinSci**, v.5, n.24, p.1-29, 2010. ISSN 1934-3663. Disponível em :<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814932>> Acesso em: 13 mai. 2015.

GASPARIAN,M. E. *et al.* Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in Escherichia coli.**Protein Expr.Purif.v.31, n.1, p.133–139, 2003.**

GASPARIAN, M.E; BYCHKOV, M.L; DOLGIKH, D.A; KIRPICHNIKOV, M.P. Strategy for improvement of enteropeptidase efficiency in tag removal processes. **Protein Expression and Purification**, v. 79, p. 191-196, 2011.

GOMES, G.L. **Detecção de inibidores de tripsina em genótipos de gergelim visando controle de *Plodia interpunctella***. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrária) –Centro de Ciências Humanas e Agrárias –Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande-PB, 2004.

GOPAL, G. J. & KUMAR. A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **Protein J**, v.32, p.419–425. 2013.

GRIFFITHS, A.J.; WESSLER, S.R; CARROLL, S.B; DOEBLEY, J. **Introdução à genética**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 714p.

GRUBER, T. M; GROSS, C. A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 441-66, 2003. ISSN 0066-4227.

Hammarstrom M., Woestenenk EA, Hellgren N., Hard T., Berglund H. Effect of fusion proteins that improve N-terminal solubility on the yield of the purified target protein. **J. Struct. Funct. Genomics**, v. 7, p. 1-14, 2006. 10.1007/ s1096900590037

HARLOW, E; LANE, D. **Antibodies a laboratory manual**: By E Harlow and D Lane. f 726. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1988. Doi: 10.1016/0307-4412(89)90165-9

HELMANN, J. D. Sigma Factors in Gene Expression. In:\_\_\_\_\_. **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. ISBN 9780470015902.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 373-95, table of contents, Sep 2002. ISSN 1092-2172.

HORVATH, D.J.Jr; LI, B; CASPER, T; PARATIDA-SANCHEZ, S; HUNSTAD, D.A; HULTGREN, S.T; JUSTIÇA, S.S. Morphological plasticity promotes resistance to uropathogenic phagocytes *Escherichia coli*. **Microbes Infect**, v. 13, n. 5, p. 426-437, 2011.

HUANG CHUNG-JR.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **39**:383–399. 2012.

IUBMB. Enzyme Nomenclature. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/21/9.html> 1/1>. Acesso: 15/06/2015.

JACOB, F.; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, v. 3, p. 318-356, 1961.

JANASSON, P *et al.* Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem*, v.35, p.91-105, 2002.

JAYARAJ, R. SMOOKER, P.M. So you Need a Protein: a guide to the production of recombinant proteins. *The Open Veterinary Science Journal*, v.3, p.28–34, 2009.

JENNY, E. J.; MANN, K. G.; LUNDBLAD, R.L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr. Purif.*, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2003.

KHAN, S; ULLAH, M.W; SIDDIQUE, R; NABI, G; MANAN, S; YOUSAF, M and HOU, H. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, v.1, p.1-14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/2405954>

LADERMAN, K. A., *et al.* The purification and characterization of an extremely thermostable  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 24394-24401, 1993.

LaVALLIE, E.R; McCOY, J.M. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Current Opinion on Biotechnology*, n.6, p.501-506, 1995.

LAVALLIE, E.R; ZHIJIAN, L.E.A; DIBLASIO-SMITH, L.A; COLLINS-RACIE, J. M. McCOY. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant

proteins in *Escherichia coli*. **Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins Part A: Gene Expression and Protein Purification**, v. 326, p. 322-340, 2000.

LEONARD, S. R.; LACHER, D. W.; LAMPEL K. A. Acquisition of the lac operon by *Salmonella enterica*. **BMC Microbiology**, v.15, n.173. 2015.

LEWIN, A.; MAYER, M.; CHUSAINOW, J.; JACOB, D.; APPEL, B. Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, v.5, n.19, 2005.

LEWIS, M. Allosterity and the lac Operon. **J. Mol. Biol**, v.425, p.2309–2316. 2013.

LIGHT A, FONSECA P. The preparation and properties of the catalytic subunit of bovine enterokinase. **J BiolChem**, v.259, p.13195–13198, 1984.

LIGHT A, JANSKA H. Enterokinase (enteropeptidase): comparative aspects. **TrendsBiochemSci**, v.14, p.110–112, 1989.

LIMA, W.J.N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivo em alta densidade celular**. 2004. 628f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia Química, São Paulo, 2004.

LIN, C.J; BARBOSA, A.S. Técnicas de análise da regulação gênica e suas aplicações na endocrinologia molecular. **Arq.Bras.Endocrinol.Metab**, v. 46, n.4, p.330-340, 2002.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiologicalreviews**, v. 60, p.515-523, 1996.

MARQUES, M.D.V. **Biologia molecular e genética bacteriana**. /Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 348. 2012.

MANIATIS, T; FRITSCH, E.F; SAN BROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

MARSCHALL, L; SAGMEISTER, P; HERWIG, C. Tunable recombinant protein expression in *E. coli*: enabler for continuous processing? **AppIMicrobiolBiotechnol**,

v. 100, p. 5719-5728, Publicado on-line 12 de may 2016 maio. [doi: 10,1007 / s00253-016-7550-4](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7550-4)

MAYER, G. Mecanismo genético regulatórios. In. \_\_\_\_\_  
Microbiologia e Imunologia. Disponível em:  
<[www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter\\_9\\_bp.htm](http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_9_bp.htm)>. Acesso: 04/11/2016.

MIYAMOTO, C.A. **Produção de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli***. Disponível em: <[www.aems.edu.br/conexao/edicaoanterior/Sumario](http://www.aems.edu.br/conexao/edicaoanterior/Sumario)>. Acesso: 21/01/2013.

MOONEY, R. A., DARST, S.A., LANDICK, R. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? Mol Cell20:335-345, 2005.

MOREIRA, G.B. **CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE PROMOTORES PARA OBTENÇÃO DE SEQÜÊNCIAS PARA *Escherichia coli***. 67f. Dissertação (Mestrado - Área de concentração Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA e da UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM, 2009.

MOREIRA, M.D. **Construção de novos promotores funcionais em *Escherichia coli* por meio de síntese química de DNA ramdomizada**. 103f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional da Universidade Federal do Amazonas – UFAM

MUSSATTO, S.I; FERNANDES, M; MILAGRES, A.M.F. Enzimas. Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v.41, n. 242, p.28-33, 2007.

NAKAJIMA, R.T. **Transcrição cooperativa de genes ribossomais em *Escherichia coli* usando um modelo estocástico e dependente de sequência**. 48f. Dissertação (Mestrado em Genética) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Campus de Botucatu, UNESP, 2015.

NASCIMENTO, A.A.C *et al.* **Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2003. 87f. Apostila.

NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.

NIU, L.X; LI, J.Y; JI, X.X; YANG, B.S. Efficient Expression and Purification of Recombinant Human Enteropeptidase Light Chain in *Escherichia coli*. **Braz. Arch. Biol**, v. 58, n. 2, p.216-221, março de 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201400094>. ISSN 1516-8913 Printed in Brazil.

OEHLER.S *et al.* Quality and position of the three lac operators of *E.coli* define efficiency of repression. **The EMBO Journal**. vol.13 no.14 pp.3348-3355, 1994

OGIWARA, K; TAKAHASHI, T. Specificity of the medaka enteropeptidase serine protease and its usefulness as a biotechnological tool for fusion protein cleavage. **Proc Natl AcadSci**, USA, v. 04, p. 7021-7026, 2007. [doi:10.1073/pnas.0610447104](https://doi.org/10.1073/pnas.0610447104)

OLIVEIRA, M.G.A; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P., GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. **Comparativ Biochemistry and Physiology**, v.140, n.3, p.369-380, 2005.

OLIVEIRA, A. S. **Purificação e caracterização de inibidores de tripsina de sementes de *Pithecellobium dumosum* seus efeitos**. 2007. 203f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2007.

OLIVEIRA, M.C.S *et al.* Fundamentos teórico-prático e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária** [recurso eletrônico], 2007. **ISBN: 987-85-86764-12-7**

OLIVEIRA, S.A. **Síntese e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo o inibidor de proteinases BTCl e peptídeos derivados**. 2012. 94f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 2012.

OLIVEIRA, V.M; ASSIS, C.R.D; BEZERRA, R.S. FISH DIGESTIVE HYDROLASE: BIOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS. **REB**, v. 7, n.3, p. 330-341, 2014.ISSN 1983-7682.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts.**Drug Discovery Today**. v. 1,n. 5, 2014.

PACHECO, B.; CROMBET, L.; LOPPNAU, P.; COSSAR, C.A screening strategy for heterologous protein expression in Escherichia coli with the highest return of investment.**Protein Expression andPurification**, v. 81,p. 33–41. 2012.

PAIXÃO, G.P. **Efeito de berenil, um inibidor de protease do tipo Bis-benzamidina, nas respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis***. 2010. 128f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2010.

PAKHOMOV, A. A.; MARTYNOV, V. I. GFP family: structural insights into spectral tuning. In: (Ed.). **Chem Biol**. England, v.15, 2008. p. 755-64. ISBN 1074-5521 (Print)1074-5521

PAVLOV, I. P. **THE WORK OF THE DIGESTIVE GLANDS**.(translanted by THOMPSON, W. H), Charles Griffin e Co London. 5. Ed, Second Edition, 1910.

PEREZ-RUEDA, E.; COLLADO-VIDES, J.The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in Escherichia coli K-12.In: (Ed.). **NucleicAcids Res**. England, v.28, 2000. p.1838-1847. ISBN 1362-4962 0305-1048.

PUHL, A.C. **Obtenção de um biocatalisador da protease TEV para a remoção de caudas de histidinas de proteínas recombinantes**. 2008.87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

- ROSANO, G. L. CICCARELLI, E. A. R. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **REVIEW ARTICLE**, v. 5, n.17. Published: 17 April 2014. [doi: 10.3389/fmicb.2014.00172](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172)
- RODRIGO, A. S. Estudi del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris*. 324 f. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanya. 2004.
- RUFF, E. F.; M. THOMAS RECORD, JR.; ARTSIMOVITCH, I. Initial Events in Bacterial Transcription Initiation. **Biomolecules**. V.5, 1035-1062. 2015.
- SAÏDA, F; UZAN, M; ODAERT, B; BONTEMS, F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Curr. Protein. Pept. Sci*, v. 7, n.1, p. 47-56, 2006.
- SCHUMANN, W. AND FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet. Mol. Biol.*, vol.27, no.3, p.442-453. ISSN 1415-4757. 2004.
- SEMSEY, S.; JAUFFRED, L.; CSISZOVSKI, Z.; ERDOSSY, J.; STÉGER, V.; HANSEN, S.; KRISHNA, S. The effect of LacI autoregulation on the performance of the lactose utilization system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 41, No. 13 6381–6390. 2013.
- SHAHRAVAN, S.H; QUI.X; CHAN, J.A.J.A. Shin, Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag, *Protein Expr. Purif.* v. 59, p.314–319, 2008.
- SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. **J Cell Comp Physiol**, v. 59, p. 223-39, Jun 1962. ISSN 0095-9898 (Print) 0095-9898 (Linking). Disponible en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13911999> >.
- SORENSEN, H.P; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, v. 115, n.2, p. 113-128, 2005.
- TANAKA K, KUSANO S, FUJITA N, ISHIHAMA A, TAKAHASHI H. Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing  $\sigma^{38}$  (the rpoS gene product). **Nucleic Acids Res**, v. 23, p.827–834, 1995.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, p. 523-533, 2003. doi: [10.1007/s00253-002-1158-6](https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6).

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

TERRA, W.R.; FERRIERA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.109B, n.1, p.1–62, 1994.

TIAN, H.; TANG, L.; WANG, Y.; WANG, X.; et al. Lactose Induction Increases Production of Recombinant Keratinocyte Growth Factor-2 in *Escherichia coli*. *Int J Pept Res Ther*, v.17, p.123–129, 2011.

TOMAZETTO, G; MULINARI, F; STANISÇUASKI, F; SETTEMBRINI, B; CARLINI, C.R; AYUB, M.A.Z. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 821-827, 2007.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTVA, A; BISWAL, K. C.; RAO, P. V. L. Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli*. Review methods. **Industrial Biotechnology**, v. 5, n.3, p.179-183. 2009.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 509-44, 1998. ISSN 0066-4154 (Print)0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759496> >.

VALDEZ-CRUZ, N.; CASPETA, L.; PEREZ, N. O.; RAMIREZ, N. O.; TRUJILLO-ROLDAN, M.A. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression. System based on the phage lambda pL and/or pR promoter. **Microbial Cell Factories**, v.9, p. 1-16, 2010.

ULHOA, C.J; SILVA, R.N. **Biotechnologia farmacêutica e seus desafios**. Disponível em:

<[http://www.proec.ufg.br/revista\\_ufg/textos/biotecnologiaFarmaceutica.pdf](http://www.proec.ufg.br/revista_ufg/textos/biotecnologiaFarmaceutica.pdf)>. Acesso: 23/03/2014.

VAZ, M. R. F. 79f. Estudo do cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinantes (eIF, LACK) para a expressão de antígenos da *Leishmaniachagasi*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2008.

WAEGEMAN, H. & SOETAERT, W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. **J IndMicrobiolBiotechnol**, v. 38, p.1891–1910. 2011.

WALLS, D; LOUGHRAN, S.T. Tagging recombinant proteins to solubility and aid purification. **Protein Chromatography: Methods and protocols, Methods in molecularbiology**, V. 681, n.1, p.151-175. 2011.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**. Volume 15, Numbers 17/18. September 2010.

WATSON, J.D; BEKER, T.A; BELL, S.P. **Biologia Molecular do Gene**. 7<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

WELSH, S.; KAY, S. A. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. In: (Ed.). **CurrOpinBiotechnol**. England, v.8, 1997. p. 617-22. ISBN 0958-1669 (Print)0958-1669

WILLIAMSON, P.T.F *et al.* Expression and purification of recombinant nerotensin in *Escherichia coli*. **Protein Epression and Purification**.n. 19, p. 271-275, 2000.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 4576–4579, 1990

WOLFGANG, S. Refolding & purification of the catalytic subunit from bovine enterokinase expressed in *E.coli*. Structural biology group department of molecular Biology university of Salzburg Billrothstra ß e 115020 Salzburg, Austria, p. 1-17, 2012.

WOOD, K. V. Marker proteins for gene expression. In: (Ed.). **Curr Opin Biotechnol.** England, v.6, 1995. p.50-8. ISBN 0958-1669 (Print)0958-1669.

WÖHLKE, J.L. **Construção de vetores de expressão para *Escherichia coli* baseados em promotores ativos na fase estacionária de crescimento.** 2012. 81f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do AMAZONAS – UFAM, Manaus, Amazonas, 2012.

WOSTEN, M. M. Eubacterial sigma-factors. In: (Ed.). **FEMS Microbiol Rev.** Netherlands, v.22, 1998. p. 127-50. ISBN 0168-6445 (Print)0168-6445 (Linking).

YANG, S.J; HUANG, H.; ZHANG, R.; HUANG, X.; LI, S.; YUAN, Z. Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p.60-64, 2001.

YANG, S. J.; MIN, B. C.; KIM, Y. W.; JANG, S. M.; LEE, B. H. PARK, K. H. Changes in the catalytic properties of *Pyrococcus furiosus* thermostable amylase by mutagenesis of the substrate binding site. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5607-5612, 2007.

YIN, L.-J.; CHOU, Y.-H.; JIANG, S.-T. Purification and Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus Oryzae* BCRC 30118. *J. of Mar. Scie. and Tech.*, v. 21, n. 1, p. 105–110, 2013.

YI-YWAN, M. C.; HUI-RU S.; CHENG-TZER L.; SHIN-YI L. Properties and Construction of Plasmid pFW213, a Shuttle Vector with the Oral Streptococcus Origin of Replication. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, p. 3967–3974. 2011.

YUAN, L.D; HUA, Z.C. Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 25, p. 300-304, 2002.

ZAMOLODCHIKOVA, T.S; SOKOLOVA, E.A; LU, D; SADLER, J.E. Activation of recombinant proenteropeptidase by duodenase. **FEBS Lett.** N. 466, p. 295–299. 2000

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X99909890>

## ANEXO

Tabela 4: Componentes do tampão de corrida para análise em gel de SDS-PAGE.

<b>Tampão de Amostra 2x</b>	
<b>Soluções</b>	
<b>Tris-HCl pH 6,8</b>	100mM
<b>SDS</b>	4,0%
<b>Azul de Bromofenol</b>	0,2%
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol</b>	
<b>Glicerol</b>	20,0%

Tabela 5: Composição do corante de Coomassie blue de detecção de proteínas.

<b>Corante Coomassie Blue (1L)</b>	
<b>Soluções</b>	
<b>Coomassie Blue</b>	2,5g
<b>Metanol</b>	400ml
<b>Ácido Acético Glacial</b>	100ml
<b>Água Milli-Q</b>	450ml

Tabela 6: Composição da solução descorante.

<b>Solução Descorante (1L)</b>	
<b>Soluções</b>	
<b>Metanol</b>	450ml
<b>Ácido Acético Glacial</b>	100ml
<b>Água Milli-Q</b>	450ml