

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Expressão heteróloga de peptídeos fusionados a *elastin-like polypeptide* e avaliação da sua atividade *in vitro* contra *Klebsiella pneumoniae*

Sheila Nara Borges da Silva

Brasília – DF

2018

Sheila Nara Borges da Silva

Expressão heteróloga de peptídeos fusionados a *elastin-like polypeptide* e avaliação da sua atividade *in vitro* contra *Klebsiella pneumoniae*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília para obtenção do título de Mestre.

Orientador (a): Dra. Simoni Campos Dias

Brasília – DF
2018

Agradecimentos

Gratidão aos dias difíceis e desanimadores que me ajudaram a chegar até as últimas palavras deste trabalho. Gratidão às lágrimas e a gastrite desenvolvida neste percurso, também me serviram de incentivo a não desistir.

Gratidão a minha orientadora Simoni que não desistiu e acreditou no meu trabalho, aos co-orientadores não oficiais Osmino Junior e Nicolau Brito que, indiretamente, trabalharam comigo e me ajudaram muito; ao Lubhandwa Sebastian Biswaro pelas análises e quantificações; e ao professor Marcelo Ramada pela paciência e atenção sempre que precisei. Gratidão a professora Margarida Casal, ao Raul Machado, a Ana Margarida e ao André Costa, bons amigos da Universidade do Minho, em Portugal, os quais tive a honra de conhecer e trabalhar. Obrigada por tudo que me ensinaram!

Gratidão aos colegas do laboratório que participaram ativamente de cada resultado, sendo positivo ou negativo, e a todos que me ajudaram sem hesitar.

Gratidão aos meus amigos sempre presentes, que me incentivaram dia após dia, aqueles que torcem pelo meu sucesso e acreditam em mim.

Gratidão às instituições de financiamento e fomento do projeto, CAPES e FAP-DF pela bolsa nesses dois anos, que permitiram uma experiência única de trabalhar na Universidade do Minho, em Portugal; gratidão à Universidade Católica de Brasília por permitir que eu desenvolvesse meu trabalho em suas dependências e aos professores da Universidade de Brasília pela oportunidade de agregar conhecimento a minha carreira acadêmica.

Gratidão a minha família pelo apoio e incentivo, mesmo sem entender o que eu estava fazendo e porquê.

Gratidão pela oportunidade de amadurecimento e crescimento pessoal e profissional neste período, gratidão por todo aprendizado, e pelo trabalho desenvolvido.

Gratidão a Deus, ao Universo, as boas energias e a tudo que é invisível aos olhos, mas sentido com o coração.

RESUMO

As infecções causadas por microrganismos Gram-negativos são crescentes e preocupantes. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) representam uma classe de moléculas com potencial para atuar como agentes de controle microbiano, pois podem apresentar diferentes atividades funcionais no controle de infecções. A utilização desses compostos associados a diferentes estratégias terapêuticas, como a sua incorporação em sistemas de liberação controlada, pode ser um caminho viável na busca de novos agentes antimicrobianos. No presente trabalho foi realizada a produção heteróloga em sistema procarioto utilizando vetor de expressão pET25b⁺ modificado de dois peptídeos: Synoeca-MP e Mastoparano-MO, em diferentes construções - com sítio de clivagem e sem este sítio, fusionados a duzentas repetições da sequência codificadora da *elastin-like polypeptide* (ELP). Após a expressão heteróloga e produção de quatro litros de cada uma das construções, o material foi purificado por histerese térmica, em ciclos a 37°C e a 4°C. Seguindo desse processo, foi realizada a clivagem da *tag* de ELP, confirmada por MALDI TOF. Os peptídeos produzidos heterologicamente e aqueles produzidos quimicamente, foram avaliados quanto a sua atividade contra uma cepa resistente de *K. pneumoniae* (KPC1410503). Os testes apresentaram MIC de 80µM com Synoeca-MP-DP, comparado a 40 µM do mesmo peptídeo sintético, enquanto os Mastoparanos, tanto o biossintetizado quanto o sintético não apresentaram resultados de inibição microbiana *in vitro*.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*; expressão heteróloga; *elastin-like polypeptide*; histerese térmica

ABSTRACT

Infections caused by Gram-negative microorganisms are increasing and worrying. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) represent a class of molecules with potential to act as microbial control agents, once they can show many different functional activities and act in infections control. The use of these compounds associated with different therapeutic strategies, such as their incorporation in controlled release systems, may be a viable path in the search for new antimicrobial agents. In the present work the heterologous production was carried out in a prokaryotic system using the modified pET25b+ expression vector. Two peptides: Synoeca-MP and Mastoparano-MO, in different constructions - with the cleavage site and without this site, fused to two hundred replicates of the elastin-like polypeptide (ELP) coding sequence. After the heterologous expression and production of four liters of each construction, the samples were purified by thermic hysteresis, in different cycles of 37°C and 4°C. After this procedure, the cleavage of the tag of ELP was performed and confirmed by MALDI TOF. Biosynthesized and synthetically produced peptides were tested their activity against a resistant strain of *K. pneumoniae* (KPC1410503). The tests showed MIC of 80 µM with Synoeca-MP-DP, compared to 40 µM of the same synthetic peptide, while the biosynthesized and synthetic mastoparans presented no results of microbial inhibition *in vitro*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; heterologous expression; recombinant biosynthesis; *elastin-like polypeptide*;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esfregaço do isolado de *K. pneumoniae* KPC1410503 corado com solução corante vermelho congo. Observado em microscopia ótica com objetiva de aumento de 100x.....13
- Figura 2:** (A) Estruturas responsáveis pela virulência ou hipervirulência da *K. pneumoniae*; (B) colônia de *Klebsiella pneumoniae* hiperviscosa em placa de ágar MacConkey.....15
- Figura 3:** Cassete com os elementos gênicos dos peptídeos para inserção no vetor pET25b⁺.....26
- Figura 4:** Gel de agarose 1% mostrando mini preparações obtidas dos vetores pUC18 e pBSK.....34
- Figura 5:** Sequência de nucleotídeos obtida a partir do sequenciamento do vetor pUC18 recombinante com o fragmento que codifica o peptídeo Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎.....35
- Figura 6:** Sequência de nucleotídeos obtida a partir do sequenciamento do vetor pBSK recombinante com o fragmento que codifica o peptídeo Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎.....36
- Figura 7:** SDS PAGE 10 % referente ao extrato proteico do cultivo celular de *E.coli* BL21 DE3 transformada com o plasmídeo recombinante após 22 horas de crescimento com indução de lactose. Gel corado com solução de cloreto de cobre.....37
- Figura 8:** SDS PAGE 10 % referente ao extrato proteico do cultivo celular de *E.coli* BL21 DE3 transformada com o plasmídeo recombinante após 22 horas de crescimento com indução de lactose. Gel corado com solução de cloreto de cobre.....38
- Figura 9:** SDS PAGE 10 % referente a purificação do peptídeo Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎. Gel corado com solução de cloreto de cobre.....39

Figura 10: SDS PAGE 10 % referente a purificação do peptídeo Synoeca-MP sem sítio de clivagem. Gel corado com solução de cloreto de cobre.....	40
Figura 11: SDS PAGE 10 % referente a purificação do peptídeo Mastoparano-MO-DP-ELP ₍₂₀₀₎ . Gel corado com solução de cloreto de cobre.....	41
Figura 12: SDS PAGE 10 % referente a purificação do peptídeo Mastoparano-MO sem sítio de clivagem. Gel corado com solução de cloreto de cobre.....	42
Figura 13: Espectro de massa MS do peptídeo Synoeca-MP-DP-ELP ₍₂₀₀₎ após a clivagem ácida.....	44
Figura 14: Espectro de MS/MS do peptídeo Synoeca-MP-DP-ELP ₍₂₀₀₎ após a clivagem e purificação.....	44
Figura 15: Espectro de massa MS do peptídeo Mastoparano-MO-DP-ELP ₍₂₀₀₎ após a clivagem ácida.....	45
Figura 16: Espectro de MS/MS do peptídeo Mastoparano-MO-DP-ELP ₍₂₀₀₎ após a clivagem e purificação.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso seco do sobrenadante após a purificação e liofilização da produção de 4L de cada sistema peptídeo-ELP ₍₂₀₀₎	32
Tabela 2: Comparação das sequências dos peptídeos e das massas moleculares originais e obtidas após a clivagem ácida	35
Tabela 3: Quantificação das frações clivadas: extratos totais clivados sem purificar; sobrenadantes clivados e purificados; e pellets clivados e purificados.	36
Tabela 4: Resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos contra a cepa resistente de <i>K. pneumoniae</i> (Kpc1410503)	38
Tabela 5: Todos os processos realizados, as construções utilizadas e os resultados obtidos desde a produção heteróloga de peptídeos fusionados a elastin-like polypeptides	46

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 Infecções relacionadas a bacilos Gram-negativos.....	1
1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
1.3 Peptídeos antimicrobianos.....	5
1.4 Peptídeos antimicrobianos isolados de artrópodes	6
1.5 Expressão heteróloga de PAMs e a utilização de sistemas carreadores..	9
2 Justificativa	12
3 Objetivos	13
3.1 Objetivos Gerais	13
3.2 Objetivos Específicos.....	13
4 Material e Métodos	14
4.1 Síntese dos genes sintéticos e clonagem do vetor de expressão.....	14
4.2 Transformação genética e produção de DNA plasmidial	15
4.3 Mini preparação do DNA plasmidial.....	15
4.4 Sequenciamento do DNA plasmidial	16
4.5 Expressão dos peptídeos recombinantes em <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	16
4.5.1 Transformação de células de <i>E. coli</i> para expressão da sequência codante dos peptídeos.....	16
4.5.2 Análise da expressão por eletroforese em gel <i>SDS-PAGE</i>	17
4.5.3 Coloração de <i>SDS-PAGE</i>	18
4.6 Produção de grande quantidade de peptídeos recombinantes.....	18
4.7 Purificação dos peptídeos fusionados ao biopolímero.....	18
4.8 Clivagem ácida dos peptídeos	19
4.9 Análise da clivagem por MALDI MS/MS	20
4.10 Quantificação dos peptídeos clivados.....	20
4.11 Ensaios de atividade antimicrobiana com proteínas recombinantes	21

5 Resultados	23
5.1 Clonagem dos peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO.....	23
5.2 Produção e expressão dos peptídeos.....	25
5.3 Purificação dos biopolímeros.....	28
5.4 Clivagem ácida, purificação e quantificação dos peptídeos.....	32
5.5 Ensaio antimicrobiano.....	37
6. Discussão	38
7 Conclusão	47
Referências	48

1 Introdução

1.1 Infecções relacionadas a bacilos Gram-negativos

As infecções associadas aos bacilos Gram-negativos são crescentes, e somente a pneumonia levou a mais de três milhões de mortes em todo o mundo em 2012 (LIU et al., 2017). Estima-se que mais de dois milhões de pessoas são acometidas por infecções bacterianas nos Estados Unidos, gerando mais de 23 mil mortes por este motivo anualmente. No cenário atual existe um potencial para a rápida disseminação de cepas multirresistentes, com a diminuição das opções de tratamento e resultando no aumento dos custos das internações e aos altos índices de mortalidade dos pacientes (KAYE; POGUE, 2015). Algumas espécies bacterianas são representativas no que diz respeito à causa de infecções em escala global. As bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* são responsáveis por cerca de 70% dos casos registrados de infecções no mundo causadas por patógenos Gram-negativos. No âmbito geral, elas respondem por cerca de 27% das infecções causadas em hospitais (KAYE; POGUE, 2015).

Estes microrganismos podem acometer os pulmões, o trato urinário e podem causar bacteremia, meningite e abscessos. Estas infecções têm maior incidência em indivíduos imunossuprimidos e aqueles hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), os quais são submetidos a procedimentos mais invasivos e comumente utilizam equipamentos como cateteres, o que aumenta o risco de infecções hospitalares (PILONETTO et al., 2004; WEINER et al., 2016).

1.2 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* caracteriza-se por apresentar microrganismos bacilares Gram-negativos (figura 1), fermentadores de lactose, que colonizam o trato gastrointestinal, podendo causar infecções no ambiente hospitalar e na comunidade. A mais importante espécie do seu gênero, *K. pneumoniae* pode acumular mecanismos de resistência baseados na síntese e na atividade de enzimas, como a betalactamase de espectro estendido (ESBL); a

carbapenemase (KPC); a metalobetalactamase (MBL); e a betalactamase classe C (AmpC) (JAIDANE et al., 2017; PROKESCH et al., 2016).

A espécie *K. pneumoniae* apresenta mecanismos não enzimáticos de resistência a agentes antimicrobianos, como estruturas que conseguem evadir o sistema imune, conhecidos como fatores de virulência, que serão discutidos mais adiante. Estes mecanismos tornam a *K. pneumoniae* resistente a grande maioria dos medicamentos disponíveis, incluindo beta-lactâmicos, carbapenêmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e colistina (JAIDANE et al., 2017; PROKESCH et al., 2016).

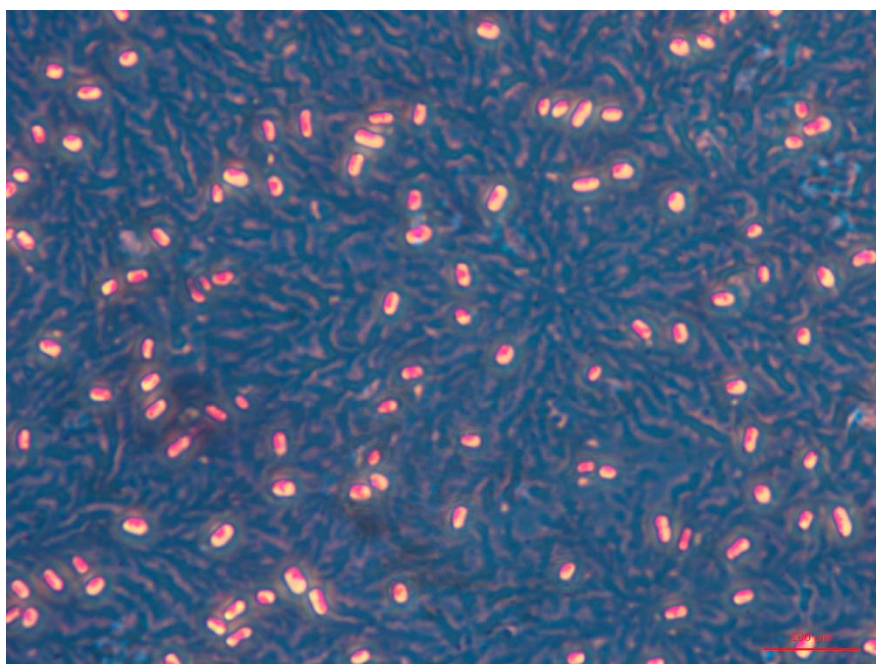


Figura 1: Esfregaço do isolado de *K. pneumoniae* KPC1410503 corado com solução vermelho congo. Observado em microscopia ótica com objetiva de aumento de 100x. Em vermelho a célula bacteriana e em branco a cápsula. Foto: Arthur Corrêa Resende Ferreira

O aumento da virulência ou a hipervirulência (hvKP) encontrada em algumas cepas dessa espécie tem aumentado significativamente nas últimas décadas, determinando o aumento de infecções invasivas e que facilmente se disseminam, aumentando os índices de mortalidade de 27 para 37% na Europa (CHETCUTI ZAMMIT; AZZOPARDI; SANT, 2014; CORTÉS et al., 2002). Os fatores que estabelecem a virulência desses organismos são a cápsula polissacarídica (CPS), a produção de hipercápsulas em cepas hipervirulentas, a presença de lipopolissacarídeos tóxicos na membrana externa (LPS),

sideróforos sequestrantes de ferro e fímbrias adesivas (figura 2) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

A CPS é essencial para a virulência da *K. pneumoniae*. As cepas que não possuem cápsula são muito menos virulentas que as encapsuladas, enquanto as cepas hipervirulentas produzem uma hipercápsula hiperviscosa (DOMENICO et al., 1994; PACZOSA; MECSAS, 2016; YEH et al., 2007).

O LPS é um componente necessário à porção externa da membrana celular das bactérias Gram-negativas e é também um importante fator de virulência que serve como obstáculo contra as defesas imunológicas do hospedeiro. Composto pelo antígeno O, pelo lipídio A e um núcleo oligossacarídeo, acredita-se que o LPS sofre modificações para evadir o reconhecimento pelo sistema imune, como atenuação da acilação do lipídio A e a plasticidade desta mesma porção, já que uma vez reconhecido, o LPS pode atuar contra o microrganismo ativando as células pró-inflamatórias (PACZOSA; MECSAS, 2016).

O elemento ferro é um dos recursos necessários para que os microrganismos prosperem durante a infecção, com exceção de certos lactobacilos. No entanto, este metal não fica disponível durante um quadro infeccioso porque o hospedeiro restringe-o como forma de resposta imune não específica, a fim de evitar a propagação de possíveis agentes patogênicos (CARNIEL, 2001). Uma das estratégias utilizadas pelos microrganismos, incluindo a *K. pneumoniae*, é adquirir ferro através da secreção de sideróforos, moléculas que possuem maior afinidade pelo ferro que àquelas proteínas transportadoras do hospedeiro. Sideróforos podem roubar o metal quelado com outras proteínas, garantindo assim a sobrevivência do patógeno (MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

As fímbrias, por sua vez, são responsáveis por mediar a adesão da *K. pneumoniae* aos tecidos a serem colonizados. As fímbrias do tipo 1 são finas, possuem uma protuberância na porção final, sendo responsáveis pela invasão celular e são expressas por 90% das cepas deste patógeno (KLEMM; SCHEMBRI, 2000; STAHLHUT et al., 2009). As do tipo 3 são filamentosas do tipo hélice, não se ligam a manose e estão envolvidas na produção de biofilmes (figura 2) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

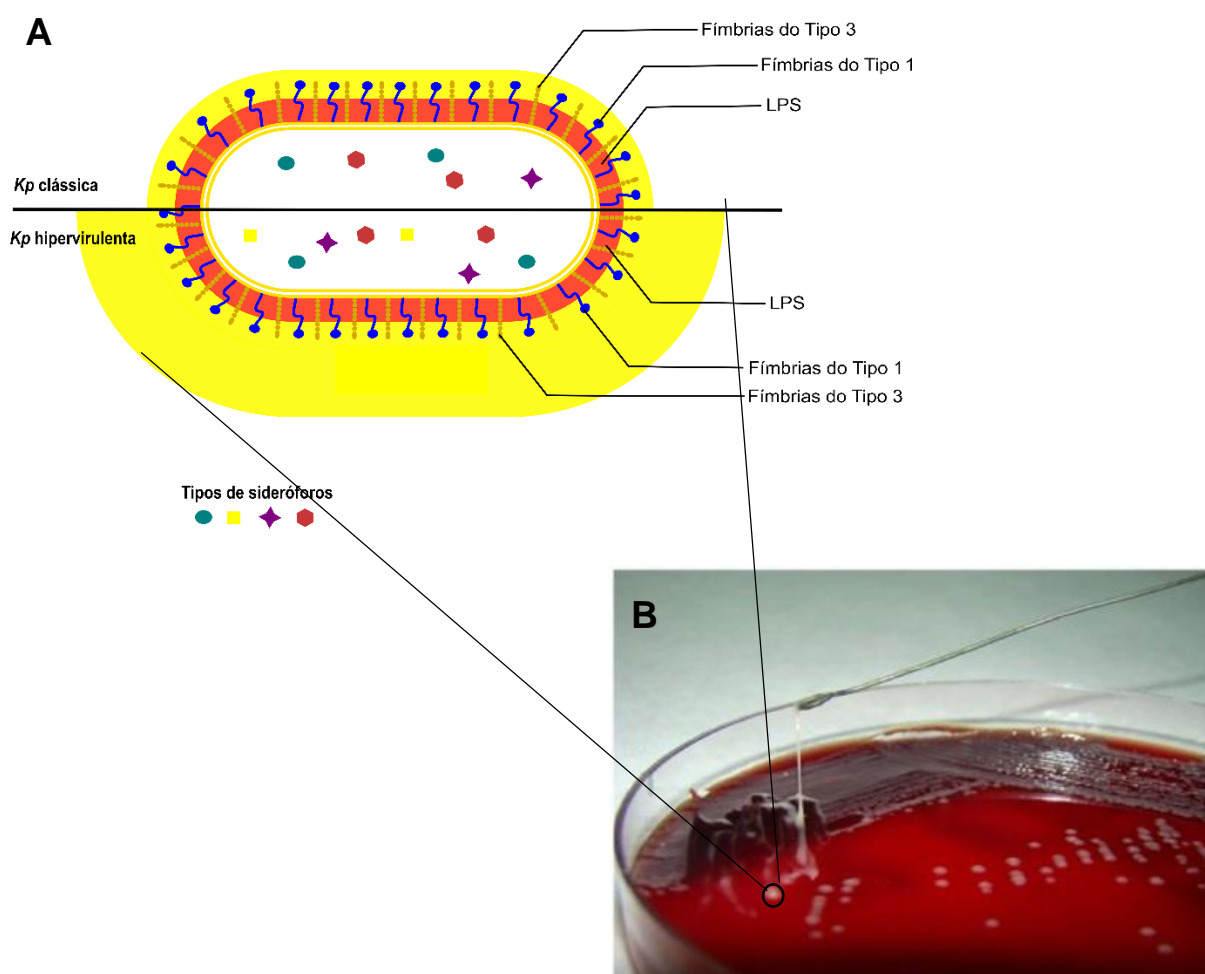


Figura 2: (A) Estruturas responsáveis pela virulência ou hipervirulência da *K. pneumoniae* (Adaptado de Paczosa e Mecsas, 2016); (B) colônia de *Klebsiella pneumoniae* hiperviscosa em placa de ágar MacConkey (Chung, 2016).

As cepas de *K. pneumoniae* codificam vários tipos dessas moléculas e a virulência de cada um varia, mas a produção de vários tipos pode explicar a neutralização da resposta imune e a colonização bem-sucedida de vários tecidos (MIETHKE; MARAHIEL, 2007; PACZOSA; MECSAS, 2016).

Atualmente, a alternativa encontrada para o tratamento das *K. pneumoniae* carbapenemases resistentes (KPCs) tem sido a terapia combinada de diferentes medicamentos, pertencentes a diferentes classes, com diferentes mecanismos de ação (CAMARGO et al., 2015; DAIKOS et al., 2007).

1.3 Peptídeos antimicrobianos

Diante do problema de aumento da resistência microbiana aos antibióticos usualmente utilizados em tratamentos médicos e da necessidade de prospecção de novas moléculas, eficientes para combater bactérias patogênicas, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma alternativa promissora aos compostos terapêuticos tradicionais (GWYNN et al., 2010).

Essas pequenas moléculas são formadas de cinco a cinquenta resíduos de aminoácidos e possuem diversas modificações quanto a sua forma e estrutura, que variam de acordo com a presença e distribuição de cargas, com a sequência de resíduos de aminoácidos na estrutura primária, e com as suas estruturas tridimensionais. São divididos em diferentes grupos de acordo com sua estrutura, a saber: folha beta, α -hélice, estendido ou em forma de *loop* (aqueles que possuem uma ponte dissulfeto formando uma alça) (AGNIESZKA, 2014; LEITE; DA CUNHA; COSTA, 2017) e classificados com base na sua estrutura físico-química: catiônicos, aniônicos, anfipáticos ou hidrofílicos (LEITE; DA CUNHA; COSTA, 2017; MULDER et al., 2013; PINHEIRO DA SILVA; MACHADO, 2012).

Os PAMs são considerados como componentes da imunidade inata de milhares de organismos, tanto invertebrados como vertebrados, terrestres e marinhos (DENNISON et al., 2006; WANG, 2014). Como mecanismos de ação, eles podem apresentar diferentes tipos de interações, relacionadas com suas estruturas primária e secundária (LEUSCHNER; HANSEL, 2004; WANG, 2014). Sendo que a maioria das interações ocorre entre os peptídeos que são, em sua maioria, catiônicos, e a membrana plasmática dos microrganismos, que é rica em fosfolípidos, o que gera uma carga final negativa (YEAMAN, 2003).

Esse contato pode ser do tipo não permeabilizante, como a translocação via *sinking raft*, quando o peptídeo interage com a membrana provocando um desbalanço de cargas e “afundando” nela; ou permeabilizante, que possui os modelos mais conhecidos, como poro tipo barril, poro toroidal, modelo de carpete, modelo detergente, modelo de agregação, agrupamento lipídico por cargas, entre outros (LEE; N. HALL; AGUILAR, 2015; WANG et al., 2015).

Há ainda mecanismos de ação em que os PAMs não causam nenhum dano a membrana, mas agem em alvos intracelulares como o DNA e o RNA - induzindo a apoptose ou necrose celular; e nas proteínas - inibindo a atividade de quinases e proteases. Normalmente, estes peptídeos apresentam alta eficiência no combate de células cancerígenas (BHUTIA; MAITI, 2008; LI et al., 2012).

Um dos fatores limitantes na prospecção de PAMs é que são encontrados em pequenas quantidades nos organismos que os produzem. A extração dessas moléculas de fontes naturais é uma prática que requer muito tempo e o resultado pode não ser tão satisfatório, haja vista que a quantidade dessas moléculas presentes nos organismos pode ser menor que a esperada (ZHOU et al., 2009).

Outro problema é que mesmo os PAMs sendo moléculas tão eficientes e apresentarem potencial atividade antimicrobiana, alguns deles não demonstraram atividade em casos de infecções sistêmicas e sabe-se que uns microrganismos já desenvolveram resistência a essas moléculas (AKHTAR et al., 2012). A evolução de algumas bactérias Gram-negativas faz com que estes organismos utilizem enzimas celulares com a finalidade de alterar bioquimicamente e diminuir a carga líquida negativa de suas membranas celulares, diminuindo assim a interação e consequente atividade dos peptídeos nesta estrutura (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010).

1.4 Peptídeos antimicrobianos isolados de artrópodes

Devido ao constante contato com diversos organismos e diante da necessidade de se defender, os artrópodes desenvolveram um sistema de glândula de peçonhas, utilizado para dominar as presas (KUHN-NENTWIG, 2003; RAVI; JEYASHREE; RENUKA DEVI, 2011). A peçonha dos artrópodes é composta por diversos compostos, neurotoxinas e enzimas, além íons e aminoácidos, atuando como fonte de substâncias bioativas (KOZLOV et al., 2006).

Os insetos sociais como as abelhas, vespas e cupins, estão mais susceptíveis ao que ocorre no meio em que vivem devido ao convívio muito próximo dos indivíduos na colônia e por apresentarem baixa variabilidade

genética, fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças infecciosas. Como consequência, é comum isolar da peçonha desses insetos um número expressivo de peptídeos antimicrobianos (BARACCHI; MAZZA; TURILLAZZI, 2012).

A peçonha das vespas têm atraído especial atenção de grupos de prospecção de PAMs por serem fontes de substâncias bioativas, de proteínas com diversas ações, sendo a atividade antimicrobiana a principal delas, e com grande variedade de PAMs com baixa massa molecular (MORTARI et al., 2012).

Um número significativo de PAMs bioativos já foi isolado da peçonha de vespas. Esses PAMs têm sido classificados de acordo com sua estrutura química e com a atividade biológica que apresentam, com atenção especial àqueles com potenciais ações contra bactérias resistentes (ČEŘOVSKÝ et al., 2008; DOS SANTOS CABRERA et al., 2008).

Os mastoparanos são a classe de PAMs mais abundante encontrados na peçonha de vespas sociais e solitárias (SILVA, 2015). Apresentam características catiônicas e a presença de aminoácidos hidrofóbicos que tendem a se organizar numa conformação do tipo α -hélice (LEITE; DA CUNHA; COSTA, 2017) Eles apresentam atividades biológicas variadas, tais como hemólise; antimicrobiana; ativação enzimática - como das fosfolipases A2 e C, que promovem o aumento do edema e lesão tecidual, ativam a liberação de histamina por degranulação de mastócitos; apresentam a capacidade de se ligar a calmodulina; aumentam a atividade da guanosina trifosfato (GTP) – que regula a proteína G e atua como um receptor acoplado a esta (HENRIKSEN et al., 2014). Além disto, possuem atividade na indução da quimiotaxia de neutrófilos e células T *helper* resultando no recrutamento de outros leucócitos (HENRIKSEN et al., 2014; JÚNIOR, 2012; SILVA, 2015).

O mastoparano-L é um tetradecapeptídeo (INLKALAALAKKIL-NH₂), que foi isolado do veneno da vespa *Vespula lewisii* (HIRAI et al., 1979). Segundo Avram e colaboradores, a principal função biológica deste peptídeo é a proteção contra predadores e defesa do ninho contra invasores (AVRAM et al., 2012).

Outras funções são atribuídas a este peptídeo, atuando como um potente estimulador da exocitose em células de mamíferos, promovendo a secreção de

histamina, serotonina, catecolamina e prolactina. Nas ilhotas pancreáticas estimula a liberação de insulina e glucagon através de proteínas reguladoras ligadas a guanosina trifosfato (GTP), e ainda promove a liberação de Ca^{++} (AVRAM et al., 2012; CHEN et al., 2008; RATES et al., 2011; SOUZA et al., 2015). Em geral, essas moléculas apresentam atividade citolítica, hemolítica, além de promover a degranulação de mastócitos e a quimiotaxia de leucócitos (SILVA, 2015).

O peptídeo Mastoparano-MO foi obtido por redesenho do peptídeo comercial Mastoparano-L, adicionando-se cinco resíduos de aminoácidos apolares na região C-terminal da sequência primária (**FLPIIINLKALAALAKKIL-OH**) (SILVA, 2015), com objetivo de reduzir a citotoxicidade do primeiro descrito (MISHRA et al., 2013; ZHANG et al., 2008). Com esta modificação, Silva e colaboradores relatam que a concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo modificado foi, aproximadamente, 50% menor que as MICs apresentadas pelo peptídeo não modificado em bactérias Gram-positivas e que o peptídeo modificado não apresentou toxicidade às células de mamífero testadas em concentrações de até $400\mu\text{M}$, valor 10 vezes mais elevado que aqueles obtidos de outros peptídeos avaliados no mesmo estudo (SILVA, 2015).

Em 2011, Freire isolou um peptídeo com características antimicrobianas da peçonha da vespa *Synoeca surinama*, denominado Synoeca-MP. Sua estrutura primária (INWLKLGKKIIASL-NH₂) apresenta massa molecular de 1597Da. Nos testes de inibição de crescimento microbiano contra KPC cepas padrão ATCC (BAA 1705s e BAA 1705r), o peptídeo apresentou 100% de inibição com doses acima de $4,7\mu\text{M}$ e nos testes de atividade hemolítica, o Synoeca-MP apresentou os resultados EC₅₀ de $185\mu\text{M}$, o que indica que 50% das células eucariontes testadas sofrem hemólise em doses a partir de $185\mu\text{M}$, valor muito acima daqueles obtidos nos MICs (FREIRE, 2011).

Pertencente a um gênero com poucas espécies, a vespa social *Synoeca surinama* compõe uma das cinco espécies que formam este grupo que tem por habitat as florestas tropicais, e são comuns nas Américas e podem ser encontrados do México até a Argentina (MENEZES et al., 2015).

Apesar da similaridade de sequência deste peptídeo com os demais mastoparanos, ainda não foram realizados experimentos que comprovem que o

Synoeca-MP possui capacidade de estimular o processo inflamatório como o Mastoparanos-MO realiza.

1.5 Expressão heteróloga de PAMs e a utilização de sistemas carreadores

Para a utilização dos PAMs tanto para finalidades biológicas, como a pesquisa de mecanismos de ação e da relação estrutura-atividade, quanto para aplicações farmacêuticas e comercialização de produtos a partir destas moléculas, é necessário a obtenção uma grande quantidade de peptídeos ativos e puros (LI; CHEN, 2008).

O isolamento da molécula direto do organismo que a produz, a síntese química e a expressão via sistema heterólogo, são os métodos descritos na literatura para a produção dessas moléculas (INGHAM; MOORE, 2007). A extração direta do organismo, como mencionado, é demorada e pode ser insatisfatório financeiramente para a indústria. Já a síntese química é cara para aqueles peptídeos com sequências com mais de dez resíduos de aminoácidos, podendo ter o custo mais elevado caso estejam presentes nas sequências pontes dissulfeto ou outras modificações pós-traducionais (LI et al., 2012). A fim de exemplificar, temos que o valor da síntese química de 300 mg do peptídeo Synoeca-MP, formado por 14 resíduos de aminoácidos, custa R\$4.000,00, ou seja, o custo de produção química de cada resíduo é R\$285,71.

O uso do sistema de expressão heteróloga para produção de PAMs teve significativo aumento, mas para a escolha do sistema a ser utilizado, deve-se levar em conta diversos aspectos, tais como o tamanho da proteína ou peptídeo, a necessidade de realização e o tipo de modificações pós-traducionais, a localização intracelular ou o ambiente extracelular onde a molécula será secretada. De maneira geral, os sistemas de expressão heteróloga mais utilizados para a síntese recombinante dessas moléculas são bactérias, notadamente *E. coli*; *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) como os principais reatores eucarióticos (PARACHIN et al., 2012).

Nesse contexto, vale ressaltar que PAMs são tóxicos para as células que os expressam e que eles podem ser facilmente degradados devido ao seu

pequeno tamanho e à sua alta cationicidade. Algumas estratégias podem ser empregadas para aumentar a estabilidade estrutural dessas moléculas e diminuir a possibilidade de degradação proteolítica. Uma das estratégias mais eficientes é a fusão dos PAMs a carreadores ou *tags*, que protegem tanto o peptídeo quanto a célula hospedeira (LI et al., 2014).

Proteínas de diferentes tamanhos e com diferentes propriedades podem ser utilizadas como carreadoras de PAMs. As mais utilizadas são: proteína de ligação à maltose (MBP), glutathione S-transferase (GST), *elastin-like polypeptide* (ELP), *small ubiquitin like modifier* (SUMO) e tioredoxina A (TrxA) (DENG et al., 2017).

Logo, quando os PAMs são acoplados a algum sistema carreador, este deve apresentar uma série de características de interesse, a depender dos detalhes de sua aplicação particular. Em diversos casos, os sistemas carreadores envolvem proteínas ou polímeros que, dependendo da sua composição, podem ser classificados como polímeros sintéticos, biopolímeros ou sistemas híbridos, os quais contêm tanto componentes sintéticos quanto porções biomoleculares (XU, CHUNYU; KOPECK, 2008).

Polímeros baseados em proteínas (PBPs) são biopolímeros artificiais baseados naqueles encontrados na natureza. Eles são, basicamente, adaptações das proteínas, utilizando a mesma sequência de aminoácidos que ocorrem naturalmente nestas moléculas, como elastina, colágeno e queratina (COLLINS et al., 2013a). Essas macromoléculas poliméricas são baseadas em repetições de blocos de aminoácidos que definem a estrutura e as propriedades desses materiais, diferenciando-os dos polímeros sintéticos por permitirem que a composição, a sequência e o tamanho dos PBPs sejam controlados (COLLINS et al., 2013a; MACHADO et al., 2015).

Ainda sobre as vantagens de utilizar essas *tags*, podemos citar que a maioria não possui interferência na atividade dos peptídeos, a facilidade na purificação após a expressão de grandes quantidades e a retirada do carreador são os maiores benefícios desse sistema de fusão. No complexo geralmente há um sítio para a clivagem e separação das moléculas e, no caso das *elastin-like polypeptides* (ELP) utilizadas no presente trabalho, a purificação pode ser

realizada por histerese térmica, não sendo necessário o uso do processo de cromatografia (DENG et al., 2017; YANG et al., 2012).

As ELPs são PBP's compostas por múltiplas repetições de elastina que combinam as propriedades mecânicas e biológicas desta proteína, a qual é um dos principais componentes da matriz extracelular, promove a elasticidade dos tecidos e está intimamente ligada a promoção da reparação tecidual (COLLINS et al., 2014; GIROTTI et al., 2011).

São formadas por blocos de aminoácidos com a sequência baseada no pentâmero (VPGXG) n , nas proporções de resíduos de aminoácidos e sequência de repetições de acordo com as propriedades desejadas do polímero, sendo X substituído por qualquer aminoácido, exceto Prolina, e n é o número de repetições do bloco (GIROTTI et al., 2011; MACHADO et al., 2013a).

De acordo com Rodriguez-Cabello (2004), devido à natureza das ELPs, não é possível obter anticorpos monoclonais contra essas moléculas uma vez que o sistema imune não as diferencia da elastina natural (RODRIGUES-CABELLO, 2004). Esses tipos de moléculas são de grande interesse para a fabricação de micro e nano estruturas com potenciais uso na engenharia de tecidos, como biomateriais responsivos, materiais funcionais e ainda podem ser usados como plásticos biodegradáveis (COLLINS et al., 2013a). Os processos de clivagem descritos na literatura são realizados, em sua maioria, aproveitando as propriedades de *self-assembly* das ELPs, utilizando tampões específicos que “soltam” esses polímeros dos peptídeos e a clivagem enzimática por afinidade está entre as mais utilizadas dentre essas opções (ARNAU et al., 2006; SHEN et al., 2010; YANG et al., 2012).

Entre todas as propriedades já citadas, a mais interessante delas é a capacidade das ELPs se auto organizarem conforme a temperatura a qual são submetidas. O pentâmero VPAVG, derivado do bloco de aminoácidos VPGVP, apresentou um comportamento singular, o polímero quando submetido a altas temperaturas tem a capacidade de se auto organizar e quando submetido a baixas temperaturas ele se ressolubiliza em meio aquoso, ou seja, é um processo reversível. Uma vez que essas moléculas estão abaixo da temperatura de transição (4°C), elas permanecem em um estado não organizado; e quando a temperatura é superior a faixa de transição (37°C), elas tornam-se insolúveis e

em um estado organizado. A este processo dá-se o nome de histerese térmica (GIROTTI et al., 2011).

2 justificativa

Considerando que muitas cepas de *K. pneumoniae* têm adquirido resistência a múltiplos antibióticos, torna-se extremamente importante a busca por novas alternativas para o controle destes microrganismos. Peptídeos antimicrobianos têm sido indicados como uma nova classe de compostos com atividade antibiótica, imunomodulatória e até mesmo antitumoral. A utilização desses compostos com a sua incorporação em sistemas de liberação controlada, pode ser um caminho viável na busca de novos biofármacos com perfil de liberação diferenciados, além da facilidade de purificação dessas moléculas a baixos custos. Neste sentido, este trabalho utiliza da técnica de expressão em sistema heterólogo para a produção de dois peptídeos com alvos de ação diferentes, porém complementares: atividade imunomodulatória do Mastoparano-MO, e atividade antimicrobiana do peptídeo Synoeca-MP. Além disto, a fusão dos peptídeos a *tag do* polímero biodegradável pode permitir a proteção dos PAMs contra degradação proteolítica e também permite a proteção da célula hospedeira, visto que os peptídeos podem ser tóxicos. Além dessas vantagens, pode-se contar com a obtenção de moléculas purificadas através de um processo de baixo custo.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Produzir em sistema heterólogo os peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO, ambos fusionados ao polímero *elastin-like polypeptide* (ELP) e, avaliação da atividade antimicrobiana destes PAMs *in vitro* contra *Klebsiella pneumoniae*.

3.2 Objetivos Específicos

Biossintetizar a sequência primária dos peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO utilizando células de *E. coli*.

Produzir peptídeos recombinantes e purificá-los.

Clivar os peptídeos Synoeca-MP-DP e Mastoparano-MO-DP biossintetizados em sistema heterólogo, separando-os da *tag* de ELP; purificá-los e avaliar a atividade antimicrobiana das moléculas separadas contra cepa multirresistente de *K. pneumoniae* (Kpc1410503).

Obter a concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO, produzidos sinteticamente, contra cepa multirresistente de *K. pneumoniae* (Kpc1410503).

4 Material e Métodos

4.1 Síntese dos genes sintéticos e clonagem do vetor de expressão

Os genes que codificam os peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO foram sintetizados, respectivamente, de acordo com a sequência codificadora do peptídeo isolado da peçonha da vespa *Synoeca surinama* (FREIRE, 2011), e da sequência do peptídeo Mastoparano-L (SILVA, 2015). Ambos os genes foram sintetizados pela empresa Eptech Biolabs (www.epochlifescience.com) e clonados nos vetores pUC18 (2686pb) e pBSK (2949pb), respectivamente.

Os sítios das endonucleases de restrição *NdeI* e *KpnI* foram adicionados às extremidades 5' e 3' do gene, visando permitir a subclonagem no vetor de expressão pET25b⁺. O vetor de expressão pET25b⁺ foi modificado com a adição de duzentas repetições da sequência codificadora da *elastin-like polypeptide* (ELP), e contendo na extremidade N-terminal um sítio de clivagem para ácido fórmico composto por um resíduo de ácido aspártico e um resíduo de prolina (DP) (figura 3).

Além desta construção, também foram sintetizadas construções gênicas codificadoras com o sítio de clivagem portadores dos aminoácidos em posições invertidas (PD), afim de avaliar se a clivagem era mais eficiente; e um terceiro sistema sem a presença do sítio de clivagem.

Primeiramente, os vetores contendo a sequência codificadora dos peptídeos foram digeridos com as endonucleases de restrição *NdeI* e *KpnI* e os fragmentos originários da digestão foram subclonados no vetor de expressão pET25b⁺ modificado formando o cassete de expressão pET25b-peptídeo-ELP₍₂₀₀₎ (figura 3).

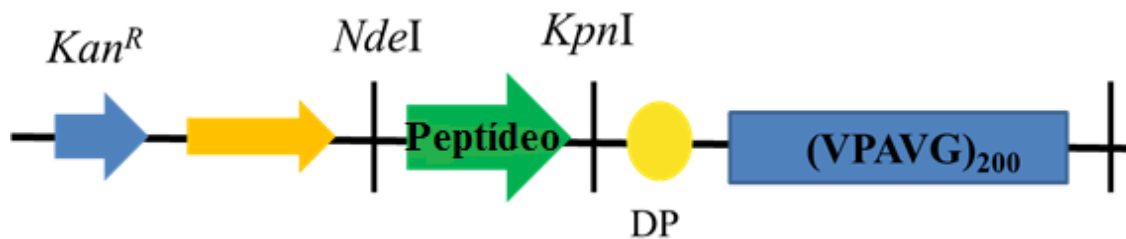


Figura 3: Cassete de expressão utilizado para produção heteróloga dos peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO no vetor pET25b⁺ modificado. As construções Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, Synoeca-MP-PD-ELP₍₂₀₀₎, Synoeca-MP sem sítio de clivagem, Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎, Mastoparano-MO-PD-ELP₍₂₀₀₎ e Mastoparano-MO sem sítio de clivagem estão inseridas no vetor pET25b⁺ modificado sob controle do promotor híbrido T7/Lac. Os peptídeos têm fusionado à sua extremidade C-terminal 200 repetições de ELP (VPAVG). Os sítios de restrição *NdeI* e *KpnI* foram adicionados às extremidades N e C-terminal dos peptídeos para permitir a posterior subclonagem no vetor de expressão.

4.2 Transformação genética e produção de DNA plasmidial

O plasmídeo pET25b-Peptídeo-ELP₍₂₀₀₎ foi transformado em células de *E. coli*, linhagem XL1-blue, transformadas por eletroporação. Posteriormente, as células foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB) – Triptona 10g.L⁻¹, Extrato de levedura 5g.L⁻¹ e NaCl 10g.L⁻¹ - contendo 100 µg.mL⁻¹ de canamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 16h. Uma colônia selecionada foi então inoculada em meio LB líquido contendo 50 µg.mL⁻¹ canamicina sob a mesma temperatura e tempo, a 180 rpm, e procedeu-se à extração do DNA plasmidial (SAMBROOK, 2012)

4.3 Mini preparação do DNA plasmidial

Para a obtenção do DNA plasmidial foi realizada a técnica de mini preparação, através do Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep Kit, com as especificações do fabricante (Invitrogen™). As células transformadas com os plasmídeos do Synoeca-MP-DP, Synoeca-MP sem sítio de clivagem, Mastoparano-MO-DP e Mastorano-MO sem sítio de clivagem, foram centrifugadas por 2 minutos a 14000rpm, em seguida o sobrenadante foi descartado. No pellet foi acrescentado 250µL do tampão 1 contendo RNase, e após vortexado foi acrescentado 250µL do tampão 2 e homogeneizado por

inversão 5 vezes, depois acrescentado 350µL do tampão 3 e misturado por inversão 10 vezes. O tubo foi colocado para centrifugar por 12 minutos a 14000rpm. O sobrenadante foi coletado e acrescentado em uma coluna de sílica, a qual foi centrifugada por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi lavada com 750µL do tampão de lavagem, centrifugada por 2 minutos e descartado o sobrenadante presente no tubo. Para a obtenção do DNA presente na coluna foi utilizado água MilliQ autoclavada, a coluna foi transferida para outro tubo e foi feita uma centrifugação por 1 minuto a 12000 RPM (SAMBROOK E RUSSELL, 2001). O DNA plasmidial extraído foi avaliado quanto a sua qualidade em um gel de agarose 1%, no qual foi aplicado 3µL de DNA e 5µL do tampão de amostra.

4.4 Sequenciamento do DNA plasmidial

O DNA obtido, por meio da mini preparação das células XL1blue de 10 colônias de cada construção, foi sequenciado para verificar se a sequência que codifica os peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO estavam corretas. O sequenciamento foi feito utilizando dois primers T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') e SP6 (5'ATTTAGGTGACACTATAG3'), no sequenciador automático ABI 3130xl Applied Biosystems.

4.5 Expressão heteróloga em *E. coli* BL21 (DE3)

4.5.1 Transformação de células de *E. coli* para expressão da sequência codante dos peptídeos

Os vetores de expressão pET25b-Peptídeo-ELP₍₂₀₀₎ (Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, Synoeca-MP sem sítio de clivagem; Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎ e Mastoparano-MO sem sítio de clivagem) foram inseridos em células eletrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) por eletroporação, utilizando 1ng de DNA proveniente da mini preparação plasmidial e 40µL de células eletrocompetentes. As células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação e levada ao eletroporador, utilizando uma voltagem de 1,8kV. Após a transformação, as células foram ressuspensas em 800µL de meio LB, transferidas para um microtubo e levadas a uma estufa a 37°C por 40 minutos.

Após este tempo, 100µL da cultura foram plaqueados em meio LB Ágar enriquecido com canamicina (50mg/mL). As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 12 horas.

Duas colônias crescidas na placa com antibiótico e uma colônia de BL21 (DE3) sem transformar foram selecionadas para avaliar a expressão da proteína recombinante, utilizando a lactose como agente indutor.

As colônias cresceram em Erlenmeyer de 1L contendo 500mL de meio Terrific broth (TB) (extrato de levedura 24 g.L⁻¹, triptona 12 g.L⁻¹, glicerol 5.04 g.L⁻¹ e K₂HPO₄ 12.54 g.L⁻¹) suplementado com canamicina (50 mg.L⁻¹) em agitador rotativo a 220 rpm por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 0,2% de lactose em cada cultura, e deixadas em agitador rotativo a 200 rpm, 37°C por 22h.

4.5.2 Análise da expressão heteróloga por eletroforese em gel SDS-PAGE

Após o crescimento bacteriano de 22 horas sob agitação à temperatura de 37°C, 100µL de cada amostra (em triplicata) foram aplicados em uma placa de 96 poços para a obtenção da densidade ótica (OD₆₀₀). Em seguida foi realizado uma leitura da densidade ótica do crescimento microbiano utilizando o equipamento espectrofotômetro (BioTek Power Waver, HT, EUA). Em placa de ELISA de 96 poços, o cálculo para a análise dos extratos proteicos das amostras foi realizado segundo a equação abaixo:

$$ODi \times Vf = ODf \times Vi$$

Sendo que ODi (densidade ótica inicial) representa a densidade ótica da cultura crescida por 22h, ODf (densidade ótica final) é o valor da densidade ótica estipulado como ideal para ser observado no gel – de 0,1; Vi (volume inicial) volume total de amostra no microtubo – de 125µl; e Vf (volume final) volume a ser obtido na equação e que será aplicado no poço do gel.

Obtido o volume a ser aplicado no gel, 1mL de cada cultura foi coletado e centrifugado por 20 minutos a 14000 RPM, o sobrenadante foi removido, adicionado 100µL de TE (10mL 1M Tris-HCl pH 8 e 400µL de 0,25M EDTA) e 25µL de tampão de amostra 5x, as amostras foram vortexadas e deixadas no

gelo por 10 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 20 minutos a 14000rpm. O volume de cada amostra obtido no cálculo a seguir foi aplicado nos poços do gel de poliacrilamida 10% (DUNN, 1994).

4.5.3 Coloração de SDS-PAGE

Após a corrida (25mA por gel, por aproximadamente 2h), o gel de poliacrilamida a 10% (LAEMMLI, 1970) foi lavado com água destilada e uma solução de cloreto de cobre (CuCl_2) – 28g de CuCl em 50mL de água destilada - foi adicionada. Após 20 minutos ou mais à temperatura ambiente e em agitador, o gel foi analisado quanto a presença de bandas na região aproximada das proteínas recombinantes.

4.6 Produção de maior quantidade peptídeos recombinantes

Foram preparados 10 mL de pré-inóculos em tubos falcons de 50 mL contendo meio Luria Bertani (LB) – Triptona 10g.L^{-1} , Extrato de levedura 5g.L^{-1} e $\text{NaCl } 10\text{g.L}^{-1}$ – suplementado com $10\mu\text{L.mL}^{-1}$ de canamicina e uma colônia transformada com os plasmídeos que codificam os peptídeos Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, Synoeca-MP sem sítio de clivagem; Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎ e Mastoparano-MO sem sítio de clivagem. Os tubos foram mantidos sob agitação a 200 rpm, por 12 horas a 37°C. Após esse tempo, uma alíquota de cultura foi inoculada em 500mL de meio TB (extrato de levedura 24 g.L^{-1} , triptona 12 g.L^{-1} , glicerol 5.04 g.L^{-1} e $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{ } 12.54\text{ g.L}^{-1}$) e canamicina (50 mg.L^{-1}), divididos em 2 Erlenmeyers de 1L, e mantido sob as mesmas condições do pré-inóculo por uma hora. Após esta hora, foi adicionado o indutor lactose, na concentração de 0,2% e as amostras mantidas sob agitação, a 37°C por 22 horas.

4.7 Purificação dos peptídeos fusionados ao biopolímero

Após as 22 horas de indução anteriormente citada, as amostras foram centrifugadas a 4°C, e os pellets ressuspendidos em 20mL de tampão de extração TE (50mM Tris + 1mM EDTA, pH=8), e mantido em gelo até a completa solubilização. Feito isso, com as amostras sempre em gelo, as células foram sonicadas (Sonicador Vibra Cell, UnitechUSA, USA) a 60% de amplitude por

uma hora: 3" de pulso on e 9" de pulso off. Foi acrescentado uma solução de HCl 37%, ajustando o pH entre 3 e 3,5, para a precipitação do *debris* celular (MACHADO *et al.*, 2013)..

As amostras foram então centrifugadas a 9500rpm por 20 minutos ou até se obter um sobrenadante completamente límpido. A partir disto, os sobrenadantes foram mantidos a 37°C por 1-2 horas (ou até ficarem com aspecto leitoso), centrifugados a 9500rpm por 20 minutos, a 37°C. Os pellets formados foram ressuspensos em 15mL de água fria (4°C) e as amostras vortexadas e mantidas a 4°C por, aproximadamente, 2 horas (ou até a completa solubilização), seguindo com uma centrifugação a 9500rpm, por 20 minutos a 4°C. Os pellets resultantes foram descartados e os sobrenadantes submetidos aos ciclos de aquecimento e resfriamento por mais duas vezes, completando três ciclos. As frações purificadas presentes nos sobrenadantes finais foram liofilizadas, pesadas e armazenadas a temperatura ambiente (MACHADO *et al.*, 2013).

4.8 Clivagem ácida dos peptídeos

Do produto liofilizado foram pesados 10mg de Mastoparano-MO-DP e 14mg de Synoeca-MP-DP, ressuspensos em solução de ácido fórmico 70% (v/v). A reação ocorreu com o acréscimo de 3 volumes de água ultra-pura, durante 48 horas, a 37°C. Após esse período, as amostras foram liofilizadas cerca de 24h para retirar o ácido fórmico. Purificações sequenciais foram realizadas com o intuito de separar as porções clivadas: ELP e peptídeo.

As amostras clivadas e liofilizadas foram então ressuspensas em água e mantidas a 37°C por 2 horas. Centrifugadas a 9500 rpm por 20 minutos a 37°C, o sobrenadante contendo o peptídeo foi transferido para outro tubo e o pellet resultante da centrifugação foi ressuspensado em água fria. Após 2 horas em geladeira a 4°C, a solução foi centrifugada a mesma temperatura, por 20 minutos a 9500 rpm. Este processo foi repetido por três vezes e o sobrenadante final foi liofilizado. Após a segunda liofilização, as amostras foram analisadas em MALDI MS/MS e quantificadas.

4.9 Análise das proteínas recombinantes por MALDI MS/MS

A pureza e a massa da fração purificada (sobrenadante final) das proteínas recombinantes provenientes das construções pET25b-Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, -ELP₍₂₀₀₎; pET25b-Synoeca-MP-ELP₍₂₀₀₎ sem sítio de clivagem; pET25b-Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎; e pET25b-Mastoparano-MO-ELP₍₂₀₀₎ sem sítio de clivagem, foram avaliadas por espectrometria de massa no equipamento MALDI-TOF/TOF. Cada peptídeo foi diluído em água Milli-Q® e analisado numa matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, preparada com 50 μ L de ácido trifluoroacético à 3%, acetonitrila 100% e 200 μ L de água ultrapura) numa proporção 1:3. As amostras foram depositadas em triplicata na placa (Anchorchip – Var 384) e mantida a temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos até sua total cristalização. A massa molecular e a fragmentação dos peptídeos foram determinadas por MALDI-TOF-TOF Autoflex Speed, Bruker Daltonics (Billerica, MA) a partir do modo de operação positivo, refletido, em uma faixa de 700-5600 m/z (CANTÚ et al., 2008).

4.10 Quantificação dos peptídeos clivados

A quantificação dos peptídeos foi realizada utilizando o LavaPep™ Peptide and Protein Quantification kit (GelCompany, USA). Inicialmente, foram preparadas curvas padrões de cada peptídeo – Synoeca-MP e Mastoparano-MO-, nas mesmas condições de análise dos peptídeos clivados, utilizando os peptídeos sintéticos (sintetizados em fase sólida pela empresa Aminotec P&D, Campinas, São Paulo, Brasil).

Amostra das frações dos peptídeos clivados (extrato proteico total, sobrenadante e pellet) após secos foram diluídos em 500 μ L de água seguido de 5 diluições seriadas, com concentrações finais de 1mg a 0,1mg, baseado na curva padrão. Foram preparadas as soluções reagentes com componente A (fluoróforo) e componente B (tampão bicarbonato), na proporção 1:9. A cada 10 μ L de peptídeo foram adicionados 40 μ L desse mix de reagentes. Uma amostra de branco foi preparada nas mesmas condições, com componente C (tampão de reação) substituindo o peptídeo. As amostras foram aplicadas em microplaca de

96 poços e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 50 µL de componente C a cada uma delas (exceto no branco).

O fluoróforo liga-se reversivelmente aos resíduos de lisina, arginina e histidina e, respondendo a um ambiente hidrofóbico, produz uma fluorescência vermelha como produto. Utilizando um leitor de fluorescência com faixa de excitação de 540 ± 10 nm e com faixa de emissão de 630 ± 10 nm, os valores obtidos foram analisados em função da curva padrão de cada peptídeo, utilizando a função: \log_{10} fluorescência x \log_{10} quantidade de peptídeos.

4.11 Ensaios de atividade antimicrobiana com proteínas recombinantes

Com o objetivo de comparar a atividade antimicrobiana *in vitro* das proteínas recombinantes produzidas e dos peptídeos produzidos sinteticamente, foram realizados ensaios utilizando o isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (Kpc1410503), cedida pelo LACEN (Laboratório Central do Distrito Federal, Brasília, Brasil), em concentrações que variavam de 128 µg a 1 µg/mL.

A concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos foi determinada utilizando placa de 24 poços, com meio Muller Hinton sólido (2 g/L de infusão desidratada de carne, 17,5 g/L de caseína hidrolisada, 1,5 g/L de amido e 17 g/L de ágar) para a contagem de colônias.

Inicialmente, um pré-inóculo foi preparado com 5 mL de meio LB líquido e uma colônia da cepa Kpc1410503 de *K. pneumoniae*. O tubo falcon foi mantido sob agitação constante, a 37°C por 16 horas. Depois deste período, 50 µL desta cultura bacteriana foram inoculadas em 5 mL de meio LB em outro falcon, e este foi mantido sob as mesmas condições, até que o crescimento bacteriano atingisse a concentração de 1×10^8 UFC/mL (representado pela absorbância no intervalo de 0,6 a 0,8 nm, lido a 595 nm em equipamento espectrofotômetro), obtido anteriormente por curva padrão do microrganismo.

Foram preparadas diluições seriadas - em volume suficiente para as triplicatas técnicas - dos peptídeos sintéticos e das frações recombinantes (sobrenadante e pellet), que variavam de 128 µg a 1 µg/mL, para os sintéticos e de 128 µg a 16 µg/mL, para as proteínas recombinantes.

Os controles negativos consistiram apenas em cultura bacteriana enquanto os controles positivos continham além da cultura bacteriana, 10 µL de antibiótico Amicacina 50mg/mL.

Com o meio Muller Hinton ágar ainda líquido com temperatura de, aproximadamente, 50°C, foi incorporado um volume de 100 µL de cada concentração de peptídeo, quantificada conforme descrito anteriormente, de modo que o meio solidificasse acrescido com as soluções nas diferentes concentrações.

O inóculo bacteriano preparado anteriormente foi diluído para a concentração final de 1×10^2 UFC. Desta forma, um volume de 100 µL de inóculo bacteriano foi aplicado em cada poço da placa onde já haviam sido incorporados os peptídeos. Foram analisados os seguintes tratamentos:

- a) Synoeca-MP sintético
- b) Synoeca-MP sem sítio de clivagem
- c) Synoeca-MP clivado (pellet e sobrenadante)
- d) Mastoparano-MO sintético
- e) Mastoparano-MO sem sítio de clivagem
- f) Mastoparano-MO clivado (pellet e sobrenadante)
- g) Controles negativo e positivo

Após 24 horas de incubação da placa em estufa a 37°C, foi realizada a contagem de UFC da cepa Kpc1410503 de *K. pneumoniae* em estereoscópio binocular (microscópio de lupa) e comparado com os controles.

5 Resultados

5.1 Clonagem dos peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO

Os plasmídeos pUC18 e pBSK contendo os genes sintéticos que codificavam os peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO, respectivamente, foram clivados em duas regiões com as enzimas *NdeI* e *KpnI*. Em seguida, os fragmentos originários da digestão foram subclonados no vetor de expressão pET25b⁺ modificado formando o cassete de expressão pET25b-peptídeo-ELP, possibilitando a produção heteróloga dos peptídeos fusionados as repetições de elastina. Desta forma, foram produzidos os seguintes vetores: pET25b⁺-Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, pET25b⁺-Synoeca-MP-PD-ELP₍₂₀₀₎, pET25b⁺-Synoeca-MP-ELP₍₂₀₀₎ sem sítio de clivagem, pET25b⁺-Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎, pET25b⁺-Mastoparano-MO-PD-ELP₍₂₀₀₎ e pET25b⁺-Mastoparano-MO-ELP₍₂₀₀₎ sem sítio de clivagem. Os vetores foram subclonados em células de *E. coli*, linhagem XL1-blue e as mini preparações foram analisadas em gel de agarose a 1 % (figura 4).

Nesta figura, é possível observar as três conformações do DNA circular dos transformantes em todos os sistemas testados. O vetor pET25b⁺ possui 5547 pb e apresentou as conformações relaxadas – bandas na parte superior da imagem (seta 1), as conformações enoveladas (seta 2) e as conformações superenoveladas (seta 3).

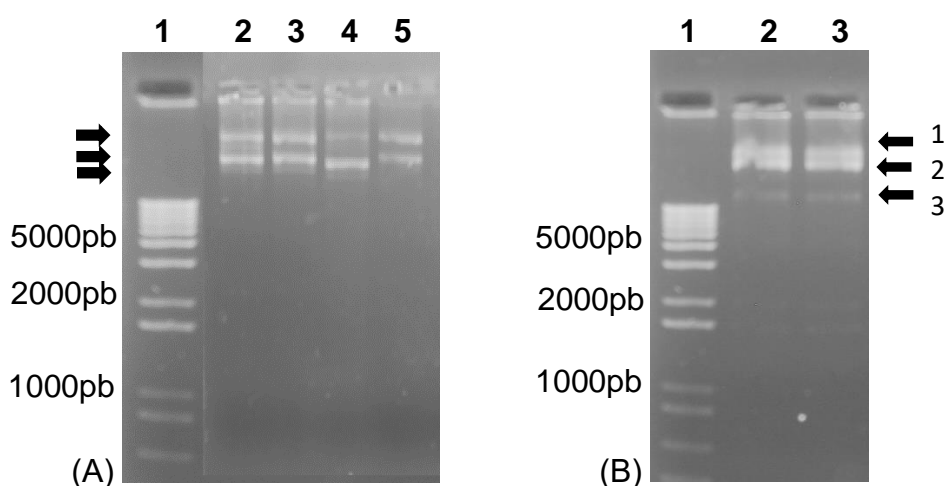


Figura 4: Gel de agarose 1% das mini preparações obtidas dos vetores transformados em células de *E. coli*. (A) 1: ladder 1kb plus, linhas 2 e 3: mini preparações dos vetores contendo a sequência Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, linhas 4 e 5: mini preparações dos vetores com a sequência

Synoeca-MP sem sítio de clivagem; (B) 1: ladder 1kb plus, 2: mini preparação do vetor contendo a sequência do Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎ e 3: mini preparação do vetor contendo a sequência do Mastoparano-MO sem sítio de clivagem. As setas indicam as conformações do DNA plasmidial nas diferentes construções.

A análise do sequenciamento das mini preparações (figuras 5 e 6), mostra que a fase de leitura está correta, e que não havia ocorrido nenhuma alteração na sequência que codificava os peptídeos (sequência marcada em amarelo). No mesmo fragmento ainda foi possível observar que o sitio de clivagem, representado por dois aminoácidos, ácido aspártico e prolina (em vermelho na figura), está intacto, bem como as 200 repetições de *elastin-like polypeptide* (marcadas em verde).

CGGGGCGTTAAGGGATCTCTTATATTTTGTTTACTTTAGAGGAGATAT
ACTATG ATTA ACTGGCTGAAACTGGGCAAAAAATTATTGCGAGCCTG**GAT**
CCG GCGGTACCGGCCGTGGGCGTTCCAACAGTGGGTGTTCCGACTGTGGCA
 TTGGATCGCCAGAGCTTTAAGGCCGAGCTTAGAGCCCGGGAGTCACCTCG
 GACCTCAAACCCTGGGCTGAACCCTGGGGCGCACCTCAGAGCTTTATGCTTC
 GGCTTACCGGCCCGGGCCTTAACCCGCACGGCCTGAAAGGATAGAGTGTA
 CGCCCCGACTTGCAAGCCCAGAGCCGGCATTGGCCGGGACGTAACAGGGG
 GAACAGTTCCGGCACAGCCGGTCTCCCAAACCCGAACAGCCGAAACCGGAC
 ATCCGGGACCGAAATCCCACAGCCCCAATACCCTAGGCCGCCTCACCCAAT
 ACCCGAGGACCCACCGCCCCAAGGGCGAAAAGACAACCCCTGAGCCTCAA
 TACCTAGCGCAGGTCTTATAGTGCAAAGCCGGAGAGGCCGCACTAGGAAC
 GCTATTAGCATAGAGAAAAGCAGAATCTGGAAGGGGAATTAGCAGCAACC
 CCCTGGAAGTGAACGTGCATCTGAGAGAAACAACCTAGGGATGAGATTTG
 TCGGATAAGCGACCAACTTGTTCCGGGCTCGCCATACCCGAGCATGCGAAG
 AGCACGCAGGATAAGTCTGTGAATCCCGGATTTGTTAGTGTGTTTTATGTGT
 CCAGCCTCCCTGAAAAAAGTCGATACTTAAGCAAACGAGCTCACTGTTCTAT
 GAACGGATAAACGCGATAAAAAGCTACATATCATAGAGTCTCTAGTAACGA
 TGATCTGCGTGCTCTAGACTTCTCGAGTAAATGTCAGCACGGATGACAGCGC
 AGCAGGCACAACCTTCGTAAGTATCC

Figura 5: Sequência de nucleotídeos obtida pela leitura do primer T7 do fragmento que codifica o peptídeo Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎. A região em negrito azul corresponde a metionina (M) (códon de iniciação); marcado em amarelo está a região correspondente à sequência do Synoeca-MP; a sequência marcada em vermelho corresponde aos códons do sitio de clivagem (DP) para o ácido fórmico, e a região em verde corresponde a sequência da elastina em repetições.

TTTTTGGTTTTTAACCTTTAGAAGGAGAATACATATGTTTCTGCCGATTA
 TTATTAACCTGAAAGCGCTGGCGGCGCTGGCGAAAAAATTCTGGATCC
 GCGGTACCGGCCGTGGGCGTTCAGCAGTGGGTGTTCCGGCTGTGGGC
 GTCCGGCGGTGGGTGTTCCGGCGGTGGGCGTTCGGCTGTGGGTGTTCC
 GGCGGTGGGCGTTCCTGCCGAGGGTGTTCGGCAGAGCGCGTATGATCC
 GAGTTCGAGCACCGAGTGAATGATGTGGCCGAGCTCAACATCAACGGGC
 TAGCTGACGTAGCTACCCCGGAAGAGAGCGATGATGTCGAGCACCCCC
 TGCCCCCTCACAGATATTCTTGTGAGGACTATTCCAAAGGATGATCATT
 TGGCGGACGTCTTCGCTAAGGATGAGTTCTCAAAGGCCGTTGGGGGCTAA
 AACCGGTCTTGACGGGTTTGTGCTCGACTGAGGAGCACTCTACGGAGAC
 GCACAGGACTCGTGAAACGTACGATACAAATTGTACAGCGCCTATAGTA
 TAGAAGAAGAGTACTGACAGGAGACGATATCCGACAAAACGATCTCCCA
 AACAGGCTCTCCAATACTATGATAACCCAATCTAGGCTACGGAGTCCAGG
 ATGACGATGACTAGGATGACCATAATCAAGAGTCGCTTTCAGCCGAGG
 ACTGCTGGGTGACCAATTCATGGTACAGCTACCGGTGAAAGCTTACAGA
 GTGAAATGCCGAAATAAAAATCCAAAACACTGCTCCCCCTTAATGATTTC
 CTGTTTATCCTCCAGTTATGATTACC

Figura 6: Sequência de nucleotídeos obtida pela leitura do primer T7 do fragmento que codifica o peptídeo Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎. A região em negrito azul corresponde a metionina (M) (códon de iniciação); marcado em amarelo está a região correspondente à sequência do Mastoparano-MO; a sequência marcada em vermelho corresponde aos códons do sítio de clivagem (DP) para o ácido fórmico, e a região em verde corresponde a sequência da elastina em repetições.

5.2 Produção dos peptídeos recombinantes

A partir da confirmação acima, as construções pET25b⁺-Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, pET25b⁺-Synoeca-MP-PD-ELP₍₂₀₀₎, pET25b⁺-Synoeca-MP-ELP₍₂₀₀₎ sem sítio de clivagem, pET25b⁺-Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎, pET25b⁺-Mastoparano-MO-PD-ELP₍₂₀₀₎ e pET25b⁺-Mastoparano-MO-ELP₍₂₀₀₎ sem sítio de clivagem foram crescidas em meio TB com indutor lactose na concentração de 0,2%, e após o período de 22 horas apresentaram crescimento de 0,514, 0,523, 0,515, 0,596, 0,512 e 0,534, respectivamente, obtido pela leitura em espectrofotômetro na absorvância de 595nm. Na mesma placa foram lidas as absorvâncias das células DE3 sem o plasmídeo transformado – utilizadas como controle negativo -, as quais apresentaram crescimento de 0,627nm. Essa diferença pode ocorrer devido à presença do promotor T7 no plasmídeo transformado que provoca uma sobrecarga na

capacidade metabólica tendo como resultado uma redução na taxa de crescimento (BENTLEY et al., 1990; CARNEIRO; FERREIRA; ROCHA, 2013).

A coloração com CuCl_2 foi a alternativa ao corante Comassie Blue, uma vez que este interage principalmente com a arginina e fracamente com outros resíduos básicos, como histidina e lisina; e resíduo aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina, além de detectar concentrações a partir de 40 ng, aproximadamente (LEE; LEVIN; BRANTON, 1987). Sendo assim, o Comassie Blue não interage com os resíduos de aminoácidos codificantes das ELPs, não reagindo a presença desta molécula no gel.

Os géis SDS-PAGE a 10%, corados com cloreto de cobre, mostram as análises dos extratos proteicos das células de *E. coli* transformadas com diferentes plasmídeos (figuras 7 e 8). Bandas em torno de 100kDa (indicadas pela seta), nas linhas 2, 3 e 4, indicam a produção heteróloga das diferentes construções de proteínas recombinante de Synoeca-MP e Mastoparano-MO, acopladas a $\text{ELP}_{(200)}$, respectivamente.

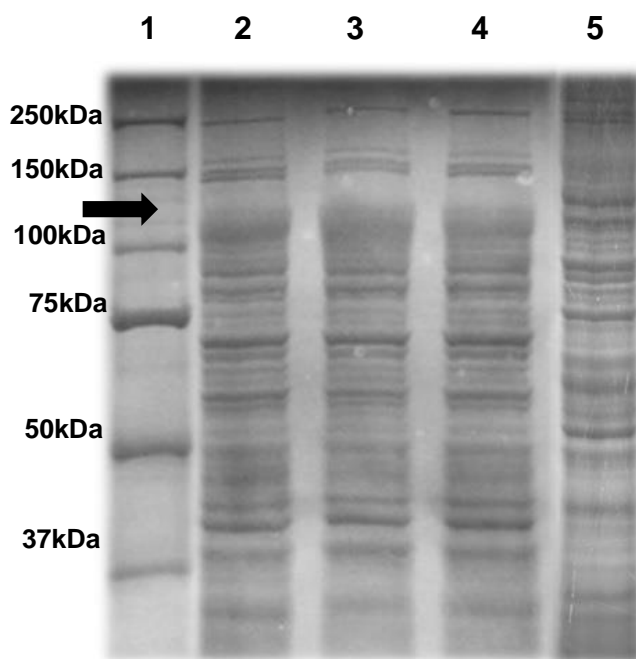


Figura 7: Gel SDS PAGE 10 % corado com solução de cloreto de cobre referente ao extrato proteico do cultivo celular de *E. coli* BL21 DE3 transformada com o plasmídeo recombinante após 22 horas de crescimento com indução de lactose. (1) marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards; (2) *E. coli* BL21 DE3 transformada com pET25b+-Synoeca-DP- $\text{ELP}_{(200)}$; (3) *E. coli* BL21 DE3 transformada com pET25b+-Synoeca-PD- $\text{ELP}_{(200)}$; (4) *E. coli* BL21 DE3 transformada com pET25b+-Synoeca- $\text{ELP}_{(200)}$ sem sítio de clivagem; (5) *E. coli* BL21 DE3 não transformada.

transformada pET25b+ com vetor vazio como controle. A seta indica as bandas que representam a expressão heteróloga dos peptídeos supracitados.

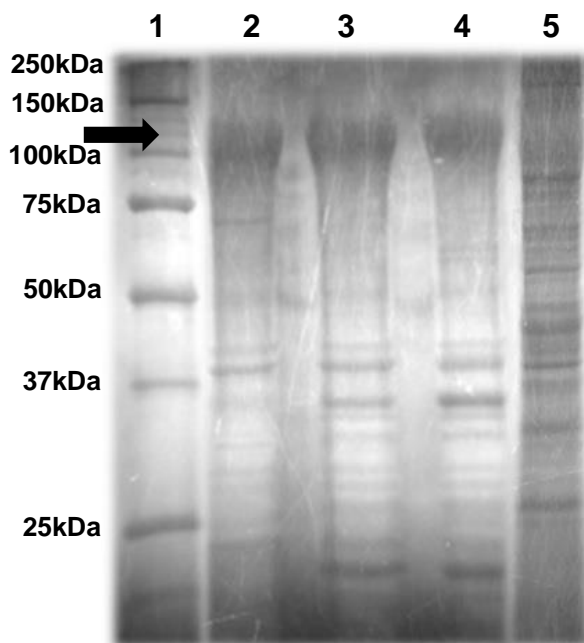


Figura 8: Gel SDS PAGE 10 % corado com solução de cloreto de cobre referente ao extrato proteico do cultivo celular de *E.coli* BL21 DE3 transformada com o plasmídeo recombinante após 22 horas de crescimento com indução de lactose. (1) marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards; (2) *E.coli* BL21 DE3 transformada pET25b+-Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎; (3) *E.coli* BL21 DE3 transformada pET25b+- Mastoparano-MO-PD-ELP₍₂₀₀₎; (4) *E.coli* BL21 DE3 transformada pET25b+- Mastoparano-MO-ELP₍₂₀₀₎ sem sítio de clivagem; (5) *E.coli* BL21 DE3 transformada pET25b+ com vetor vazio como controle.. A seta indica as bandas que representam a expressão heteróloga dos peptídeos supracitados.

A massa aparente observada nestes géis se deve a fusão do peptídeo, o qual possui baixa massa molecular, com 200 repetições de ELP, o que torna a massa do sistema peptídeo-ELP aproximadamente este apresentado. É interessante observar que a massa dos resíduos que codificam os sítios de clivagem DP, PD ou a ausência deste sítio não é significativa, ou seja, não altera a massa molecular observado no gel.

As construções contendo o sítio de clivagem com os aminoácidos em posições invertidas (PD) não foram utilizadas já que a ideia era observar se no sitio PD poderia ocorrer uma clivagem mais eficiente. Entretanto, experimentos realizados em Portugal na Universidade do Minho, utilizando este mesmo vetor com outro peptídeo e o sitio PD, não mostraram diferenças na clivagem quando

comparados com o sítio DP. Desta forma, uma das perspectivas deste trabalho é realizar a clivagem desta última construção citada (tabela 5).

Após a produção heteróloga dos peptídeos recombinantes ligados as 200 repetições de ELP, foram produzidos 4L de cultura das seguintes construções: Synoeca-MP-DP, Synoeca-MP sem sítio de clivagem, Mastoparano-MO-DP e Mastoparano-MO sem sítio de clivagem, para purificação.

5.3 Purificação dos biopolímeros

O processo de purificação consiste em submeter as células de *E. coli* transformadas com os vetores a diferentes temperaturas, em ciclos de aquecimento, 37°C por, aproximadamente, 2 horas seguido de centrifugação à mesma temperatura; e resfriamento, à temperatura de 4°C pelo mesmo período ou até que as amostras estivessem completamente dissolvidas no meio aquoso, seguido de centrifugação à mesma temperatura. Estes procedimentos (ou ciclos) são realizados por três vezes seguidas e espera-se que, ao final de cada ciclo, se obtenha amostras mais limpas ou sem contaminantes, eliminando as proteínas endógenas da bactéria (MACHADO et al., 2013b).

As figuras 9, 10, 11 e 12 mostram os resultados obtidos quando as amostras de sobrenadante do cultivo celular de cada fase quente/frio dos respectivos ciclos foram obtidos. Podemos observar que à medida que a purificação ocorria, todas as construções apresentavam menos proteínas “contaminantes” ou endógenas, e no final do terceiro ciclo a construção peptídeo-ELP é considerada pura. Também podemos observar que a solubilidade das proteínas é maior a 4°C e que, sob a temperatura de 37°C, as mesmas ficavam retidas no pellet junto com as ELPs (linhas 3,5 e 7, figura 9; linhas 2, 4 e 6, figura 10).

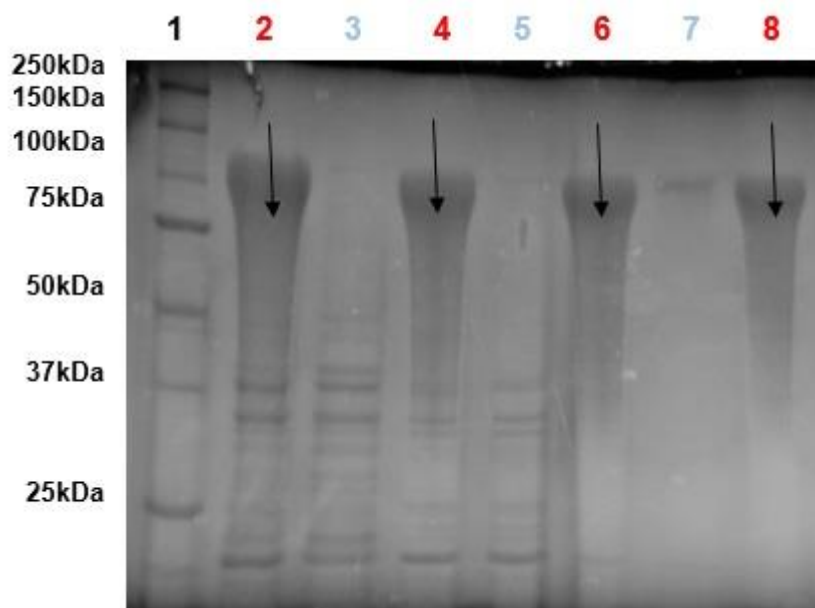


Figura 9: Gel SDS PAGE 10 % corado com solução de cloreto de cobre referente a purificação do peptídeo Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, (1) marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards; (2) *E.coli* BL21 DE3 transformada pET25b+-Synoeca-DP-ELP₍₂₀₀₎; (3)(5) e (7) amostras dos sobrenadantes dos peptídeos após 2 horas a 37°C dos ciclos 1, 2 e 3, respectivamente; (4) (6) e (8) amostra dos sobrenadantes dos peptídeos após 2 horas a 4°C dos ciclos 1, 2 e 3, respectivamente. As setas indicam a presença de proteínas endógenas e a retirada destas durante o processo de purificação.

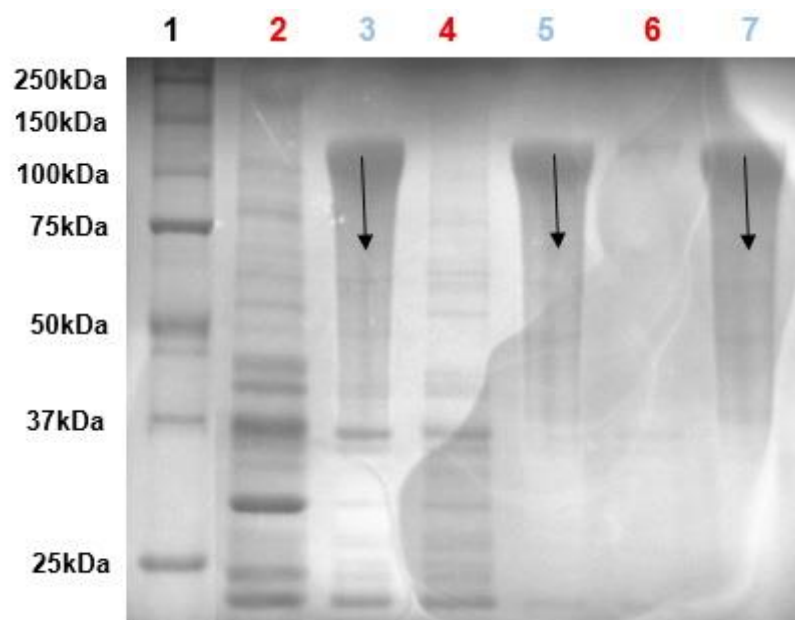


Figura 10: Gel SDS PAGE 10 % corado com solução de cloreto de cobre referente a purificação do peptídeo Synoeca-MP sem sítio de clivagem. (1) marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards; (2) (4) e (6) amostras dos sobrenadantes dos peptídeos após 2 horas a 37°C

dos ciclos 1, 2 e 3, respectivamente; (3) (5) e (7) amostra dos sobrenadantes dos peptídeos após 2 horas a 4°C dos ciclos 1, 2 e 3, respectivamente. As setas indicam a presença de proteínas endógenas e a retirada destas durante o processo de purificação.

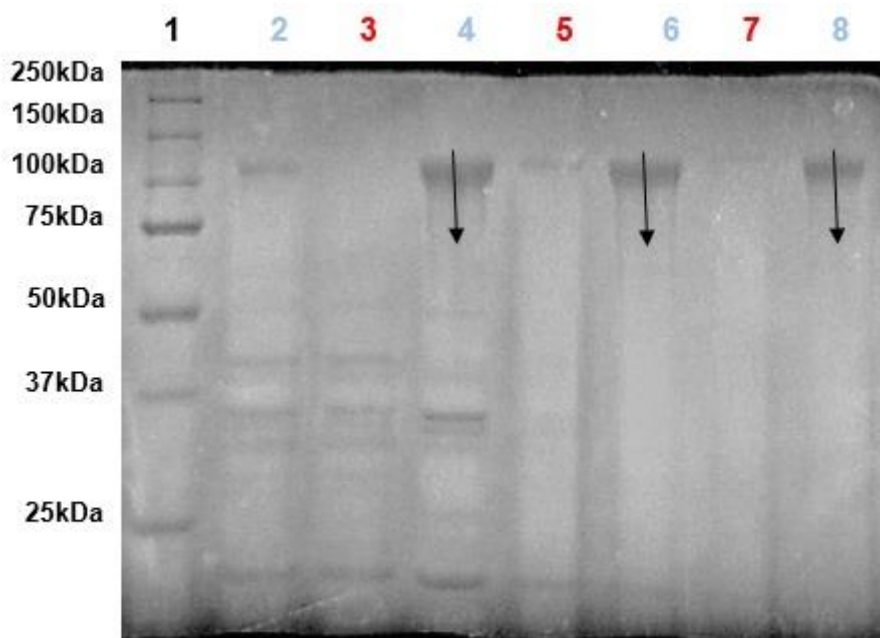


Figura 11: Gel SDS PAGE 10 % corado com solução de cloreto de cobre referente a purificação do peptídeo Mastoparano-MO-DP. (1) marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards; (2) *E.coli* BL21 DE3 transformada pET25b+-Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎; (3)(5) e (7) amostras dos sobrenadantes dos peptídeos após 2 horas a 37°C dos ciclos 1, 2 e 3, respectivamente; (4) (6) e (8) amostra dos sobrenadantes dos peptídeos após 2 horas a 4°C dos ciclos 1, 2 e 3, respectivamente. As setas indicam a presença de proteínas endógenas e a retirada destas durante o processo de purificação.

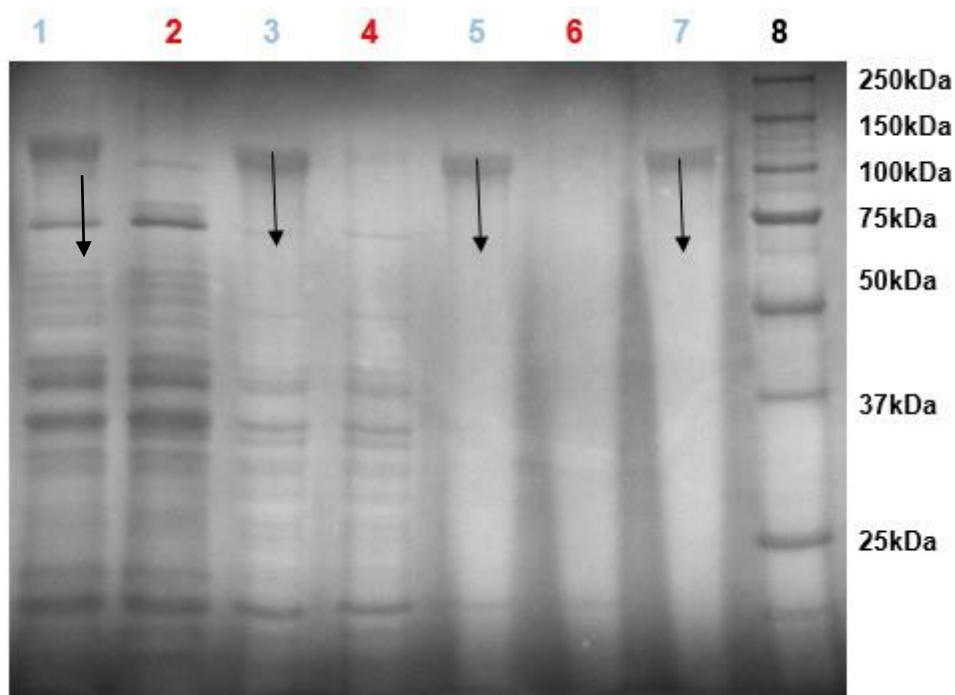


Figura 12: Gel SDS PAGE 10 % corado com solução de cloreto de cobre referente a purificação do peptídeo Mastoparano-MO sem sítio de clivagem. (1) *E.coli* BL21 DE3 transformada pET25b+-Mastoparano-MO-ELP₍₂₀₀₎; (2)(4) e (6) amostras dos sobrenadantes dos peptídeos após 2 horas a 37°C dos ciclos 1, 2 e 3, respectivamente; (3) (5) e (7) amostra dos sobrenadantes dos peptídeos após 2 horas a 4°C dos ciclos 1, 2 e 3, respectivamente e (8) marcador de massa molecular Precision Plus Protein Standards. As setas indicam a presença de proteínas endógenas e a retirada destas durante o processo de purificação.

Após os ciclos de purificação por histerese, os sobrenadantes obtidos de cada construção, os quais continham as proteínas recombinantes purificadas, foram liofilizados e pesados. As construções do peptídeo Synoeca-MP, tanto com sítio de clivagem quanto sem, produziram maior quantidade de proteínas recombinantes enquanto as construções de Mastoparano-MO tiveram menor rendimento quando comparadas entre si (tabela 1; tabela 5).

Tabela 1: Peso seco do sobrenadante após a purificação e liofilização da produção de 4L de cada sistema peptídeo-ELP₍₂₀₀₎

	<i>Peso seco (mg) em 4L de cultura</i>
<i>Synoeca-MP sem sítio de clivagem</i>	339,6
<i>Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎</i>	354,4
<i>Mastoparano-MO sem sítio de clivagem</i>	47,7
<i>Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎</i>	129,6

5.4 Clivagem ácida, purificação e quantificação dos peptídeos

Foram submetidos ao processo de clivagem as construções Synoeca-MP-DP e Mastoparano-MO-DP (tabela 5), por possuírem um sítio específico para que a reação com o ácido fórmico acontecesse. Após 48 horas de reação à 37°C, as soluções foram liofilizadas para a retirada do ácido e as amostras foram submetidas a purificação por ciclos de temperatura, como já havia sido realizado após a produção de proteínas por expressão heteróloga. Após três ciclos de temperatura 37°C/4°C, o que se esperava era obter o peptídeo de interesse sempre solúvel no meio aquoso, uma vez que apenas a elastina tem a propriedade de se agregar quando submetida a altas temperaturas e, após a clivagem ácida, toda a elastina seria retirada por centrifugação a 37°C, e o peptídeo estaria concentrado no sobrenadante. Entretanto, esta suposição não pôde ser confirmada por gel SDS-PAGE 15%, desta forma, o sobrenadante e o pellet obtidos após a purificação da clivagem, ambos ressuspensos em água, foram liofilizados e analisados por espectrometria de massa no MALDI MS/MS.

As imagens a seguir são dos espectros apresentando a massa molecular e a sequência fragmentada obtida na análise.

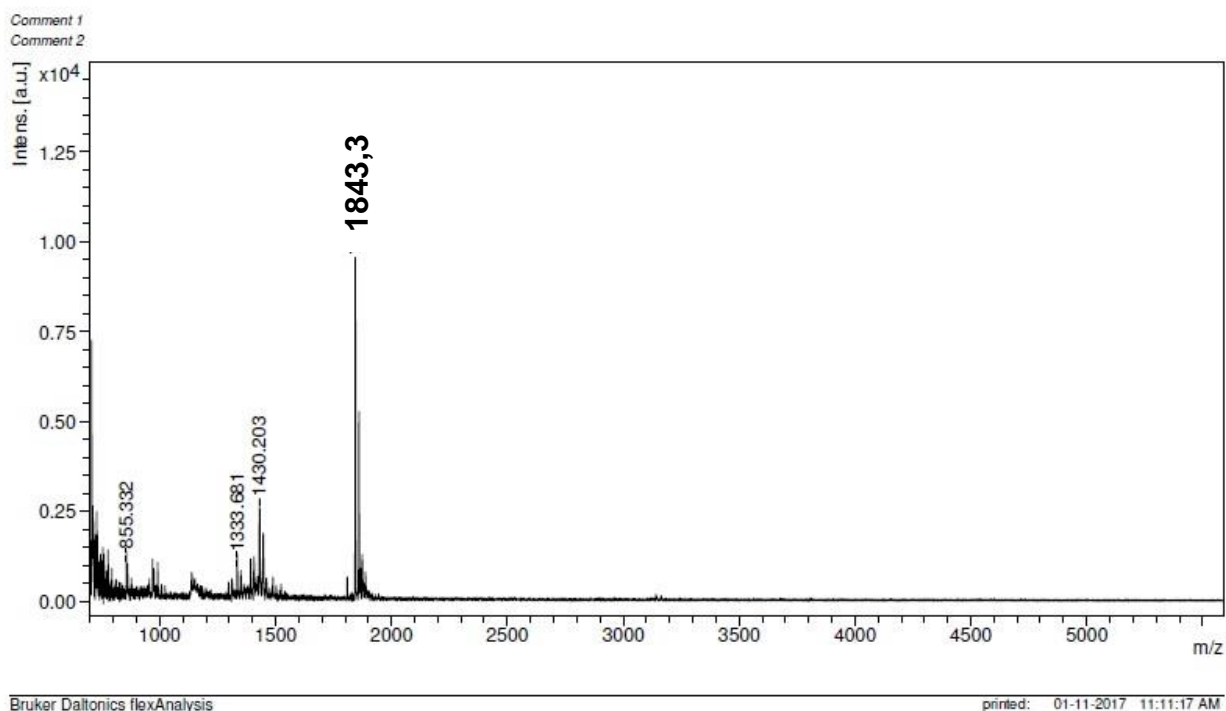


Figura 13: Espectros de massas MS obtido em método positivo, refletido, na faixa de 700/5600 m/z no equipamento MALDI-TOF/TOF do peptídeo Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, após a clivagem ácida e purificação. A massa observada de 1843,307 difere da massa protonada M+H 1597 do peptídeo sintético

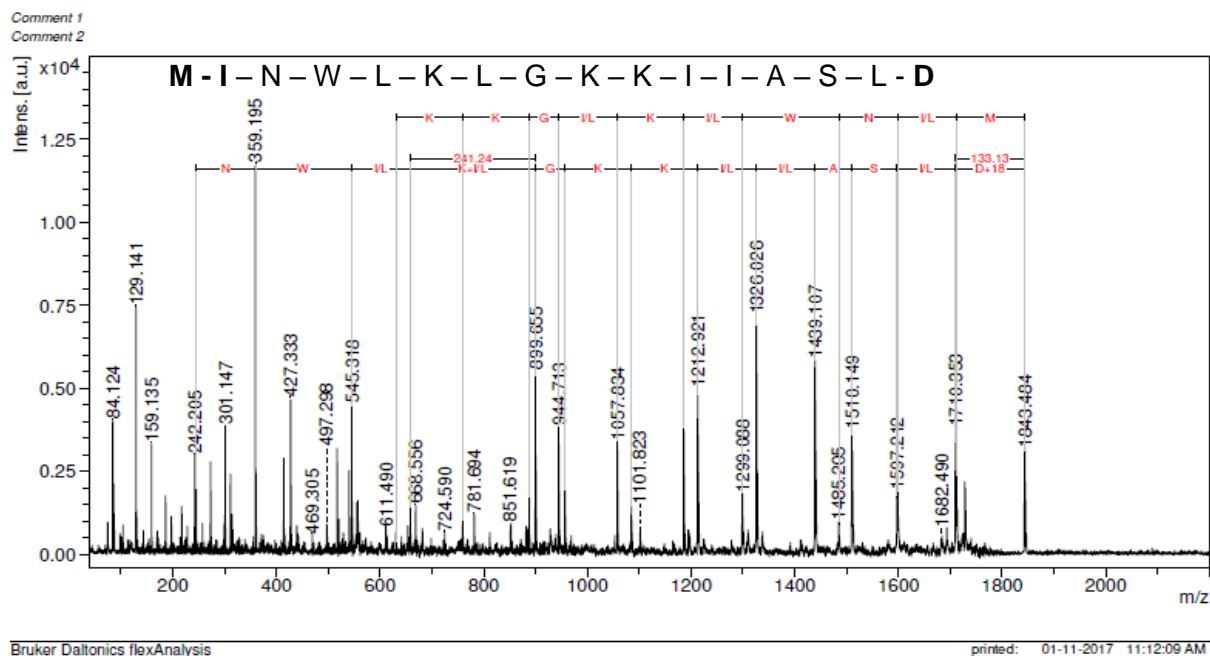


Figura 14: Espectro de MS/MS do peptídeo Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎, após a clivagem e purificação, obtido pelo método positivo, refletido, utilizando o modo LIFT para fragmentação de peptídeos e a sequência original do peptídeo.

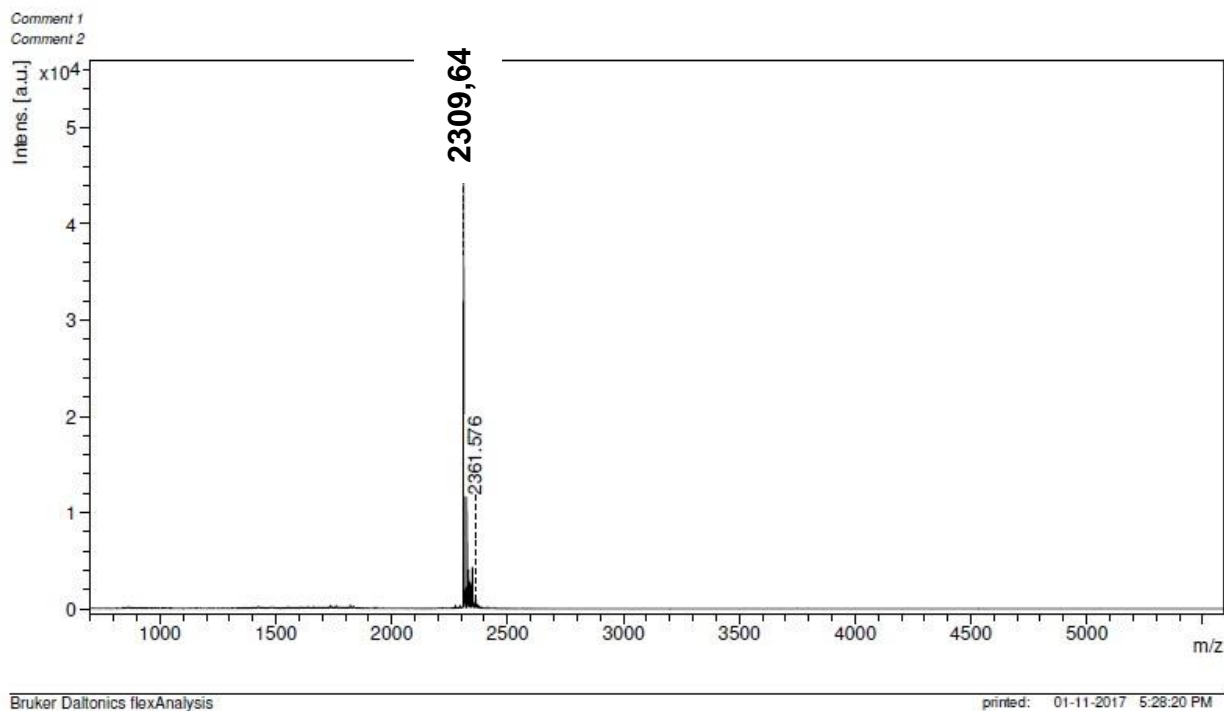


Figura 15: Espectro de massa MS obtido em método positivo, refletido, na faixa de 700/5600 m/z no equipamento MALDI-TOF/TOF do peptídeo Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎, após a clivagem e purificação. A massa observada de 2309,645 difere da massa protonada M+H 2064,65 do peptídeo sintético

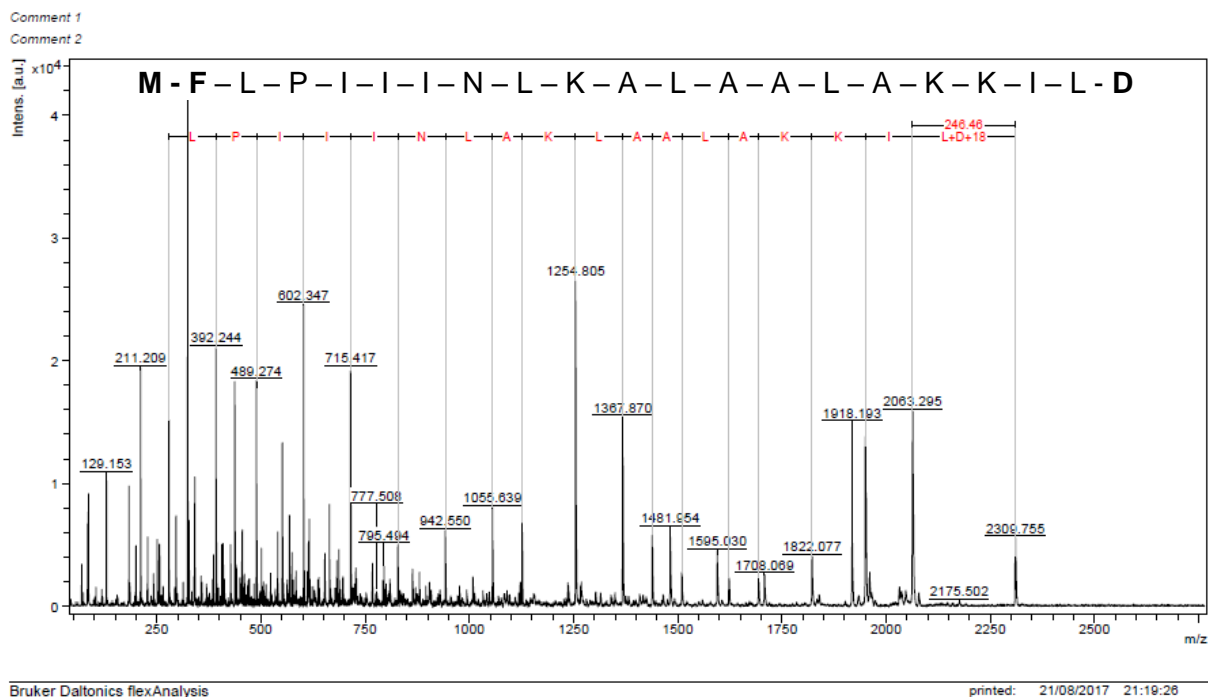


Figura 16: Espectro de MS/MS do peptídeo Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎, após a clivagem e purificação, obtido em método positivo, refletido, utilizando o modo LIFT para fragmentação de peptídeos.

A partir dos íons de maior intensidade, foi realizada a fragmentação da sequência dos peptídeos através de quebra das ligações peptídicas que induz a formação de dois íons-fragmentados, que são classificados como íons que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal (gerando fragmentos no sentido da direita - esquerda), e íons que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal (gerando fragmentos no sentido da esquerda - direita). Os pares de íons serão sempre correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si, como observado na figura 14.

De acordo com as figuras 13 e 15, referentes as massas moleculares encontradas no MALDI, foi possível observar massas não idênticas àquelas esperadas, de 1597Da para o Synoeca-MP-DP e 2064 para o Mastoparano-MO-DP. A diferença nas massas é devido ao acréscimo na sequência original de cada um dos peptídeos do resíduo de ácido aspártico (D) oriundo do sítio de clivagem e da metionina (M) inserida no desenho do vetor como códon inicial para a leitura da sequência dos peptídeos. A soma da massa/carga da sequência original de cada peptídeo, mais esses dois fragmentos corresponde a massa/carga obtida nos respectivos espectros.

Tabela 2: Comparação das sequências dos peptídeos e das massas moleculares originais e obtidas após a clivagem ácida

	<i>Sequência original</i>	<i>Sequência obtida no MALDI MS/MS</i>
	<i>Massa molecular (Da)</i>	<i>Massa molecular obtida no MALDI (Da)</i>
<i>Syn-DP*</i>	INWLKLGKKIIASL 1597	MINWLKLGKKIIASLD 1843
<i>MPDP**</i>	FLPIIINLKALAALAKKIL 2064	MFLPIIINLKALAALAKKILD 2309

* Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎

** Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎

Após estas análises no MALDI, as construções que passaram pelo processo de clivagem foram quantificadas para que os ensaios antimicrobianos

fossem realizados. A tabela 3 apresenta as quantificações realizadas pelo kit Lavapep, o qual quantifica pelo método de fluorescência, que permite uma quantificação sensível de proteínas e peptídeos e também faz uso de uma curva padrão para fins de comparação com as quantificações obtidas.

As frações quantificadas (tabela 3; tabela 5) após a clivagem ácida foram: o extrato total pós-clivagem sem purificar, os sobrenadantes clivados e purificados (que correspondem a porção que deveria conter apenas os peptídeos) e os pellets clivados e purificados (correspondente a porção que não deveria conter peptídeos, apenas elastina).

Tabela 3: Quantificação das frações clivadas: extratos totais clivados sem purificar; sobrenadantes clivados e purificados; e pellets clivados e purificados.

Fração analisada	Quantificação em mg/mL
<i>Synoeca-MP extrato total clivado não purificado</i>	0,016
<i>Synoeca-MP sobrenadante clivado purificado</i>	0,19
<i>Pellet clivado e purificado</i>	0,13
<i>Mastoparano-MO extrato total clivado não purificado</i>	0,014
<i>Mastoparano-MO sobrenadante clivado purificado</i>	0,52
<i>Pellet clivado e purificado</i>	0,389

Os valores obtidos nas quantificações são inferiores aos esperados. No caso do *Synoeca-MP*, partindo de 14 mg de material clivado, foram obtidos, aproximadamente, 0,30 mg de proteínas (somando as quantificações de sobrenadante e pellet). Também podemos observar que houve uma pequena diferença da quantidade de peptídeos presente no sobrenadante e no pellet, mostrando que a metodologia de clivagem não está sendo eficiente. No caso do *Mastoparano-MO*, apesar da quantificação também ter sido baixa, teve um rendimento melhor do que o *Synoeca-MP*, já que foram obtidos, aproximadamente, 0,90 mg de peptídeos, somando pellet e sobrenadante, partindo de 10mg de material bruto liofilizado.

Entretanto um fato que chama a atenção no caso do Mastoparano-MO é que a quantificação dos peptídeos clivados e purificados do pellet foi maior do que no sobrenadante, mostrando que ou o processo de clivagem não foi eficiente (mantendo boa parte dos peptídeos ligados a *tag* de ELP), ou as quantificações estão subestimadas.

5.5 Ensaios antimicrobianos

De acordo com as concentrações obtidas após o processo de clivagem, para todos os tratamentos foram avaliadas as concentrações a partir de 128 µg/mL de cada construção, seguida de diluições seriadas até a concentração de 16 µg/mL. Vale lembrar que estas concentrações foram escolhidas com base em resultados de experimentos anteriores com os peptídeos sintéticos Synoeca-MP e Mastoparano-MO, contra a mesma cepa de *K. pneumoniae* (dados não publicados).

A cepa Kpc 1410503 foi cedida pelo Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF), precedente de isolado clínico, com característica de multirresistência. Já foi observada a presença de cápsula nesses microrganismos, o que a torna mais virulenta que aquelas que não possuem a mesma estrutura.

Os testes foram realizados em placas de 24 poços, a temperatura de 37°C por 24 horas, seguido da contagem de colônias através de microscópio. Foram utilizados como controle positivo 10µl do antibiótico Amicacina na concentração de 50mg/mL e como controle negativo apenas a cultura celular bacteriana. Todos os testes foram realizados em triplicata técnica.

Uma vez que as soluções de peptídeos diluídos eram incorporadas em meio Muller Hinton com ágar ainda líquido, era possível observar que imediatamente a elastina reagia a temperatura e se agregava, inclusive nas soluções contendo os sobrenadantes clivados e purificados.

A tabela 4 apresenta os valores de MIC obtidos após 24 horas de ensaio. A fração do sobrenadante do Synoeca-MP-DP clivado a purificado apresentou o dobro do resultado do mesmo peptídeo produzido sinteticamente. A fração do pellet não apresentou resultado.

Não houve inibição com nenhuma das frações do Mastoparano-MO-DP, o que difere dos resultados obtidos por Silva (2015). No entanto, vale lembrar que os testes realizados por este autor foram contra cepas ATCC, e sabe-se que a cepa aqui testada (Kpc1410503) é multirresistente.

Tabela 4: Resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos contra a cepa resistente de *K. pneumoniae* (Kpc1410503)

Fração testada	MIC (μM)
<i>Synoeca-MP sintético</i>	40
<i>Sobrenadante do Syn* biossintetizado clivado e purificado</i>	80
<i>Pellet do Syn* biossintetizado clivado e purificado</i>	-
<i>Mastoparano-MO sintético</i>	-
<i>Sobrenadante do MPDP** biossintetizado clivado e purificado</i>	-
<i>Pellet do MPDP** biossintetizado clivado e purificado</i>	-

*Syn = *Synoeca-MP-DP-ELP*₍₂₀₀₎

**MPDP = *Mastoparano-MO-DP-ELP*₍₂₀₀₎

6. Discussão

A partir da década de 1990, quando foram identificadas as primeiras cepas de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais, surgiram também avanços notáveis na tecnologia que permitiram grandes progressos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Como exemplos, temos a manipulação de DNA recombinante, que permitiu produzir determinadas proteínas com alto rendimento; o aprimoramento na determinação da estrutura das moléculas, que permitiu o desenho racional de medicamentos; e unido a isso, os avanços computacionais permitiram lidar e analisar uma quantidade muito maior de dados, possibilitando a criação de bibliotecas digitais de fácil acesso (BROWN; WRIGHT, 2016; MACARRON et al., 2011).

O presente trabalho fez uso da técnica de DNA recombinante, usando o vetor pET25b+ que foi desenhado para a expressão heteróloga das moléculas de interesse, ou seja, as sequências que codificam os peptídeos unidos a uma repetição de 200 vezes do pentâmero que codifica a ELP. A biossíntese por

sistema heterólogo de PAMs utilizando células bacterianas de *E. coli* foi utilizada por uma série de vantagens, como o melhor custo-benefício, por apresentarem rápido crescimento, grande variedade de vetores para expressão vendidos facilmente, possui protocolos bem estabelecidos de manipulação do seu DNA, permite a produção dessas pequenas proteínas em larga escala e têm-se um extenso conhecimento genético, bioquímico e fisiológico do funcionamento dessas células (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). O vetor pET é o mais comumente utilizado para a produção de PAMs e as cepas mais frequentes são pLysS Origami, pLysS Roseta, C41 (DE3) e BL21 (DE3) – a qual apresentou melhor expressão dos peptídeos utilizados neste trabalho (PARACHIN et al., 2012).

Como indutor do promotor do vetor, o mais utilizado é o Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). No entanto, para a mesma finalidade, utilizamos a lactose, já que esta apresenta vantagens frente ao IPTG por não ser um produto tóxico ao homem e por seu custo ser muito inferior (LIM et al., 2004).

Um dos desafios nos sistemas heterólogos é a toxicidade que a maioria dos peptídeos antimicrobianos pode causar à célula hospedeira e a instabilidade destas moléculas devido a suas propriedades químicas e seu tamanho, tornando-os alvos das proteases produzidas pelos microrganismos (LI, 2011). Para contornar este problema uma das opções é incluir nos vetores de expressão de *E. coli* sequências de proteínas de fusão ou *tags*. Embora sejam muito úteis em vários aspectos, essas *tags* podem apresentar toxicidade intrínseca ao hospedeiro, limitar os estudos funcionais, estruturais e da atividade biológica das proteínas recombinantes, ou ainda podem degradar o peptídeo expresso por meio de enzimas proteolíticas e, portanto, devem ser retiradas do sistema. Para tal, adicionar uma sequência de proteases ao vetor é comum, mas apresenta várias limitações como baixa especificidade ao sítio de clivagem, clivando em diversos sítios e aumentando o custo da produção quando realizada em grande escala (CORRALES-GARCIA et al., 2013; FENG et al., 2014).

Diversas *tags* – como as já citadas: proteína de ligação à maltose (MBP), glutathione S-transferase (GST), *elastin-like polypeptide* (ELP), *small ubiquitin like modifier* (SUMO) e tioredoxina A (TrxA) (DENG et al., 2017) já foram desenvolvidos a fim de aumentar a produção heteróloga dos PAMs, e ainda

evitar a toxicidade dos peptídeos à célula hospedeira. Em comparação com outras *tags*, a ELP apresenta vantagens nesse sentido, a julgar por ser dez vezes maior que os peptídeos, com isso conseguir protegê-los de degradação proteolítica; não é um produto tóxico às células, é solúvel e também leva vantagens no processo de purificação, haja vista que não utiliza de processos cromatográficos, evitando assim gastos com resinas e equipamentos. O processo de purificação é rápido e permite a obtenção de boas quantidades de proteína (HU et al., 2010; MEYER; CHILKOTI, 1999; TRABBIC-CARLSON et al., 2004).

O resultado da expressão heteróloga dos peptídeos observado nos géis (figuras 7 e 8) demonstrou bandas com tamanhos aproximados de 100kDa como esperado, devido ao grande número de repetição de ELP e aos pequenos tamanhos dos peptídeos. Logo, as cepas de *E. coli* produziram com sucesso as proteínas recombinantes ligadas a *tag* ELP. Outras proteínas de baixa massa molecular foram produzidas utilizando a *tag* ELP, como moricin CM4 e β -defensina humana (H β D4), que foram satisfatoriamente expressas unidas a 110 repetições de ELP (SHEN et al., 2010) e tioredoxin e calmodulin (CaIM), expressos unidos a 90 repetições de ELP. No entanto, nenhum dos trabalhos realizou teste de atividades das moléculas produzidas (MEYER; CHILKOTI, 1999; TRABBIC-CARLSON et al., 2004).

A escolha dos peptídeos a serem biossintetizados também foi providencial, a sequência primária destes PAMs indica que eles não necessitam de modificações pós-traducionais, bem como não possuem pontes dissulfeto, tornando-os bons candidatos a serem sintetizados em sistemas procaríotas. Aliado a estes fatos, os peptídeos possuem atividades funcionais diferentes, tendo o Synoeca-MP demonstrado atividade antimicrobiana (FREIRE, 2014) e o Mastoparano-MO demonstrado atividade imunomodulatória (SILVA, 2015), atuações que podem ser usadas em conjunto no futuro.

Não há relatos na literatura da atividade imunomodulatória do Synoeca-MP, mas este teste está nas perspectivas deste trabalho.

A opção de produzir proteínas recombinantes unidas a ELP teve como objetivo primordial as razões anteriormente citadas. No entanto, esta *tag* pode também sequestrar o peptídeo quando submetidos a altas temperaturas, devido

às suas características de auto-organização (Pastuszka and MacKay, 2016). Pensando nisso, foi criada a estratégia de produzir nanoestruturas atuando como *drug delivery*, aproveitando estas propriedades. Nanocápsulas, nanofibras, hidrogéis ou carreadores macromoleculares são exemplos de estruturas formadas com ELP, testadas para os tratamentos de infecções e câncer (MACEWAN; HASSOUNEH; CHILKOTI, 2014; MACHADO et al., 2015; SAXENA; NANJAN, 2015; SHAH et al., 2012; SMITS et al., 2015).

Entretanto, antes de produzir partículas de *drug delivery*, é racional que a *tag* de ELP seja retirada do complexo, e para que isso aconteça, após a purificação se faz necessário clivar num ponto específico para que as moléculas se separem.

Antes da clivagem foi realizado o processo de purificação que consistiu, basicamente, em lisar as células para que todo o conteúdo fosse extravasado e, a partir daí os ciclos de histerese por temperatura atuariam sequestrando os peptídeos de interesse e deixando todo o *debris* celular e moléculas insolúveis no meio. Através de centrifugação sob a mesma temperatura que a amostra foi submetida (4°C e 37°C), há a separação das porções com e sem ELP. Este processo de histerese é realizado pelo menos duas vezes e observa-se a diferença na quantidade de proteínas endógenas (ou contaminantes) presentes na amostra através de gel SDS PAGE 10% (MACHADO et al., 2015).

De acordo com as imagens apresentados das purificações realizadas (figuras 9, 10, 11 e 12), pode-se observar que o terceiro ciclo apresentou amostras adequadamente purificadas e que não houve perda de proteínas de interesse nos outros passos dos ciclos, confirmado pelas amostras do sobrenadante a 37°C, após a centrifugação sob a mesma temperatura, garantindo que as ELPs estavam atuando satisfatoriamente sequestrando os peptídeos e, portanto, não foi observado a presença deles nessas amostras.

Esses resultados são semelhantes àqueles apresentados por Hu (2009), Shen (2010), Yang (2012) e Johnson e Koria (2016), que utilizaram o princípio da histerese para purificar peptídeos e apresentaram o resultado através de géis SDS-PAGE como os apresentados neste trabalho (HU et al., 2010; JOHNSON; KORIA, 2016; SHEN et al., 2010; YANG et al., 2012). Contudo, estes autores fizeram uso de solução de NaCl para facilitar a precipitação de proteínas e em

seguida utilizaram métodos cromatográficos para a retirada do sal. Como Carlson (2004), não aplicamos essa técnica de precipitação com sal para que não fosse necessário fazer uso de métodos cromatográficos, mantendo assim a proposta de uma técnica de purificação mais simples e barata. Carlson foi além e apresentou em seu trabalho a comparação entre os métodos de purificação apenas por histerese – como o utilizado neste projeto -, e o método tradicional de cromatografia. Concluiu que o método utilizando o princípio de agregação da ELP foi mais vantajoso que o cromatográfico apresentando melhor solubilidade e aumento da escala de produção mais facilmente, embora esta tecnologia não se aplique a todas as variedades de proteínas (TRABBIC-CARLSON et al., 2004).

Após o processo de purificação por histerese, o sobrenadante final a 4°C foi liofilizado e pesado. Os pesos secos das proteínas recombinantes foram de 84,9mg/L de Synoeca-MP e 88,6mg/L de Synoeca-DP, superiores as produtividades apresentadas por Luo (2016), de 77,9mg de proteínas unidas uma *tag* de His e purificadas por HPLC a partir de 300ml de cultura; e 69mg/L de do peptídeo halocidin 18 unido a nove repetições de ELP, obtidas por Hu em 2010 pelo método de quantificação de proteína BCA kit (Pierce) (HU et al., 2010; LUO et al., 2016).

Já as produtividades dos Mastoparanos, tanto o sem sítio de clivagem quanto aquele com o sítio DP, foram inferiores quando comparadas com os autores citados no parágrafo anterior: 11,9mg/L de Mastoparano-MO sem sítio de clivagem e 32,4mg/L de Mastoparano-MO-DP. A escolha do tamanho da *tag* é de fundamental importância, uma vez que quanto maior ela for, mais sobrecarga metabólica trará para a célula hospedeira, que tenta, na maioria das vezes, neutralizar esse estresse ajustando e adaptando seu metabolismo para restaurar sua funcionalidade. No entanto, para que estes ajustes aconteçam, a célula desvia significativamente seu crescimento e a produção de proteínas recombinantes (ABDELHAMID et al., 2014; CARNEIRO; FERREIRA; ROCHA, 2013).

Logo, quando comparado com as produções acima, que possuem *tags* de tamanhos muito inferiores a ELP utilizada neste trabalho, o peptídeo Mastoparano-MO gerou maior estresse e sobrecarga metabólica para a célula

hospedeira que as demais, incluindo o Synoeca-MP, que apesar de possuir 200 repetições de ELPs possui 14 resíduos de aminoácidos em sua sequência enquanto o Mastoparano-MO é formado por 19 resíduos. A menor produção pode ser entendida então devido ao tamanho total do sistema, que é maior que todos os outros comparados.

Para a retirada da *tag* após as amostras purificadas, foi realizada a clivagem com ácido fórmico, o qual cliva proteínas no resíduo de ácido aspártico na ligação ácido asp-prolina, ou DP (CRIMMINS; MISCHÉ; DENSLOW, 2005). Entretanto, Costa (2015) observou que este processo é dependente de alta temperatura (37°C) e ocorre mais eficientemente com o ácido fórmico na concentração de 70% (v/v), sendo que a temperaturas mais baixas ou concentrações menores de ácido, a clivagem não é eficiente (DA COSTA et al., 2015). Neste trabalho a clivagem foi realizada nessas mesmas condições, a 37°C, com ácido fórmico na concentração de 70%, pelo período de 48 horas.

As análises por espectrometria de massa demonstraram moléculas íntegras dos peptídeos após a clivagem ácida. Como já sabemos, os íons fragmentados fazem leituras complementares em direções opostas na sequência analisada e, portanto, todo resíduo de aminoácido presente na leitura da direita para a esquerda, pode ser encontrado também da esquerda para a direita. Assim, temos as sequências do Synoeca-MP-DP e do Mastoparano-MO-DP clivadas e perfeitamente intactas nos picos de 1843 e 2310, respectivamente. Logo, os espectros são claros que houve a fragmentação entre peptídeo e ELP pela presença do resíduo de ácido aspártico, D, referente ao sítio de clivagem e também foi possível observar a presença da metionina, motivos que levaram ao aumento da massa molecular da molécula purificada. A título de confirmação temos: massa molecular do peptídeo + massa do ácido aspártico em ligação + massa da metionina ($1597+115+131 = 1843$ para o Synoeca-MP-DP e $2064+115+131 = 2310$ para o Mastoparano-MO-DP), exatamente as massas obtidas no MALDI.

O processo de clivagem das construções Synoeca-MP-DP e Mastoparano-MO-DP foi realizado como descrito no protocolo e os resultados quantitativos apontaram que o procedimento não foi tão eficaz como desejado, haja vista que na avaliação do extrato total, obtivemos uma baixa concentração

de peptídeos e foi possível observar a presença de ELPs na fração purificada. A dificuldade de interação entre o ácido fórmico e o sítio DP específico para esta ligação, provavelmente se dá pela interferência das ELPs, uma vez que para cada molécula de peptídeo e para cada sítio DP produzido, são biossintetizadas 200 moléculas de ELP.

Ainda como confirmação da presença e da interferência de ELPs mesmo após a purificação dos peptídeos clivados, obtivemos a quantificação de proteínas recombinantes na fração que não deveria conter estas moléculas, como apontado na tabela 3. Como método de quantificação, a utilização do kit de fluorescência era a melhor opção devido a ligação específica do reagente com os resíduos da sequência de aminoácidos. Para tal, o método utiliza um fluoróforo que se liga reversivelmente aos resíduos de lisina (K), histidina (H) e arginina (R). Sabendo que temos diversos resíduos de lisina na sequência de ambos os peptídeos, mas nenhum destes resíduos no pentâmero de ELP, julgamos ser um excelente método. No entanto, não podemos esquecer que a proteína recombinante possui muitas moléculas de ELP, logo, a quantificação provavelmente está sendo afetada e subestimada pela dificuldade de reação do fluoróforo com a sequência dos peptídeos.

No trabalho desenvolvido por Costa (2015), o qual utilizou o mesmo processo para retirar a *tag* de ELP, os autores não fizeram a quantificação das proteínas recombinantes produzidas, apenas demonstraram através de um gel tricina SDS-PAGE uma banda no tamanho esperado do peptídeo sem *tag* (DA COSTA et al., 2015). O presente trabalho não optou por este método por termos acesso a equipamentos e kits mais precisos, e pela presença de elastina nas amostras, o que não permitiria a migração do peptídeo no gel.

Uma vez obtida as quantificações de proteínas recombinantes, os ensaios antimicrobianos foram realizados contra a cepa resistente de *K. pneumoniae* Kpc1410503. Quando comparado o MIC do peptídeo sintético e do Synoeca-MP clivado, observamos que o peptídeo expresso heterologicamente precisou do dobro de concentração para conseguir inibir o crescimento microbiano enquanto o Synoeca-MP sem sítio de clivagem, ou seja, unido às 200 repetições de elastina não apresentou inibição nenhuma.

Levando em consideração que temos para cada 200 repetições de ELP uma molécula do peptídeo, podemos inferir que a *tag* de elastina "revestiu" o peptídeo, impedindo que ele se ligasse corretamente à membrana bacteriana, diminuindo assim sua função. Podemos inferir ainda que a presença desorganizada das moléculas de ELP dificultam a interação do peptídeo com a membrana bacteriana, como demonstrado por Simnick e colaboradores em 2010, quando demonstraram que a interação de peptídeo e membrana era muito maior em estruturas nanoengenheiradas como em micelas, do que em estruturas não organizadas como as construções testadas neste trabalho (SIMNICK et al., 2010).

O peptídeo Mastoparano-MO, que possui conhecida atividade imunomodulatória, apresentou também atividade antibacteriana variando de 2 a 12,5 μM contra microrganismos Gram-positivos como *Staphylococcus pyogenes* e de 3,8 a 31 μM contra bactérias Gram-negativas, sendo este maior MIC contra a *K. pneumoniae* (kpc971) (SILVA, 2015). No entanto, este mesmo peptídeo modificado, tanto o sintético quanto aquele produzido em sistema heterólogo, não apresentou inibição microbiana contra a cepa Kpc1410503, testada neste trabalho. Isto se deve pelas diferenças gênicas e fenotípicas das diferentes cepas, haja vista que a cepa Kpc1410503 apresenta cápsula polissacarídica e é multirresistente aos fármacos utilizados para o tratamento de infecções causadas por estes organismos.

Tabela 5: Todos os processos realizados, as construções utilizadas e os resultados obtidos desde a produção heteróloga de peptídeos fusionados a *elastin-like polypeptides*

	Produção heteróloga	Purificação (mg/mL)	Clivagem ácida	Quantificação (mg/mL)	MIC* (μM)
<i>Synoeca-MP sintético</i>	-	-	-	-	40
<i>Synoeca-MP-DP-ELP₍₂₀₀₎</i>	Ok	354,4	Ok	0016	80
<i>Sobrenadante pós clivagem</i>				0,19	
<i>Pellet pós clivagem</i>				0,13	
<i>Synoeca-MP-PD-ELP₍₂₀₀₎</i>	Ok	-	-	-	-
<i>Synoeca-MP sem sítio de clivagem</i>	Ok	339,6	-	-	-
<i>Mastoparano-MO sintético</i>	-	-	-	-	-
<i>Mastoparano-MO-DP-ELP₍₂₀₀₎</i>	Ok	129,6	Ok	0,014	-
<i>Sobrenadante pós clivagem</i>				0,52	
<i>Pellet pós clivagem</i>				0,389	
<i>Mastoparano-MO-PD-ELP₍₂₀₀₎</i>	Ok	-	-	-	-
<i>Mastoparano-MO sem sítio de clivagem</i>	Ok	47,7	-	-	-

*Os ensaios de concentração inibitória mínima foram realizados somente contra a cepa de *K. pneumoniae* Kpc1410503

(-) Experimento não realizado ou não obteve resposta

7 Conclusão

Pode-se concluir que o trabalho realizou a produção heteróloga dos peptídeos Synoeca-MP e Mastoparano-MO como proposto;

A purificação das construções com os sítios de clivagem DP e das construções sem o sítio de clivagem foi realizada utilizando a propriedade de agregação das ELPs, tornando o processo de baixo custo;

A clivagem para a retirada da *tag* de ELP com ácido fórmico em alta concentração não degradou as proteínas, mas também não foi completamente satisfatório, haja vista que foi observada a presença de elastina na porção purificada após a clivagem;

A quantificação está provavelmente subestimada pela interferência dos resíduos de ELP nas amostras purificadas;

Nos testes antimicrobianos, obtivemos um MIC acima do esperado;

Se faz necessário a otimização do processo de clivagem para a retirada completa da *tag* presente no sistema sem que haja alteração na sequência codificante dos peptídeos.

8 Perspectivas

Otimizar o processo de clivagem ácida para a completa separação da *tag* de ELP sem que haja degradação das moléculas dos peptídeos;

Testar se há sinergismo de atividade entre Synoeca-MP e Mastoparano-MO;

Avaliar a atividade imunomodulatória do Synoeca-MP;

Nanoformular os peptídeos utilizando a propriedade de *self-assembly* das moléculas de ELP.

Referências

ABDELHAMID, M. A. A. et al. Affinity purification of recombinant proteins using a novel silica-binding peptide as a fusion tag. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5677–5684, 2014.

AGNIESZKA, M.-N. K. AND M. Perspectives in Medicinal Chemistry. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, p. 73–80, 2014.

AKHTAR, M. S. et al. Antimicrobial peptides as infection imaging agents: Better than radiolabeled antibiotics. **International Journal of Peptides**, v. 2012, 2012.

ARNAU, J. et al. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 48, n. 1, p. 1–13, 2006.

AVRAM, S. et al. More effective antimicrobial mastoparan derivatives, generated by 3D-QSAR-Almond and computational mutagenesis. **Mol. BioSyst.**, v. 8, n. 2, p. 587–594, 2012.

BARACCHI, D.; MAZZA, G.; TURILLAZZI, S. From individual to collective immunity: The role of the venom as antimicrobial agent in the *Stenogastrinae* wasp societies. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 1, p. 188–193, 2012.

BENTLEY, W. E. et al. Plasmid-encoded protein: The principal factor in the metabolic burden associated with recombinant bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 7, p. 668–681, 1990.

BHUTIA, S. K.; MAITI, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 210–217, 2008.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336–343, 2016.

CAMARGO, J. F. et al. Successful treatment of carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5903–5908, 2015.

CANTÚ, M. D. et al. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.

CARNEIRO, S.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, I. Metabolic responses to

recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 396–408, 2013.

CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: An iron-uptake island. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 561–569, 2001.

ČEŘOVSKÝ, V. et al. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. **Peptides**, v. 29, n. 6, p. 992–1003, 2008.

CHEN, W. et al. Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor* Fabricius. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 1887–1892, 2008.

CHETCUTI ZAMMIT, S.; AZZOPARDI, N.; SANT, J. Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. **European Journal of Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 571–576, 2014.

COLLINS, T. et al. Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): Key parameters for optimisation. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2013a.

COLLINS, T. et al. Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21 (DE3): key parameters for optimisation. **Microbial Cell Factories**, p. 1–16, 2013b.

COLLINS, T. et al. High level biosynthesis of a silk-elastin-like protein in *E. coli*. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 7, p. 2701–2708, 2014.

CORRALES-GARCIA, L. et al. Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. **Protein Expression and Purification**, v. 89, n. 1, p. 33–43, 2013.

CORTÉS, G. et al. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2583–2590, 2002.

CRIMMINS, D. L.; MISCHE, S. M.; DENSLOW, N. D. Chemical Cleavage of Proteins in Solution. **Current Protocols in Protein Science**, p. 11.4.1-11.4.11, 2005.

DA COSTA, A. et al. Development of elastin-like recombinamer films with

antimicrobial activity. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 2, 2015.

DAIKOS, G. L. et al. Activity of imipenem against VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the murine thigh infection model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 2, p. 202–205, 2007.

DENG, T. et al. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. **Protein Expression and Purification**, v. 140, p. 52–59, 2017.

DENNISON, S. et al. Anticancer α -Helical Peptides and Structure / Function Relationships Underpinning Their Interactions with Tumour Cell Membranes. **Current Protein & Peptide Science**, v. 7, n. 6, p. 487–499, 2006.

DOMENICO, P. et al. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4495–4499, 1994.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. **European Biophysics Journal**, v. 37, n. 6, p. 879–891, 2008.

DUNN, M. J. Gel Eletrophoreses: Proteins. **Bios Scientific Publishers**, v. 119, n. 2, p. 25–26, 1994.

FENG, Y. et al. A novel self-cleavage system for production of soluble recombinant protein in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 99, p. 64–69, 2014.

FREIRE, D. Dissertação de mestrado intitulada: Atividade Antimicrobiana do novo peptídeo Synoeca-MP isolado da peçonha de *Synoeca surinama* frente a bactérias resistentes. **Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**, 2011.

GIROTTI, A. et al. Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 10, p. 1174–1186, 2011.

GWYNN, M. N. et al. Challenges of antibacterial discovery revisited. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, n. 1, p. 5–19, 2010.

HENRIKSEN, J. R. et al. Side chain hydrophobicity modulates therapeutic activity and membrane selectivity of antimicrobial peptide mastoparan-X. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014.

HIRAI, Y. et al. A new mast cell degranulating peptide “mastoparan” in the venom of *Vespula lewisii*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1942–4, 1979.

HU, F. et al. Expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with elastin-like polypeptides in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2377–2387, 2010.

INGHAM, A. B.; MOORE, R. J. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1, 2007.

JAIDANE, N. et al. Genomic insights into Colistin Resistant *Klebsiella pneumoniae* from a Tunisian teaching hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. December, p. AAC.01601-17, 2017.

JOHNSON, T.; KORIA, P. Expression and Purification of Neurotrophin-Elastin-Like Peptide Fusion Proteins for Neural Regeneration. **BioDrugs**, v. 30, n. 2, p. 117–127, 2016.

JÚNIOR, J. J. L. A. Dissertação de mestrado “Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de rãs : citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas e genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos”. **Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas**, p. 30, 2012.

KAYE, K. S.; POGUE, J. M. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 10, p. 949–962, 2015.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Fimbrial surface display systems in bacteria: From vaccines to random libraries. **Microbiology**, v. 146, n. 12, p. 3025–3032, 2000.

KOZLOV, S. A. et al. Latacins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaei* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 30, p.

20983–20992, 2006.

KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 12, p. 2651–2668, 2003.

LEE, C.; LEVIN, A.; BRANTON, D. Copper staining: A five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 308–312, 1987.

LEE, T.-H.; N. HALL, K.; AGUILAR, M.-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 25–39, 2015.

LEITE, M. L.; DA CUNHA, N. B.; COSTA, F. F. Antimicrobial peptides, nanotechnology, and natural metabolites as novel approaches for cancer treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, p. 21, 2017.

LEUSCHNER, C.; HANSEL, W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 19, p. 2299–2310, 2004.

LI, N. K. et al. Molecular description of the I₀ behavior of an elastin-like polypeptide. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 10, p. 3522–3530, 2014.

LI, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. **Protein Expression and Purification**, v. 80, n. 2, p. 260–267, 2011.

LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207–215, 2012.

LI, Y.; CHEN, Z. RAPD: A database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. **FEMS Microbiology Letters**, v. 289, n. 2, p. 126–129, 2008.

LIM, H. K. et al. Induction of the T7 promoter using lactose for production of recombinant plasminogen kringle 1-3 in *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 225–230, 2004.

LIU, F. et al. Epidemiology, microbiology and treatment implications in adult patients hospitalized with pneumonia in different regions of China: A retrospective study. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, n. 10, p. 3875–3887, 2017.

LUO, D. et al. High level expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* with AK-TAG. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–11, 2016.

MACARRON, R. et al. Impact of high-throughput screening. **Nature**, v. 10, n. March 2011, p. 188–195, 2011.

MACEWAN, S. R.; HASSOUNEH, W.; CHILKOTI, A. Non-chromatographic Purification of Recombinant Elastin-like Polypeptides and their Fusions with Peptides and Proteins from *Escherichia coli*; **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 1–8, 2014.

MACHADO, R. et al. Electrospun silk-elastin-like fibre mats for tissue engineering applications. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 8, n. 6, 2013a.

MACHADO, R. et al. High level expression and facile purification of recombinant silk-elastin-like polymers in auto induction shake flask cultures. **AMB Express**, v. 3, p. 1–15, 2013b.

MACHADO, R. et al. Exploring the Properties of Genetically Engineered Silk-Elastin-Like Protein Films. **Macromolecular Bioscience**, v. 15, n. 12, p. 1698–1709, 2015.

MENEZES, R. S. T. et al. Molecular phylogeny and historical biogeography of the Neotropical swarm-founding social wasp genus *Synoeca* (Hymenoptera: Vespidae). **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

MEYER, D. E.; CHILKOTI, A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 11, p. 1112–1115, 1999.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413–451, 2007.

MISHRA, B. et al. A novel antimicrobial peptide derived from modified N-terminal domain of bovine lactoferrin: Design, synthesis, activity against multidrug-resistant bacteria and *Candida*. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 677–686, 2013.

MORTARI, M. R. et al. Pharmacological characterization of *Synoeca cyanea* venom: An aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region.

Toxicon, v. 59, n. 1, p. 163–170, 2012.

MULDER, K. C. L. et al. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. October, p. 1–23, 2013.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016.

PARACHIN, N. S. et al. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 446–456, 2012.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. 4–7, 2010.

PILONETTO, M. et al. Hospital gowns as a vehicle for bacterial dissemination in an intensive care unit. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 206–210, 2004.

PINHEIRO DA SILVA, F.; MACHADO, M. C. C. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 308–314, 2012.

PROKESCH, B. C. et al. Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. e190–e195, 2016.

RATES, B. et al. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 35–52, 2011.

RAVI, C.; JEYASHREE, A.; RENUKA DEVI, K. Antimicrobial Peptides from Insects : An Overview. **Research in Biotechnology**, n. January 2011, 2011.

RODRIGUES-CABELLO, C. Smart Elastin-like Polymers. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. February 2004, p. 0–14, 2004.

SAMBROOK, M. R. G. J. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.: s.n.]. v. 33

SAXENA, R.; NANJAN, M. J. Elastin-like polypeptides and their applications in anticancer drug delivery systems: A review. **Drug Delivery**, v. 22, n. 2, p. 156–167, 2015.

SHAH, M. et al. Biodegradation of elastin-like polypeptide nanoparticles. **Protein Science**, v. 21, n. 6, p. 743–750, 2012.

SHEN, Y. et al. Expression and purification of moricin CM4 and human b - defensins 4 in Escherichia coli using a new technology. **Microbiological Research**, v. 165, p. 2–7, 2010.

SILVA, O. Defesa de doutorado intitulada: Modificação incremental de peptídeos: novas perspectivas para o tratamento de infecções e erradicação de biofilmes bacterianos. **Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora**, 2015.

SIMNICK, A. J. et al. Morphing low-affinity ligands into high-avidity nanoparticles by thermally triggered self-assembly of a genetically encoded polymer. **ACS Nano**, v. 4, n. 4, p. 2217–2227, 2010.

SMITS, F. C. M. et al. Elastin-like polypeptide based nanoparticles: Design rationale toward nanomedicine. **Macromolecular Bioscience**, v. 15, n. 1, p. 36–51, 2015.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–128, 2005.

SOUZA, B. M. DE et al. Structure-activity relationship of mastoparan analogs: Effects of the number and positioning of Lys residues on secondary structure, interaction with membrane-mimetic systems and biological activity. **Peptides**, v. 72, p. 164–174, 2015.

STAHLHUT, S. G. et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 21, p. 6592–6601, 2009.

TRABBIC-CARLSON, K. et al. Expression and purification of recombinant proteins from Escherichia coli: Comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. **Protein Science**, p. 3274–3284, 2004.

WANG, G. Human antimicrobial peptides and proteins. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 5, p. 545–594, 2014.

WANG, R. et al. Identification and functional analysis of a novel tryptophyllin

peptide from the skin of the red-eye leaf frog, *agalychnis callidryas*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 2, p. 209–219, 2015.

WEINER, L. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288–1301, 2016.

XU, CHUNYU; KOPECK, J. Genetically Engineered Block Copolymers : Influence of the Length and Structure of the Coiled-Coil Blocks on Hydrogel Self-Assembly. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 3, p. 674–682, 2008.

YANG, K. et al. Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides. **Protein Expression and Purification**, v. 85, n. 2, p. 200–203, 2012.

YEAMAN, M. R. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

YEH, K. M. et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 466–471, 2007.

ZHANG, G. et al. Modification of antimicrobial peptide with low molar mass poly(ethylene glycol). **Journal of Biochemistry**, v. 144, n. 6, p. 781–788, 2008.

ZHOU, L. et al. TrxA mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 64, n. 2, p. 225–230, 2009.