



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
DEPARTAMENTO E BIOLOGIA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO Pg-AMP1 RECOMBINANTE,
UM PEPTÍDEO RICO EM GLICINA,
ISOLADO DE GOIABA (*Psidium guajava* L.)**

Letícia Stephan Tavares

JUIZ DE FORA
2009

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO Pg-AMP1 RECOMBINANTE, UM PEPTÍDEO
RICO EM GLICINA,
ISOLADO DE GOIABA (*Psidium guajava* L.).**

Letícia Stephan Tavares

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Biológicas
na área de Genética e
Biotecnologia

Orientador: Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora
2009

LETÍCIA STEPHAN TAVARES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO Pg-AMP1 RECOMBINANTE, UM
PEPTÍDEO RICO EM GLICINA,
ISOLADO DE GOIABA (*Psidium guajava* L.)**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora
2009

LETÍCIA STEPHAN TAVARES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO Pg-AMP1 RECOMBINANTE, UM PEPTÍDEO
RICO EM GLICINA,
ISOLADO DE GOIABA (*Psidium guajava* L.)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - área de Genética e Biotecnologia – da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos
Instituto de Ciências Biológicas da UFJF

Professor Doutor Octávio Luiz Franco
Instituto de Ciências Biológicas da UFJF

Professora Doutora Simoni Campos Dias
Universidade Católica de Brasília

Juiz de Fora
2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a busca infinita por respostas nem sempre compreensíveis.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A maneira como a vida nos muda de caminhos e faz com que apenas os grandes desejos se realizem;
- ✓ Ao meu filho, Márcio, pelas inúmeras brincadeiras adiadas para que este trabalho fosse possível;
- ✓ Ao Professor Dr. Marcelo por ter tornado este trabalho real, fornecendo tudo o possível para o seu melhor desenvolvimento. Pela orientação, confiança, disponibilidade, carinho e paciência, sem as quais este trabalho não teria sido tão gratificante e prazeroso;
- ✓ Ao Dr. Lyderson pela confiança em meu trabalho;
- ✓ Ao Dr. Octávio por iluminar o caminho;
- ✓ Ao Dr. José Marcello pelo exemplo e disposição;
- ✓ Ao Dr. Saulo pela sempre boa vontade em ajudar;
- ✓ Ao Dr. Marco Antônio da Embrapa Gado de Leite por ter aberto as portas de seu laboratório, pela ajuda elucidando técnicas e procedimentos,
- ✓ A Dra. Nádia por ter aberto as portas do NIQUA;
- ✓ Ao Dr. Raul do Laboratório de Biologia Celular por estar sempre pronto a ajudar e discutir resultados;
- ✓ As minhas (des) orientadas Ana Paula e Júnya pela ajuda e participação neste trabalho, pela disponibilidade e boa vontade, sem vocês este trabalho teria sido muito mais difícil, meu muito obrigada.
- ✓ Ao Silvioney por seus tampões e soluções sempre feitas com a maior eficiência;
- ✓ Ao Robert a Ana Luísa pela sempre presteza em ajudar;
- ✓ Aos colegas do mestrado Débora, Diego, Fernanda, João, Marcelo, Michelle, Priciane e Sabine, pela colaboração direta ou indireta em todo o processo de formação;

- ✓ Aos colegas do laboratório Ana Elisa, Aline, Ariane, Artur, Bruna, Cássia, Joyce, Juliana, Lucas, Luiz, Natália e Shaiany pelos momentos de ócio criativo tão necessário á ciência;
- ✓ As amigas Pâmela, Cecília, Fernanda e Priciane pelo companheirismo;
- ✓ A minha mãe, Ana Maria, pelo exemplo de dedicação e busca sem limites por conhecimento e aprimoramento sem, contudo deixar de lado o carinho e o conforto de mãe;
- ✓ Ao meu pai, Flávio Augusto, por ter se tornado perto apesar da distância;
- ✓ Aos meus irmãos João, Thiago, Francesca pela compreensão, sem muitas vezes entender o porquê de escolhas tão difíceis;
- ✓ A minha avó Auta, sem a qual esta história não seria contada, por sua teimosia e perseverança com a qual tanto me identifico;
- ✓ Ao Amino, Fabrícia, Tâmara e Alice, por terem cada um a seu modo e tempo, ajudado a tornar a caminhada mais agradável;
- ✓ Ao Márcio e Márcia pela colaboração neste processo;
- ✓ A todos os amigos que participaram direta ou indiretamente deste caminho;
- ✓ As pedras que houveram no meio do caminho sem impedir o caminhar;
- ✓ A todos meu muito obrigada.

RESUMO

A busca por novos antibióticos de amplo espectro de ação tem aumentado nas últimas décadas devido ao número crescente de bactérias resistentes aos antibióticos convencionais. O peptídeo recombinante Pg-AMP1, expresso em um sistema heterólogo em *Escherichia coli*, apresentou atividade antibacteriana contra linhagens Gram-positivas e Gram-negativas. A partir da seqüência de aminoácidos do peptídeo isolado de sementes de goiaba (*Psidium guajava* L.) o gene correspondente ao peptídeo foi modificado utilizando-se o códon preferencial para expressão em *E. coli* e construído um vetor de expressão. Uma região codificadora para cauda de histidina foi fusionada ao gene pg-amp1 permitindo a purificação por cromatografia de afinidade com íons de níquel imobilizados em coluna de sefarose. Utilizando SDS-PAGE e análise *in silico* identificamos a massa molecular do Pg-AMP1 recombinante de 7,368 kDa e pl 8.93. O peptídeo recombinante foi expresso principalmente na forma insolúvel, agregando-se em corpos de inclusão que foram tratados com agentes desnaturantes obtendo o peptídeo solúvel. Após a purificação pela coluna de níquel obtivemos um rendimento de 13 mg por litro de meio de cultura. O peptídeo Pg-AMP1 recombinante apresentou atividade contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermides*. O peptídeo recombinante Pg-AMP1 não mostrou atividade contra os fungos fitopatogênicos testados. Devido a sua ação contra estas cepas de bactérias patogênicas humanas, o Pg-AMP1 recombinante torna-se um promissor antimicrobiano a ser utilizado no desenvolvimento de novos antibióticos contra cepas resistentes aos fármacos comumente usados.

Palavras chave: Pg-AMP1. Peptídeo Antimicrobiano. Expressão Heteróloga.

ABSTRACT

The search for new antibiotics of broad spectrum of activity has increased in recent decades due to the increasing number of bacteria resistant to conventional antibiotics. The Pg-AMP1 recombinant peptide expressed in a heterologous system in *Escherichia coli*, strains showed antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative. From the sequence of amino acid peptide isolated from the seeds of guava (*Psidium guajava* L.) peptide corresponding to the gene was modified using the preferred codon for expression in *E. coli* and constructed a vector for expression. A region coding for the histidine tail was merged the gene-pg amp1 allowing purification by affinity chromatography with nickel ions immobilized on the column sepharose. Using SDS-PAGE and *in silico* analysis identified the molecular weight of Pg-AMP1 recombinant with 7.368 kDa and pI 8.93. The recombinant peptide was expressed mostly as insoluble form, adding up in inclusion bodies, which were treated with denaturants agents to solubilize the peptide. The purification of peptide by nickel sepharose column yielded 13 mg per liter of culture medium. The Pg-AMP1 recombinant peptide showed activity against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and against gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The recombinant peptide Pg-AMP1 showed no activity against the phytopathogenic fungi tested. Due to its action against these strains of human pathogenic bacteria, the recombinant Pg-AMP1 is a promising antimicrobial for use in developing new antibiotics against strains resistant to commonly used drugs.

Keywords: Pg-AMP1. Antimicrobial peptide. Heterologous Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo da forma de ação de AMPs sobre a membrana celular do patógeno	8
Figura 2.	Alinhamento do Pg-AMP1 com outras proteínas ricas em glicina	10
Figura 3.	Seqüência nucleotídica do gene <i>pg-amp1</i> e de aminoácidos do Peptídeo Pg-AMP ₁	20
Figura 4.	Mapa de restrição do vetor pQE30-Pg- AMP1 e representação esquemática do cassete de expressão do Pg-AMP1	21
Figura 5.	Gel de Agarose 2%. Digestão do plasmídeo recombinante PQE30 <i>pg-amp1</i> com <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III	28
Figura 6.	SDS-PAGE 15%. Análise da presença do Pg-AMP1 na fração insolúvel com diferentes tempos e concentrações de IPTG	31
Figura 7.	SDS-PAGE 15%. Análise da presença do Pg-AMP1 na fração solúvel e insolúvel	31
Figura 8.	SDS-PAGE 15%. Análise do (His) ₆ - Pg-AMP1 após purificação com a coluna His Trap	32
Figura 9.	SDS-PAGE 15%. Análise da purificação do Pg-Amp1 recombinante após purificação pela cromatografia de afinidade com íons magnéticos de níquel His Trap HP	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Atividade antimicrobiana do Pg-AMP1 recombinante	36
Tabela 2.	Lista dos aminoácidos, símbolos, abreviações e nomenclatura	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alf-AFP	Alfafa peptídeo antifúngico
Ac-AMP1	<i>Amaranthus caudatus</i> peptídeo antimicrobiano 1
Ac-AMP2	<i>Amaranthus caudatus</i> peptídeo antimicrobiano 2
ALDH2	Aldeído desidrogenase
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
Avr	Genes de avirulência
ATCC	Marca registrada da <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de tipos de cultura da América)
AtGRP1	Repetições ricas em glicina de <i>Arabidopsis thaliana</i> 1
AtGRP5	Repetições ricas em glicina de <i>Arabidopsis thaliana</i> 5
BL21(DE3)	Linhagem de <i>E.coli</i> para expressão da Invitrogen
BSA	Soro de albumina bovina
BDA	Meio de cultivo de agar, dextrose e batata
CLSI/NCCLS	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto e padrões clínicos e laboratoriais)
CFU	Unidade formadora de colônia
DELFs	Genes semelhantes às defensinas
DM-AMP ₁	<i>Dahlia merckii</i> peptídeo antimicrobiano 1
DNA	Ácido desoxiribonucleico
g	Gramas
GGX	Motivo repetitivo em glicinas
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GRPs	Proteínas ricas em glicinas
His	Resíduo do aminoácido histidina
IMAC	Cromatografia de afinidade por imobilização dos íons metálicos
IPTG	Isopropil-tio-galactosídeo
Kb	Unidade de milhar(s) de par (s) de base (s)
kDa	Kilodaltons
LacZ	Gene que codifica a enzima β -galactosidase
LB	Meio de Cultura <i>Lysogny broth</i>
LTPs	Proteínas de transferência de lipídios
MBPs	Proteínas de ligação a mirosinases

mg	Miligramas
MIC	Concentração inibitória mínima
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
μl	Micro litro
NBS-LRR	Proteínas citoplasmáticas de ligação a nucleotídeos com repetições ricas em leucina
OD	Densidade ótica
OI2-2	Peptídeo induzido por ozônio em <i>Atriplex canescens</i> 2
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da enzima DNA polimerase
Pg-AMP ₁	<i>Psidium guajava</i> peptídeo antimicrobiano 1
pI	Ponto isoelétrico
PI	Iodeto de propídio
pQE30	Vetor de expressão da Qiagen
PR	Proteínas relacionadas ao patógeno
PtGRP1	Repetições ricas em glicina de <i>Petunia hybrida</i> 1
PT5	Promotor do bacteriófago T5
PT7	Promotor do bacteriófago T7
pUC18	vetor de clonagem
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
RRMs	Motivos de reconhecimento ao RNA
RS-AFP2	<i>Raphanus sativus</i> peptídeo antifúngico 2
SbGRP1	Peptídeo rico em glicina de <i>Glycine max</i> 1
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel
TSB	Meio de cultivo com triptona e soja
TFM5	Peptídeo rico em glicina de tomate
TMV	Tobacco Mosaic Vírus
TOP10	Linhagem de <i>E.coli</i> usada para clonagem
tRNA	RNA transportador
UDP	N-acetilmuramilpeptideo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) e o Sistema Imune Inato Vegetal.	4
1.2 Proteínas Ricas em Glicina	8
1.3 Transformação Gênica e Expressão Heteróloga	13
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAL e MÉTODOS	18
4 RESULTADOS	27
4.1. Construção do Vetor de Expressão	27
4.2. Expressão da proteína recombinante Pg-AMP₁	29
4.3. Purificação do peptídeo recombinante	30
4.4. Cromatografia de Afinidade	33
4.5. Ensaio Antibacterianos	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	47
7 PERSPECTIVAS	48
8 REFERÊNCIAS	49
ANEXO A	58
ANEXO B	67
ANEXO C	68

1 INTRODUÇÃO

Pequenos peptídeos catiônicos anfifílicos são encontrados em virtualmente todos os seres vivos como um antibiótico natural de defesa contra microorganismos (HANCOCK e SAHL, 2006). Interações entre patógenos e hospedeiros resultam em estratégias de inibição mútua, evasão e adaptação que se desenvolvem ao longo de milhões de anos em um processo contínuo e altamente dinâmico de co-evolução. Quando este balanço delicado entre patógeno e hospedeiro é rompido, como em doentes imunodeprimidos, pode levar a conseqüências potencialmente devastadoras e de difícil erradicação (PESCHEL e SAHL, 2006). A busca por novos compostos antimicrobianos tem aumentado em contrapartida ao crescente número de bactérias resistentes aos antibióticos de uso tradicional (FURUYA e LOWY, 2006). Novos antibióticos de uso restrito têm sido testados, buscando a inibição de bactérias causadoras de infecções hospitalares. Yang et al. (2007) clonou e testou a ação de uma colicina 5 contra *E.coli* causadoras de infecções hospitalares em pacientes imunodeprimidos. O peptídeo antimicrobiano Ay-AMP, apresenta grande ação antifúngica além de ser resistente ao efeito de proteases e aquecimento, mostrando ser promissor o desenvolvimento do mesmo como fármaco (RIVILLAS-ACEVEDO e SORIANO-GARCIA, 2007).

Os seres vivos de maneira geral possuem diversos mecanismos que os protegem contra patógenos. Alguns desses mecanismos são constitutivos, ou seja, expressos de maneira constante em todos os tecidos, condições ambientais e de desenvolvimento. Outros são expressos apenas quando induzidos por elicitores endógenos ou exógenos. Diversos compostos que fazem parte do sistema de defesa, conferindo resistência contra bactérias patogênicas, fungos e vírus, já foram identificados em vários organismos (BROGDEN, 2005).

Os vegetais são expostos de forma contínua a um grande número de organismos patogênicos do ambiente, de maneira que, ao longo do processo evolutivo, diversos mecanismos de defesa como a síntese de componentes com baixo peso molecular, proteínas e peptídeos com atividades antifúngicas e antibacterianas (AMPs), surgiram e foram conservados em diversos gêneros de

plantas (BROEKAERT et al., 1995; GARCIA-OLMEDO et al., 1995; TREGGAR et al., 2002). Uma vez que as proteínas participam direta ou indiretamente de todos os processos celulares, tais como na defesa imune inata vegetal, torna-se fundamental a identificação e compreensão da função dos complexos protéicos envolvidos na resposta imune.

Várias proteínas e peptídeos antimicrobianos já foram identificados como constituintes do sistema de defesa em vegetais, dentre as mais conhecidas pode-se destacar as lecitinas, as proteínas relacionadas aos patógenos (PR), as glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, as proteínas semelhantes às ciclofilinas, as proteínas inativadoras de ribossomos e os inibidores de proteases (EGOROV et al., 2005). Outra classe bastante importante, a dos peptídeos antimicrobianos (AMPs), também participa ativamente do mecanismo de defesa imune primária dos vegetais contra microorganismos (MONTESINOS, 2007).

Os peptídeos antimicrobianos são pequenas sequências de peptídeos, geralmente menores que 50 resíduos de aminoácidos, que constituem um importante mecanismo ancestral de resistência inata, atuando de forma rápida e metabolicamente econômica como primeira linha de defesa contra patógenos apresentando um amplo espectro de ação e já foram identificados em diversos organismos (EGOROV et al., 2005; MONTESINOS, 2007). Koike et al. (2002) identificou em plantas de trigo o AMP *Tad1*, com estrutura semelhante às Defensinas com ação contra *Pseudomonas cichorii* e como resposta ao frio. Por outro lado Park et al. (2000) identificou em *Medicago* dois AMPs nomeados de shepherin I e II com estrutura ricas em glicina e histidina respectivamente apresentando ação contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Montesinos (2007) descreveu AMPs de origem bacteriana como as Bacteriocinas que inibem bactérias fitopatogênicas. Moreno et al. (2003) descreveu a ação do AMP AFP extraído de *Aspergillus giganteus* com ação contra *Botrytis cinerea*.

O conhecimento acerca do sistema imune inato vegetal, associado com a engenharia genética, tem sido usado para a síntese de produtos biotecnológicos, tais como cultivares que apresentem resistência aumentada contra pragas agrícolas e patógenos (KAWATA et al., 2003; MARSHALL e ARENAS, 2003; PORTIELES, AYRA e BORRAS, 2006). Esta estratégia tem contribuído para solucionar numerosos problemas associados à maturação, estocagem e processamento, possibilitando

aumentos quantitativos e qualitativos na produção agrícola (NIELSEN et al., 1997). Além disso, muitos destes AMPs têm sido empregados também como produtos farmacêuticos no tratamento de infecções bacterianas resistentes aos antibióticos sintéticos convencionais (BROGDEN, 2005). Esse cenário geral circunda o objeto desta pesquisa.

Nos últimos anos, o número de bactérias resistentes aos antibióticos convencionais tem aumentado. Muitas infecções hospitalares têm sido de difícil tratamento devido às bactérias oportunistas, muitas pertencentes à microbiota normal e que, em organismos imune-deprimidos, tornam-se de difícil e caro tratamento (HANCOCK e SAHL, 2006). Estudos com *Staphylococcus aureus* com resistência aos antibióticos meticilina e vancomicina, mostraram que esta bactéria pode modificar sua parede celular, aumentando a produção de N-acetilglucosamina (GlcNAc), de monômeros precursores de mureína (UDP-N-acetilmuramilpeptideo) e também aumentar a produção de proteínas que se ligam a penicilina. Desta maneira a bactéria forma uma espessa camada sobre a membrana celular que impede a passagem do antibiótico até o citoplasma (PELEGRINI et al., 2008). Resistência a antibióticos do tipo vancomicina tem sido observada em vários tipos de enterococcus antes sensíveis a este antibiótico. Através da conjugação plasmídial entre as cepas diferentes de enterococcus, a resistência a vancomicina tende a se espalhar rapidamente limitando a ação desta droga (NOVAK et al., 1999; FRIDKIN et al., 2005).

A busca de novos antimicrobianos é de grande importância para a criação de novos fármacos, quer seja de amplo espectro de ação, ou contra bactérias específicas, tais como as causadoras de infecções hospitalares. Nas duas últimas décadas, vários estudos têm sido publicados demonstrando que peptídeos catiônicos e não-catiônicos expressos em plantas, bactérias, vertebrados e invertebrados atuam de maneira sinérgica na resposta imune (MARSHALL e ARENAS, 2003; HANCOCK e SAHL, 2006). Desta forma a busca e identificação de AMPs a partir de fontes naturais podem constituir a base para uma nova geração de drogas para o tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos (HANCOCK e DIAMOND, 2000; MARSHALL e ARENAS, 2003). O estudo dos AMPs tem se mostrado promissor também no tratamento de outras doenças como câncer, viroses e

infecções parasíticas (ANDERSEN et al., 2001; TANAKA, 2001; VIZIOLI e SALSET, 2002).

No presente trabalho, sintetizamos e expressamos o gene que codifica um peptídeo com ação antimicrobiana isolado de sementes de goiaba (*Psidium guajava*) por Pelegrini et al. (2008), denominado Pg-AMP1. Em seguida foram feitos bioensaios com bactérias patogênicas em humanos e fungos fitopatogênicos, de maneira a testar a ação antimicrobiana do peptídeo e estabelecer suas concentrações inibitórias mínimas para os diferentes microorganismos testados.

1.1 Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) e o Sistema Imune Inato Vegetal

O sistema imune inato vegetal constitui o primeiro mecanismo contra patógenos e ao contrário do sistema imune adaptativo, é imediato, não-específico e variado (RADEK e GALLO, 2007). Este complexo modo de defesa inclui vias de sinalização interna, espessamento da parede celular, apoptose da área infectada e a produção de diferentes compostos antimicrobianos. Dentre estes, podem ser citados os peptídeos antimicrobianos (AMPs), os compostos fenólicos, os metabólitos secundários, as proteínas de baixo peso molecular como os peptídeos ricos em glicina, as defensinas, as proteínas de transferência de lipídios, os ciclotídeos, as albuminas 2S, dentre outros (TAVARES et al., 2008).

No caso dos AMPs, o mecanismo de indução da expressão envolve o reconhecimento do elicitor pelo hospedeiro, ativando a transcrição destes peptídeos, gerando e regulando uma reação de hipersensibilidade que atua diretamente nos tecidos adjacentes ao infectado pelo patógeno (CASTRO e FONTES, 2005). Os elicitores podem ser componentes da superfície celular do patógeno, como a quitina e β -glicanas. A identificação do elicitor leva a uma ativação de enzimas específicas no hospedeiro em resposta ao ataque como, por exemplo, as quitinases ou β -gluconases. Plantas transgênicas de canola (*Brassica napus* L.), expressando constitutivamente uma endoquitinase de feijão, apresentaram um aumento na

resistência contra o fungo *Rhizoctonia solani*, pois a quitina constituinte da parede celular do patógeno foi degradada (DIXON, HARRINSON e LAMB, 1994).

Os AMPs são divididos em cinco classes principais de genes de resistência, de acordo com o domínio protéico identificado *in silico*: a classe das proteínas citoplasmáticas de ligação a nucleotídeos com repetições ricas em leucina (NBS-LRR); os domínios extra citoplasmáticos ricos em leucina; os receptores quinase serina/treonina citoplasmáticos com repetições ricas em leucina extracelulares; quinases sem receptores citoplasmáticos e os domínios fusionados ancorados de membrana. Além da morte celular programada, o reconhecimento do elicitor ativa a produção de compostos fenólicos, de síntese de proteínas de defesa, de acúmulo de fitormônios, de moléculas sinalizadoras como o ácido salicílico e o ácido jasmônico, bem como a produção de peptídeos antimicrobianos (DIXON, HARRINSON e LAMB, 1994, GARCIA-OLMEDO et al., 1995, HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996; LAY e ANDERSON, 2005).

Os AMPs, de forma geral, podem ser produzidos por duas vias. Na maioria dos organismos, os AMPs são sintetizados pela maquinaria celular usando ribossomos. No entanto, alguns fungos e bactérias podem sintetizar peptídeos não-ribossômicos através da ação da enzima peptídeo sintetase não-ribossomal que são proteínas multifuncionais que biosintetizam pequenos peptídeos independentemente da maquinaria ribossômica através da quebra de proteínas maiores. Estes são chamados peptabólitos, ciclopeptídeos e pseudopeptídeos (HANCOCK e CHAPPLE, 1999; THEVISSSEN, TERRAS e BROEKAERT, 1999; MARSHALL e ARENAS, 2003; MONTESINOS, 2007). O processo não-ribossômico produz pequenos e simples peptídeos, que podem ser formados por uma única α -hélice, enquanto peptídeos mais complexos, como as defensinas, apresentam uma estrutura contendo α -hélices e folhas β -pregueadas e são produzidas pela via ribossômica.

Segundo Marshall e Arenas (2003) os AMPs podem ser divididos em três diferentes classes de acordo com a sua estrutura. Podem ser lineares, formadores de estruturas em hélices, peptídeos abertos ricos em cisteínas contendo uma ou várias pontes dissulfeto e ainda aqueles constituídos em sua maioria de um mesmo aminoácido como os ricos em glicina, prolina, histidina ou triptofano.

Peptídeos ricos em glicina como o Ac-AMP1 e Ac-AMP2 (*Amaranthus caudatus* AMP1-2), identificadas por Broekaert et al. (1992) são ativos contra

bactérias Gram-negativas e fungos. Park et al. (2000) identificou peptídeos ricos em glicina e histidina, nomeados como Sepherin I e II que atuam contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os peptídeos ricos em cisteínas como o RS-AFP2 (*Raphanus sativus* – peptídeo antifúngico 2), identificado por Terras et al. (1992), agem contra bactérias e fungos, enquanto que o DM-AMP₁ (*Dahlia merckii* – peptídeo antimicrobiano 1) identificado por Thevissen, Terras e Broekaert (1999) e o Alf-AFP (alfafa – peptídeo antifúngico) identificado por Gao et al. (2000), atuam apenas contra fungos.

O mecanismo de ação proposto para AMPs envolve o reconhecimento, ligação e permeabilização da membrana celular do patógeno, através da interação mediada por receptores da bicamada lipídica, promovendo a desorganização dos canais de íons dependentes de voltagem (RADEK e GALLO, 2007). Alguns AMPs causam a ruptura da membrana, enquanto outros atravessam a bicamada lipídica e interagem com a maquinaria celular inibindo a síntese de ácidos nucleicos, proteínas ou atividade enzimática (BROGDEN, 2005).

Vários modelos têm sido propostos para os sítios de interação dos AMPs com a membrana celular do patógeno (GIULIANI, PIRRI e NICOLETTO, 2007). Brogden (2005) sugere as seguintes formas de interação do AMP com o patógeno: modelo “barrel stave”, identificado em peptídeos com configuração α -hélice, propõe que os peptídeos se agregam formando uma bolha na membrana com um lúmen na porção central formando um poro na membrana. Em outro modelo, o de “tapete” (carpet model), os peptídeos se organizam paralelamente à membrana desorganizando-a, de forma semelhante a um detergente, induzindo a desagregação da membrana e formação de micelas. No modelo do “poro toroidal”, as hélices dos AMPs se inserem na membrana induzindo a formação de uma monocamada lipídica pelo dobramento da membrana, formando poros. Este modelo difere do modelo “barrel stave”, pois os peptídeos se associam com a parte hidrofílica da membrana ao mesmo tempo em que penetram perpendicularmente na mesma (BROGDEN, 2005). Existe ainda o modelo de canais agregados no qual os peptídeos se ligam na parte hidrofílica dos fosfolípidos inserindo-se na membrana de forma não estruturada e formando poros rápidos na membrana (HANCOCK e CHAPPLE, 1999). Na figura 1, estão esquematizados três modelos das formas de ação conhecidas para os peptídeos antimicrobianos.

Cada tipo de AMP (ricos em glicina, defensinas, LTPs, MBPs, Snakinas, dentre outros) é codificado por genes únicos que fazem parte de famílias gênicas altamente homólogas localizadas em agrupamentos ou “clusters” em um mesmo cromossomo. Esta organização gênica reflete a evolução das inúmeras subclasses de AMPs em diferentes organismos, e como são expressos em tecidos específicos ou em situações diferentes de indução (HANCOCK e DIAMOND, 2000). Em *Arabidopsis thaliana* foram identificados mais de 300 genes semelhantes às defensinas (DELFs), cujos “clusters” mostram sucessivos eventos de duplicação da mesma seqüência e refletem, de acordo com a similaridade entre os nucleotídeos, o tempo em que ocorreram tais duplicações. A análise destes “clusters” fornece ainda uma maneira de avaliar a pressão evolutiva sobre os genes, uma vez que os domínios correspondentes ao peptídeo sinal são conservados, enquanto que a seqüência correspondente ao peptídeo maduro pode variar. Apesar disso, alguns aminoácidos, como as cisteínas são conservados já que são essenciais na conformação tridimensional do peptídeo (SILVERSTEIN et al., 2005).

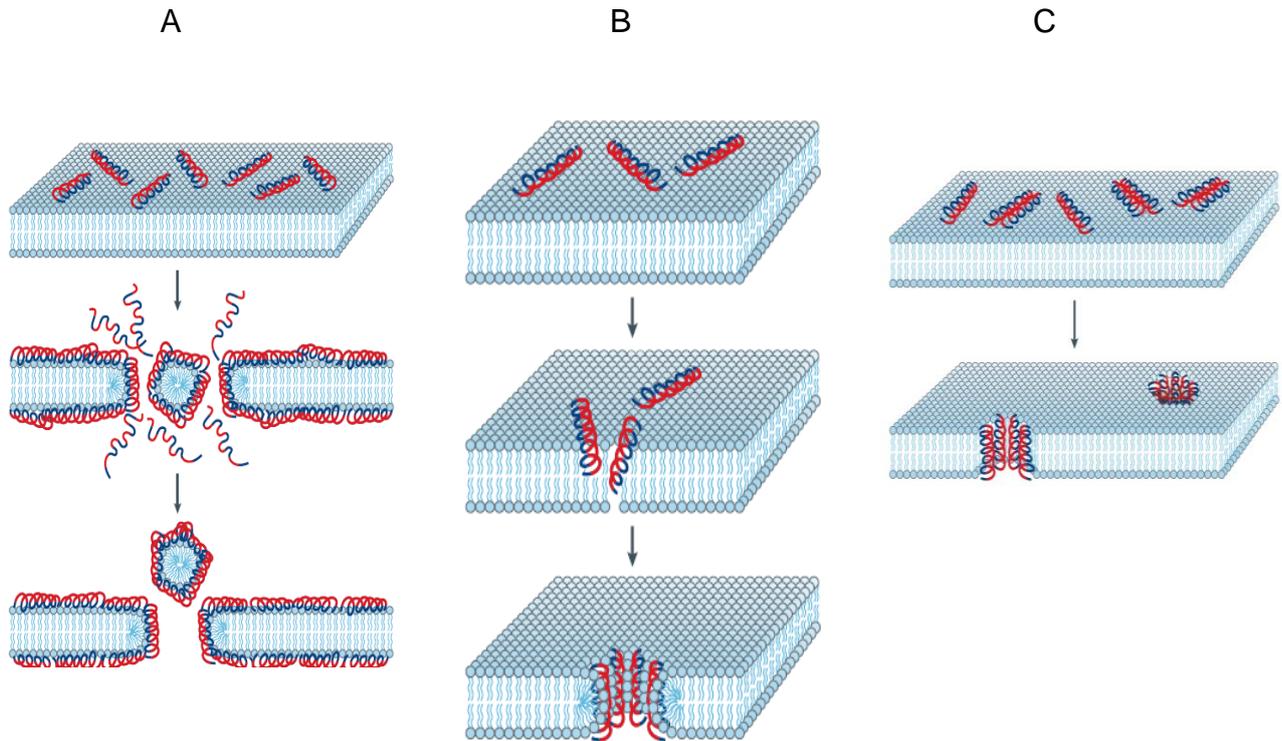


Fig.1: Modelo da forma de ação de AMPs sobre a membrana celular do patógeno. A- Modelo carpete, induzindo o rompimento da membrana celular. B- Modelo toroidal, o peptídeo induz a formação de poros na membrana celular. C- Modelo “barrel stave”, onde o peptídeo se insere na membrana formando poros. Vermelho- regiões hidrofílicas. Azul- regiões hidrofóbicas. Adaptado de Brogden, 2005.

1.2 Proteínas ricas em glicina

As proteínas ricas em glicina (GRPs) são um grupo de proteínas caracterizado pelo grande número de resíduos de glicina organizados em blocos e identificados em diferentes organismos (GODDEMEIER, WULFF e FEIX, 1998). Regiões ricas em glicina estão envolvidas em interações proteína-proteína em pelo menos três famílias protéicas de mamíferos: a das queratinas, loricinas e nas proteínas de ligação a RNA, que atuam no processamento, estabilização ou transporte dos pré-mRNAs

(SACHETTO-MARTINS, FRANCO e OLIVEIRA, 2000). GRPs são também descritas como o maior componente constitutivo da casca dos ovos de *Schistosoma mansoni* (PENA et al., 1990). Em cianobactérias foram identificadas dois tipos de GRPs. Um tipo com ação bactericida foi isolado de uma toxina liberada por estes organismos, outro tipo age como proteína de ligação ao RNA (SATHIYAMOORTHY e SHANMUGASUNDARAM, 1996). Diversos genes codificantes de proteínas ricas em glicina foram isolados em várias espécies de plantas e, até recentemente, eram associados a proteínas estruturais. No entanto, vários trabalhos têm descrito estas proteínas como moléculas participantes do sistema de defesa vegetal (SACHETTO-MARTINS, FRANCO e OLIVEIRA, 2000; PELEGRINI et al., 2008).

Através do seqüenciamento dos peptídeos ricos em glicina foi estabelecido que estes se caracterizam pela presença de resíduos de glicina em sua seqüência primária, sendo que a porcentagem destes resíduos varia de um organismo para outro (MOUSAVI e HOTTA, 2005). De acordo com porcentagem de glicina que o constitui, cada GRPs pode ser classificada em três diferentes grupos. O primeiro grupo engloba aquelas proteínas que possuem mais que 70% de resíduos de glicina em sua estrutura primária, que podem conter domínios conservados conhecidos como motivos de reconhecimento de RNA (RRMs) e são em geral proteínas estruturais, tais como as GRPs identificadas em *A. thaliana* e *Brassica napus*. O segundo grupo compreende aqueles GRPs com menos resíduos de glicina do que os do primeiro grupo, tais como o TFM5 encontrado em tomate. Já o terceiro grupo é constituído de proteínas contendo grandes quantidades de glicina sem formar domínios ricos em glicina (RINGLI, KELLER e RYSER, 2001).

O Pg-AMp1 identificado por Pelegrini et al., (2008) em sementes de goiaba, pertence ao terceiro grupo de GRPs, pois apresenta grandes quantidades do resíduo glicina, sem contudo formar grandes domínios como os observados em *O. sativa* e *Z. mays*. O alinhamento da seqüência do Pg-AMp1 com outros GRPs de outros grupos foi realizado por Pelegrini et al. (2008) e pode ser visto na figura 2.

TEMPLETON e LAMB, 1989), tendo sido também encontrado no hipocótilo, caule e pecíolo (YE e NG, 2000).

A expressão das GRPs em plantas é modulada por diversos fatores podendo ser induzidas por fatores biológicos, físicos e químicos, reforçando a hipótese de que estas proteínas participam de processos celulares importantes (SACHETTO-MARTINS, FRANCO e OLIVEIRA, 2000). Dentre os moduladores químicos temos os fitormônios como as auxinas, primeiramente descritas em morangos (MATSUNAGA et al., 1996) e o ácido abscísico na germinação (DE OLIVEIRA et al., 1990) além do estresse hídrico. Dentre os processos físicos temos a diferença de luminosidade, estresse pelo frio e os danos mecânicos (CARPENTER, KREPS e SIMON, 1994). Os fatores biológicos que interferem na expressão dos GRPs são principalmente causados pela exposição à fitopatógenos, principalmente fungos e viroses (FANG et al., 1991 e BRADY, DARVILL e ALBERSHEIN, 1993). Dentre os genes que codificam GRPs, cuja expressão é induzida como resposta a estresse hídrico, temos o SbGRP1 em *Glycine max* (SACHETTO-MARTINS, FRANCO e OLIVEIRA, 2000), induzido por tratamentos com hormônios, temos os AtGRP1 e AtGRP5 em *Arabidopsis thaliana* (DE OLIVEIRA et al., 1990), por ferimentos podemos citar o PtGRP1 em *Petunia hybrida* (CONDIT e MEAGHER, 1987) e os induzidos por estresse causado por ozônio, o OI2-2 em *Atriplex canescens* (NO et al., 1997).

O modo de ação das proteínas ricas em glicina ainda não é totalmente conhecido. Até agora poucos trabalhos demonstram que, semelhante a outras proteínas antimicrobianas (AMPs), as GRPs tenham ação contra fungos, bactérias e vírus. Egorov et al., (2005) isolou em trigo GRPs com atividade contra fungos filamentosos. Na aveia (*Avena sativa*) e no *Ginkgo biloba* foi descrita a presença de GRPs que apresentam domínios de ligação à quitina com ação inibitória do crescimento de fungos filamentosos (HUANG, XIE e GONG, 2001; LI e CLAESON, 2003). Um GRPs isolado do inseto *Tenebrio molitor*, chamado tenecina-3 apresenta ação antifúngica contra *Candida albicans*, provavelmente atuando a nível citoplasmático, modificando os processos metabólicos e o fluxo de íons da parede celular (KIM et al., 1998; LEE et al., 1999; KIM et al., 2001). Recentemente Pelegrini (2008) demonstrou a atividade de um GRP (Pg-AMP₁) contra bactérias Gram-negativas patogênicas em humanos como *E. coli*, *Klebsiella sp* e *Proteus sp*. Foi descrita em *Nicotiana glutinosa* um GRP com atividade antiviral, foi observado que a

expressão destas proteínas aumentou quando as plantas foram infectadas com TMV (Vírus do Mosaico em Tabaco) inibindo a multiplicação viral (NAQVI et al., 1998).

Até agora o processo evolutivo dos genes *grp* ainda não foi bem compreendido. Pela diversidade de repetições glicina nestas proteínas tem sido sugerido que elas sejam oriundas de um evento de combinação gênica em um ancestral comum. Esta hipótese é corroborada pelo alto conteúdo CG dos genes *grp*, que são possíveis “hot spots” para recombinação gênica (SACHETTO-MARTINS, FRANCO e OLIVEIRA, 2000). No genoma de *Arabidopsis* e feijão foram identificados genes *grp* organizados em tandem (KELLER, TEMPLETON e LAMB, 1989; DE OLIVEIRA et al., 1990). Tais eventos de recombinação são responsáveis pela grande diversidade genética das GRPs nos diferentes organismos e, em um mesmo organismo, nas diferentes famílias em que são agrupadas estas proteínas (SACHETTO-MARTINS, FRANCO e OLIVEIRA, 2000).

A produção desses peptídeos por técnicas biotecnológicas pode ampliar seu uso em diferentes setores da atividade humana, além de ampliar os conhecimentos a cerca de seu modo de ação sobre o patógeno.

A sequência gênica do peptídeo Pg-AMP1, utilizada nesta pesquisa, foi obtida a partir da sequência do peptídeo obtida por Pelegrini et al., (2008). Este peptídeo foi identificado pela purificação de um extrato de proteínas totais extraídas de sementes de goiabas secas que apresentou atividade antimicrobiana. Processos de purificação foram realizados até identificar a fração correspondente ao peptídeo com ação contra bactérias Gram-negativas, em seguida a sequência de aminoácidos e massa molecular foram estabelecidas. Embora o efeito contra as bactérias testadas tenha mostrado a possibilidade de desenvolver um novo fármaco, o baixo rendimento do peptídeo a partir da extração de sementes de goiaba inviabiliza esta perspectiva. Uma alternativa para aumentar o rendimento do peptídeo de interesse é através da expressão heteróloga da sequência gênica correspondente ao Pg-AMP1 em um vetor de expressão tal como *E. coli*. Trabalho semelhante foi desenvolvido por Xu et al., (2007) obtendo um rendimento de 6.8mg/L do AMP puro, desta maneira torna-se promissor a expressão do peptídeo Pg-AMP1 em *E.coli* para realizar testes com microorganismos não testados, além de estabelecer a estrutura secundária com o dicroísmo circular.

1.3 Transformação Gênica e Expressão Heteróloga

Peptídeos com importância comercial, principalmente os usados na indústria farmacêutica, podem ser produzidos utilizando processos biotecnológicos. Em escala comercial, podem-se obter peptídeos através da purificação a partir do organismo, o que geralmente é difícil devido às baixas concentrações celulares da maioria dos peptídeos, e através da engenharia genética ou pela síntese química direta, utilizada principalmente em peptídeos com número pequeno de aminoácidos (CHRISTENSEN et al., 2007). A engenharia genética tem aperfeiçoado técnicas cada vez mais eficientes nos últimos anos, possibilitando a clonagem de genes exógenos codificadores de proteínas recombinantes em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas (PARK et al., 2008; ZELENA et al., 2009). Xu et al., (2007) clonou e expressou em *E.coli* altos níveis do peptídeo recombinante híbrido de cecropina e maganina denominado CA-MA. Já a sequência codificadora de uma colicina denominada pQE30-cfa-cfi ligada a uma cauda de histidina foi clonada e expressa rendendo entre 60-80mg/L do antimicrobiano (YANG et al., 2007).

Uma vez identificada a sequência gênica de interesse, métodos corriqueiros em biologia molecular são usados para clonagem e construção do vetor de expressão do gene em estudo. Após os vetores serem produzidos são usados para expressar o gene de interesse, em geral são inseridos na célula hospedeira por técnicas de transformação genética, como choque térmico, eletroporação ou biobalística. O inserto, nome dado ao gene exógeno que se deseja inserir no vetor plasmidial, passa a fazer parte do material genético da bactéria, podendo ser herdado pelas novas células todas as vezes que a bactéria sofrer divisão celular (WATSON et al., 2004). Neste trabalho, o vetor de clonagem e expressão foi sintetizado pela empresa Epotech Biolabs com a sequência gênica de interesse unida a uma sequência codificadora de uma cauda de seis histidinas.

A condição fisiológica denominada competência é necessária para que a bactéria esteja apta a receber e transmitir a seus clones o DNA plasmidial. Uma bactéria competente é aquela capaz de receber DNA exógeno no citoplasma e replicá-lo (PRIMROSE e TWYMAN, 2006). Esta capacidade é adquirida através de

técnicas que envolvem o tratamento com soluções como cloreto de cálcio e mudanças bruscas de temperatura as quais alteram a permeabilidade da parede celular, fazendo com que estas células permitam a entrada de DNA exógeno através da membrana celular (INOUE, NOJIMA e OKAYAMA, 1990). Antes da reação de ligação, o DNA circular do plasmídeo é aberto com uma enzima de restrição específica e a mesma enzima de restrição é utilizada para cortar o fragmento de DNA exógeno que se pretende introduzir no plasmídeo (PRIMROSE e TWYMAN, 2006).

A região promotora é de suma importância na escolha de um vetor de expressão, pois é esta sequência gênica que determina a frequência com que o mRNA será sintetizado e conseqüentemente a quantidade de proteína recombinante produzida (LEE et al., 2002). Outro fator a ser considerado na construção de um vetor de expressão é a forma de como regular o promotor. A regulação gênica pode ser por indução ou repressão. No presente trabalho, utilizamos um promotor forte que controla a transcrição do gene *lacZ* e é induzível por IPTG (isopropil-tio-galactosídeo) acrescido ao meio de cultura (NELSON e COX, 2006)

Após a expressão do peptídeo de interesse torna-se necessário purificá-lo, separando-o das demais proteínas do hospedeiro. Uma forma de tornar este processo mais rápido é através da produção de proteínas recombinantes fusionadas a uma proteína ou peptídeo denominado *tag*. Este método facilita a purificação e pode ainda promover estabilidade e solubilidades à proteína recombinante (ARNAU et al., 2006). A purificação da proteína recombinante pode ser feita por cromatografia, onde as proteínas podem ser separadas de acordo com propriedades específicas de suas caudas.

Neste trabalho, como dito anteriormente, a proteína recombinante foi expressa contendo uma cauda de histidina fusionada à sequência de aminoácidos correspondente ao Pg-AMP1, de maneira a possibilitar a sua purificação pelo método de cromatografia de afinidade. No entanto, vários autores descrevem que pode ser desvantajosa a construção de proteínas fusionadas quando a proteína de interesse é hidrofóbica, pois estas, após expressas em *E. coli*, são frequentemente acumuladas em corpos de inclusão (BAO et al., 2006; JHAMB, JAWED e SAHOO, 2008). Isto ocorre principalmente devido ao mau dobramento das proteínas recombinantes. Embora a extração das proteínas dos corpos de inclusão não seja um processo muito complicado, a reconstituição da mesma deve ser feita cuidadosamente de maneira a

assegurar o dobramento correto e conseqüentemente à função da proteína (BAO et al., 2006).

Os corpos de inclusão frequentemente são formados quando uma proteína recombinante é fortemente expressa. São agregados densos de RNA e proteínas insolúveis, cuja solubilização requer agentes desnaturantes como guanidina-HCl ou uréia e em seguida deve ser feito o *refolding* ou dobramento em tampões sem o agente desnaturante. Muitas vezes as proteínas recombinantes agrupadas em corpos de inclusão são mais estáveis, uma vez que muitas das proteínas expressas na fração solúvel são degradadas (SCHEIN e NOTEBORN, 1989).

Conhecendo que diferentes organismos adotam códons preferenciais diferentes (*codon usage*) para traduzir um mesmo aminoácido, deve-se observar se o códon do gene de interesse é compatível com o traduzido no vetor de expressão. Segundo Brown (2003), apesar de virtualmente todos os organismos utilizarem o mesmo código genético, cada um possui uma tendência a utilizar preferencialmente determinados códons. Esta preferência por códons diferentes em organismos diferentes reflete a eficiência com que o RNA transportador reconhece os diferentes códons. Desta forma, se um gene clonado contém uma proporção alta de códons desfavoráveis, os RNAs transportadores (tRNAs) da célula hospedeira podem apresentar dificuldades na tradução do gene, reduzindo sua expressão (BROWN, 2003). Acredita-se que esta “escolha” por códons preferenciais em diferentes organismos seja resultado da pressão evolutiva. Desta forma, proteínas altamente expressas estão sob maior pressão seletiva de maneira que mutações em suas seqüências são danosas ao organismo, enquanto aqueles indivíduos que possuíam códons preferenciais diminuem a chance de erro e aumentam sua viabilidade (GOUY e GAUTIER, 1982).

Neste trabalho utilizamos estratégias em genética molecular para determinar a seqüência gênica *in silico* para a síntese do vetor de expressão, a transformação e expressão do gene de interesse usando *E.coli* como um sistema de expressão heterólogo. Em seguida determinamos a melhor forma de expressão e purificação para obtermos o peptídeo recombinante viável, com sua atividade antimicrobiana preservada. Desta forma, unindo conhecimentos em engenharia genética, microbiologia e bioquímica de proteínas, pudemos otimizar um sistema para

expressar um antimicrobiano de origem vegetal com ação inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

O presente trabalho teve como objetivo expressar o peptídeo recombinante de *Psidium guajava* Pg-AMP1 em sistema heterólogo e estabelecer a melhor forma de indução e purificação do peptídeo, visando testar possíveis atividades antimicrobianas contra patógenos humanos e vegetais.

2.2 Objetivos Específicos:

- Expressar em *E. coli* o peptídeo recombinante Pg-AMP1;
- Determinar a melhor linhagem bacteriana para a expressão do peptídeo;
- Estabelecer a melhor forma de indução e melhor tempo para expressão do peptídeo;
- Realizar ensaios antifúngicos;
- Realizar ensaios antibacterianos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição e Transformação do Vetor de Expressão

O gene que codifica o peptídeo Pg-AMP1 foi sintetizado de acordo com a sequência de aminoácidos do peptídeo isolado de sementes de goiaba (*Psidium guajava*) por Pelegrini et al., (2008). A estratégia de subclonagem do vetor de expressão foi desenhada de maneira que o produto final da expressão tivesse uma cauda de histidina (His)₆ na extremidade N-terminal, visando facilitar a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A sequência codificadora do gene *pg-amp1* contém 165 pares de bases e foi sintetizada pela empresa Epotech Biolabs no vetor pUC18. A sequência de nucleotídeos deduzida a partir de aminoácidos do peptídeo (Figura 2) foi otimizada para códon preferencial de *Escherichia coli* utilizando-se o software próprio da empresa Epotech Biolabs, visando à expressão máxima (Figura 3). O seguinte parâmetro foi utilizado para escolha dos códons: retirada de qualquer códon cuja utilização preferencial pela bactéria seja menor do que 15%, exceto para posições que modifiquem a estrutura secundária evitando a formação de pregas e *loops* na sequência nucleotídica.

Para posterior subclonagem foram adicionadas à sequência codificadora do peptídeo a sequência de restrição da enzima *Bam*HI na extremidade 5' e a sequência de restrição da enzima *Hind*III na extremidade 3'. A partir destes sítios de restrição, a sequência foi subclonada no plasmídeo pQE30 sob o controle do promotor híbrido T5/*lac* (Figura 4), ficando ao todo com 198 pares de bases (Figura 3A) correspondente a 66 aminoácidos (Figura 3B).

O plasmídeo recombinante, agora denominado pQE30-Pg-AMP1, foi inserido de acordo com as instruções do fabricante, por choque térmico em linhagens de células de *E. coli* competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para replicação do plasmídeo e para verificar seu mapa de restrição e na linhagem BL21(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA) para expressão do peptídeo com pequenas modificações do método proposto por Inoue, Nojima e Okayama (1990) (Anexo A). Em seguida as

bactérias foram plaqueadas em meio *Lysogeny broth* (LB) (anexo A) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) contendo ampicilina (100µg/mL) como agente seletivo.

Foram escolhidas aleatoriamente cinco colônias de cada uma das linhagens TOP10 e BL21(DE3) e crescidas em LB (Anexo A) líquido com ampicilina 100µg/mL para extração plasmidial (Miniprep) e digestão dos mesmos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, por 3hs a 37° C , para confirmar a presença do inserto e posteriormente realizar os ensaios de expressão.

(A)

● ● ● *

ATGCATCATCATCATCATCATGGATCCCGTGAGTCTCCGAGTAGCC
 GCATGGAATGCTATGAACAGGCGGAGCGTTATGGGTACGGCGGCT
 ATGGTGGCGGTTCGTTACGGCGGTGGTTATGGTAGCGGTTCGCGGCC
 AGCCGGTTGGTCAGGGCGTGGAACGCAGCCATGACGATAATCGTA
 ACCAACCACGCAAAGCTT

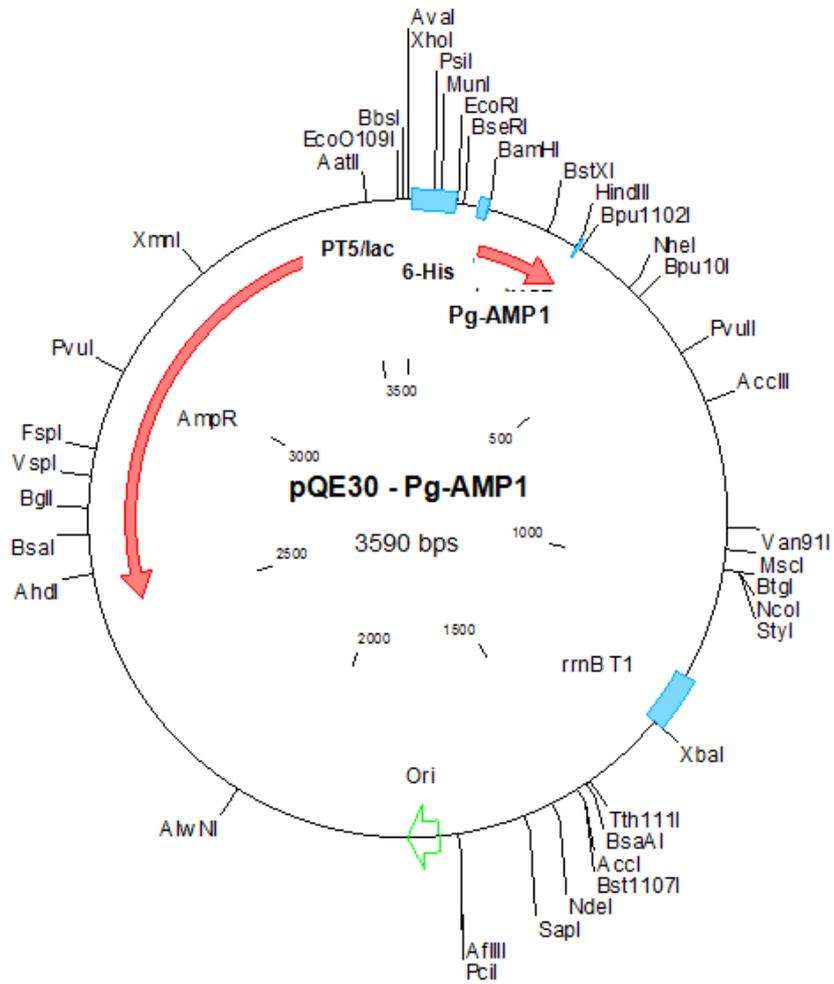
(B)

● * * * * *

His₆- Pg-AMP1 MHHHHHGSRESPSSRMECYEQAERYGYGGYGG
 GRYGGGYGSGRGQPVGQGVERSHDDNRNQPRKL

Fig. 3. (A) Seqüência nucleotídica do gene *pg-amp₁* e de aminoácidos do Peptídeo Pg-AMP1. Ponto negro I- Códon de início; Asteriscos- cauda de Histidina; Grifado – Sítio de Restrição das enzimas *Bam*HI e *Hind*III; (B) Seqüência de aminoácidos do peptídeo Pg-AMP1 adicionado metionina (ponto negro) e cauda de histidina (asteriscos). Em cinza, resíduos de Glicina.

A



B

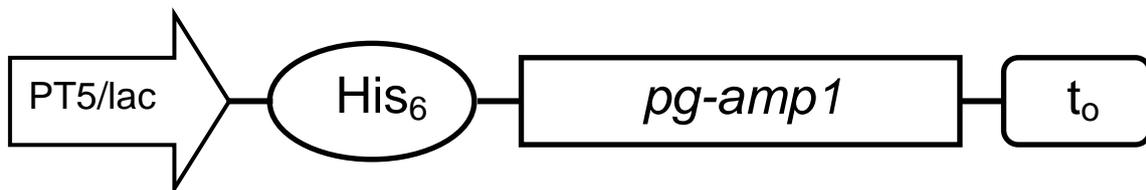


Fig.4. Vetor de expressão do gene *pg-amp1*. A. Mapa de restrição do vetor pQE30-Pg-AMP₁; B. Representação esquemática do cassete de expressão do Pg-AMP₁ (PT5/lac – promotor; t₀ – códon de terminação transcricional).

3.2 Expressão do peptídeo recombinante Pg-AMP1

Visando a expressão do peptídeo recombinante foram testadas duas cepas de *E. coli*. A linhagem TOP10 (F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ) é utilizada principalmente para clonagem gênica. Já a BL-21 (DE3) (F⁻ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])) é uma cepa usada para expressão gênica e é induzível por Isopropil- β -D-galactopiranoside (IPTG).

Uma colônia transformada com o vetor pQE30-Pg-AMP1, da linhagem BL21(DE3), foi inoculada em 5mL de meio LB líquido contendo 100 μ g/mL de ampicilina e crescida 16hs a 37° C, sob agitação de 200 rpm. A partir deste pré-inóculo crescido “overnight” foi feita uma diluição de 1:100 ou seja, 5mL do pré-inóculo em 500mL do meio SOB (Anexo A) líquido, com 100 μ g/mL de ampicilina. As bactérias cresceram a 37° C sob agitação de 200 rpm até atingirem a absorbância (OD₆₀₀) entre 0,6-0,8 quando então foram induzidas com IPTG e crescidas a 30° C sob agitação de 200 rpm. Foram testadas duas concentrações finais de IPTG (0,5 e 1mM), sendo coletadas amostras com 1, 2, 4 e 6 horas de indução, para verificar o maior rendimento na expressão do peptídeo. Para a linhagem TOP10, utilizada também na expressão de Pg-AMP1 recombinante, o mesmo método foi utilizado para o crescimento exponencial da colônia testando a adição de IPTG para aumentar a indução da expressão. O melhor protocolo para a indução do Pg-AMP1 recombinante foi estabelecido e utilizado para a produção do peptídeo.

3.3 Purificação do peptídeo recombinante

Após o período de indução da expressão do peptídeo recombinante, 500mL da cultura de bactérias foi centrifugada a 4.500g, 4° C por 15 minutos. O *pellet* foi ressuspensado em uma diluição de 1:10 de tampão de lise (Anexo A) contendo Fosfato

de Sódio (50mM – pH7.8), Cloreto de Sódio (300mM), Cloreto de Potássio (50mM), Glicerol (10%), Triton x-100 (0,5%) e Imidazol (10mM) em seguida, as células foram rompidas por ultrassom (Sonics – Vibra Cell) 20Khz amplitude de 100% com uma sonda modelo cv188, no gelo por 4 tempos de 20 segundos com intervalos de 1 minuto. Em seguida, foram novamente centrifugadas a 4.500g a 4° C por 30 minutos. O sobrenadante, correspondente fração do meio de cultura de *E.coli* foi recolhido e armazenado a -20° C para posterior análise por eletroforese.

Cada grama do *pellet* agora formado, correspondente às proteínas totais citoplasmáticas insolúveis, foi ressuspensão em 3 mL de tampão de lise para corpos de inclusão (Anexo A) contendo Cloreto de Sódio (300mM), Fosfato de Sódio (50mM – pH 7.4), β -mercaptoetanol (10mM) e em seguida adicionado o Cocktail Inibidor de Protease (10mg/mL) (SIGMA) e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período a suspensão foi armazenada no gelo e tratada por ultrassom por 3 tempos de 20 segundos com intervalos de 1 minuto, em seguida centrifugado a 4.500g, 4° C por 15 minutos visando eliminar proteases e evitar a oxidação dos peptídeos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* tratado com dois tampões diferentes (A e B) (Anexo A) para desnaturação dos agregados insolúveis, utilizando para tal, os agentes caotrópicos hidrocloreto de guanidina (Gua-HCl) e uréia. O tampão A continha 6M de Gua-HCl, Cloreto de Sódio 300mM, Fosfato de Sódio (50mM – pH7.4) e Imidazol (20mM), já o tampão B continha 8M de Ureia, Cloreto de Sódio (300mM) e Imidazol (20mM). Em seguida os tratamentos foram centrifugados a 4.500g, 4° C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 100 μ L de água ultrapura.

3.4 Detecção do Peptídeo por SDS – PAGE

O SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel) foi feito seguindo os procedimentos descritos por Sambrook e Russel (2001) de acordo com Laemmli (1970) com o objetivo de verificar o melhor tratamento quanto às concentrações de IPTG e as horas de indução das frações solúveis e insolúveis do material induzido e

não induzido. A quantificação do rendimento total das proteínas em ambas as frações foi feito de acordo com o método de Bradford (1976) usando BSA (soro de albumina bovina) como padrão (maiores detalhes ver Anexo A). A partir dessa quantificação foram aplicadas no gel 50µg de proteínas totais em cada poço e as proteínas separadas por eletroforese vertical em gel desnaturante de poliacrilamida (15%) a 80 V no Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System® (Bio-Rad).

3.5 Purificação por Cromatografia de Afinidade

Após definir o melhor protocolo para indução, com 4h de crescimento para a linhagem TOP10 sem indução com IPTG e 2h para a linhagem BL21(DE3) após indução com 1mM de IPTG. Estabeleceu-se que a melhor maneira de extração e solubilização do Pg-AMP1 recombinante foi com 8M de Uréia. Em seguida foi feita a purificação do peptídeo utilizando cromatografia de afinidade por imobilização dos íons metálicos (IMAC), usando uma coluna de Níquel His-Trap de 1mL (GE, Upsala). Foram testadas três concentrações diferentes de imidazol na lavagem das proteínas totais da coluna de níquel: 10, 20 e 60mM. A coluna carregada com 0,1M de Sulfato de Níquel foi equilibrada com Fosfato de Sódio 20mM, Cloreto de Sódio 500mM, Imidazol nas diferentes concentrações acima descritas, pH 7.4. As proteínas extraídas dos corpos de inclusão foram diluídas no tampão de lavagem/ligação e em seguida carregadas na coluna de afinidade e lavadas com 10mL do tampão descrito acima. Em seguida, o peptídeo recombinante foi eluído utilizando o tampão de eluição contendo Fosfato de Sódio 20mM, Cloreto de Sódio 500mM, Imidazol 500mM, pH 7.4. O peptídeo purificado foi quantificado por Bradford, como descrito anteriormente, e aplicado no SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida a 15%.

3.6 Ensaios Antibacterianos

A atividade antimicrobiana do Pg-AMP1 recombinante purificado por cromatografia de afinidade foi testada contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Os bioensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de polipropileno usando 100µL de meio LB inoculado com o microorganismo e 100µL do peptídeo Pg-AMP1 recombinante, em diferentes concentrações, diluído em salina (0,9 g/L). Para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) o peptídeo foi testado com as concentrações finais de 100, 75, 50 e 25 µg/mL por 20 horas a 35°C. Foram usados dois controle negativos, um contendo o inóculo tratado com o Tampão de Lavagem contendo Tampão Fosfato 20mM, Imidazol 10mM (melhor condição estabelecida para lavagem na coluna de afinidade), Cloreto de Sódio 0,5M em pH 7.4, outro controle negativo contendo solução salina (0,9 g/L), a mesma usada na diluição do microorganismo. Já o controle positivo testado foi uma solução de cloranfenicol nas concentrações finais de 1.250; 125; 12,5; 1,25 e 0, 125 µg/mL diluídas com salina (0,9 g/L). Cada experimento foi realizado em triplicata. Os microorganismos usados para o ensaio bactericida para determinação da MIC foram às seguintes: Gram-negativas - *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25931, *Shigella sonnei* ATCC 3027, *Escherichia coli* ATCC 8739 e 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11229 e 27853. Já as Gram-positivas testadas foram as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 2921-3 e 2592-3, *Staphylococcus aureus* MEC-A ATCC 3359-1 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222-8.

As bactérias foram crescidas em meio Tryptone Soy Broth (TSB - Triptona 5g/L, Extrato de Levedura 2,5g/L, Dextrose 1g/L e Cloreto de Sódio 10g/L) a 37°C por 20hs e a medida da inibição do crescimento foi realizada de acordo com a NCCLS (2003). O inóculo inicial foi de aproximadamente 1×10^4 unidades formadoras de colônia (CFU ml⁻¹) padronizadas pela comparação com a solução de McFarland segundo a NCCLS (2003). O volume final foi de 200µl por poço, sendo que 100µl do meio de cultura TSB inoculado e 100µl do tratamento, controle negativo ou controle positivo com o antibiótico cloranfenicol.

O crescimento das células foi monitorado pela medida da absorbância turbimétrica a 600nm utilizando um leitor de placas Espectra Max 190 (Molecular Devices). As unidades formadoras de colônias (CFUs) foram contadas diluindo-se o inóculo em solução salina 0,9% e plaqueadas em meio MSB sólido (Anexo A). A concentração inibitória mínima corresponde à menor concentração na qual o peptídeo atuou como agente antimicrobiano impedindo o crescimento do microorganismo. Para identificar se o agente antimicrobiano tem ação bactericida ou bacteriostática, após a medida do crescimento uma alíquota de 20µL de cada um dos tratamentos foi inoculada em 1 mL de meio TSB líquido e incubada por 16hs a 37° C sob agitação de 100rpm.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição e Transformação do Vetor de Expressão

O vetor pQE30-Pg-AMP1 foi sintetizado visando a expressão do peptídeo Pg-AMP1 fusionado a uma cauda de histidina (His)₆ (Fig. 4). Para confirmar a presença do inserto foi feito o crescimento de colônias isoladas das duas linhagens de células competentes testadas por 16hs a 37° C sob agitação de 200rpm. Em seguida extraímos os plasmídeos por miniprep e fizemos a digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III por 3h em banho-maria a 37°C (Anexo A). Os fragmentos oriundos da digestão do plasmídeo foram visualizados em UV após eletroforese em gel de agarose 2% com o produto da digestão das duas linhagens. Na figura 5A pode ser visto o gel do produto de digestão do vetor inserido na célula BL21(DE3), já na figura 5B temos a digestão dos vetores inseridos na linhagem TOP10. O tamanho esperado do inserto, após a digestão com as enzimas de restrição é de 171pb, correspondente apenas a sequência codificadora do Pg-AMP1 e as partes coesivas das enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI, já que esta corta após a cauda de histidina eliminando também o códon de início. Na linhagem BL21(DE3) foi observada a formação de um rastro como produto da digestão, isto é, cortes inespecíficos ou degradação do fragmento digerido, já na linhagem TOP10 a digestão ocorreu como esperado, ou seja, duas bandas, sendo uma de 171pb correspondendo aos 165pb do inserto acrescidos de 6pb correspondentes às partes coesivas do corte das enzimas de restrição, e outra de 3,5 Kb correspondendo ao vetor.

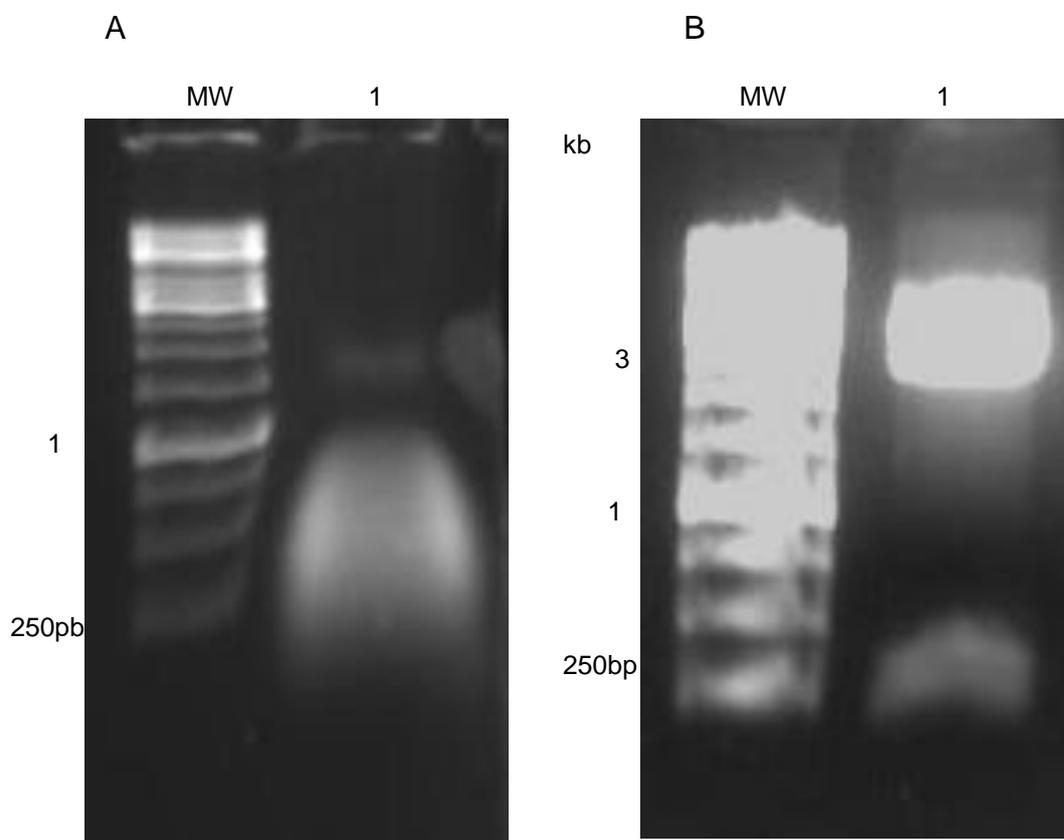


Fig.5. Gel de Agarose 2%. Digestão do plasmídeo recombinante $PQE30pg-amp_r$ com *Bam*HI e *Hind*III. MW- marcador de peso molecular de 1kb. A. 1- Digestão plasmidial da linhagem de *E.coli* BL21(DE3). B.1- Digestão plasmidial da linhagem de *E.coli* TOP10.

4.2 Expressão da proteína recombinante Pg-AMP₁

O plasmídeo recombinante foi inserido nas células competentes *E.coli* linhagens TOP10 e BL21(DE3) e em seguida feita a indução da expressão do peptídeo Pg-AMP₁ recombinante. A indução do promotor *T5/lac* foi feita usando duas concentrações diferentes de IPTG (0,5 e 1mM) em diferentes tempos de indução (1; 2; 4; 6hs). A melhor expressão do peptídeo com a cauda de histidina foi obtida com 1mM de IPTG após 2hs de incubação a 30°C para a linhagem BL21(DE3), apresentando um rendimento de aproximadamente 1mg/L. Já a linhagem TOP10 teve a melhor expressão do Pg-AMP₁ recombinante com 4h após atingir a densidade de 0,6 e crescer por 4 horas adicionais com ou sem a indução de IPTG, apresentando um rendimento de aproximadamente 13mg/L (Figura 6). O peptídeo Pg-AMP₁ fundido a uma cauda de histidina pode ser visualizado como uma banda na altura de aproximadamente 7,4 kDa. O tamanho predito do peptídeo Pg-AMP₁ recombinante corresponde a de 7,368 kDa, com pI igual a 8,93 (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>) o marcador de peso molecular usado foi o 7-175 kDa (New England Biolabs, Ipswich, MA). O peptídeo recombinante foi mais abundante na parte insolúvel de ambas as linhagens testadas do que na parte solúvel (Figura 7). A expressão foi mais eficiente nas linhagens de TOP10 do que na BL21 (DE3) conforme dito anteriormente.

4.3 Purificação do peptídeo recombinante

A maior parte dos peptídeos expressos foi agrupada em corpos de inclusão formando uma fração insolúvel (Figura 6). Desta forma foi necessário extrair o Pg-AMP1 recombinante dos corpos de inclusão e deixá-lo solúvel para posterior purificação por cromatografia. Dos tampões testados para solubilização dos corpos de inclusão, aquele contendo uréia 8M foi mais eficiente. A amostra solubilizada com Gua-HCl necessitou de um passo extra, em uma solução de uréia, antes de aplicar no SDS-PAGE devido a alta força iônica da solução de Gua-HCl, que precipita a amostra. A fase seguinte da purificação do peptídeo recombinante foi feita por cromatografia de afinidade onde apenas os peptídeos fusionados à cauda de histidina foram retidos na coluna devido a sua afinidade com o níquel da mesma. Usando uma coluna His Trap HP, a proteína fundida foi aplicada na coluna e lavada, para retirar as demais proteínas da célula hospedeira, com Tampão de Ligação 10mM de imidazol e eluída com o Tampão de Eluição contendo 500mM de imidazol. O peptídeo recombinante purificado foi analisado por SDS-PAGE 15% apresentando peso molecular de aproximadamente 7,4 kDa (Figura 7) que é compatível com o tamanho esperado deduzido pela sequência de aminoácidos (Fig. 3B).

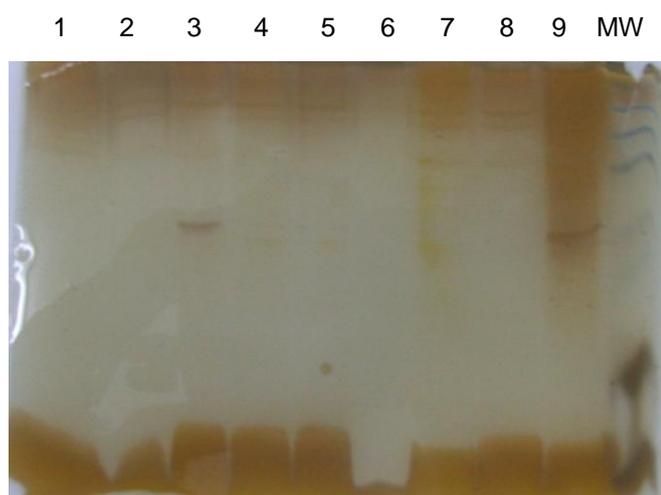


Fig.6. SDS-PAGE 15%, corado com prata. Análise da presença do Pg-AMP1 na fração insolúvel com o s diferentes tempos e concentrações testadas na indução com IPTG. 50 μ g de proteínas insolúveis totais expressas por *E. coli* TOP10. 1– 1mM IPTG, 6hs; 2- 1mM IPTG, 4h, 3 – 1mM IPTG, 2hs. 4 – 0,5mM IPTG, 6hs, 5 – 0,4mM IPTG, 4hs, 6 – sem IPTG, 6hs, 7- sem IPTG, 4hs, 8 – sem IPTG, 2hs, 9- sem IPTG 0hs.

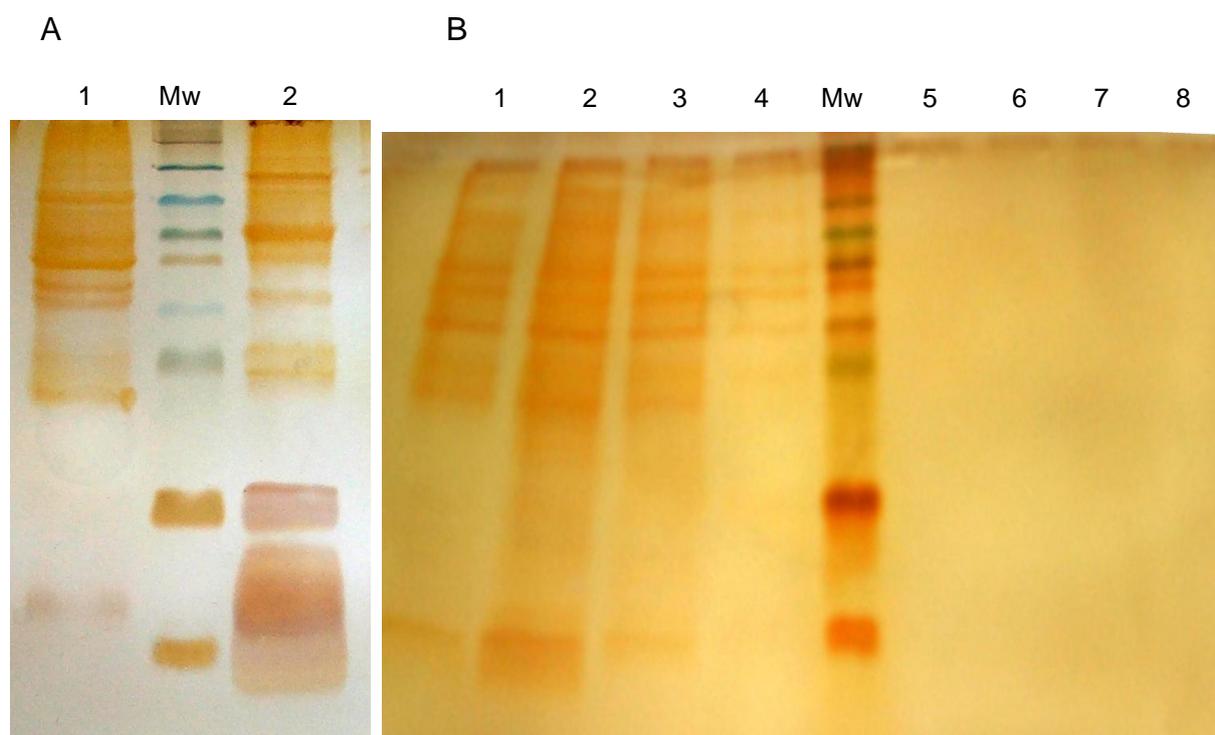


Fig.7. SDS-PAGE 15%, corado com prata. Análise da presença do Pg-AMP1 na fração solúvel e insolúvel. A- 50 μ g de proteínas expressas por *E. coli* BL21(DE3) após purificadas na coluna His Trap HP. 1– Fração solúvel extracelular; 2- Fração solubilizada dos corpos de inclusão; mW- marcador de peso molecular de 175-7kDa. B – Proteínas expressas em TOP10 após purificação pela coluna His Trap HP. 1-4 Fração solubilizada dos corpos de inclusão; 5-8- Fração solúvel extracelular.

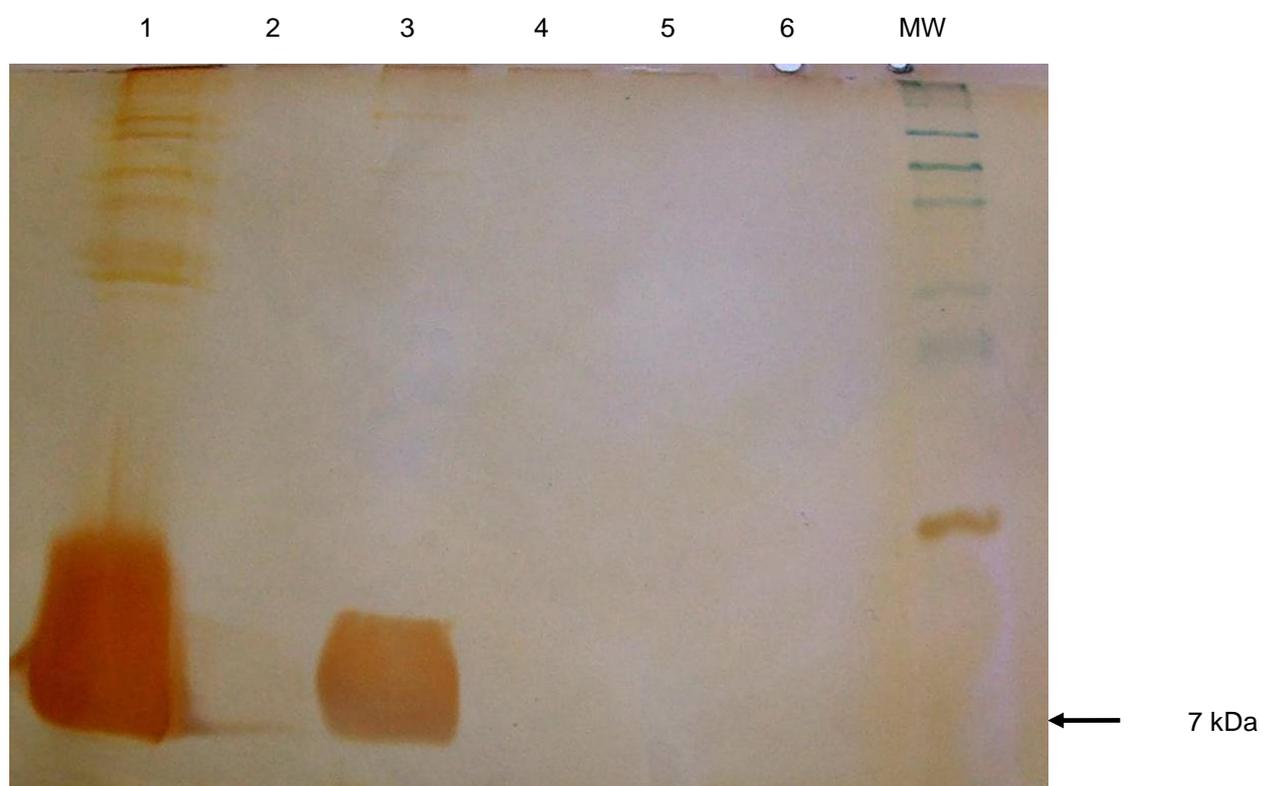


Fig.8. SDS-PAGE 15% corado com prata. Análise do $(\text{His})_6$ -Pg-AMP1 após purificação com a coluna His Trap. Foram aplicados $100\mu\text{g}$ do peptídeo expresso em *E. coli* Top10. 1- Alíquota antes de passar pela coluna de Níquel; 2-6- Alíquotas eluídas da coluna de Níquel. MW-marcador de peso molecular de 175-7 kDa.

4.4 Cromatografia de Afinidade

O peptídeo recombinante Pg-AMP1 foi purificado utilizando uma coluna de com íons de níquel nos quais a cauda de histidina fusionada ao peptídeo se liga por afinidade. Buscando um peptídeo com menor quantidade de proteínas contaminantes originária da célula hospedeira, avaliamos três concentrações diferentes de imidazol no tampão utilizado para retirada das proteínas da célula hospedeira, tampão este denominado tampão de lavagem, de acordo com o manual do fabricante. Foram testados imidazol nas concentrações de 10, 20 e 60mM. A menor quantidade de proteínas contaminantes foi obtida usando o tampão contendo 10mM de imidazol, de maneira que esta concentração foi usada nas demais purificações pela coluna de níquel. As proteínas purificadas foram quantificadas por Bradford e o rendimento obtido foi de aproximadamente 13mg/L de cultura. As primeiras três alíquotas eluídas da coluna de níquel contiveram a maior parte dos peptídeos purificados, conforme descrito pelo manual do fabricante (Figura 9), sendo que a segunda alíquota é a que geralmente tem a maior concentração do peptídeo purificado como pode ser visto na figura 8. A purificação também foi feita acoplando duas colunas His Trap utilizando o tampão com 10mM de imidazol durante a lavagem da coluna, e, neste caso, a purificação obtida foi um pouco maior, no entanto parte da fração do peptídeo foi perdida. A parte solúvel dos peptídeos expressos em TOP 10 foi passada pela coluna de níquel e as alíquotas da purificação foram aplicadas no SDS-PAGE com bisacrilamida 15%, certificando que a maior parte do peptídeo Pg-AMP1 recombinante estava na fração insolúvel, ou seja, aquela contida nos corpos de inclusão e que foram solubilizadas com o tratamento com uréia 8M, das proteínas totais (Fig.8). Após quantificação por espectrometria de acordo com o método de Bradford os peptídeos foram usados para os ensaios de inibição de fungos e bactérias.

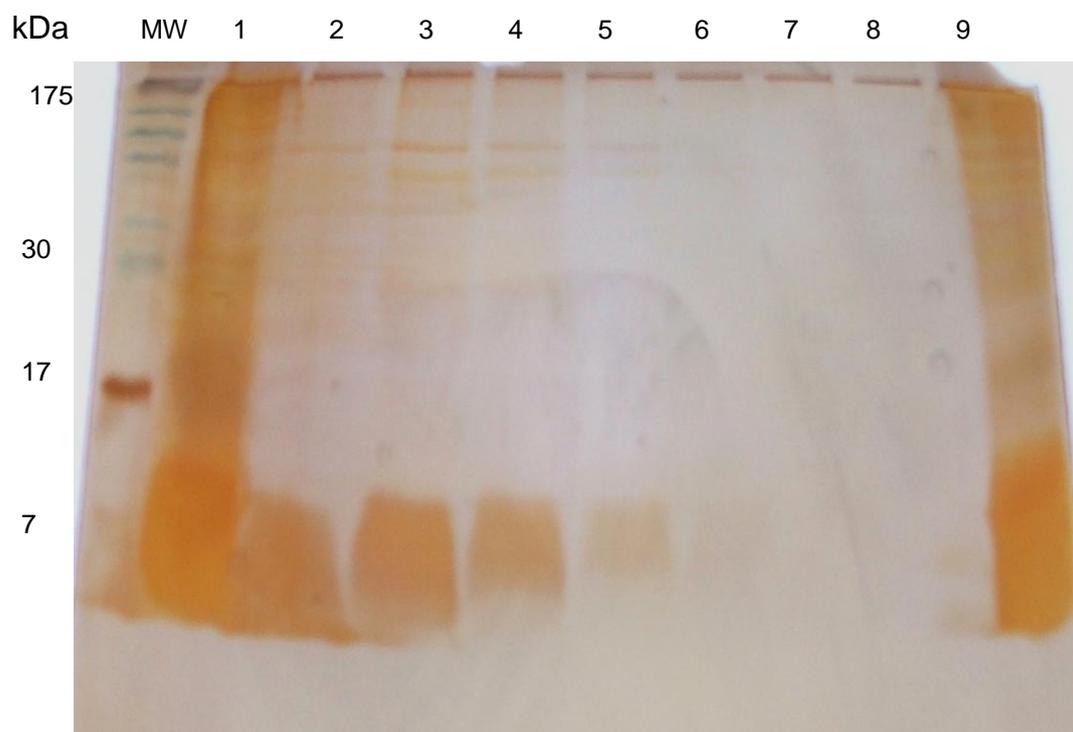


Fig. 9. SDS-PAGE 15%, corado com prata. Análise da purificação do His₆ - Pg-AMP1 após purificação pela cromatografia de afinidade com íons magnéticos de níquel His Trap HP. Mw – marcador de peso molecular de 175 – 7 kDa; 1- Proteínas solubilizadas de corpos de inclusão não purificadas pela coluna de afinidade; 2-7- Alíquota sucessivas após passar pela coluna de níquel; 8- Tampão de Ligação 10mM imidazol; 9 – Proteínas solúveis extracelulares sem passar pela coluna de níquel.

4.5 Ensaio Antibacterianos

O peptídeo recombinante Pg-AMP1 purificado foi testado em bioensaios *in vitro* contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostrando atividade bacteriostática contra a maioria dos organismos testados. Dentre as Gram-negativas testadas duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* foram inibidas, a ATCC 11229 foi inibida com 100µg/ml do peptídeo e a ATCC 27853 com 75µg/ml. As duas linhagens de *Escherichia coli* testadas a ATCC 35218 e ATCC 8739 foram inibidas com 100µg/ml do Pg-AMP1 recombinante. Quatro linhagens Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* foram testadas, *S. aureus* ATCC 2592-3 inibida com 100µg/ml e a ATCC 2921-3 com 75µg/ml. *S. epidermidis* ATCC 1222-8 foi inibida com a concentração inibitória de 50µg/ml. A ATCC 3359-1 de *S. aureus* MEC-A, uma linhagem resistente a antibióticos metilina, foi inibida usando 75µg/mL do peptídeo. No entanto, as linhagens Gram-negativas de *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25931 e *Shigella sonnei* ATCC 3027 não foram inibidas até a concentração máxima utilizada de 100µg/ml do peptídeo recombinante Pg-AMP1. Todas as linhagens que foram inibidas pelo Pg-AMP1 recombinante apresentaram atividade bacteriostática, ou seja, após livres do agente antimicrobiano, inoculadas em um meio novo de cultura (diluição 1:50), o microorganismo voltou a crescer (Tab.1).

Tab. 1: Atividade antimicrobiana do Pg-AMP1 recombinante.

MICROORGANISMO	ATCC	PG-AMP1	ATIVIDADE	CLORANFE NICOL	ATIVIDADE
Gram-positivas					
<i>Staphylococcus aureus</i> MEC-A	3359-1	75µg/mL	Bacteriostática	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Staphylococcus aureus</i>	2592-3	100µ/mL	Bacteriostática	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Staphylococcus aureus</i>	2921-3	75µg/mL	Bacteriostática	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1122-8	50µg/mL	Bacteriostática	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
Gram-negativas					
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	-	-	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3027	-	-	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Shigella sonnei</i>	25931	-	-	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3027	100µg/mL	Bacteriostática	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	75µg/mL	Bacteriostática	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Escherichia coli</i>	35218	100µg/mL	Bacteriostática	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática
<i>Escherichia coli</i>	11229	100µg/mL	Bacteriostática	1250µg/mL 125µg/mL	Bacteriocida Bacteriostática

5 Discussão

Nos últimos anos muitos AMPs têm sido expressos de maneira heteróloga objetivando a produção de grandes quantidades de peptídeos com ação sobre um amplo-espectro de microorganismos (CHRISTENSEN et al., 2007, GUERREIRO et al., 2008, HUANG et al., 2008). O Pg-AMP1 identificado em sementes de goiaba mostrou atividade contra bactérias as Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 causadoras de infecção hospitalar (PELEGRINI et al., 2008). Visando um modelo para aumentar a quantidade do peptídeo puro, o gene *pg-amp1* foi sintetizado em um vetor de clonagem pUC18 e em seguida inserido em um vetor de expressão pQE30. Este vetor foi inserido por choque térmico em células competentes e expresso de maneira heteróloga em *E.coli* gerando um peptídeo recombinante cuja ação antimicrobiana foi demonstrada contra diferentes bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas.

A digestão do plasmídeo recombinante pQE30*pg-amp1* com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III liberou o inserto na altura esperada próxima de 165 pares de bases (Fig. 3A) na linhagem TOP10 e produziu um rastro na digestão da BL21(DE3) (Fig.5). Este rastro (Fig. 5A) corresponde à digestão pelas endonucleases existentes na linhagem BL21(DE3) que é melhorada visando à expressão e não a clonagem gênica. Já a linhagem TOP10 (Fig. 5B), uma linhagem melhorada para a clonagem gênica, possui genótipo *endA1* que lhe confere a eliminação da atividade de endonucleases não-específicas resultando em extrações plasmidiais (miniprep) sem degradação.

As linhagens de *E. coli* competentes TOP 10 e a BL21(DE3) foram testadas para expressão de Pg-AMP1 recombinante. A linhagem BL21(DE3) possui genótipo *ompT* e *lon* que lhe confere ausência de proteases de membrana propiciando maior rendimento por não degradar o produto da mesma (SORENSEN e MORTENSEN, 2005). Esta linhagem expressa melhor vetores contendo o promotor T7, pois possui em seu genótipo o gene codificador da RNA polimerase de T7, no entanto o vetor construído pQE30 tem como região promotora a seqüência híbrida T5/*lac* (Fig.4).

Hsu (2003) comparou a eficiência na transcrição dos promotores bacteriófagos T5 e T7 utilizando a RNA polimerase com o fator σ^{70} de *E. coli* e observou que a subunidade da enzima identifica mais rapidamente o promotor T7 do que o T5, embora mantenha uma ligação mais estável com o promotor T5. Possivelmente na BL21(DE3) a subunidade σ responsável pelo reconhecimento da região promotora, não esteja muito efetiva no reconhecimento da região promotora T5 do vetor pQE30, embora tenha sido descrito em outros artigos que as demais RNAs polimerases expressas nesta linhagem possam reconhecer e transcrever de forma eficiente sequencias controladas pelo promotor T5 (SORENSEN e MORTENSEN, 2005; LAN et al., 2006). A interação entre a subunidade σ da RNA polimerase e a região promotora do DNA a ser transcrito determina a força da região promotora, ou seja, o número de eventos de iniciação por unidade de tempo (SORENSEN e MORTENSEN, 2005; ALBERTS et al., 2006). Desta forma a construção do plasmídio recombinante no vetor pQE30 foi bastante acertada para expressão em *E.coli* já que a subunidade σ desta bactéria identifica e se liga de maneira estável, conferindo grande força á região promotora. Assim, uma linhagem bacteriana melhorada para a expressão de proteínas potencialmente tóxicas, apresentando um repressor forte, além de uma RNA polimerase específica para a região promotora T5 poderá aumentar o rendimento da expressão do Pg-AMP1 recombinante comparado ao obtido em TOP10.

De maneira diferente do esperado, a expressão do vetor pQE30-Pg-AMP1 não foi muito eficiente na linhagem BL21(DE3). Esta linhagem codifica para uma da RNA polimerase T7 específica para a região promotora T7, além da RNA polimerase cromossomal que transcreve as demais proteínas bacterianas e reconhece também sequências gênicas reguladas por promotores T5/lac como o pQE30-Pg-AMP1. Lan et al., (2006) clonou e expressou hormônios placentários humanos em diferentes vetores de expressão e em diferentes linhagens de *E. coli* hospedeiras. Curiosamente obteve um maior rendimento dos hormônios placentários com a combinação pQE30 em células BL21(DE3), do que com a combinação pET e BL21(DE3) que apresenta a região promotora T7 compatível com a RNA polimerase expressa nesta linhagem bacteriana (LAN et al., 2006). A BL21(DE3) é uma das linhagens mais indicadas para altos níveis de expressão em *E. coli* (DE PAULA et al., 2008; HUANG et al., 2008), no entanto neste trabalho a linhagem TOP 10 apresentou

maior rendimento do peptídeo recombinante. Outros trabalhos descrevem a eficiência da estratégia desenvolvida neste trabalho, mostrando que apesar da expressão em TOP10 ter sido maior que a obtida na BL21(DE3) esta é uma linhagem eficientemente usada para vetores pQE30.

A linhagem TOP10, segundo o fabricante, apresenta uma mutação do *lacI* (*lacI⁻*), que torna esta linhagem incapaz de produzir o repressor apresentando expressão constitutiva dos genes controlados por este promotor, não sendo necessária a indução com IPTG. A linhagem BL21(DE3) possui o gene *lacI^q* produzindo uma proteína repressora que impede a ligação da RNA polimerase na região operadora, tanto para os vetores com promotores T5 como para os T7, regulando a transcrição. Esta só irá ocorrer quando IPTG for adicionado ao meio de cultura competindo com o repressor e liberando a região promotora. Neste trabalho, diferente do esperado houve aumento da expressão do Pg-AMP1 recombinante expresso na linhagem TOP10, independente da adição de IPTG ao meio de cultura, como esperado, pois a mesma é *lacI⁻*. Já na linhagem BL21(DE3) mesmo adicionando IPTG (0,5 e 1mM) não houve uma produção satisfatória do peptídeo. Resultado semelhante foi obtido por Lee et al. (2002) quando comparou a expressão da aldeído-desidrogenase (ALDH2) sob controle do promotor T5 e T7, identificando que a expressão sob o controle do promotor T5 foi maior do que a expressão sob controle do promotor T7, e em ambos os casos a expressão ocorreu predominantemente na forma insolúvel.

No experimento com o Pg-AMP1 recombinante foi observada uma baixa expressão, mesmo usando IPTG, para a linhagem BL21(DE3) comparada com a linhagem TOP10, ambas na forma de corpo de inclusão. Essa baixa expressão pode ser explicada por vários motivos. Um deles pode reportar-se a constituição dos vetores da família pQE (QIAGEN) que são indicados para serem usados em linhagens com o vetor pREP que carrega o gene *lacI^q*, em especial a linhagem M15 da qiagen. Linhagens carregando este plasmídeo apresentam expressão 1.000 vezes maior do que linhagens que não carregam este plasmídeo quando o vetor de expressão é da família pQE (SLUPSKA et al., 1999). Hwang et al., (2000) observou que quando a linhagem BL21(DE3) foi utilizada para a expressão da proteína D-aminoácido oxidase em uma construção que teve como base o vetor pQE30 a proteína foi 4 vezes menos expressa quando comparada a outra construção cujo

backbone do vetor era do tipo pET21. Uma provável explicação para a baixa expressão obtida com a linhagem BL21(DE3) é que ela produz a T7 RNA polimerase e assim essa enzima compete pelo promotor T5 presente no pQE30 com a RNA polimerase nativa de *E. coli*, pois a T7 RNA polimerase reconhece o promotor mais rapidamente, embora a ligação da RNA polimerase de *E. coli* seja mais forte nesse ligação aumentando o número de transcrições abortivas e diminuindo a transcrição de gene de interesse (HSU et al., 2003). O vetor pQE30 como dito anteriormente, possui o promotor T5 além de duas regiões operadoras para o repressor LacI. A eficiência deste vetor de expressão foi maior para a linhagem TOP10, pois esta não possui o gene para repressor *lacI*, produzindo o mesmo constitutivamente. Interessantemente o peptídeo Pg-AMP1 acumulou-se na forma de corpos de inclusão o que pode ter evitado a morte das bactérias da linhagem TOP10, uma vez que o mesmo é letal para *E. coli* (PELEGRINI et al., 2008). Em DH5 α , uma linhagem *lacI* assim como a TOP10, foi observado que um proteína letal para bactéria somente era expressa quando sintetizada na forma inativa, pois quando o cDNA era expresso e produzia a proteína na sua forma ativa não era possível recuperar transformantes de *E. coli* para essa construção, uma vez que o mesmo matava a bactéria (LEW e PAULUS., 2002).

A melhor condição de expressão do Pg-AMP1 recombinante foi estabelecida para cada uma das linhagens de *E.coli* usadas. A TOP10 apresentou um rendimento de aproximadamente 13mg/L após 4 horas de indução a 30° C, sob agitação após a densidade ótica igual a 0,6. Já para a linhagem BL21(DE3), o melhor rendimento foi obtido (aproximadamente 1mg/L) com 2 horas de inoculo a 30° C, sob agitação após a indução com 1mM de IPTG.

Escherichia coli foi escolhida como vetor de expressão por seu rápido crescimento com altas densidades celulares e substratos baratos, mas frequentemente ocorre o mau dobramento dos polipeptídeos heterólogos e formação de corpos de inclusão (BANEY, 1999). Corpos de inclusão são agregados de polipeptídeos sem função biológica que ocorrem principalmente em proteínas recombinantes armazenadas intracelularmente. Ocorre frequentemente quando proteínas eucarióticas, como interleucinas, insulinas e o Pg-AMP1, são expressos em vetores procariotos (JHAMB, JAWED AND SAHOO, 2008). A principal causa deste mau dobramento das proteínas recombinantes, que resulta em corpos de inclusão, é

a sobrecarga das chaperonas, que ocorre quando grandes quantidades de um mesmo peptídeo são expressas (CHOE, NIAN AND LAI, 2006).

Ambas as linhagens testadas TOP10 e BL21(DE3) utilizando o vetor pQE30 produziu Pg-AMP1 recombinante sob a forma de corpo de inclusão. O Pg-AMP1 é potencialmente uma proteína tóxica para a *E. coli* e sua agregação em corpos de inclusão pode se tornar benéfica para a bactéria hospedeira. Peptídeos tóxicos agregados em corpos de inclusão não apresentam atividade contra a célula hospedeira, sendo interessante principalmente em pequenos peptídeos que não necessitam de dobramento posterior ou “refolding” (SHLYAPNIKOV et al., 2008). De acordo com Jhamb, Jawed e Sahoo (2008) a formação de corpos de inclusão pode ser interessante para o processo de purificação de proteínas citoplasmáticas, pois as protege da degradação proteolítica e podem ser separados das proteínas totais por centrifugação. Desta forma a presença do Pg-AMP1 recombinante na parte insolúvel das proteínas totais (Fig.8) foi interessante do ponto de vista do rendimento e da não degradação do mesmo. Durante o processo de solubilização dos corpos de inclusão foram testados dois agentes caotrópicos, uréia 8M e hidrocloreto de guanidina 6M, associado ao β -mercaptoetanol como agente redutor. A uréia apresentou melhor solubilização do peptídeo sendo usada nas purificações seguintes. Além disso, a purificação com Gua-HCl necessita de passos extras para a não precipitação da amostra quando aplicada no SDS-PAGE. Quanto à funcionalidade, mesmo mantido em corpos de inclusão, o peptídeo foi ativo contra parte das bactérias testadas. Shlyapnikov et al. (2008) observou resultado semelhante, mostrando que o peptídeo latarcin 2a extraído de veneno de aranha, teve sua atividade preservada mesmo mantido em corpos de inclusão, devido a simplicidade de sua estrutura terciária e a não estabilidade de sua estrutura terciária. Vários métodos podem ser empregados para aumentar a solubilidade de uma proteína recombinante. Xu et al. (2007) usou uma molécula de Ubiquitina fusionada a porção N-terminal da proteína CA-MA, resultando em aumento no rendimento, na estabilidade e solubilidade da proteína expressa, além de ter mantido a proteína funcional após a remoção da UBI. Korepanova et al. (2007) testou vários vetores com proteínas de ligação a maltose (MBP) fusionadas a genes que codificam proteínas de membrana altamente hidrofóbicas, obtendo maior rendimento e solubilidade das mesmas. Outra maneira de aumentar a expressão de uma proteína em sua forma nativa é coexpressar

chaperonas, aumentando desta forma o número de enzimas responsáveis pelo dobramento correto das proteínas recombinantes (LEE et al., 2002; PFEFFER et al., 2007; JHAMB, JAWED e SAHOO, 2008).

A construção do vetor com a cauda de histidina ligada ao gene do *pg-amp1* possibilitou a purificação do peptídeo expresso pela cromatografia de afinidade, já que a histidina possui afinidade pelo níquel da coluna. Além de facilitar a purificação da proteína, a cauda de histidina pode aumentar o rendimento através da prevenção de proteólise, aumentar a solubilidade, bem como facilitar o redobramento da proteína (ARNAU et al., 2006). Mesmo com a cauda de histidina fundida ao Pg-AMP1, a purificação com a coluna His Trap HP não foi total, podendo ser visto por SDS-PAGE a 15% que algumas proteínas contaminantes permaneceram nas amostras, mesmo após a passagem pela coluna (Fig. 8-9). Um processo de purificação complementar torna-se necessário, já que mesmo variando a concentração de imidazol dos tampões de ligação e eluição, conforme orientação do manual do fabricante, a purificação total não foi obtida. Huang et al. (2008) combinou diferentes tipos de cromatografia de afinidade (Ni-NTA, sefadex G-25 e heparina) para conseguir uma pureza de 95% do peptídeo recombinante Tat-haFGF. Um processo denominado TAP (purificação por afinidade em tandem) tem sido usado para obtenção de proteínas recombinantes para técnicas que exigem alta pureza como cristalografia (ARNAU et al., 2006).

Quanto ao rendimento obtido após a purificação com a cromatografia de afinidade, a linhagem BL21(DE3) produziu aproximadamente 1mg/L de meio de cultura, enquanto que a TOP10 rendeu aproximadamente 13mg/L, tornando claro que mesmo não sendo uma linhagem utilizada para expressão de proteínas heterólogas a linhagem TOP10 foi mais eficiente na expressão do Pg-AMP1 recombinante. Provavelmente por produzir o peptídeo constitutivamente. O rendimento aproximado foi calculado após a quantificação por Bradford de cada *pellet* gerado no processo de purificação de corpos de inclusão e após a purificação na coluna de níquel. Em seguida multiplicamos este valor obtido pelo número total de *pellets* gerados em um litro de cultura bacteriana expressando o peptídeo Pg-AMP1. Zelena et al. (2009) descreve o uso da linhagem TOP10 para construção do vetor, propagação e expressão, obtendo a proteína recombinante tanto na forma insolúvel quanto solúvel. Na figura 7 pode-se observar que apesar do menor rendimento da

linhagem BL21(DE3), esta também apresentou a expressão predominante do Pg-AMP1 recombinante em corpo de inclusão (Fig.7A), indicando que possivelmente o número ou interação com as chaperonas não está sendo suficiente. A expressão da TOP10 predominantemente na fração insolúvel pode ser observada na figura 7B.

Após estabelecer a melhor linhagem bacteriana para expressão, estabelecer o melhor método de purificação e quantificarmos o peptídeo (Pg-AMP1) recombinante realizamos os bioensaios *in vitro* contra fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas humanas. O peptídeo foi testado em diferentes concentrações contra diferentes microorganismos objetivando comprovar se a atividade antimicrobiana descrita por Pelegrini et al. (2008) foi preservada no peptídeo recombinante. Um dado importante encontrado no presente trabalho relaciona-se ao fato de ter havido modificação da ação a partir daquela descrita para o peptídeo extraído de sementes de goiaba. Observamos também a ação contra bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* (Tab. 1), enquanto o trabalho de Pelegrini et al. (2008) mostrou apenas contra Gram-negativas. Já para *Salmonella typhimurium* ATCC14028, embora seja a mesma linhagem testada por Pelegrini et al. (2008), não houve inibição do crescimento. Estes dados sugerem que o dobramento do peptídeo recombinante pode ter se modificado em função da adição da cauda de histidina e dos aminoácidos correspondentes aos sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Hind*III, já que sua ação sobre os microorganismos foi modificada. A modificação na função do Pg-AMP1 recombinante pode ter sido causada pela interação da cauda de histidina, pois a mesma pode atuar de maneira negativa modificando a conformação protéica e alterando a atividade biológica (ARNAU et al., 2006). Outra hipótese seria relacionada aos agrupamentos do peptídeo em corpos de inclusão, indicando que o peptídeo recombinante Pg-AMP1 pode ter uma estrutura secundária diferente do P-AMP1 extraído de sementes de goiaba. Uma maneira de obter informações sobre a conformação secundária e o dobramento correto do peptídeo é através do dicroísmo circular (CD). A análise do espectro obtido com o peptídeo recombinante pode nos fornecer mais dados acerca da estrutura secundária do peptídeo, relacionando a estrutura e a função do peptídeo recombinante com sua ação sobre os microorganismos inibidos (KELLY, JESS e PRICE, 2005).

A modelagem molecular feita por Pelegrini et al. (2008) mostra que o Pg-AMP1 obtido de sementes de goiaba é composto por duas α -hélices, uma na extremidade

N-terminal e a outra na extremidade C-terminal, tendo entre as mesmas um *loop* contendo vários resíduos de glicina que possibilitam flexibilidade. O Pg-AMP1 recombinante possui em sua extremidade N-terminal seis resíduos de histidina e no sítio correspondente à enzima de restrição *BamHI*, um resíduo de glicina e um de serina. Já na extremidade C-terminal temos, no sítio da enzima *HindIII*, resíduos de lisina e leucina. Desta maneira, devido a estes resíduos de aminoácidos adicionados à estrutura primária do Pg-AMP1, provavelmente a conformação secundária foi modificada, podendo resultar também em alteração na estrutura terciária e consequentemente na função/ação do peptídeo sobre o patógeno. Na extremidade N-terminal, a cauda de histidina adicionada tende a formar α -hélices, enquanto que a serina e a glicina adicionadas tendem a romper a α -hélice e formar dobras β . Na extremidade C-terminal, os resíduos adicionados, lisina e leucina, tendem a formar α -hélices semelhantes à estrutura do peptídeo (NELSON e COX, 2006). Lee et al. (2002) mostrou que a cauda de histidina na porção N-terminal da proteína ADHL2 não modificou a solubilidade, o nível de expressão obtido e não alterou a atividade enzimática da proteína expressa quando comparado a mesma proteína não fusionada a cauda de histidina.

Apesar da inserção de aminoácidos no Pg-AMP1 recombinante a ação antibacteriana foi mantida, mostrando atividade bacteriostática contra dois gêneros de Gram-negativas, duas cepas de *E.coli* (ATCC 35218 e 8739) e duas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 11229 e 27853). Foi observada ainda atividade contra cepas Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 2592-3 e 2921-3), *S. epidermidis* (ATCC 1222-8) e ainda contra a cepa de *S. aureus* MEC-A (ATCC 3359-1), resistente a meticilina. O peptídeo Pg-AMP1 recombinante foi testado ainda contra as Gram-negativas *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella sonnei*, além dos fungos fitopatogênicos *Botrytys cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Cholleotrichium sp*, não apresentando nenhum tipo de inibição em nenhuma das concentrações testadas.

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa simbiótica que pertence à microflora intestinal de indivíduos saudáveis, mas que também pode ser agente etiológico de infecções intestinais e urinárias, principalmente em crianças (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; RANGEL et al., 2005). As cepas de *E.coli* patogênicas e não patogênicas se distinguem pelos fatores de virulência, geralmente codificados

por elementos móveis como plasmídeos (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Chen et al. (2006) identificou o gene *yfaL* que codifica proteínas e confere habilidade de modificar a resposta imune inata da cepa de *E.coli* aumentando a resistência a tratamentos com antibióticos. Já *Pseudomonas aeruginosa*, outra Gram-negativa, é considerada uma infecção hospitalar grave quando atinge a corrente sanguínea, pois afeta principalmente pacientes de unidades intensivas causando mortalidade de 20% dos infectados, principalmente quando não é feito o diagnóstico preciso nas fases iniciais (MICEK et al., 2005). Infecções com *P. aeruginosa* também ocorrem como uma infecção crônica nas vias aéreas de pacientes com fibrose cística causando problemas respiratórios que resultam na morte dos pacientes (SMITH et al., 2006). Estudos realizados em cepas de *P. aeruginosa* causadora de infecções crônicas sugerem que ao longo do tempo e com o uso de tratamento inapropriado, ocorrem mutações que coexistem em um mesmo paciente dificultando o tratamento (SMITH et al., 2006).

Apenas o gênero *Staphylococcus* foi testado dentre as Gram-positivas. *S. aureus* causa infecções hospitalares lesando a pele e tecidos adjacentes em procedimentos invasivos, sendo responsável por cerca de 20 a 25% de mortes dos pacientes infectados apesar dos agentes antimicrobianos empregados (FRIDKIN et al., 2005) e, segundo Fowler (2006), a bacteremia causada por *S. aureus* leva a complicações como endocardites em 30 a 40% dos casos. O *S. aureus* MEC-A (MRSA) é uma linhagem resistente a antibióticos como meticilina, e a busca por novos antibióticos para seu tratamento torna-se necessária (FOWLER et al., 2006); *S. epidermidis*, em geral pertence à microflora normal humana, no entanto o número de infecções causadas por esta bactéria tem aumentado, juntamente com o número de cepas resistentes a múltiplas drogas (IWASE et al., 2008).

O peptídeo Pg-AMP1 recombinante mostrou atividade inibitória bacteriostática para todas as cepas testadas em concentrações de inibição variando entre 50 e 100 µg/ml (ver tabela 1), no entanto seu modo de ação ainda não foi estabelecido. De acordo com Giulliani, Pirri e Nicoletto (2007), o modelo proposto para a forma de ação dos AMPs sobre as bactérias Gram-negativas ocorre através da interação e desestabilização dos peptídeoglicanos da parede celular, rompendo a mesma. Outra forma de ação possível para os AMPs é atravessar a membrana celular procariota e ligar-se ao RNA ou DNA inibindo a maquinaria celular (GIULIANI, PIRRI e

NICOLETTO, 2007). O Pg-AMP1 identificado por Pelegrini et al. (2008) parece agir rompendo a membrana, levando a morte celular das bactérias Gram-negativas. No entanto, como o Pg-AMP1 recombinante mostrou um espectro maior de ação, atuando também sobre Gram-positivas, outros estudos devem ser realizados para comprovar seu modo de ação. Uma forma de confirmar se ocorre a permeabilização da membrana é usando o reagente SYTO 9 e PI (iodeto de propídio), mostrando através da fluorescência se a membrana tornou-se permeável ou não após o tratamento com o AMP (YANG et al., 2007).

Considerando as discussões realizadas acima, este projeto ainda contém vários passos que devem ser realizados. A expressão pode ser otimizada, testando para tal uma linhagem bacteriana que reconheça o promotor T5 com maior eficiência e que possa ter sua expressão basal regulada. O uso do dicroísmo circular e de modelagem molecular é necessário para estabelecer a estrutura secundária do peptídeo e visualizar se a conformação terciária foi mantida ou não no peptídeo recombinante. Técnicas de fluorescência como o SYTO 9 e o PI também são interessantes para confirmar o modo de ação do peptídeo sobre as bactérias testadas. São necessárias, ainda, etapas posteriores de purificação do peptídeo como forma de estabelecer precisamente a concentração inibitória mínima do peptídeo sobre os microorganismos suscetíveis.

Faz-se necessário salientar a importância dos estudos posteriores para estabelecer a viabilidade da produção do Pg-AMP1 recombinante como antibiótico, uma vez que houve atividade bacteriostática contra bactérias causadoras de infecções hospitalares para as quais muitos antibióticos comumente usados tornaram-se ineficientes.

6 CONCLUSÃO

- O peptídeo recombinante Pg-AMP1 foi expresso em sistema heterólogo de *E.coli*, em especial na linhagem TOP10;
- A maior parte do peptídeo foi expressa na forma insolúvel em corpos de inclusão, sendo necessário adicionar um agente caotrópico durante a purificação;
- O peptídeo foi purificado e isolado utilizando uma coluna de Ni His-Trap;
- O peptídeo recombinante teve parte sua ação antimicrobiana preservada;
- O peptídeo recombinante mostrou atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas;

7 PERSPECTIVAS

A continuidade deste trabalho com o peptídeo recombinante Pg-AMP1 pode objetivar as seguintes etapas:

- ✓ Realizar o dicroísmo circular como maneira de estabelecer a estrutura secundária do peptídeo;
- ✓ Realizar a modelagem molecular para prever as interações entre os resíduos dos aminoácidos inseridos no peptídeo recombinante como forma de prever as interações existentes entre eles e se organizam-se em dímero como ocorre com o peptídeo nativo extraído de goiaba;
- ✓ Otimizar a expressão e purificação do peptídeo para realizar ensaios de cristalização, e uma vez obtidos cristais, utilizar-se da difração de raios-X para estabelecer sua estrutura tridimensional;
- ✓ Modificar a cauda de histidina ou inserir outra cauda de forma a endereçar o peptídeo para o meio extracelular ou mantê-lo solúvel como forma de facilitar as etapas de purificação e manter a conformação nativa;
- ✓ Avaliar sua expressão em linhagens de bactérias para expressão onde o promotor *t5* seja mais ativo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. AND WALTER, P. 2006. **Molecular Biology of The Cell**.4th ed.

ANDERSEN, J.; OSBAKK, S.; VORLAND, L.; TRAAVIK, T.; GUTTEBERG, T. 2001. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. **Antiviral Research**, **51**: 141-149.

ARNAU, J.; LAURITZEN, C.; PETERSEN, G.E.; PEDERSEN, J. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, **48**: 1–13.

BANEY, X.F. 1999. Recombinant protein expression *Escherichia coli*. **Current Opinion Biotechnology**, **10**:411–421.

BAO, W.J.; GAO, Y.G.; CHANG, Y.G.; ZHANG, T.Y.; LIN, X.J.; YAN, X.Z.; HU, H.Y. 2006. Highly efficient expression and purification system of small-size protein domains in *Escherichia coli* for biochemical characterization. **Protein Expression and Purification**, **47**: 599–606.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**: 248–254.

BRADY, K.P.; DARVILL, A.G. AND ALBERSHEIN, P. 1993. Activation of a tobacco glycine-rich protein gene by a fungal glucan preparation. **Plant Journal**, **4**: 517-524.

BROEKAERT, W.F.; MARIEN, W.; TERRAS, F.R.G.; DE BELLE, M.F.C.; PROOST, P.; VAN DAME, J.; DILLEN, L.; CLAEYS, M.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J. AND CAMMUE, B.P.A. 1992. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins? **Biochemistry**, **31**: 4308-4314.

BROEKAERT, W.F.; TERRAS F.R.G.; CAMMUE B.P.A. AND OSBORN R.W. 1995. Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. **Plant Physiology**, **108**: 1353-1358.

BROGDEN, K.A. 2005. Antimicrobial peptides pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, **3**: 238-250.

BROWN, T.A. 2003. **Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma Introdução**. Artmed, 4^a Ed.: 225-253.

- CARPENTER, C.D.; KREPS, J.A.; SIMON, A.E. 1994. Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. **Plant Physiology**, **104**: 1015-1025.
- CASTRO, M.S.; FONTES, W. 2005 Plant Defense and Antimicrobial Peptides **Protein and Peptide Letters**, **12**: 11-16.
- CHEN, S.L.; HUNG, C.; XU, J.; REIGSTAD, C.S.; MAGRINI, V.; SABO, A.; BLASIAR, D.; BIERI, T.; MEYER, M.M.; OZERSKY, P.; ARMSTRONG, J.R.; FULTON, R.S.; LATREILLE, J.P.; SPIETH, J.; HOOTON, T.M.; MARDIS, E.R.; HULTGREN, S.J.; GORDON, J.I. 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: A comparative genomics approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103 (15)**: 5977–5982.
- CHOE, W.S.; NIAN, R.; LAI, W.B. 2006. Recent advances in biomolecular process intensification. **Chemical Engineering Science**, **61(3)**:886–906.
- CHRISTENSEN, T.; TRABBIC-CARLSON, K.; LIU, W.; CHILKOTI, A. 2007. Purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* at low expression levels by inverse transition cycling. **Analytical Biochemistry**, **360**:166–168.
- CONDIT, C.M.; MEAGHER, R.B. 1987. Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. **Molecular Cell Biology**, **7**: 4273–4279.
- DE OLIVEIRA, D.E.; SEURINCK, J.; INZE, D.; VAN MONTAQUE, M.; BOTTEMAN, J. 1990. Differential expression of five *Arabidopsis* genes encoding glycine-rich proteins. **Plant Cell**, **2**: 437– 536.
- DE PAULA, V. S.; RAZZERA, G.; MEDEIROS, L.; MIYAMOTO, C.A.; ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E.; ALMEIDA, F.C.L.; VALENTE, A.P. 2008. Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. **Plant Molecular Biology**, **68**: 321–335.
- DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J.1994. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Reviews Phytopathology**, **32**: 479–501.
- EGOROV, T.A.; ODINTSOVA, T.I.; PUKHALSAKY, V.A.; GRISHIN, E.V. 2005. Diversity of wheat anti-microbial peptides. **Peptides**, **26**: 2064-2073.
- FANG, R.X.; PANG, Z.; GAO, D.M.; MANG, K.Q.; CHUA, N.H. 1991. cDNA sequence of a virus-inducible, glycine-rich protein gene from rice. **Plant Molecular Biology**, **17**: 1255-1257.
- FOWLER, V.G.; BOUCHER, H.W.; COREY, G.R.; ABRUTYN, E.; KARCHMER, A.W.; RUPP, M.E.; LEVINE, D.P.; CHAMBERS, H.F.; TALLY, F.P.; VIGLIANI, G.A.; CABELL, C.H.; LINK, A.S.; DEMEYER, I.; FILLER, S.G.; ZERVOS, M.; COOK, P.; PARSONNET, J.; BERNSTEIN, J.M.; PRICE, C.S.; FORREST, G.N.; FÄTKENHEUER, G.; GARECA, M.; REHM, S.J.; BRODT, H.R.; TICE, A.

COSGROVE, S.E. 2006. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**, **355 (7)**: 653-665.

FRIDKIN, S.K.; HAGEMAN, J.C.; MORRISON, M.; SANZA, L.T.; SABETTI, K.C.; JERNIGAN, J.A.; HARRIMAN, K.; HARRISON, L.H.; LYNFIELD, R.; FARLEY, M.M. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. **The New England Journal of Medicine**, **352**: 1436-1444.

FURUYA E.Y.; LOWY F.D. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature Review Microbiology**, **4**: 36–45.

GAO A.G.; HAKIMI S.M.; MITTANCK C.A.; WU Y.; WOERNER B.M.; STARK D.M.; SHAH D.M.; LIANG J.; ROMMENS C.M.T. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, **18**: 1307-1310.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; SEGURA, A.; MORENO, M. 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. **Trends in Microbiology**, **3**:72-74.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S.F. 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**, **2**: 1-33.

GODDEMEIER, M.L.; WULFF, D. AND FEIX, G. 1998. Root-specific expression of a *Zea mays* gene encoding a novel glycine-rich protein, zmGRP3. **Plant Molecular Biology**, **36**: 799–802.

GOUY, M. AND GAUTIER, C.1982. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. **Nucleic Acids Research**, **10**: 7055-7074.

GUERREIRO, C.I.P.D.; FONTES, C.M.G.A.; GAMA, M.; DOMINGUES, L. 2008. *Escherichia coli* expression and purification of four antimicrobial peptides fused to a family 3 carbohydrate-binding module (CBM) from *Clostridium thermocellum*. **Protein Expression and Purification**, **59**: 161-168.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. 1996. Inducible plant defense mechanisms and resistance gene function. **Plant Cell**, **8**: 1773–91.

HANCOCK, R.E.W.; CHAPPLE, D.S. 1999. Peptides antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **43**: 1317–1323.

HANCOCK, R.E.W.; DIAMOND, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiology**, **8**: 402–410.

HANCOCK, R.E.W.; SAHL, H.G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, **24**: 1551-1557.

- HSU, L.M.; VO, N.V.; KANE, C.M.; CHAMBERLIN, M.J. 2003. *In vitro* studies of transcript initiation by *Escherichia coli* RNA Polymerase 1. RNA chain initiation, abortive initiation, and promoter escape at three bacteriophage promoters. **Biochemistry**, **42 (13)**: 3777-3786.
- HUANG, X.; XIE, W.J.; GONG, Z.Z. 2001. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, **478**: 123–126.
- HUANG, Y.; RAO, Y.; FENG, C.; LI, Y.; WU, X.; SU, Z.; XIAO, J.; XIAO, Y.; FENG, W.; LI, X. 2008 High-level expression and purification of Tat-haFGF. **Applied Microbiology Biotechnology**, **77**: 1015–1022.
- HWANG, T.S.; FU, H.M.; LIN, L.L.; HSU, W. 2000. High-level expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Escherichia coli* using lactose as inducer. **Biotechnology Letters** **22**: 655–658.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, **96**: 23-28.
- IWASE, T.; HOSHINA, S.; SEKI, K.; SHINJI, H.; MASUDA, S. AND MIZUNOE, Y. 2008. Rapid identification and specific quantification of *Staphylococcus epidermidis* by 5' nuclease real-time polymerase chain reaction with a minor groove binder probe. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, **60**: 217–219.
- JHAMB, K.; JAWED, A.; SAHOO, D.K. 2008. A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body proteins. **Process Biochemistry**, **43**: 587–597.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology**, **2**: 123–140.
- KAWATA, M.; NAKAJIMA, T.; YAMAMOTO, T.; MORI, K.; OIKAWA, T.; FUKUMOTO, F.; KURODA, S. 2003. Genetic engineering for disease resistance in rice (*Oryza sativa* L.) using antimicrobial peptides. **Japan Agricultural Research Quarterly**, **37**: 71–76.
- KELLER, B.; SAUER, N.; LAMB, C.J. 1988. Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. **European Molecular Biology Organization Journal**, **7**: 3625–3633.
- KELLER, B.; TEMPLETON, M.D.; LAMB, C.J. 1989. Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **86**: 1529–1533.
- KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N. 2005. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1751**: 119 – 139.

KIM, D.H.; LEE, Y.T.; LEE, Y.J.; CHUNG, J.H.; LEE, B.L.; CHOI, B.S. A.; LEE, Y. 1998. Bacterial expression of tenecin 3, an insect antifungal protein isolated from *Tenebrio molitor*, and its efficient purification. **Molecular Cells**, **8**: 786–789.

KIM, D.H.; LEE, D.G.; KIM, K.L.; LEE, Y. 2001. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. **European Journal Biochemistry**, **268**: 4449–4458.

KOIKE, M.; OKAMOTO, T.; TSUDA, S.; IMAIB, R. 2002. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **298**: 46–53.

KOREPANOVA, A.; MOORE, J.D.; NGUYEN, H.B.; HUA, Y.; CROSS, T.A.; GAO, F. 2007. Expression of membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli* as fusions with maltose binding protein. **Protein Expression and Purification**, **53**: 24–30.

LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins using assembly of the head of the bacteriophage. **Nature**, **227**: 680–685.

LAN, P. C.; TSENG, C.F.; LIN, M.C.; CHANG, A.C. 2006. Expression and purification of human placenta lactogen in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, **46**: 285–293.

LAY, F.T.; ANDERSON, M.A. 2005. Defensins - components of the innate immune system in plants. **Current Protein Peptide Science**, **6**: 85–101.

LEE, Y.T.; KIM, D.H.; SUH, J.Y.; CHUNG, J.H.; LEE, B.L.; LEE, Y.; CHOI, B.S. 1999. Structural characteristics of tenecin 3, an insect antifungal protein. **Biochemistry Molecular Biology International**, **47**: 369–376.

LEE, K.H.; KIM, H.S.; JEONG, H.S.; LEE, Y.S. 2002. Chaperonin GroESL mediates the protein folding of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **298**: 216–224.

LEW, B.M.; PAULUS, H. 2002. An in vivo screening system against protein splicing useful for the isolation of non-splicing mutants or inhibitors of the RecA intein of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene**, **282**: 169–177.

LI, S.S.; CLAESON, P. 2003. Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. **Phytochemistry**, **63**: 249–255.

MARSHALL, S.H.; ARENAS, G. 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology**, **2**: 271-284.

MATSUNAGA, A.; KAWANO, S.; TAKANO, H.; UCHIDA, H.; SAKAI, A. AND KUROIAMA, T. 1996. Isolation and developmental expression of male reproductive

organ-specific genes in a dioecious campion, *Melandrium album* (*Silene latifolia*). **Plant Journal**, **10**: 679-689.

MICEK, S.T.; LLOYD, A.E.; RITCHIE, D.J.; REICHKEY, R.M.; FRASER, V.J.; KOLLEF, M.H. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, **49** (4): 1306–1311.

MONTESINOS, E. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, **270**: 1 – 177.

MORENO, A.B.; MARTÍNEZ, A.; BORJA, M.; SANAEGUNDO, B. 2003. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interact**, **93**: 1344-1353.

MOUSAVI, A.; HOTTA, T. 2005. Glycine-rich proteins a class of novel proteins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **120**: 169-174.

NAQVI, S.M.; PARK, K.S.; YI, S.Y.; LEE, H.W.; BOK, S.H.; CHOI, D. 1998. A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following tobacco mosaic virus infection in tobacco. **Plant Molecular Biology**, **37**: 571–576.

NCCLS/ CSLI. 2003. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. 6th ed, 23 (2). www.clsi.org

NELSON, D.L.; COX, M.M. 2006. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Sarvier. 4a ed., 74-156.

NIELSEN, K.K.; NIELSEN, J.E.; MADRID, S.M. AND MIKKELSEN, J.D. 1997. Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. **Plant Physiology**, **113**: 83-91.

NO, E.G.; FLAGLER, R.B.; SWIZE, M.A.; CAIRNEY, J.; NEWTON, R.J. 1997. cDNAs induced by ozone from *Atriplex canescens* (saltbush) and their response to sulfur dioxide and water-deficit. **Physiology Plantarum**, **100**:137-146.

NOVAK, R.; HENRIQUES, B.; CHARPENTIER, E.; NORMAK, S. AND TUOMANEN, E. 1999. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. **Nature**, **399**: 590-593.

PARK, C.J.; PARK, C.B.; HONG, S.S.; LEE, H.S.; LEE, S.Y.; KIM, S.C. 2000. Characterization and cDNA cloning of two glycine and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. **Plant Molecular Biology**, **44**: 187–197.

PARK, J.O.; SUH, M.C.; KIM, T.H.; KIM, M.C.; CHO, S.H. 2008. Expression of glycine-rich protein genes, AtGRP5 and AtGRP23, induced by the cutin monomer 16-

- hydroxypalmitic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, **46**: 1015-1018.
- PELEGRINI, P.B.; MURAD, A.M.; SILVA, L.P.; SANTOS, R.C.P.; COSTA, F.T.; TAGLIARI, P.D.; BLOCH, C.J.; NORONHA, E.L.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. 2008. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against gram-negative bacteria. **Peptides**, **29**: 1271-1279.
- PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M.; BRAGA, V.M.M.; RUMJANEK, F.D.; SIMPSON, A.J.G. 1990. F10, the gene for the glycine-rich major eggshell protein of *Schistosoma mansoni* recognizes a family of hypervariable minisatellites in the human genome. **Nucleic Acids Research**, **18**: 7466.
- PESCHEL, A.; SAHL, HG. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Microbiology**, **4**: 529- 536.
- PFEFFER, J.; RUSNAK, M.; HANSEN, C.E.; RHLID, R.B.R.; SCHMID, R.D.; MAURER, S.C. 2007. Functional expression of lipase A from *Candida antarctica* in *Escherichia coli* - A prerequisite for high-throughput screening and directed evolution. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **45**: 62–67.
- PORTIELES, R.; AYRA, C.; BORRAS, O. 2006. Basic insight on plant defensins. **Biotechnología Aplicada**, **23**: 75-78.
- PRIMROSE, S.B.; TWYMAN, R.M. 2006. **Principles of Gene Manipulation and Genomics**. Blackwell Publishing, 7th ed., 36-124.
- RADEK, K.; GALLO, R. 2007. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. **Seminars of Immunopathology**, **29**: 27–43.
- RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P.M.; SWERDLOW, J. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, **11 (4)**: 603-609.
- RINGLI, C.; KELLER, B.; RYSER, U. 2001. Glycine-rich protein as structural components of plant cell walls. **Cell Molecular Life Science**, **58**:1430–1441.
- RIVILLAS-ACEVEDO, L.A.; SORIANO-GARCÍA, M. 2007. Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55**: 10156–10161.
- SACHETTO-MARTINS, G.; FRANCO, L.O.; OLIVEIRA, D.E. 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? **Biochimica et Biophysica Acta**, **1492**: 1-14.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. 2001. **Molecular cloning. A Laboratory Manual**. New York. Cold Spring Harbor. (1, 2 e 3).

SATHIYAMOORTHY, P.; SHANMUGASUNDARAM, S. 1996. Preparation of cyanobacterial peptide toxin as a biopesticide against cotton pests. **Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, **46**: 511-513.

SCHEIN, C.H.; NOTEBORN, M.H.M. 1989. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. **Bio/Technology**, **6**: 291-294.

SHLYAPNIKOV, Y.M.; ANDREEV, Y.A.; KOZLOV, S.A.; VASSILEVZKI, A.A.; GRISHIN, E.V. 2008. Bacterial production of Iatarcin 2a, a potent antimicrobial peptide from spider venom. **Protein Expression and Purification**, **60**: 89-95.

SILVERSTEIN, K.A.T.; GRAHAN, M.A.; PAAPE, T.D.; VANDENBOSCH, K.A. 2005. Genome organization of more than 300 defensin-like genes in arabidopsis. **Plant Physiology**, **138**: 600-610.

SLUPSKA, M.M.; LUTHER, W.M.; CHIANG, J.; YANG, H.; MILLER J.H. 1999. Functional Expression of hMYH, a Human Homolog of the *Escherichia coli* MutY Protein. **Journal of Bacteriology**, **181 (9)**: 6210-6213.

SMITH, E.E.; BUCKLEY, D.G.; WU, Z.; SAENPHIMMACHAK, C.; HOFFMAN, L.R.; D'ARGENIO, D.Q.; MILLER, S.I.; RAMSEY, B.W.; SPEERT, D.P.; MOSKOWITZ, S.M.; BURNS, J.L.; KAUL, R.; OSLOM, M.V. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103 (22)**: 8487-8492.

SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, **115**: 113-128.

TANAKA, K. 2001. P-13 - kinase p85 is a target molecule of proline-rich antimicrobial peptide to suppress proliferation of ras-transformed cells. **Japanese Journal of Cancer Research**, **92**: 959-967.

TAVARES, L.S.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; MOREIRA, J.S.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. 2008. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. **Peptides**, **29**: 1842-1851.

TERRAS, F.R.G.; SCHOOF, H.M.E.; DE BOLLE, M.F.C.; VAN LEUVEN, F.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.P.A.; BROEKAERT, W.F. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, **267**: 15301-15309.

THEVISSSEN, K.; TERRAS, F.R.G.; BROEKAERT, W.F. 1999. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**: 5451-5458.

TREGGAR, J.W.; MORCILLO, F.; RICHAUD, F.; BERGER, A.; SINGH, R.; CHEAH, S.C.; HARTMANN, C.; RIVAL, A.; DUVAL, Y. 2002. Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. **Journal of Experimental Botany**, **35**: 1387-1396.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, **44**: 135–62.

VIZIOLI, J.; SALZET, M. 2002. Antimicrobial peptides versus parasitic infections? **Trends in Parasitology**, **18**: 475-476.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. 2004. **Molecular Biology of the Gene**. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 5th ed.:p 647.

XU, X.; JIN, F.; YU, X.; REN, S.; HU, J.; ZHANG, W. 2007. High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropin A (1-8) - magainin2 (1-12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, **55**: 175–182.

YANG, H.; WAN, L.; LI, X.; CAI, H.; CHEN, L.; LI, S.; LI, Y.; CHENG, J.; LU, X. 2007. High level expression of His-tagged colicin 5 in *E. coli* and characterization of its narrow-spectrum bactericidal activity and pore-forming action. **Protein Expression and Purification**, **54**: 309–317.

YE, X.Y.; NG, T.B. 2000. Mungin, a novel cyclophilin-like antifungal protein from the mungbean. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, **273**: 1111–1115.

ZELENA, K.; KRÜGENER, S.; LUKENBEIN, S.; ZORN, H.; BERGER, R.G. 2009. Functional expression of the lipase gene Lip2 of *Pleurotus sapidus* in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, **31**: 395–401.

ANEXO A

I MATERIAIS

1 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Tabela 2. Enzimas de Restrição utilizadas.

Enzima	Sítio de Clivagem	Origem	Temperatura	Fabricante
<i>Bam HI</i>	G [^] GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	37° C	NEB
<i>Hind III</i>	A [^] AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	37° C	NEB

2- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Após dissolver todos os reagentes em água, os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave a 120° C, 1 ATM por 20 minutos. Nos meios de cultura seletivos foi adicionado o antibiótico ampicilina filtro-estéril nas concentrações de 50µg/ml e 100µg/ml após o meio de cultura estéril esfriar a uma temperatura próxima a 37° C. Nos ensaios bacterianos foi utilizado o antibiótico cloranfenicol fitro-estéril nas concentrações de 1.250; 125; 12,5; 1,25 e 0,125 µg/mL. Nos ensaios antifúngicos foi usado Captan 0,5%.

Meio LB (*Lysogenis Broth*)

Triptona	10g/L
Extrato de Levedura	5g/L
Cloreto de Sódio	10g/L

pH ajustado para 7,0 com NaOH

Para LB sólido (placas de cultivo), adicionar:

Agar	15g/L
------	-------

SOB

Triptona	20g/L
Extrato de Levedura	5g/L
Cloreto de Sódio	0,5g/L
Cloreto de Potássio	250mM
Cloreto de Magnésio	2M

pH 7,0, ajustado com NaOH

Adicionar o $MgCl_2$ filtro-estéril após o meio de cultura ter sido autoclavado.

TSB (Tryptone Soy Broth)

Triptona	5g/L
Extrato de Levedura	2,5g/L
Dextrose	1g/L
Cloreto de Sódio	10g/L

pH 7,0 ajustado com NaOH.

BDA (Batata, Dextrose e Agar)

Batata	100g/L
Dextrose	1g/L
Agar	25g/L

3 SOLUÇÕES

Gel de Agarose 2%

Tampão de Amostra 5X

Glicerol	50,0% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,2% (p/v)
Solvente TBE	2,5 X

Estocar a 4° C.

Tampão de Corrida para gel de Agarose (TBE) 5X

Tris Base	54g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5M (pH 8,0)	20mL
H ₂ O destilada qsp	1L

pH 8,3

Marcadores de massa molecular (Mm) para DNA

- Marcador "1kb Ladder" (New England Biolabs, Ipswich, MA)

Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante:

Gel separador 15%	10mL
Acrilamida 30%	4.74mL
Tampão Tris 1,5M (pH 6,8)	2,5mL
SDS 10%	2,0mL
H ₂ O destilada	110µL
AMP10%	100µL
TEMED	15µL

Gel concentrador 4%	5mL
Acrilamida 30%	670µL
Tampão Tris 0,5M (pH 6,8)	1250µL
SDS 10%	50µL
H ₂ O destilada	3mL
AMP 10%	25µL
TEMED	50µL

Tampão de Corrida 5X

Tris Base	15,1g
Glicina	94g
SDS	50mL
H ₂ O	800 mL

pH 8,3 ajustado com HCl,
Completar o volume de água para 1 L.

Tampão de Amostra 6X	10mL
Glicerol 10%	1mL
SDS10%	1g
Azul de Bromofenol 0,05%	0,005g
2 β - Mercaptoetanol 4mM	3 μ L

Ajustar o pH para 6,8 (Tris-HCl 0,5M)

Marcador de Peso Molecular (Mw) para proteínas
7-175 kDa (New England Biolabs, Ipswich, MA)

Solução de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo)

IPTG	1M
------	----

Dissolvido em água ultra-pura e filtro-estéril em membrana microbiológica de 0,22 μ m (Millipore). Usado na concentração de 1mM e 0,5 mM para indução da transcrição do peptídeo recombinante.

4 PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE

Tampão de Lise

Fosfato de Sódio (pH=7.8)	50mM
Cloreto de Sódio	300mM
Cloreto de Potássio	50mM
Glicerol	10%
Triton X-100	0,5%
Imidazol	10mM

Tampão lise para corpos de inclusão

Cloreto de Sódio	300mM
2 β -Mercaptoetanol	10mM
Fosfato de sódio (pH 7,4)	50 mM

Cocktail Inibidor de Protease (SIGMA)	10mg/mL
---------------------------------------	---------

Tampão A – Lise de corpos de inclusão com Hidrocloro de Guanidina 6M

Cloreto de Sódio	300mM
Fosfato de Sódio (pH 7.4)	50mM
Imidazol	20mM
Gua-HCl	6M

Tampão B- Lise de corpos de inclusão com uréia 8M

Cloreto de Sódio	5M
Imidazol	20mM
Uréia	8M

5 SOLUÇÕES E MATERIAIS PARA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

- Coluna
“His TrapTM HP Columns” carregada com “Níquel Sepharose High Performance” coluna de 1 mL da “GE Healthcare”.

- Soluções
Todas as soluções foram filtro-estéreis em filtro de micromembrana de 0,22µm (Millipore).

Tampão de Ligação/ Lavagem

Tampão fosfato 8x (20mM)	3,0 ml (SE 160mM)
Imidazol (pH 7.5) (10mM)	240µl (SE 1M)
Cloreto de Sódio (0,5M)	6 ml (SE 2M)
H ₂ O qsp	24 mL
pH 7.4	

Tampão de Eluição

Tampão fosfato 8x (20mM)	1,0 m (SE 160mM)
Imidazol (pH 7.5) (500mM)	4ml (SE 1M)
Cloreto de Sódio (0,5M)	2 ml (SE 2M)
H ₂ O qsp	8 mL
pH 7.4	

II MÉTODOS

1 PREPARO DE BACTÉRIAS COMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO (MÉTODO INOUE)

Material Necessário:

- Linhagem bacteriana de *E. coli* TOP 10 e BL21(DE3)
- Plasmídeo;
- Meios para crescimento bacterianos: meio SOB, meio SOC,
- Tampões e soluções adicionais: Transformation buffer (TB), DMSO.

Procedimento:

1. A partir de uma colônia isolada, inocular 10 mL de Meio SOB;
2. Deixar a 37°C *overnight* num incubador *shaker* a 150 rpm;
3. Transferir os 10 mL da cultura para um erlenmeyer de 1L contendo 90 mL de Meio SOB;
4. Deixar crescer a 18°C por no mínimo 3 horas, com agitação de 100rpm;
Medir a OD a cada 30 minutos após as primeiras 2 horas até atingir uma OD₆₀₀=0,6.
5. Incubar no gelo por 10 minutos.
6. Centrifugar a 2.500 rpm. a 4°C por 10 minutos.
7. Descartar o sobrenadante. Ressuspender as células, gentilmente, em 32 mL de Solução Transformation Buffer (TB) gelado;
8. Centrifugue por 10min a 3500 rpm a 4°C;
9. Retire todo o sobrenadante e secar em papel por 2min.
10. Ressuspender as células gentilmente em 8mL com TB gelado.
11. Adicionar 600µl de DMSO para uma concentração final de 7%.
12. Incubar no gelo por 10 minutos.
13. Aliquotar 200µl em microtubos de 1,5 mL. Congelar imediatamente em nitrogênio líquido.
14. Armazenar em caixa de isopor devidamente identificada à -70°C.
15. Testar a eficiência das células em uma reação de transformação.
16. Usar 0,1 ng de um plasmídeo fechado.

Soluções:

Transformation Buffer (TB).

MnCl₂. 4H₂O -----10.88g (C.F. 55mM)CaCl₂. 2H₂O-----2.20g (C.F. 15mM)

KCl-----18.65g (C.F. 250mM)

MOPS-----200mL (C.F. 50mM)

Diluir para 1L de água deionizada, esterelizar por filtro-esterelização.

Meios:

SOC

Tryptona -----20g/L

Extrato de Levedura-----5g/L

Cloreto de Sódio-----5g/L

Diluir para 1L, esterelizar por autoclavagem.

Após o meio esfriar acrescentar 20mL de Solução de Glicose 1M, filtro-estéril.

2- TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

Células TOP10 e BL21(DE3) competentes foram transformadas com o plasmídeo pQE30-pg-amp1 por choque térmico. Um tubo com alíquotas de 200µL de células competentes de cada linhagem previamente preparado e armazenado em freezer -80° C foi colocado no gelo por 10 minutos. O DNA plasmidial recombinante foi adicionado às bactérias competentes (cerca de 20ng), misturado gentilmente e incubado no gelo por 30 minutos. Em seguida os tubos foram transferidos para o banho a 42°C por 50 segundos. Após esse período foi incubado no gelo por 2 minutos e adicionados 400µL do meio SOC a 37° C. Cada tubo foi incubado no shaker a 37° C, 200rpm por 1,5 horas. Em seguida 200µL de cada cultura foi plaqueado em meio LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37° C *overnight* sem agitação e em seguida armazenadas a 4° C.

3- DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As digestões foram realizadas conforme orientação do fabricante das enzimas.

4 PRECIPITAÇÃO COM TCA

Foi adicionado 133 μ l de ácido tricloroacético (TCA) 75% a 1 mL da amostra contendo o peptídeo. Em seguida foi homogeneizado e incubado no gelo por 30 minutos, após a amostra foi centrifugada durante 15 minutos a 14000rpm, 4^o C. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 1 mL de acetona gelada sobre o *pellet*. Este processo foi repetido duas vezes e o *pellet* final foi ressuspensão em água e armazenado a -20^o C ou ressuspensão em tampão de amostra 6x (aplicação em SDS-PAGE).

5- QUANTIFICAÇÃO POR BRADFORD

O reagente de Bradford foi preparado da seguinte maneira:

Comassie azul brilhante 250G	100mg/L
Dissolver em 50mL de Etanol 95%	
Acrescentar 100mL de Ácido Fosfórico 85%	
Agitar até dissolver, filtrar com papel de filtro	
Completar o volume para 1 litro.	

Armazenar em geladeira em vidro coberto com papel alumínio.

Reação:

Preparar os padrões e calibração da curva-padrão com BSA (1mg/mL), traçar a curva com R² igual ou superior a 98%;

Para quantificar o peptídeo colocar 100 μ L da amostra em 1mL do reagente de Bradford, esperar por 5-10 minutos e ler no espectrofotômetro.

6- COLORAÇÃO DE PROTEÍNAS COM PRATA

1. Fixar o gel em 100mL da Solução de ácido acético por 20 minutos.
2. Lavar o gel 3 vezes em água destilada por 2 minutos.
3. Deixar por 30 minutos em 100mL de solução de nitrato de prata.
4. Lavar o gel bem e rapidamente 3 vezes com água.
5. Colocar 100mL de solução de carbonato de sódio sob agitação até o gel tornar-se amarelado e atingir a intensidade desejada (aproximadamente 10 minutos).
6. Retirar a solução de carbonato de sódio e adicionar a solução de ácido acético para parar a coloração.
7. Cobrir o recipiente para proteger da luz.

Obs.: Utilizar luvas durante os procedimentos para não manchar o gel.

SOLUÇÕES:

- Solução de ácido acético:
 - 10mL de ácido acético P.A
 - 90mL de água.

- Solução de nitrato de prata:
 - 0,05g de AgNO_3
 - 50mL H_2O
 - 75 μL de formaldeído.

- Solução carbonato de sódio:
 - 3g de Na_2CO_3
 - 100mL de H_2O
 - 150 μL de formaldeído
 - 20 μL de Na_2SO_3 30%.

ANEXO B:

Tabela 3: Lista dos aminoácidos, símbolos, abreviações e nomenclatura. (fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Amino%C3%A1cido>)

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Glicina	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe ou Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propionico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propionico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propionico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropionico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropionico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico

ANEXO C: Artigos Publicados: