

BIOLOGIA MOLECULAR

ACH5564-2023

**AULA_10- EXPRESSÃO DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE BACTÉRIA**

Prof. Luiz Paulo Andrioli

METODOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

- A UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS E OUTRAS PROTEÍNAS E MESMO A SUA INDUSTRIALIZAÇÃO, É ANTERIOR AO SURGIMENTO DA BIOLOGIA MOLECULAR;
- MAS..., O ADVENTO DA METODOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE (ENGENHARIA GENÉTICA) ESTABELECEU PATAMARES INÉDITOS...
 - PARA ATENDER DIFERENTES DEMANDAS

METODOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

- OS SEQUENCIAMENTOS GENÔMICOS IDENTIFICAM NOVAS PROTEÍNAS;
- E EXISTE A PERSPECTIVA DO QUE OS “OMICS” SEJAM FONTE DE UM POTENCIAL ENORME PARA NOVAS DESCOBERTAS;
- POTENCIAL “INFINITO” PARA MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS;
- PARA ATENDER NECESSIDADES DA PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA, E/OU, MELHORAR O DESEMPENHO DAS PROTEÍNAS.

BIOTECNOLOGIA

- **PREMISSAS:**
- **PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES ENVOLVE PECULIARIDADES DA PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA, DIFERENTE DAS SITUAÇÕES DOS LABORATÓRIOS DE PESQUISA.**
- **PRODUÇÃO DE PROTEÍNA GERADA A PARTIR DA METODOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE NECESSITA A UTILIZAÇÃO DE UM SISTEMA CELULAR ADEQUADO.**

SISTEMA DE EXPRESSÃO

- SISTEMA CELULAR (CÉLULA HOSPEDEIRA):
 - BACTÉRIAS;
 - LEVEDURA;
 - CÉLULAS ANIMAIS;
 - CÉLULAS VEGETAIS.

SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

- SISTEMA CELULAR (CÉLULA HOSPEDEIRA):
- *Escherichia coli*;
- *Pseudomonas fluorescens* (Gram negativa);
- *Bacillus subtilis* (Gram positiva).

SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

- **VANTAGENS DESTE SISTEMA (*E coli*):**
- FÁCIL MANIPULAÇÃO GENÉTICA;
- GRANDE CONHECIMENTO DO SISTEMA;
- MUITOS RECURSOS TÉCNICOS A DISPOSICÃO;
- BAIXO CUSTO DE PRODUÇÃO;
- GERAÇÃO DE GRANDE QUANTIDADE DE CÉLULAS DE FORMA RÁPIDA EM BIORREATORES;
- VÁRIOS EXEMPLOS BEM SUCEDIDOS.

SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

- **DESAFIOS DESTE SISTEMA:**
- **CONTORNAR AS ESPECIFICIDADES DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EUCARIOTAS**

SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

- **DESAFIOS DESTE SISTEMA:** CONTORNAR AS ESPECIFICIDADES DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EUCARIOTA
- SPLICING (USAR cDNA NA CLONAGEM);
- GLICOSILAÇÃO DIFERENTE NA BACTÉRIA;
- FORMAÇÃO DE PONTES DISSULFETO MUITAS VEZES NÃO É POSSÍVEL OU É INEFICIENTE;
- CLIVAGEM DE PRECURSORES E ADIÇÃO DE LIPÍDEOS NÃO É REALIZADA;
- TAMBÉM A ADIÇÃO DE GRUPOS ACETIL, FOSFATO, SULFATO NÃO É FEITA.

SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

- **DESAFIOS DESTE SISTEMA:** AJUSTES PARA EXPRESSÃO NO SISTEMA CELULAR ESCOLHIDO
- **PREFERÊNCIAS DE CÓDONS (*CODON USAGE*)**
- Assim como a composição de bases (A/T, C/G) é variável entre as espécies, o mesmo se aplica a utilização de códons

Table 3 - Frequency of arginine codon usage for four different species

Codon	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
CGU	38	18	14	8
CGC	40	21	6	19
CGA	6	10	7	11
CGG	10	16	4	22
AGA	4	26	48	20
AGG	2	9	21	20

SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

- PREFERÊNCIAS DE CÓDONS

- A existência de códons pouco usuais na proteína de interesse resulta em quantidade baixa de RNAs carreadores na célula, diminuição da velocidade de tradução, estabilidade e rendimento;

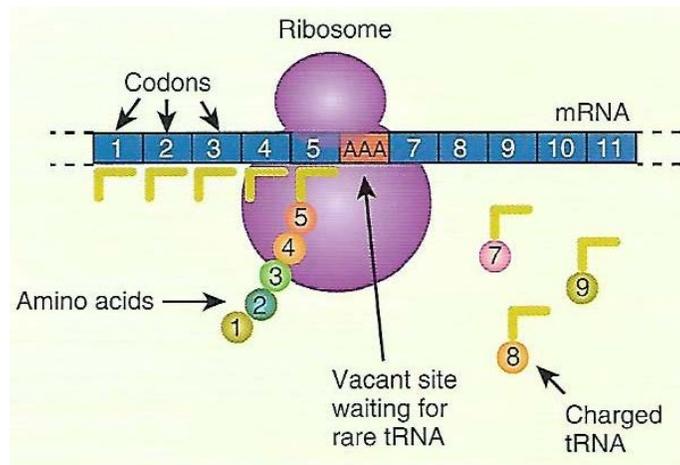


Table 3.5 Increases in gene expression that result from altering the codon usage of the wild-type gene (or cDNA) to more closely correspond to the host *E. coli* cell

Protein	Improvement (fold)
Human interleukin-2	16
<i>Clostridium tetani</i> tetanus toxin fragment C	4
Human cardiac troponin T	10–40
Mouse c-FOS protein	>200
Spinach plastocyanin	1.2
Human neurofibromin	3
Human glutathione transferase M2-2	140
Human phosphatidylcholine transfer protein	>100
Human interleukin-6	3
Human interleukin-18	5
<i>Plasmodium</i> vaccine candidate antigen	4

- Em algumas situações é necessário alterar códons da sequência de interesse, ajustando para códons preferenciais do sistema celular utilizado.

SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

FUNDAMENTAL:

- PLANEJAR A CLONAGEM LEVANDO EM CONTA AS MODIFICAÇÕES DE PROTEÍNAS EUCARIOTAS

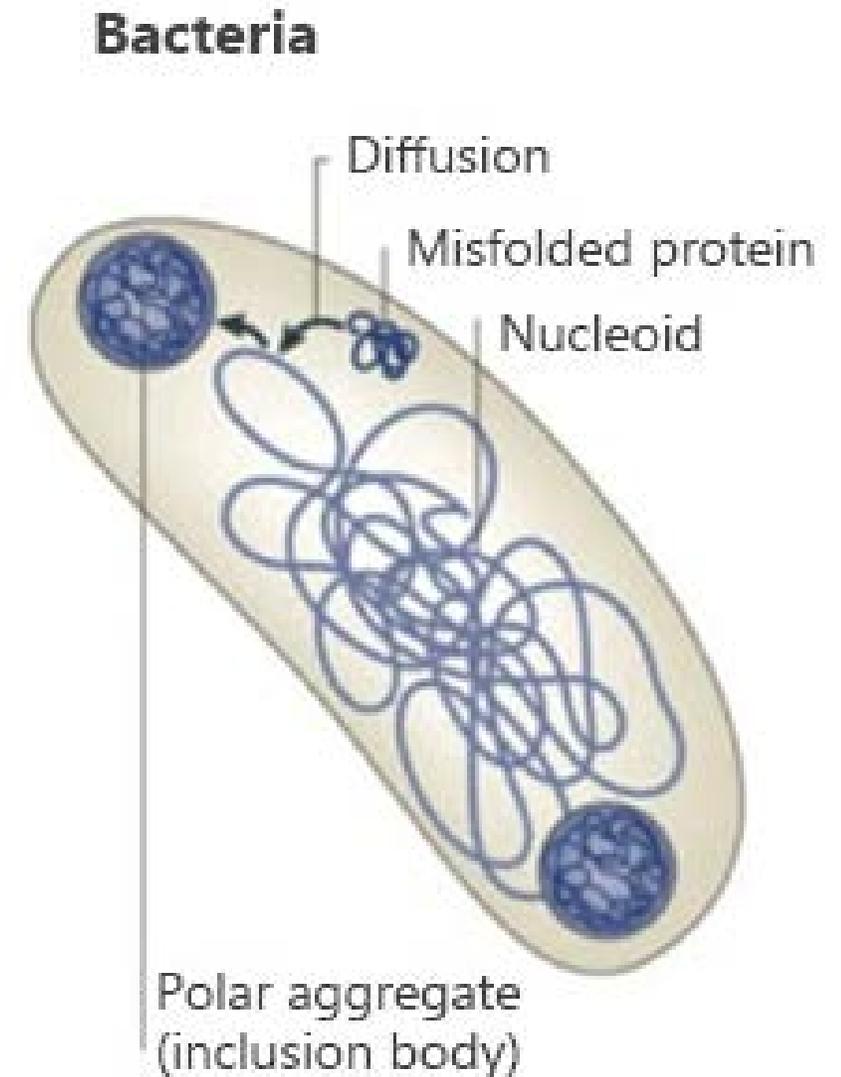
SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

- **DESAFIOS DESTE SISTEMA:**
- **GERAR PROTEÍNA EM GRANDE QUANTIDADE NA FORMA SOLÚVEL E ATIVA**

VETOR EXPRESSÃO

•CORPO DE INCLUSÃO

- Defesa da bactéria que isola proteínas com conformação errada em partículas no citoplasma, como é o caso das proteínas recombinantes expressas rapidamente e em grande concentração, muitas vezes sem atingirem a conformação adequada.



SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

- **DESAFIOS DESTE SISTEMA:**
 - ALÉM DISSO, PODEM SURGIR PROBLEMAS NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NÃO PREVISTOS, POR EXEMPLO:

SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTÉRIA

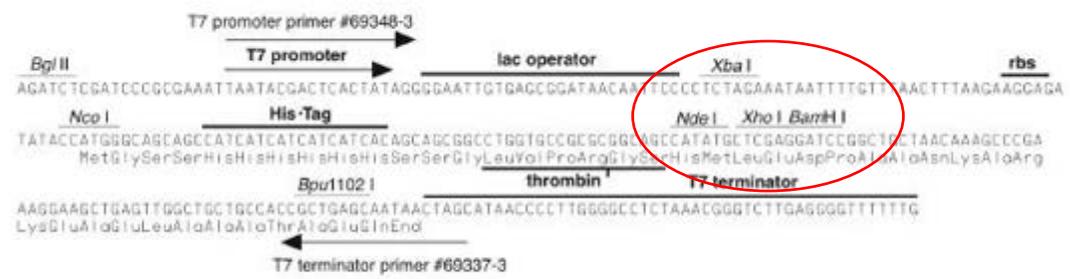
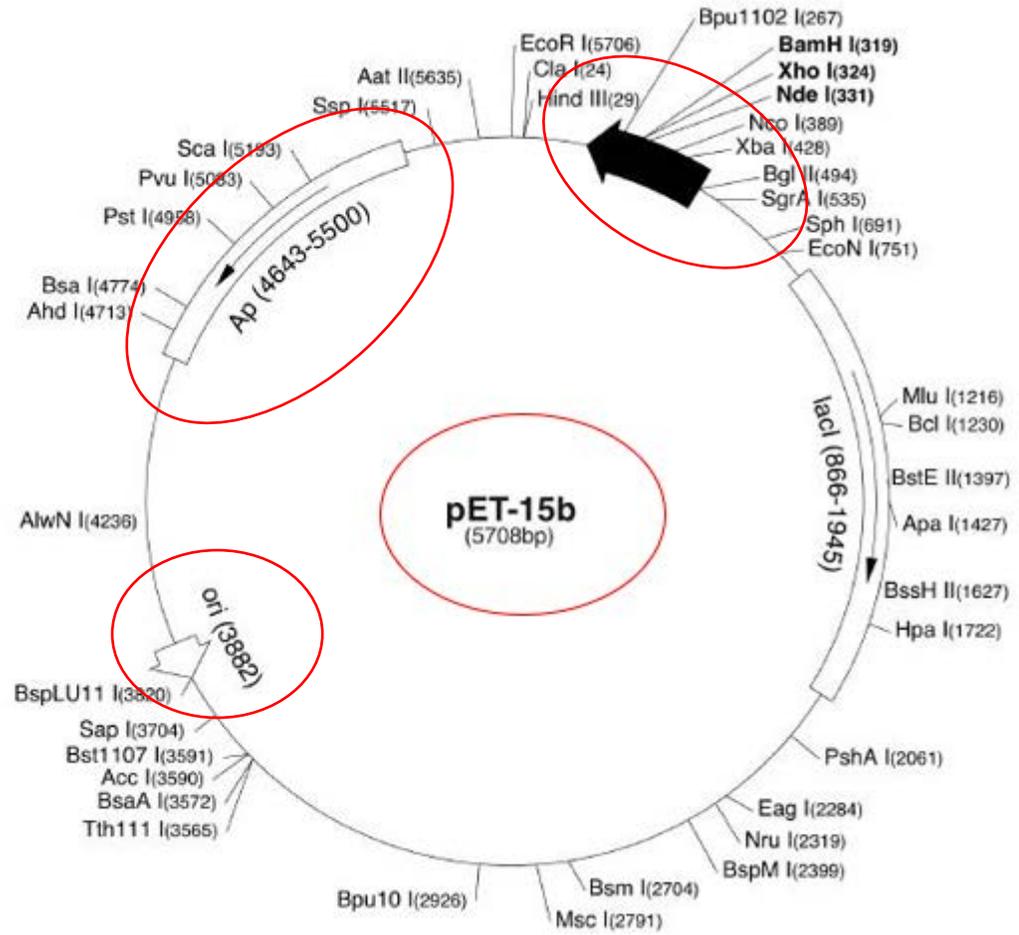
- **DESAFIOS DESTE SISTEMA:**
- ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS RNAm;
- INSTABILIDADE DA PROTEÍNA;
- TOXICIDADE DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA.

VETOR EXPRESSÃO

- PLASMÍDEO
- ORIGEM DE REPLICAÇÃO;
- RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICO;
- SÍTIOS DE CLONAGEM.

VETOR EXPRESSÃO

pET-15b sequence landmarks	
T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His-Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



VETOR EXPRESSÃO

- O vetor de expressão oferece menores possibilidades de clonagem (menos opções de sítios de clonagem):

Por que menos opções para a clonagem?

- Porque o cDNA de interesse precisa ser clonado em fase de leitura correta para gerar a proteína esperada e/ou, pela proteína recombinante ser muitas vezes uma proteína de fusão.

VETOR EXPRESSÃO

- **cDNA (DNA complementar):** Molécula de DNA sintetizada no laboratório a partir da sequência de um RNAm;
- Na prática, não precisa realizar esse experimento!;
- Trabalha-se com as sequências gênicas (quando já conhecidas).

VETOR EXPRESSÃO

- MUITO CUIDADO NESSA HORA!
- CLONAGEM DE cDNA
- ESPECIALMENTE EM VETOR DE EXPRESSÃO PARA BACTÉRIA, SIGNIFICA...
- ... REGIÃO CODIFICADORA!
 - START CODON – STOP CODON

VETOR EXPRESSÃO

- Clonagem em fase de leitura:

Nde I

5'...CATATG...3'
3'...GTATAC...5'

CGC GGC AGC CAT ATG CTC GAG
GCG CCG TCG GTA TAC GAG CTC
Arg Ser Gly His Met Leu Glu

CGCCCCACATCCAT ATG CAG TCG
GCGGGGTGTAG GTA TAC GTC AGC
Met Glu Ser



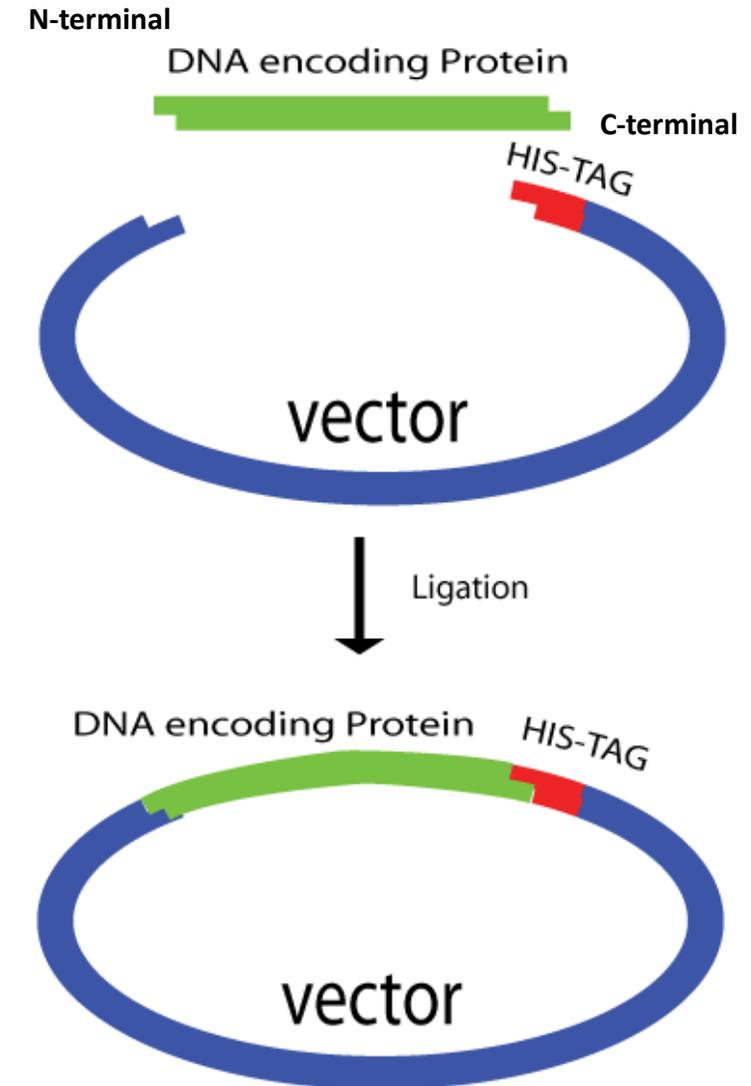
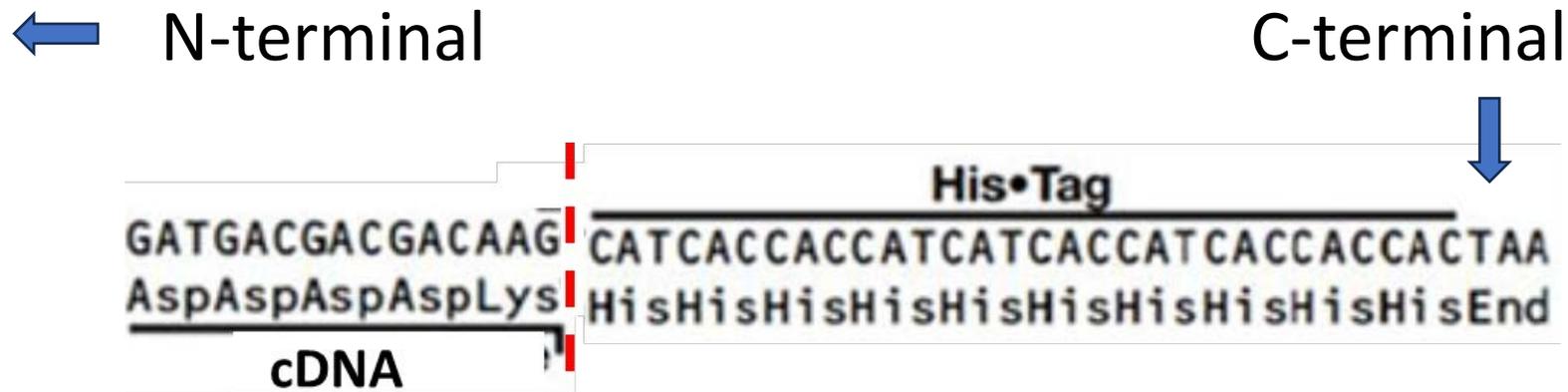
CGC GGC AGC CAT ATG CAG TCG
Arg Ser Gly His Met Glu Ser

VETOR EXPRESSÃO

- **Proteína de fusão:** Proteína híbrida que consiste de pelo menos dois domínios, naturalmente codificados separadamente, mas que foram juntados para transcrever e traduzir como uma unidade única, gerando uma cadeia polipeptídica.

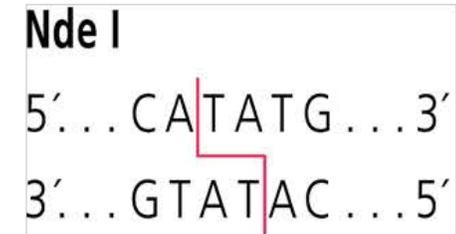
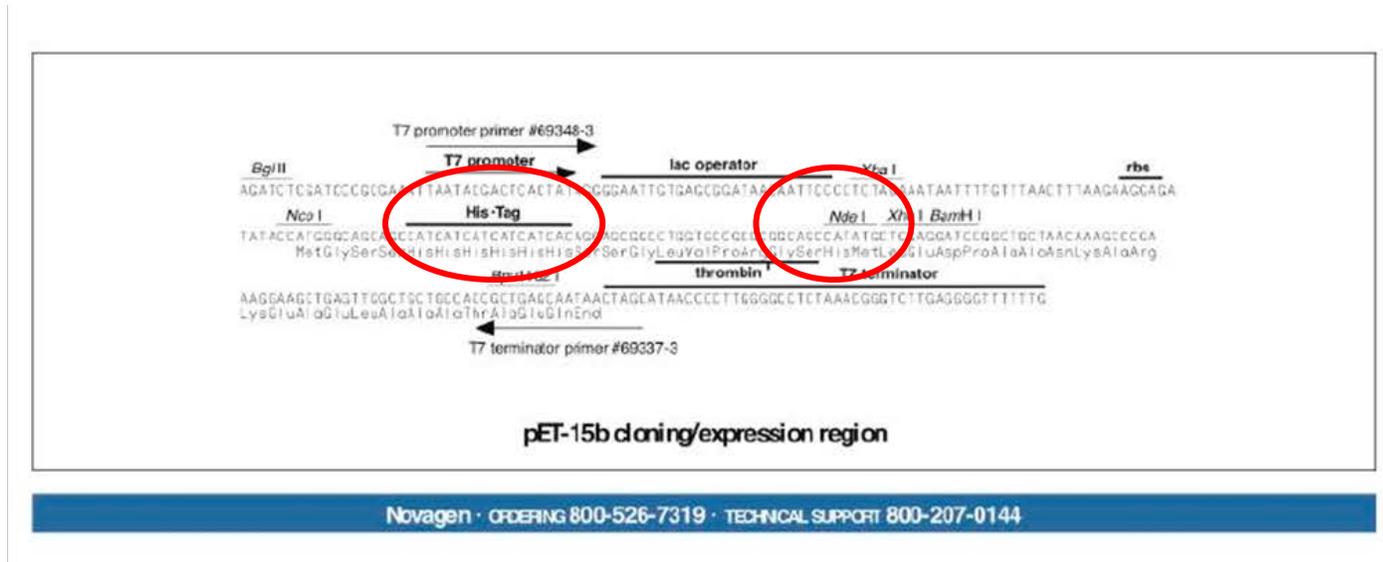
VETOR EXPRESSÃO

- Um domínio é composto pelo cDNA de interesse e o outro está presente no vetor (em geral contíguo a um dos sítios de clonagem).



VETOR EXPRESSÃO

- Clonagem em fase de leitura:



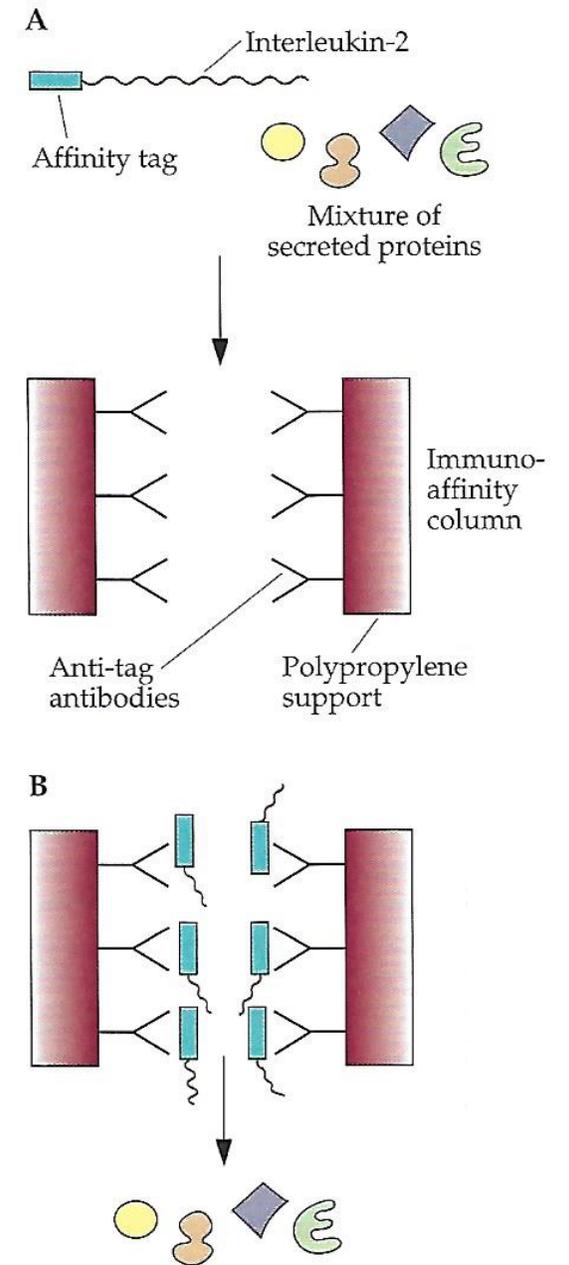
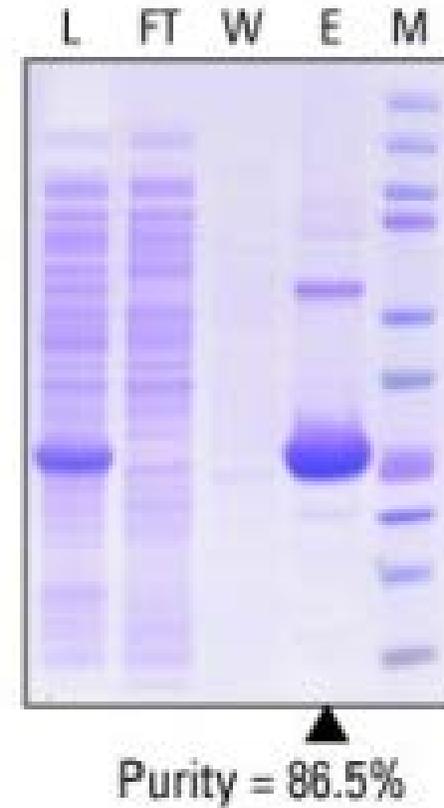
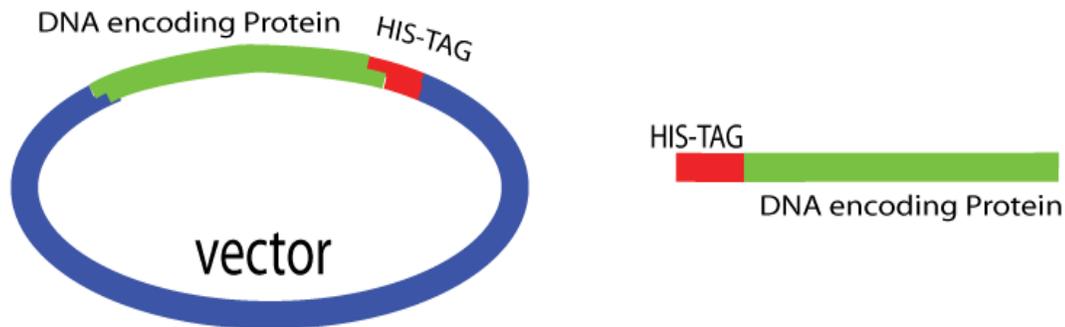
CGC GGC AGC **CAT ATG** CTC GAG CGCCCCACATC**CAT ATG** CAG TCG
 Arg Ser Gly His Met Leu Glu Met Glu Ser



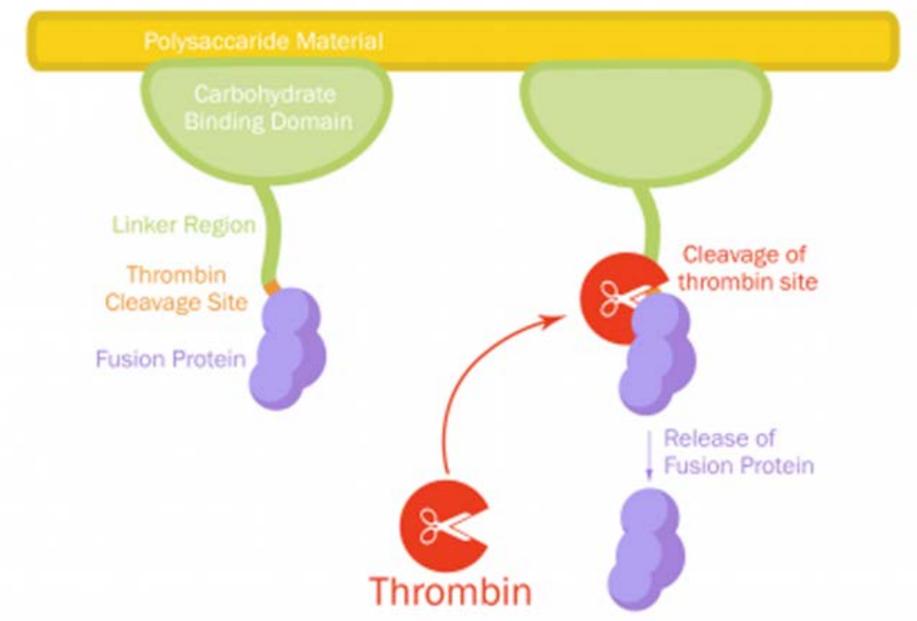
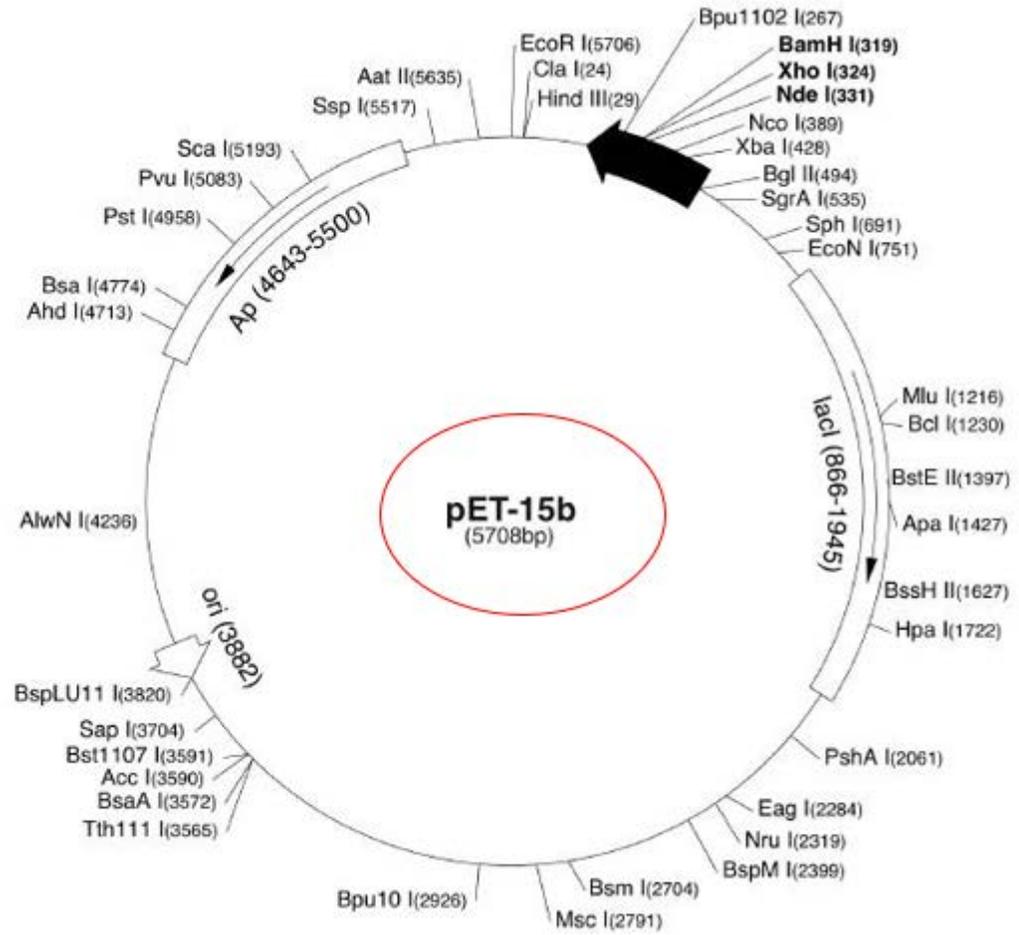
CGC GGC AGC **CAT ATG** CAG TCG
 Arg Ser Gly His Met Glu Ser

VETOR EXPRESSÃO

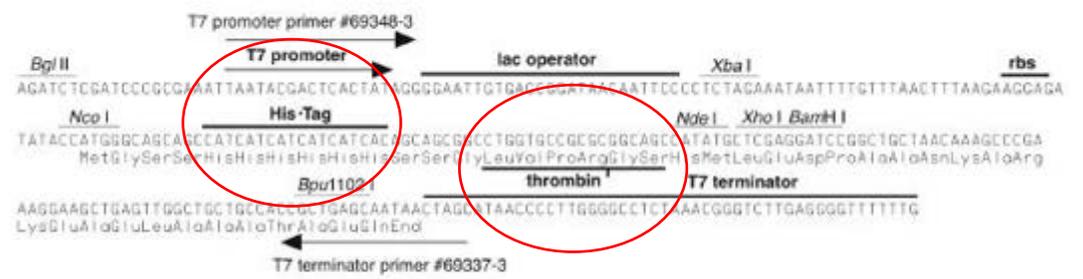
PROTEÍNA DE FUSÃO/ PURIFICAÇÃO



pET-15b sequence landmarks	
T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His-Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



VETOR EXPRESSÃO



pET-15b cloning/expression region

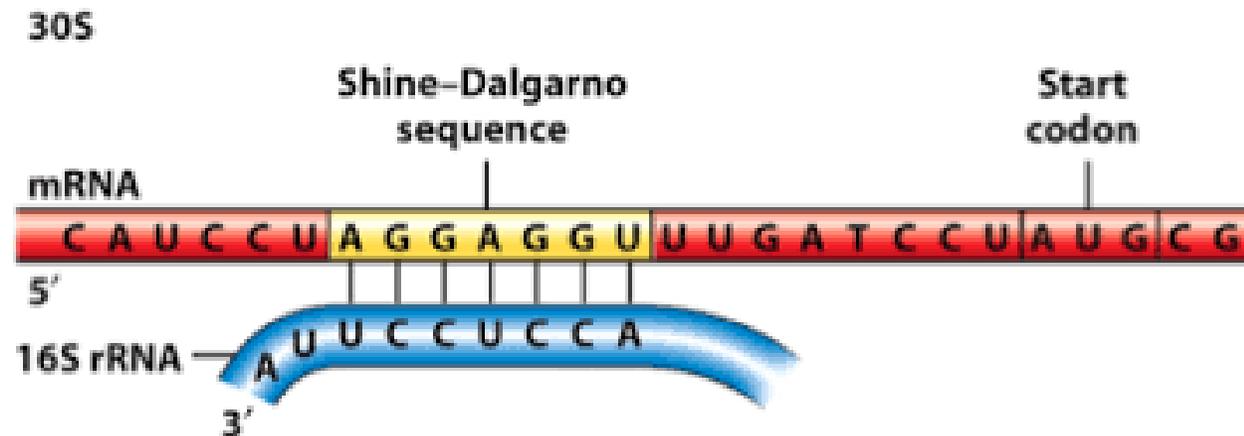
VETOR EXPRESSÃO

- O vetor de expressão é diferente de um vetor carreador (transportador);
- Apresenta características próprias e recursos para a expressão de proteína recombinante que um vetor transportador não possui;
- Outras características:

VETOR EXPRESSÃO

CARACTERÍSTICAS DO PLASMÍDEO:

- TRADUÇÃO EFICIENTE/ OTIMIZADA



- Quanto mais próximo da sequência consenso de Shine-Dalgarno (sequência de ligação do RNAm no RNAr 16S da subunidade menor do ribossomo) e da distância ideal dessa sequência para o códon iniciador (~6- 8pb), melhor é a tradução.

VETOR EXPRESSÃO

CARACTERÍSTICAS DO PLASMÍDEO:

- PROMOTOR FORTE

- Promotor forte é aquele que apresenta alta afinidade para uma RNA polimerase, e elevada taxa de transcrição.
- Portanto, com a presença de um promotor forte e da SSD, maior será o rendimento para obtenção da proteína recombinante.

VETOR EXPRESSÃO

CARACTERÍSTICAS DO PLASMÍDEO:

- TÉRMINO DE TRANSCRIÇÃO FORTE
- Utilização de sequências de término de transcrição eficientes;
- Que evitem a transcrição em regiões do plasmídeos, consumo de energia desnecessário;
- Alguns vetores apresentam essas sequências em duplicata.

VETOR EXPRESSÃO

CARACTERÍSTICAS DO PLASMÍDEO:

- EXPRESSÃO CONSTITUTIVA

- Não é desejável porque;
- A expressão constitutiva drena gastos celulares e prejudica funções vitais como a proliferação;
- Instabilidade da clonagem em grande culturas;
- Geração de produtos tóxicos que matam a célula.

VETOR EXPRESSÃO

CARACTERÍSTICAS DO PLASMÍDEO:

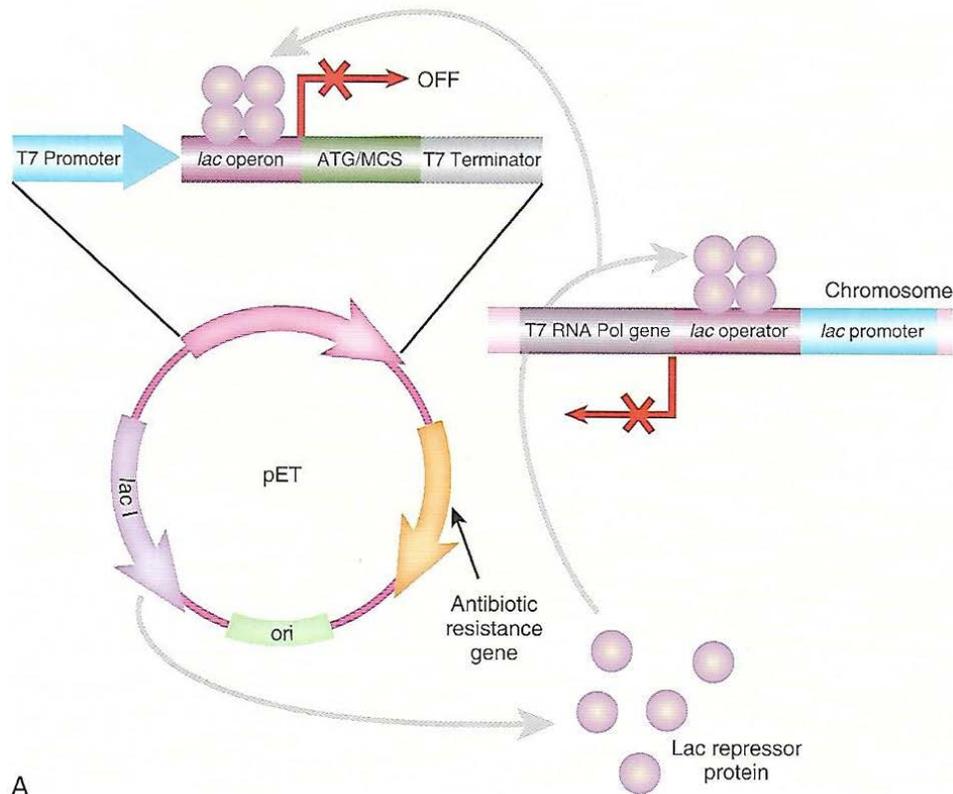
- EXPRESSÃO INDUZÍVEL
- É desejável porque:
- Permite controlar o momento de expressão da proteína recombinante.

VETOR EXPRESSÃO

CARACTERÍSTICAS DO PLASMÍDEO:

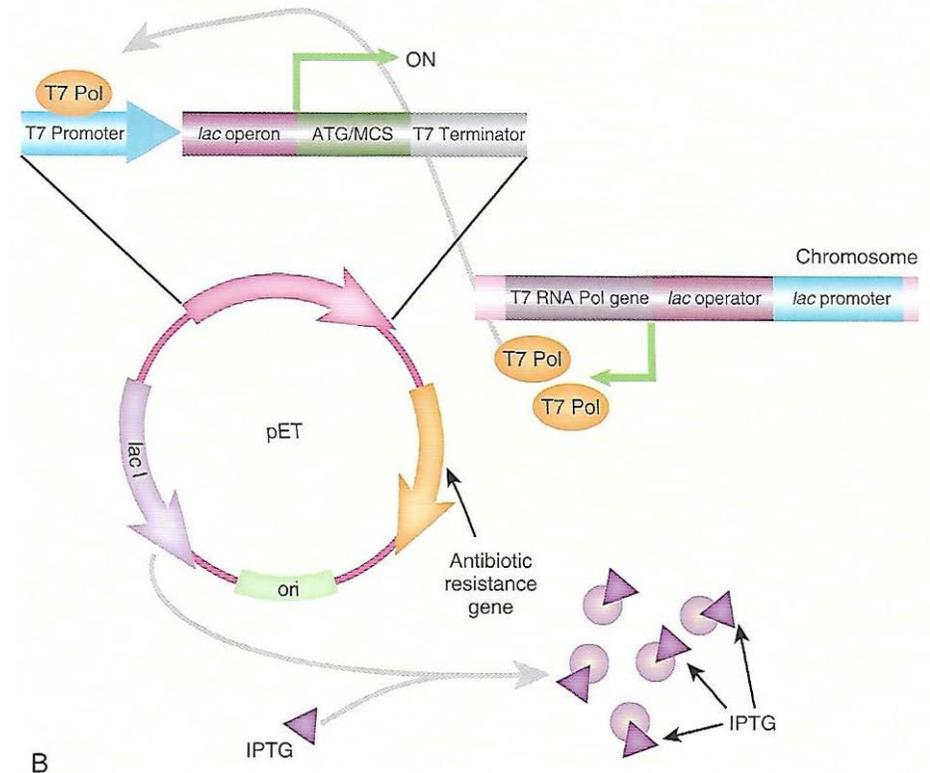
- EXPRESSÃO INDUZÍVEL
- O gene para a RNA polimerase do bacteriófago T7 está integrado no genoma da hospedeira e sob controle do promotor e operador *lacZ*.

NO RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION



A

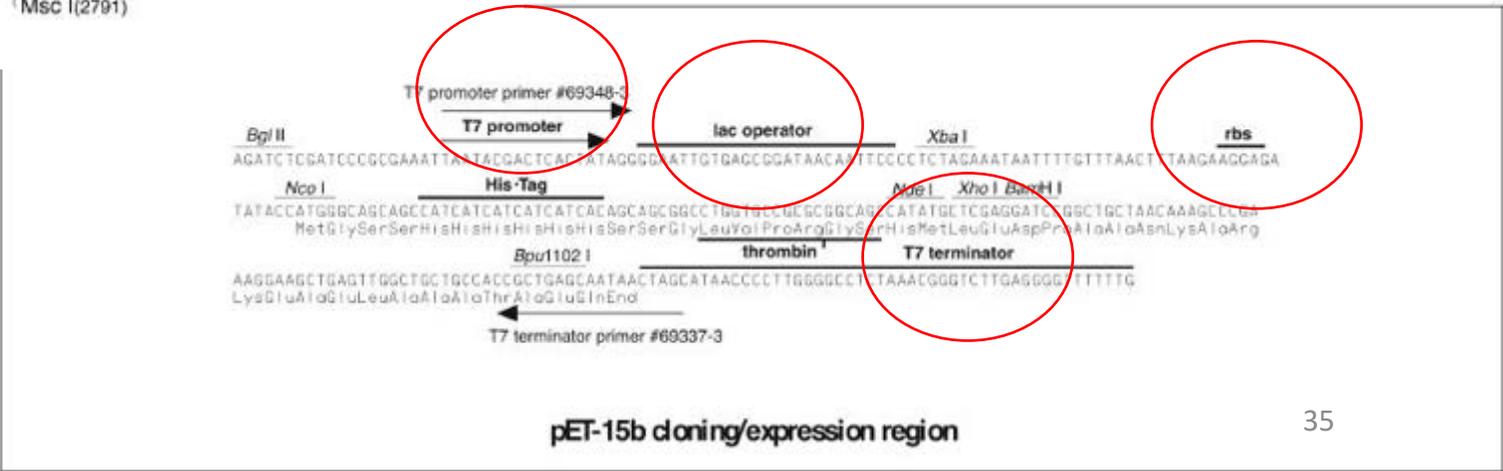
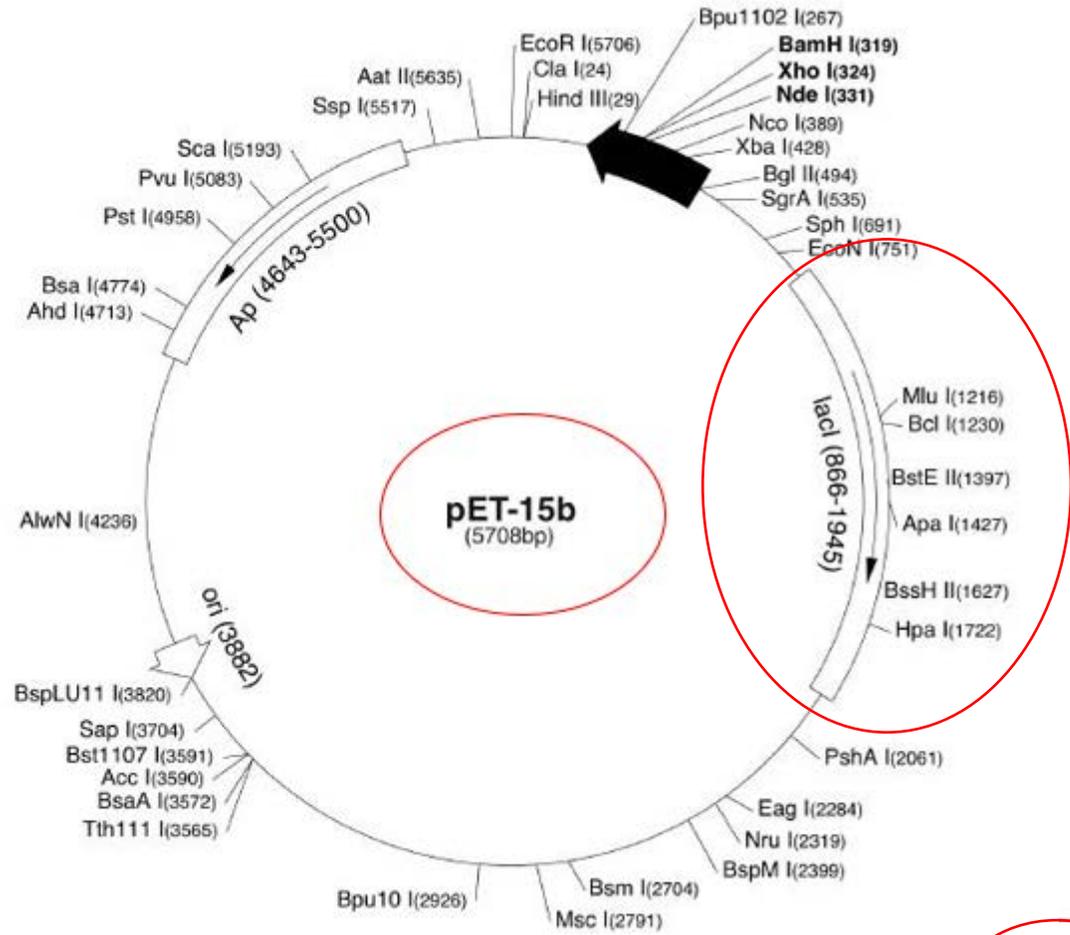
RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION



B

VETOR EXPRESSÃO

pET-15b sequence landmarks	
T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His-Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence (866-1945)	
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



EXPRESSÃO BACTÉRIA

DESAFIO CONTÍNUO BIOTECNOLOGIA
(PRODUÇÃO EM GRANDE ESCALA)

- A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE PODE SER UMA EMPREITADA MUITO DESAFIADORA...

EXPRESSÃO BACTÉRIA

DESAFIO CONTÍNUO BIOTECNOLOGIA
(PRODUÇÃO EM GRANDE ESCALA)

- PLASMÍDEO “HIGH-COPY-NUMBER”

INSTÁVEL EM CULTURAS DENSAS NA ESCALA INDUSTRIAL

EXPRESSÃO BACTÉRIA

DESAFIO CONTÍNUO BIOTECNOLOGIA
(PRODUÇÃO EM GRANDE ESCALA)

- PLASMÍDEOS RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICO

ANTIBIÓTICOS SÃO INSUMOS CAROS EM ESCALA INDUSTRIAL

EXPRESSÃO BACTÉRIA

DESAFIO CONTÍNUO BIOTECNOLOGIA
(PRODUÇÃO EM GRANDE ESCALA)

- INTEGRAR O GENE NO CROMOSSOMO CELULAR

DIMINUI O NÚMERO DE CÓPIAS GÊNICAS

EXPRESSÃO BACTÉRIA

DESAFIO CONTÍNUO BIOTECNOLOGIA
(PRODUÇÃO EM GRANDE ESCALA)

- INTEGRAR MÚLTIPLAS CÓPIAS GÊNICAS EM TANDEM

INSTABILIDADE DEVIDO A RECOMBINAÇÃO DE DNA ENTRE
SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS...

VETOR EXPRESSÃO

- A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES É UMA ABORDAGEM DE TENTATIVA E ERRO;
- É PARTICULAR DE CADA PROTEÍNA;
- NO ENTANTO, MUITAS VEZES, É POSSÍVEL DE SER VIABILIZADA OU OTIMIZADA

VETOR EXPRESSÃO

EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE:

- A EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM BACTÉRIA, DE FORMA CONSTITUTIVA OU INDUZÍVEL;
- REALIZADA DE FORMA RÁPIDA E EM GRANDE QUANTIDADE, PODE LEVAR A FORMAÇÃO DE CORPO DE INCLUSÃO.

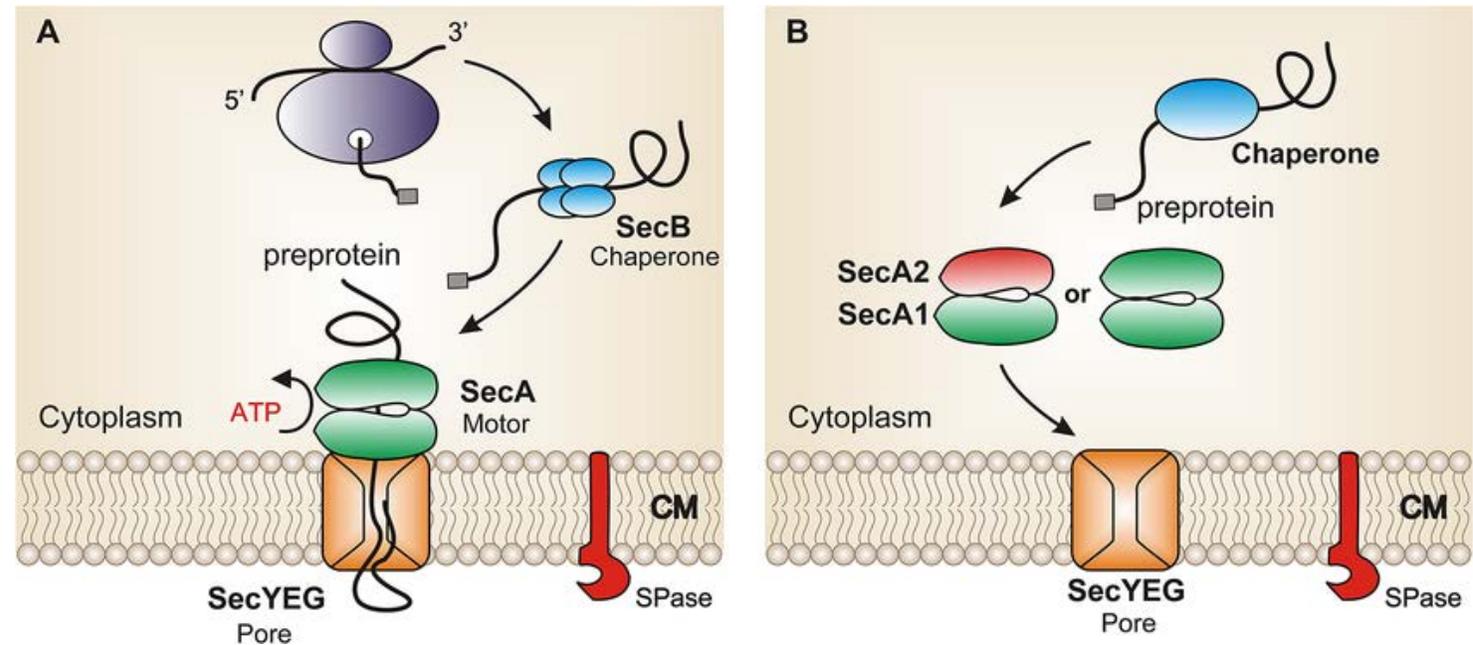
VETOR EXPRESSÃO

EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE:

- MAS, PODEM SER CONTORNÁVEIS COM PEQUENAS ALTERAÇÕES
- POR VEZES, DIMINUINDO O NÍVEL DE INDUÇÃO;
- DIMINUINDO A TEMPERATURA DE CRESCIMENTO;
- USANDO BACTÉRIA EXPRESSANDO CHAPERONINA;
- PODEM SER MEDIDAS SUFICIENTES PARA ALCANÇAR BONS RESULTADOS!

VETOR EXPRESSÃO

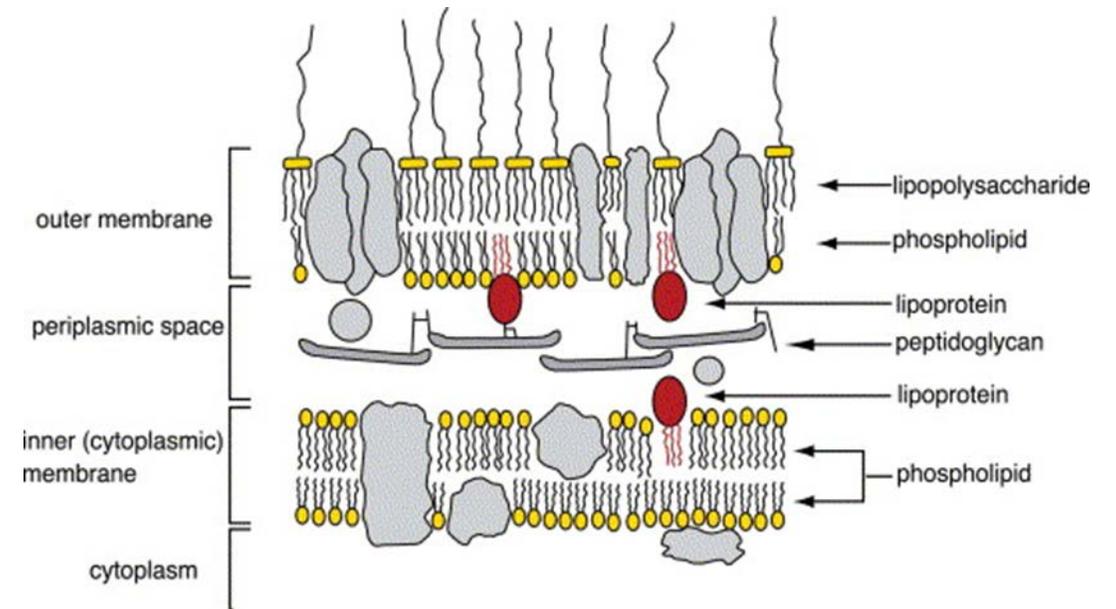
SECREÇÃO



- A E coli TEM SISTEMAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANAS;
- SECREÇÃO P/ O MEIO É INCOMUM EM E. coli;
- MAS ALGUMAS PROTEÍNAS FORAM IDENTIFICADAS, E PODEM SER UTILIZADAS EM FUSÃO.

VETOR EXPRESSÃO

SECREÇÃO

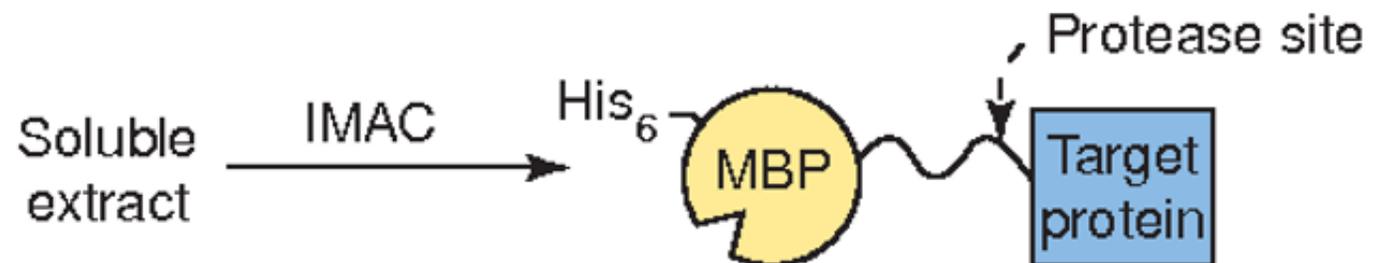


- A SECREÇÃO DE PROTEÍNAS PARA O ESPAÇO PERIPLASMÁTICO OU PARA O MEIO EXTERNO PODE:
- FACILITAR O ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO;
- CONFERIR ESTABILIDADE PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE.

VETOR EXPRESSÃO

EXEMPLO:

- PROTEÍNA DE FUSÃO CONTENDO TODA PROTEÍNA LIGADORA DE MALTOSE;
- EVITA DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNA PELA BACTÉRIA;
- DIRECIONA PARA O PERIPLASMA;
- QUE É UM AMBIENTE POSSÍVEL DE FORMAÇÃO DE PONTES DISSULFETO.



ENGENHARIA GENÉTICA

MUITAS VEZES, NOS PROCEDIMENTOS MENCIONADOS, É NECESSÁRIO OTIMIZAR A PROTEÍNA:

- MUTAÇÃO
 - SÍTIO DIRIGIDA
 - RANDÔMICA

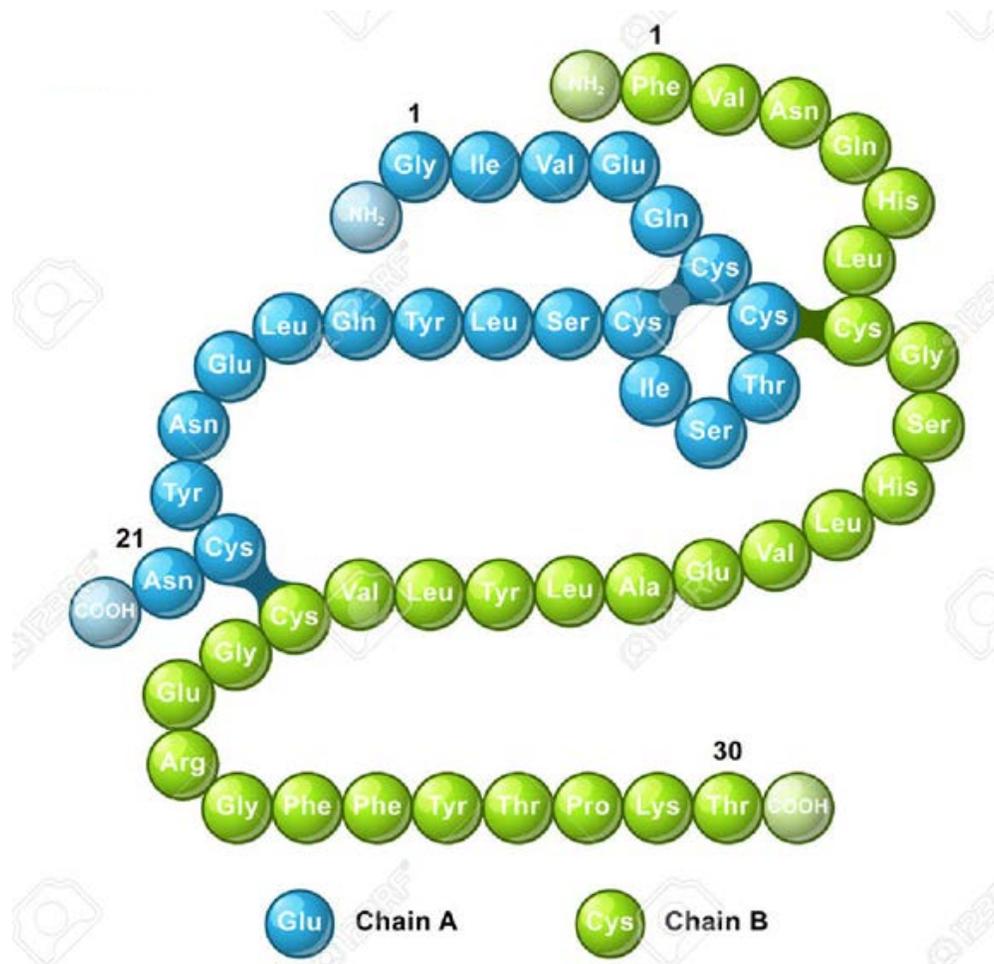
- TÉCNICAS
 - PCR
 - SÍNTESE QUÍMICA

INSULINA, UM EXEMPLO

- NA DIABETES, O PACIENTE ACUMULA GLICOSE NO SANGUE;
- UMA DAS CAUSAS É A DEFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE INSULINA;
- NESSE CASO EXISTE A POSSIBILIDADE DE SUPLEMENTAR O PACIENTE COM INJEÇÕES DE INSULINA;
- ATUALMENTE, A INSULINA UTILIZADA É DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.

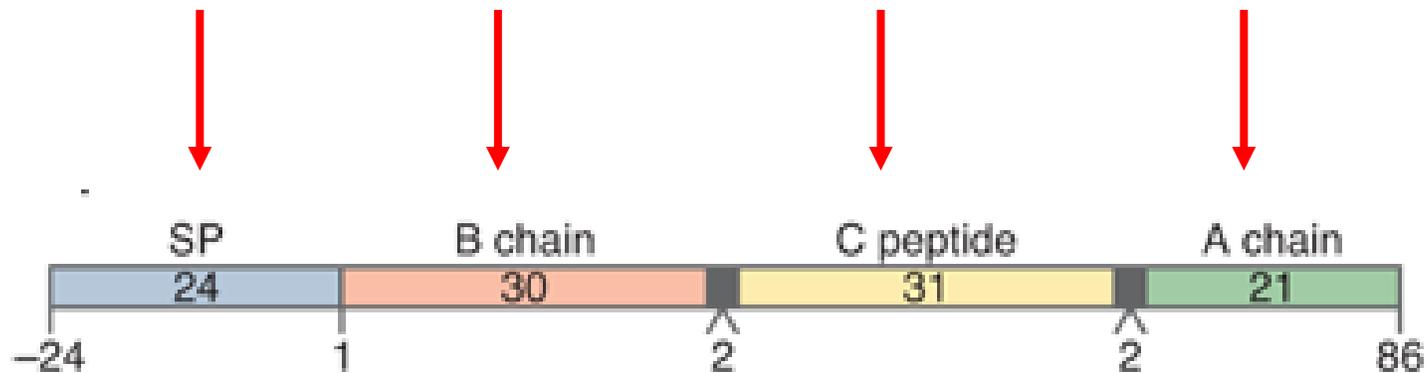
INSULINA, UM EXEMPLO

- INSULINA FUNCIONAL É FORMADA POR DUAS CADEIAS, A e B, LIGADAS POR PONTES DISSULFETO



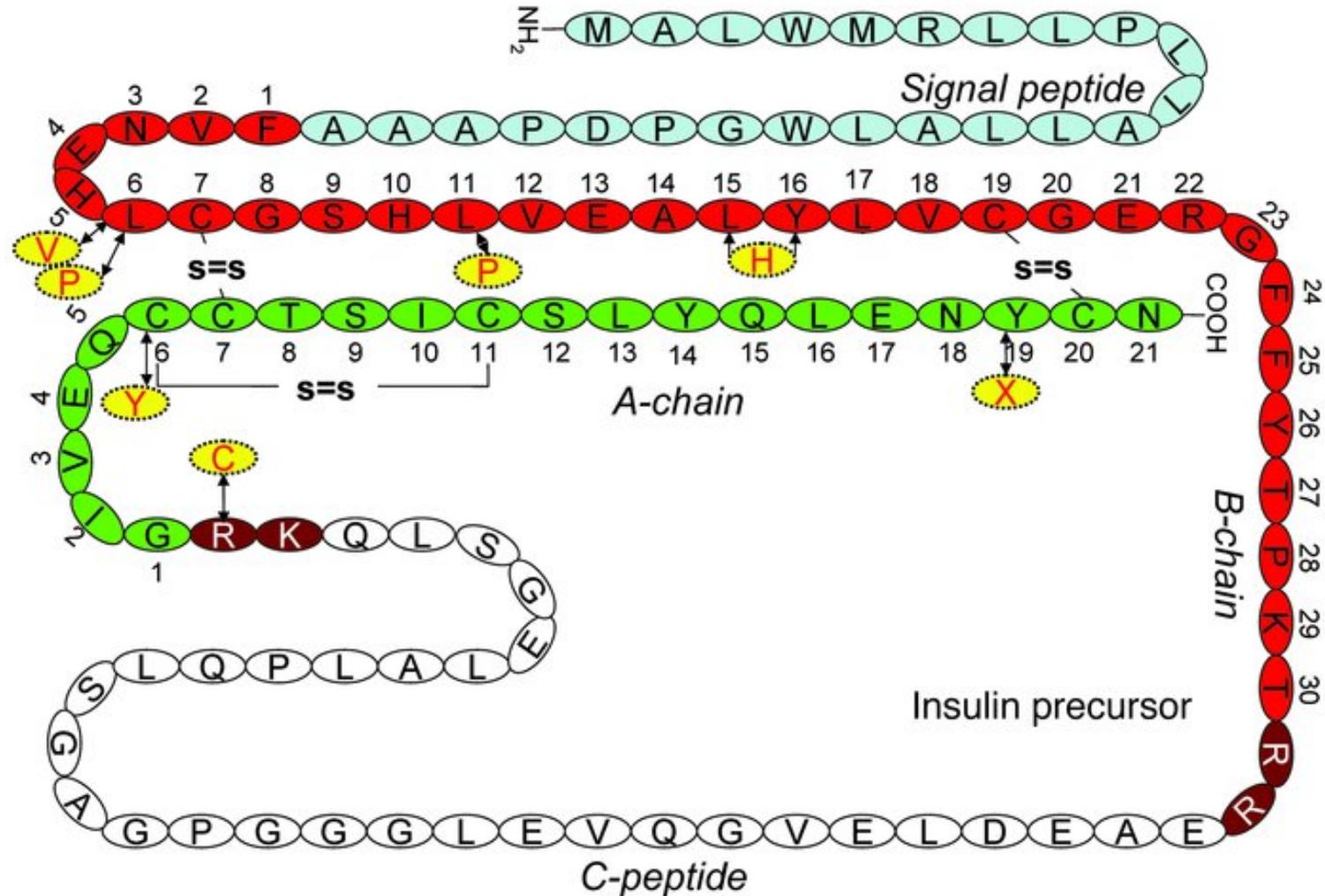
INSULINA, UM EXEMPLO

- AS DUAS CADEIAS FAZEM PARTE DO MESMO POLIPEPTÍDEO (TRANSCRITO POR UM ÚNICO GENE);
- AS CADEIAS A e B ESTÃO LIGADAS PELO PEPTÍDEO C (PEPTÍDEO DE CONEXÃO);
- NA REGIÃO N-TERMINAL AINDA ESTÁ PRESENTE UMA SEQUÊNCIA SINAL (PARA A SECREÇÃO);
- ESSE PRODUTO INICIAL DO GENE É A PREPROINSULINA, QUE SERÁ PROGRESSIVAMENTE PROCESSADA.



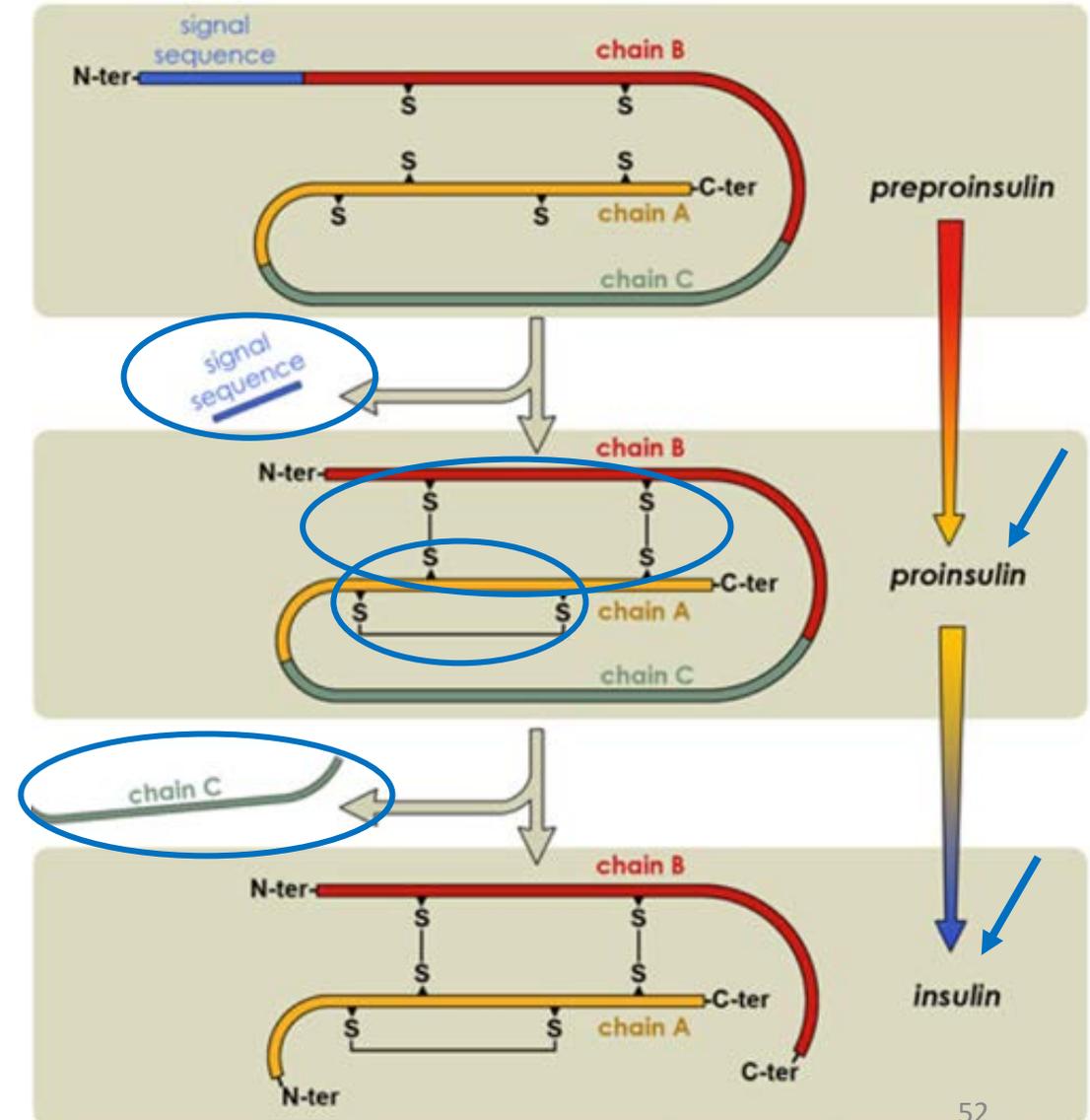
INSULINA, UM EXEMPLO

- PREPROINSULINA



INSULINA, UM EXEMPLO

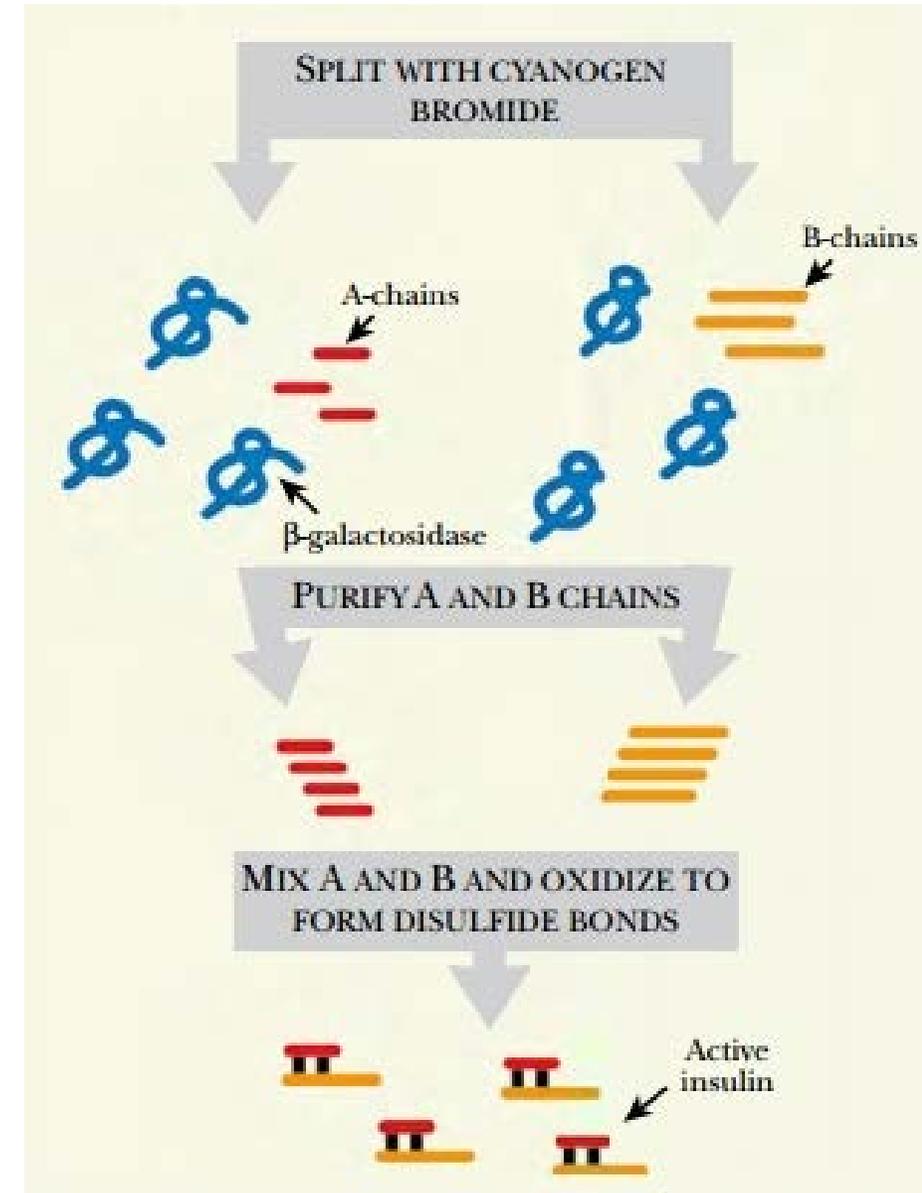
- NA ROTA DE SECREÇÃO O PEPTÍDEO SINAL É CLIVADO, GERANDO A PROINSULINA;
- PONTES DISSULFETO SÃO FORMADAS ENTRE AS CADEIAS;
- A PROINSULINA É CLIVADA POR UMA ENDO PEPTIDASE LIBERANDO A CADEIA C, E GERANDO A INSULINA;
- RESÍDUOS TERMINAIS R e K TAMBÉM SÃO REMOVIDOS DA PROTEÍNA.



INSULINA, UM EXEMPLO

ABORDAGEM INICIAL:

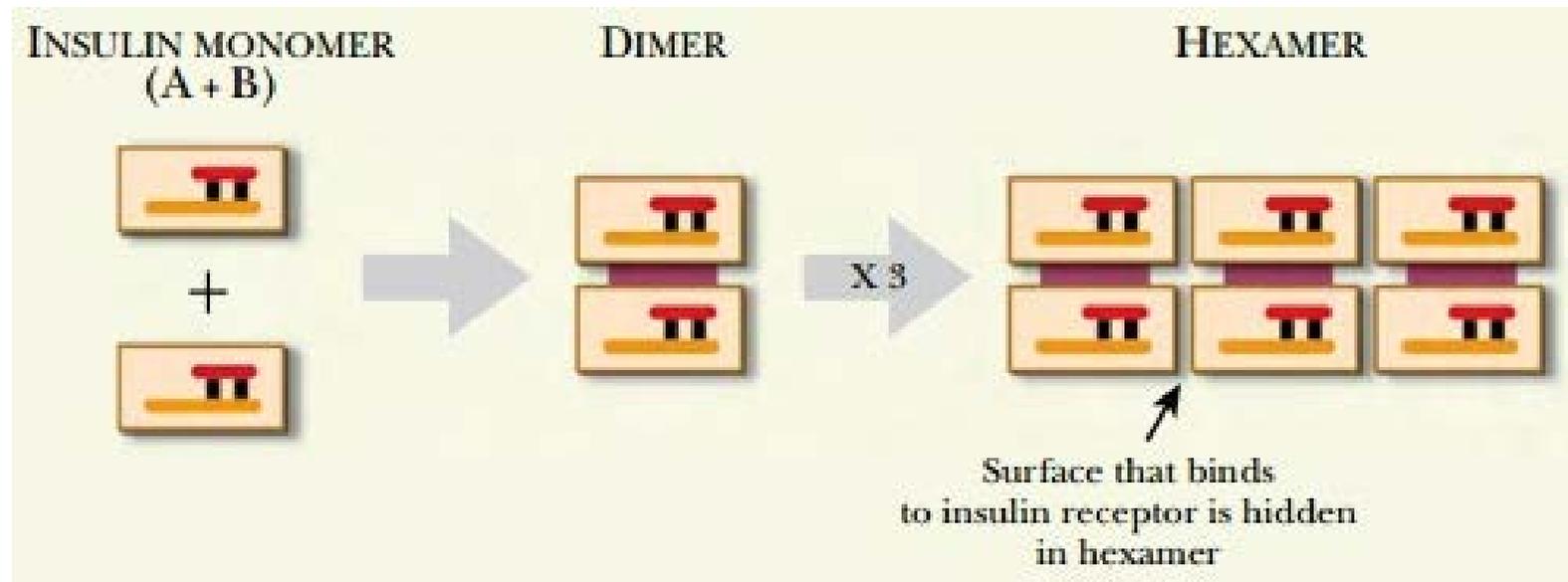
- CLONAR DOIS MINIGENES;
- TRANSFORMAR CADA UM DELES SEPARADAMENTE;
- APÓS EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO, AS CADEIAS SÃO MISTURADAS;
- TRATADAS QUIMICAMENTE PARA FORMAÇÃO DAS PONTES DISSULFETO;



INSULINA, UM EXEMPLO

PROBLEMA DA ABORDAGEM INICIAL:

- TENDÊNCIA DA INSULINA SE AGREGAR;
- FORMAÇÃO DE AGREGADOS E OBSTRUÇÃO DE INTERAÇÃO COM RECEPTOR;
- E APESAR DE OCORRER DISSOCIAÇÃO NO ORGANISMO, ELA É LENTA, LEVANDO VÁRIAS HS PARA DIMINUIR GLICOSE NO SANGUE.



INSULINA, UM EXEMPLO

ABORDAGEM SEGUINTE:

- ALTERAÇÃO DE RESÍDUOS QUE FAVORECIAM A AGREGAÇÃO POR RESÍDUOS QUE A IMPEDEM;
- ESTRATÉGIA DE ADIÇÃO DE RESÍDUOS LENTIFICA PROCESAMENTO E FAVORECE ABSORÇÃO RÁPIDA INDICADADA PARA DIABETES TIPO I.

