

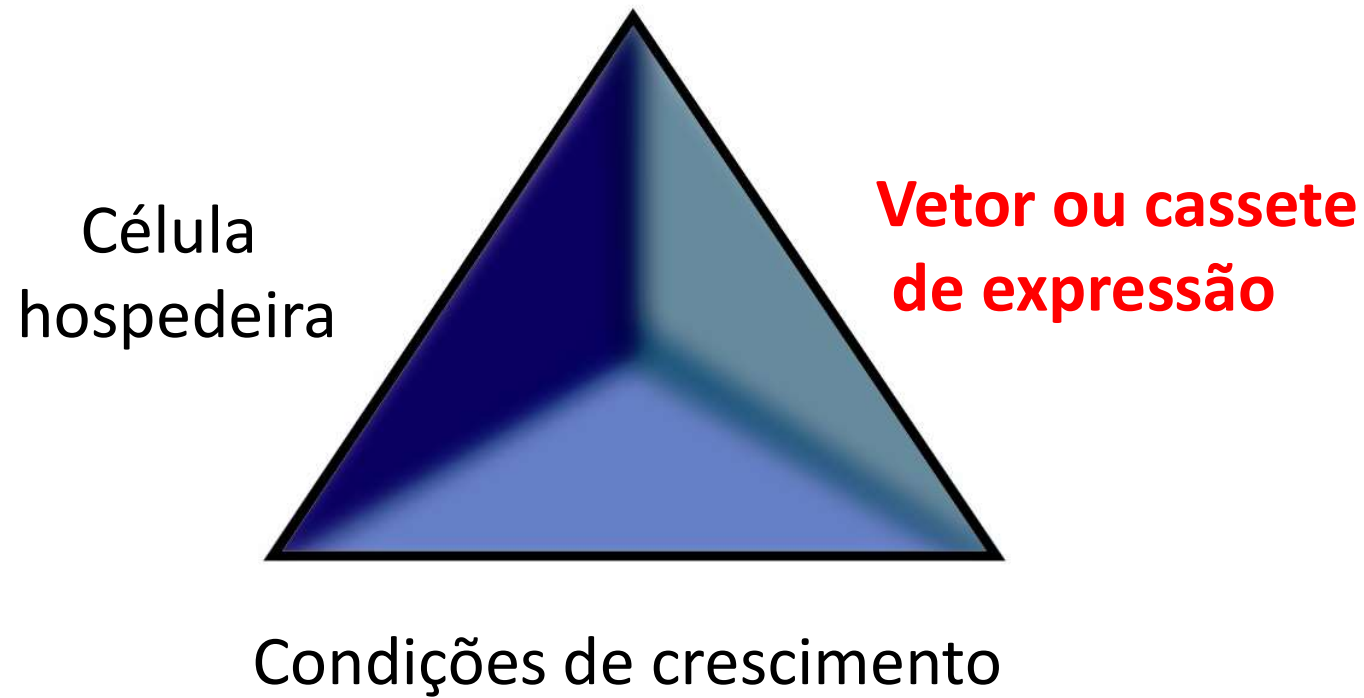


# Proteínas Recombinantes – Clonagem e Vetores de Expressão

Aulas 3 e 4

## Objetivo da Aula

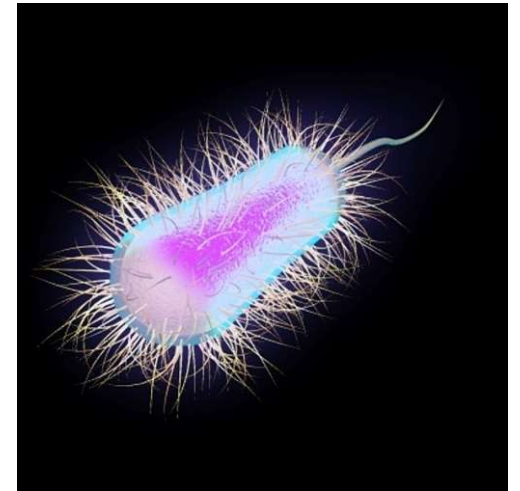
No contexto da produção de proteínas recombinantes, conhecer as etapas de clonagem e expressão usando-se *E coli* como sistema de expressão.



Fonte: Adaptado de Finkbeiner, M. (2009)

## A *E. coli* como Sistema de Expressão de rProteínas

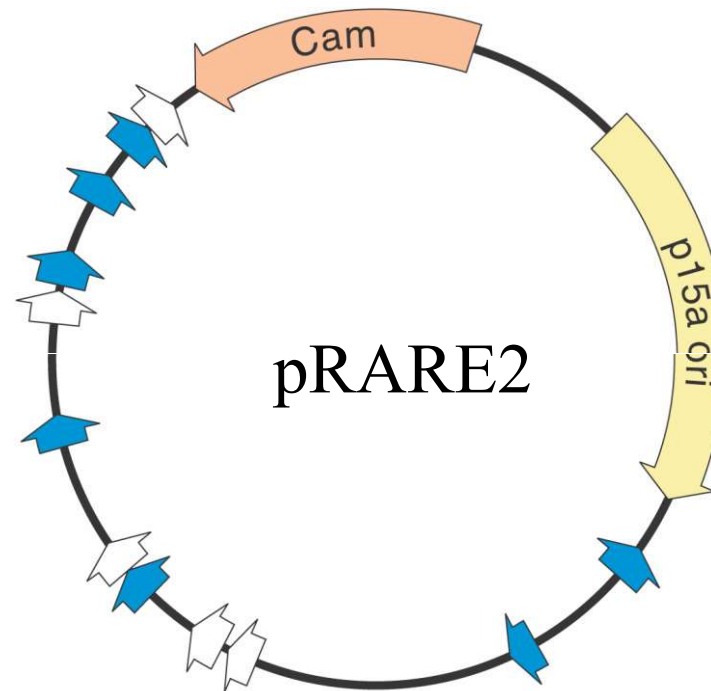
- Amplamente estudada do ponto de vista biológico
- Linhagens seguras (não patogênicas)
- Rápido crescimento a baixo custo
- Mutantes próprios para expressão de rProteínas
  - Deficientes em proteases
  - Próprias para códons raros (tRNAs)
  - Sistema redox modificado
  - Controle rígido sobre a expressão
  - Manutenção plasmidial sem o uso de antibióticos



# 1. Linhagens próprias para proteínas de organismos Eucariotos (códon raros)

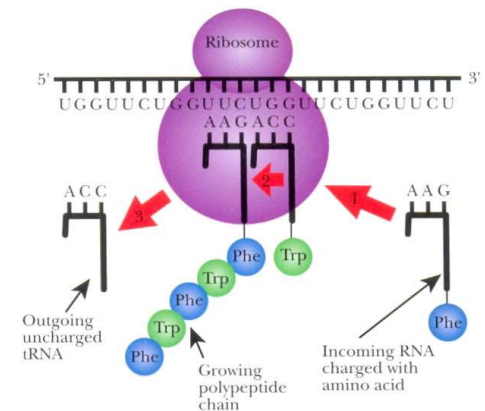
Table 1. Arg, Gly, Ile, Leu and Pro codon usage in *E. coli*

amino acid	codon	fraction in all genes	fraction in Class II
Arg	AGG	0.022	<b>0.003</b>
Arg	AGA	0.039	<b>0.006</b>
Arg	CGG	0.098	<b>0.008</b>
Arg	CGA	0.065	<b>0.011</b>
Arg	CGU	0.378	0.643
Arg	CGC	0.398	0.330
<hr/>			
Gly	GGG	0.151	0.044
Gly	GGA	0.109	<b>0.020</b>
Gly	GGU	0.337	0.508
Gly	GGC	0.403	0.428
<hr/>			
Ile	AUA	0.073	<b>0.006</b>
Ile	AUU	0.507	0.335
Ile	AUC	0.420	0.659
<hr/>			
Leu	UUG	0.129	0.034
Leu	UUA	0.131	0.055
Leu	CUG	0.496	0.767
Leu	CUA	0.037	<b>0.008</b>
Leu	CUU	0.104	0.056
Leu	CUC	0.104	0.080
<hr/>			
Pro	CCG	0.525	0.719
Pro	CCA	0.191	0.153
Pro	CCU	0.159	0.112
Pro	CCC	0.124	<b>0.016</b>



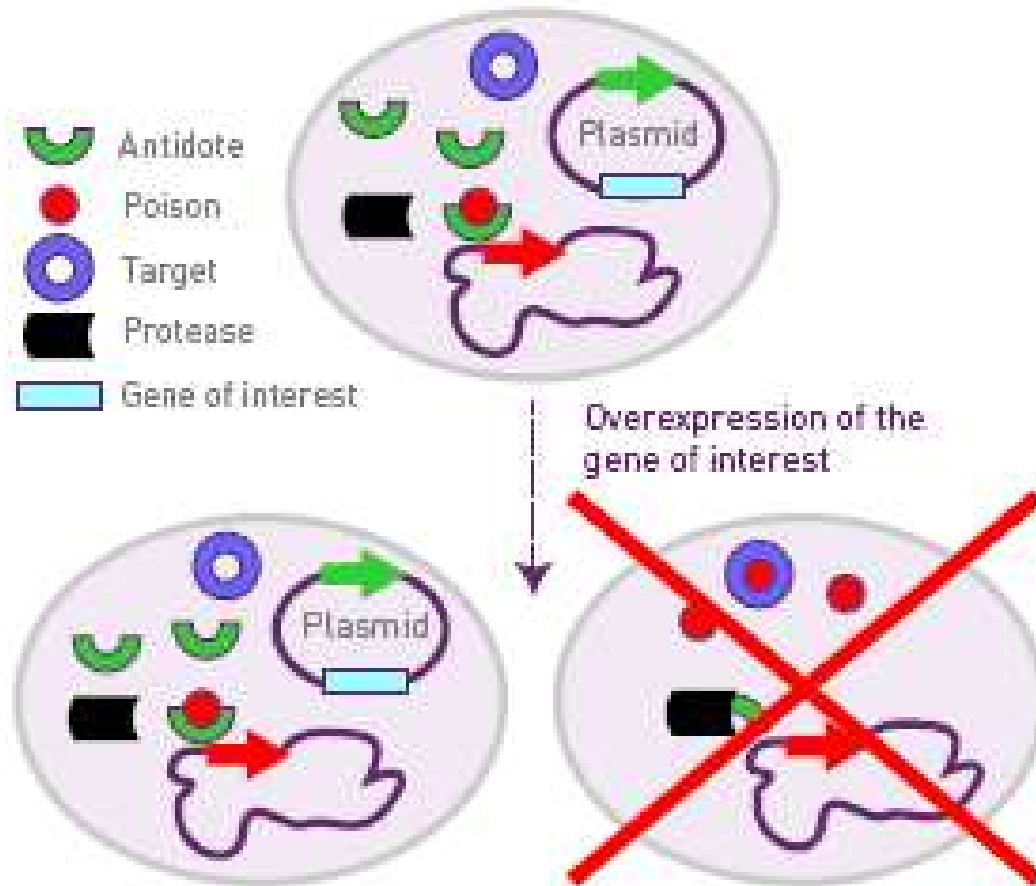
Linhagem *E. coli* BL21(DE3)Rosetta

*argU* (AGA/AGG)  
*argW* (AGG)  
*argX* (CGG)  
*ileX* (AUA)  
*leuW* (CUA)  
*glyT* (GGA)  
*proL* (CCC)



Fonte: David P. Clark. Molecular biology. Understanding the genetic revolution. Elsevier (2005)

## 2. Linhagens capazes de manter o vetor de expressão sem o uso de antibióticos



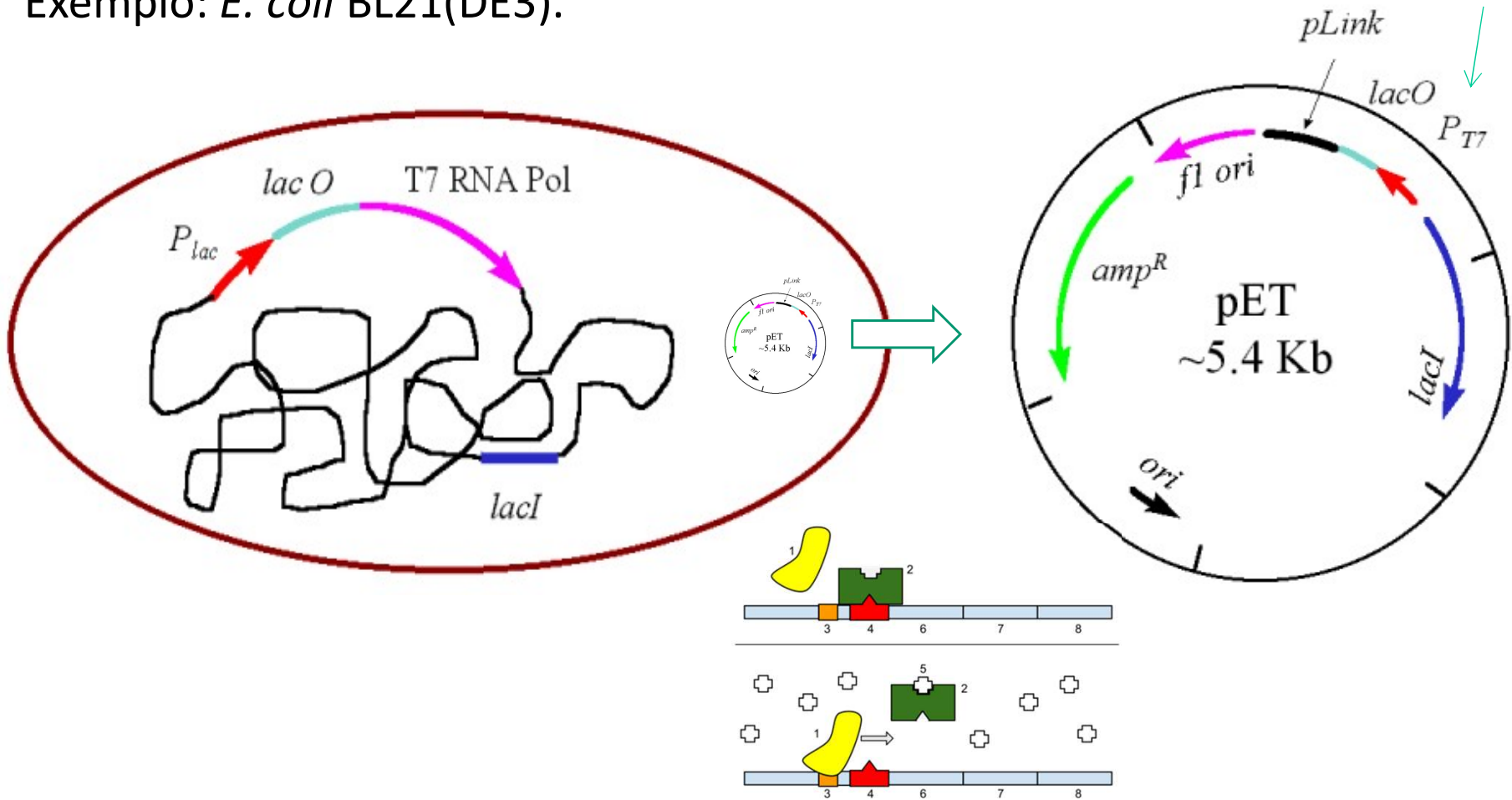
Sistema Staby Express™ (Eurogentec, Bélgica)

### 3. Linhagens modificadas para expressão controlada da rProteína

- Inserção do gene que codifica para a T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*

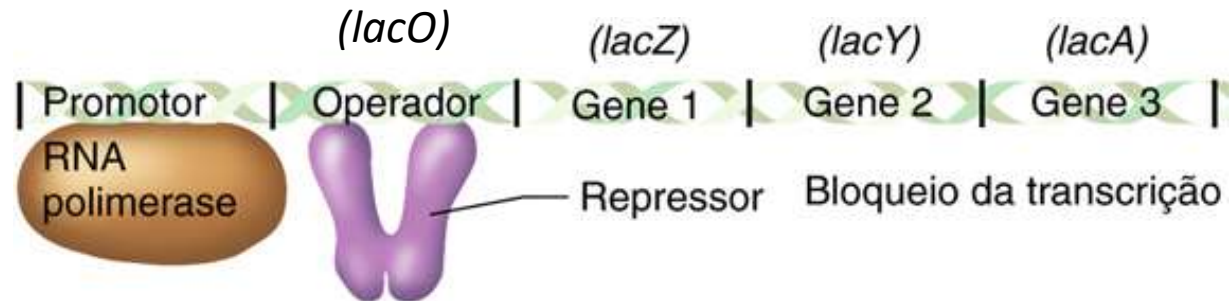
Exemplo: *E. coli* BL21(DE3).

Promotor T7

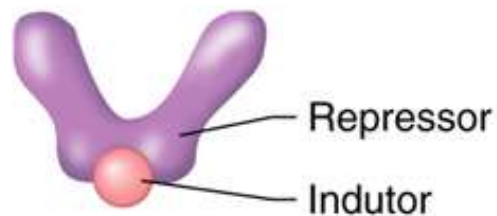
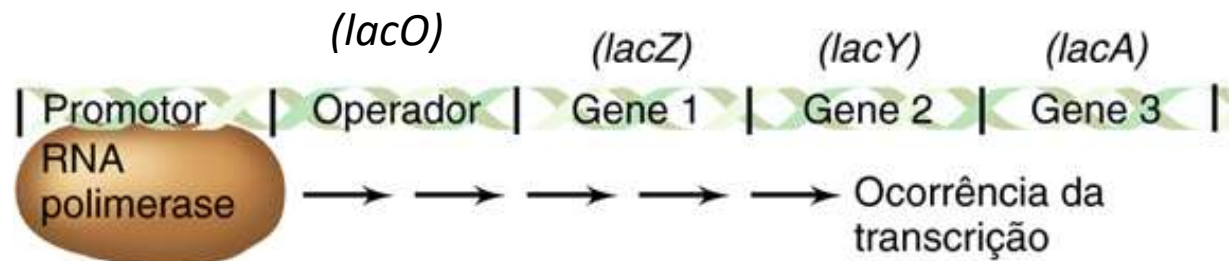


# Regulação da Transcrição

## Indução – O operon *lac* e a síntese da b-galactosidase



(a)



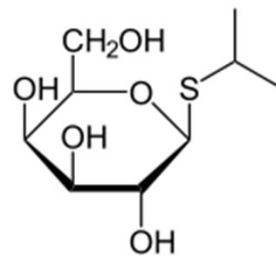
(b)



# Indução da Expressão em Vetores Baseados no *LacUV5/T7* RNA Polimerase

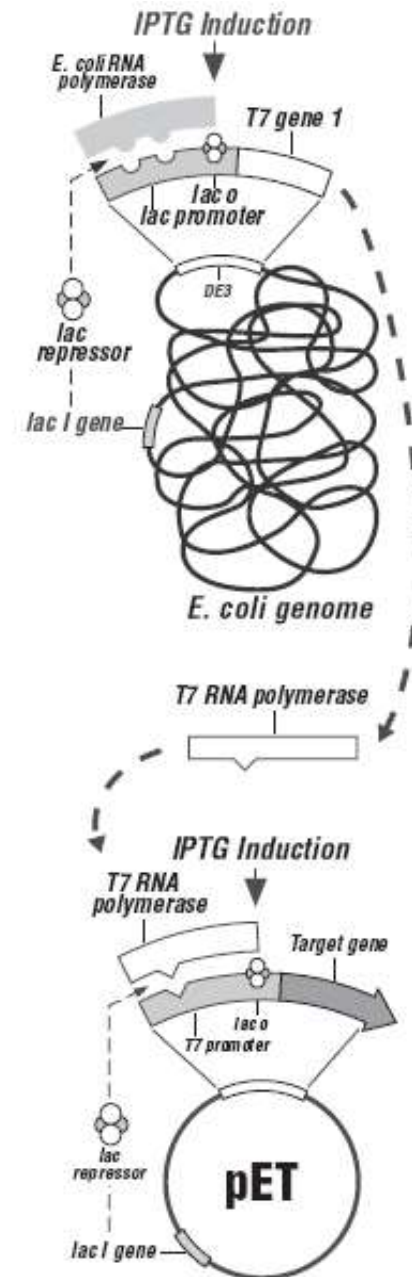
Passos para a expressão gênica:

1. Adiciona-se IPTG ao meio de cultivo
2. O IPTG liga-se ao repressor lac, liberando a transcrição do gene *T7 RNA polimerase*
3. A *T7 RNA polimerase* liga-se ao promotor *T7* do vetor e inicia a transcrição do gene de alvo



IPTG

(Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)

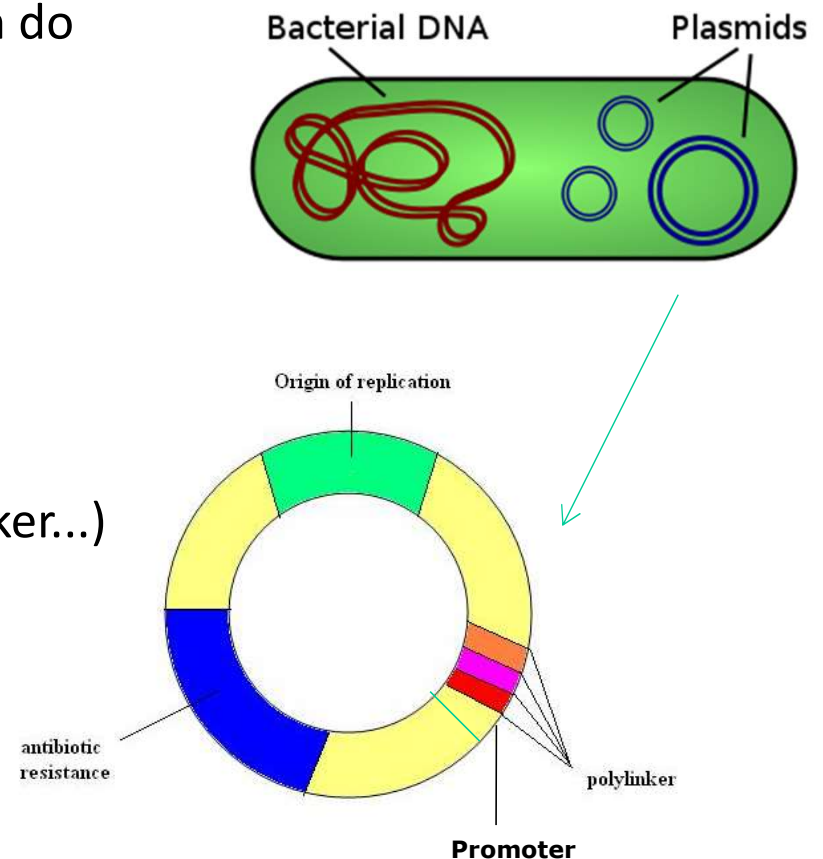


# Vetores para expressão de rProteínas em *E. coli*

Em geral, são plasmídeos especialmente modificados para este fim. Plasmídeos são moléculas de DNA, geralmente circulares, encontradas separadas do DNA cromossômico e capazes de se multiplicar independentemente. São elementos genéticos de transferência, geralmente portando genes que conferem alguma “vantagem competitiva” ao hospedeiro.

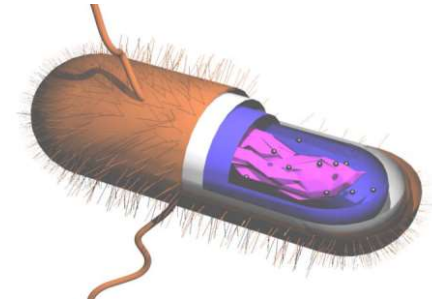
Possui elementos de controle e replicação, além do gene de interesse:

- Origem de replicação
- Gene de seleção
- Promotor
- Região de clonagem (multicloning site, polylinker...)
- Outros elementos dependendo da aplicação...



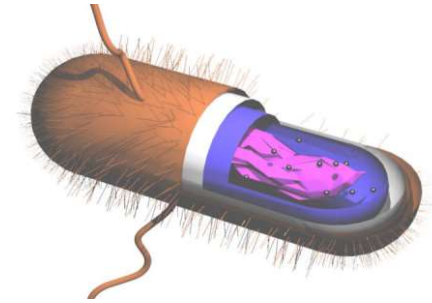
## Características importantes na escolha do vetor:

1. Expressão no Periplasma ou Citoplasma?  
Existem vetores com sequências para exportação da proteína recombinante para o periplasma.
2. Produzir a proteína na forma “nativa” ou como “proteína de fusão”?  
Pode-se, em um primeiro momento do desenvolvimento, adicionar sequências que codificam para proteínas altamente solúveis, como a Trx (thioredoxin), MBP (maltose binding protein) ou sequências de histidina (His.Tags) para facilitar purificação ou detecção da proteína recombinante.
3. Qual será a forma de seleção (antibiótico)?  
Kanamicina, ampicilina ou outro antibiótico, dependendo da linhagem de expressão e da finalidade (pequena ou larga-escala?). Outras formas de seleção também existem...
4. Proteína tóxica para a célula?  
Expressão como fusão ou com vetores e linhagens com forte controle da expressão.



## Características importantes na escolha do vetor:

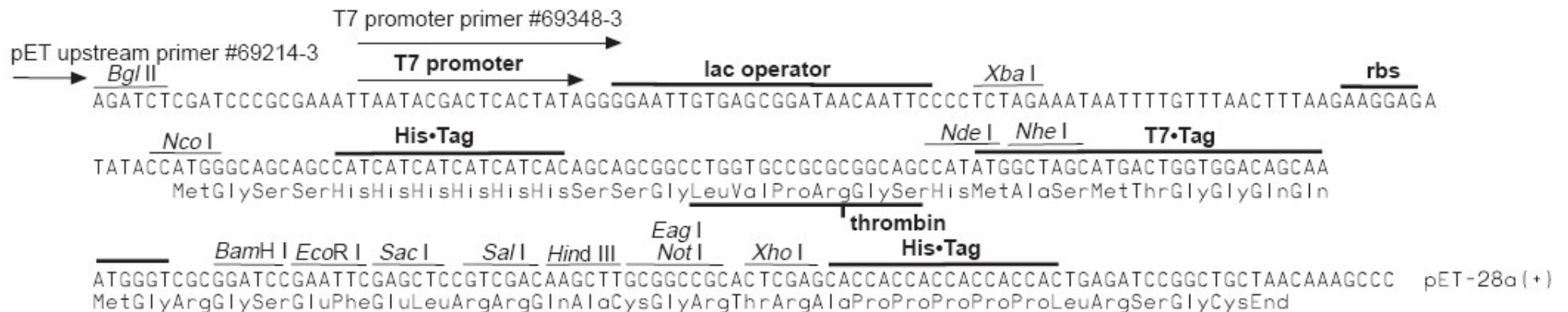
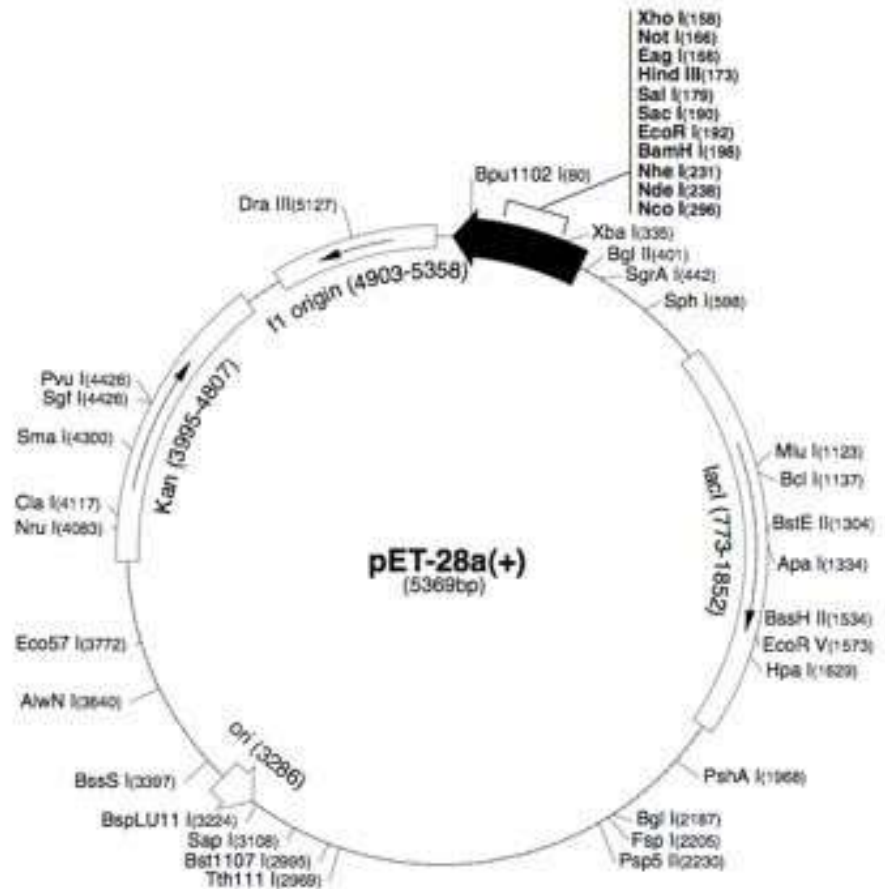
1. Expressão no Periplasma ou Citoplasma?  
Existem vetores com sequências para exportação da proteína recombinante para o periplasma.
2. Produzir a proteína na forma “nativa” ou como “proteína de fusão”?  
Pode-se, em um primeiro momento do desenvolvimento, adicionar sequências que codificam para proteínas altamente solúveis, como a Trx (thioredoxin), MBP (maltose binding protein) ou sequências de histidina (His.Tags) para facilitar purificação ou detecção da proteína recombinante.
3. Qual será a forma de seleção (antibiótico)?  
Kanamicina, ampicilina ou outro antibiótico, dependendo da linhagem de expressão e da finalidade (pequena ou larga-escala?). Outras formas de seleção também existem...
4. Proteína tóxica para a célula?  
Expressão como fusão ou com vetores e linhagens com forte controle da expressão.



# Exemplo de Vetor de Expressão

pET-28a, Novagen (Merck)

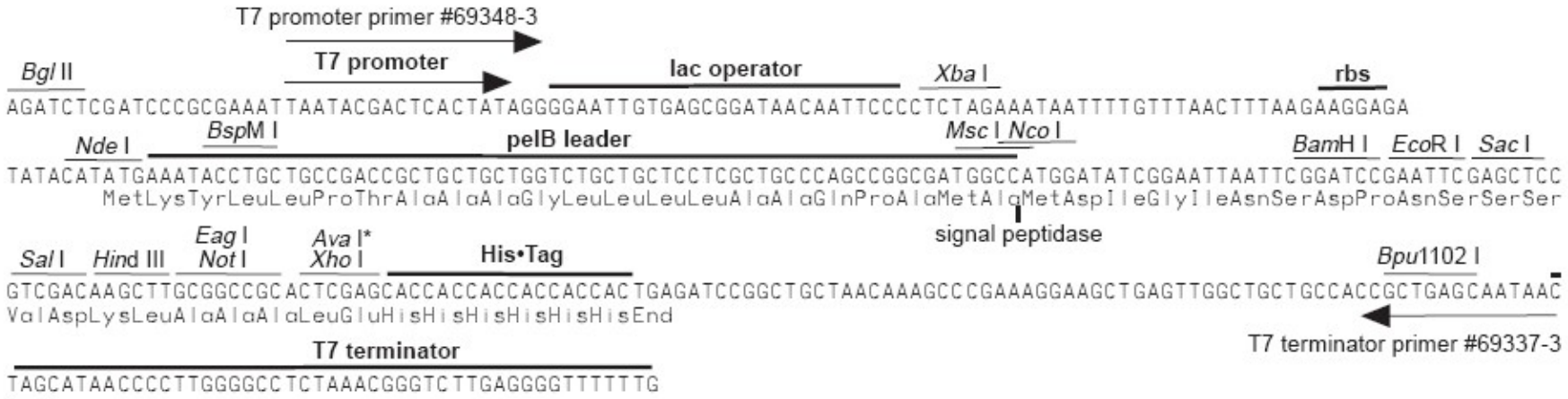
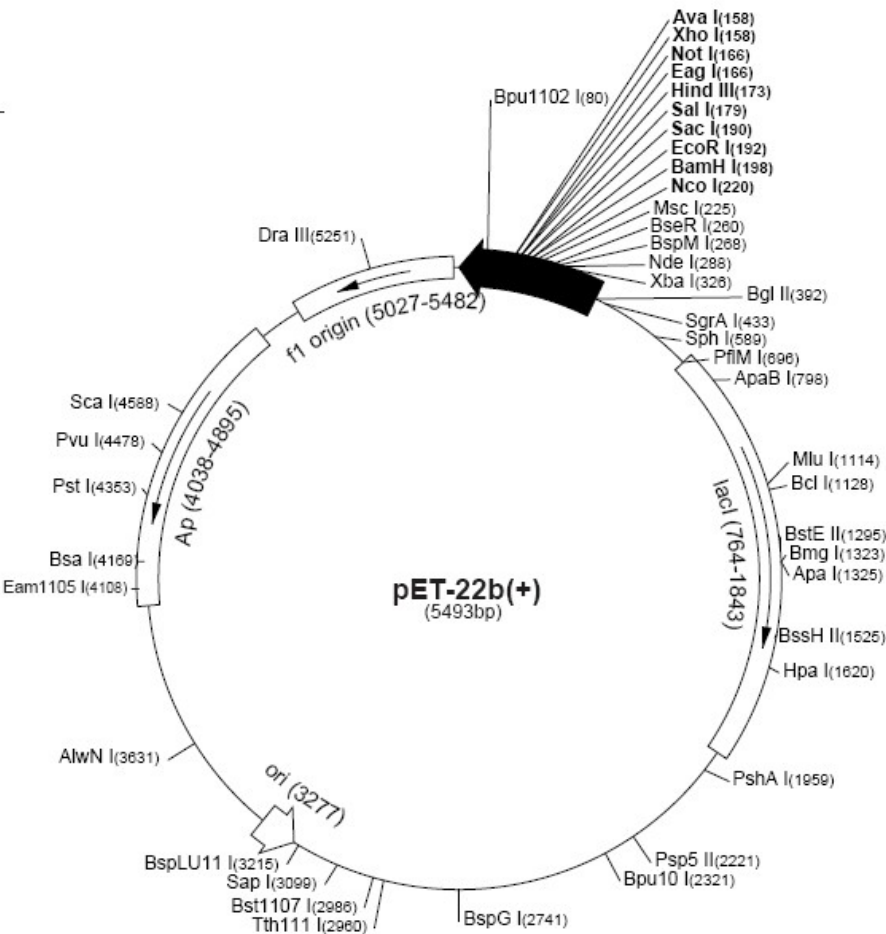
Expressão intracelular



# Exemplo de Vetor de Expressão

pET-22b, Novagen (Merck)

Expressão direcionada para Periplasma (“potencial”)



pET-22b(+) cloning/expression region

# Amplificação Gênica e Clonagem

**Estudo de Caso:** amplificação e clonagem da proteína humana X utilizando-se o vetor pET-28a

**1º Passo:** Obtenção da sequência de nucleotídeos na literatura (em bancos de dados, como o GenBank®)

Aminoácidos (89aa):

MCDRKAVIKNADMSEEMQQDSVECATQALEKYNIEKDIAAHIKKEFDKKYNPTWHCI  
VGRNFGSYVTHETKHFIYFYLGQVAILLFSKSG

Nucleotídeos (267pb):

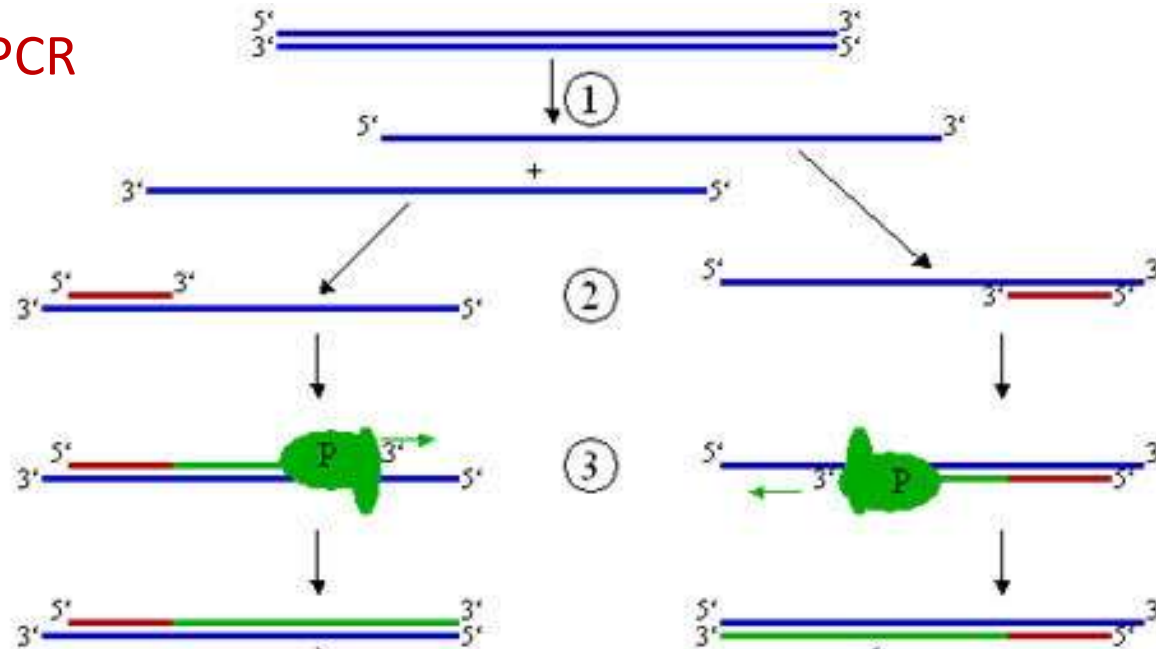
**ATG**TGCGACCGAAAGGCCGTGATCAAAAATGCGGACATGTCGGAAGAGATGCAAC  
AGGACTCGGTGGAGTGCGCTACTCAGGCGCTGGAGAAATACAACATAGAGAAGGA  
CATTGCGGCTCATATCAAGAAGGAATTTGACAAGAAGTACAATCCCACCTGGCATTG  
CATCGTGGGGAGGAACTTCGGTAGTTATGTGACACATGAAACCAAACACTTCATCTA  
CTTCTACCTGGGCCAAGTGGCCATTCTTCTGTTCAAATCTGGT**TAA**

## 2º Passo: desenho dos primers para amplificação

O que é um primer?

Uma fita de DNA que serve como ponto de início para replicação de DNA. A DNA Polimerase só pode adicionar a uma fita de DNA existente.

### Reação PCR

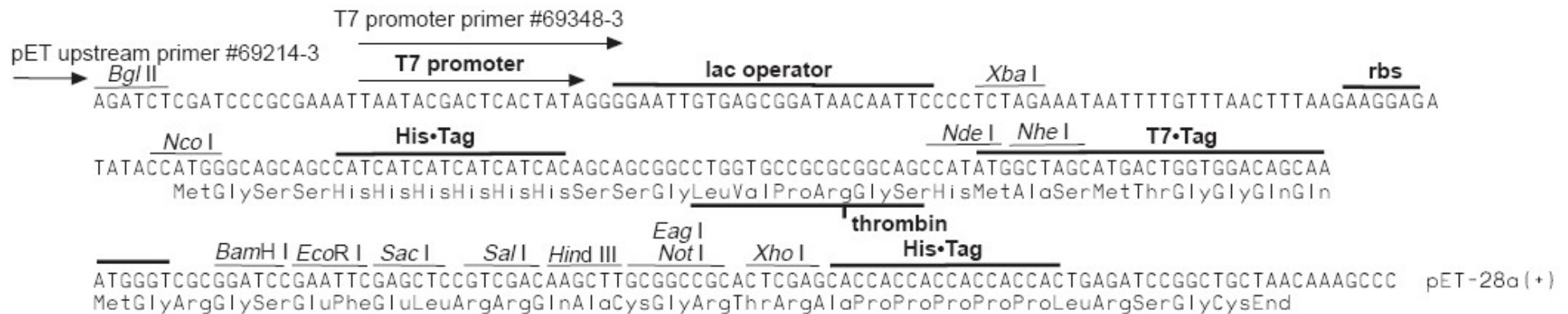
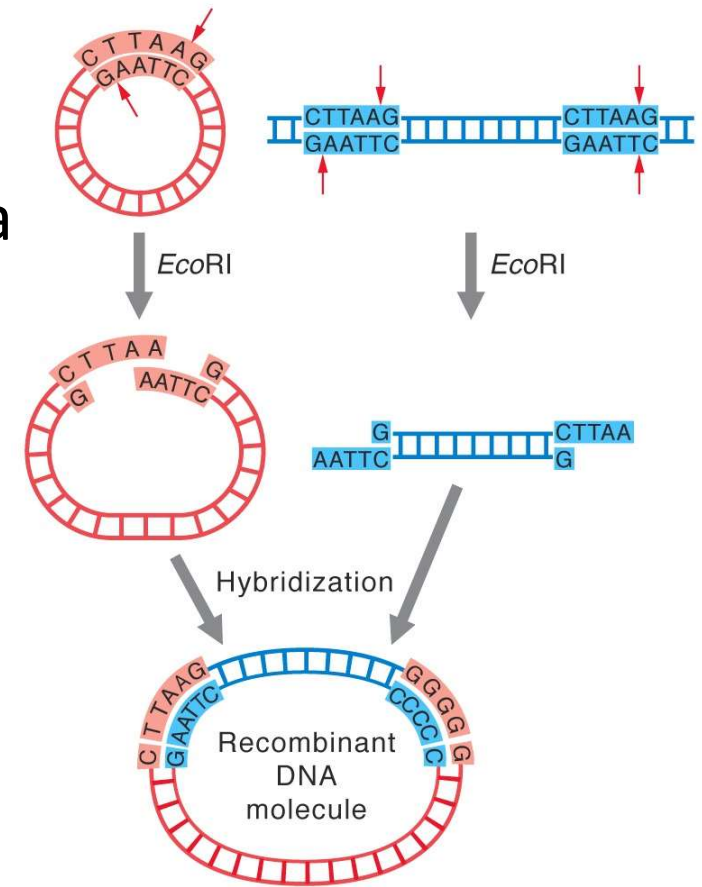




## 2º Passo (cont.): desenho dos primers para

Quais enzimas de restrição usar para cortar o vetor e o gene amplificado por PCR?

Exemplo: *Nde*I (CATATG) e *Eco*RI (GAATTC)



## 2º Passo (Cont.): desenho dos primers para amplificação

Definidas as enzimas, os primers podem ser desenhados

Nucleotídeos:

**ATG**TGCGACCGAAAGGCCGTGATCAAAAATGCGGACATGTCGGAAGAGATGCAA  
 CAGGACTCGGTGGAGTGCGCTACTCAGGCGCTGGAGAAATACAACATAGAGAAG  
 GACATTGCGGCTCATATCAAGAAGGAATTTGACAAGAAGTACAATCCCACCTGGC  
 ATTGCATCGTGGGGAGGAACTTCGGTAGTTATGTGACACATGAAACCAAACACTT  
 CATCTACTTCTACCTGGGCCAAGTGGCCATTCTTCTGTTCAAATCTGGGT**TAA**

→ Região de ligação ao gene a ser amplificado

Primer Direto: 5' - GAC AAT **CAT ATG** TGC GAC CGA AAG GCC – 3'

→ Sítio de restrição reconhecido pela *NdeI*

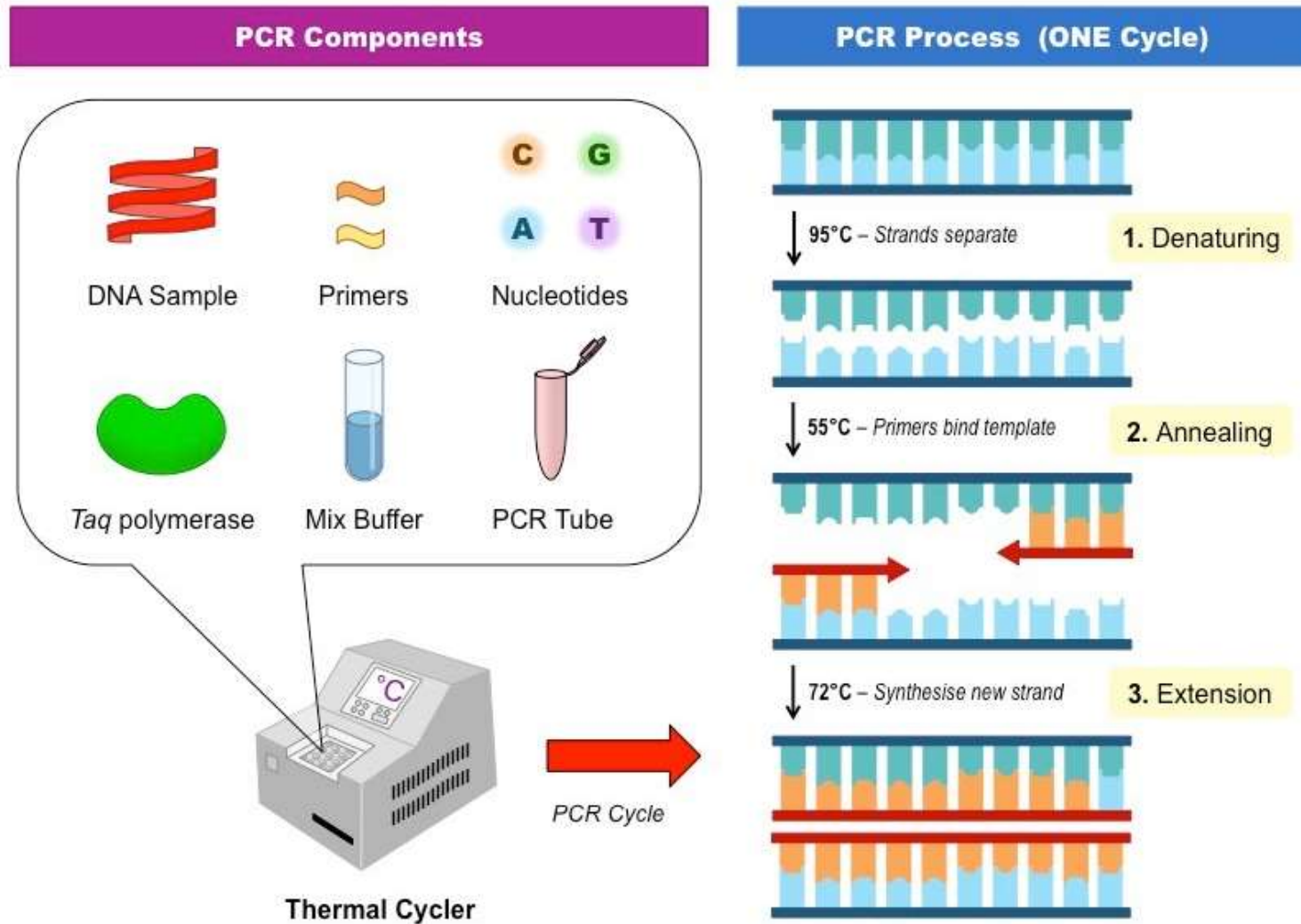
→ Região de ligação ao gene a ser amplificado

Primer Reverso: 5' - CAG CCG **GAA TTC** **TTA** ACC AGA TTT GAA CAG - 3'

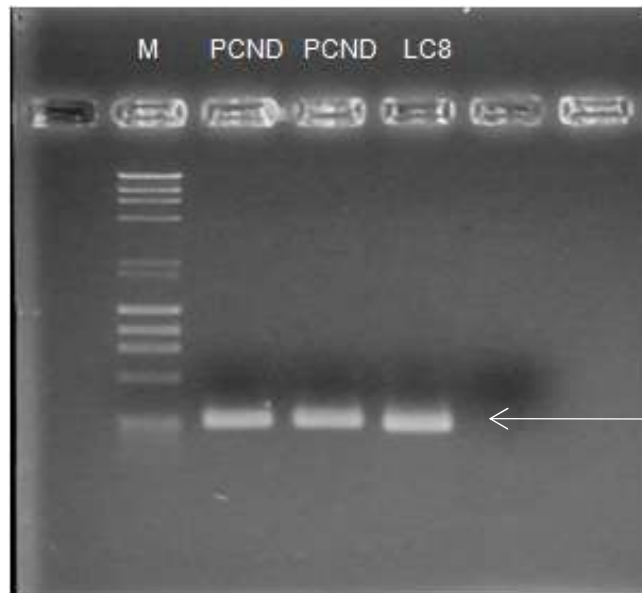
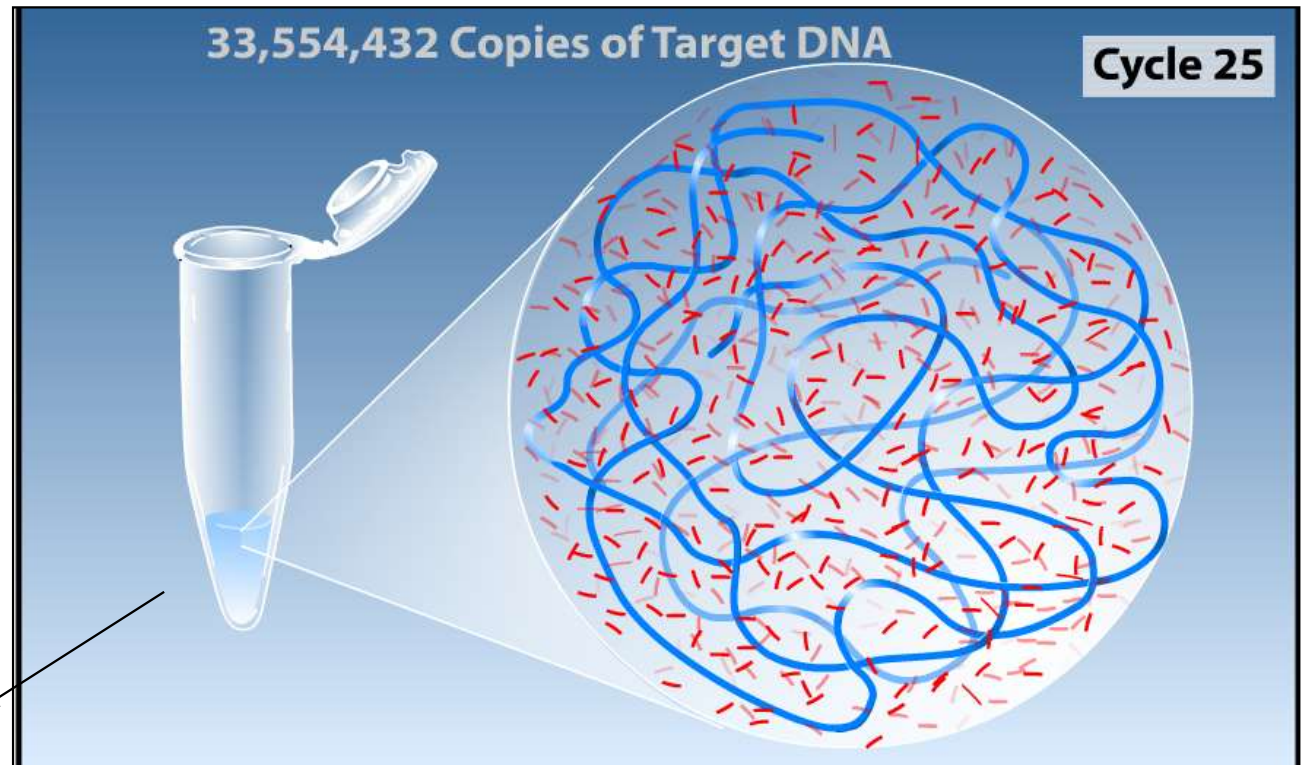
→ Sítio de restrição reconhecido pela *EcoRI*

**3º Passo:**

Amplificação do gene de interesse através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction)

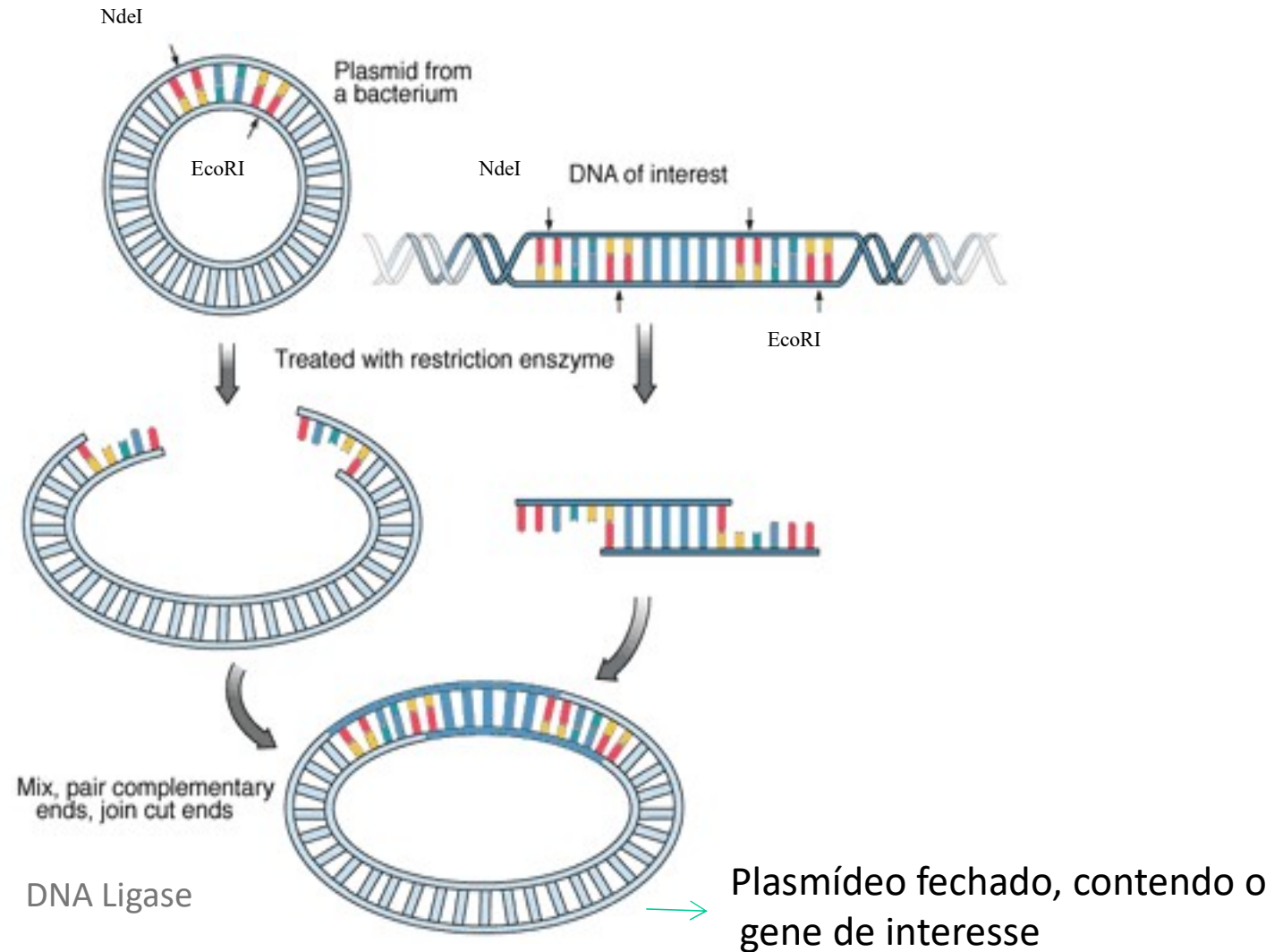


Os ciclos de PCR se repetem por 25 ou até 30 vezes, gerando milhões de cópias a partir de um único gene.

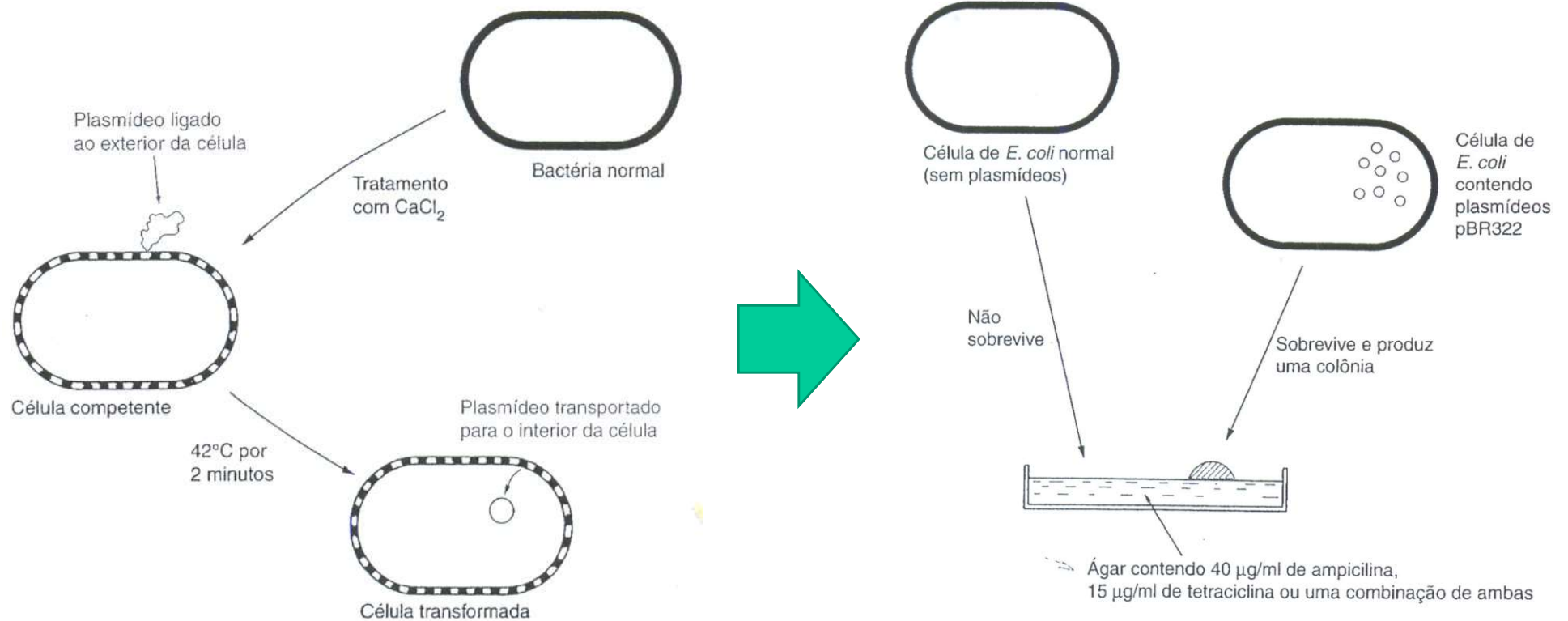


← 291 pb (gene amplificado visualizado por eletroforese em gel de agarose)

**4º Passo:** Corte com as enzimas de restrição e ligação (vetor + inserto) utilizando a enzima DNA Ligase



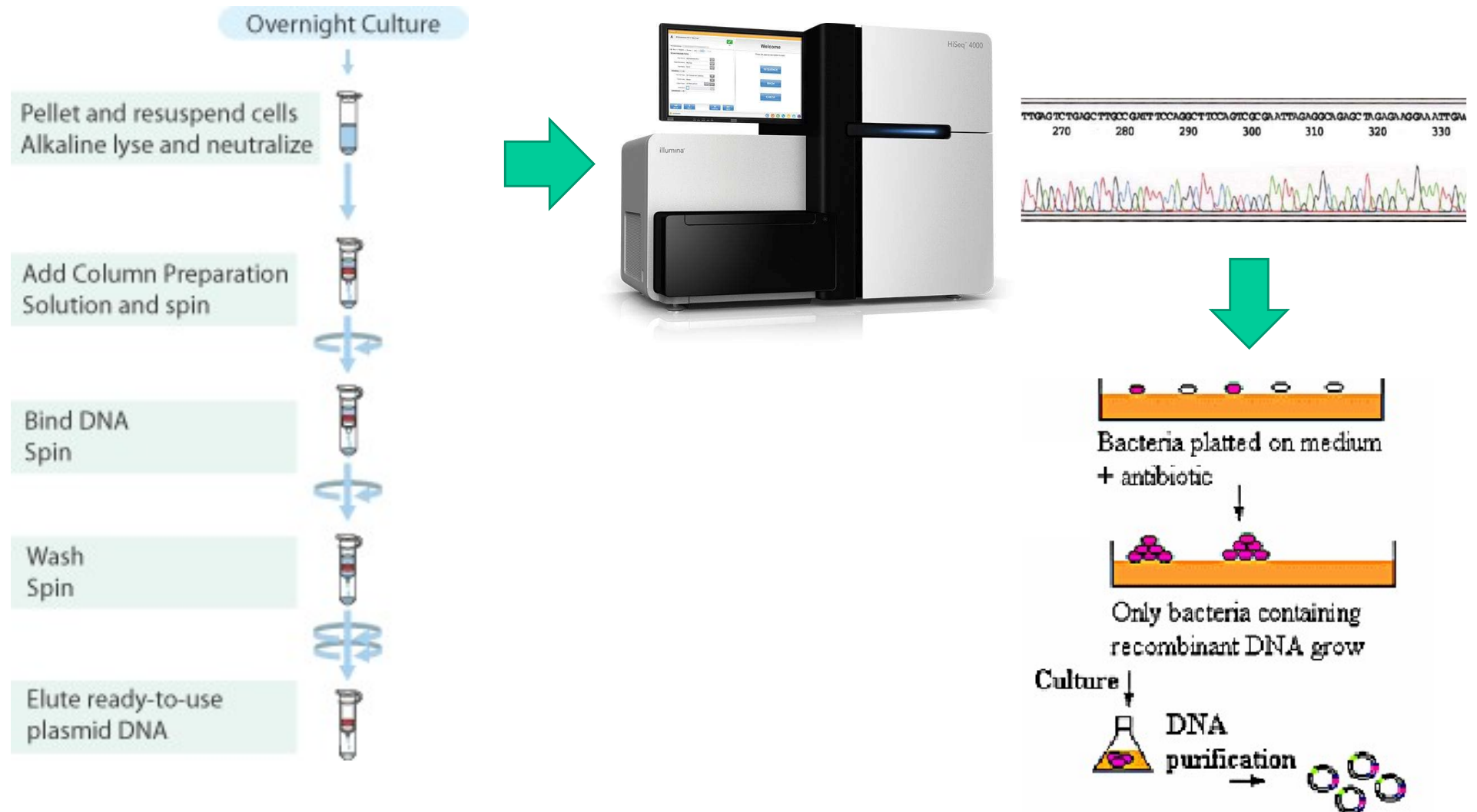
**5º Passo:** Inserção do vetor contendo o gene de interesse em *E. coli* “competente” (Transformação) para multiplicação dos plasmídeos



**5º Passo (cont.):** Inserção do vetor contendo o gene de interesse em *E. coli* “competente” (Transformação) para multiplicação dos plasmídeos

- Utilizar “linhagem de clonagem”, mutante para endonuclease (Ex. *E. coli* DH5a)
- Bactérias que recebem o plasmídeo se tornam resistentes ao antibiótico
- Pode-se então multiplicar as bactérias em frascos agitados (Erlenmeyers) e purificar os plasmídeos visando à análise por sequenciamento, armazenamento e futura inserção em linhagens de produção, por exemplo, a *E. coli* BL21(DE3) comentadas anteriormente neste curso.

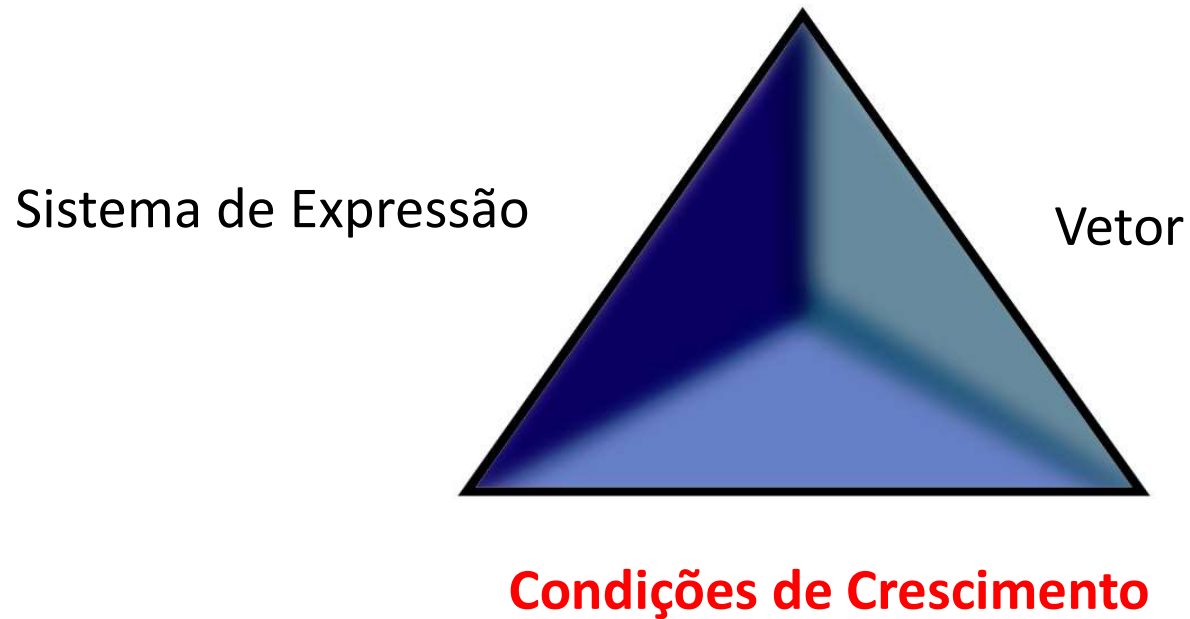
**6º Passo:** Após a Purificação e o Seqüenciamento, é feita a inserção do vetor contendo o gene de interesse em *E. coli* (linhagens de Expressão)





# Avaliações Iniciais de Expressão e Análise da rProteína

## Efeito das Condições de Crescimento (avaliação preliminar)



# Avaliação Preliminar das Condições de Crescimento e Expressão



São estudos geralmente realizadas em Erlenmeyers ou pequenos biorreatores

## Variáveis geralmente estudadas nos “Estudos de Expressão”:

- Composição do meio de cultura (fonte de carbono, nitrogênio, aminoácidos, etc)
- Temperatura de crescimento e indução
- Concentração do indutor
- Tipo de indutor (ex. IPTG vs Lactose)
- Tempo de indução
- Aeração e agitação

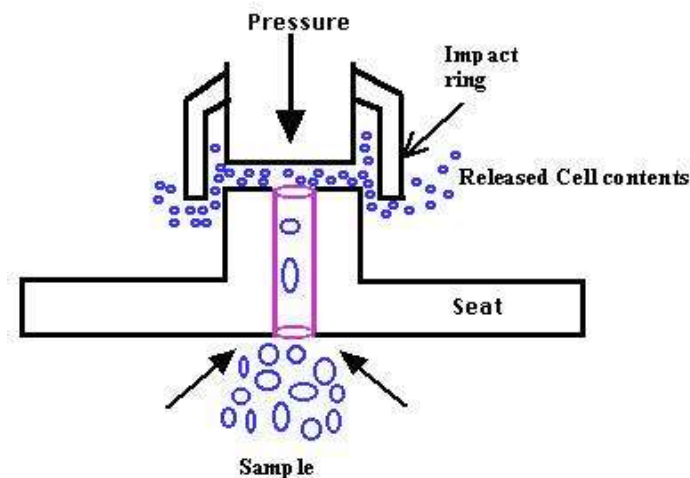


## Rompimento Celular

Uma vez determinada a melhor condição de expressão, parte-se para a produção em maior quantidade. A metodologia depende da escala de trabalho. Em pequena escala é geralmente feita por sonicação. Em maior escala, são bastante usados os homogeneizadores a alta pressão. Extração de proteínas presentes no periplasma é feita normalmente por *shock* osmótico.



Ultrassom



Homogeneizador de alta pressão

# Purificação e Caracterização de Proteínas Recombinantes (exemplos)

His•Tag

- 6, 8, or 10 aminoácidos, N ou C-terminal  
(Purificação por IMAC)

T7•Tag

- 11 aminoácidos, N-terminal  
(Purificação por Afinidade/anticorpos)

GST•Tag ou MBP•Tag

- N ou C-terminal  
(Purificação em resinas de Glutathione ou Amilose)

**Desvantagen:**

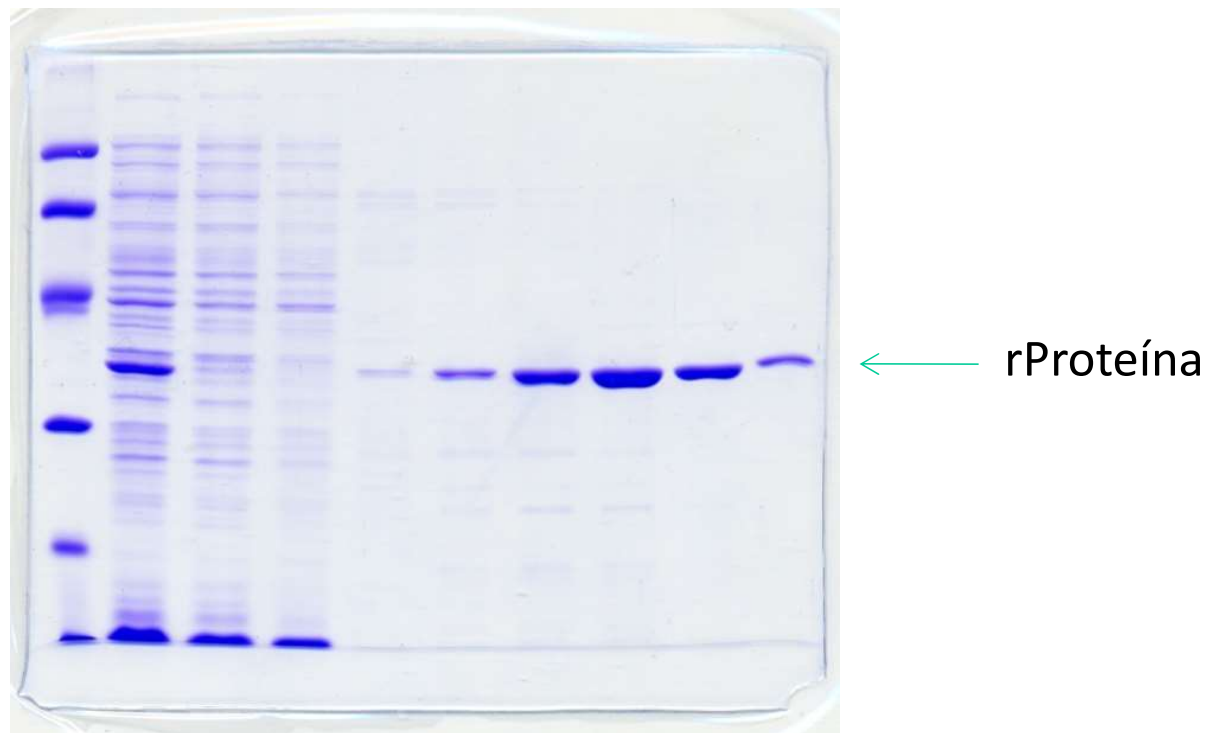
**Remoção do “Tag”!**

**Obs: “Tags” não são usados em  
biofármacos comerciais  
(alta imunogenicidade)**



## Purificação de Proteínas Recombinantes (exemplo)

Purificação de rProteína (com His.tag) por IMAC utilizando resina de níquel imobilizado



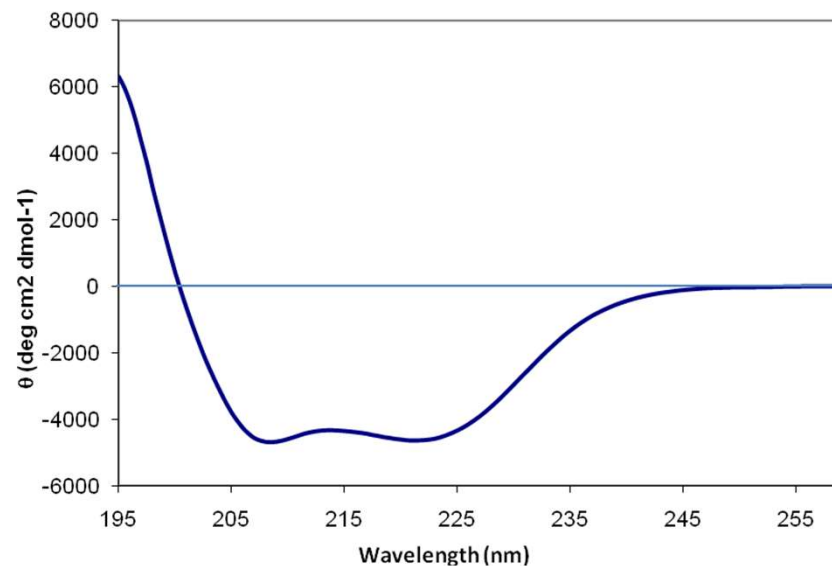
Gel de eletroforese “SDS-PAGE” contendo diferentes frações de uma cromatografia

# Caracterização de proteínas recombinantes

Uma vez purificada, a proteína pode ser analisada por inúmeros métodos visando a verificar sua identidade, integridade, tamanho, enovelamento, estabilidade, atividade biológica, etc.

Alguns dos principais métodos utilizados são:

- SDS-PAGE
- Dicroísmo circular
- Espectrometria de massa
- Cromatografia de exclusão molecular
- Espalhamento de raio X a baixo ângulo
- Espalhamento de luz
- Seqüenciamento
- Outros... (Segundo normas das agências reguladoras)



Análise por dicroísmo circular de uma proteína recombinante

FIM