



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MOLECULAR

CENTRO DE ANÁLISES PROTEÔMICAS E BIOQUÍMICAS- UCB

Doutorado

PRODUÇÃO EM BIORREATOR DE UM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
COM O USO DO MARCADOR ELP-INTEÍNA

Autor: Daniel Amaro Sousa

Orientador: Octávio Luiz Franco

Coorientadora: Kelly Cristina Leite Mulder

BRASÍLIA

2016

DANIEL AMARO SOUSA

**PRODUÇÃO EM BIORREATOR DE UM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
COM O USO DO MARCADOR ELP-INTEÍNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção de Título de Doutorado em Patologia Molecular.

Orientador: Octávio Luiz Franco

Brasília

DANIEL AMARO SOUSA

**“PRODUÇÃO EM BIOREATOR DE UM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO COM O
USO DO MARCADOR ELP-INTEÍNA”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Molecular da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para obtenção de Título de
Doutorado em Patologia Molecular.

Aprovado em: 12 de setembro de 2016


Banca examinadora:



Dr. Octávio Luiz Franco
Universidade de Brasília
Presidente da banca



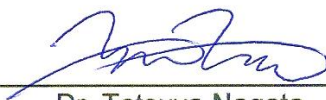
Dra. Juliana Lott de Carvalho
Universidade Católica de Brasília
Examinadora



Dra. Marcia Renata Mortari
Universidade de Brasília
Examinadora



Dra. Maria Sueli Soares Felipe
Universidade de Brasília
Examinadora



Dr. Tatsuya Nagata
Universidade de Brasília
Examinador

Brasília

2016

A busca por respostas tem início lento, tal qual uma roda numa leve inclinação, sujeita apenas à gravidade para movê-la, morosa e gradualmente. Aos poucos a roda ganha velocidade...

Mike Mignola, 2010

AGRADECIMENTOS

Findo este ciclo de formação, primeiramente agradeço aos meus pais e família. José Lima de Sousa, meu pai sempre foi uma inspiração e exemplo de dedicação ao trabalho, providenciando suporte financeiro e orientação, consentindo com minhas escolhas profissionais. Nilsete Amaro Costa Sousa, minha mãe, que sempre se mostrou um modelo de caráter, apoiando-me nas minhas decisões, sem abrir mão de sua opinião e conselhos valiosos. Agradeço também às minhas irmãs Alyne, Alycia e Anyelle Amaro pelo apoio e companheirismo nos mais diversos momentos. Ainda, a minha namorada e futura esposa Mariana de Jesus Fonseca Nunes, pelo apoio incondicional e paciência, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao fim desta etapa.

Agradeço aqueles que fizeram parte da minha trajetória de 10 anos no Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas - CAPB. Em especial, não posso esquecer-me das figuras de Renato Goulart de Almeida, amigo nas alegrias das descobertas e nas tristezas do fardo da monotonia e tédio das repetições de experimentos; Júlia Mourot Filiatre, Simone Maria Neto e Fábio Teles com quem também dividi o início de minha vida científica; Às minhas alunas de iniciação científica, Maria Eugênia Zaban, Tatiane Rodrigues da Silva, Thuanne Moura Alencar e Kehtly de Souza Nobre, pelo apoio em experimentos e pela oportunidade que me deram de aprender orientação e planejamento. Betty Souza Cândido e Marlon Henrique Cardoso, que estiveram ao meu lado em diversas situações e me ajudaram crescer como cientista e pessoa. À Flávia Dutra, Mirna Freire, Nelson Júnior, Stella Lima, Ana Paula Cantuária, Luz Irazabal e Kênia Chaves por dividirem bancada por dias que pareciam não ter fim, almoços e confraternizações que poderiam ter se estendido e pelo suporte emocional não-declarado. Agradeço também a minha coorientadora, Kelly Mulder pelo suporte e principalmente por abrir diversos caminhos para realização deste projeto.

Ainda, ao amigo e irmão Jefferson Sousa, por partilhar de partes únicas da minha vida. Aos professores José Raimundo Corrêa, Simoni Campos Dias, Nádia Parachin, Eloá Medeiros e Rinaldo Pereira pela inspiração como profissionais. Sobretudo, agradeço ao Prof. Octávio Luiz Franco pela oportunidade, confiança e dedicação ao sonho que partilhamos por tantos anos.

Resumo

Um dos mais importantes aspectos relacionados aos patógenos infecciosos pode ser relacionado à sua excepcional adaptabilidade para o desenvolvimento de resistência, o que leva a um desafio de descoberta de novas drogas antimicrobianas, com novos mecanismos de ação. Entre estes, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) se apresentam como promissoras moléculas anti-infecciosas. Buscando superar os altos custos associados com o isolamento a partir de fontes naturais ou da síntese química de PAMs, propõem-se no presente trabalho a expressão do Pa-MAP 2, um PAM rico em alaninas. Para isso, este peptídeo foi fusionado a um marcador ELP-inteína, onde o ELP foi usado para promover a auto-agregação, possibilitando um isolamento rápido e de baixo custo. A inteína foi usada para permitir a liberação controlada do peptídeo. Para isso, o vetor pET 21a foi usado para produzir o Pa-MAP 2 fusionado a região N-terminal da inteína modificada *Mxe GyrA*, seguido por um ELP de 60 repetições. Após purificação, o Pa-MAP 2 demonstrou MIC contra *E. coli* ATCC 8739 de 25 μM . A análise do cultivo em biorreator demonstrou que o Pa-MAP 2 pode ser produzido tanto em meio rico quanto em meio definido, com rendimento 50 vezes superior que o reportado para outros peptídeos produzidos pelo sistema ELP-inteína, e em rendimentos comparáveis a sistemas de expressão com clivagem química ou proteases. Desta forma, a metodologia do presente trabalho contribui para aplicação biotecnológica dos PAMs. Os resultados aqui apresentados demonstram uma comparação de diferentes condições de cultivo, para obter alto rendimento do Pa-MAP 2, usando o sistema ELP-inteína, contribuindo para incluir os PAMs como futuras alternativas aos antimicrobianos convencionais.

Palavras-chave: ELP, Inteína, Peptídeo Antimicrobiano, Produção em biorreator

Abstract

One of the most important aspects related to infectious pathogens may be correlated to an exceptional adaptability in developing resistance, which leads to a challenge in the discovery of antimicrobial drugs with novel mechanisms of action. Among them, antimicrobial peptides (AMPs) stand out as promising anti-infective molecules. In order to overcome the high costs associated with isolation from natural sources or chemical synthesis of AMPs we propose the expression of Pa-MAP 2, a polyalanine AMP. Pa-MAP 2 was fused to an ELP-intein tag where the ELP was used to promote aggregation and fast and cost-effective isolation after expression, and the intein was used to stimulate a controlled AMP release. For these, the vector pET21a was used to produce Pa-MAP 2 fused to the N-termini region of a modified *Mxe* GyrA intein followed by 60 repetitions of ELP. Purified Pa-MAP 2 showed a MIC of 25 μ M against *E. coli* ATCC 8739. Batch fermentation demonstrated that Pa-MAP 2 can be produced in both rich and defined media at yields 50-fold higher than reported for other AMPs produced by the ELP-intein system, and in comparable yields to expression systems with protease or chemical cleavage. Therefore, the methodology applied here contributes to the biotechnological application of AMPs. Our results show a comparison of different fermentation conditions to obtain high yields of Pa-MAP 2 using the ELP-intein system, contributing to including these molecules as future alternatives to conventional antibiotics in the pharmaceutical field.

Keywords: ELP, Intein, Antimicrobial Peptide, Batch Production

Lista de Ilustrações

Figura 1. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos	18
Figura 2. Modelo tridimensional do peptídeo Pa-MAP 2.....	22
Figura 3. Esquema de <i>splicing</i> de proteínas.....	24
Figura 4. Mecanismo de ação básico de inteínas.....	26
Figura 5. Transição inversa de fase reversível	31
Figura 6. Produção e purificação pelo sistema ELP-Inteína	35
Figura 7. Vetores pBSK para os peptídeos BmLAO	51
Figura 8. Mapa dos plasmídeos construídos para <i>B. subtilis</i>	52
Figura 9. Insertos clivados dos vetores pBSK.....	53
Figura 10. Vetor pHT 01 clivado e não clivado	53
Figura 11. Ligação dos vetores pHT01 com as construções 1 e 2	54
Figura 12. Vetores pHT01_1(RecA) e pHT01_2(MTU).....	55
Figura 13. Mapa dos plasmídeos construídos	56
Figura 14. Vetores pET-60EGP e pET-100EMP	57
Figura 15. Extrato proteico total de pET-60EGP em <i>E. coli</i> BL 21	58
Figura 16. Extrato proteico total de pET-60EGP em <i>E. coli</i> BL 21 pLysE.....	59
Figura 17. Extrato proteico total de pET21a(+) em <i>E. coli</i> BL 21	59
Figura 18. Isolamento após precipitação dos ELPs	60
Figura 19. Análise da ativação da inteína em diferentes condições	61
Figura 20. Análise de ativação da inteína nas condições escolhidas	62
Figura 21. Análise da massa do peptídeo produzido	62
Figura 22. Perfil de fermentação em meio definido.....	64

Lista de tabelas

Tabela 1. Peptídeos antimicrobianos em teste clínico	20
Tabela 2. Custo de produção de PAMs por diferentes métodos.....	37
Tabela 3. Atividade antimicrobiana	63
Tabela 4. Produção em diferentes condições de cultivo	65
Tabela 5. Custos associados ao meio de cultivo em meio TB	65
Tabela 6. Custos associados ao meio de cultivo definido (sem alimentação)	66
Tabela 7. Custos associados ao meio de cultivo em meio econômico	66

Lista de siglas

μl- microlitro

μM- micromolar

aa- aminoácido

ACN- Acetonitrila

AFP- “Antifreezing peptide”- peptídeo anticongelante

ATP- Adenosina tri-fosfato

DO- Oxigênio dissolvido

ELP- “Elastin like-polipeptide”; peptídeos semelhantes a elastina

h- hora

IPTG- Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo

IrAS- Infecções relacionadas à assistência à saúde

kDa- quilodalton

LB- “Lysogeny broth” - Meio LB

M- molar

mg- miligrama

MIC- “Minimal inhibitory concentration”; concentração mínimo inibitória

min- minuto

ml- mililitro

MS- “Mass spectrometry”- espectrometria de massa

Mtu RecA- Inteína RecA de *Micobacterium tuberculosis*

Mxe GyrA- Inteína GyrA de *Micobacterium xenopi*

nm- nanômetro

PAM- Peptídeo antimicrobiano

Pa-MAP 2- Peptídeo antimicrobiano 2 de *Pleuroneuctis americanus*

Pb- pares de base

PCR- Polymerase chain reaction- reação em cadeia da polimerase

TB- “Terrific Broth”, meio TB

TFA- “trifluoroacetic acid”- Ácido trifluoroacético

UFC- Unidade formadora de colônia

UFLC- “Ultra fast liquid chromatography”- Cromatografia líquida ultra rápida

SUMÁRIO

Capa	I
Folha de rosto	II
Folha de aprovação	III
Epígrafe	IV
Agradecimentos	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Lista de ilustrações	VIII
Lista de tabelas.....	IX
Lista de siglas	X
Sumário.....	11
1. Introdução	13
1.1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)	17
1.1.1 Peptídeos anticongelantes e Pa-MAP 2.....	21
1.2. Inteínas	23
1.3. ELPs e outros métodos de purificação não-cromatográficos.....	30
1.4. Uso de ELPs combinados à inteínas	34
1.5. Uso do sistema ELP-inteína em biorreatores	36
2. Justificativa	39
3. Objetivos gerais	40
4. Objetivos específicos	40
5. Metodologia.....	41
5.1. Outros projetos desenvolvidos.....	41
5.1.1. Linhagens de bactérias, vetores e enzimas.....	41
5.1.2. Construção dos vetores para expressão para os peptídeos BmLAO.....	41
5.1.3. Construção dos vetores para expressão para os <i>B. subtilis</i>	42
5.1.4. Preparo de células competentes de <i>B. subtilis</i>	44
5.1.5. Análise de expressão em <i>B. subtilis</i>	44
5.2. Projeto principal da tese.....	45
5.2.1 Construção dos vetores para expressão em <i>E. coli</i> do peptídeo Pa-MAP2.....	45
5.2.2. Transformação dos vetores em <i>E. coli</i>	45

5.2.3. Expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em <i>shaker</i>	46
5.2.4. Purificação da fusão ELP-Pa-MAP 2 recombinante	46
5.2.5. Ativação da inteína e purificação do Pa-MAP 2	47
5.2.6. Análises de massa molecular por SDS-PAGE	47
5.2.7. Análises de massa molecular por espectrometria de massa	48
5.2.8. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	48
5.2.9. Cultivo em biorreator, cultivo alimentado em biorreator e medidas de peso seco....	49
5.2.10. Análises de HPLC para acetato e glicose	50
6. Resultados	51
6.1. Resultados dos outros projetos desenvolvidos	51
6.1.1. Construção dos vetores de expressão para os peptídeos BmLAO	51
6.1.2. Construção dos vetores de expressão para <i>B. subtilis</i>	52
6.1.3 Expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em <i>B. subtilis</i>	55
6.2. Resultados do projeto principal da tese	56
6.2.1. Construção dos vetores para expressão em <i>E. coli</i>	56
6.2.2. Transformação dos plasmídeos em <i>E. coli</i> para expressão	56
6.2.3. Análise inicial da expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em <i>E. coli</i>	57
6.2.4. Análise da expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em <i>E. coli</i> em <i>shaker</i>	58
6.2.5. Isolamento da fusão ELP-Pa-MAP 2 recombinante.....	60
6.2.6. Ativação da inteína e isolamento do peptídeo Pa-MAP 2.....	61
6.2.7. Testes antimicrobianos	63
6.2.8. Cultivo simples e alimentado em biorreator	63
6.2.9. Análise dos custos de produção	65
7. Discussão	68
8. Conclusões e perspectivas	75
9. Referências Bibliográficas	76
10. Anexos	89

1. Introdução

As Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IrAS) são infecções adquiridas durante um contato com o serviço de saúde e que não estava presente ou em período de incubação por ocasião da admissão do paciente, sendo diagnosticadas, em geral, a partir de 48 horas após a internação (PADOVEZE *et al.*, 2014). As IrAS podem ser causadas por uma grande variedade de bactérias, fungos e vírus, principalmente em ambientes hospitalares. Entretanto, estas bactérias podem ser encontradas em todos os locais onde há assistência ao paciente, envolvendo também sistemas de não internação, como enfermarias, ambulatórios e consultórios, se manifestando durante a internação ou até mesmo após a alta e podendo se relacionar com a internação ou com procedimentos hospitalares (ANVISA, 2004b).

As IrAS representam não só um problema de saúde, mas também de economia global. Estima-se que os custos diretos das IrAS nos Estados Unidos possam ser de 5.7 a 6.8 bilhões de dólares (WHO, 2011), sendo grande parte destes custos associados a dias extras de internação. Dados da Organização Mundial de Saúde, levantados entre 1995 e 2010, apontam que em países desenvolvidos, por volta de 7% dos pacientes internados desenvolvem algum tipo de IrAS, enquanto que nos países em desenvolvimento, a média pode alcançar 11%. No Brasil, as IrAS chegam a acometer por volta de 14% dos pacientes (WHO, 2011).

Diversos microrganismos podem estar associados às IrAS, variando entre espécies mais frequentes, de acordo com a população de pacientes afetados, instalações hospitalares e até a região demográfica onde são encontrados (PARR *et al.*, 1999). As bactérias podem ser consideradas principais agentes das IrAS. Apesar de serem encontradas na microbiota normal do homem onde convivem de forma harmônica possuindo um papel protetivo, algumas destas bactérias causam processos infecciosos em hospedeiros debilitados (DAVIS, 1996). Existem ainda bactérias que representam um maior risco por serem naturalmente patogênicas e apresentarem maior virulência. Estas bactérias podem causar infecções localizadas ou epidêmicas, independente do estado imunológico do hospedeiro (ANVISA, 2004a).

Dentre as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* são os principais causadores de IrAS, associados a quadros de infecções nos pulmões, ossos, endocardites e faringites (BUNCE *et al.*, 1992; ANVISA, 2004b).

Dentre as bactérias Gram-negativas, as enterobactérias aparecem como a maior família de importância médica, sendo encontradas em 30% dos isolados clínicos (GAYNES *et al.*, 2005; PELEG *et al.*, 2010). Esta família de bactérias pode ser encontrada naturalmente no trato intestinal humano e de animais, na água, no solo e em plantas, e estão associadas a 50% dos quadros de septicemia e 70% dos quadros de infecção urinária, além de estarem associadas a diversos quadros de infecção intestinal (ANVISA, 2004a).

As principais enterobactérias encontradas tanto em infecções hospitalares como comunitárias são *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.* Além disso, também tem sido observada a presença de *Pseudomonas aeruginosa* que, apesar de não ser classificada como enterobactéria, compartilha da principal característica de virulência entre estes microrganismos que é a presença de fímbrias que auxiliam na aderência a superfícies e membranas mucosas (WEISS, 1971; CONNELL *et al.*, 1996; WITKOWSKA *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* pode ser encontrada no solo, água e microbiota da pele. Este microrganismo se reproduz tanto em ambientes normais como em baixas concentrações de oxigênio, e está geralmente relacionado com infecções de sítio cirúrgico e septicemias em pacientes imunologicamente debilitados ou que possuam dispositivos médicos como cateteres e sondas (PALLERONI, 2010).

O gênero *Escherichia* apresenta espécies praticamente universais do trato intestinal de humanos e outros animais, onde desempenham importantes funções nos hospedeiros (síntese de vitamina K, por exemplo), não sendo normalmente patogênicas (NATARO *et al.*, 1998; KAMADA *et al.*, 2005). Neste gênero, *E. coli* aparece como uma das linhagens mais associadas a infecções, podendo causar diarreia, meningite, septicemia ou infecções urinárias, devido à produção de enterotoxinas. As linhagens de *E. coli* que causam diarreia ainda podem ser classificadas em três grupos: Enteropatogênicas (EPEC - causando diarreia aquosa, característica em crianças), Enterotoxigênicas (ETEC - causando diarreia aquosa do tipo cólera) e Enteroinvasoras (EIEC – causando diarreia que evolui apresentando muco e sangue). Algumas linhagens de EPEC podem causar, com maior frequência, infecções do tipo disentericas e febres generalizadas (ANVISA, 2004a).

Nos últimos anos, o número crescente de IAS, tanto associadas a bactérias quanto a fungos e vírus, tem sido extremamente preocupante. A pressão seletiva gerada pelo uso de uma quantidade cada vez maior de antibióticos tem contribuído

para a seleção de microrganismos resistentes, aumentando consideravelmente a mortalidade e morbidade relacionada a estas infecções (SPELLBERG *et al.*, 2011).

Apesar do considerável aumento de trabalhos sobre a descoberta de novas bactérias resistentes e de algumas linhagens multirresistentes como MRSA (*S. aureus* resistente a metilina e oxacilina) e VRE (Enterococcus resistentes à vancomicina), o número de novos fármacos antimicrobianos introduzidos no mercado tem diminuído significativamente (COOPER *et al.*, 2011). Essa diminuição do número de novos fármacos lançados no mercado, assim como a crescente incapacitação dos antibióticos em uso clínico, principalmente em casos de bactérias multirresistentes tem gerado uma demanda por novos antimicrobianos. Logo, a busca de moléculas alternativas com novos mecanismos de ação tem direcionado o trabalho de inúmeros grupos de pesquisa.

Buscando alternativas aos antimicrobianos que vêm sendo superados pelo surgimento das bactérias resistentes, várias frentes de pesquisa foram criadas, gerando resultados promissores. Dentre as mais recentes alternativas estudadas, destacam-se o uso de bacteriófagos, probióticos, enzimas para edição de genes, vacinas e os peptídeos antimicrobianos (REARDON, 2015). A terapia por bacteriófagos foi proposta em 1920, e desde então apresentam diversas aplicações clínicas, em especial na dermatologia, cirurgias, infecções oftalmológicas, ginecológicas e urológicas. Por meio desta terapia, os bacteriófagos encontram, infectam e matam tipos específicos de bactérias, tendo assim um alto potencial de seletividade (SYBESMA *et al.*, 2016), em potencial inclusive contra bactérias multirresistentes (VIERTEL *et al.*, 2014).

Outra estratégia usada como alternativa aos antimicrobianos consiste no uso de probióticos, organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício a saúde do hospedeiro. São definidos como misturas de bactérias ou esporos não-tóxicos que permitem tratamentos profiláticos e terapêuticos, que podem inclusive ser usados com antibióticos ou outras alternativas, como bacteriófagos (BO *et al.*, 2014; GOLDENBERG *et al.*, 2015).

Outra frente de pesquisa envolve técnicas de edição genética, baseadas na estratégia de bactérias para proteção contra fagos. Normalmente, uma bactéria detecta e destrói fagos gerando pequenas sequências curtas de RNA correspondentes ao RNA do corpo estranho, que servem como marcadores para

enzimas que posteriormente reconhecem estes fragmentos e destroem o DNA deste invasor. Em laboratório, sequências semelhantes têm sido desenvolvidas para desligar genes não de fagos, mas da própria bactéria, incluindo genes de resistência (PARMLEY, 2014; YOSEF *et al.*, 2015)

Outra estratégia usada como alternativa aos antimicrobianos convencionais consiste na busca de novos antígenos. Estes têm sido estudados quanto ao seu potencial de treinar o sistema imune quanto à infecções causadas pelos mais diferentes patógenos. As vacinas são provavelmente o método de combate aos microrganismos mais usado, apresentando grande efetividade, além de poder ser utilizado profilaticamente (FERNEBRO, 2011). O IC43, um antígeno formado a partir de proteínas de fusão da membrana de *P. aeruginosa*, parece ser um promissor candidato à vacina e já está em fases de testes clínicos (DORING *et al.*, 2008). O antígeno de *S. aureus* nomeado V710 derivado da proteína IsdB (*Iron surface determinant B*), foi testado com sucesso tanto em modelo murino quanto em primatas não-humanos (*Macaca mulatta*), e parece induzir uma rápida resposta na produção de anticorpos, gerando um aumento na sobrevivência nos modelos estudados (KUKLIN *et al.*, 2006). Ainda, o IC47 tem sido considerado como um forte candidato à produção de uma nova vacina. Ela está sendo desenvolvida a partir de antígenos derivados de proteínas encontrados nas membranas de pneumococos e tem sido testada com sucesso em modelos animais (GIEFING *et al.*, 2008). Por fim, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) aparecem como promissores candidatos e como modelos para o desenvolvimento de novos anti-infectivos, especialmente devido ao seu amplo espectro de atividade. Os PAMs serão discutidos em maiores detalhes no tópico seguinte.

1.1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

No final dos anos 80, durante experimentos *in vivo* utilizando a rã *Xenopus laevis*, Michael Zasloff se perguntou como estas rãs conseguiam sobreviver a procedimentos cirúrgicos não estéreis, mesmo quando eram colocadas em tanques contaminados com bactérias. Estudando a pele destes anfíbios, ele descobriu pequenos peptídeos secretados em resposta a danos teciduais. Zasloff nomeou estes

peptídeos que possuíam a capacidade de matar bactérias, como magaininas, do hebreu “magain”, que significa escudo (GERRITSEN, 2001).

Esta é a história do primeiro peptídeo antimicrobiano (PAM) descrito há mais de 25 anos. Hoje, mais de 2.500 diferentes PAMs estão descritos no *The Antimicrobial Peptide Database* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), sendo encontrados não só em rãs, mas em todos os reinos de seres vivos, além de vários outros PAMs descritos por ferramentas de bioinformática. A atenção especial que os PAMs recebem deve-se ao seu potencial terapêutico. Estes peptídeos foram descritos como moléculas multifuncionais, baseado em suas atividades contra vírus (YE *et al.*, 2002), fungos (LIN *et al.*, 2008) e bactérias, incluindo as multirresistentes (CAO *et al.*, 2012). Alguns PAMs, como o LL-37 humano, podem agir destruindo diretamente os microrganismos, porém sua ação principal ocorre por meio da modulação da resposta imune, de forma a resolver a infecção (ALALWANI *et al.*, 2010).

Além de suas atividades biológicas, os PAMs apresentam características próprias, tais como serem tipicamente formados por pequenas cadeias de aminoácidos (10 a 50 aa) e por possuírem, de forma geral, grandes quantidades de resíduos hidrofóbicos e catiônicos (KAMYSZ *et al.*, 2003). Dentre as diversas classificações dos PAMs, a mais comum tem sido baseada em famílias divididas por padrões de dobramento estrutural, uma vez que uma baixa similaridade é observada entre as sequências de aminoácidos entre os grandes grupos (HWANG *et al.*, 1998). Dentre as abordagens de classificação propostas, destaca-se a que divide os PAMs em quatro famílias baseados em suas estruturas secundárias: α , β , $\alpha\beta$ e não $\alpha\beta$ (WANG, 2015).

De modo geral, em relação a sua atividade antibacteriana, os peptídeos antimicrobianos podem ser bactericidas ou bacteriostáticos, inibindo vários processos-chave na célula bacteriana por múltiplos mecanismos de ação, amplamente revisados (JENSSEN *et al.*, 2006; MOJSOSKA *et al.*, 2015). Os diferentes modelos propostos envolvem a interação dos PAMs com a membrana bacteriana (Figura 1A), o que contribui para alterações na estrutura da membrana por afinamento, formação de poros ou curvaturas alteradas. Estas modificações levam, de forma geral a diminuição do gradiente de prótons, o que leva a inibição da produção de ATP e do metabolismo celular, levando a morte celular.

No modelo de poro em barril, os peptídeos inserem-se perpendicularmente, porém alinhando-se lateralmente como tiras de um barril, com as regiões hidrofílicas voltadas para o poro e as hidrofóbicas interagindo com a membrana (Figura 1B). No modelo de poro toroidal (Figura 1C) os peptídeos inserem-se perpendicularmente na bicamada lipídica, com as regiões hidrofílicas associando-se com a cabeça de fosfolipídio, e as regiões hidrofóbicas ligam-se ao centro da molécula de lipídeos, curvando a membrana e formando um poro. No modelo de poro toroidal desorganizado (Figura 1D), os peptídeos se localizam próximos ao centro de um poro formado, com outras moléculas posicionadas próximas a borda do poro. Por fim, no modelo de tapete (Figura 1E) os peptídeos agregam-se paralelamente na membrana, cobrindo áreas como um tapete, que termina com uma atividade semelhante a de um detergente, causando a formação de micelas e poros na membrana.

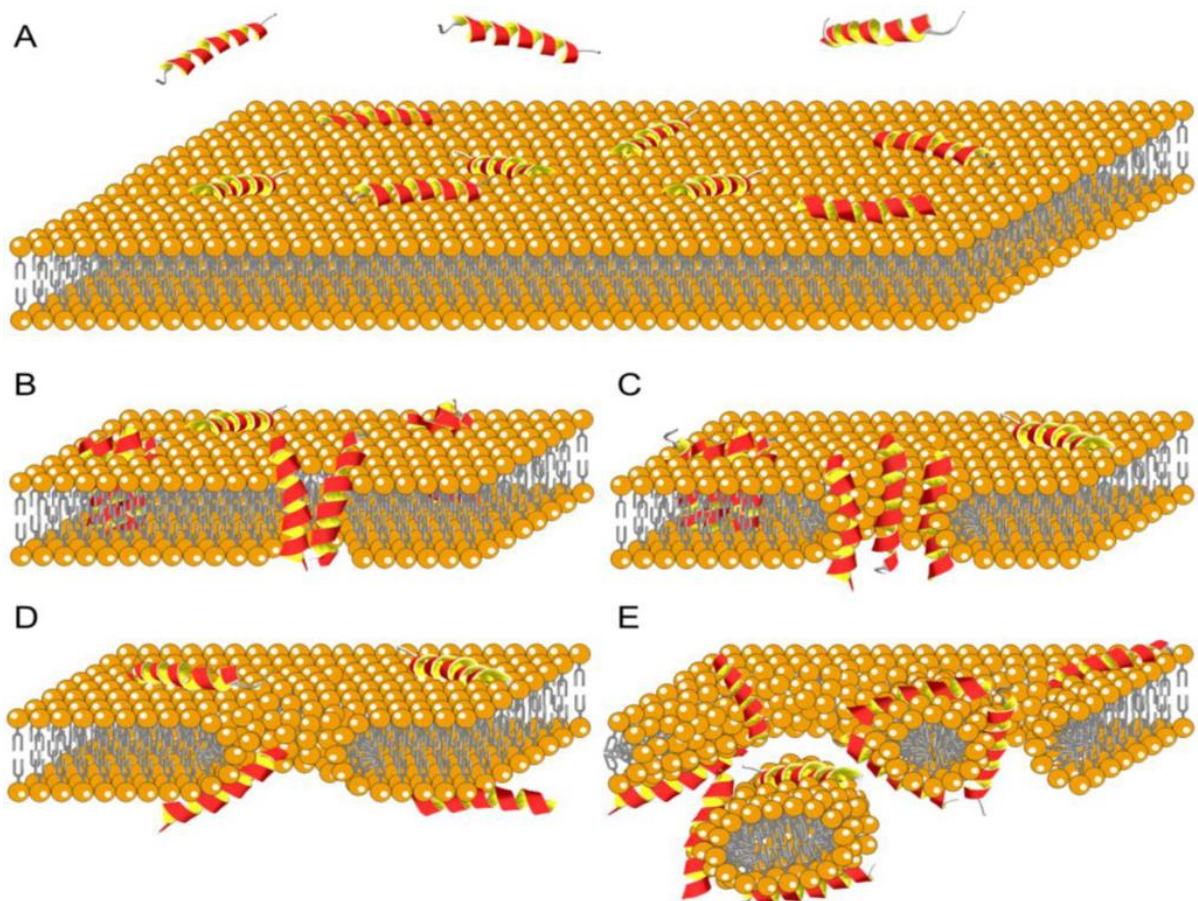


Figura 1. Mecanismos propostos mais estudados para interação de peptídeos antimicrobianos com membranas bacterianas. A- Interação inicial dos peptídeos antimicrobianos. B- Modelo de disposição em barril. C- Modelo de poro toroidal. D- Modelo de poros toroidais distorcidos. E- Modelo de tapete, ou semelhante a detergente. Adaptado de Mojsoska e Jenssen, 2015.

Apesar da habilidade de lizar as membranas bacterianas, diversos relatos na literatura apontam que os PAMs podem cruzar a membrana bacteriana sem rompê-la, exercendo sua ação antimicrobiana em alvos intracelulares (MOJSOSKA *et al.*, 2015). Dentre estes alvos, destacam-se inibição da formação da parede celular (SASS *et al.*, 2010), inibição da replicação do DNA (FRIEDRICH *et al.*, 2001) e a ligação ao DNA e RNA (PARK *et al.*, 1998).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser encontrados em uma enorme diversidade de seres vivos, em sua forma ativa ou como parte de proteínas maiores, que ao serem clivadas, dão origem a eles. Estes peptídeos possuem grande diversidade de sequências e estruturas, que se refletem tanto em seus mecanismos de ação diversos quanto em funções não-antimicrobianas que eles podem desempenhar (SILVA *et al.*, 2011). Nos últimos anos, foi proposto que uma única estrutura de peptídeo pode estar associada à múltiplas funções (FRANCO, 2011).

Desta forma, alguns destes peptídeos, como o Cn-AMP1, parecem desempenhar papel imunomodulatório nos mamíferos (SILVA *et al.*, 2012), enquanto outros, como as albuminas 2s, estão associados às proteínas de reserva energética em plantas (MARIA-NETO *et al.*, 2011). Outros peptídeos, como as ciclótides, exercem ainda atividade inseticida nas plantas em que são encontradas, inibindo assim a predação das mesmas (PINTO *et al.*, 2012). As defensinas, também encontradas em plantas, podem apresentar atividade antiviral, antibacteriana, controlar o desenvolvimento e inibir enzimas digestivas de predadores.

Apesar do grande número de peptídeos descritos, com as mais diversas atividades descritas, como o Pa-MAP 2, somente alguns alcançaram os estágios de testes clínicos (Tabela 1), sendo que a magainina, usada provavelmente para tratamento de úlceras de paciente com pé diabético, encontra-se na fase 3, e será submetida na segunda metade de 2017 para registro na Agência Europeia de Medicamentos (MANGONI *et al.*, 2016).

De fato, o desenvolvimento comercial dos PAMs, ainda que para aplicações simples, tem sido muito limitado (BROGDEN *et al.*, 2011). Isto deve-se em parte ao fato de que muitas questões, como mecanismo de ação, eficácia e segurança, ainda precisam ser respondidas antes que estes peptídeos sejam implementados para o uso clínico (WIMLEY *et al.*, 2011). Responder a estas questões requer extensivos estudos funcionais e estruturais, e estes estudos são restringidos em parte devido à produção

de peptídeo puro. Realmente, a disponibilidade é o maior fator que impede o amplo uso destas moléculas. Tanto a pesquisa básica como clínica requerem uma grande quantidade de peptídeos altamente purificados e que esteja prontamente disponível, mas de forma custo efetiva (LI, 2009).

Tabela 1. Peptídeos antimicrobianos em teste clínico. Disponível em 9/2016 nos sítios <https://clinicaltrials.gov> e <http://adisinsight.springer.com/>.

Produto	Descrição	Indicação	Fase	Companhia (Localização)
Pexiganan (Magainina)	PAM linear isolado de <i>Xenopus laevis</i>	Úlcera do pé diabético/ Infecções de pele e mucosas	3/1	Dipexium Pharma (White Plains, Nova York)
Omiganan	PAM sintético derivado da indolicidina	Acne rosácea/ Neoplasia intraepitelial vulvar	3/2	BioWest Therapeutics/Maruho (Vancouver)
DPK-060	PAM humano derivado de quininogênio	Otite, infecções dérmicas	3	Pergamun (Suécia)
EA 230	Tetrapeptídeo imunomodulatório	Sepse	2	Exponential Biotherapies USA
Duramycina (Leucopeptin)	Lantibiótico de classe II	Sintomatologia de Fibrose cística	2	Santa Cruz Biotechnology (EUA)
Novexatin (NP 213)	Peptídeo catiônico cíclico sintético	Onicomicose	2	NovaBiotics (Aberdeen, Inglaterra)
Lytixar (LTX-109)	Peptídeo sintético com ação na membrana bacteriana	<i>S. aureus</i> multiresistente (MRSA)	2	Lytix Biopharma (Oslo)
HB1345	Lipohexapeptídeo sintético	Acne	1	Helix BioMedix (EUA)
IMX942	Pentapeptídeo derivado de indolicidina	Infecções hospitalares	1	Inimex Pharmaceuticals (Canadá)
Deoxyactagardina B (NVB302)	Lantibiótico de Classe B	<i>C. difficile</i>	1	Novacta (Welwyn Garden City, Inglaterra)
NZ2114	Peptídeo derivado de plectazina	<i>S. aureus</i> multiresistente	1	Novozymes (Dinamarca)
POL7080	Peptídeo sintético cíclico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Poliphor (Suíça)

De forma geral, o processo de isolamento a partir de recursos naturais tem sido trabalhoso, requerendo muito tempo e resultando em baixa quantidade de peptídeos que não correspondem às demandas industriais (LI, 2009; PARACHIN *et al.*, 2012). A síntese química, apesar de muito eficiente, pode ser complexa e relativamente cara para peptídeos maiores, e por isso não parece ser a plataforma ideal para produção de todos os PAMs em larga escala (ROGIER A GAISER, 2011). Felizmente, a tecnologia do DNA recombinante oferece meios econômicos para produção de proteínas, de forma que muitos peptídeos foram expressos com sucesso por esta técnica, em diferentes organismos hospedeiros (PARACHIN *et al.*, 2012).

Como revisado anteriormente (PARACHIN *et al.*, 2012), os peptídeos antimicrobianos são produzidos em três sistemas principais: bactérias, fungos e recentemente, plantas. A seleção do sistema de expressão pode ser feita, dentre outros fatores, levando em consideração o tamanho do PAM, a localização intracelular ou possível secreção, o enovelamento adequado e a necessidade de modificações pós-traducionais, como a formação de pontes dissulfeto e glicosilação.

Uma vez que são geralmente tóxicos para o sistema heterólogo em que estão sendo produzidos, usualmente os peptídeos antimicrobianos são expressos em conjunto com uma proteína carreadora, que pode agir tanto reduzindo a toxicidade do peptídeo como inibindo a degradação por enzimas proteolíticas do hospedeiro (LI, 2011). Os PAMs podem ainda ter uma sequência anexada visando facilitar a purificação, como uma cauda de histidina ou um domínio de ligação à quitina (ZHANG *et al.*, 1998; LI, 2009; SUN *et al.*, 2010). A remoção destas sequências ou a das proteínas carreadoras, após a expressão, pode ser feita de forma enzimática ou química (FENG *et al.*, 2012; PARACHIN *et al.*, 2012).

Todo este processo costuma ser muito dispendioso, especialmente quando muitos passos de purificação são necessários, ou quando são requeridos reagentes de alto custo, enzimas ou resinas de afinidade (BANKI e WOOD, 2005). Uma alternativa que reduz dramaticamente o preço de produção e purificação de PAMs é a combinação de duas tecnologias: o isolamento não cromatográfico pela adição de um domínio de polipeptídeos semelhantes à elastina (*elastin-like peptides* - ELPs) e a separação do peptídeo por uma inteína, uma sequência proteica que auto excisa de uma pré-proteína. Estas duas tecnologias serão abordadas nos tópicos seguintes, após discussão sobre o peptídeo escolhido para o presente trabalho, o Pa-MAP 2.

1.1.1 Peptídeos anticongelantes e Pa-MAP 2

Dentre a proposta de peptídeos multifuncionais, destacam-se os peptídeos encontrados em alguns peixes polares teleósteos, quando expostos a temperaturas abaixo de 0 °C, que são úteis para impedir a formação de cristais de gelo que destruiriam as células. Estes peptídeos são conhecidos como peptídeos anticongelantes (AFPs), sendo a família AFP 1 comumente encontrada no linguado polar (*Pleuronectes americanus*), dos quais foi isolado peptídeo AFP HPLC-6 (GONG *et al.*, 1996).

A partir do peptídeo AFP HPLC 6, diversos derivados sintéticos foram desenvolvidos, baseado no fato de que os PAMs e os AFPs compartilham propriedades estruturais e físico-químicas, como a taxa de aminoácidos hidrofóbicos, momento hidrofóbico e composição específica de aminoácidos. Dentre estes derivados sintéticos, foi-se obtido o peptídeo Pa-MAP 2 por meio da organização dos resíduos de aminoácidos, criando uma sequência palindrômica para favorecer a formação de uma estrutura secundária em α -hélice, direcionando as cadeias laterais para um polo inferior com cargas e um polo superior hidrofóbico (Figura 2). Além destas modificações, foram inseridas na sequência de seis lisinas e quatro leucinas, e o número total de aminoácidos foi reduzido, de 38 para 28 aminoácidos (MIGLIOLO *et al.*, 2016).

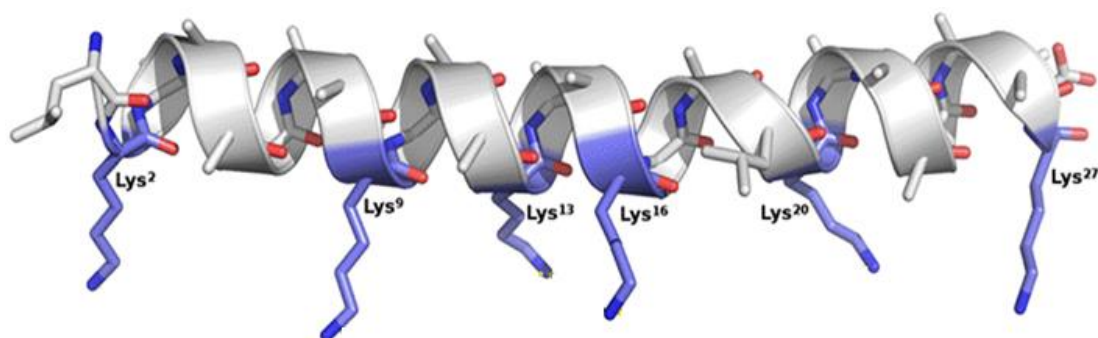


Figura 2 - Modelo tridimensional do peptídeo Pa-MAP 2. Modelo obtido utilizando o programa Modeller 9.13 (<https://salilab.org/modeller>). Em azul, evidencia-se a região catiônica e em branco a região hidrofóbica da hélice.

A sequência final gerada para o peptídeo Pa-MAP 2 (LKAAAAAKLAAKAAKAALKAAAAAKL) foi então sintetizada pela metodologia Fmoc e teve sua atividade antimicrobiana testada, *in vitro*, apresentando-se ativa em meio Muller-Hinton (MH) nas concentrações de 3 μ M contra *E. coli* ATCC 8739, *Acinetobacter baumannii* linhagem 215 (Ab 215) e *Acinetobacter baumannii* linhagem 41 (Ab41), porém sem apresentar atividade contra *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (MSSA) ou *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) nas concentrações testadas (MIGLIOLO *et al.*, 2016).

Para investigar a toxicidade contra células de mamíferos *in vitro*, o Pa-MAP 2 também foi avaliado contra diversos tipos celulares, não apresentando atividade deletéria até as concentrações de 102 μ M em eritrócitos humanos e em monócitos RAW 264 (macrófagos leucêmicos de camundongo) e 40 μ M em células musculoesqueléticas L6 de rato (*Rattus norvegicus*) e 25 μ M em células Vero (epitélio do rim de *Chlorocebus sabaeus*), aparecendo assim com reduzido potencial danoso

à células de mamíferos, o que facilita sua introdução na terapêutica (MIGLIOLO *et al.*, 2016).

Para confirmar *in vivo* os efeitos observados em modelos *in vitro*, o peptídeo Pa-MAP 2 foi utilizado nas concentrações de 1 e 2 mg.kg⁻¹, para tratar camundongos previamente injetados por via intraperitoneal com doses subletais de *E. coli*. Após um período de 48 h, os animais sem tratamento apresentaram taxa de sobrevivência de 60%, enquanto aqueles tratados com ampicilina, utilizada como controle positivo, ou ambas concentrações do Pa-MAP 2 apresentaram taxa de sobrevivência de 100%. Observou-se ainda um maior ganho de peso, após o tratamento, entre os animais tratados com Pa-MAP 2 em relação aos tratados com ampicilina (MIGLIOLO *et al.*, 2016).

1.2. Inteínas

As inteínas são elementos internos de proteínas que se auto excisam de sua proteína hospedeira, catalisando a ligação das sequências flanqueadas (exteínas) com uma ligação peptídica. Este processo pós-traducional não é dependente de cofatores ou enzimas, e pode ser chamado de *splicing* de proteínas, em analogia ao *splicing* dos íntrons do pré-mRNA (ELLEUCHE *et al.*, 2010). As inteínas foram primeiramente identificadas em 1990, por um grupo no Japão durante estudos com a proteína VMA1, uma H⁺-ATPase da membrana do vacúolo de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta proteína apresentava uma massa estimada de 67 kDa. Porém o sequenciamento do seu gene predizia um polipeptídeo com 118 kDa. Além disso, tanto o N-terminal quanto o C-terminal da proteína predita apresentavam alta similaridade com outras H⁺-ATPases, ao contrário de uma região interna de 454 resíduos de aminoácidos que apresentou homologia com uma endonuclease. Esta inserção continuava presente ao estudar-se o mRNA processado, sugerindo que a sequência era expressa em sua totalidade e depois excisada (HIRATA *et al.*, 1990).

De fato, esta hipótese foi confirmada ainda no mesmo ano, por um grupo americano, para o gene TFP1, que codificava uma proteína de H⁺-ATPase de 69 kDa, correspondentes a parte inicial e final da sequência de DNA, enquanto a parte central codifica uma proteína de 50 kDa, que é excisada pós-traducionalmente, religando a sequência inicial e final da proteína (KANE *et al.*, 1990). Esta remoção do segmento

interno, seguida pela formação de uma ligação peptídica entre os segmentos flanqueadores distingue o *splicing* de proteínas de uma auto-proteólise simples (Figura 3) (PERLER *et al.*, 1994). Mais de 500 inteínas já foram reportadas em todos os três domínios da vida (eubacteria, archaea e eukaria) e estão organizadas no InBase (<http://tools.neb.com/inbase/index.php>), um banco de dados que armazena nomes, sequências e outras informações relevantes de cada inteína (PERLER, 2002). O nome de uma inteína inclui a designação da espécie e do gene em que foi descrita, abreviado para um padrão de três letras (PERLER *et al.*, 1994). Por exemplo, a inteína derivada resultante da DNA polimerase de *Thermococcus litoralis* é nomeada de inteína *Tli Pol*. Se um gene possuir múltiplas inteínas, elas são nomeadas com números, ex. inteína *Tli Pol 1* e inteína *Tli Pol 2*.

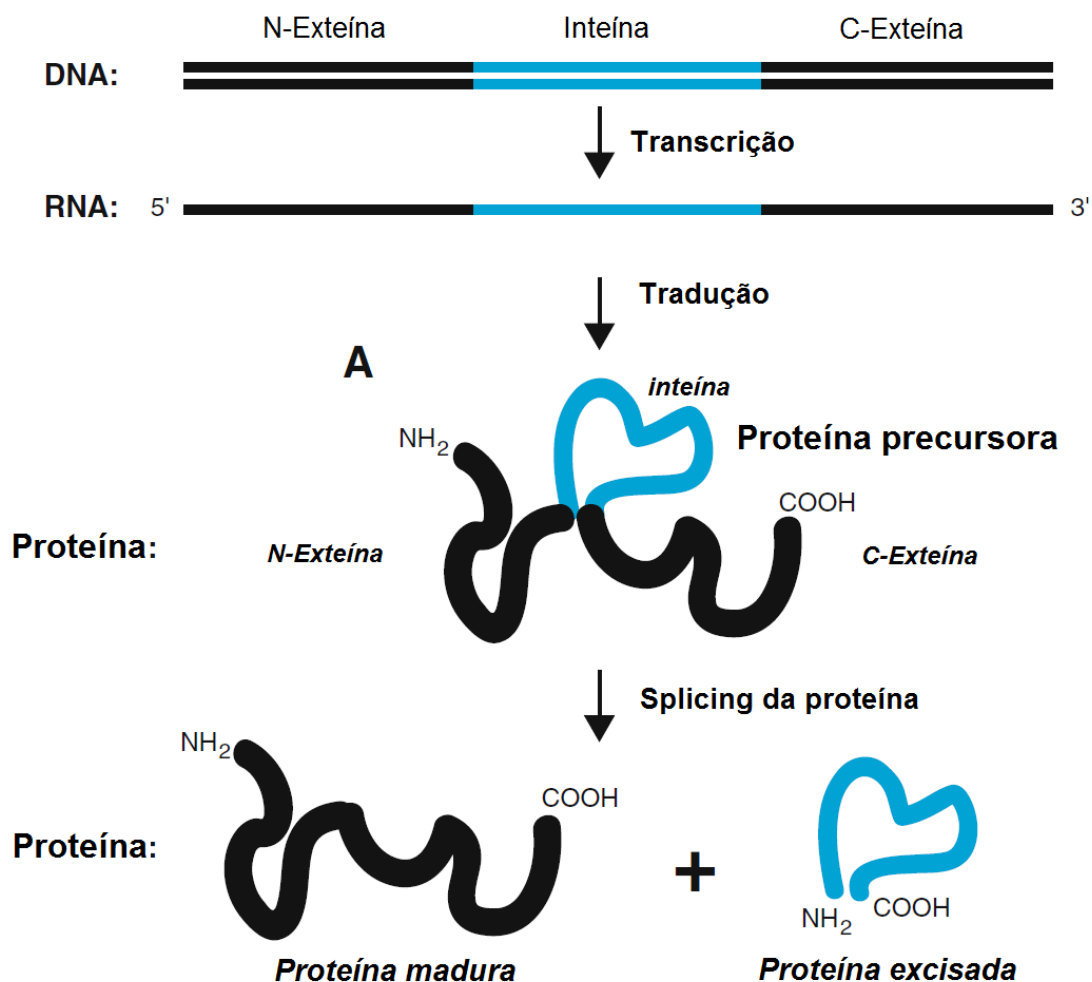


Figura 3. Esquema de *splicing* de proteínas. A sequência codante pode ser transcrita na forma de RNAm e traduzida na forma de um precursor proteico não funcional, que sofre um rearranjo autocatalítico, no qual a inteína é excisada e as exteínas unidas, gerando assim a proteína madura. Adaptado de (ELLEUCHE *et al.*, 2010).

Quanto a sua função biológica, apesar dos genes de inteína representarem em sua maior parte DNA egoísta, trabalhos recentes sugerem que a clivagem condicional pode ocorrer em sistemas naturais contribuindo para regular a função e ativação de proteínas (NOVIKOVA *et al.*, 2014; PERLER *et al.*, 2014). Para fins práticos, as inteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos sendo estes as grandes inteínas, que contêm um grupo central de endonuclease de direcionamento (*homing endonuclease*) e mini-inteínas, que não apresentam este grupo. As endonucleases de direcionamento promovem a transferência lateral de sua própria região codante em um processo de recombinação conhecido como *homing*, porém os sítios de reconhecimento destas enzimas são extremamente raros (JASIN, 1996), apesar de que estas endonucleases suportam um determinado grau de degeneração (ROBERTS *et al.*, 2003).

A presença do domínio de *splicing* e de endonuclease faz das inteínas proteínas bifuncionais. Já foi demonstrado, porém, que o domínio de endonuclease não está envolvido no processo de *splicing*, permitindo assim a construção de mini-inteínas funcionais. De forma geral, as inteínas possuem baixa similaridade de sequência, com resíduos conservados principalmente nos N e C-terminais. A maior parte das inteínas começa com serina (Ser) ou cisteína (Cys), terminando em asparagina (Asn) ou histidina-glicina (His-Gly). O primeiro aminoácido seguinte a inteína é invariavelmente Ser, Thr ou Cys, enquanto que o resíduo que precede a inteína não é conservado (ELLEUCHE *et al.*, 2010). Foi demonstrado, porém que os outros resíduos antecedentes ou sucessores da inteína podem acelerar ou retardar o processo de *splicing* (AMITAI *et al.*, 2009).

O processo de *splicing* acontece de forma rápida, por meio do ataque de quatro nucleófilos (ELLEUCHE *et al.*, 2010). O processo começa com uma mudança N-O se o primeiro resíduo da inteína for Ser, ou N-S, se o primeiro resíduo for Cys. Esta mudança induz a formação de uma ligação tio éster na junção entre a N-exteína e a inteína (Figura 4A). Em seguida a ligação tio éster é atacada pelo grupo OH ou SH do primeiro resíduo na exteína ligado ao C-terminal, que pode ser Cys, Ser ou Thr. Isto leva a uma transesterificação, que transfere o N-terminal da inteína para a cadeia lateral do primeiro resíduo do C-terminal da exteína (Figura 4B). Em seguida, a ciclização do resíduo Asn conservado no C-terminal da inteína libera a inteína e liga as exteínas por uma ligação tio éster (Figura 4C). Por fim, ocorre um rearranjo da

ligação tio éster para uma ligação peptídica, por uma mudança S-N ou O-N (Figura 4D).

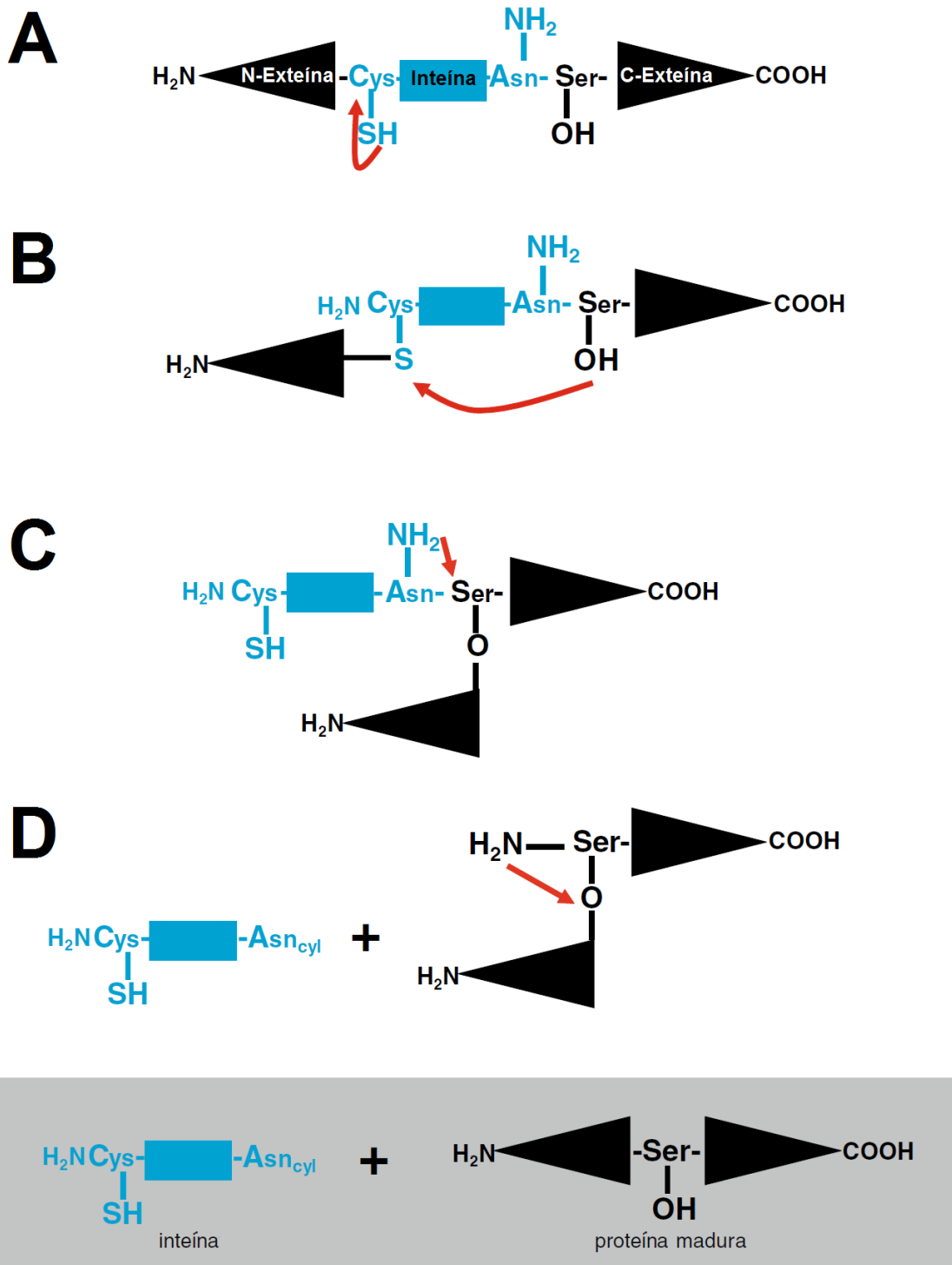


Figura 4. Mecanismo de ação básico das inteínas. A) Passo 1 - Rearranjo N-S Acil da ligação peptídica no N-terminal da inteína. B) Passo 2 - Transesterificação entre o resíduo nucleofílico da C-exteína e da ligação tio éster. C) Passo 3 - Ciclização da Asn e clivagem da ligação peptídica. D) Passo 4 - Mudança N-O acil e rearranjo da ligação éster para ligação peptídica. Adaptado de Elleuche, *et al* 2010.

A clivagem sítio específico das junções inteína-exteína podem ser alcançadas por mutação dos resíduos conservados da inteína. Mutações no resíduo de Asn no C-terminal da inteína impede os passos 3 e 4 da reação de *splicing*, porém resulta na clivagem do N-terminal. Desde que o primeiro passo ocorra, a ligação tio éster pode hidrolisar-se espontaneamente, separando a N-exteína da inteína ainda ligada a C-exteína (ELLEUCHE *et al.*, 2010). Mutações no primeiro resíduo conservado da inteína impedem os passos 1, 2 e 4 da reação de *splicing*, conduzindo, porém, a clivagem do C-terminal. Nestas inteínas, o passo de ciclização de Asn continua ocorrendo, separando a C-exteína da porção contendo a inteína ligada a N-exteína (ELLEUCHE *et al.*, 2010). A clivagem controlada de cada um dos terminais das inteínas possibilitou um grande número de aplicações em biotecnologia, dentre as quais a expressão controlada de proteínas tóxicas, a ciclização de proteínas, a incorporação de aminoácidos não canônicos e o monitoramento de interação entre proteínas *in vivo*, além da purificação de proteínas (SHAH *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, um grande número de marcações de afinidade, ou proteínas de fusão, foi desenvolvido. Fato este que simplificou grandemente o isolamento de proteínas recombinantes dos cultivos microbianos. Estas marcas são geralmente unidas com as proteínas de interesse no nível de DNA, e podem ainda ser usadas para aumentar a solubilidade e estabilidade das proteínas alvo (TERPE, 2003). Um dos problemas deste método é que a proteína de fusão geralmente precisa ser clivada da proteína de interesse, o que é usualmente realizado por endoproteases sítio-específicas (ELLEUCHE *et al.*, 2010). O método de clivagem enzimática acaba por se tornar um dos maiores custos associados à produção de proteínas recombinantes, além de poder interferir ainda na atividade biológica do composto purificado. As inteínas aparecem então como alternativa, com potencial amplamente descrito para purificação de diferentes tipos de proteínas recombinantes (LI *et al.*, 2012; ALBERTSEN *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2013). Wu e colaboradores demonstraram o potencial das inteínas ao expressar uma construção formada por uma proteína de superfície celular (INT) ligada a proteína GFP pela inteína ativada por pH ou tiol Sce VMA. Desta forma, após a expressão e direcionamento para o exterior celular, a inteína pode ser ativada e a GFP, por conseguinte liberada em solução. As células, ainda intactas são removidas por centrifugação (WU *et al.*, 2011).

As proteínas MMP13 e eGFP também foram expressas ligadas a inteína *Sce* VMA ativada por pH, assim como ligadas a grupamento de ubiquitina ou SUMO2, para aumentar a solubilidade, e ligadas também a uma cauda de histidina. Após a expressão em *E. coli*, as proteínas recombinantes foram ligadas à resina de níquel e as inteínas ativadas, de forma que as proteínas foram eluídas com grau de pureza superior a 90% (WANG *et al.*, 2012). Este método também foi útil para purificar a toxina gelonina, fusionada a inteína *Ssp* DNA B e ligada a um domínio de ligação de quitina (CBD). Neste trabalho, a inteína foi usada também como par de fusão, inibindo a toxicidade do peptídeo. Após a expressão, o lisado total clarificado foi aplicado em coluna de quitina, e a inteína ativada por mudança no pH, sendo em seguida a toxina eluída com alto grau de pureza (GUO *et al.*, 2004).

Diversos peptídeos antimicrobianos também já foram obtidos com o uso de inteínas, como o peptídeo SMAP-29, semelhante à catalecidinas, que foi fusionado em uma construção ao N-terminal e em outra ao C-terminal. O lado oposto da inteína usada, *Sce* VMA, apresentava um domínio de ligação à quitina (CBD). A ligação do peptídeo ao N-terminal foi altamente tóxica, impedindo o desenvolvimento da bactéria hospedeira *E. coli*, enquanto que a fusão ao C-terminal anulou a toxicidade do peptídeo. Este peptídeo foi purificado por coluna de afinidade de quitina e a inteína ativada pela adição de DTT. Após a liberação e eluição do peptídeo, o mesmo foi testado e a atividade antibacteriana inicial foi reestabelecida (MORASSUTTI *et al.*, 2005). Este mesmo peptídeo foi também produzido pelo mesmo método anteriormente em tabaco, indicando o potencial desta técnica também para sistemas vegetais transgênicos (MORASSUTTI *et al.*, 2002).

Outros peptídeos também expressos ligados a inteína VMA e a CBD foram a dermicidina, (HONG *et al.*, 2010); o peptídeo antibacteriano e antitumoral CM4, uma cecropina (CHEN *et al.*, 2008); e as defensinas ricas em ligações dissulfídicas, HBD2, RBD1e rBin1B. Neste último trabalho, após a expressão, os peptídeos foram aplicados na coluna de quitina, oxidados para formação das pontes dissulfídicas e então liberados da inteína por mudança de pH. Estes peptídeos mostraram-se ativos contra bactérias, o que indica um dobramento adequado (DIAO *et al.*, 2007). Por fim, o peptídeo K2-CRAMP-18, uma catalecidina, foi ligado à inteína *Vch* CPD e a uma cauda de histidina. Após a expressão, as células de *E. coli* foram submetidas a pulsos de ultrassom e clarificadas, e o sobrenadante aplicado em coluna de níquel. Ainda na

coluna, a inteína foi ativada com IP6, e o peptídeo eluído e purificado em um segundo passo em coluna hidrofóbica C18. O peptídeo resultante apresentou atividade bacteriana semelhante ao mesmo peptídeo produzido por síntese química (WRIGHT *et al.*, 2012).

Somados a vários outros na literatura, estes dados apontam o potencial das inteínas para purificação de peptídeos em sistemas comerciais, em pequena e larga escala. De fato, a simplicidade propiciada por este método, que requer poucos passos de isolamento e uma quantidade reduzida de reagentes, sugere que as inteínas podem ser usadas para diminuir o custo de produção de proteínas recombinantes (BANKI e WOOD, 2005).

A empresa *New England Biolabs* (NEB) lançou em 2005 o primeiro sistema comercial de purificação baseado na inteína *Sce VMA*, com uma mutação que induz a clivagem do N-terminal na presença de DTT ou β -mercaptoetanol. Este sistema foi combinado ainda ao domínio de ligação de quitina (CBD) para formar o produto *IMPACT system (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)*, que foi usado para purificação em pequena escala de diversas proteínas (BANKI e WOOD, 2005). Este sistema foi recentemente modificado para indução da clivagem também do C-terminal, de forma que a proteína recombinante de interesse pode ser fusionada tanto ao N quanto ao C-terminal, otimizando assim a expressão. Outras inteínas lançadas pela NEB como sistemas comerciais foram as mini inteínas *Mxe GyrA*, a *Ssp DnaB* e a *Mth Rre*, que podem ser induzidas pela adição de reagentes contendo um grupamento Tiol, ou por mudanças no pH e temperatura (BANKI e WOOD, 2005; ZHAO *et al.*, 2016).

O grande desafio a respeito dos atuais sistemas de expressão está relacionado ao custo das resinas usadas para purificação, sejam elas de afinidade a cauda de histidina ou ao domínio de ligação de quitina (BANKI e WOOD, 2005; LIN *et al.*, 2015). Este custo pode ser diminuído consideravelmente com o uso de métodos não cromatográficos de isolamento em conjunto com as inteínas, como os métodos de PHB-inteína ou ELP-inteína.

1.3. ELPs e outros métodos de purificação não-cromatográficos

A cromatografia de afinidade consiste em um dos métodos mais utilizados para o isolamento de proteínas recombinantes de forma rápida em escala laboratorial, todavia seus custos parecem ser proibitivos em larga escala. Isto se deve em especial ao custo da resina de afinidade, representando assim a maior parte do preço final de mercado da proteína desejada (MEYER *et al.*, 1999). Algumas resinas baseadas no reconhecimento por anticorpos, como a FLAG (Sigma) e a TAP (GE) podem chegar a 10.000 dólares americanos por grama de resina, enquanto outras resinas imobilizadas em agarose, como Ni-NTA ou *Protein A* apresentam um custo médio de 500 dólares por grama. Este custo pode ser parcialmente compensado pelo fato de que a maioria das resinas pode ser reutilizada e o preço para compras em grandes quantidades ser amortecido (FONG, WU, *et al.*, 2010). Entretanto, este valor ainda continua muito alto para a produção industrial, especialmente de proteínas antimicrobianas.

Em resposta a este desafio, nos últimos anos, vários métodos não cromatográficos para purificação de proteínas foram desenvolvidos, e vários estão em desenvolvimento, dos quais três se destacam: a anexina B1, o PHB e os ELPs. A anexina B1 consiste em uma sequência de 347 aa que pode ser precipitada diferencialmente do lisado de células pela adição de Ca^{2+} a 20mM. Por meio deste método, a proteína desejada pode ser fusionada ao C-terminal da anexina que, depois de removida de solução, é clivada e precipitada novamente, de forma que a proteína de interesse permaneça em solução (DING *et al.*, 2007). Apesar da interleucina 2 humana e a cadeia de baixo peso da uroquinase terem sido expressas e purificadas por este método (DING *et al.*, 2007), não existem relatos da expressão de PAMs por esta técnica na literatura.

No método por PHB, um sistema de afinidade em microescala pode ser criado dentro de cada bactéria. O PHB (polihidroxibutirato) consiste em um polímero composto de carboidratos que se comporta como uma matriz de afinidade para as fasinas, proteínas que se ligam fortemente e especificamente na superfície dos grânulos de PHB, formados em condições de estresse fisiológico (GILLIES *et al.*, 2009). A proteína de interesse é expressa fusionada à fasina que, após a expressão, se liga de forma covalente aos grânulos de PHB. Em seguida, o PHB é precipitado e a proteína de interesse é clivada, enquanto a fasina ainda está ligada aos grânulos de

PHB. Desta forma, a proteína permanece em solução, enquanto o PHB é novamente precipitado e removido (BANKI, GERNGROSS, *et al.*, 2005). Yu e colaboradores reportaram em 2008 a expressão do peptídeo LL-37 por meio da ligação a um PHB (YU-JIONG, 2008).

No sistema por ELP (peptídeos semelhantes a elastina), repetições múltiplas do pentapeptídeo VPGXG (de 20 à 330 repetições) são fusionados à proteína de interesse (HASSOUNEH *et al.*, 2010). Após a expressão, as células bacterianas são lisadas e a temperatura aumentada acima da temperatura de transição (T_t), de forma que os ELPs se agregam (Figura 5) e são separados diretamente do meio de cultura por centrifugação ou filtração. Os agregados de ELP podem ser ressuspensos em um tampão com grande força iônica em temperatura menor que T_t , voltando então ao estado solúvel. Neste estado, a proteína pode então ser clivada quimicamente, enzimaticamente ou por via de uma inteína. Um novo aumento de temperatura pode ser realizado, e os ELPs agregam-se novamente, de forma que a proteína de interesse permanece em solução (FONG, WU, *et al.*, 2010).

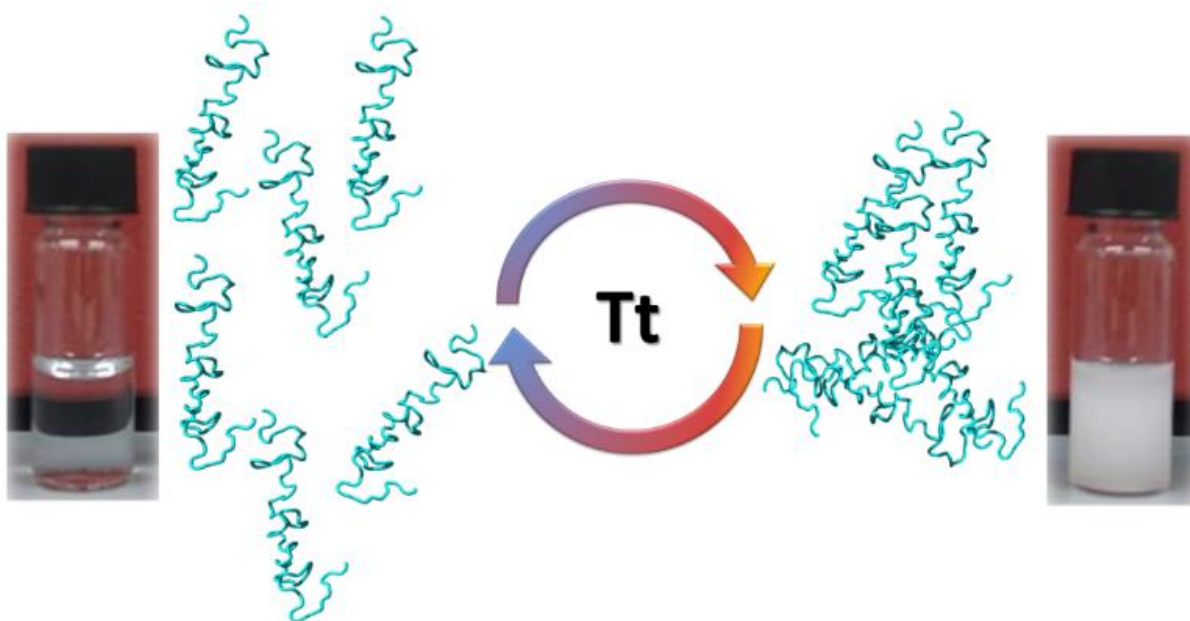


Figura 5 - Transição inversa de fase reversível. Os ELPs permanecem em solução abaixo da temperatura de transição (T_t), mas se agregam e se tornam insolúveis acima da temperatura de T_t , podendo ser coletados por centrifugação ou retidos por filtração, permitindo assim a separação dos mesmos de outras proteínas presentes no meio. Após este passo, os ELPs precipitados podem ser ressolubilizados em tampão apropriado em temperatura abaixo de T_t . Este procedimento pode ser usado para purificar proteínas recombinantes fusionadas aos ELPs. O aumento da turbidez pode ser monitorado espectrofotometricamente, como ilustrado nas cuvetas. A cuvette da esquerda contém os ELPs solúveis, enquanto que a cuvette da direita contém ELPs insolúveis, causando um aumento na turbidez.

O efeito de agregação/desagregação dos ELPs também pode ser iniciado ao se variar a concentração de sais, especialmente por íons cosmotrópicos, ou pelos efeitos combinados da temperatura e concentrações de sais (FONG *et al.*, 2009). Por fim, dois outros fatores importantes que se relacionam à Tt são o número de repetições do pentapeptídeo básico e a composição do Xaa na sequência, que pode ser um único aminoácido (geralmente valina) ou uma combinação de diferentes aminoácidos, como Val:Ala:Gly em uma determinada taxa (FLOSS *et al.*, 2010).

Para cada proteína alvo, a temperatura de transição e a composição de aa dos ELPs devem ser empiricamente determinadas, levando em consideração a quantidade de proteína a ser produzida, bem como parâmetros de estabilidade e custo de reagentes devem ser levados em consideração (CHILKOTI, 2002). Valores de Tt acima de 37 °C são comumente selecionados, uma vez que o peptídeo fusionado continua solúvel quando em cultura, porém é possível ajustar a Tt para valores mais baixos que o da cultura, de forma que os ELPs se agreguem, ficando protegidos da degradação por proteases (CHILKOTI, 2002). Se após a cultura não são observados agregados quando acima da Tt, possivelmente devido à baixa expressão das proteínas alvo, uma solução de ELPs pode ser adicionada, aumentando assim a formação de agregados e a recuperação das proteínas alvo (HASSOUNEH *et al.*, 2010).

Muitos sistemas biológicos podem ser usados para produção de proteínas fusionadas a ELPs, como fungos, plantas e bactérias. Em fungos, somente um relato de expressão de ELPs tem sido atualmente encontrado na literatura, apesar de que se refere à expressão somente de ELPs, sem proteínas fusionadas. O trabalho, realizado em *Pichia pastoris*, além de demonstrar o potencial para expressão de ELPs em leveduras, apresenta uma nova estratégia para evitar baixos níveis de expressão associados com a alta repetitividade dos mesmos aminoácidos em sequência. Para isto, são usados códons não preferenciais, buscando aproveitar todo o potencial de tRNA no organismo hospedeiro (SALLACH *et al.*, 2009).

Em plantas, já foi demonstrado o potencial para produção de fragmentos simples de anticorpos recombinantes por meio da ligação à ELPs (SCHELLER *et al.*, 2006), assim como para produção de interleucina humana 10, interleucina murina 4 e a proteína de teia de aranha spidroína 2 em folhas de tabaco (PATEL *et al.*, 2007). Conley e colaboradores demonstraram ainda que em plantas, os ELPs, após

agregação, também são úteis para proteger as proteínas recombinantes produzidas da degradação por proteases intracelulares (CONLEY *et al.*, 2009).

A bactéria *E. coli* apresenta-se, contudo, como hospedeira mais frequentemente usada para produção de proteínas recombinantes ligadas a ELPs. De fato, o sistema de expressão e purificação de proteínas ligadas a ELPs foi desenvolvido nesta bactéria por Meyer e Chilkoti em 1999, onde diferentes repetições do pentapeptídeo formador do ELP (10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 repetições) foram fusionadas a tioredoxina (Trx), muito solúvel, e a um inibidor de α -amilase, notoriamente insolúvel. Após o crescimento celular e expressão induzida por IPTG, a construção Trx-ELP foram purificadas em quantidade semelhante a uma construção de Trx-His-Tag. Este trabalho demonstrou ainda que ELPs com maior número de repetições necessitam de uma menor temperatura de transição, e que a adição de sais também pode diminuir a temperatura necessária à agregação dos ELPs, permitindo assim o uso desta técnica em proteínas termolábeis (MEYER *et al.*, 1999).

Trabbic-Carlson e colaboradores confirmaram a validade deste método na expressão das proteínas cloranfenicol acetiltransferase, proteína azul fluorescente, tioredoxina e calmodulina, encontrando valores de recuperação de proteína ativa maiores que 75%, e destacam que o baixo custo deste método, assim como a facilidade de escalonamento indica que os ELPs podem ser amplamente usados para produção de proteínas heterólogas com bom custo benefício (TRABBIC-CARLSON *et al.*, 2004).

De fato, diversas outras proteínas foram expressas fusionadas à uma sequência de ELPs visando facilitar seu isolamento, ao exemplo da proteína beta-galactosidade. Esta enzima foi expressa conjugada à um ELP de 80 repetições, sendo em seguida facilmente purificada, e manteve sua atividade ainda unida ao ELP (YU *et al.*, 2012). Peptídeos antimicrobianos também já foram expressos por esta técnica, como o peptídeo cecropina AD, ligado a um sítio de enteroquinase e a 36 repetições de ELP. O peptídeo foi posteriormente separado com o uso de enteroquinase (YANG *et al.*, 2012). Outro PAM produzido foi a halocidina 18, ligada a um ELP de 90 repetições por um sítio de hidroxilamina. O autor do trabalho destaca, entretanto, que este método não parece ser adequado à produção em larga-escala, devido aos custos da clivagem e diálise (HU *et al.*, 2010b).

O principal limitante nestes trabalhos consistiu na remoção enzimática ou química dos ELPs após síntese e precipitação, para permitir a recuperação da proteína nativa. Dificuldades associadas a este procedimento incluem clivagem não desejada da proteína, remoção incompleta ou lenta dos ELPs, remoção da protease pós-tratamento ou alto custo das enzimas proteolíticas (WU *et al.*, 2006). A maior parte destes problemas pode ser resolvida pelo uso de uma inteína entre o ELP e a proteína de interesse.

1.4. Uso de ELPs combinados à inteínas

O desenvolvimento de métodos simples e confiáveis de purificação pode ser um importante passo para produção em larga escala de proteínas recombinantes. Um dos métodos recentemente desenvolvidos envolve o uso de ELPs, que se agregam reversivelmente em tampões com sal em temperaturas acima de 30 °C; e de inteínas, que permitem que, após a expressão e isolamento inicial, o ELP seja separado da proteína de interesse em resposta à mudança de pH ou temperatura. Desta forma, elimina-se as necessidades de vários passos cromatográficos, sendo possível a purificação e isolamento de uma proteína por ciclos de adição de sal, aquecimento e centrifugação (Figura 6).

O sistema ELP-inteínas foi primeiramente testado, para diversas proteínas, onde uma sequência de 110 repetições de ELP foi ligada a inteína Δ I-CM. Por meio desta fusão foram expressas a proteína estabilizadora de α -hemoglobina (104 mg.L⁻¹), β -lactamase (122 mg.L⁻¹), catalase (79 mg.L⁻¹), glutathione S-transferase (118 mg.L⁻¹), proteína verde fluorescente (110 mg.L⁻¹), proteína ligante à maltose (46 mg.L⁻¹), S824 (45 mg.L⁻¹), cloranfenicol acetil transferase (96 mg.L⁻¹) e NusA (56 mg.L⁻¹), (BANKI, FENG, *et al.*, 2005). Outra proposta para a expressão de proteínas por este método envolve a criação de um sistema de afinidade em microescala em cada bactéria, onde a “resina” de afinidade é composta por um ELP de 40 repetições ligados ao domínio coesina de *Clostridium thermocellum*. A proteína alvo é expressa ligada a uma inteína (Rec A) e um domínio dokerina, que possui alta afinidade pelo domínio coesina. Por meio desta estratégia, foram expressas as proteínas endoglucanase (110 mg.L⁻¹), cloranfenicol acetil transferase (110 mg.L⁻¹) e proteína verde fluorescente melhorada (eGFP), que foi quantificada apenas quanto à sua atividade relativa (LIU *et al.*, 2012).

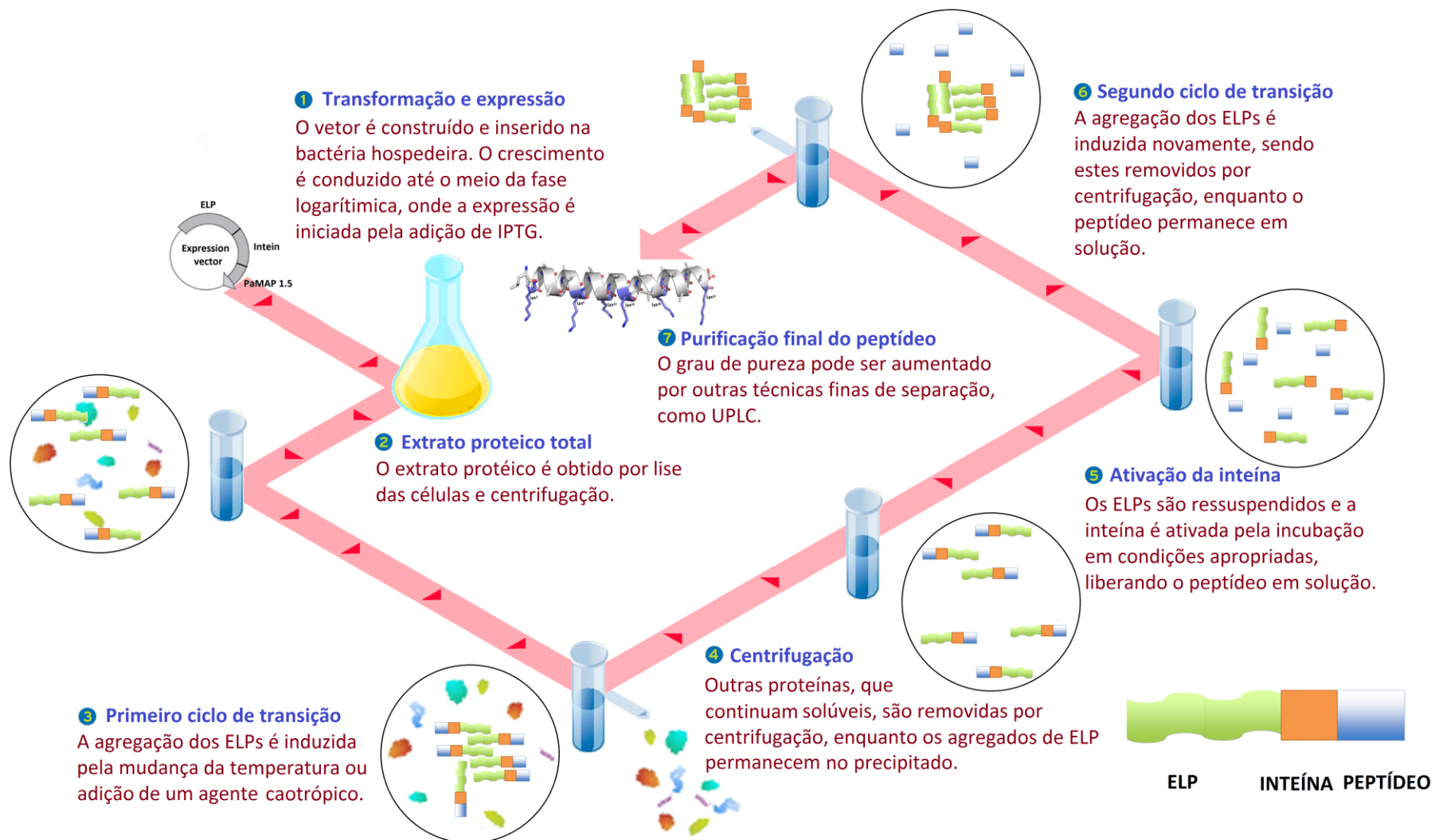


Figura 6. Produção e purificação pelo sistema ELP-inteína. Neste método uma proteína alvo nativa é produzida usando o método de marcação por ELP, um marcador de agregação reversível e por uma inteína, um elemento autoclivável.

Com o propósito de aumentar o rendimento total de proteínas, evitando a clivagem prematura da inteína Δ I-CM, outro estudo propõe a divisão da inteína em duas partes, onde uma contém um ELP de 110 repetições ligado ao fragmento N-terminal da inteína, e uma contém um ELP com o mesmo número de repetições, ligados ao fragmento C-terminal da inteína e a proteína de interesse. Cada uma destas construções pode ser expressas em cultivos separados que são, em seguida, lisados e unidos *in vitro* para ativação das inteínas (SHI *et al.*, 2013).

Por meio deste trabalho foi observado um leve aumento da recuperação de proteínas expressas, e que não foi maior devido a menor eficiência de clivagem da inteína quando separada. Neste trabalho foram relatadas a expressão das proteínas β -galactosidase (140 mg.L^{-1}), proteína verde fluorescente (GFP) (40 mg.L^{-1}), beta-lactamase (51 mg.L^{-1}) e proteína ligante a maltose (MBP) (55 mg.L^{-1}) (SHI *et al.*, 2013). O sistema ELP-inteínas foi também usado para expressão do peptídeo antimicrobiano moricina CM4 ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$) e para β -defensina humana 4 ($1,8 \text{ mg.L}^{-1}$), ligados diretamente à inteína Δ I-CM e a um ELP de 110 repetições. As baixas quantidades observadas são justificadas pelo autor como associadas a uma possivelmente clivagem prematura (SHEN *et al.*, 2010).

1.5. Uso do sistema ELP-Inteína em sistemas de larga-escala

A despeito do claro potencial biotecnológico e econômico do método ELP-inteína, pouco foi feito para adaptação destes métodos para purificação de proteínas recombinantes em escala industrial. Um trabalho de 2010 relatou o uso de uma construção de ELP de 110 repetições ligado à inteína Δ I-CM para expressão das proteínas β -galactosidase (162 mg.L^{-1}) e para o mutante S5 da hidrolase de fósforo orgânico (83 mg.L^{-1}). Estas construções foram expressas em alta densidade celular, cultivadas em meio mínimo em fermentadores de 2 e 3 litros por diferentes estratégias como a batelada e a batelada alimentada, sendo em seguida facilmente isoladas e purificadas por meio de transição de ciclo e centrifugação (FONG e WOOD, 2010).

Recentemente, a análise do custo de materiais envolvido na produção em larga escala (1 kg de proteína pura) foi efetuada por Banki e Wood. Eles compararam os custos de consumíveis dos métodos não cromatográficos ELP e PHB ligados à

inteínas, com outras técnicas comerciais de isolamento de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade (Tabela 2).

Tabela 2. Custo de produção de PAMs por diferentes métodos. O cálculo de custos é baseado no simples escalonamento de protocolos publicados para processos em escala laboratorial. Adaptado- (BANKI e WOOD, 2005).

	pMAL	His-Tag	CBD-inteína	PHB-inteína	ELP-inteína
Rendimento médio (mg.L ⁻¹)	40	74	4,5	36	85
Capacidade da resina (mg.ml ⁻¹)	3	8	2	-	-
Meio de cultivo (U\$D)	44.198,38	23.101,67	379.894,17	126.257,54	58.699,27
Custo de indução (U\$D)	35.373,35	19.101,61	314.115,30	39.304,03	-
Custos com tampão (U\$D)	51.900,11	5.921,45	103.596,75	27.212,63	15.810,47
Custos da resina (U\$D)	624.375,00	790.000,00	192.000,00	-	-
Custos de desnaturação (U\$D)	428.835,99	-	-	-	-
Custos com proteases (U\$D)	8.480.000,00	-	-	-	-
Custos totais por Kg (U\$D)	9.664.682,82	838.124,73	989.696,23	153.470,17	74.509,75

pMAL - Fusão ligada a maltose, isolada por resina de amilose e clivada pela protease (Fator Xa). His-Tag - Para os custos em consideração, a marcação de histidina é mantida na proteína final, de forma que os principais custos se referem à resina para purificação. CBD-inteína - Baseada no sistema IMPACT (NEB), em que os custos de indução (por IPTG) e do meio de cultivo são os mais representativos. PHB-inteína - O peptídeo é expresso em conjunto a uma fase, que se agregam ao redor de grânulos de polihidroxibutirato (PHB) durante a expressão. Neste método o meio de cultura e o custo de indução são os mais representativos. ELP-inteína - Os principais custos associados a este método incluem o meio de cultura e os custos do tampão.

O decréscimo significativo dos custos de produção associados ao método de ELP se deve principalmente às maiores quantidades de proteínas obtidas e a eliminação de resinas de afinidade e custos associados, demonstrando o claro potencial econômico desta técnica.

Ainda que alguns dos custos possam ter sido modificados ou otimizados nos últimos anos, a comparação feita mostra um decréscimo de mais de 125 vezes para o método ELP em relação ao método de afinidade pMAL, e de mais de 10 vezes em comparação com o método de purificação por cauda de histidina (His-Tag). O menor custo associado ao sistema ELPs-inteínas representa um grande atrativo para processos industriais de larga escala na produção de proteínas heterólogas, onde pequenos níveis de impurezas são aceitáveis. Para aplicações farmacêuticas, onde altos níveis de pureza são requeridos, outros passos de polimento podem ser adicionados.

O desenvolvimento de novas inteínas, de cadeias ideais de ELP para cada proteína alvo e o uso de novos organismos hospedeiros podem contribuir ainda para

diminuição dos custos de produção associados. No presente trabalho, avalia-se a produção do peptídeo antimicrobiano Pa-MAP 2 por meio do sistema ELP-inteínas, devido ao seu tamanho e constituição de aminoácidos, especialmente devido a presença de polialaninas (LIPPENS *et al.*, 2001), características que dificultam sua produção por síntese química. Espera-se ainda, por meio desse trabalho, avançar na produção de moléculas, especialmente os PAMs, explorando a rota tecnológica de produção por biorreatores, tendo em vista seu potencial na saúde humana e animal.

2. Justificativa

Apesar de seu grande potencial, o uso clínico de peptídeos antimicrobianos tem sido limitado, dentre outros fatores, pela disponibilidade e custo de produção destas moléculas em escalas necessárias para testes clínicos. Tanto a pesquisa básica quanto clínica requerem uma grande quantidade de peptídeos com alto grau de pureza e que estejam prontamente disponíveis, mas de forma custo-efetiva. A maior parte do custo associado à produção dos PAMs está associada à purificação, desta forma, a expressão destas moléculas ligadas a marcadores autoagregantes ELPs pode contribuir efetivamente para diminuição deste custo e do tempo de trabalho associado ao refinamento do peptídeo. Separar o peptídeo precipitado por meio deste sistema da proteína ELP pode ainda representar um alto custo, sendo assim o custo de produção pode ser otimizado por meio do uso de uma interação entre as sequências, possibilitando o desenvolvimento de um sistema adaptável à produção em larga escala, o que poderá, sem dúvida alguma, contribuir de modo decisivo na produção, testes e viabilização do uso de peptídeos antimicrobianos como forma terapêutica.

3. Objetivo geral

Desenvolver um sistema de produção para o peptídeo multifuncional Pa-MAP 2, usando como organismo hospedeiro bactéria *E. coli*, a fim de atingir futuras aplicações biotecnológicas e clínicas destes compostos como potenciais novos fármacos.

4. Objetivos específicos

- Desenvolver um vetor que possibilite a expressão do peptídeo PAMAP 2 em *E. coli*;
- Analisar o processo de precipitação por 60 repetições de ELP;
- Analisar as condições de clivagem ideais para inteína *Mxe GyrA*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo Pa-MAP 2 *in vitro*;
- Avaliar o nível de produção do peptídeo Pa-MAP 2 em diferentes condições com o uso de fermentadores.

5. Metodologia

5.1 Outros projetos desenvolvidos

5.1.1- Linhagens de bactérias, vetores e enzimas

Escherichia coli DH5 α foi usada para subclonar os plasmídeos e para amplificação. Os plasmídeos usados foram pET28a(+), para expressão e *E. coli*; e pHT01, para expressão em *B. subtilis*. As enzimas utilizadas para construção e clonagem dos plasmídeos serão *Bam*HI, *Aat*II, *Xho*I. As bactérias *E. coli* BL21 e *B. subtilis* 1012 foram usadas como hospedeiros de expressão. A bactéria *E. coli* ATCC 8739 foi usada para os testes antimicrobianos.

5.1.2- Construção dos vetores de expressão para *B. subtilis* dos peptídeos BmLAO F1, F2 e F3

O projeto de doutorado inicialmente proposto consistia na expressão dos peptídeos BmLAO F1 (IKFEPPLPPKKAH), F2 (KKFWEDDG) e F3 (IYYPPHNNFP) em *B. subtilis* por meio de plasmídeos compostos pelos seguintes módulos: uma cauda de histidina, visando o processo posterior de purificação; uma dentre três sequências sinal, AmyE, sSacC e Nprb, visando o direcionamento do peptídeo produzido para o interior ou exterior de *B. subtilis*; uma dentre duas proteínas carreadoras, tioredoxina ou GST; um sítio de clivagem, com brometo de cianogênio; Para isso, foram então desenhados, com auxílio do programa Clone Manager seis plasmídeos, contendo diversos módulos flanqueados por enzimas de restrição, para possibilitar a construção e clonagem de um total de 18 plasmídeos diferentes, que seriam então comparados quanto aos seus níveis e locais de expressão, forma de purificação e atividade antimicrobiana. Depois de ter suas sequências checadas e otimizadas para expressão em *B. subtilis*, os seis plasmídeos foram então sintetizados pela empresa Epoch *Life Sciences* (Estados Unidos) no vetor pBSK. Após a chegada destes construtos, procedemos então com a transformação em *E. coli* DH5 α e os plasmídeos foram amplificados e extraídos com kit de purificação de plasmídeos *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo recomendações do fabricante. Estes plasmídeos foram então digeridos pelo método de digestão dupla, em que duas enzimas eram adicionadas à reação, para liberar cada um dos módulos. Assim, em uma reação de 50 μ l, foi adicionado 1 μ g de DNA, 5 μ l de

tampão para digestão dupla, e a quantidade recomendada para dupla digestão das seguintes enzimas: *Bam*HI e *Spe*II para as sequências sinal Nprb, AmyE e SsSacC; *Spe*II e *Not*I para as proteínas carreadoras GST e Thioredoxina; e *Not*I e *Xba*I para os peptídeos BmLAO F1, F2 e F3. Em seguida a ligação destes insertos foi realizada sequencialmente no vetor pHT01. Para isso 150 ng do vetor pHT01 foram adicionadas em um microtubo, juntamente com uma concentração equimolar à uma razão de 4:1 (inserto:vetor) de inserto com a enzima T4 DNA Ligase (Promega). Esta reação foi mantida a 4 °C por 16 h, sendo em seguida transformada em *E. coli* dh5α competente e plaqueada em meio de cultura seletivo (ampicilina 100 µg/mL), mantido a 37 °C por 16 h. As colônias resultantes foram crescidas em meio LB seletivo e os plasmídeos foram extraídos. Os plasmídeos resultantes tiveram então seu tamanho confirmado por gel de agarose 1%.

5.1.3- Construção dos vetores de expressão para expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em *B. subtilis*

Dois vetores foram desenvolvidos com o auxílio do programa Clone Manager e sintetizados pela empresa Epoch *Life Sciences* (Estados Unidos) no vetor pBSK de acordo com os seguintes modelos: *Vetor pBSK 1 (ELP-RecA-Pa-MAP)*- O vetor pBSK 1 foi construído partir da ponta 5' com um sítio de *Bam*HI, seguido de um ELP de 100 repetições do pentapeptídeo VPGXG, onde X representa Val:Ala:Gly, numa proporção de 5:3:2, seguido da inteína *Mtu* RecA ΔI-CM, modificada para possibilitar a clivagem do C-terminal mantendo o N-terminal intacto, seguida do peptídeo Pa-MAP 2 e do sítio *Aat*II. *Vetor pBSK 2 (ELP-GyrA-Pa-MAP)*- O vetor pBSK 2 foi construído partir da ponta 5' com um sítio de *Bam*HI, seguido de um ELP de 100 repetições do pentapeptídeo VPGXG, onde X representa Val:Ala:Gly, numa proporção de 5:3:2, seguido da inteína *Mxe* GyrA, modificada para possibilitar a clivagem do C-terminal mantendo o N-terminal intacto, seguida do peptídeo Pa-MAP 2 e do sítio *Aat*II. Após a síntese, os vetores pBSK 1 e pBSK 2 foram transformados em *E. coli* Dh5α competente, amplificados e extraídos com kit de purificação de plasmídeos *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo recomendações do fabricante. Para a retirada dos insertos, 2 µg dos vetores pBSK 1 e 2 foram digeridos primeiramente com a enzima *Aat*II (Fermentas) por 16 h a 37 °C, sendo em seguida purificados com kit *GeneJET PCR Purification* de acordo com recomendações do

fabricante. Em seguida o DNA resultante foi digerido por 2 h com a enzima *Bam*HI a 30 °C, sendo logo após aplicado em gel de agarose 1%. O vetor pHT01, desenvolvido para expressão em *B. subtilis* também foi digerido de acordo com esse protocolo. Este vetor foi adquirido em colaboração com a Universidade de Bayreuth, na Alemanha. As bandas correspondentes aos insertos e ao vetor pHT01 digerido foram então cortadas do gel de agarose e extraídas com kit *PureLink Quick Gel Extraction* (Life Technologies), segundo recomendações do fabricante. Em seguida a ligação dos insertos das construções pBSK 1 e 2 foi realizada no vetor pHT01. Para isso 150 ng do vetor pHT01 foram adicionadas em um microtubo, juntamente com uma concentração equimolar à uma razão de 4:1 (inserto:vetor) de inserto com a enzima T4 DNA Ligase (Promega). Esta reação foi mantida a 4 °C por 16 h, sendo em seguida transformada em *E. coli* dH5 α competente e plaqueada em meio de cultura seletivo (ampicilina 100 μ g/mL), mantido a 37 °C por 16 h. As colônias resultantes foram crescidas em meio LB seletivo e os plasmídeos foram extraídos, gerando os vetores pHT01_1 (RecA) e pHT01_2 (GyrA). Para confirmar a correta inserção dos fragmentos, foram usados três métodos: primeiramente foram desenhados e sintetizados primers correspondentes as regiões flangeadoras aos insertos no vetor pHT01, visando amplificar a região contendo o inserto (5`-CAATTCCAATTAAAGGAGG-3` e 5`-CATTAGGCGGGCTGCCCCGG -3`). Para isso, uma reação de PCR de 50 μ l foi desenvolvida contendo 100 ng de DNA, 5 μ l de tampão para Taq 10X, 10 mM de dNTP, 10 μ M de cada primer, 50 mM de Magnésio e 3 U de Taq. O tempo de extensão à 72 °C foi igual a 2,5 min, o tempo de anelamento de 1 min a diferentes temperaturas (50 – 65 °C, variando em 1 °C para cada), Após 30 ciclos de reação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% adicionado e brometo de etídeo e visualizadas em filtro U.V. O segundo método usado foi o sequenciamento destes vetores, buscando ainda confirmar a presença do inserto, e para isso, 300 ng de DNA foram adicionados a 2 μ l dos primers a 1,5 μ M em 5 μ l de volume final, e o sequenciamento foi realizado de forma terceirizada pelo laboratório de biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, pelo método sanger, em sequenciador ABI 3130xl (*Applied Biosystems*). Foi usado ainda o método de digestão dos plasmídeos pHT01_1 e pHT01_2 com as enzimas *Bam*HI e *Aat*II, onde 2 μ g destes plasmídeos foram digeridos primeiramente com a enzima *Aat*II (Fermentas) por 16 h a 37 °C, sendo em seguida purificados com kit *GeneJET PCR Purification* de

acordo com recomendações do fabricante. Em seguida o DNA resultante foi digerido por 2 h com a enzima *Bam*HI a 30 °C, sendo logo após aplicado em gel de agarose 1%.

5.1.4- Preparo de células competentes de *B. subtilis* e transformação dos vetores

Para preparo de células competentes de *B. subtilis*, primeiramente, uma placa fresca foi crescida por 20 h à 37 °C a partir de um estoque de glicerol. Desta placa, várias colônias foram usadas para inocular 12 ml de meio A (0,1 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,02 g.L⁻¹ de hidrolisado de caseína, 0,5 g.L⁻¹ de glicose, 0,18 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1,26 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0,54 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0,09 g.L⁻¹ de citrato trisódico, 0,018 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 1 ml de L-triptofano à 11 mg.ml⁻¹), que foi incubado a 37 °C com agitação vigorosa. Após o fim da fase lag, as células foram incubadas ainda por 90 min à 37 °C. Em seguida, alíquotas de 50 µl desta cultura foram transferidas a tubos de 1,5 ml contendo 450 µl de meio B (10 ml de meio A adicionados de 100 µl de CaCl₂.2H₂O 50 mM e 100 µl de MgCl₂.6H₂O 250 nM), e incubadas a 37 °C por 90 min. Neste momento as células estão altamente competentes. Para transformação, um tubo contendo as células competentes foi centrifugado à 14.000 x g por 5 min e 400 µl do sobrenadante foi descartado, sendo as células ressuspensas nos 100 µl de sobrenadante restantes. Nestes, foram adicionados então 0,6 µg dos vetores pHT01_1 e pHT01_2, e em seguida o tubo foi incubado por 30 min a 37 °C, sendo em seguida espalhado em uma placa de LB com cloranfenicol à 10 µg.ml⁻¹, que foi incubado à 37 °C por 24 h. As colônias resultantes foram as transformadas.

5.1.5- Análises de expressão em *B. subtilis*

Para expressão dos peptídeos em *B. subtilis*, uma colônia contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 5 mls de meio LB suplementado com 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina e incubada a 37 °C por 12 a 24, até que se atinja um nível elevado de turbidez. Este inóculo foi então diluído na proporção de 1:100 em meio TB (*Terrific Broth*) suplementado (triptona 12 g.L⁻¹, extrato de levedura 24 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 2,31 g.L⁻¹, K₂HPO₄ 12,54 g.L⁻¹, pH 7, glicerol 4 ml.L⁻¹ e ampicilina 100 µg.ml⁻¹), onde 2 ml de inóculo foram diluídos em 198 ml de TB e colocados em um balão de *Erlenmeyer* de

1 L (volume total), sendo incubado em seguida a 37 °C em um agitador orbital à uma velocidade de 300 rpm, até que a absorbância (600 nm) atinja 0,5 a 0,7. Os Erlenmeyers foram então transferidos para uma *shaker* em temperatura ambiente, e a expressão dos plasmídeos de interesse foi iniciada, com a adição de (1 mM) à 37°C por 4 h.

5.2- Projeto principal da tese

5.2.1. Construção dos vetores de expressão para *E. coli*.

Para produção do Pa-MAP 2 em *E. coli*, dois vetores foram desenvolvidos com o auxílio do programa Clone Manager. Estes vetores foram sintetizados no vetor pUC 57 pela empresa Genscript (Estados Unidos) e clonados no vetor pET 21a(+), ainda pela Genscript de acordo com os seguintes modelos: O vetor pET-100EMP foi construído partir da ponta 5' com um sítio de *Bam*HI, seguido de um ELP de 100 repetições do pentapeptídeo VPGXG, onde X representa Val:Ala:Gly, numa proporção de 5:3:2, seguido da inteína *Mtu* RecA Δ I-CM, modificada (C1A e V67L), para possibilitar a clivagem do C-terminal mantendo o N-terminal intacto, seguida do peptídeo Pa-MAP 2 e dos sítios *Aat*II e *Xho*I. O vetor pET-60EGP foi construído a partir da ponta 5' com um sítio de *Bam*HI, seguido de um ELP de 60 repetições do pentapeptídeo VPGXG, onde X representa Val:Ala:Gly, numa proporção de 5:3:2, seguido da inteína *Mxe* GyrA, modificada (C1A) para possibilitar a clivagem do C-terminal mantendo o N-terminal intacto, seguida do peptídeo Pa-MAP 2 e do sítio *Aat*II e *Xho*I. Após a síntese, os vetores pET-100EMP e pET-60EGP foram transformados em *E. coli* DH5 α competente, amplificados e extraídos com kit de purificação de plasmídeos *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo recomendações do fabricante.

5.2.2. Transformação dos vetores em *E. coli*

A transformação dos vetores pET-100EMP e pET-60EGP em *E. coli*, foi realizada pelo método de choque térmico. Para isso, 3 μ l de DNA plasmidial, contendo 50 ng de DNA, foram adicionados em 50 μ l de *E. coli* BL21 DE3 (*New England Biolabs*)

ou *E. coli* BL21 DE3 PlyE (*Life Technologies*) competentes em tubos de 1,5 ml. Este tubo foi colocado no gelo por 15 min, e em seguida em banho-maria à 42 °C por 2 min, voltando então ao gelo, onde foi adicionado então 1 ml de LB com ampicilina (50 µg.ml⁻¹), sendo então este tubo incubado a 37 °C por 1 h. Os tubos foram centrifugados e à 5.000 x g por 7 min, e logo após o sobrenadante foi descartado, e o precipitado contendo as células foi ressuscitado e aplicado em placas de LB com ampicilina, que foram incubadas por 16 h.

5.2.3. Expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em shaker

Para expressão dos peptídeos e *E. coli*, uma colônia contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 5 ml de meio LB suplementado com 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina e incubada a 37 °C por 12 a 24. Este inóculo foi então diluído na proporção de 1:100 em meio LB, TB (*Terrific Broth*) (triptona 12 g.L⁻¹, extrato de levedura 24 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 2,31 g.L⁻¹, K₂HPO₄ 12,54 g.L⁻¹, pH 7, ampicilina 100 µg.ml⁻¹) ou TB suplementado (TB + glicerol 4 ml.L⁻¹), onde 2 ml de inóculo foram diluídos em 198 ml de TB e colocados em um balão de erlenmeyer de 1 L (volume total), sendo incubado em seguida a 37 °C em um agitador orbital à uma velocidade de 300 rpm, até que a absorbância (600 nm) atinja 0,5 a 0,7. Os erlenmeyers foram então transferidos para uma *shaker* em temperatura ambiente, e a expressão dos plasmídeos de interesse foi iniciada, com a adição de 1 mM de IPTG à 37 °C por 4 h.

5.2.4. Purificação da fusão ELP-Pa-MAP 2 recombinante

Após crescimento induzido por IPTG, todo o volume de cultura foi recuperado e resfriado no gelo por 20 min. As células foram então centrifugadas à 4.000 x g por 10 min à 4 °C e o precipitado foi ressuscitado em 1/20 da cultura original de tampão de lise (Tris-HCL 10 mM, pH 8,5, EDTA 2 mM e lisozima 0,1 mg.ml⁻¹) e deixado em repouso no gelo por 45 min e em seguida congeladas por 16 h. Em seguida, as células foram submetidas à lise completa por ultrassom (18 pulsos de 10 s, com 80% de amplitude) e centrifugadas à 17.000 g a 4 °C por 1 h. O sobrenadante contendo o lisado de células clarificado foi então transferido para tubos de 50 ml, onde 3 M de NaCl foi adicionado diretamente. Logo após, o tubo foi então incubado por 10 min a

30 °C para permitir a agregação dos ELPs e então centrifugado a 30 °C por 10 min a 8.000 x g, encerrando um ciclo de precipitação, que foi repetido por duas vezes. O precipitado final corresponde então a fração rica em ELPs ligados ao peptídeo Pa-MAP 2 pela inteína *Mxe GyrA*.

5.2.5. Ativação da inteína e purificação do Pa-MAP 2

A ativação da inteína *Mxe GyrA* foi analisada em diferentes soluções de clivagem (Acetato de sódio 50 mM pH 5; 5,5; Bis-tris 20 mM pH 6; 6,5; Tris-HCl pH 7; 7,5; 8; 8,5). Para isso, o precipitado rico em ELPs foi ressuspendido em uma das soluções de clivagem geladas e incubados em diferentes temperaturas a 19 °C, 25 °C e 30 °C. Amostras foram coletadas em 24 h e 48 h e analisadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) usando um sistema de eletroforese Mini-PROTEAN (*Bio-Rad*). Foi usado como marcador de peso molecular o *PageRuller Unstained Protein Ladder* (*Fermentas*). As bandas foram visualizadas por coloração com Azul de Comassie (Pink et al, 2010). O melhor método de clivagem foi escolhido baseado primeiramente no menor tempo e nível de clivagem, baseado na maior intensidade da banda inferior (sem o peptídeo) que da banda superior (pH 5,5 e 24 h) e em segundo lugar na temperatura mais próxima à ambiente, de 25 °C. Estes parâmetros foram aplicados nas amostras e análises subsequentes. Uma vez que o procedimento de clivagem foi completo, outro ciclo de precipitação por ELP foi realizado. O sobrenadante, contendo o peptídeo livre em solução foi então transferido para um tubo de 15 ml, dialisado e liofilizado.

5.2.6. Análises de massa molecular por SDS-PAGE

Análises de massa molecular foram feitas inicialmente em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970), onde dez microlitros de tampão de amostra foram adicionados a 10 µl das amostras. A solução foi então colocada em água fervente por 5 min e depois, aplicada nos poços do gel (10 µl de cada amostra) de acrilamida 12 %, juntamente com um marcador de peso molecular. A corrida foi feita a 200V por 45 min e o gel corado com nitrato de prata.

5.2.7. Análises de massa molecular por espectrometria de massa

A análise de massa molecular foi realizada em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com laser Smart Beam™ controlado pelo software Flexcontrol 3.0. Objetivando as análises de MALDI-TOF MS, o peptídeo liofilizado foi dissolvido em água ultrapura e homogeneizado a uma solução saturada (50 µl TFA 3%, 250 µl ACN 100% e 200 µl de H₂O Milli-Q) de uma matriz constituída por ácido α-ciano-4-hidroxi-cinâmico (1:3). Em seguida foram depositadas em duplicata em uma placa do tipo Anchorchip Var-384 e cristalizadas à temperatura ambiente. As massas dos componentes moleculares foram determinadas por MS com calibração externa com mistura de peptídeos padrão (*Peptide Calibration Standard I, Bruker Daltonics*) sob modo de operação refletivo e positivo.

5.2.8. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Nos ensaios de atividade dos peptídeos recombinantes *in vitro* foi utilizada a bactéria, *E. coli* ATCC 8739. Para isso, as células bacterianas foram previamente replicadas em meio LB, sob agitação durante 2-3 h a 37 °C. A atividade antimicrobiana foi determinada usando o método de microdiluição em caldo de acordo M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Watts, 2006) com modificações. Previamente, a curva de crescimento da cultura original foi estabelecida por monitoramento do crescimento bacteriano através da observação da densidade ótica a 595 nm, a cada meia hora. Desta forma, foi possível determinar o tempo ótimo para que o inóculo alcance o meio da fase exponencial. Para determinar a relação entre unidades formadoras de colônias (UFC) e densidade ótica, foi aplicada a técnica de microgotas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão, onde uma alíquota foi coletada durante as leituras de meia hora, submetida a diluições de 1:10 e microgotas das suspensões foram semeadas em meio LB acrescido de ágar (15 g.L⁻¹). Os testes contra as bactérias foram realizados em placas multi-poços, a partir da cultura original, onde foi preparado um inóculo, diluído para aproximadamente 5 x 10⁴ UFC.mL⁻¹ por poço, sem ultrapassar 10% do volume do poço contendo meio LB líquido e uma diluição seriada (200 a 1,56 µM) do Pa-MAP 2 recombinante, Pa-MAP 2 sintético ou da proteína ELP-inteína-Pa-MAP 2, sendo água

destilada estéril utilizada como controle negativo e como controle positivo cloranfenicol $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As placas multi-poços inoculadas foram incubadas com agitação leve a 37°C durante 4 h. O crescimento bacteriano foi monitorado a 595 nm, a cada meia hora, durante a fase exponencial de crescimento. A quantidade de crescimento bacteriano nos poços do controle positivo foi comparada com a quantidade de crescimento nos poços do controle negativo para determinar os pontos finais de crescimento. O MIC (concentração mínima inibitória) foi definido como a menor concentração do peptídeo que impediu o crescimento do microrganismo.

5.2.9. Cultivo em biorreator, cultivo alimentado em biorreator e medidas de peso seco

Para o cultivo em biorreator e cultivo alimentado em bioreator, uma colônia única de *E. coli* BL 21 carregando o plasmídeo pET-100EGP foi usada para inocular 120 ml de meio LB suplementado com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina e incubado a 37°C por 12 h. Esta cultura foi então usada para inocular 0,5 L de meio TB ou meio definido (Gustavsson et al, 2001) ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $9,94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, glicose $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 ml MgSO_4 1M, 1 ml de solução de metais traço - $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{FeCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1,67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,018 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, CuSO_4 $0,016 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0,013 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{CoCl}_2\cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ $0,018 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA.2Na $2,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) até uma OD_{600} final de 0.1 em um Fermentador BioFlo 110 de 1,3 L (*New Brunswick Scientific*). O pH da cultura foi controlado usado 1 M de hidróxido de sódio, enquanto o oxigênio dissolvido (dO_2) foi ajustado para $>20\%$. Para o cultivo alimentado em biorreator, em pulso e em meio mínimo, as células foram crescidas no modo de cultivo simples a 37°C até que a glicose foi depletada do meio, o que é indicado por um rápido aumento de dO_2 . Ao ponto em que o aumento de dO_2 superar 50% , 4 ml de solução glicose 50% (peso:peso) foi adicionado. Este procedimento foi repetido até depleção da fonte de nitrogênio, o que foi indicado pela estabilização dos níveis de oxigênio mesmo após a alimentação por glicose. Para cultivo em meio TB suplementado, a indução foi realizada pela adição de 1 mM de IPTG após 4 h. Para o cultivo simples e alimentado em biorreator, a indução foi iniciada após 8 h. Em todas as condições, amostras de células foram colhidas em diferentes pontos após a indução, e centrifugadas a $5000 \times g$ por 2 min. Os precipitados celulares foram armazenados a -80°C para análise.

Para a medida de peso seco, 1 a 5 ml de cultura foram filtrados por uma membrana de celulose previamente pesada, com poro de 0,22 μm e 45 mm de diâmetro. Em seguida, a membrana foi aquecida até 70 °C por 48 h e pesada novamente.

5.2.10. Análises de HPLC para Acetato e Glicose

O consumo de glicose e os níveis de acetato em meio definido foram detectados com o uso de um UFLC Shimadzu com uma coluna Shim-Pack SRC-101H, usando fase móvel de H_2SO_4 , em uma corrida a 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Para isso, um ml de amostras de fermentação foram coletadas a cada hora, e centrifugadas a 20000 x g por 10 min. Padrões foram preparados com diluições seriadas de concentrações conhecidas de glicose e acetato. A detecção foi realizada por Índice de refração (RI) ou UV 210 nm com o pico de acetato possuindo um tempo de retenção de aproximadamente 9 min e a glicose de aproximadamente 14 min.

6. RESULTADOS

6.1. Resultados dos outros projetos desenvolvidos

6.1.1 Construção dos vetores de expressão em *B. subtilis* dos peptídeos BmLAO F1, F2 e F3

O projeto inicial da tese previa inicialmente a expressão de três peptídeos antimicrobianos, BmLAO F1, F2 e F3, derivados de fragmentos de proteínas encontradas no veneno de Jararaca-pintada (*Bothrops mattogrosensis*) em *Bacillus subtilis*. Para isso, foram escolhidas 3 sequências sinais, duas proteínas carreadoras e três peptídeos antimicrobianos, que foram sintetizados no vetor pBSK (Figura 7 A-F). Os módulos contidos no vetor pBSK foram então amplificados e clivados com enzimas de restrição para possibilitar a construção e clonagem de um total de 18 plasmídeos diferentes no vetor pHT 01. Ao final da construção final destes plasmídeos, ainda antes da etapa de transformação em *B. subtilis* para expressão, este projeto foi extinto, tendo em vista a indisponibilidade no mercado nacional do reagente brometo de cianogênio, que seria usado para separação futura dos peptídeos de suas proteínas de fusão. Para criação dos próximos sistemas de expressão, foram então modificadas as proteínas de fusão, sítio de clivagem e o peptídeo alvo para expressão. Esta nova estratégia será apresentada no próximo tópico.

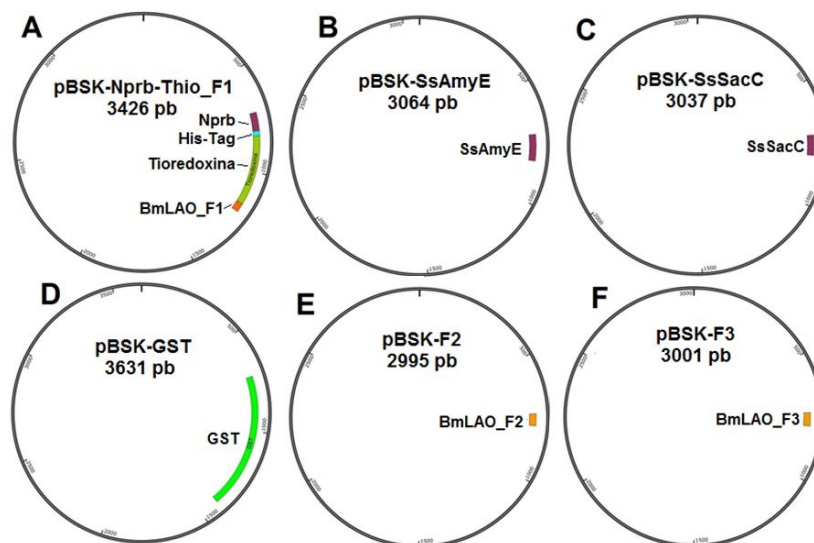


Figura 7- Vetores pBSK contendo os módulos para expressão dos peptídeos BmLAO F 1, F2 e F3. A) Nprb+His-tag+Thioredoxina+BmLAO F1; B) SsAmyE; C) SsSacC; D) GST; E) BmLAO F2; E) BmLAO F3.

6.1.2 Construção dos vetores para expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em *B. subtilis*

Para nova estratégia de expressão, foram propostas duas construções *in silico* para *B. subtilis*, sendo a primeira composta por uma sequência de 100 repetições de ELP, ligada a mini inteína *Mtu RecA* e o peptídeo Pa-MAP 2, nomeada de pHT01_1 (Figura 8A), e a segunda uma sequência de 100 repetições ligada a mini inteína *RecA* e o peptídeo Pa-MAP 2, nomeada pHT01_2 (Figura 8B). Estas sequências foram sintetizadas pela empresa Epoch Life Sciences, no vetor pBSK. Estes plasmídeos foram transformados em *E. coli* DH5 α competente amplificados, extraídos e estocados em refrigeração à -80 °C.

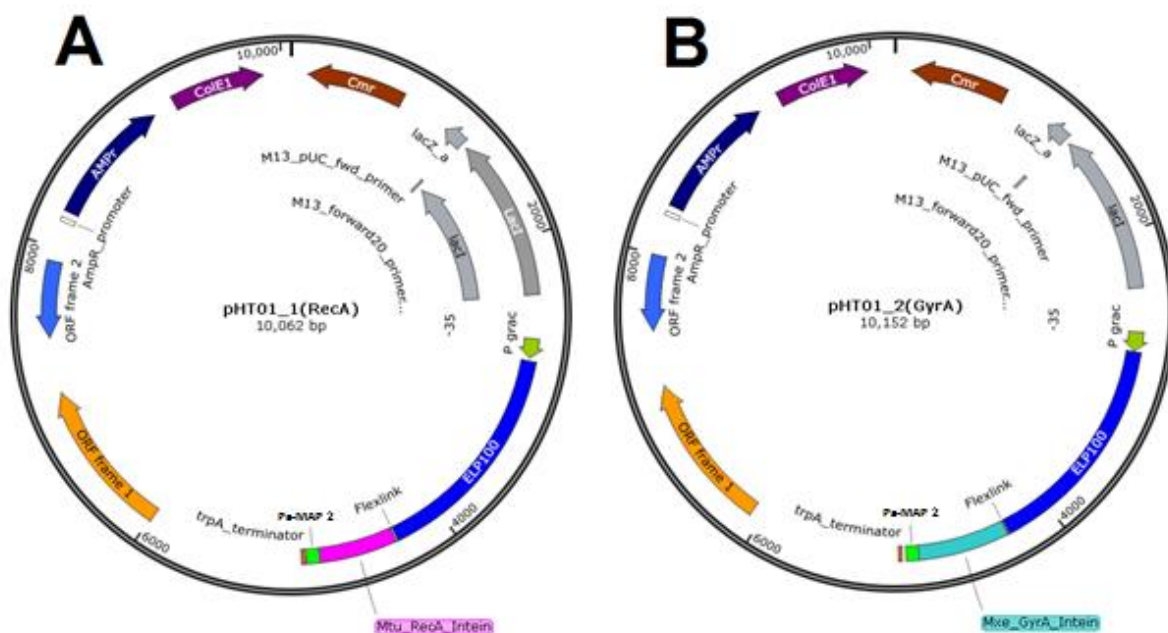


Figura 8- Mapa dos plasmídeos construídos. A) pET21_1(ELP100_RecA), B) pET21_2(ELP60_GyrA), C) pHT01_1(RecA), D) pHT01_2(GyrA).

Para a retirada dos insertos, 2 μ g dos vetores pBSK contendo as construções de interesse foram processados primeiramente com a enzima *Aat*I, sendo em seguida purificados com kit *GeneJET PCR Purification*. Em seguida o DNA resultante foi processado com a enzima *Bam*HI, sendo em seguida aplicado em gel de agarose 1%. O vetor pHT01 também foi processado de acordo com esse protocolo.

A clivagem dos vetores pBSK gerou três fragmentos observados, sendo um próximo a 4500 pb correspondente ao vetor, um próximo a 2500 pb correspondente ao vetor sem o inserto e um próximo a 2000 pb correspondente ao inserto (Figura 9).

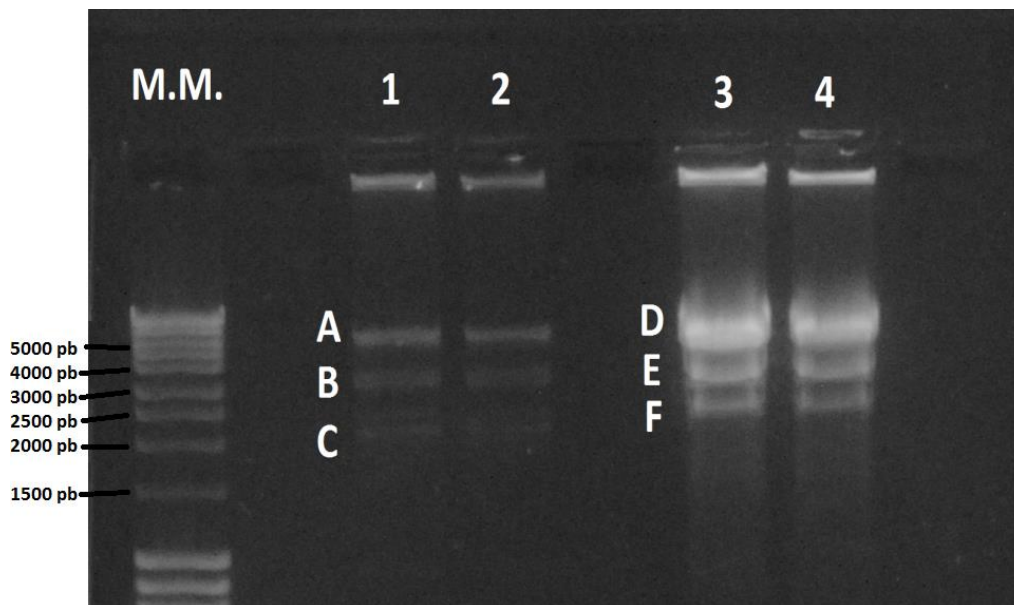


Figura 9- Insertos clivados dos vetores pBSK RecA (1,2) e GyrA (3,4). M.M.: Marcador molecular. A e D- Vetores não clivados; B e E- Vetores sem inserto; C e F- Insertos.

A clivagem do vetor pHT01 gerou apenas uma banda de 10.000 pb, correspondente ao vetor processado por enzima de restrição (Figura 10). As bandas correspondentes aos insertos e ao vetor pHT01 clivado foram então cortadas e extraídas com kit de purificação.

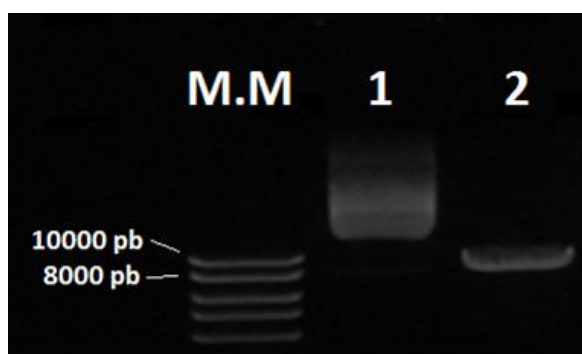


Figura 10. Vetor pHT 01 não clivado (1) e clivado sequencialmente com as enzimas BamHI e AatII (2). MM: Marcador molecular.

Em seguida a ligação dos insertos gerados pela clivagem das construções foi realizada no vetor pHT01, sendo em seguida transformada em dh5- α competente e plaqueada em meio de cultura seletivo. As colônias resultantes foram crescidas em meio LB seletivo e os plasmídeos foram extraídos.

Para confirmar a correta ligação entre inserto e vetor, foram desenhados primers para as regiões flanqueantes ao inserto. Estes primers foram usados em uma reação de PCR de 30 ciclos em diferentes temperaturas (54 a 62 °C). Não foi observado, porém, a amplificação de região em correspondente ao inserto. Os resultados de sequenciamento destas regiões também não foram conclusivos (dados não mostrados). Estes resultados são atribuídos à grande quantidade de sequências repetitivas da região ELP, que dificulta a correta amplificação e sequenciamento dos fragmentos (STIRLING, 2003).

Desta forma, visando confirmar a correta ligação entre vetores e insertos, os plasmídeos foram então clivados de acordo com o protocolo de digestão utilizado anteriormente, sendo observada uma banda correspondente ao inserto de aproximadamente 2.000 pb e uma banda de 8.000 pb correspondente ao vetor (Figura 11). Este resultado indica a inserção das construções 1 (pHT01_1) e 2 (pHT01_2) no vetor pHT01. Estes plasmídeos resultantes foram então transformados em *B. subtilis* de onde foram recuperados (Figura 12).

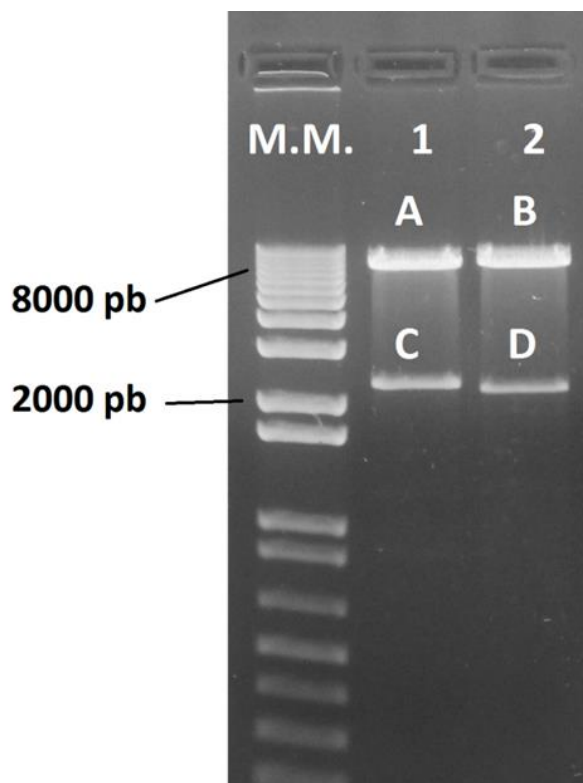


Figura 11. Ligações entre o vetor pHT01 e as construções 1 (1) e 2 (2), clivadas com as enzimas BamHI e AatII. M.M.: Marcador molecular. A e B- Vetor pHT01; C e D- Insertos 1 e 2.

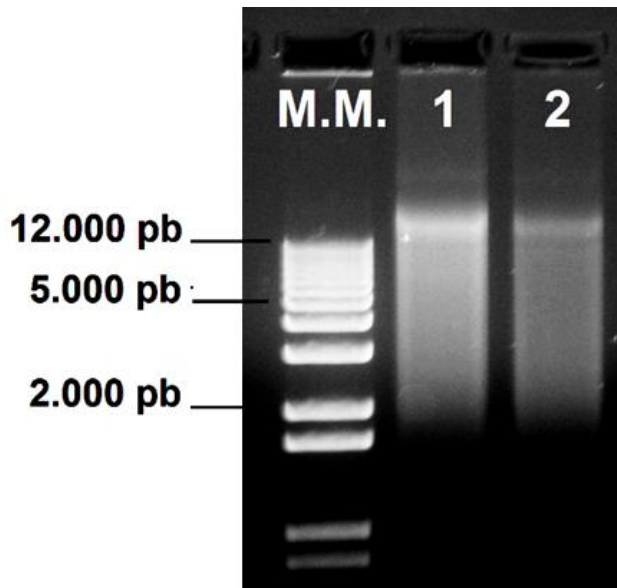


Figura 12. Vetores PHT01_1(RecA) (1) e PHT01_2(GyrA) (2) extraídos por kit de extração de plasmídeos (adicionado de lisozima) a partir da bactéria *B. subtilis* 1012 transformada. M.M.: Marcador molecular.

6.1.3. Expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em *B. subtilis*

Após a confirmação da presença dos plasmídeos em *B. subtilis*, seguiu-se com expressão dos peptídeos. Para isso, uma colônia transformada foi inoculada em meio LB suplementado e crescida por 18 h, sendo então este inóculo diluído em 1:100 de meio TB suplementado. Foram então realizadas leituras de OD até 0,7, onde a indução da expressão foi feita com IPTG. A partir deste ponto foram coletadas amostras a 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h, sendo o extrato protéico total aplicado em gel SDS-PAGE 12%. Entretanto, em nenhuma destas amostras foi detectada a presença de peptídeos expressos diferencialmente com a indução por IPTG, nas massas esperadas de 60 kDa pHT01_1 e 63 kDa pHT01_2 (Dados não mostrados).

6.2- Resultados do projeto principal da tese

6.2.1. Construção dos vetores de expressão para *E. coli*.

Com o insucesso da produção do peptídeo Pa-MAP 2 em *B. subtilis*, foi dado início então a expressão em *E. coli*. Por meio do programa Clone Manager, foram feitas duas construções *in silico* para expressão em *E. coli*, sendo a primeira composta de 100 repetições de ELP ligada a mini-inteína RecA e o peptídeo Pa-MAP 2, nomeada de pET-100EMP (Figura 13A) e a segunda formada por 60 repetições de ELP ligada a mini-inteína RecA e o peptídeo Pa-MAP 2, nomeada de pET-60EGP (Figura 13B). Estas duas últimas construções foram então sintetizadas diretamente em seus vetores de expressão (pET 21a(+)) pela empresa Genscript. Os plasmídeos recebidos foram então transformados em *E. coli* DH5 α competente amplificados, extraídos e estocados em refrigeração à -80 °C.

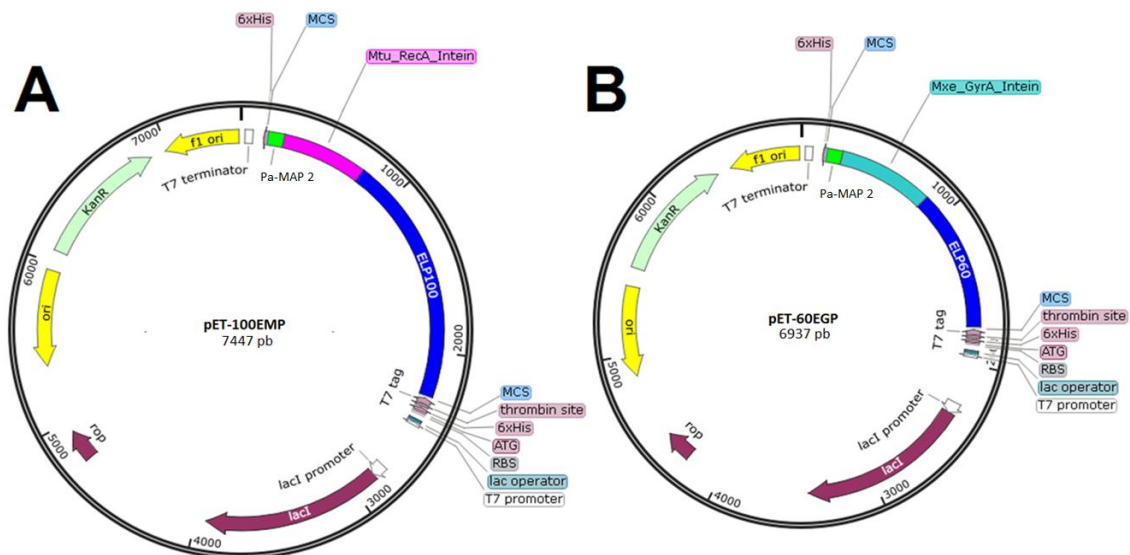


Figura 13- Mapa dos plasmídeos construídos. A) pET-100EMP, B) pET-60EGP.

6.2.2. Transformação dos plasmídeos em *E. coli* para expressão

Os plasmídeos construídos pela empresa Genscript pET-100EMP e pET-60EGP, foram transformados nas bactérias *E. coli* BL21 DE3 e *E. coli* BL21 DE3 pLysE por meio de choque térmico e plaqueadas em meio seletivo. A escolha da linhagem de *E. coli* BL21 pLysE foi baseada nas características da linhagem de maior

controle da T7 DNA polymerase, necessária quando a proteína recombinante a ser expressa é tóxica, apesar de seus níveis de expressão serem comumente reportados como menores que os da linhagem DE3.

Colônias resistentes foram então crescidas em meio LB suplementado com antibiótico e o DNA plasmidial foi extraído com kit de purificação a partir de cultura de *E. coli* BL21 DE3, afim de verificar a correta transformação (Figura 14).

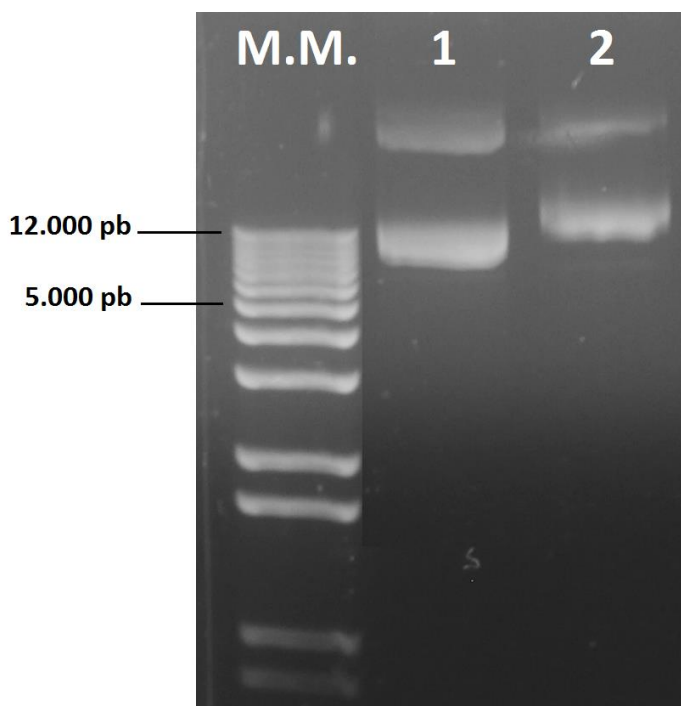


Figura 14. Vetores pET-60EGP (1) e pET-100EMP (2) extraídos por kit de extração de plasmídeos a partir da bactéria *E. coli* BL21 transformada. M.M.: Marcador molecular.

6.2.3. Análise inicial da expressão do peptídeo Pa-MAP 2 em *E. coli*

Após a confirmação da presença dos plasmídeos, seguiu-se com o teste de expressão dos peptídeos a partir dos vetores pET-60EGP e pET-100EMP. As análises iniciais de expressão foram realizadas em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de LB, TB ou TB suplementado. A expressão da proteína alvo não foi detectada por SDS-PAGE após a indução em até quatro horas para nenhum dos plasmídeos ou linhagens nos meios LB e TB (dados não mostrados), sendo somente observada para o plasmídeo pET-60EGP, desta forma, este plasmídeo e o meio TB suplementado foram usados nas análises subsequentes.

6.2.4. Análise da expressão do peptídeo Pa-MAP2 em *E. coli* em shaker

Para as análises das condições de expressão do plasmídeo, uma colônia transformada foi inoculada em meio LB suplementado e crescida por 18 h, sendo então este inóculo diluído em meio TB suplementado (erlenmeyers de 1 l com 200 ml de meio TB). Foram então realizadas leituras de OD₆₀₀ até 0,5, onde a indução da expressão foi feita com IPTG. A partir deste ponto foram coletadas amostras a 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h para bactéria *E. coli* BL21 DE3 (Figura 15) e de 0 h, 0,5 h e 3 h para bactéria BL21 pLysE (Figura 16) sendo o extrato proteico total aplicado em gel SDS-PAGE 12%. O plasmídeo pET 21 sem inserto foi usado como controle de expressão por indução (Figura 17).

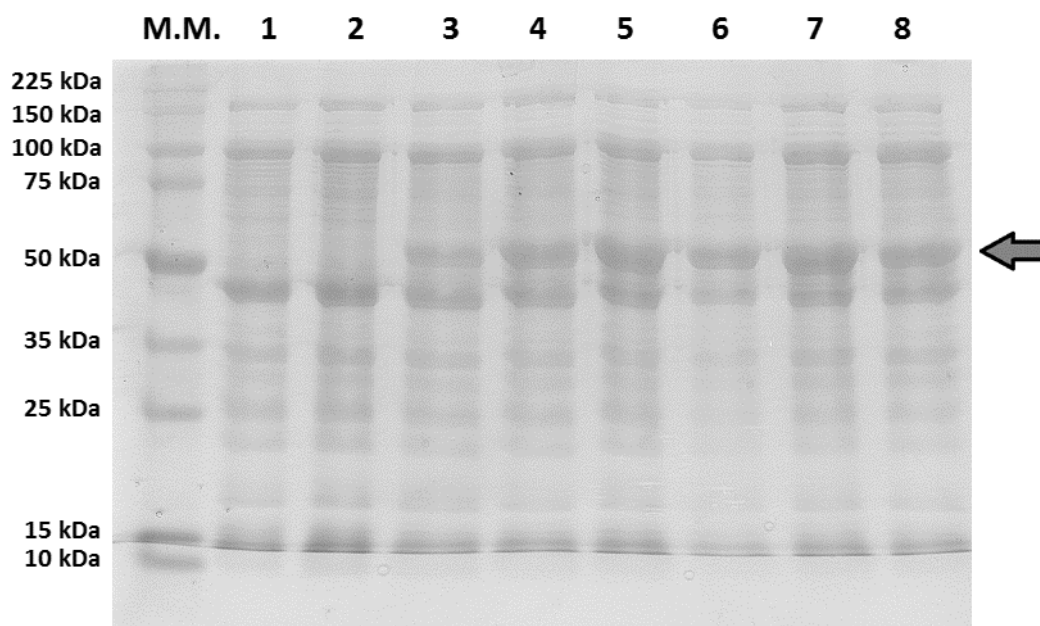


Figura 15. Extrato proteico total de pET-60EGP em *E. coli* BL21 DE3, transformada antes da indução (1) e após a indução nos tempos 0 min (2), 15 min (3), 30 min (4), 1 h (5), 2h (6), 3h (7) e 4h (8). A proteína resultante da indução de expressão do plasmídeo aparece nas colunas 3 a 8, com massa observada aproximada de 55 kDa, indicada pela seta vermelha. M.M.: Marcador molecular.

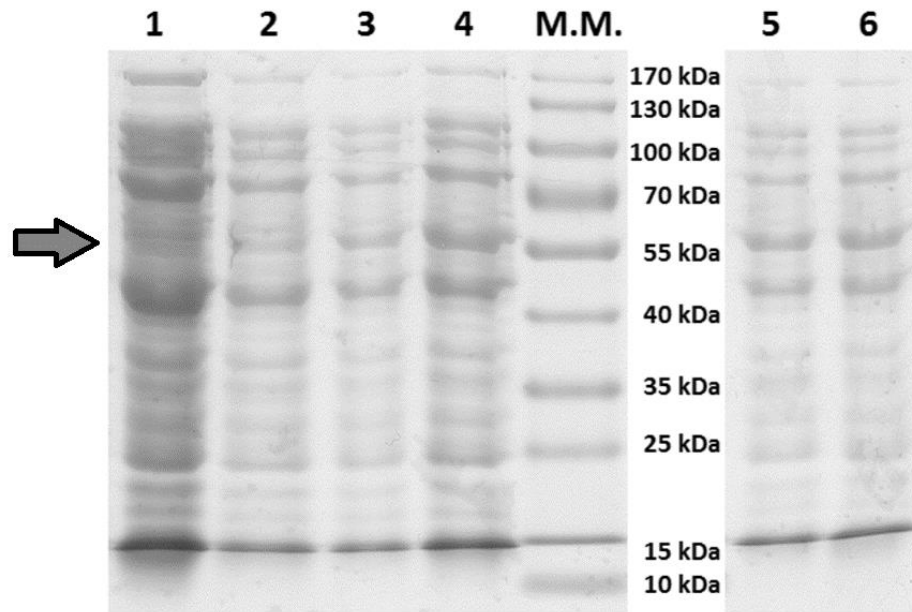


Figura 16. Extrato proteico total de pET-60EGP em *E. coli* pLysE nos tempos 30 min (2), 1h (3), 2h (4), 3h (5) e 4h (6) em comparação com a hora zero de indução (1). A proteína resultante da indução de expressão do plasmídeo aparece nas colunas 2, 3, 4, 5 e 6, com massa observada de aproximadamente 55 kDa, indicada pela seta. M.M.: Marcador molecular.

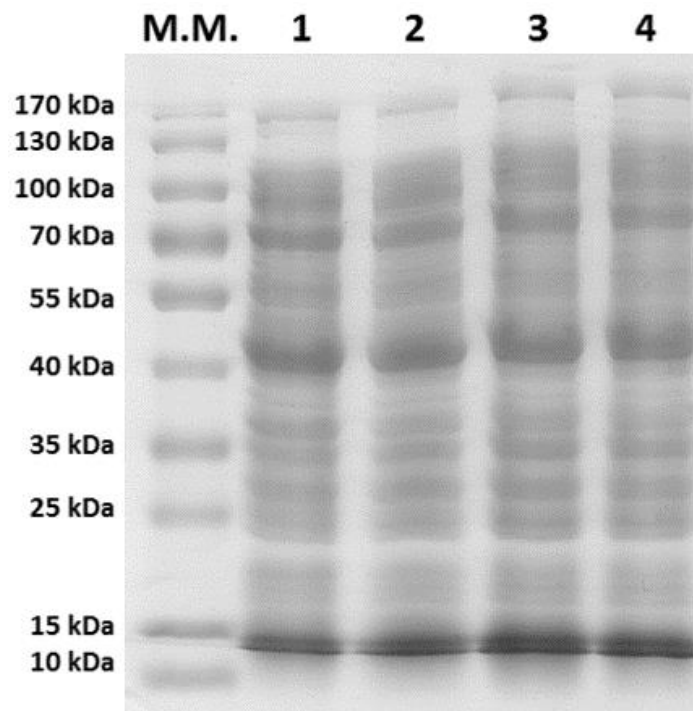


Figura 17. Extrato proteico total de pET21a(+) em *E. coli* BL 21 nos tempos zero min (1), 30 min (2), 1h (3), 3hs (4) após a indução. M.M.: Marcador molecular.

A análise da expressão do plasmídeo pET-60EGP nas duas linhagens de *E. coli* avaliadas indicou a presença de uma proteína expressa por indução de 55 kDa, que não foi observada no controle pET 21a(+). O cálculo de massa para a proteína

esperada era de 47 kDa. Entretanto este é um fenômeno já reportado em outros trabalhos, uma vez que a característica tridimensional dos ELPs reduz sua mobilidade nos géis de acrilamida, mesmo com o uso de desnaturantes presentes no tampão de amostra (Ge, 2006; Shimazu, 2002). Considerando o esperado e aparente maior nível de expressão da proteína alvo em *E. coli* BL21, esta bactéria foi usada para as análises posteriores.

6.2.5. Isolamento da fusão ELP-Pa-MAP 2 recombinante

A efetividade do processo inicial de purificação por agregação de ELPs foi avaliada. Para este fim, após crescimento induzido por IPTG por 2 h, as células foram coletadas por centrifugação, lisadas por lizozima e um ciclo de congelamento, seguido de ultrassom para fragmentação de DNA, e novamente centrifugadas para retirada dos debris celulares. O sobrenadante resultante, contendo o lisado clarificado, foi então submetido ao método de precipitação de ELPs, onde foi adicionado um agente químico de precipitação (NaCl), sendo este homogeneizado submetido à temperatura de 30 °C, onde se observa a turbidez do meio ocasionada pela retirada dos ELPs de solução. Em seguida, os ELPs foram precipitados por meio de centrifugação a 40 °C. Desta forma, foi-se separado o precipitado, rico em ELPs e o sobrenadante, que contém as outras proteínas (Figura 18).

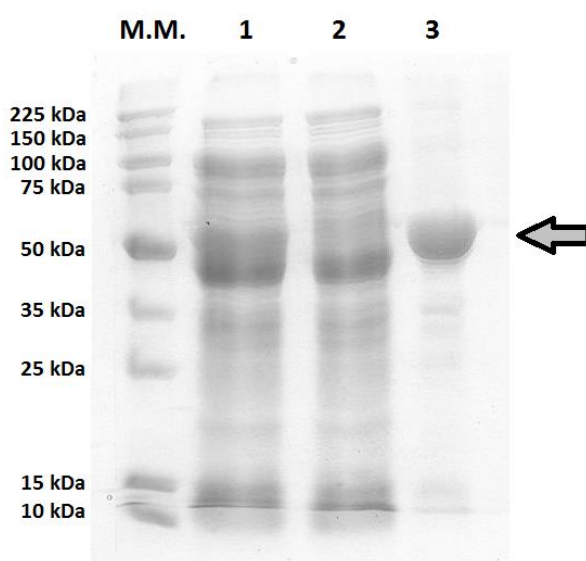


Figura 18. Isolamento após precipitação dos ELPs. Análise do extrato proteico total após indução, (1) extrato proteico total após precipitação por ELP (2) e ELP precipitado (3). A seta vermelha indica o ELP ainda ligado ao Pa-MAP 2 no precipitado. M.M.: Marcador molecular.

6.2.6. Análise de ativação da inteína e isolamento do peptídeo Pa-MAP 2

Após purificação, a fração rica em ELPs foi ressuspendida em diferentes soluções de clivagem, e incubada em diferentes condições para análise da clivagem do C-terminal (figura 19). A ativação da inteína, representada por um aumento da migração da banda de ELP em SDS-PAGE, foi observada como aumento da banda inferior em relação a superior, observado visualmente, em 24 h para o pH 5,5 a 25 °C e a 30 °C. Em 48 h, a ativação da inteína foi observada nos pHs 5 e 5,5 a 19, 25 e 30 °C e no pH 6,5 e 7 a 30 °C. Assim, a condição de pH 5,5, 25 °C e 24 h (Figura 20) foi escolhida e aplicadas nas análises subsequentes, devido ao menor tempo para clivagem e temperatura mais próxima à ambiente. Depois da ativação da inteína, 3 M de NaCl foram adicionados as amostras, seguido por incubação a 30 °C por 10 min, e centrifugados, para remoção dos ELPs. O sobrenadante, contendo o peptídeo Pa-MAP 2 foi então liofilizado e analisado por espectrometria de massa, onde um pico de 2517,95 m/z foi observado (Figura 21).

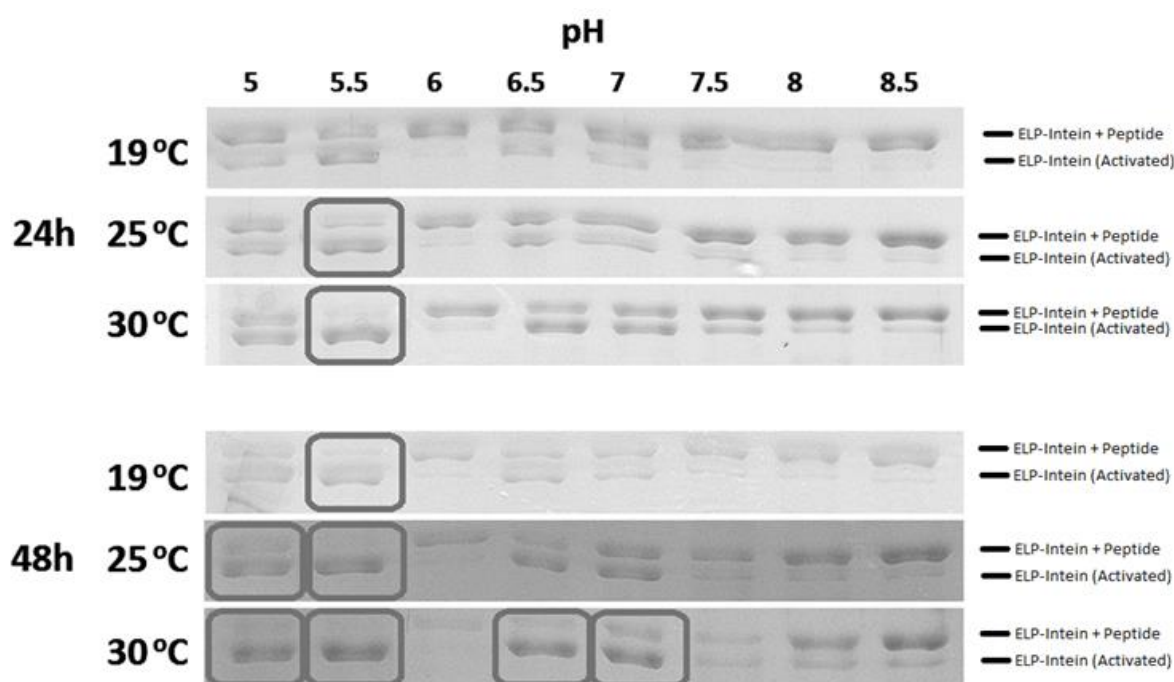


Figura 19. Análise por SDS-PAGE da ativação da inteína em diferentes condições. Os números acima da figura correspondem ao pH (5 a 8,5). Quadrados indicam as condições em que a clivagem observada visualmente foi maior, com a banda inferior aparecendo em maior proporção que a superior.

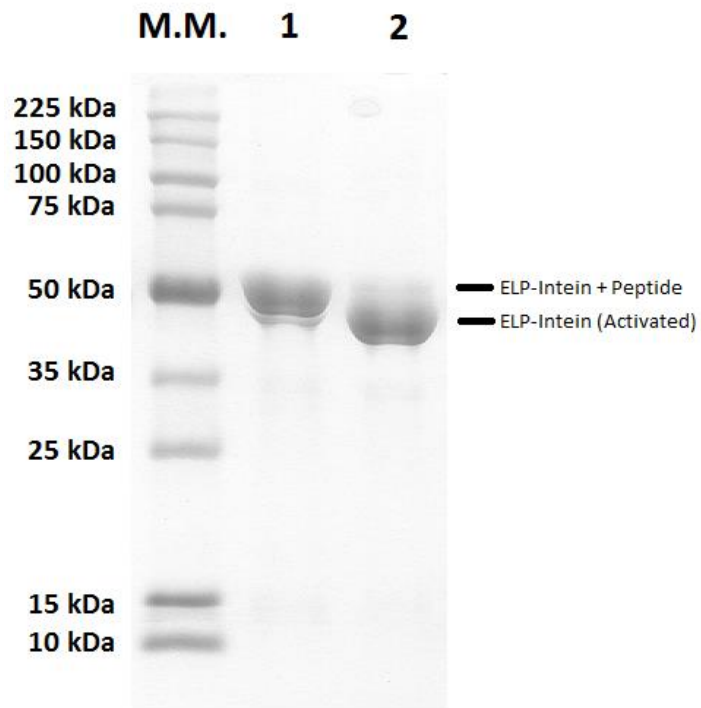


Figura 20. Análise da ativação da inteína nas condições escolhidas. ELPs antes da clivagem (1), e após a clivagem a 25 °C, pH 5,5 por 24 h (2). M.M. Marcador molecular.

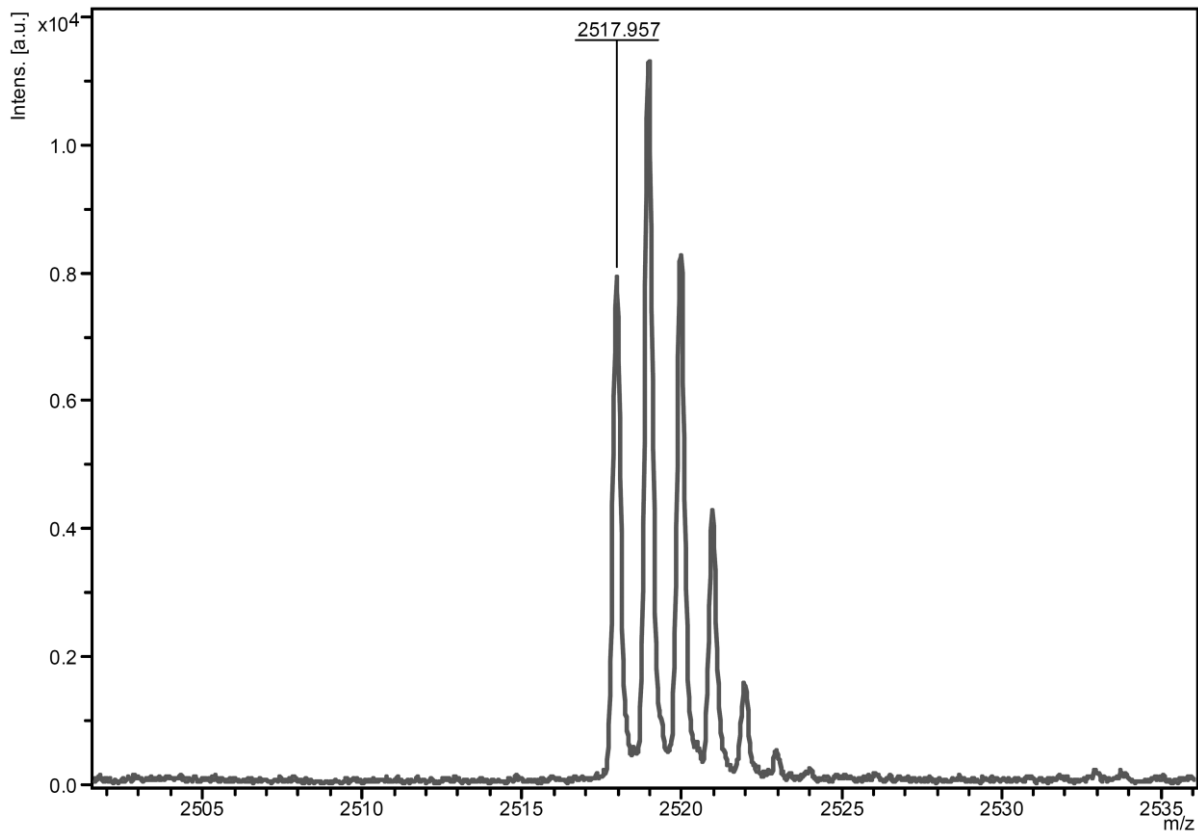


Figura 21. Análise do peptídeo produzido por MALDI. Espectro de massa com as espécies de múltipla carga, indicando o pico esperado de 2517,95 m/z.

6.2.7. Testes antimicrobianos

Buscando avaliar a atividade antimicrobiana, o MIC dos peptídeos Pa-MAP 2 recombinante e sintético, e da proteína formada pela ligação do Pa-MAP 2 ligado ao sistema ELP-inteína foram determinados contra *E. coli*. Não foi detectado inibição do crescimento de *E. coli* com o Pa-MAP 2 ligado ao sistema ELP-inteína, mesmo nas concentrações testadas mais altas (200 µM). Tanto o Pa-MAP 2 recombinante quanto o obtido por síntese química inibiram o crescimento de *E. coli* nas concentrações entre 12,5 µM.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana. Porcentagem de inibição de *E. coli* por concentração do peptídeo Pa-MAP 2 recombinante, Pa-MAP 2 sintético e do precursor Pa-MAP 2 ligado aos marcadores ELP-inteína.

Concentração (µM)	Pa-MAP 2 recombinante	Pa-MAP 2 sintético	Pa-MAP 2 ligado a inteína e ELP
200	100	100	0
100	100	100	0
50	100	100	0
25	100	100	0
12,5	100	100	0
6,25	45	32	0
3,125	13	9	0
1,5625	0,5	0,1	0

6.2.8. Cultivo simples e alimentado em biorreator

Para investigar a produção do Pa-MAP 2 por meio do sistema ELP-inteína em meio definido, primeiramente meio TB suplementado com glicerol foi usado como meio rico. Para emular as condições em *shaker*, o controle de pH e dos níveis de dO₂ foram desligados. Durante esta corrida, observou-se uma diminuição do pH, até nível inferior a 4, durante o meio da fase log, de forma que o crescimento foi reduzido consideravelmente (dados não mostrados). Nas fermentações subsequentes, o nível de pH foi ajustado para 7 e mantido com a adição de base, sendo o crescimento sustentado por 4 horas até o início da fase estacionária. Em seguida, o cultivo simples em biorreator em meio definido foi realizada para determinação da produção heteróloga do Pa-MAP 2, com o pH ajustado para 7, porém sem controle de dO₂. O crescimento foi sustentado, porém durante a fase exponencial, a baixa nos níveis de oxigênio foi acompanhada de um aumento nos níveis de acetato (Figura 22a). O nível

de oxigênio dissolvido foi então ajustado para 20%, resultando em uma menor produção de acetato e um aumento de 10% na biomassa total (Figura 22b).

A fim de otimizar ainda o nível de biomassa produzido, buscando obter uma maior quantidade de proteína, um cultivo alimentado em biorreator foi realizado, sendo a alimentação realizada em pulsos. Nestas condições, a produção de biomassa foi aumentada em 18% (Figura 22c).

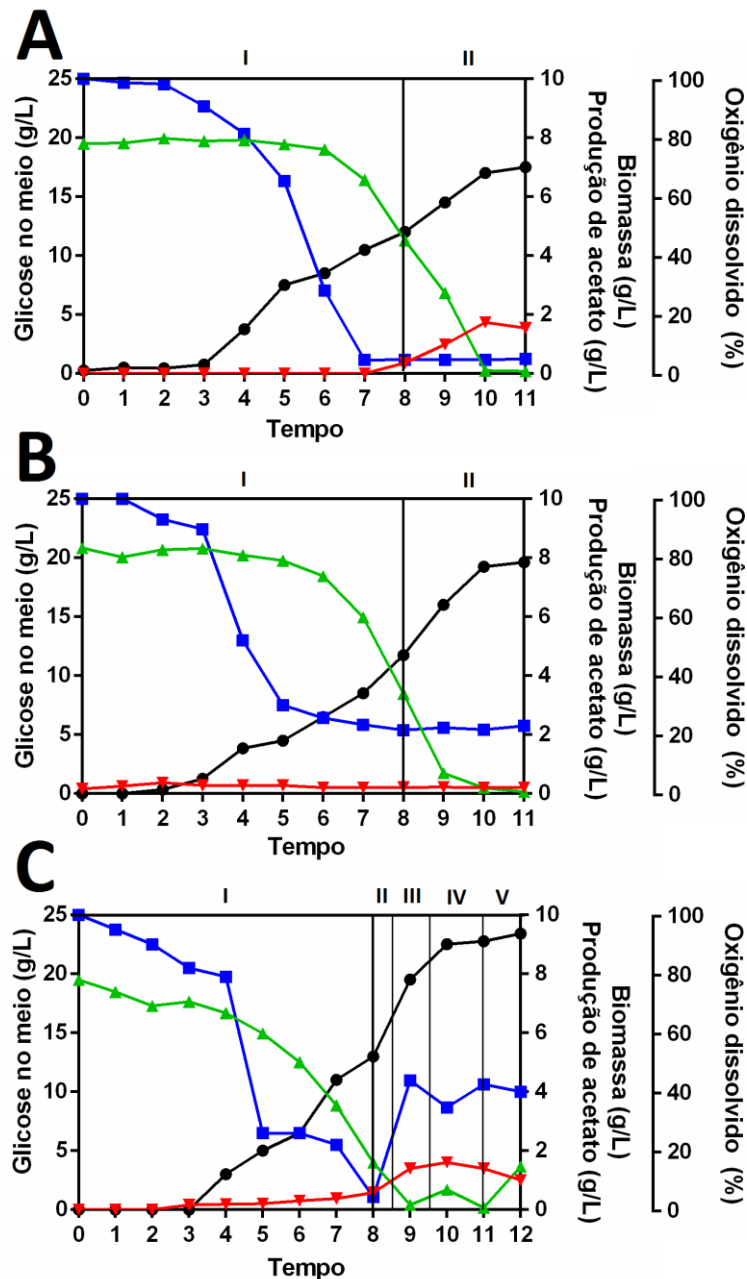


Figura 22 - Perfil de fermentação em meio definido. Plasmídeo pET-60EGP transformado em *E. coli*. A - Cultivo simples sem controle de oxigênio. B - Cultivo simples com controle do nível de oxigênio. C - Cultivo alimentado com controle de oxigênio. ■ - Oxigênio dissolvido. ▲ - Nível de glicose. ● - Produção de biomassa. ▼ - Nível de acetato. Números romanos acima dos gráficos correspondem a: I - Pré-indução, II-V - Após indução por IPTG, III - Primeiro pulso de alimentação com glicose, IV - segundo pulso de alimentação com glicose, V - terceiro pulso de alimentação com glicose. Variações em cada ponto e em linha geral corresponde a <5% em cada replicata.

As análises de rendimento proteico (Tabela 4) indicam uma maior produção em meio TB, correspondente a 11 mg of Pa-MAP 2 por grama de biomassa ($Y_{P/X}$). Em meio definido, a maior produção de biomassa foi observada cultivo simples e alimentado com controle do nível de oxigênio, rendendo 3.7 mg e 3.9 mg de Pa-MAP 2 por grama de glicose ($Y_{P/S}$) respectivamente. Entretanto, a produção total observada para o Pa-MAP 2 foi maior na estratégia com alimentação, 96 mg.L⁻¹ contra 78 mg.L⁻¹ na fermentação sem alimentação.

Tabela 4: Produção de proteína em diferentes condições de cultivo.

Meio/ Condição	$Y_{P/S}$ (mg.g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (mg.g ⁻¹)	Proteína Total (g.L ⁻¹)	ELP (g.L ⁻¹)	Pa-MAP 2 (mg.L ⁻¹)
TB	-	11.0	5.45 ± 0.75	1.45 ± 0.2	117.0 ± 1.7
Definido (Cultivo simples)	3.4	9.7	3.28 ± 0.52	0.95 ± 0.3	68.0 ± 2.4
Definido + 20% dO2 (Cultivo simples)	3.9	10.1	3.33 ± 0.34	1.08 ± 0.2	78.0 ± 2.6
Definido (Cultivo alimentado)	3.7	10.2	4.39 ± 0.8	1.14 ± 0.4	96.0 ± 3.0

TB: Cultivo em *Terrific broth* (TB), dO2: oxigênio dissolvido, $Y_{p/s}$: rendimento em mg de produto (Pa-MAP 2) por grama de substrato. $Y_{p/x}$: rendimento de mg de produto (Pa-MAP 2) por grama de biomassa, ELP: Proteína total recuperada pelo método de precipitação de ELPs.

6.2.9. Análise dos custos de produção

Os principais custos associados a produção de peptídeos por meio do sistema ELP-inteína são o meio de cultivo, os tampões e o reagente caotrópico relacionados a precipitação, clivagem e recuperação do peptídeo (BANKI e WOOD, 2005). Os custos associados ao meio rico na produção do Pa-MAP 2, são representados em mais de 95% pelo uso da triptona e do extrato de levedura (tabela 5).

Tabela 5: Custos associados ao meio de cultivo em meio TB.

Reagentes	Uso (kg)	Preço (kg)	Preço no meio de cultura (L)
Triptona (Kasvi)	0,012	958,00	11,50
Extrato de levedura (Kasvi)	0,024	820,00	19,68
KH ₂ PO ₄	0,00231	35,00	0,08
K ₂ HPO ₄	0,01254	36,00	0,45
Glicerol*	0,004	24,00	0,10
Custo em meio TB:			31,80

Custos associados ao meio de cultivo em meio rico TB. O preço dos reagentes foi orçado no mês 09/2016. Todos os reagentes foram cotados diretamente pela distribuidora Sigma Aldrich/Vetec, com exceção da triptona e extrato de levedura, cotados pela Kasvi. A quantia de uso e preço por quilo de glicerol apresentam-se em ml. Os preços são representados em reais.

Os custos relacionados ao meio de cultura estão próximos a 3,67 reais por mg de Pa-MAP 2 em meio rico, enquanto que em meio definido (Tabela 6), este custo cai para 0,04 reais por mg. Em meio definido, os principais custos estão associados ao uso dos metais-traço.

Tabela 6: Custos associados ao meio de cultivo em meio definido (sem alimentação).

Reagentes	Uso (kg)	Preço (kg)	Preço no meio de cultura (L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,007	33,00	0,2
KH ₂ PO ₄	0,0016	36,00	0,1
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,00994	48,00	0,5
Glicose	0,02	24,00	0,5
MgSO ₄	0,00012	27,00	0,0
<u>EDTA.2H₂O</u>	0,00214	475,00	1,0
<u>CaCl₂.2H₂O</u>	0,00005	58,00	0,0
<u>FeCl₂.6H₂O</u>	0,00167	832,00	1,4
<u>ZnSO₄.7H₂O</u>	0,000018	59,00	0,0
<u>CuSO₄</u>	0,000016	41,00	0,0
<u>MnCl₂.4H₂O</u>	0,000013	716,00	0,0
<u>CoCl₂.6H₂O</u>	0,000018	738,00	0,0
Custo:			3,7

Custos associados ao meio de cultivo em meio definidos sem alimentação. O preço dos reagentes foi orçado no mês 09/2016. Todos os reagentes foram cotados diretamente no pela distribuidora Sigma Aldrich/ Vetec. Sublinhados: Elementos-traço. Os preços dos reagentes são representados em reais.

O custo da indução por IPTG não foi incluído nos cálculos de meio TB ou definido. O preço da indução por este método pode afetar consideravelmente o preço final do peptídeo obtido, entretanto, sua substituição por lactose, que foi descrita porém não validada pelo presente estudo, pode contribuir drasticamente para redução deste custo (tabela 7).

Tabela 7: Custos associados à indução.

Reagentes em indução	Uso (kg)	Preço (kg)	Preço no meio de cultura (L)
IPTG	0,000238	242,800	57,79
Lactose	0,00958	80	0,77

Custos associados a indução. O preço dos reagentes foi orçado no mês 09/2016. Todos os reagentes foram cotados diretamente pela distribuidora Sigma Aldrich/ Vetec. Os preços dos reagentes são representados em reais.

Por meio de uma análise considerando os custos de meio de cultura e indução, e relacionando-os aos rendimentos médios obtidos, são obtidos 1g de peptídeo em meio TB por volta de 766 reais, e em meio mínimo por volta de 640 reais, sendo que a maior parte deste custo se relaciona ao preço do IPTG. Em cotação realizada em maio de 2016, os custos para compra de 1 g de Pa-MAP 2 eram de 16.000 dólares. É importante ressaltar que durante esta discussão do processo de produção do Pa-MAP 2, vários custos não foram considerados, discutidos ou podem ainda ser modificados. Os custos de lise das células pós-fermentação, realizados no presente trabalho por sonicação e com o uso de enzimas pode ser realizado potencialmente em maior escala e menor custo com o uso de aparelhos de pressão hidráulica, como o *french press*. Não foram considerados os custos dos três ciclos de precipitação por ELPs, onde a centrifugação e o reagente NaCl aparecem como principal custo. Por fim existem ainda custos associados ao tampão de clivagem, concentração de amostras, pós-purificação do peptídeo e análise de pureza de acordo com o grau exigido e outros custos operacionais e de pessoal, além dos custos relacionados ao desenvolvimento e síntese do plasmídeo.

7. DISCUSSÃO

Nos dias atuais, existe uma aparente demanda clínica relacionada a doenças infecciosas, onde o desenvolvimento de novos antimicrobianos constitui uma necessidade urgente. A organização mundial de saúde (WHO, 2014) recentemente relatou o possível início de uma era pós-antibióticos. Muitas iniciativas para estimular o desenvolvimento de novos compostos foram lançadas, com os PAMs representando potenciais candidatos a esta terapêutica. Entretanto, uma das maiores restrições ao uso destas moléculas é o seu alto custo de produção (DA COSTA *et al.*, 2015).

Atualmente, a produção de PAMs pode ser baseada em duas rotas, sistemas biológicos e síntese química. Apesar da vasta maioria dos fármacos peptídicos serem obtidos pela síntese química, este processo ocorre de forma demorada, trabalhosa e com alto custo, sendo apropriado principalmente para sequências de até 2,5 kDa (BASU *et al.*, 2014). A produção por meio de sistemas biológicos tem sido descrita como o procedimento melhor custo-efetivo para produção em larga escala de peptídeos (LI, 2011). Estes processos têm sido simplificados nas últimas décadas pelo desenvolvimento de um grande número de vetores de clonagem, linhagens hospedeiras, proteínas de fusão e diferentes marcações; ferramentas que em conjunto simplificam o isolamento de PAM recombinantes a partir de culturas microbianas.

Visando criar um sistema de expressão para peptídeos antimicrobianos, o projeto inicial da presente tese previa a expressão de três PAMs, BmLAO F1, F2 e F3, derivados de fragmentos de proteínas encontradas no veneno de Jararaca-pintada (*Bothrops matogrosensis*) em *Bacillus subtilis*. Este projeto foi abandonado ainda durante os experimentos iniciais, devido à inviabilidade de seu sistema de expressão e purificação com o uso de brometo de cianogênio, que tem atualmente seu transporte proibido no país. Desta forma, deu-se início ao design de um sistema de expressão onde foram modificadas além das proteínas de fusão e sítio de clivagem, o peptídeo alvo para expressão.

A nova estratégia de expressão proposta previa a produção do Pa-MAP 2, um peptídeo sintético caracterizado em nosso grupo de pesquisa (MIGLIOLO *et al.*, 2012). Este peptídeo foi avaliado e demonstrou notória atividade contra bactérias gram-negativas e baixo potencial citotóxico, sendo assim evidenciado seu potencial

terapêutico. Entretanto, sua produção em maior escala era desafiadora por dois motivos. O primeiro se relacionava ao seu tamanho, que tornava o custo de produção por síntese química um impeditivo ao seu uso. O segundo fator era a grande quantidade de alaninas em sequência, que representa um problema para síntese química, conhecido como agregação da cadeia peptídica, diminuindo o rendimento por esta técnica (COIN *et al.*, 2007).

Como alternativa a estes problemas encontrados na síntese química, buscou-se validar o método de produção por ELP-inteínas para produção de peptídeos antimicrobianos ricos em polialaninas, sendo o PAM Pa-MAP 2 usado como peptídeo alvo. Para isso, dois cassetes foram desenhados para *B. subtilis*, sendo o primeiro constituído por 100 repetições de ELP, a inteína *Mtu* RecA e o Pa-MAP 2 e o segundo cassete formado por 100 repetições de ELP, a inteína *Mxe* GyrA e o Pa-MAP 2. Estes cassetes foram sintetizados nos vetores pBSK e corretamente inseridos no vetor pET 21, sendo em transformados em *B. subtilis*. Em seguida, foi-se avaliada a produção do peptídeo ligado às proteínas de fusão por estes vetores, porém mesmo após a indução em diferentes condições, não foi possível observar nenhuma proteína diferencialmente expressa. Após análise e revisão detalhada dos protocolos usados, e com repetido insucesso, o processo de produção do Pa-MAP 2 foi então novamente modificado para expressão em *E. coli*, tendo ainda diversos parâmetros modificados.

Dentre as diferentes variáveis, o tamanho do marcador de ELP foi alterado. O número de repetições do pentapeptídeo VPGXG, formador dos ELPs, igual a 100 parece ser o mais usado na literatura (FLOSS *et al.*, 2010). Porém é possível que um número menor de repetições de ELPs possa ser mais adequado a produção de PAMs, visando um maior rendimento final de peptídeo (YANG *et al.*, 2012), uma vez que ao encurtar o marcador ELP, disponibiliza-se mais aminoácidos para síntese desta longa sequência proteica repetitiva (MEYER *et al.*, 2001). Assim, uma sequência de 60 repetições foi criada, visando manter a temperatura esperada de agregação abaixo de 50 °C, segundo descrito por estudos anteriores (GOLEMIS *et al.*, 2005). Contudo deve se observar que apesar do maior rendimento, diminuir o número de repetições pode aumentar os requerimentos de força iônica e de temperatura durante a transição de fase para precipitação dos ELPs.

Desta forma, para expressão do Pa-MAP 2 em *E. coli* foram desenvolvidas duas construções, com uma sequência de 100 e uma de 60 repetições de ELPs. Estes

plasmídeos foram sintetizados e clonados em *E. coli*, porém somente o plasmídeo com 60 repetições gerou uma proteína diferencialmente expressa após indução com IPTG. Sendo assim, a sequência de 100 repetições não pode ser avaliada nos experimentos subsequentes e foi descartada. A sequência de 60 repetições de ELP foi purificada com sucesso após dois ciclos de precipitação, assim como descrito em outros trabalhos (FONG e WOOD, 2010; SHI *et al.*, 2013), sendo a temperatura de precipitação mantida, com a adição do agente caotrópico, abaixo de 30 °C com sucesso.

O sistema de precipitação por ELP já havia sido previamente usado para produção de dois peptídeos antimicrobianos. O PAM cecropina AD foi ligada a um sítio de enteroquinase e 36 repetições de ELP, resultando em um rendimento de 12 mg.L⁻¹ (YANG *et al.*, 2012), enquanto o PAM halocidina 18 foi conectado a 90 repetições de ELP por um sítio de clivagem por hidroxilamina, apresentando um rendimento final de 69 mg.L⁻¹ (HU *et al.*, 2010a). As principais limitações citadas nestes trabalhos envolvem a clivagem enzimática ou química da proteína, remoção lenta ou incompleta do ELP, remoção pós tratamento das proteases usadas e o alto custo das enzimas proteolíticas. A maior parte destes problemas pode ser resolvida pelo uso de uma inteína, separando o ELP e o PAM. Devido à falta de expressão observada no variante contendo 100 repetições de ELP e a inteína *Mtu* RecA, foi-se avaliado no presente trabalho somente a atividade de clivagem por meio da inteína *Mxe* GyrA.

De fato, muitos peptídeos antimicrobianos foram obtidos em bactérias com o uso de inteínas, a partir de diferentes marcadores de purificação, em diferentes rendimentos. O PAM SMAP-29 foi obtido com rendimento de 0.2 mg.L⁻¹ (MORASSUTTI *et al.*, 2002), a cecropina CM4 com 2,5 mg.L⁻¹ (CHEN *et al.*, 2008), a defensina HBD2 with 4 mg.L⁻¹ (DIAO *et al.*, 2007), o IDR 1 com 80 mg.L⁻¹ (BOMMARIUS *et al.*, 2010) e o SC-AMP com 208 mg.L⁻¹ (KOTRA, 2014), otimizado em cultivo alimentado em biorreator até 467 mg. L⁻¹ (SEETHA RAM K., 2014). Em especial, estes últimos estudos indicam o uso potencial das inteínas para purificação de peptídeos em pequena e larga escala.

A simplicidade conferida por este método, que requer poucos passos de isolamento e reduz a quantidade de reagentes necessária, sugere que as inteínas podem ser usadas para diminuir o custo de produção de proteínas recombinantes

(BANKI e WOOD, 2005). A fusão do Pa-MAP 2 no ELP poderia ser realizada no N- ou C-terminal. Ainda que seja relatado na literatura que maiores níveis de produção estão associados a fusão de proteínas no N-terminal dos ELPs (CHRISTENSEN *et al.*, 2009), nestas condições faz-se necessário o uso de DTT para ativação da inteína. Para expressão em *E. coli*, buscando uma estratégia com menor custo por meio da clivagem induzida por mudança de temperatura ou pH, a inteína *Mxe Gyra* foi fusionada ao C-terminal do ELP, tendo seu primeiro aminoácido modificado (C1A) com o intuito de permanecer fusionada ao ELP, liberando o peptídeo em solução (PAULUS, 2000).

Apesar de algum nível de pré-clivagem, com possível liberação do peptídeo após a indução, ter sido observada durante as análises de SDS-PAGE do ELP após sua precipitação inicial (Figura 20, coluna 1), o crescimento após a indução foi comparável a bactéria não induzida (dados não mostrados), o que indica que a ativação da inteína *Mxe Gyra* foi bem controlada. É possível ainda que esta clivagem tenha ocorrido em menor nível durante a expressão, ocorrendo também durante os processos de extração e purificação inicial.

Trabalhos anteriores descrevem a inteína *Mxe Gyra* como temperatura-dependente (TELENTI *et al.*, 1997; SOUTHWORTH *et al.*, 1999), entretanto em nossos experimentos, o pH ótimo de indução desta inteína foi o pH 5,5, em três diferentes temperaturas avaliadas (19, 25 e 30 °C). A análise de MALDI demonstrou que o Pa-MAP 2 pode ser recuperado sem resíduos adicionais de aminoácidos, sendo ativo contra a bactéria testada em concentrações similares a Pa-MAP 2 sintético. O trabalho anterior com o Pa-MAP 2 (MIGLILOLO *et al.*, 2016) indicava um MIC de 3.2 µM, bem abaixo do encontrado no presente trabalho, de 12,5 µM. Esta diferença pode ser explicada pela diferença de protocolo usado para realização do teste de MIC, em especial ao uso de meios de cultura diversos, a saber o meio Mueller-Hinton no trabalho anterior e o meio LB no presente trabalho. Esse resultado se relaciona com a característica de vários PAMs, que apresentam maior atividade em meios de maior força iônica, com o meio Mueller-Hinton, porém o meio LB parece simular melhor as concentrações fisiológicas de íons (BOWDISH *et al.*, 2006).

O presente trabalho é o primeiro relato da produção de um PAM ativo, por meio da marcação por ELP-inteína em um biorreator de 0,5 L, comparando sua produção em meio rico e meio definido. Os experimentos em *shaker* demonstraram que a

produção do precursor marcado com ELP permaneceu relativamente constante depois de duas horas de indução (Figura 15). Desta forma, os experimentos em biorreator foram desenvolvidos para aumentar a densidade celular, primeiramente em meio rico (TB) e depois em meio definido, visando por consequência aumentar o total de peptídeo produzido.

Por meio dos primeiros experimentos em biorreator com o meio TB, foram estabelecimento parâmetros básicos de crescimento. O primeiro experimento em reator foi feito somente com o controle de temperatura, à 37 °C. Nesta condição foi observada uma queda pronunciada do pH nas primeiras horas de experimento, resultando em diminuição pronunciada do crescimento bacteriano. O segundo experimento foi realizado com ajuste de temperatura e pH, sendo o crescimento realizado até o início da fase estacionária, onde a indução com IPTG foi realizada e posteriormente amostras foram coletadas para análises de produção.

Para avaliação detalhada dos fatores limitantes de crescimento e consumo de substrato, foram realizados então experimentos em diferentes condições em meio mínimo. Durante a primeira análise em meio mínimo, sem ajuste de DO, foi-se observada produção de acetato em resposta à diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido para próximo de zero durante a fase máxima de crescimento. Sabe-se que a produção de acetato pode diminuir os níveis totais de proteína produzida, especialmente em biorreatores (EITEMAN *et al.*, 2006; DE MEY *et al.*, 2007). Buscando minimizar a produção de acetato, a próxima fermentação foi realizada com ajuste do oxigênio dissolvido para >20%, por meio do aumento automático da rotação do meio de cultura. Por meio desta modificação, a produção de acetato foi minimizada com sucesso, e um aumento de biomassa de aproximadamente 10% foi observado. Notou-se ainda que nestas condições, o crescimento bacteriano se deu até o fim do suprimento de glicose.

A terceira fermentação foi desenhada para avaliar a glicose como um fator limitante de crescimento bacteriano. Para isso, realizou-se uma batelada alimentada, utilizando-se como critério que, com a depleção da glicose do meio, o crescimento bacteriano era rapidamente desacelerado, sendo então observado um aumento da concentração de oxigênio dissolvido. Nesta situação, realizou-se então a suplementação pontual de glicose, o que resultou em um aumento de biomassa de aproximadamente 10%. Após a terceira suplementação, a bactéria entrou em fase

estacionária de crescimento, possivelmente devido ao esgotamento da fonte de amônia (WANG *et al.*, 2009).

A quantidade total do Pa-MAP 2 produzido por grama de biomassa foi aproximadamente 10% maior em meio TB comparado ao cultivo alimentado em biorreator usando meio definido. Adicionalmente, as células em meio TB são coletadas seis horas após início da fermentação, enquanto no meio definido, esta coleta é feita após 10 horas, o que sugere uma maior produtividade por tempo associada ao uso de meios complexos.

Apesar do sistema ELP-inteína ter sido validado para expressão de diferentes proteínas, poucas tentativas para trazer esta técnica para produção de PAMs foram realizadas. De fato, os PAMs moricina CM4 e a beta defensina humana 4 são os únicos relatos de AMPs expressos por esta técnica, em rendimentos de 0,6 e 1,8 mg.L⁻¹, respectivamente (SHEN *et al.*, 2010). O rendimento do peptídeo antimicrobiano Pa-MAP 2 usando o meio rico em biorreatores foi cinquenta vezes maior que o PAM beta defensina humana 4, expressa em mesmo meio porém com o uso de 110 repetições de ELP e a inteína *Mxe RecA ΔI-CM* (SHEN *et al.*, 2010). Este aumento expressivo pode estar associado a diversos fatores modificados no presente estudo, como o maior controle do crescimento relacionado ao uso de biorreatores, o foco no aumento de biomassa, uso de ELP com menor número de repetições e da inteína melhor controlável.

Quanto aos custos de produção, os principais gastos associados à produção pelo sistema ELP-inteína envolvem o meio de cultura e a indução. Nos meios não-definidos, como o meio TB, os custos mais relevantes envolvem os reagentes complexos como a triptona e o extrato de levedura. Dentre os principais custos associados ao meio definido sem alimentação, estão o custo combinados dos metais-traço. É importante ressaltar que muitos deles podem ser potencialmente eliminados do meio de cultivo com o uso de água do sistema público, além de ser observada uma diminuição de custo associada a não-utilização de água destilada (FONG e WOOD, 2010). Especialmente nos cultivos alimentados, os custos de glicose como fonte de carbono pode ser potencialmente reduzidos com o uso de bagaço de cana não tratado (Tabela 7), e o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio pode possivelmente ser trocado por milhocina, um resíduo gerado pela indústria de beneficiamento de milho rico em aminoácidos (YE *et al.*, 2010), diminuindo os custos do meio de cultivo em

relação ao esperado para o meio definido. Todavia a substituição por estas fontes de carbono e nitrogênio não foram avaliadas no presente trabalho e precisam ser validadas experimentalmente.

Os custos de indução por IPTG se mostram relevantes para produção do Pa-MAP 2, afetando consideravelmente o preço final do peptídeo obtido, entretanto, sua substituição por lactose, ainda não validada, pode contribuir drasticamente para redução deste custo (DVORAK *et al.*, 2015). É importante ressaltar que, antes que se possa indicar o sistema ELP-inteína como alternativa viável para produção em massa de PAMs, faz-se necessária uma análise mais detalhada de custos, onde processos de pós-purificação do peptídeo para diferentes graus de pureza requeridos podem ainda representar valores significativos. Apesar de todos estes custos, o método relatado neste trabalho substitui as resinas de afinidade no isolamento e no uso de reagentes químicos ou proteases para clivagem, sendo particularmente interessante para produção de peptídeos antimicrobianos.

8. Conclusões e perspectivas

O uso do sistema ELP-inteínas foi usado com sucesso para produção e purificação do Pa-MAP 2 em *E. coli*. Mais do que a produção deste peptídeo, o presente trabalho mostra-se como uma prova de conceito, apontando direções futuras para produção de outros peptídeos, especialmente os ricos em alaninas, por meio deste sistema, oferecendo uma alternativa atrativa à purificação por afinidade ou clivagem por enzimas e reagentes químicos. Notavelmente, os peptídeos produzidos por este processo possuem atividade semelhante ao obtido por síntese química. Por meio deste trabalho, são apresentadas ainda direções para produção de peptídeos por meio do sistema ELP-inteína em reatores, com rendimento comparável a outros processos de produção, porém com baixo custo associado, contribuindo para o estabelecimento deste processo como uma importante ferramenta biotecnológica para viabilização do uso de peptídeos antimicrobianos na terapêutica humana. Espera-se que futuramente, os dados aqui apresentados possam ainda ser utilizados para otimizações do processo apresentado, bem como para o estabelecimento de experimentos em maior escala e na produção de novos peptídeos antimicrobianos.

9. Referências

ALALWANI, S. M.; SIERIGK, J.; HERR, C.; PINKENBURG, O.; GALLO, R.; VOGELMEIER, C.; BALS, R. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 4, p. 1118-26, Apr 2010.

ALBERTSEN, L.; SHAW, A. C.; NORRILD, J. C.; STROMGAARD, K. Recombinant production of peptide C-terminal alpha-amides using an engineered intein. **Bioconjug Chem**, v. 24, n. 11, p. 1883-94, Nov 20 2013.

AMITAI, G.; CALLAHAN, B. P.; STANGER, M. J.; BELFORT, G.; BELFORT, M. Modulation of intein activity by its neighboring extein substrates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 27, p. 11005-10, Jul 7 2009.

ANVISA. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica – Módulo V. SAÚDE**, M. D. Brasília: Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004a.

_____. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. . SAÚDE, M. D. Brasília, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004b.

BANKI, M. R.; FENG, L.; WOOD, D. W. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. **Nat Methods**, v. 2, n. 9, p. 659-61, Sep 2005.

BANKI, M. R.; GERNGROSS, T. U.; WOOD, D. W. Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. **Protein Sci**, v. 14, n. 6, p. 1387-95, Jun 2005.

BANKI, M. R.; WOOD, D. W. Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up. **Microb Cell Fact**, v. 4, p. 32, Nov 11 2005.

BASU, A.; MISHRA, B.; DEY, S.; LEONG, S. S. J. Intein based bioprocess for production of a synthetic antimicrobial peptide: an alternative route to solid phase peptide synthesis. **RSC Advances**, v. 4, n. 60, p. 31564-31572, 2014.

BO, L.; LI, J.; TAO, T.; BAI, Y.; YE, X.; HOTCHKISS, R. S.; KOLLEF, M. H.; CROOKS, N. H.; DENG, X. Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 10, p. CD009066, 2014.

BOMMARIUS, B.; JENSSEN, H.; ELLIOTT, M.; KINDRACHUK, J.; PASUPULETI, M.; GIEREN, H.; JAEGER, K. E.; HANCOCK, R. E.; KALMAN, D. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. **Peptides**, v. 31, n. 11, p. 1957-65, Nov 2010.

BOWDISH, D. M. E.; DAVIDSON, D. J.; HANCOCK, R. E. W. Immunomodulatory Properties of Defensins and Cathelicidins. In: SHAFER, W. M. (Ed.). **Antimicrobial Peptides and Human Disease**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p.27-66.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **Int J Antimicrob Agents**, v. 38, n. 3, p. 217-25, Sep 2011.

BUNCE, C.; WHEELER, L.; REED, G.; MUSSER, J.; BARG, N. Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. **Infect Immun**, v. 60, n. 7, p. 2636-40, Jul 1992.

CAO, L.; LI, Z.; ZHANG, R.; WU, Y.; LI, W.; CAO, Z. StCT2, a new antibacterial peptide characterized from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. **Peptides**, Apr 27 2012.

CHEN, Y. Q.; ZHANG, S. Q.; LI, B. C.; QIU, W.; JIAO, B.; ZHANG, J.; DIAO, Z. Y. Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using two fusion partners. **Protein Expr Purif**, v. 57, n. 2, p. 303-11, Feb 2008.

CHILKOTI, D. E. M. A. A. **Protein Purification by Inverse Transition Cycling**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

CHRISTENSEN, T.; AMIRAM, M.; DAGHER, S.; TRABBIC-CARLSON, K.; SHAMJI, M. F.; SETTON, L. A.; CHILKOTI, A. Fusion order controls expression level and activity of elastin-like polypeptide fusion proteins. **Protein Sci**, v. 18, n. 7, p. 1377-87, Jul 2009.

COIN, I.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. **Nat. Protocols**, v. 2, n. 12, p. 3247-3256, 12//print 2007.

CONLEY, A. J.; JOENSUU, J. J.; JEVNIKAR, A. M.; MENASSA, R.; BRANDLE, J. E. Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. **Biotechnol Bioeng**, v. 103, n. 3, p. 562-73, Jun 15 2009.

CONNELL, I.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MARILD, S.; SVANBORG, C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9827-32, Sep 3 1996.

COOPER, M. A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 32, Apr 7 2011.

DA COSTA, J. P.; COVA, M.; FERREIRA, R.; VITORINO, R. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 5, p. 2023-40, Mar 2015.

DAVIS, C. P. Normal Flora. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th. Galveston (TX), 1996.

DE MEY, M.; DE MAESENEIRE, S.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 11, p. 689-700, Nov 2007.

DIAO, H.; GUO, C.; LIN, D.; ZHANG, Y. Intein-mediated expression is an effective approach in the study of beta-defensins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 357, n. 4, p. 840-6, Jun 15 2007.

DING, F. X.; YAN, H. L.; MEI, Q.; XUE, G.; WANG, Y. Z.; GAO, Y. J.; SUN, S. H. A novel, cheap and effective fusion expression system for the production of recombinant proteins. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 77, n. 2, p. 483-8, Nov 2007.

DORING, G.; PIER, G. B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v. 26, n. 8, p. 1011-24, Feb 20 2008.

DVORAK, P.; CHRAST, L.; NIKEL, P. I.; FEDR, R.; SOUCEK, K.; SEDLACKOVA, M.; CHALOUPKOVA, R.; DE LORENZO, V.; PROKOP, Z.; DAMBORSKY, J. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 201, 12/21

EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. **Trends Biotechnol**, v. 24, n. 11, p. 530-6, Nov 2006.

ELLEUCHE, S.; POGGELER, S. Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, n. 2, p. 479-89, Jun 2010.

FENG, X.; LIU, C.; GUO, J.; SONG, X.; LI, J.; XU, W.; LI, Z. Recombinant expression, purification, and antimicrobial activity of a novel hybrid antimicrobial peptide LFT33. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 95, n. 5, p. 1191-8, Sep 2012.

FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections-future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 2, p. 125-39, Apr 2011.

FLOSS, D. M.; SCHALLAU, K.; ROSE-JOHN, S.; CONRAD, U.; SCHELLER, J. Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. **Trends Biotechnol**, v. 28, n. 1, p. 37-45, Jan 2010.

FONG, B. A.; WOOD, D. W. Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density *E. coli* fermentation. **Microb Cell Fact**, v. 9, p. 77, 2010.

FONG, B. A.; WU, W. Y.; WOOD, D. W. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. **Protein Expr Purif**, v. 66, n. 2, p. 198-202, Aug 2009.

_____. The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes. **Trends Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 272-9, May 2010.

FRANCO, O. L. Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. **FEBS Lett**, v. 585, n. 7, p. 995-1000, Apr 6 2011.

FRIEDRICH, C. L.; ROZEK, A.; PATRZYKAT, A.; HANCOCK, R. E. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. **J Biol Chem**, v. 276, n. 26, p. 24015-22, Jun 29 2001.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R.; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE, S. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 6, p. 848-54, Sep 15 2005.

GERRITSEN, V. B. When a frog swallows a fly. **Protein Spotlight**, n. 7, p. 1-2, February 2001 2001.

GIEFING, C.; MEINKE, A. L.; HANNER, M.; HENICS, T.; BUI, M. D.; GELBMANN, D.; LUNDBERG, U.; SENN, B. M.; SCHUNN, M.; HABEL, A.; HENRIQUES-NORMARK, B.; ORTQVIST, A.; KALIN, M.; VON GABAIN, A.; NAGY, E. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 1, p. 117-31, Jan 21 2008.

GILLIES, A. R.; MAHMOUD, R. B.; WOOD, D. W. PHB-intein-mediated protein purification strategy. **Methods Mol Biol**, v. 498, p. 173-83, 2009.

GOLDENBERG, J. Z.; LYTVYN, L.; STEURICH, J.; PARKIN, P.; MAHANT, S.; JOHNSTON, B. C. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 12, p. CD004827, 2015.

GOLEMIS, E.; ADAMS, P. D. **Protein-protein Interactions: A Molecular Cloning Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.

GONG, Z.; EWART, K. V.; HU, Z.; FLETCHER, G. L.; HEW, C. L. Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4106-12, Feb 23 1996.

GUO, C.; LI, Z.; SHI, Y.; XU, M.; WISE, J. G.; TROMMER, W. E.; YUAN, J. Intein-mediated fusion expression, high efficient refolding, and one-step purification of gelonin toxin. **Protein Expr Purif**, v. 37, n. 2, p. 361-7, Oct 2004.

HASSOUNEH, W.; CHRISTENSEN, T.; CHILKOTI, A. Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins. **Curr Protoc Protein Sci**, v. Chapter 6, p. Unit 6 11, Aug 2010.

HIRATA, R.; OHSUMK, Y.; NAKANO, A.; KAWASAKI, H.; SUZUKI, K.; ANRAKU, Y. Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 265, n. 12, p. 6726-33, Apr 25 1990.

HONG, I.; KIM, Y. S.; CHOI, S. G. Simple purification of human antimicrobial peptide dermcidin (MDCD-1L) by intein-mediated expression in *E.coli*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 20, n. 2, p. 350-5, Feb 2010.

HU, F.; KE, T.; LI, X.; MAO, P. H.; JIN, X.; HUI, F. L.; MA, X. D.; MA, L. X. Expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with elastin-like polypeptides in *Escherichia coli*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, n. 8, p. 2377-87, Apr 2010a.

_____. Expression and Purification of an Antimicrobial Peptide by Fusion with Elastin-like Polypeptides in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2377-2387, Apr 2010b.

HWANG, P. M.; VOGEL, H. J. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. **Biochem Cell Biol**, v. 76, n. 2-3, p. 235-46, 1998.

JASIN, M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. **Trends Genet**, v. 12, n. 6, p. 224-8, Jun 1996.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, July 1, 2006 2006.

KAMADA, N.; INOUE, N.; HISAMATSU, T.; OKAMOTO, S.; MATSUOKA, K.; SATO, T.; CHINEN, H.; HONG, K. S.; YAMADA, T.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, T.; WATANABE, N.; TSUCHIMOTO, K.; HIBI, T. Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. 5, p. 455-63, May 2005.

KAMYSZ, W.; OKROJ, M.; LUKASIAK, J. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta Biochemitry Polonica**, v. 50, n. 2, p. 461-9, 2003.

KANE, P. M.; YAMASHIRO, C. T.; WOLCZYK, D. F.; NEFF, N.; GOEBL, M.; STEVENS, T. H. Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. **Science**, v. 250, n. 4981, p. 651-7, Nov 2 1990.

KOTRA, S. R. K., M.M.V.; SRI, S. D.; RAMUDU, N. D.; KUMAR, S. A.; PERAVALI, J. B. Cost effective purification of intein based syntetic cationic antimicrobial peptide expressed in cold shock expression system using salt inducible *E. coli* GJ1158. **Journal of Microbiology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 7, 2014.

KUKLIN, N. A.; CLARK, D. J.; SECORE, S.; COOK, J.; COPE, L. D.; MCNEELY, T.; NOBLE, L.; BROWN, M. J.; ZORMAN, J. K.; WANG, X. M.; PANCARI, G.; FAN, H.; ISETT, K.; BURGESS, B.; BRYAN, J.; BROWNLOW, M.; GEORGE, H.; MEINZ, M.; LIDDELL, M. E.; KELLY, R.; SCHULTZ, L.; MONTGOMERY, D.; ONISHI, J.; LOSADA, M.; MARTIN, M.; EBERT, T.; TAN, C. Y.; SCHOFIELD, T. L.; NAGY, E.; MEINEKE, A.; JOYCE, J. G.; KURTZ, M. B.; CAULFIELD, M. J.; JANSEN, K. U.; MCCLEMENTS, W.; ANDERSON, A. S. A novel *Staphylococcus aureus* vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine *S. aureus* sepsis model. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2215-23, Apr 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LI, J.; ZHENG, L.; LI, P.; WANG, F. Intein-mediated expression, purification, and characterization of thymosin alpha1-thymopentin fusion peptide in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif**, v. 84, n. 1, p. 1-8, Jul 2012.

LI, Y. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 54, n. 1, p. 1-9, Sep 2009.

_____. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. **Protein Expr Purif**, v. 80, n. 2, p. 260-7, Dec 2011.

LIN, P.; NG, T. B. A novel and exploitable antifungal peptide from kale (*Brassica alboglabra*) seeds. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1664-71, Oct 2008.

LIN, Z.; ZHAO, Q.; XING, L.; ZHOU, B.; WANG, X. Aggregating tags for column-free protein purification. **Biotechnol J**, v. 10, n. 12, p. 1877-86, Dec 2015.

LIPPENS, G.; WARRASS, R.; WIERUSZESKI, J. M.; ROUSSELOT-PAILLEY, P.; CHESSARI, G. High resolution magic angle spinning NMR in combinatorial chemistry. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 4, n. 4, p. 333-51, Jun 2001.

LIU, F.; TSAI, S. L.; MADAN, B.; CHEN, W. Engineering a high-affinity scaffold for non-chromatographic protein purification via intein-mediated cleavage. **Biotechnol Bioeng**, v. 109, n. 11, p. 2829-35, Nov 2012.

MANGONI, M. L.; MCDERMOTT, A. M.; ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. **Exp Dermatol**, v. 25, n. 3, p. 167-73, Mar 2016.

MARIA-NETO, S.; HONORATO, R. V.; COSTA, F. T.; ALMEIDA, R. G.; AMARO, D. S.; OLIVEIRA, J. T.; VASCONCELOS, I. M.; FRANCO, O. L. Bactericidal activity identified in 2S Albumin from sesame seeds and in silico studies of structure-function relations. **Protein J**, v. 30, n. 5, p. 340-50, Jun 2011.

MEYER, D. E.; CHILKOTI, A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. **Nat Biotechnol**, v. 17, n. 11, p. 1112-5, Nov 1999.

MEYER, D. E.; TRABBIC-CARLSON, K.; CHILKOTI, A. Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: effect of polypeptide length on the purification of thioredoxin. **Biotechnol Prog**, v. 17, n. 4, p. 720-8, Jul-Aug 2001.

MIGLIOLO, L.; FELÍCIO, M. R.; CARDOSO, M. H.; SILVA, O. N.; XAVIER, M.-A. E.; NOLASCO, D. O.; DE OLIVEIRA, A. S.; ROCA-SUBIRA, I.; VILA ESTAPE, J.; TEIXEIRA, L. D.; FREITAS, S. M.; OTERO-GONZALEZ, A. J.; GONÇALVES, S.; SANTOS, N. C.; FRANCO, O. L. Structural and functional evaluation of the palindromic

alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 7, Part A, p. 1488-1498, 7// 2016.

MIGLIOLO, L.; SILVA, O. N.; SILVA, P. A.; COSTA, M. P.; COSTA, C. R.; NOLASCO, D. O.; BARBOSA, J. A. R. G.; SILVA, M. R. R.; BEMQUERER, M. P.; LIMA, L. M. P.; ROMANOS, M. T. V.; FREITAS, S. M.; MAGALHÃES, B. S.; FRANCO, O. L. Structural and Functional Characterization of a Multifunctional Alanine-Rich Peptide Analogue from *Pleuronectes americanus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47047, 2012.

MOJSOSKA, B.; JENSSEN, H. Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 8, n. 3, p. 366-415, 2015.

MORASSUTTI, C.; DE AMICIS, F.; BANDIERA, A.; MARCHETTI, S. Expression of SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system. **Protein Expr Purif**, v. 39, n. 2, p. 160-8, Feb 2005.

MORASSUTTI, C.; DE AMICIS, F.; SKERLAVAJ, B.; ZANETTI, M.; MARCHETTI, S. Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. **FEBS Lett**, v. 519, n. 1-3, p. 141-6, May 22 2002.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998.

NOVIKOVA, O.; TOPILINA, N.; BELFORT, M. Enigmatic distribution, evolution, and function of inteins. **J Biol Chem**, v. 289, n. 21, p. 14490-7, May 23 2014.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 995-1001, 2014.

PALLERONI, N. J. The Pseudomonas story. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1377-83, Jun 2010.

PARACHIN, N. S.; MULDER, K. C.; VIANA, A. A.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 446-56, Dec 2012.

PARK, C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 244, n. 1, p. 253-7, Mar 6 1998.

PARMLEY, S. Programmable sensitivity. **Science-Business eXchange**, v. 7, n. 41, 2014/10/23 2014.

PARR, A. M.; ZOUTMAN, D. E.; DAVIDSON, J. S. Antimicrobial activity of lidocaine against bacteria associated with nosocomial wound infection. **Annals of Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 239-45, Sep 1999.

PATEL, J.; ZHU, H.; MENASSA, R.; GYENIS, L.; RICHMAN, A.; BRANDLE, J. Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. **Transgenic Res**, v. 16, n. 2, p. 239-49, Apr 2007.

PAULUS, H. Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 447-96, 2000.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010.

PERLER, F. B. InBase: the Intein Database. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 1, p. 383-4, Jan 1 2002.

PERLER, F. B.; ALLEWELL, N. M. Evolution, mechanisms, and applications of intein-mediated protein splicing. **J Biol Chem**, v. 289, n. 21, p. 14488-9, May 23 2014.

PERLER, F. B.; DAVIS, E. O.; DEAN, G. E.; GIMBLE, F. S.; JACK, W. E.; NEFF, N.; NOREN, C. J.; THORNER, J.; BELFORT, M. Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 7, p. 1125-7, Apr 11 1994.

PINTO, M. F.; FENSTERSEIFER, I. C.; MIGLIOLO, L.; SOUSA, D. A.; DE CAPDVILLE, G.; ARBOLEDA-VALENCIA, J. W.; COLGRAVE, M. L.; CRAIK, D. J.; MAGALHAES, B. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane. **J Biol Chem**, v. 287, n. 1, p. 134-47, Jan 2 2012.

REARDON, S. Bacterial arms race revs up. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 402-3, May 28 2015.

ROBERTS, R. J.; BELFORT, M.; BESTOR, T.; BHAGWAT, A. S.; BICKLE, T. A.; BITINAITE, J.; BLUMENTHAL, R. M.; DEGTYAREV, S.; DRYDEN, D. T.; DYBVG, K.; FIRMAN, K.; GROMOVA, E. S.; GUMPORT, R. I.; HALFORD, S. E.; HATTMAN, S.; HEITMAN, J.; HORNBY, D. P.; JANULAITIS, A.; JELTSCH, A.; JOSEPHSEN, J.; KISS, A.; KLAENHAMMER, T. R.; KOBAYASHI, I.; KONG, H.; KRUGER, D. H.; LACKS, S.; MARINUS, M. G.; MIYAHARA, M.; MORGAN, R. D.; MURRAY, N. E.;

NAGARAJA, V.; PIEKAROWICZ, A.; PINGOUD, A.; RALEIGH, E.; RAO, D. N.; REICH, N.; REPIN, V. E.; SELKER, E. U.; SHAW, P. C.; STEIN, D. C.; STODDARD, B. L.; SZYBALSKI, W.; TRAUTNER, T. A.; VAN ETTEN, J. L.; VITOR, J. M.; WILSON, G. G.; XU, S. Y. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 7, p. 1805-12, Apr 1 2003.

ROGIER A GAISER, L. R. A. P. L. **Production of eukaryotic antimicrobial peptides by bacteria – A review.** Formatex, 2011.

SALLACH, R. E.; CONTICELLO, V. P.; CHAIKOF, E. L. Expression of a recombinant elastin-like protein in *Pichia pastoris*. **Biotechnol Prog**, v. 25, n. 6, p. 1810-8, Nov-Dec 2009.

SASS, V.; SCHNEIDER, T.; WILMES, M.; KORNER, C.; TOSSI, A.; NOVIKOVA, N.; SHAMOVA, O.; SAHL, H. G. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. **Infect Immun**, v. 78, n. 6, p. 2793-800, Jun 2010.

SCHELLER, J.; LEPS, M.; CONRAD, U. Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides. **Plant Biotechnol J**, v. 4, n. 2, p. 243-9, Mar 2006.

SEETHA RAM K., P. K. K., PERAVALI J. B. Fermentative optimization of culture conditions for large scale production of engineered synthetic antimicrobial peptide using salt inducible *E. coli* GJ1158. **Minerva Biotechnologica**, v. 26, n. 4, p. 263-279, 2014.

SHAH, N. H.; MUIR, T. W. Inteins: Nature's Gift to Protein Chemists. **Chem Sci**, v. 5, n. 1, p. 446-461, 2014.

SHEN, Y.; AI, H. X.; SONG, R.; LIANG, Z. N.; LI, J. F.; ZHANG, S. Q. Expression and purification of moricin CM4 and human beta-defensins 4 in *Escherichia coli* using a new technology. **Microbiol Res**, v. 165, n. 8, p. 713-8, Oct 20 2010.

SHI, C.; MENG, Q.; WOOD, D. W. A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, n. 2, p. 829-35, Jan 2013.

SILVA, O. N.; MULDER, K. C.; BARBOSA, A. E.; OTERO-GONZALEZ, A. J.; LOPEZ-ABARRATEGUI, C.; REZENDE, T. M.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. **Front Microbiol**, v. 2, p. 232, 2011.

SILVA, O. N.; PORTO, W. F.; MIGLIOLO, L.; MANDAL, S. M.; GOMES, D. G.; HOLANDA, H. H.; SILVA, R. S.; DIAS, S. C.; COSTA, M. P.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R.; REZENDE, T. M.; FRANCO, O. L. Cn-AMP1: a new promiscuous peptide with potential for microbial infections treatment. **Biopolymers**, v. 98, n. 4, p. 322-31, 2012.

SOUTHWORTH, M. W.; AMAYA, K.; EVANS, T. C.; XU, M. Q.; PERLER, F. B. Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the *Mycobacterium xenopi* gyrase A intein. **Biotechniques**, v. 27, n. 1, p. 110-4, 116, 118-20, Jul 1999.

SPELLBERG, B.; BLASER, M.; GUIDOS, R. J.; BOUCHER, H. W.; BRADLEY, J. S.; EISENSTEIN, B. I.; GERDING, D.; LYNFIELD, R.; RELLER, L. B.; REX, J.; SCHWARTZ, D.; SEPTIMUS, E.; TENOVER, F. C.; GILBERT, D. N. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52 Suppl 5, p. S397-428, May 2011.

STIRLING, D. Technical notes for sequencing difficult templates. **Methods Mol Biol**, v. 226, p. 401-2, 2003.

SUN, C.; DU, X. J.; XU, W. T.; ZHANG, H. W.; ZHAO, X. F.; WANG, J. X. Molecular cloning and characterization of three crustins from the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 28, n. 4, p. 517-24, Apr 2010.

SYBESMA, W.; ZBINDEN, R.; CHANISHVILI, N.; KUTATELADZE, M.; CHKHOTUA, A.; UJMAJURIDZE, A.; MEHNERT, U.; KESSLER, T. Bacteriophages as potential treatment for urinary tract infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016-April-11 2016.

TELENTI, A.; SOUTHWORTH, M.; ALCAIDE, F.; DAUGELAT, S.; JACOBS, W. R., JR.; PERLER, F. B. The *Mycobacterium xenopi* GyrA protein splicing element: characterization of a minimal intein. **J Bacteriol**, v. 179, n. 20, p. 6378-82, Oct 1997.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, p. 523-33, Jan 2003.

TRABBIC-CARLSON, K.; LIU, L.; KIM, B.; CHILKOTI, A. Expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*: Comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. **Protein Sci**, v. 13, n. 12, p. 3274-84, Dec 2004.

VIERTEL, T. M.; RITTER, K.; HORZ, H.-P. Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 9, p. 2326-2336, September 1, 2014.

WANG, G. Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides. In: ZHOU, P. e HUANG, J. (Ed.). **Computational Peptidology**. New York, NY: Springer New York, 2015. p.43-66.

WANG, H.; WANG, F.; WEI, D. Impact of oxygen supply on rtPA expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3): ammonia effects. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, n. 2, p. 249-59, Feb 2009.

WANG, Z.; LI, N.; WANG, Y.; WU, Y.; MU, T.; ZHENG, Y.; HUANG, L.; FANG, X. Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification. **Protein Expr Purif**, v. 82, n. 1, p. 174-8, Mar 2012.

WEISS, R. L. The structure and occurrence of pili (fimbriae) on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of general microbiology**, v. 67, n. 2, p. 135-43, Aug 1971.

WHO. **Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide**. WHO. Geneva, Suíça. 2011.

WIMLEY, W. C.; HRISTOVA, K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. **J Membr Biol**, v. 239, n. 1-2, p. 27-34, Jan 2011.

WITKOWSKA, D.; MIESZALA, M.; GAMIAN, A.; STANISZEWSKA, M.; CZARNY, A.; PRZONDO-MORDARSKA, A.; JAQUINOD, M.; FOREST, E. Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella* fimbriae are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 221-30, Aug 1 2005.

WRIGHT, O.; YOSHIMI, T.; TUNNACLIFFE, A. Recombinant production of cathelicidin-derived antimicrobial peptides in *Escherichia coli* using an inducible autocleaving enzyme tag. **N Biotechnol**, v. 29, n. 3, p. 352-8, Feb 15 2012.

WU, J. Y.; TSAI, T. Y.; LIU, T. T.; LIN, C. C.; CHEN, J. H.; YANG, S. C.; SHIEH, C. J.; LIU, Y. C. Production of recombinant EGFP via surface display of ice nucleation protein and self-cleavage intein. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 158-163, May 15 2011.

WU, W. Y.; MEE, C.; CALIFANO, F.; BANKI, R.; WOOD, D. W. Recombinant protein purification by self-cleaving aggregation tag. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2257-62, 2006.

XIE, Y. G.; HAN, F. F.; LUAN, C.; ZHANG, H. W.; FENG, J.; CHOI, Y. J.; GROLEAU, D.; WANG, Y. Z. High-yield soluble expression and simple purification of the antimicrobial peptide OG2 using the intein system in *Escherichia coli*. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 754319, 2013.

YANG, K.; SU, Y. J.; LI, J. H.; SUN, J.; YANG, Y. J. Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides. **Protein Expression and Purification**, v. 85, n. 2, p. 200-203, Oct 2012.

YE, Q.; LI, X.; YAN, M.; CAO, H.; XU, L.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; XIONG, J.; OUYANG, P.; YING, H. High-level production of heterologous proteins using untreated cane molasses and corn steep liquor in *Escherichia coli* medium. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, n. 2, p. 517-25, Jun 2010.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. **Life Sci**, v. 70, n. 10, p. 1129-38, Jan 25 2002.

YOSEF, I.; MANOR, M.; KIRO, R.; QIMRON, U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 23, p. 7267-7272, June 9, 2015 2015.

YU-JIONG, G. Y.-X. Z. X.-Z. S. Z.-W. A. W. System of Intein-mediated PHB Purified Human Antimicrobial Peptide LL-37. **China Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 72-76, 2008.

YU, S. Q.; LIU, Y. H. Expression and one-step purification of a beta-galactosidase by fusion with elastin-like polypeptides. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1108-1114, Jul 2012.

ZHANG, L.; FALLA, T.; WU, M.; FIDAI, S.; BURIAN, J.; KAY, W.; HANCOCK, R. E. Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 247, n. 3, p. 674-80, Jun 29 1998.

ZHAO, Q.; XU, W.; XING, L.; LIN, Z. Recombinant production of medium- to large-sized peptides in *Escherichia coli* using a cleavable self-aggregating tag. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2016.



Production of a polar fish antimicrobial peptide in *Escherichia coli* using an ELP-intein tag



Daniel A. Sousa^{a,b,*}, Kelly C.L. Mulder^a, Kethly S. Nobre^a, Nádia S. Parachin^d, Octávio L. Franco^{a,b,c}

^a Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, 70790-160, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, CEP 70.790-900, Brazil

^c S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, CEP 79.117-900, Brazil

^d Grupo de Engenharia Metabólica Aplicada a Bioprocessos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, CEP 70.790-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2016

Received in revised form 22 July 2016

Accepted 28 July 2016

Available online 30 July 2016

Keywords:

ELP

Intein

Antimicrobial peptide

Batch production

ABSTRACT

An important aspect related to infectious pathogens is their exceptional adaptability in developing resistance, which leads to a perpetual challenge in the discovery of antimicrobial drugs with novel mechanisms of action. Among them, antimicrobial peptides (AMPs) stand out as promising anti-infective molecules. In order to overcome the high costs associated with isolation from natural sources or chemical synthesis of AMPs we propose the expression of Pa-MAP 2, a polyalanine AMP. Pa-MAP 2 was fused to an ELP-intein tag where the ELP (Elastin-like polypeptide) was used to promote aggregation and fast and cost-effective isolation after expression, and the intein was used to stimulate a controlled AMP release. For these, the vector pET21a was used to produce Pa-MAP 2 fused to the N-termini region of a modified *Mxe* CysA intein followed by 60 repetitions of ELP. Purified Pa-MAP 2 showed a MIC of 25 μ M against *E. coli* ATCC 8739. Batch fermentation demonstrated that Pa-MAP-2 can be produced in both rich and defined media at yields 50-fold higher than reported for other AMPs produced by the ELP-intein system, and in comparable yields to expression systems with protease or chemical cleavage.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A serious threat to public health worldwide consist in the considerable increase in infections caused by resistant Gram-negative bacteria, including multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, particularly *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (Kaye and Pogue, 2015). Meanwhile, the number of novel antimicrobial drugs introduced into the market has significantly decreased (Cooper and Shlaes, 2011), leading to the occurrence of near untreatable infections (Karam et al., 2016). Different research fields have emerged in this area in order to find novel therapeutic options, where antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as a promising alternative (Fernebro, 2011). AMPs were described as multifunctional molecules based on their activity against viruses (Ye and Ng, 2002),

fungi (Lin and Ng, 2008) and bacteria, including multidrug resistant ones (Cao et al., 2012). Besides their biological activities, AMPs have been characterized for typically possessing a single short amino acid residue chain (10–50 aa), and most of them show large amounts of hydrophobic and cationic residues (Kamysz et al., 2003).

Although a large number of peptides have been discovered, only a few AMPs have reached the clinical trials stage, so the commercial development of these peptides has been very limited (Brogden and Brogden, 2011). This is due in part to the fact that extensive structural and functional studies are required, including evaluation of the mechanism of action, efficacy and safety, and these in turn are restrained by the availability of high-quality, active and readily available peptides in a cost-effective way (Li, 2009) (Wimley and Hristova, 2011). In general, the process of isolation from natural sources is laborious, time consuming, and yields low quantities of peptides, not meeting industrial demands (Li, 2009; Parachin et al., 2012). Chemical synthesis is highly efficient, but its costs are related directly to the size of peptides, being complex and relatively expensive for lengthy peptides and those with post-translational modification, which hampers a range of valuable candidates, and therefore does not represent an ideal platform for

* Corresponding author at: Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, 70790-160, Brazil.

E-mail address: amarods@gmail.com (D.A. Sousa).

large-scale production for all peptides (Gaiser et al., 2011). Fortunately, recombinant DNA technology offers an economical means to manufacture proteins. In fact, many active AMPs have been successfully obtained from recombinant production in different heterologous hosts such as plants, yeasts and bacteria (Parachin et al., 2012).

The selection of expression system takes into consideration, among other factors, the AMP size, intracellular production or extracellular secretion, proper folding and the need for post-translational modifications, such as disulfide bridge and glycosylation (Parachin et al., 2012). Since the AMPs are generally toxic for the bacterial system in which they are produced, they are usually expressed together with a carrier protein, which can act both by reducing the toxicity of the peptide and inhibiting the proteolytic degradation by host enzymes (Li, 2011). They can also have a tag in their sequences intended to facilitate the purification, such as His-tag or chitin binding domain (Li, 2009; Sun et al., 2010; Zhang et al., 1998). In order to remove tags or carrier proteins, a cleavage site is usually necessary, and this reaction can occur chemically or enzymatically, which greatly increases the cost of production of AMPs (Feng et al., 2012; Parachin et al., 2012). An alternative that could drastically decrease its time and costs of production and purification is the combination of two technologies including a non-chromatographic purification by aggregating ELP (elastin-like polypeptide) temperature-dependent tag (Lim et al., 2007) and the release of residual-free peptide by a self-cleavable intein (Elleuche and Poggeler, 2010). The technique in use of ELP-intein system was video reviewed (MacEwan et al., 2014).

In this work, the ELP-intein system was used for production of Pa-MAP 2, a synthetic polyalanine AMP composed of 28 amino acid residues (LKAAAAAKLAAKAAKAAALKAAAAAKL). It is an in silico developed peptide based on the endogenous produced Pa-MAP peptide from *Pleuronectes americanus* (Teixeira et al., 2013) with its primary sequence favouring an α -helix structure. Pa-MAP 2 showed promising therapeutic results against cancer cells and Gram-negative bacteria in vitro, due to electrostatic interactions leading to membrane disruption and presents no observed deleterious effects against Gram-positive bacteria, human erythrocytes, RAW 264.7, Vero and L6 cells. Also, in vivo studies showed that survival rate in mice systemically infected with *E. coli* was improved with treatment with Pa-MAP 2 (Migliolo et al., 2016). The main goal of this work was to develop a suitable strategy for the efficient production of active and residual-free polyalanine peptides using *E. coli* as host and an ELP system fused to intein as purification system. For that, a fed-batch fermentation process was performed in order to investigate the suitability of this model of production and purification in terms of cost and obtainment of active peptide.

2. Material and methods

2.1. Plasmids and strains

The expression cassette was composed of 60 repetitions of ELP pentapeptide VPGXG where X represents Val:Ala:Gly (5:3:2), followed by a modified intein *Mxe GyrA* (N198A) to allow its cleavage only on C-terminal, and the peptide Pa-MAP 2, totalizing a predicted expressed protein with 47,725 kDa. The expression cassette, named 60EGP (Supplementary data 1), was synthesized and directly cloned into the plasmid pET-21 a(+) using the enzymes *Bam*HI and *Aat*II by the company Genscript (Piscataway, NJ, USA). The expression vector, named pET21-60EGP, was then transformed into *Escherichia coli* DH5 α and BL21 DE3 used for cloning and expression, respectively. Heat-shock method was used for transformation (Froger and Hall, 2007). LB (Lysogeny Broth) agar plates (10 g sodium chloride, 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 15 g agar,

per L) supplemented with 100 μ g mL⁻¹ of ampicillin were used for positive cloning screening.

2.2. Shake flask cultures

One single colony carrying the plasmid pET21-60EGP was used to inoculate 5 mL of LB medium supplemented with 100 μ g mL⁻¹ of ampicillin, incubated at 37 °C for 18 h. For expression, 2 mL of seed culture were subsequently used to inoculate 198 mL of LB, Terrific Broth (TB) (tryptone 12 g L⁻¹, yeast extract 24 g L⁻¹, KH₂PO₄ 2,31 g L⁻¹, K₂HPO₄ 12,54 g L⁻¹, pH 7 and ampicillin 100 μ g mL⁻¹) or TB supplemented (TB media with glycerol 4 mL L⁻¹). This culture was incubated in 1 L Erlenmeyer flasks at 37 °C in an orbital shaker, until the OD_{600nm} reached between 0.5 and 0.7. Then, the expression was initiated by addition of 1 mM IPTG. Samples were collected at times 0 h (shortly before induction) and 0.25 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h and 4 h, then harvested by centrifugation at 5000 \times g for 10 min at 4 °C. The cell pellet was recovered and stored at -80 °C.

2.3. ELP purification

The cell pellet from shake flask and batch fermentation cultures was resuspended in 1/20 of the original culture volume with lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2 mM EDTA, 0.1 mg mL⁻¹ lysozyme) and frozen at -80 °C for one hour. Cells were subsequently thawed at room temperature and disrupted by sonication on ice (18 pulses of 10 s each with 80% amplitude). Cell lysates were clarified by centrifugation at 20,000 \times g for 1 h at 4 °C. Next, 3 M sodium chloride was directly added to each clarified lysate to induce ELP precipitation, and the samples were incubated at room temperature for 10 min in order to allow ELP aggregation. Samples were then centrifuged at 8000 \times g for 10 min at 40 °C, and the pellet was resuspended in ice-cold PBS (pH 7.4) and incubated in ice for 10 min. After centrifugation at 8000 \times g at 4 °C the supernatant was collected, ending a cycle of precipitation, which was repeated twice. A new precipitation induced by NaCl yielded the pellet fraction rich in ELP aggregates in which the peptide Pa-MAP 2 was fused to the intein *Mxe GyrA*. These parameters were applied in subsequent samples and analyses.

2.4. *Mxe GyrA* intein activation analysis and Pa-MAP 2 purification

Activation of *Mxe GyrA* intein was analyzed in different cleaving buffers (50 mM sodium acetate pH 5, 5.5; 20 mM Bis-Tris pH 6, 6.5; 20 mM Tris-HCl pH 7, 7.5, 8, 8.5). For these, ELP aggregates were resuspended in ice-cold buffer and incubated at 19, 25 or 30 °C. Samples were taken at 24 and 48 h and evaluated by 12% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) using a Mini-PROTEAN[®] Electrophoresis System (Bio-Rad) and PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas) as molecular weight marker. Bands were visualized by coomassie staining (Pink et al., 2010). The best method was chosen based firstly on the shortest time and highest level of intein-cleavage (pH 5.5 at 24 h) and secondly on how fast the system achieved the temperature of 25 °C. These parameters were applied in subsequent samples and analyses. Once the cleavage procedure was completed, another cycle of ELP precipitation was performed. The final purified supernatant containing the residual-free peptide was then transferred into a new 1.5 mL tube and lyophilized. To analyze the size of the peptide Pa-MAP 2 after its release, MALDI-TOF MS analysis was performed using an Ultraflex mass spectrometer (Bruker), with a 600 μ m AnchorChip target (Bruker) and protein calibration standard II (Bruker) using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix.

2.5. Antibacterial assays

The protein concentration was measured using Qubit™ fluorometric assay (Invitrogen). The activity of Pa-MAP 2 linked to ELP-intein, recombinant Pa-MAP 2 and Pa-MAP 2 synthesized by solid-phase synthesis F-MOC with 95% purity degree (Aminotech, São Paulo, Brazil) was determined against *E. coli* ATCC 8739 using the microdilution method according to the protocol M7-A6 of the Clinical and Laboratory Standards Institute with modifications.

Briefly, tests against bacteria were performed in multi-well plates where an inoculum from original culture diluted to approximately 5×10^4 per well UFC mL⁻¹ was prepared, without exceeding 10% of the volume of the well containing LB medium liquid. Sterile distilled water and chloramphenicol at 80 µg mL⁻¹ were used as negative and positive control, respectively. The plates were incubated at 37 °C at gentle agitation for 4 h. Bacterial growth was monitored at 595 nm at every 30 min during exponential growth phase. The amount of bacterial growth in the positive control wells was compared with the amount of growth in the negative control wells to determine the endpoints of growth. The MIC (minimal inhibitory concentration) was defined as the lowest concentration of protein or peptide that prevents growth of microorganism.

2.6. Batch, fed-batch fermentations and dry weight measurements

One single colony carrying the plasmid pET21-60EGP was used to inoculate 120 mL of LB medium supplemented with 100 µg mL⁻¹ of ampicillin and incubated at 37 °C for 12 h. This seed culture was used to inoculate 0.5 L of TB or defined media (Gustavsson et al., 2011) ((NH₄)₂SO₄ 7 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1.6 g L⁻¹, Na₂HPO₄·7H₂O 9.94 g L⁻¹, glucose 20 g L⁻¹, 1 mL MgSO₄ 1 M, 1 mL Trace metals- CaCl₂·2H₂O 0.05 g L⁻¹, FeCl₂·6H₂O 1.67 g L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0.018 g L⁻¹, CuSO₄ 0.016 g L⁻¹, MnCl₂·4H₂O g L⁻¹, MnCl₂·4H₂O 0.013 g L⁻¹, CoCl₂·6H₂O 0.018 g L⁻¹, EDTA.2Na 2.14 g L⁻¹) to an final OD₆₀₀ of 0.1 into a 1.3 L BioFlo 110 fermenter (New Brunswick Scientific). Culture pH was controlled using 1 M sodium hydroxide, while dissolved oxygen (dO₂) was controlled using agitation between 300 and 600 rpm. For batch runs, cultures were grown at 37 °C for 4 h (TB media) or 8 h (defined media), and expression was induced with 1 mM IPTG. Cells were harvested 2 h after induction. Batch runs were run at a pH set point of 7 and the oxygen set point was set to >20%. For the defined media fed batch strategy, cells were allowed to grow in batch mode at 37 °C until glucose was depleted from the media, indicated by a sharp increase in dO₂ (dO₂ >50%). At this point, 2 g of glucose was added to the vessel. If oxygen levels decreased again to >50%, 2 g of glucose were added. This procedure continued until the nitrogen source was depleted, indicated by stable oxygen level after addition of glucose. After 8 h, induction was initiated by addition of 1 mM IPTG for both batch and fed-batch. Cells were harvested at various time points after induction and centrifuged at 5000 × g for 10 min. Cell pellets were stored at -80 °C and further analyzed. For dry weight measurements, 1–5 mL of culture were filtered through pre-weight cellulose acetate membrane, 22 µm pore size and 45 mm diameter. The filter was then heated at 70 °C for 48 h and weighed.

2.7. HPLC analysis for glucose and acetate

Consumption of glucose and acetate levels in defined media was detected in a Shimadzu UFLC with a Shim-pack SCR-101H column with a mobile phase of H₂SO₄ running at 0.6 mL min⁻¹. One milliliter of fermentation samples were collected hourly and centrifuged at 20,000 × g for 2 min. Standards were prepared with serial dilutions of known concentration of glucose and acetate. Detection was with refractive index (RI) or UV 210 nm with the

acetate peak having a retention time of about 9 min and the glucose, 14 min.

3. Results

3.1. Expression of 60 EGP in *E. coli* in flask

In order to ascertain the viability of the ELP-intein system for production of the peptide Pa-MAP 2 through ELP-intein system, the plasmid pET21-60EGP was designed (see Fig. S1), synthesized and cloned into *E. coli* BL21 via heat shock transformation. Firstly, LB and Terrific Broth (TB) media without glycerol were selected for bacterial growth. Nevertheless, ELP-fusion production was not detected after induction with 1 mM IPTG (data not shown). In TB supplemented with glycerol, expression of 60EGP was detected within 15 min (Fig. 1A, lane 3), reaching its maximum at 1 h (Fig. 1A, lane 5), remaining relatively constant until 4 h (Fig. 1A, lanes 6 to 8). The whole protein extracts were loaded into a 12% SDS-PAGE.

3.2. Recovery of recombinant 60EGP

Additionally, the effectiveness of purification by ELP aggregation was evaluated. For this, clarified supernatant containing whole protein extract was homogenized and ELP-fusion was removed from solution by addition of 3 M NaCl and incubation at 30 °C for 10 min, where turbidity caused by the ELP aggregation was observed. ELPs were precipitated by centrifugation and supernatant further checked by SDS-PAGE, where no ELP was detected (Fig. 1B, lane 2). The pellet rich in ELPs was resuspended in cold PBS, and centrifuged again. After a new step of ELP precipitation with the supernatant only the purified 60EGP product was recovered in the pellet. (Fig. 1B, lane 3).

3.3. Intein activation and isolation

After purification, the ELP-rich fraction (Fig. 1C, lane 1) was resuspended in different pH cleavage solutions and incubated under different conditions for C-terminal cleavage analysis (Fig. 2). Total intein activation, represented by an increase in ELP band migration, was observed in 24 h for pH 5.5 at 25 and 30 °C. In 48 h activation was complete at pH 5 and 5.5 at 19, 25 and 30 °C, and at pH 6.5 and 7 at 30 °C. The condition of pH 5.5, 25 °C for 24 h was chosen to be applied to the subsequent analysis since in those conditions intein self-cleavage was achieved faster and at room temperature. After intein activation 3 M NaCl was added to samples followed by incubation at 30 °C/10 min and spun for ELP removal. The supernatant containing residual-free Pa-MAP 2 was then lyophilized and analyzed by mass spectrometry, where a peak of 2,517.95 m/z was observed (Fig. 3).

3.4. Antibacterial assays

In order to evaluate the activity of Pa-MAP 2, the MICs were determined against *E. coli*. Pa-MAP 2 linked to ELP-intein did not show activity at the highest concentration tested (200 µM). Purified recombinant Pa-MAP 2 and chemically synthesized Pa-MAP 2, both with purity higher than 95%, inhibited *E. coli* growth at the concentration between 12 and 25 µM in MIC analysis.

3.5. Batch and fed-batch fermentation

In order to investigate AMP Pa-MAP 2 production using the ELP-intein system in defined media, firstly TB medium supplemented with glycerol was used as rich-medium. To emulate shake flask conditions, pH control and dO₂ level control were switched off. During the run, pH fell to level 4 around mid-log phase and growth was

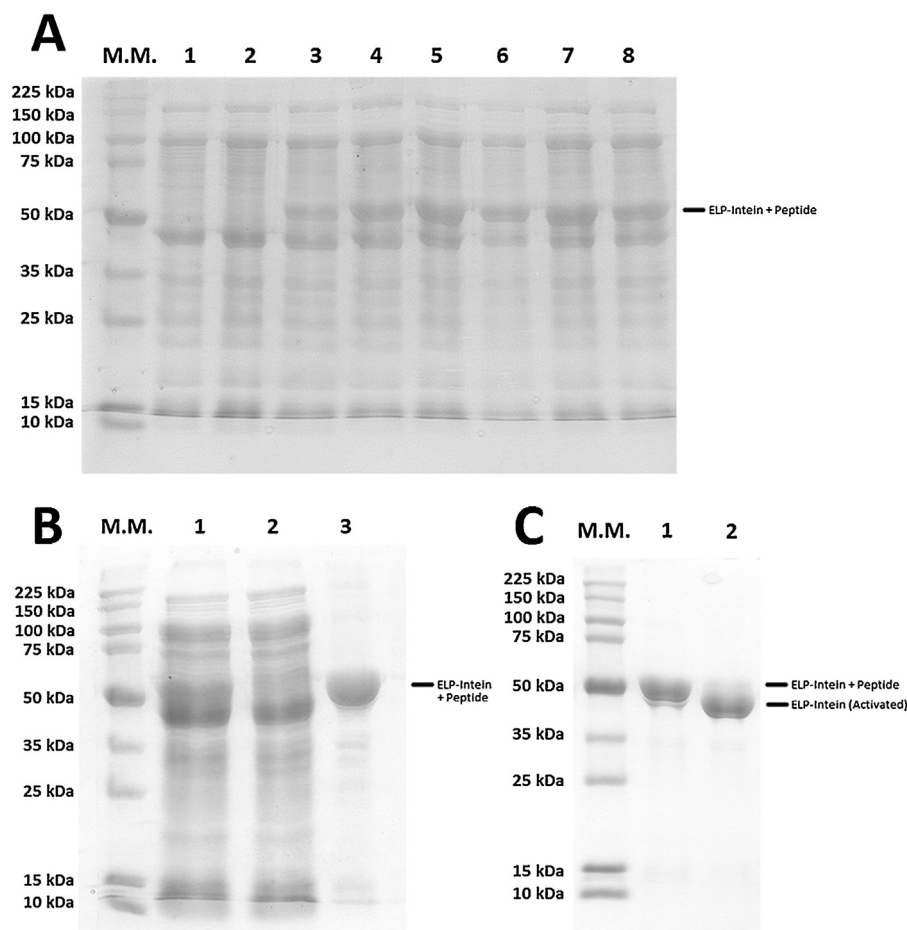


Fig. 1. A- Whole protein extract of *E. coli* BL21 transformed with pET21-60EGP before induction (1) and after induction time of 0 min (2), 15 min (3), 30 min (4), 1 h (5), 2 h (6), 3 h (7) and 4 h (8). Protein loading normalized by OD₆₀₀ value. B- SDS-PAGE analysis of ELP isolation. Whole protein extract after induction (1), supernatant after two ELP precipitation rounds (2) and precipitated ELP (3). C- SDS-PAGE analysis of optimized intein activation. ELPs before activation (1), and after activation at pH 5.5, 25 °C, 24 h (2). M.M.: Molecular mass marker.

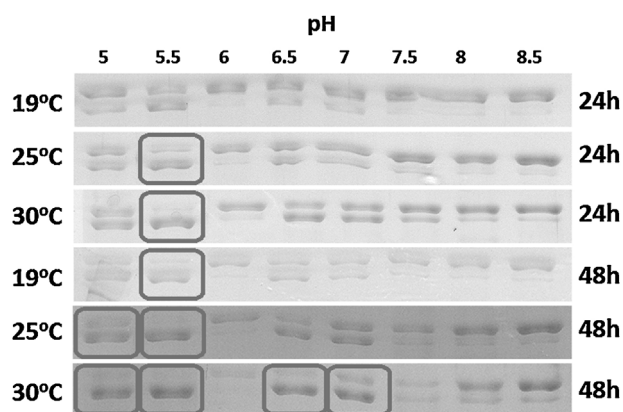


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of intein activation in different conditions. Numbers above picture correspond to pH (5–8.5). Squares indicate conditions where almost complete or complete cleavage was achieved.

reduced (data not shown). In the subsequent fermentation, the pH level set to 7 was held with base addition, and growth was sustained until beginning of stationary phase. Next, batch with defined media was performed for determination of heterologous AMP production with pH set to 7 and without dO₂ level control. During exponential phase in this condition, a drop in oxygen levels was accompanied by an increase in acetate production (Fig. 4A). In order to lower the acetate level, dO₂ was set to 20% and acetate production was min-

imized. Moreover, a 10% increase in total biomass was observed (Fig. 4B). To further increase the biomass production, in order to obtain a higher protein amount, a fed batch was done, with fed in pulses. In this condition, final biomass production was increased by 18% (Fig. 4C). Analysis of protein yield (Table 1) indicates a higher production in TB media, of 11 mg of Pa-MAP 2 per gram of biomass (Y_{P/X}). In defined media, higher protein production was observed both in batch and fed-batch strategy with oxygen control, yielding 3.7 mg of Pa-MAP 2 per gram of glucose. Nevertheless, total Pa-MAP 2 production was higher in fed-batch strategy, with 96 mg L⁻¹ against 78 mg L⁻¹ in batch strategy.

4. Discussion

Nowadays, there is an evident clinical demand related to infectious diseases, where the development of novel antibiotics constitutes an urgent necessity. Several initiatives to stimulate the development of new compounds have been recently launched, of which AMPs represent potential therapeutic candidates. However, one of the biggest restraints on using these molecules is their high production costs (da Costa et al., 2015). Currently, the production of AMPs relies on two routes: biological and chemical synthesis. The vast majority of peptide-based drugs are produced through chemical synthesis, and this constitutes a long, highly costly and laborious process, more appropriate for amino acid sequences of less than 2.5 kDa (Basu et al., 2014). Biological synthesis using recombinant production systems has been described as the most cost-effective

Table 1
Protein production under different cultivation conditions.

Media/Condition	$Y_{P/S}$ (mg g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (mg g ⁻¹)	Total Protein (g L ⁻¹)	ELP (g L ⁻¹)	Pa-MAP 2 (mg L ⁻¹)
TB	–	11.0	5.45 ± 0.75	1.45 ± 0.2	117.0 ± 1.7
Defined (Batch)	3.4	9.7	3.28 ± 0.52	0.95 ± 0.3	68.0 ± 2.4
Defined +20% dO ₂ (Batch)	3.9	10.1	3.33 ± 0.34	1.08 ± 0.2	78.0 ± 2.6
Defined (Fed batch)	3.7	10.2	4.39 ± 0.8	1.14 ± 0.4	96.0 ± 3.0

TB: Terrificbroth, dO₂: dissolved oxygen, Y_{P/S}: yield of mg of product (total protein) per g of substrate, Y_{P/X}: yield of mg of product (total protein) per g of biomass, ELP: elastin-like peptide fused to the intein.

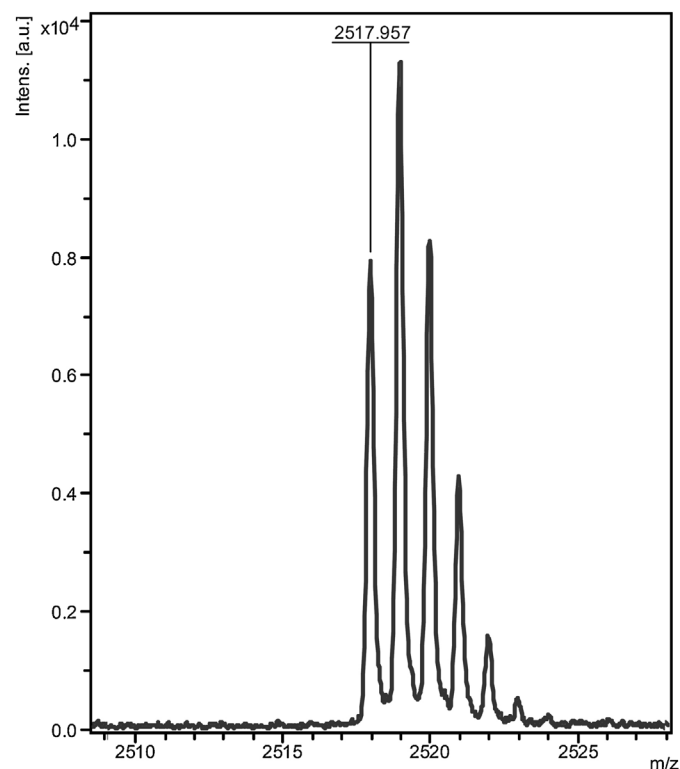


Fig. 3. Mass spectrum of Pa-MAP 2 multiple charged species, indicating a peak of 2,517.95 m/z.

procedure for large-scale production of peptides (Li, 2011). These processes have been simplified in recent decades by the development of a large number of cloning vectors, host strains, fusion proteins and different tags, tools that altogether greatly simplify the isolation of recombinant AMPs from microbial cultures.

In order to validate the ELP-intein method in batch fermentation for AMP production, Pa-MAP 2 was used as target peptide. The ELP system has been previously used for the production of two AMPs. Cecropin AD was linked to an enterokinase site and the 36 repetitions of ELP yielded 12 mg L⁻¹ (Yang et al., 2012), and halocidin 18 was connected to 90 repetitions of ELP through a hydroxylamine cleavage site, yielding 69 mg L⁻¹ (Hu et al., 2010). Limitations on these works involved the chemical or enzymatic removal of the ELPs after precipitation to allow recovery of the native protein, unwanted cleavage of the protein, slow or incomplete removal of the ELPs, removal of the post-treatment protease or high cost of proteolytic enzymes. Most of these issues can be solved by using an intein between the ELP and the protein of interest. In fact, several antimicrobial peptides have been obtained in bacteria with the use of inteins from different isolation tags, in a range of yields, like SMAP-29 with 0.2 mg L⁻¹ (Morassutti et al., 2002), cecropin CM4 with 2.5 mg L⁻¹ (Chen et al., 2008), the defensins HBD2 with 4 mg L⁻¹ (Diao et al., 2007), IDR 1 with 80 mg L⁻¹ (Bommarius et al., 2010) and SC-AMP with 208 mg L⁻¹ (Kotra et al., 2014), optimized

to 467 mg L⁻¹ in the fed batch (Seetha Ram et al., 2014). These last studies indicate the potential use of intein for protein purification on both small and large commercial scales. In fact, the simplicity afforded by this method, which requires fewer isolation steps and a reduced amount of reagents, suggests that inteins can be used to decrease the cost of producing recombinant proteins (Banki and Wood, 2005). Although the ELP-intein system has been validated for expression of different proteins, only a few efforts to bring this technique for AMP production have been made. Indeed, moricin CM4 and human beta defensin4 are the only reports of AMPs expressed by this technique, though with yields of 0.6 and 1.8 mg L⁻¹, respectively (Shen et al., 2010).

Therefore, the present work is the first one reporting the production of an active ELP-intein tagged AMP in a 0.5 L fermenter, comparing its expression in rich and defined media. In our work, the choice of number of 60 ELP repetitions was based on shortening the ELP tag length, to increase expression by freeing the energy that would be required to synthesize the large ELP repetitive protein sequence (Meyer et al., 2001), but maintaining a transition temperature below 50 °C according to a previous protocol (Golemis and Adams, 2005). Fusion of target protein into ELP can either be made at N- or C-termini. Although the fusion of target protein to N-terminus of ELP shows high expression levels of final purified peptide (Christensen et al., 2009), DTT is required to achieve intein cleavage. In our work, aiming for a more cost-effective cleavage by changing pH and temperature, the *Mxe* GyrA intein was fused to the C-terminus of ELP. Although pre-cleavage during expression was observed through SDS-PAGE, bacterial growth was comparable to non-induced bacteria (data not shown), which indicates that intein *Mxe* GyrA was well controlled. A previous report described this intein as temperature-dependent (Southworth et al., 1999), but in our experiments *Mxe* GyrA activation was optimum at pH 5.5, at three different tested temperatures (19, 25 and 30 °C). MALDI analysis has shown that Pa-MAP 2 was successfully purified with no extra amino acid residues and it was as active as synthetic Pa-MAP 2 at a similar concentration, both with purity higher than 95%. This retention of biological activity merits the ELP-intein strategy as an alternative to the chemical peptide synthesis.

In this work, shake flask experiments showed that the production of the ELP tagged precursor remained relatively constant after 2 h of induction (Fig. 1A). Thus, fermentation experiments were performed in order to achieve high cell density in both TB and defined media to increase consequently the amount of heterologous peptide produced. The total amount of protein and the amount of Pa-MAP 2 produced per gram of biomass was approximately 0.1-fold higher in TB media compared to fed batch in defined media. Also in TB media, cells were harvested in six hours, while in defined media this occurred at ten hours after beginning of cultivation, suggesting a higher productivity rate over time associated with the use of complex media. The yield of Pa-MAP 2 produced using TB media was 50-fold higher than the antimicrobial peptide H β D4 also expressed in TB media using an ELP-intein system (Shen et al., 2010). This rise in yield was probably associated with the focus on biomass increase and control of parameters in bioreactors, both not performed in H β D4 production.

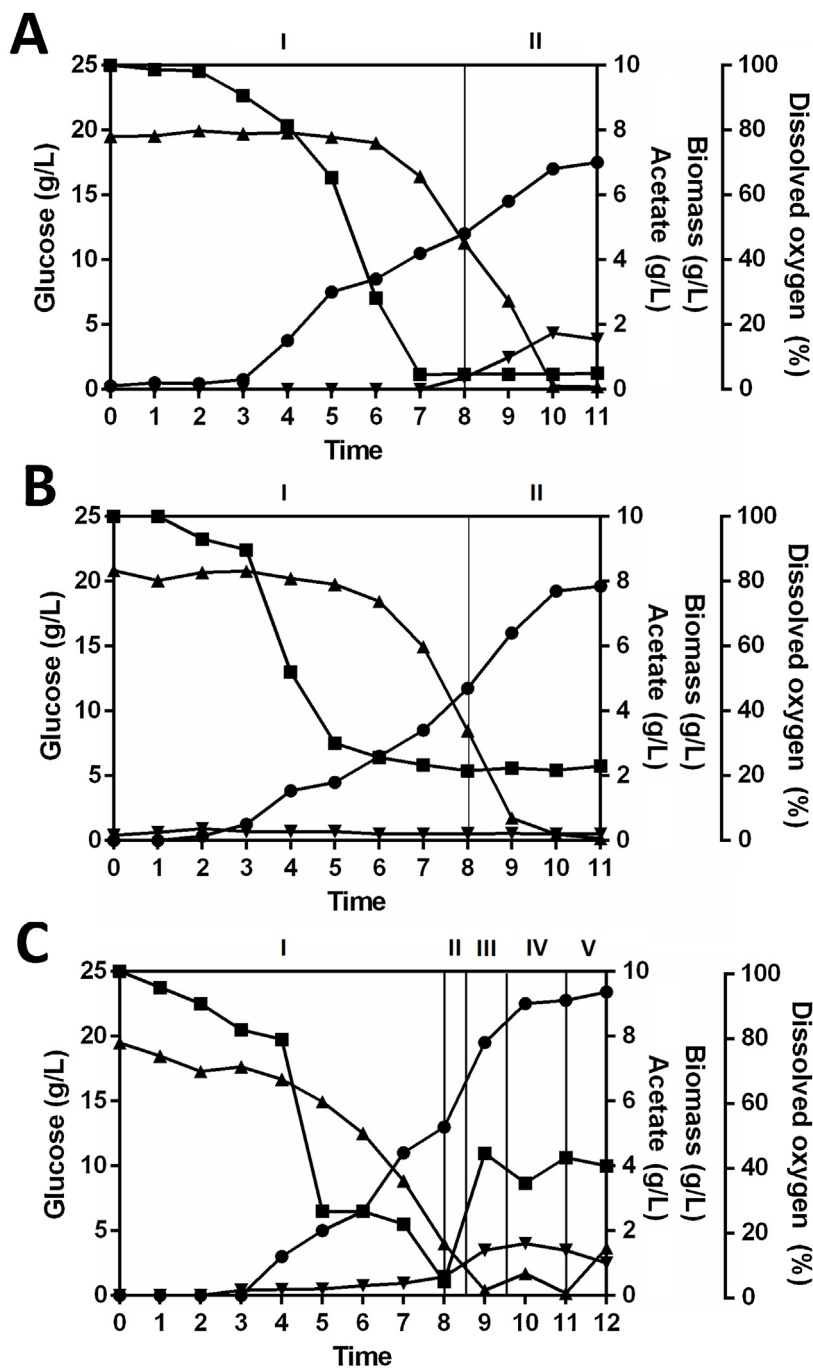


Fig. 4. Fermentation profile of pET21-60EGP transformed *E. coli* in defined media. A Batch culture without oxygen control. B Batch culture with oxygen control. C Fed batch culture with oxygen control. Square- Dissolved oxygen, Triangle- Glucose level, Inverted triangle- Acetate production, Circle- Biomass production. All experiments were duplicated or triplicated. Roman numerals above graphics correspond to: I- Pre-induction, II-V- After induction with IPTC, III- first glucose feed, IV- second glucose feed, V- third glucose feed. Variations in each time point and the general trend were less than 5% within each replicated set.

5. Conclusion

In summary, we have developed an efficient approach for recombinant Pa-MAP 2, with the use of ELP-intein system. By using a 60 repetition ELP and the pH controllable intein, *Mxe GyrA*, the Pa-MAP 2 was produced and recovered both in shaker flask as in batch mode, with antimicrobial activity equivalent to chemically synthesized Pa-MAP 2. The lower costs associated with ELP-intein-mediated peptide production and purification is a major attraction for industrial processes. This system can be established as an impor-

tant biotechnological tool for achieving the economic feasibility of antimicrobial peptides in clinical use.

Disclosure statement

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by The National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), the Coordination for the

Improvement of Educational Personnel (CAPES), the Foundation for Research Support of the Federal District (FAPDF), the Foundation for Educational Research and Technology of Mato Grosso do Sul (FUNDECT), and the Ministry of Science and Technology (MCT).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.021>.

References

- Banki, M.R., Wood, D.W., 2005. Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up. *Microb. Cell Fact.* 4, 32.
- Basu, A., Mishra, B., Dey, S., Leong, S.S.J., 2014. Intein based bioprocess for production of a synthetic antimicrobial peptide: an alternative route to solid phase peptide synthesis. *RSC Adv.* 4, 31564–31572.
- Bommarius, B., Jenssen, H., Elliott, M., Kindrachuk, J., Pasupuleti, M., Gieren, H., Jaeger, K.E., Hancock, R.E., Kalman, D., 2010. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides* 31, 1957–1965.
- Brogden, N.K., Brogden, K.A., 2011. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 217–225.
- Cao, L., Li, Z., Zhang, R., Wu, Y., Li, W., Cao, Z., 2012. StCT2, a new antibacterial peptide characterized from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. *Peptides* 36 (2), 213–220.
- Chen, Y.Q., Zhang, S.Q., Li, B.C., Qiu, W., Jiao, B., Zhang, J., Diao, Z.Y., 2008. Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using two fusion partners. *Protein Expr. Purif.* 57, 303–311.
- Christensen, T., Amiram, M., Dagher, S., Trabbic-Carlson, K., Shamji, M.F., Setton, L.A., Chilkoti, A., 2009. Fusion order controls expression level and activity of elastin-like polypeptide fusion proteins. *Protein Sci.* 18, 1377–1387.
- Cooper, M.A., Shlaes, D., 2011. Fix the antibiotics pipeline. *Nature* 472, 32.
- Diao, H., Guo, C., Lin, D., Zhang, Y., 2007. Intein-mediated expression is an effective approach in the study of beta-defensins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 840–846.
- Elleuche, S., Poggeler, S., 2010. Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 479–489.
- Feng, X., Liu, C., Guo, J., Song, X., Li, J., Xu, W., Li, Z., 2012. Recombinant expression, purification, and antimicrobial activity of a novel hybrid antimicrobial peptide LFT33. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1191–1198.
- Fernebro, J., 2011. Fighting bacterial infections—future treatment options. *Drug Resist. Updat.* 14, 125–139.
- Froger, A., Hall, J.E., 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J. Visualized Exp.: JoVE* 253.
- Gaiser, R.A., López, P., Rivas, L., 2011. Production of Eukaryotic Antimicrobial Peptides by Bacteria A Review. *Formatex*.
- Golemis, E., Adams, P.D., 2005. Protein-protein Interactions: A Molecular Cloning Manual Cold. Spring Harbor Laboratory Press.
- Gustavsson, M., Backlund, E., Larsson, G., 2011. Optimisation of surface expression using the AIDA autotransporter. *Microbial. Cell Fact.* 10, 72.
- Hu, F., Ke, T., Li, X., Mao, P.H., Jin, X., Hui, F.L., Ma, X.D., Ma, L.X., 2010. Expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with elastin-like polypeptides in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 2377–2387.
- Kamysz, W., Okroj, M., Lukasiak, J., 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochem. Pol.* 50, 461–469.
- Karam, G., Chastre, J., Wilcox, M.H., Vincent, J.L., 2016. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit. Care* 20, 136.
- Kaye, K.S., Pogue, J.M., 2015. Infections caused by resistant gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy* 35, 949–962.
- Kotra, S.R.K., M.M.V. Sri, S.D., Ramudu, N.D., Kumar, S.A., Peravali, J.B., 2014. Cost effective purification of intein based syntetic cationic antimicrobial peptide expressed in cold shock expression system using salt inducible *E. coli* GJ1158. *J. Microbiol. Infect. Dis.* 4, 7.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Li, Y., 2009. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 54, 1–9.
- Li, Y., 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expr. Purif.* 80, 260–267.
- Lim, D.W., Trabbic-Carlson, K., Mackay, J.A., Chilkoti, A., 2007. Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules* 8, 1417–1424.
- Lin, P., Ng, T.B., 2008. A novel and exploitable antifungal peptide from kale (*Brassica alboglabra*) seeds. *Peptides* 29, 1664–1671.
- MacEwan, S.R., Hassouneh, W., Chilkoti, A., 2014. Non-chromatographic purification of recombinant elastin-like polypeptides and their fusions with peptides and proteins from *Escherichia coli*. *J. Visualized Exp.: JoVE*.
- Meyer, D.E., Trabbic-Carlson, K., Chilkoti, A., 2001. Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: effect of polypeptide length on the purification of thioredoxin. *Biotechnol. Prog.* 17, 720–728.
- Miglioli, L., Felício, M.R., Cardoso, M.H., Silva, O.N., Xavier, M.-A.E., Nolasco, D.O., de Oliveira, A.S., Roca-Subira, I., Vila Estape, J., Teixeira, L.D., Freitas, S.M., Otero-Gonzalez, A.J., Gonçalves, S., Santos, N.C., Franco, O.L., 2016. Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* 1858, 1488–1498.
- Morassutti, C., De Amicis, F., Skerlavaj, B., Zanetti, M., Marchetti, S., 2002. Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Lett.* 519, 141–146.
- Parachin, N.S., Mulder, K.C., Viana, A.A., Dias, S.C., Franco, O.L., 2012. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38, 446–456.
- Pink, M., Verma, N., Rettenmeier, A.W., Schmitz-Spanke, S., 2010. CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *Electrophoresis* 31, 593–598.
- Seetha Ram, K., P.K.K. Peravali, J.B., 2014. Fermentative optimization of culture conditions for large scale production of engineered synthetic antimicrobial peptide using salt inducible *E. coli* GJ1158. *Minerva Biotechnol.* 26, 263–279.
- Shen, Y., Ai, H.X., Song, R., Liang, Z.N., Li, J.F., Zhang, S.Q., 2010. Expression and purification of moricin CM4 and human beta-defensins 4 in *Escherichia coli* using a new technology. *Microbiol. Res.* 165, 713–718.
- Southworth, M.W., Amaya, K., Evans, T.C., Xu, M.Q., Perler, F.B., 1999. Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the *Mycobacterium xenopi* gyrase A intein. *Biotechniques* 27, 118–120, 110–114 116.
- Sun, C., Du, X.J., Xu, W.T., Zhang, H.W., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2010. Molecular cloning and characterization of three crustins from the Chinese white shrimp, *Penaeopenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 517–524.
- Teixeira, L.D., Silva, O.N., Miglioli, L., Fensterseifer, I.C., Franco, O.L., 2013. In vivo antimicrobial evaluation of an alanine-rich peptide derived from *Pleuronectes americanus*. *Peptides* 42, 144–148.
- Wimley, W.C., Hristova, K., 2011. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J. Membr. Biol.* 239, 27–34.
- Yang, K., Su, Y., Li, J., Sun, J., Yang, Y., 2012. Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides. *Protein Expr. Purif.* 85, 200–203.
- Ye, X.Y., Ng, T.B., 2002. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. *Life Sci.* 70, 1129–1138.
- Zhang, L., Falla, T., Wu, M., Fidai, S., Burian, J., Kay, W., Hancock, R.E., 1998. Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 674–680.
- da Costa, J.P., Cova, M., Ferreira, R., Vitorino, R., 2015. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2023–2040.