

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LAÍS CESCHINI MACHADO

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TRANSPOSASE DE *mos1* EM DIFERENTES
CEPAS DE *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

**São Gabriel
2016**

LAÍS CESCHINI MACHADO

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TRANSPOSASE DE *mos1* EM DIFERENTES
CEPAS DE *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Paulo Marcos Pinto

**São Gabriel
2016**

LAÍS CESCHINI MACHADO

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TRANSPOSASE DE EM *mos1* EM DIFERENTES
CEPAS DE *Escherichia coli* BL21 D3

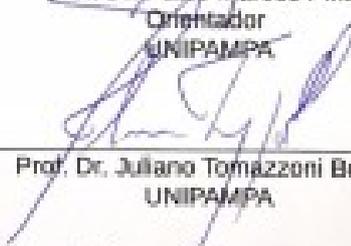
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em:

Banca-examinadora:



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
UNIPAMPA



Prof. Ms. Evelise Leis Carvalho
UNIPAMPA

Dedico este trabalho as duas pessoas mais importantes na minha vida, minha mãe e meu pai.

AGRADECIMENTO

De todos os agradecimentos que eu já li, começa-se sempre agradecendo a família, e comigo não poderia ser diferente pois eles são a coisa mais importante para mim, e graças a eles que eu estou aqui hoje escrevendo este trabalho.

Então primeiramente agradeço ao meus pais Elton Obaldia Machado e Rosélia Ceschini Machado por me darem a vida, por todos os ensinamentos e por me proporcionarem a coisa mais linda que pode-se dar para um filho que é a educação, apesar de todas as dificuldades (que não foram poucas). E por serem minha base e sustentação nos momentos difíceis e nos maravilhosos.

Ao meu amado companheiro Alexandre Freitas, que além de ser meu colega de profissão, de laboratório, meu melhor amigo, é certamente o amor da minha vida. Obrigada amor pelo apoio nos momentos de desespero e sofrimento.

Ao bonde do LPA, Bruno, Darlene, Filipe, Jéssica, Luiz Fernando e Pablo, por todos os momentos magníficos que passamos nestes quase 4 anos de laboratório. Em especial a Evelise e a Thalita por me ajudarem na realização deste trabalho, quando eu me via surtando por não dar tempo de realizar todos os experimentos.

Ao “Sol orbitado por planetas”, meu mestre e orientador Paulo Marcos Pinto, que certamente foi de grande importância na formação da minha carreira profissional, e abriu as portas para que eu pudesse conhecer o lugar que hoje é onde eu mais gosto de estar, dentro de um laboratório.

Aos meus colegas da turma 17 por estes 4 anos de estudos e bebedeira. E aos professores do curso Biotecnologia que contribuíram para minha formação.

““Tu devias ser cientista Victor”. “Ninguém gosta de cientistas” – diz Victor. Ao que Rzykruski responde – “Eles gostam do que a ciência lhes dá, mas das perguntas, não, eles não gostam das perguntas que a ciência faz””

(Frankenweenie)

RESUMO

Elementos transponíveis (TE) são sequências móveis de DNA presente na maioria dos genomas, que são capazes de se mover de um determinado locus para outro. Estes elementos estão distribuídos em todos os principais ramos da vida, sua diversidade e características biológicas intrínsecas fazem uma considerável fonte de mudanças genéticas durante a evolução da maioria das espécies. A superfamília *mariner* de transposons de DNA é provavelmente a mais difundida de transposons na natureza, e caracteriza-se por possuir 2400 pares de bases com uma única região codificadora da enzima transposase. O elemento transponível *mos1*, que é classificado dentro da superfamília de transposons *mariner*, e estes são amplamente distribuídos na família Drosophilidae. O estudo de elementos transponíveis ainda é muito sucinto, e o conhecimento sobre sua transposase é pouco conhecido à nível molecular. Com isto este trabalho busca determinar condições ideais para otimizar o sistema de expressão e purificação para obtenção da transposase do elemento *mariner mos1*, em diferentes cepas de *Escherichia coli* BL21 D3. Foi subclonado em vetor plasmidial de expressão pGEX-4T1, a *open reading frame* (ORF) do gene da transposase. Posteriormente foi feito testes de expressão e solubilização em 3 concentrações de *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) (0,1 mM; 0,5 mM e 1,0 mM) e duas temperaturas 30°C e 37°C, onde o IPTG funciona como um indutor para o promotor para que ocorra a expressão da proteína heteróloga. A expressão da transposase, em fusão com a Glutathione S-transferase (GST) (intrínseca ao plasmídeo) foi identificada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) apresentando a massa molecular similar à predita de aproximadamente 67kDa. Com a aquisição destes resultados obtidos pelo SDS-PAGE, notou-se uma menor eficácia na expressão heteróloga na cepa BL21 D3 GROE. Além de constatar uma diminuição na expressão em todas as cepas na temperatura de 30°C. Os testes de solubilização não apresentaram diferenças significativas nas diferentes temperaturas e concentrações de IPTG. Com esses resultados das expressões, irá proceder-se com a purificação e a produção de anticorpos contra essa proteína para maior análises moleculares e funcionais.

Palavras-Chave: expressão heteróloga; transposase; elemento *mariner*.

ABSTRACT

Transposable elements (TE) are mobile DNA sequences present in most genomes, which are able to move from one locus to another. These elements are distributed in all major branches of life, their diversity and intrinsic biological characteristics makes a considerable source of genetic changes during the evolution of most species. The DNA transposon mariner superfamily is probably the most widespread of transposons in nature, and is characterized by having 2400 base pairs with a single coding region of the enzyme transposase. The transposable element *mos1*, which is classified within the superfamily of transposons mariner, and these are widely distributed in the family Drosophilidae. The study of transposable elements is still very succinct, and the knowledge about its transposase is little known at the molecular level. This work seeks to determine optimal conditions to optimize the expression and purification system to obtain the transposase of the mariner element MOS1 in different strains of *Escherichia coli* BL21 D3. It was subcloned into pGEX-4T1 expression plasmid vector, the open reading frame (ORF) of the transposase gene. Subsequently, expression and solubilization tests were performed on 3 concentrations of Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.1 mM, 0.5 mM and 1.0 mM) and two temperatures of 30°C and 37°C, Where the IPTG functions as an inducer to the promoter for expression of the heterologous protein. Expression of transposable fusion in Glutathione S-transferase (GST), was identified by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) having the predicted molecular mass of approximately 67kDa. With the acquisition of these results obtained by SDS-PAGE, a lower efficacy was observed in the heterologous expression in the BL21 D3 GROE strain. In addition, there was a decrease in expression in all strains at a temperature of 30°C. The solubilization tests showed no significant differences in the different temperatures and concentrations of IPTG. With these results from the expressions, we will proceed with the purification and production of antibodies against this protein for further molecular and functional analyzes.

Keywords: heterologous expression; transposase; mariner element.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TEs- Elementos transponíveis

TIR – Sequências invertidas flanqueadoras de transposons de DNA

HTT- Transferência horizontal de transposons

GDP- *Gene Disruption Projec*

LB- Meio de cultura bacteriano *Luria-Bertani*

IPTG- *isopropil-β-D-1-thiogalactopyranoside*

PCR- Reação em cadeia da polimerase

GST-tag - *Glutathione S-transferases*

CI – corpo de inclusão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Elementos transponíveis.....	12
1.2	Superfamília <i>mariner</i> e elemento <i>mos1</i>	13
1.3	<i>Transposases</i>	14
1.4	<i>Drosophila</i> e transposon.....	14
1.5	Produção de proteína heteróloga.....	15
2	JUSTIFICATIVA.....	18
3.	OBJETIVO.....	19
3.1	Objetivo geral.....	19
3.2	Objetivos específicos.....	19
4.	METODOLOGIA	20
4.1	Montagem do vetor com o inserto.....	20
4.2	Transformação bacteriana.....	20
4.3	Indução por IPTG.....	22
4.4	Análise de expressão.....	22
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1	Clonagem.....	23
5.2	Expressão.....	23
5.3	Solubilidade.....	25
6.	CONCLUSÃO.....	29

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Elementos transponíveis

Elementos transponíveis (ETs) são sequências móveis de DNA presentes na maioria dos genomas que são capazes de se mover de um determinado *locus* para outro. Estes são divididos em duas classes principais, os transposons de classe I (retrotransposons) que se movem no genoma através de um intermediário de RNA, e os de classe II (transposons de DNA) que se movem por uma cópia da sequência original (Delaurière, 2009).

Estes elementos estão distribuídos em todos os principais ramos da vida, sua diversidade e características biológicas intrínsecas são uma considerável fonte de mudanças genéticas durante a evolução da maioria das espécies (Bire et al., 2013). Estas sequências modelam a arquitetura de genomas e contribuem para muitas modificações genéticas, incluindo novos genes e redes de sinais que regulam a expressão genica (Bonhe et al., 2008). Apesar dessas ações acarretarem benefícios, a transposição dos TEs pode exibir atividade altamente mutagênica dentro do genoma do hospedeiro (Bire et al., 2013). Além desses fatores, há também elementos que se submetem não só a transferência dentro do genoma, mas também uma transferência horizontal (HTs) entre espécies diferentes, evitando assim sua perda eventual (Filée et al., 2015).

Os transposons podem atingir um grande número de cópias, e representam uma grande fração do genoma de alguns vertebrados (Bonhe et al., 2008). Um exemplo significativo é o genoma do milho (*Zea mays*), cerca de 80% é composto por elementos transponíveis (Ragagnin et al., 2016), já o genoma humano é constituído cerca de 40% por estes elementos, onde estes apresentam um número total de cópias superior a de alguns genes clássicos (LANDER et al., 2001 apud Bonhe et al., 2008).

Transposons de DNA são segmentos nucleotídicos que apresentam repetições terminais invertidas nas suas extremidades (TIRs) (Bire et al., 2013), são sempre flanqueadas por um dinucleotídeo TA (Tellier et al., 2015). Esses transposons podem ser classificados em dois tipos, os autônomos, que codificam sua própria transposase, e os não-autônomos que possuem apenas as áreas flanqueadoras (TIRs) (Jurka et al., 2007). Em genomas eucarióticos, os transposons de DNA são classificados em pelo menos 17 superfamílias, estas são classificados

de acordo com a semelhança das sequências que codificam as transposases do elemento transponível.

1.2. Superfamília *mariner* e elemento MOS1

A superfamília *mariner* de transposons de DNA é provavelmente a mais difundida de transposons na natureza, e esta está presente em todos os ramos da vida (Yuan, Wessler, 2011). Estes estão difundidos em diversos genomas diferentes, em muitos casos apresenta centenas ou milhares de cópias (Lampe, 1995). Os elementos pertencentes a superfamília *mariner* geralmente apresentam cerca de 1,5k pb de comprimento, e codificam uma transposase com cerca de 340 aminoácidos, que é flanqueada por repetições invertidas simples (TIRs) com cerca de 30 pb (Tellier et al., 2015). Sua transposição ocorre devido a uma dobra estrutural da transposase, e este evento foi observado pela primeira vez em ribonuclease H de *Escherichia coli* (Katayangi, 1990 apud Teiller et al., 2015).

O elemento transponível *mos1* demonstrado na Figura 1, é classificado dentro da superfamília de transposons *mariner*. Foi identificado primeiramente na bactéria *Shigella sonnei* (Jacobson et al., 1998) e isolado primeiramente a partir do genoma de *Drosophila mauritiana* (Crénés et al., 2010). Em estudos anteriores se relatou que este elemento é capaz de produzir modificações genéticas em células eucarióticas, tais como protozoários, insetos e nematódeos (Mamoun et al., 2000 apud Delauruère et al. 2009). Este elemento apresenta 1.286 pb de comprimento, e codifica uma transposase de 345 aminoácidos, contendo 28 pb em cada uma das extremidades invertidas (TIRs) (Dawson et al., 2003).

C. Mos1

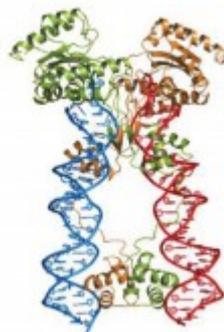


Figura 1: Enzima transposase do elemento transponível MOS1 Fonte: Hickman;_Dyda, 2015

1.3. Transposases

Transposases de elementos transponíveis de DNA autônomos são enzimas que se movem dentro do genoma, e normalmente são codificadas pelo próprio elemento transponível (Hickman, Dyda, 2015). O gene da transposase em eucariotos é transcrito pelo núcleo e exportado para o citoplasma onde é traduzido. Após isso, a transposase passa por modificações pós-traducionais. Finalmente, esta transposase retorna ao núcleo, onde desempenha a função de transpor o elemento (Beall et al., 2002). Cada um desses passos pode estar envolvido na regulação da transposição através da quantidade e/ou eficiência da transposase produzida (Bire et al., 2013). Estas enzimas têm como característica compartilhar um domínio catalítico conservado contendo resíduos de aspartato e/ou glutamato, para auxiliar na reação de transposição (Teiller et al., 2015).

As transposases são classificadas de acordo com o seu domínio catalítico, como exemplo as transposases do tipo HUH, DD(E/D), *Ser transposase* e *Tyr transposase* (Hickman; Dyda, 2015). Para mobilizar o transposon do *lôcus* primitivo a transposase gera uma ruptura de fita dupla em ambas as extremidades do elemento, apresentando uma característica interessante, durante a reação da transposição a extremidade 5' é sempre clivado antes da extremidade 3', essa coordenação das etapas catalíticas da reação entre duas extremidades ajuda a evitar eventos deletérios do elemento transponível (Bouuaert et al., 2014).

Tosi & Beverley (2000) estabeleceram que a transposase é o único fator responsável para que se realize a transposição (Tosi; Beverley, 2000). Em geral a maioria dos transposons da superfamília *mariner* são independentes na sua transposição, e este evento não depende de fatores específicos do hospedeiro (Teiller et al., 2015). Como todos os passos da transposição é catalisado pela transposase, o elemento *mos1* não apresenta restrições em se transpor tanto em eucariotos quanto em procariotos (Picardeau, 2010).

1.4. *Drosophila* e transposon

A mosca do gênero *Drosophila* desempenha como importante organismo modelo por mais de 100 anos, isso se dá por sua riqueza em mutantes e facilidade com que elas podem ser manipulada (Bellen et al., 2011). Por suas diversas características e conhecimento da comunidade científica, este organismo também tem desempenhado um papel central no estudo da dinâmica e divergência de TEs.

Por possuir diversas ferramentas genéticas disponíveis como marcadores e TEs clonados a *Drosophila* ofereceu as primeiras informações genéticas destes elementos (Lee; Langley, 2010). Muitas das mutações assistidas geradas na maioria dos genes de *Drosophila* é decorrência da utilização de transposons, esse método foi estabelecido em 1991 pelo GDP (*Gene Disruption Project*) (Spradling et al., 1999). Este trabalho contribuiu para caracterizar detalhadamente a preferência de locais de inserção de transposons específicos (Bellen et al. 2011) tendo como resultado colaborar com muitas aplicações destes elementos como ferramentas genéticas para genética molecular em *Drosophila* (Rio; Rio, 2002). Especificamente em *Drosophila*, rearranjos genéticos naturais podem causar síndrome de disgenesia híbrida (Rubin et al., 1982), o movimento de transposons pode levar a diversas alterações, como inserções, exclusões e rearranjos cromossômicos podendo levar a letalidade em *Drosophila melanogaster* (Russo et al., 2015).

Drosophila simulans (Sturtevens, 1920) é, em termos evolutivos, intimamente relacionado com *Drosophila melanogaster* e foi um dos 12 genomas sequenciados de *Drosophila* para realização de um grande estudo comparativo há alguns anos (Clark et al., 2007). Esta espécie vem sendo utilizada não só como modelo evolutivo, mas também comumente utilizada em estudos com transposons. Segundo (Wallau et al., 2011), o elemento transponível MOS1 está relacionado com vários gêneros de *Drosophila*, inclusive com *Drosophila simulans*. Esta espécie é um modelo interessante para investigar o mecanismo de transposição, pois em estudos anteriores se demonstrou um excelente sistema que permite quantificar a mobilização somática e é facilmente manipulada *in vivo* (Jardim et al., 2015).

1.5. Produção de proteína heteróloga

A bactéria *Escherichia coli* é o sistema de expressão mais comumente utilizado para produção de alto nível de proteínas heterólogas, esse sistema de expressão possui diversas características favoráveis para produção de proteínas recombinantes em grande escala, incluindo fonte barata de carbono, crescimento bacteriano rápido e de fácil manuseio (Hanning. Makrides, 1998). A utilização da genética bacteriana é uma forma muito útil para examinar estrutura, função e evolução de transposons. Muitas técnicas diferentes foram adaptadas para estudar elementos transponíveis em *E. coli*, e seu contínuo estudo em bactérias parece ser limitado apenas pela imaginação dos pesquisadores (Lampe, 2010). Esse sistema

de produção de proteínas serve também como base para a descrição da engenharia de proteínas e consequentemente sua análise funcional e estrutural (Gordon et al., 2008).

Para a realização da produção de proteínas heterólogas a *E. coli* BL21 e seus derivados são comumente utilizados. Estas apresentam diversas modificações em suas culturas para minimizar alguns problemas de expressão e solubilização (Terpe, 2006). A *E. coli* BL21 (D3) é derivada da BL21, e é provavelmente a linhagem mais amplamente utilizada na expressão heteróloga de proteínas. Esta linhagem tem como característica abrigar um pró-fago D3 derivado de um vírus bacteriófago λ , que carrega o gene da RNA polimerase T7 sob o controle do promotor *lacUV5* (Jeong et al., 2009 apud Jeong et al., 2005). Este promotor pode ser induzido por adição do análogo de lactose não hidrossolúvel *isopropil- β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG), este mecanismo depende da reação de catabolismo da glicose para indução da lactose, fornecendo o controle da expressão (Long et al., 2015). O desenvolvimento deste sistema foi com o intuito de redução de problemas na regulação do promotor como repressão catabólica (Terpe, 2006).

Um vetor de expressão de proteínas de sucesso deve conter um conjunto de elementos genéticos que afetam todos os aspectos da produção da proteína (Axelsson et al., 1998), estes precisam apresentar um promotor forte para que resulte na acumulação da proteína fazendo-se de 10 a 30% o da proteína celular total, uma origem de replicação (Ori) para determinar o número de cópias do plasmídeo. Além de todas as características necessárias, inclusão de um gene de resistência a antibióticos facilita a seleção fenotípica do vetor (Hanning; Makrides, 1998), e também auxilia na estabilidade das culturas com a presença do plasmídeo (Chen, 2012).

Embora milhares de proteínas já serem totalmente expressas em níveis elevados em *E. coli* BL21 D3, muitas das vezes essa alta produção pode não ser alcançada devido a alguns fatores, (Miroux; Walker, 1996 apud Dumon-Seignovert et al., 2004) como fatores genéticos (por exemplo, força do promotor e número de cópias do plasmídeo) e fatores ambientais (por exemplo, temperatura, quantidade de indutor), podem interferir drasticamente na expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* (Saraswat et al., 1999). Além disso, a proteína heteróloga pode formar corpos de inclusão insolúveis devido ao excesso de proteínas produzidas (Kim et al., 2016). Para recuperação de proteínas de corpos de inclusão, necessita-se de

diversas técnicas como purificação, solubilização e redobramento, com isso acaba tornando o processo de produção mais complexo (Jacobson et al., 1986 apud Gabrielcyk et al., 2017).

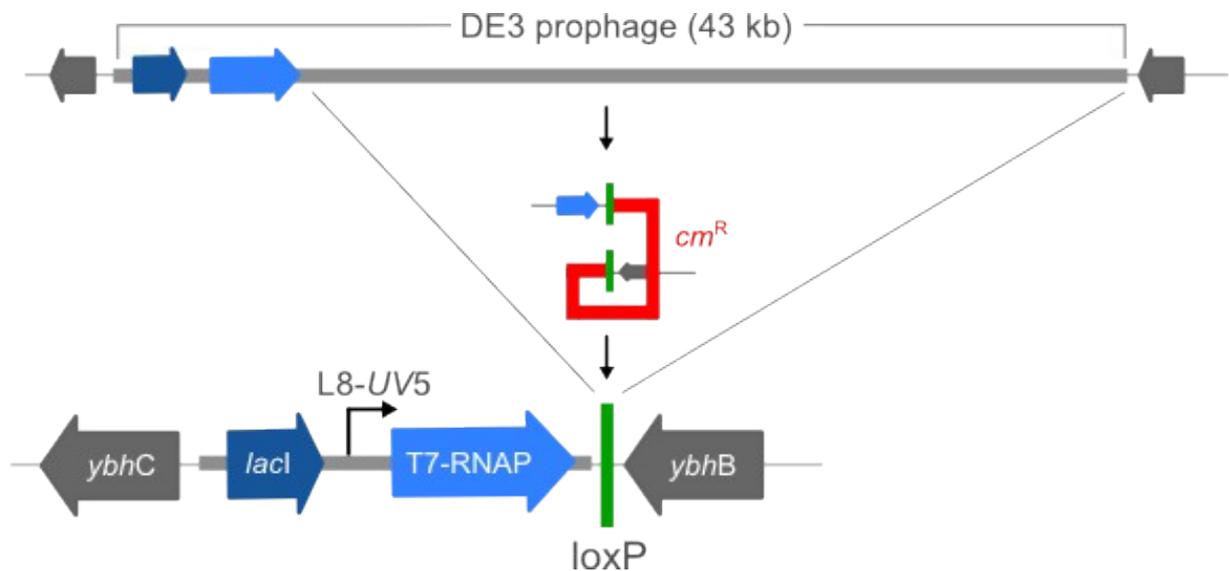


Figura 2: Esquema gênico característicos das linhagens derivadas de *E. coli* BL21 (DE3)

Várias abordagens experimentais têm sido utilizadas para minimizar a formação de corpos de inclusão e melhorar o dobramento de proteínas. Estes incluem o crescimento de bactérias em temperaturas mais baixas e a seleção de diferentes cepas de *E. coli* (Makrides, 1996). Diversos sistemas de expressão são desenvolvidos com sucesso e utilizados amplamente para gerar proteínas heterólogas (Ingham; Moore, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos elementos transponíveis serem bem conhecidos, principalmente suas sequências e sua diversidade em genomas, ainda há falta de conhecimento nas suas estruturas moleculares e seus mecanismos de transposição. Trabalhos prévios, como por exemplo da enzima ativa são necessários para realização de posteriores trabalhos relacionados com a análise destas estruturas moleculares e mecanismos de transposição.

Diversos fatores são necessários para uma ótima expressão de proteínas heterólogas. Muitos estudos já foram realizados em busca de uma maquinaria de expressão eficiente, porém esse desfecho apresenta diversas variantes, como o vetor utilizado, o tamanho da sequência de interesse, além do tipo de proteína a ser expressa (proteína de membrana, proteínas estruturais, enzimas, etc.). As características da desta maquinaria devem suprir todas as necessidades para que a expressão obtenha sucesso, tendo que minimizar ao máximo problemas suscetíveis no momento da expressão.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Este estudo busca determinar condições ideais para otimizar o sistema de expressão e purificação para obtenção da transposase do elemento *mariner* MOS1. Tendo como propósito, clonar a sequência de DNA da transposase através de PCR circular no vetor de expressão pGEX 4T1, além de transformar *E. coli* BL21 (D3) PlysS, *E. coli* BL21 (D3) RP, *E. coli* BL21 (D3) GROE; *E. coli* BL21 (D3) RIL.

3.2 Objetivos específicos

- Clonagem da sequência de DNA da transposase no vetor pGEX 4T1;
- Transformar eficientemente o vetor nas diferentes linhagens de *E. coli* BL21 (D3);
- Testar diferentes temperaturas de indução;
- Testar diferentes concentrações de IPTG;
- Testar diferentes condições de solubilização;
- Expressar eficientemente a transposase do elemento transponível MOS1.

4. METODOLOGIA

4.1 Clonagem do elemento *mos1*

Primeiramente foi realizado uma PCR convencional para o isolamento do gene da transposase de *mos1*, onde foram utilizados como primer direto PGEX 4T1 - Mos Fw 5' CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG ATG TCG AGT TTC GTG CCG AA 3' e como primer reverso PGEX 4T1 - Mos Rv 5' ACG CGC GAG GCA GAT CGT CAT TAT TCT AAG TAT TTG CCG TCG C 3'. Através desses primers foi possível adicionar ao inserto pequenas regiões complementares ao plasmídeo pGEX 4T1 e dessa forma utilizá-lo posteriormente na clonagem através da técnica de PCR circular assim como descrito por Quan e Tian(2009). Para a realização da clonagem, o plasmídeo pGEX 4T1 foi clivado com enzima de restrição *XhoI* para que o que vetor se mantenha linear. Após isso foi realizado a PCR Circular para e realização da clonagem, utilizando ambos o inserto e o plasmídeo pGEX4T1 clivado,o PCR foi realizado em 35 ciclos a 98°C por 10 segundos, 56°C por 10 segundos e 72°C por 3 minutos.

4.2 Transformação bacteriana

A transformação bacteriana ocorreu através do método de transformação química. Estas foram cultivadas *overnight*, a 37°C com agitação de 250RPM em 3mL de meio de cultura *Luria-Bertani* (LB), após o processo de centrifugação, foi adicionado 1ml de MgCl₂ e posteriormente, após outro processo de centrifugação, foi adicionado 1ml de CaCl₂ e levado a 0° por 30min. Após este tempo, foi adicionado 1ul de plasmídeo PGEX 4T1 de concentração 10mg/μl e iniciado o choque térmico, com 20min a 0°C, 2 min a 42°C e 5min a 0°C, seguindo com a adição de 600ul de meio de cultura LB e incubado a 37°C por 1 hora. Logo foi preparado placas de petri de meio LB sólido, adicionando 170μg/ml de cloranfenicol e 100ug/ml de ampicilina. Este processo se repetiu nas quatro linhagens apresentadas no Quadro 1.

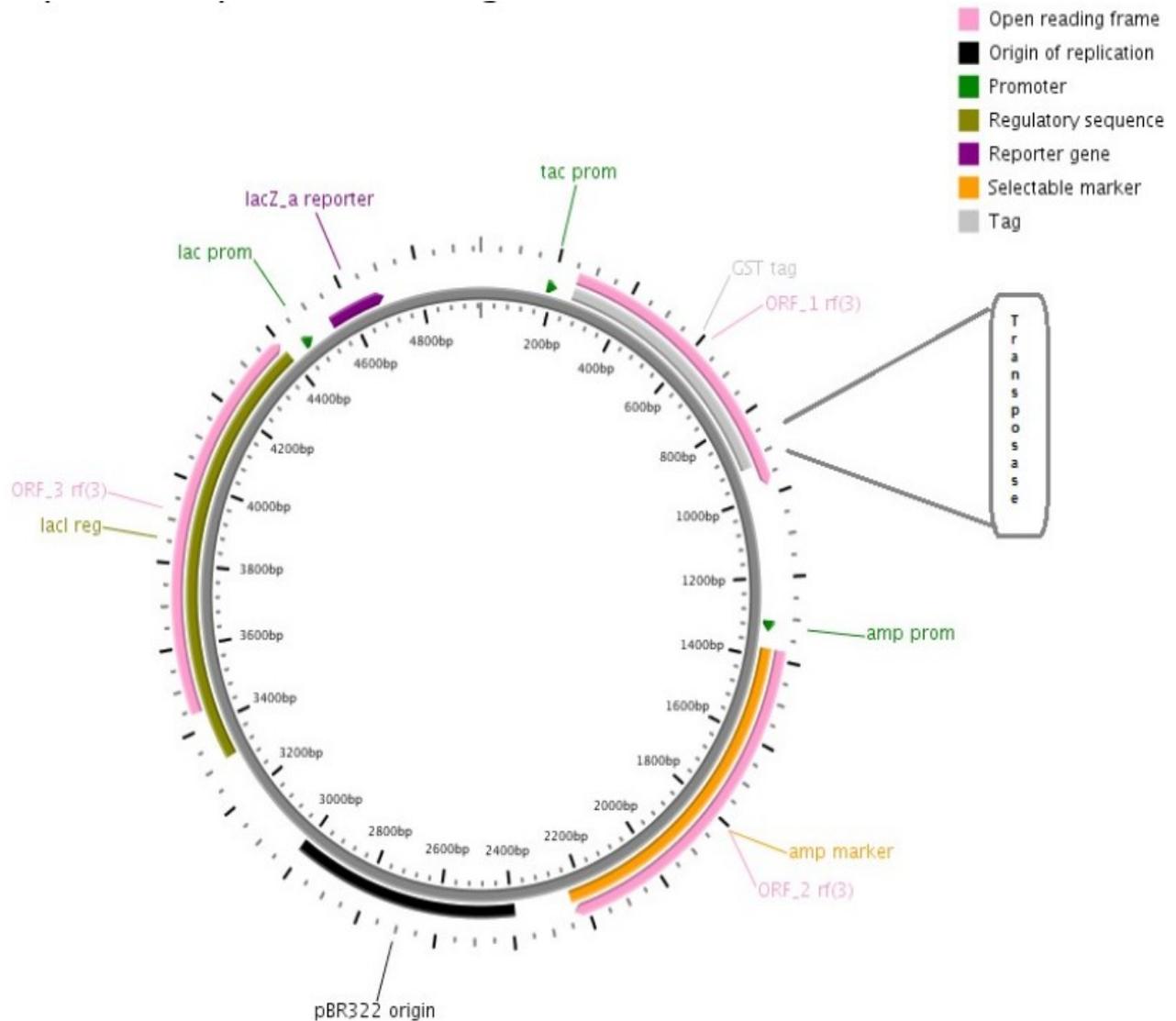


Figura 3: Mapa do vetor utilizado para a transformação e expressão da transposase de *mos1*.

Quadro 1: Bactérias utilizadas e seus respectivos genótipos.

Cepa de <i>E. coli</i> BL21 (D3)	Genótipo
<i>E. coli</i> BL21 (D3) PLYSs	B F- dcm ompT hsdS(rB - mB -) gal λ(DE3) [pLysS Cam(r)
<i>E. coli</i> BL21 (D3) RP	<i>E. coli</i> B F- ompT hsdS(rB - mB -) dcm+ Tet(r) gal endA Hte [argU proL Cam(r)
<i>E. coli</i> BL21 (D3) GROE	PT7-groESL, ColE1, Cm(r)
<i>E. coli</i> BL21 (D3) RIL	B F- ompT hsdS(rB - mB -) dcm+ Tet(r) gal endA Hte [argU ileY leuW Cam(r)

4.3 Indução por IPTG

O processo de indução ocorreu em diferentes condições. Primeiramente as bactérias previamente transformadas foram cultivadas *overnight* na presença de 170µg/ml de cloranfenicol e 20mg/ml de ampicilina, a 37°C com agitação de 250rpm em 3ml de meio de cultura LB. Posteriormente foi adicionado 10% (300µl) do pré inóculo em um novo meio de cultura contendo 3ml de meio de cultura LB na ausência de antibióticos, e cultivado durante 2 horas a 37°C. Passado este processo, as culturas foram divididas em dois grupos: cultivadas a 30°C e cultivadas a 37°C, ambas com tempo de indução de 3 horas e agitação de 250rpm. Dentro destes grupos, foi adicionado diferentes concentrações de IPTG, 0,1mM, 0,5mM e 1,0mM, além das culturas com ausência de IPTG. Após a finalização deste processo de indução, as culturas passaram pelo processo de centrifugação, e adição de 100ul de H₂O deionizada, após isto ocorreu a lise celular, realizada do *Tissue laser* em uma frequência de 30Hz/s durante 1 minuto. Com a obtenção do extrato proteico, as amostras destinadas para realização da análise de solubilização foram centrifugadas, e capturado o sobrenadante e suspenso o *pellet* em 100ul de H₂O deionizada.

4.4 Análise de expressão

As análises foram feitas em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE, com gel de empacotamento 4% (TRIS 0,5M pH 6,8, 10% de SDS, 30% de acrilamida, TMED, 10% de APS e água deionizada) e gel de corrida 12% (TRIS 1,5M pH 8,8, 10% de SDS, 30% de acrilamida, TMED, 10% de APS). Foi utilizado 10µl de extrato proteico, 5µl de tampão de amostra (glicerol, B-mercaptoetanol, 10% SDS, TRIS 0,5M Ph 6,8) migrado com tampão de corrida, a 100v em uma cuba eletroforética. O processo de coloração do gel ocorreu utilizando o corante de proteínas *comassie blue R-250 overnight*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Clonagem

A clonagem e inserção do gene da transposase no vetor ocorreu com sucesso, demonstrando que o PCR circular foi eficiente e com isto reduziu diversos processos para adquirir este resultado.

5.2 Expressão

A proteína de interesse foi expressa em todas as cepas testadas com o tamanho esperado (indicado nas flechas cinzas nas figuras abaixo) de aproximadamente 67kDa (transposase + *Glutathione S-transferases*), porém em uma delas na BL21 D3 GROE, ocorreu uma significativa diminuição na quantidade de expressão em relação a outras cepas de *E. coli* BL21 D3 testadas, como demonstrado na figura 3. Nossos resultados demonstraram visivelmente que no caso da transposase do elemento *mos1*, as diferentes concentrações de indutor IPTG (0,1mM, 0,5mM e 1,0mM) não influenciou significativamente na eficiência de expressão desta proteína, porém a diferença de temperatura influenciou visivelmente na quantidade de proteínas expressa, como demonstrado nas figuras 3, 4, 5 e 6.

Em estudos anteriores já foi constatado que algumas cepas de bactérias, como exemplo *E. coli* HMS174 apresentou uma baixa taxa de expressão da proteína Est-AF (*alpha/beta hydrolase*) de *Archaeoglobus fulgidus* (Miykae et al., 2003), porém é eficiente na produção heteróloga de *cytosolic serine hydroxymethyltransferase* de *Danio rerio* (Chang et al.,2006). Isto certifica que a ORF altera o nível de expressão em determinadas cepas de bactérias *E. coli*.

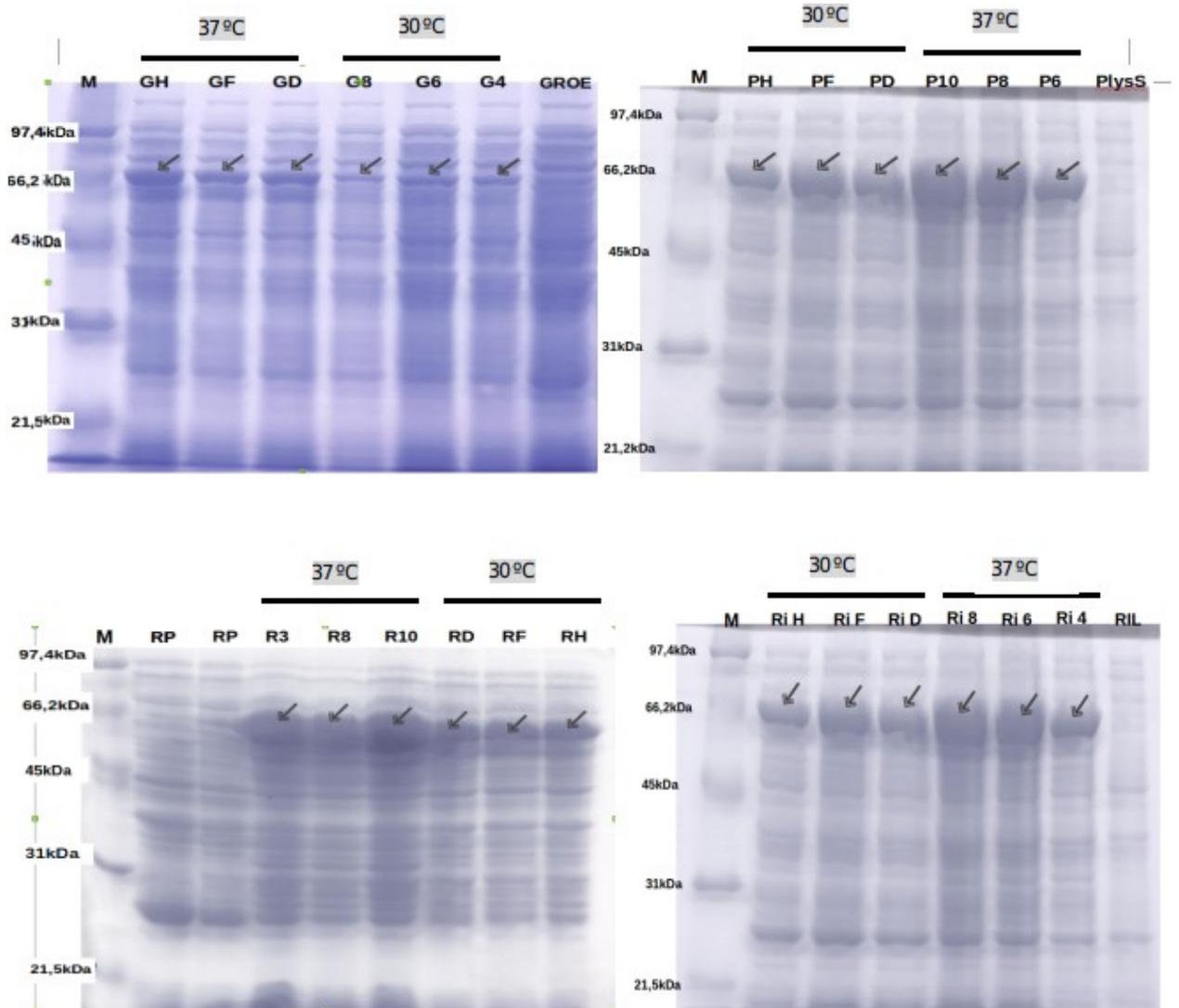


Figura 4: Gel de poliácridamida SDS PAGE 12% da indução da cepa de *E. coli* BL21 D3 PlysS, *E. coli* BL21 D3 GROE, *E. coli* BL21 D3 GROE, *E. coli* BL21 D3 RIL, em ordem crescente de indutor de IPTG.

Stosch von Moritz (2016) constatou que a temperatura influencia no nível de expressão proteínico, porém não é a única responsável pela diferença de expressão de proteínas. Ph, tempo de indução e disponibilidade de carbono também são fatores que determinam a eficiência de expressão de proteínas. Kim 2016 realizou um trabalho semelhante ao apresentado, e constatou que a eficiência da

temperatura foi de 37°C e com variação de concentração de IPTG de 0,4mM a 1,0mM, porém as temperaturas que ocorreu uma diferença significativa na expressão excedia os 40°C. Já nossos resultados demonstraram que uma diferença de 7°C já apresenta variação na taxa de expressão. Isto se dá devido ao tempo que a bactéria necessita para se dividir em uma temperatura mais baixa.

A regulação dos níveis de expressão também é modulada pelos códons raros (Kurland, 1991). A dificuldade de expressão de um gene em um hospedeiro heterólogo é frequentemente relatada devido à diferença no uso de determinados códons específicos (Robinson et al., 1984 apud Thangadurai et al., 2008), além de ocorrer alguns erros de tradução devido a estes fatores. Por este fato é necessário a utilização do hospedeiro que sintetize tRNAs apropriados, pois estes problemas de tradução dependem principalmente da genética do hospedeiro (Kane, 1995). A presença destes códons faz com que o ribossomo atinja uma posição que causa a terminação prematura da cadeia (Thangadurai et al., 2008). Esta circunstância determina a taxa de síntese proteica, afetando diretamente na produção de proteínas.

5.3 Solubilidade

A solubilidade é um fator de extrema importância no momento da expressão, além de ser o indicador de um dobramento correto de proteínas, (Liddy et al., 2010). O nível de solubilidade é relevante para a eficiência da purificação de uma proteína ativa. Nossa proteína alvo de estudo com aproximadamente 67kDa, se demonstrou insolúvel, como demonstrado na figura 7, figura 8, figura 9, figura 10, figura 11, figura 12, figura 13 e figura 14. A temperatura de expressão (30°C e 37°C) não influenciou no grau de solubilidade da proteína. Também não foi possível constatar diferença no grau de solubilização nas diferentes concentrações de IPTG (0,1mM, 0,5mM E 1,0mM). Esta característica pode ser devida a fusão intrínseca da sequência da transposase a uma *Glutathione S-transferases* (GST-tag) para facilitar no momento de purificação. Esta molécula é utilizada para realizar a purificação em coluna de HPLC, facilitando o resgate da proteína de interesse.

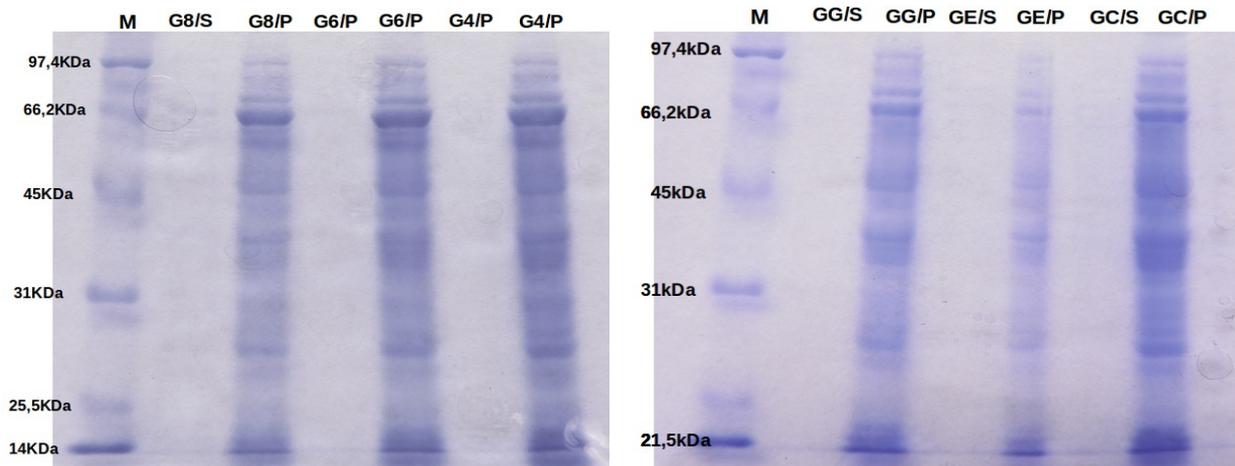


Figura 5: Gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%; Gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%; **M**- marcador, separados em *pellet* e sobrenadante do extrato protéico de *E. coli* BL21 D3 GROE em ordem crescente de IPTG em duas temperaturas, 37°C e 30°C respectivamente.

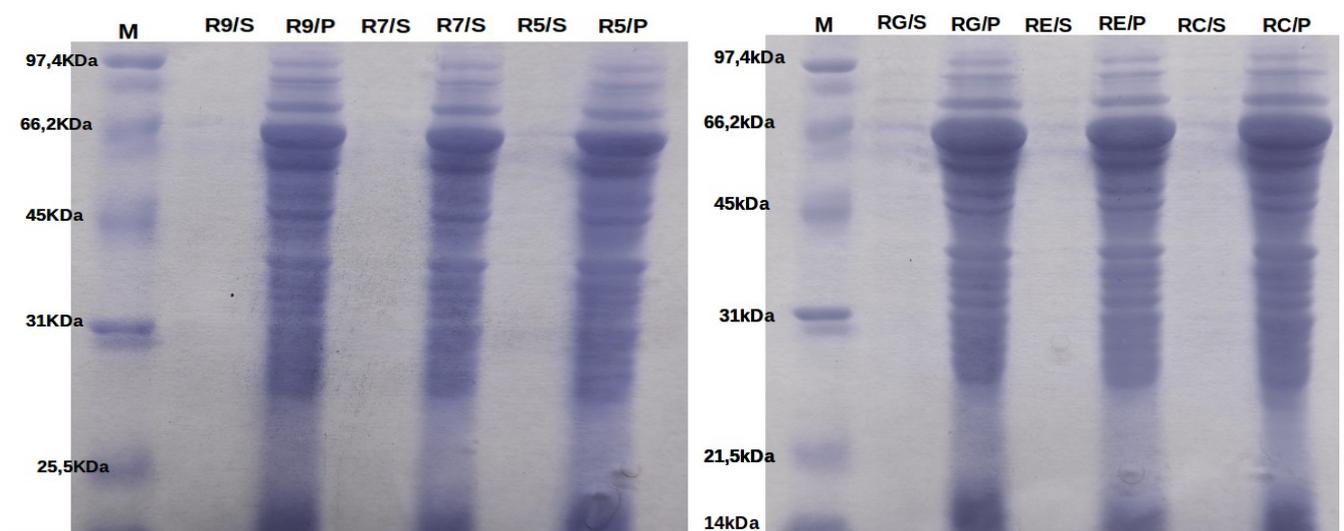


Figura 6: Gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%; Gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%; **M**- marcador, separados em *pellet* e sobrenadante do extrato protéico de *E. coli* BL21 D3 RP em ordem crescente de IPTG em duas temperaturas, 37°C e 30°C respectivamente.

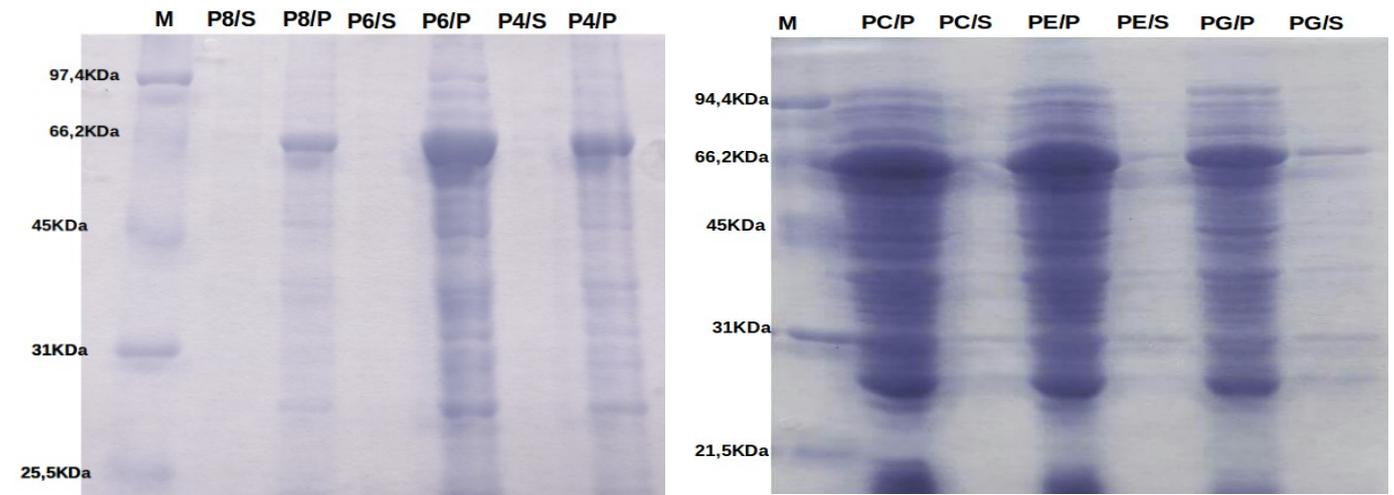


Figura 7: Gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%; Gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%; **M**- marcador, separados em *pellet* e sobrenadante do extrato protéico de *E. coli* BL21 D3 PlysS em ordem crescente de IPTG em duas temperaturas, 37°C e 30°C respectivamente.

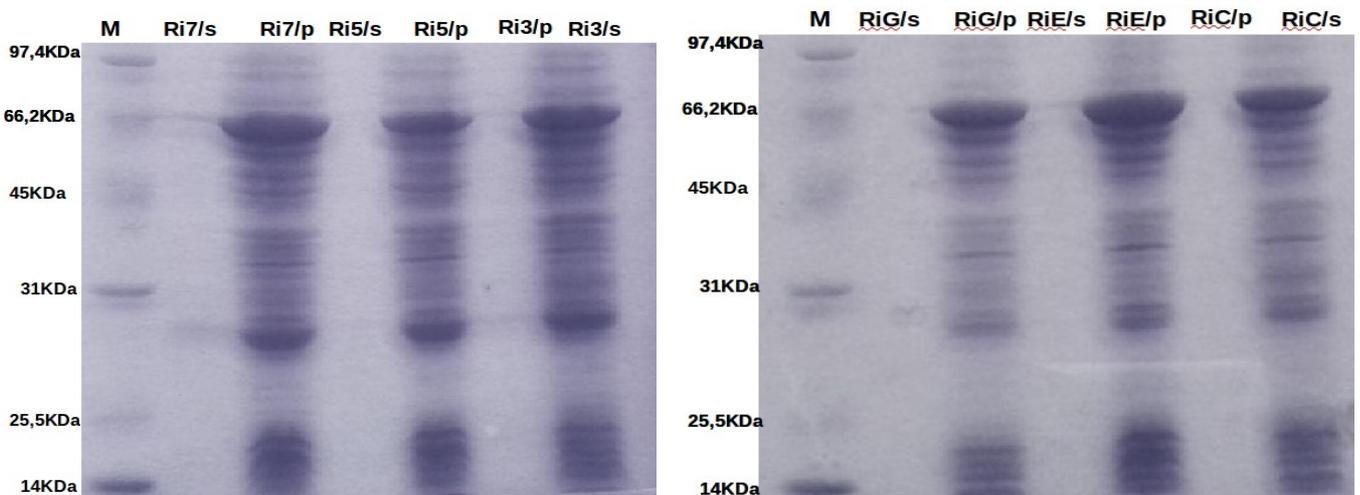


Figura 8: Gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%; Gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%; **M**- marcador, separados em *pellet* e sobrenadante do extrato protéico de *E. coli* BL21 D3 GROE em ordem crescente de IPTG em duas temperaturas, 37°C e 30°C respectivamente.

A expressão de proteínas heterólogas insolúveis pode acarretar na formação de agregados proteicos, mais conhecidos como corpos de inclusão (CI). Os CIs não são distribuídos homogeneamente no citoplasma das bactérias, em vez disso ficam localizados principalmente nos polos da bactéria (Ventura, 2016). O conhecimento da solubilidade é essencial para determinar diversos fatores no momento da produção heteróloga, como entender o controle da auto-montagem da proteína.

Guerra et al., 2016 em seu estudo testando a solubilidade de expressão heteróloga de proteínas de *Plasmodium falciparum* em duas diferentes cepas de *E. coli*, detectou que a linhagem BL21- Codon Plus que codificava Trna raros e BL21-pG-KJE8 que superexpressa chaperonas apresentavam expressão de proteínas insolúveis, mesmo com diferentes temperaturas e diferentes concentrações de IPTG.

Nossos resultados não podem afirmar o grau de solubilidade, mas viu-se que a temperatura de 30°C e 37°C e a concentração de IPTG (0,1mM, 0,5mM E 1,0mM), visivelmente não influenciam na solubilidade da transposase do elemento *mos1*.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que todas as cepas de *E. coli* BL21 D3 GROE, *E. coli* BL21 D3 PlysS, *E. coli* BL21 D3 RIL, *E. coli* BL31 D3 RP foram maquinarias eficazes para realizar a expressão heteróloga da transposase do elemento MOS1. Porém a cepa *E. coli* BL21 D3 GROE obteve um menor rendimento na expressão independente da temperatura de indução ou da concentração de IPTG utilizado. Além desta diferença significativa da expressão, as diferentes concentrações de IPTG não foram capazes de modificar o nível de expressão heteróloga da proteína de todas as linhagens, porém quando induzidas a uma temperatura de 30°C houve diminuição no nível de expressão.

As análises de solubilização, visivelmente não apresentaram diferenças entre as cepas testadas de BL21 D3, além de não apresentarem também, diferenças de grau de solubilização em ambos fatores testados, o da temperatura e da concentração de indutor IPTG.

Contudo este trabalho demonstrou que algumas linhagens de bactérias *E. coli* BL21 D3 como *E. coli* BL21 D3 PlysS, *E. coli* BL21 RIL e *E. coli* BL21 D3 RP são mais eficientes em realizar a expressão heteróloga da transposase do elemento da família *mariner*, MOS1. Além de concluir que a diferença de temperatura (30°C e 37°C) e diferentes concentrações (0,1mM, 0,5mM e 1,0mM), não influenciam no grau de solubilização da transposase. Porém a diminuição da temperatura para 30°C acarreta em uma diminuição na taxa de expressão em todas as linhagens.

Este trabalho é de grande valia para padronização da expressão, para futuramente realizar trabalhos de descoberta de funções, estrutura molecular e mecanismo de transposição da transposase deste TE.

REFERÊNCIAS

- AXELSSON, L.; KATLA, T.; BJØRNSLETT, M.; EIJSINK, V. G. H.; HOLCK, A. **A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake***. FEMS Microbiology Letters, v. 168, n. 1, p. 137–143, 1998.
- BEALL, E. L.; MAHONEY, M. B.; RIO, D. C. **Identification and analysis of a hyperactive mutant form of *Drosophila* P-element transposase**. Genetics, v. 162, n. 1, p. 217–227, 2002.
- BELLEN, H. J.; LEVIS, R. W.; HE, Y.; et al. **The *Drosophila* gene disruption project: Progress using transposons with distinctive site specificities**. Genetics, v. 188, n. 3, p. 731–743, 2011.
- BIRE, S.; CASTERET, S.; ARNAOTY, A.; et al. **Transposase concentration controls transposition activity: Myth or reality?** Gene, v. 530, n. 2, p. 165–171, 2013. Elsevier B.V.
- BÖHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C.; VOLFF, J. N. **Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates**. Chromosome Research, v. 16, n. 1, p. 203–215, 2008.
- BOUUAERT, C. C.; WALKER, N.; LIU, D.; CHALMERS, R. **Crosstalk between transposase subunits during cleavage of the** , v. 42, n. 9, p. 5799–5808, 2014.
- CHANG, W.-N.; TSAI, J.-N.; CHEN, B.-H.; FU, T.-F. **Cloning, expression, purification, and characterization of zebrafish cytosolic serine hydroxymethyltransferase**. Protein Expression and Purification, v. 46, n. 2, p. 212–220, 2006.
- CHEN, R. **Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond**. Biotechnology Advances, v. 30, n. 5, p. 1102–1107, 2012.
- CLARK, A. G.; EISEN, M. B.; SMITH, D. R.; et al. **Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny**. Nature, v. 450, n. 7167, p. 203–18, 2007.
- CRÉNÈS, G.; MOUNDRAS, C.; DEMATTEI, M. V.; et al. **Target site selection by the mariner-like element, *Mos1***. Genetica, v. 138, n. 5, p. 509–517, 2010.
- DAWSON, A.; FINNEGAN, D. J.; BUILDINGS, K.; KINGDOM, U.; GENT, V. **Excision of the** , v. 11, n. D, p. 225–235, 2003.
- DELAURI??RE, L.; CH??NAIS, B.; HARDIVILLIER, Y.; GAUVRY, L.; CASSE, N. **Mariner transposons as genetic tools in vertebrate cells**. Genetica, v. 137, n. 1, p. 9–17, 2009.
- DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. **The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: A comparison of overexpression in**

BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expression and Purification*, v. 37, n. 1, p. 203–206, 2004.

FILÉE, J.; ROUAULT, J.-D.; HARRY, M.; HUA-VAN, A. **Mariner transposons are sailing in the genome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*.** *BMC genomics*, v. 16, n. 1, p. 1061, 2015.

GABRIELCZYK, J.; KLUITMANN, J.; DAMMEYER, T.; JÖRDENING, H.-J. **Effects of ionic strength on inclusion body refolding at high concentration.** *Protein Expression and Purification*, v. 130, p. 100–106, 2017.

GORDON, E.; HORSEFIELD, R.; SWARTS, H. G. P.; et al. **Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*.** *Protein Expression and Purification*, v. 62, n. 1, p. 1–8, 2008.

GUERRA, Á. P.; CALVO, E. P.; WASSERMAN, M.; CHAPARRO-OLAYA, J. **Production of recombinant proteins from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli*.** *Biomédica*, v. 36, p. 97–108, 2016.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. **Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*.** *Trends in biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 54–60, 1998.

HICKMAN, A. B.; DYDA, F. **Mechanisms of DNA Transposition.** *Microbiology Spectrum*, n. May, p. 1–22, 2015.

INGHAM, A. B.; MOORE, R. J. **Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems.** *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 47, p. 1–9, 2007.

JACOBSON, J. W.; MEDHORA, M. M.; HARTL, D. L. **Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, n. 22, p. 8684–8688, 1986.

JARDIM, S. S.; SCHUCH, A. P.; PEREIRA, C. M.; LORETO, E. L. S. **Effects of heat and UV radiation on the mobilization of transposon mariner-Mos1.** *Cell stress & chaperones*, v. 20, n. 5, p. 843–51, 2015.

JEONG, H.; BARBE, V.; LEE, C. H.; et al. **Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3).** *Journal of Molecular Biology*, v. 394, n. 4, p. 644–652, 2009.

JEONG, H.; KIM, J.; LEE, J. **Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain BL21.** *Genome Announcements*, v. 3, n. 2, p. 1, 2015.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHANY, O.; JURKA, M. V. **Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution.** *Annual review of genomics and human genetics*, v. 8, p. 241–59, 2007.

- KANE, J. F. **Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli***. *Current opinion in biotechnology*, v. 6, n. 5, p. 494–500, 1995.
- K. KATAYANAGI, M. MIYAGAWA, M. MATSUSHIMA, M. ISHIKAWA, S. KANAYA, M. IKEHARA, T. MATSUZAKI, K. M. **Three-dimensional structure of ribonuclease H from *E. coli***. *Nature*, v. 347, n. 20, p. 306–310, 1990.
- KIM, J.; KIM, S. I.; HONG, E.; RYU, Y. **Strategies for increasing heterologous expression of a thermostable esterase from *Archaeoglobus fulgidus* in *Escherichia coli***. *Protein Expression and Purification*, v. 127, p. 98–104, 2016.
- LAMPE, D. J. **Recent Horizontal Transfer of a**. *Screen*, p. 850–862, 1995.
- LAMPE, D. J. **Bacterial genetic methods to explore the biology of mariner transposons**. *Genetica*, v. 138, n. 5, p. 499–508, 2010.
- LEE, Y. C. G.; LANGLEY, C. H. **Transposable elements in natural populations of *Drosophila melanogaster***. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences*, v. 365, n. 1544, p. 1219–28, 2010.
- LIDDY, N.; MOLLOY, P. E.; BENNETT, A. D.; et al. **Production of a soluble disulfide bond-linked TCR in the cytoplasm of *Escherichia coli* *trxB* *gor* mutants**. *Molecular Biotechnology*, v. 45, n. 2, p. 140–149, 2010.
- LONG, X.; GOU, Y.; LUO, M.; et al. **Soluble expression, purification, and characterization of active recombinant human tissue plasminogen activator by auto-induction in *E. coli***. *BMC biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 13, 2015.
- MAKRIDES, S. C. **Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli***. *Microbiol. Rev.*, v. 60, n. 3, p. 512–538, 1996.
- MAMOUN, C. BEN; GLUZMAN, I. Y.; BEVERLEY, S. M.; GOLDBERG, D. E. **Transposition of the *Drosophila* element mariner within the human malaria parasite *Plasmodium falciparum***. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 110, n. 2, p. 405–407, 2000.
- MIROUX, B.; WALKER, J. E. **Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels**. *Journal of molecular biology*, v. 260, n. 3, p. 289–298, 1996.
- MIYAKE, O.; HASHIMOTO, W.; MURATA, K. **An exotype alginate lyase in *Sphingomonas* sp. A1: Overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of alginate lyase IV (A1-IV)**. *Protein Expression and Purification*, v. 29, n. 1, p. 33–41, 2003.
- PICARDEAU, M. **Transposition of fly mariner elements into bacteria as a genetic tool for mutagenesis**. *Genetica*, v. 138, n. 5, p. 551–558, 2010.

RIO, D. C.; RIO, D. C. **P transposable elements in *Drosophila melanogaster*.** Mobile DNA II, n. May 2015, p. 484–518, 2002.

M. ROBINSON, R. LILLEY, S. LITTLE, J.S. EMTAGE, G. YARRANTON, P. STEPHENS, A. MILLICAN, M. EATON, G. HUMPHREYS, **Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*.** Nucleic Acids Res. 12 (1984) 6663–6671.

RUBIN, G. M.; KIDWELL, M. G.; BINGHAM, P. M. **The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The nature of induced mutations.** Cell, v. 29, n. 3, p. 987–994, 1982.

RUSSO, J.; HARRINGTON, A. W.; STEINIGER, M. **Antisense transcription of retrotransposons** in. 2015.

SARASWAT, V.; KIM, D. Y.; LEE, J.; PARK, Y.-H. **Effect of specific production rate of recombinant protein on multimerization of plasmid vector and gene expression level.** FEMS Microbiology Letters, v. 179, p. 367–373, 1999.

SPRADLING, A. C.; STERN, D.; BEATON, A.; et al. **The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes.** Genetics, v. 153, n. 1, p. 135–177, 1999.

STOSCH, M. VON; HAMELINK, J. M.; OLIVEIRA, R. **Toward intensifying design of experiments in upstream bioprocess development: An industrial *Escherichia coli* feasibility study.** Biotechnology Progress, 2016.

TELLIER, M.; BOUUAERT, C. C.; CHALMERS, R. **Mariner and the ITm Superfamily of Transposons.** Microbiol Spectr, v. 3, n. 2, p. MDNA3–0033–2014, 2015.

TERPE, K. **Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 72, n. 2, p. 211–222, 2006.

THANGADURAI, C.; SUTHAKARAN, P.; BARFAL, P.; et al. **Rare codon priority and its position specificity at the 5' of the gene modulates heterologous protein expression in *Escherichia coli*.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 376, n. 4, p. 647–652, 2008.

TIAN, J. Q. AND J.; QUAN, J. **Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways.** PLoS One, v. 4, n. 7, p. e6441, 2009.

TOSI, L. R.; BEVERLEY, S. M. **cis and trans factors affecting Mos1 mariner evolution and transposition in vitro, and its potential for functional genomics.** Nucleic acids research, v. 28, n. 3, p. 784–90, 2000.

VENTURA, S. **Editorial: Protein Solubility and Aggregation in Bacteria.** *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. JUL, p. 1–3, 2016.

WALLAU, G. L.; HUA-VAN, A.; CAPY, P.; LORETO, E. L. S. **The evolutionary history of mariner-like elements in Neotropical drosophilids.** *Genetica*, v. 139, n. 3, p. 327–338, 2011.

YUAN, Y.-W.; WESSLER, S. R. **The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies.** *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, v. 108, n. 19, p. 7884–7889, 2011