MARCELLO SILVA

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO
DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE,
PsaA E FRAGMENTOS DE PspA
DE *Streptococcus pneumoniae***

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia: USP/Instituto Butantan/IPT,
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Área: Biotecnologia).

SÃO PAULO
2005

MARCELO DA SILVA

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO
DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE,
PsaA E FRAGMENTOS DE PspA
DE *Streptococcus pneumoniae***

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia: USP/Instituto Butantan/IPT,
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientadora:
Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Co-orientadores:
Dr. Joaquín Cabrera-Crespo
Dr. Alexandre Paulo Yague Lopes

SÃO PAULO
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós Graduação Interunidades
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan,
IPT-Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Marcello Silva.

Tese: Clonagem, expressão e purificação das proteínas de superfície, PsaA e fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae*.

Orientadora: Luciana Cezar de Cerqueira Leite.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a) Assinatura
Nome
Instituição

Examinador(a) Assinatura
Nome
Instituição

Examinador(a) Assinatura
Nome
Instituição

Examinador(a) Assinatura
Nome
Instituição

Presidente Assinatura
Nome
Instituição

DEDICATÓRIA

*À minha querida mamãe, Dona Dulce,
pelos valiosos ensinamentos, apoio e incentivo,*

à minha linda Silmara, pelo amor e compreensão,

*aos meus irmãos, Murilo, Chochá, Márcia, Dedé,
Cris e Ângela, por me ensinarem da forma deles, a
acreditar na superação dos obstáculos, degrau após
degrau,*

*às avós, Maria e Zefinha (madrinha), ao meu avô, o
velho Zé Bento, aos meus tios e tias, por tentarem
me mostrar os melhores caminhos a seguir,*

*ao meu pai, Divino, por ter me doado parte do seu
DNA e pela falta que sua ausência me faz.*

*Mesmo estando longe, estavam perto, sempre ao
meu lado,*

...com muito carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Luciana C.C. Leite, pesquisadora do Laboratório de BCG Recombinante do Centro de Biotecnologia-Instituto Butantan, por ter me acolhido em seu laboratório, pela orientação, discussão e correção deste trabalho.

Ao Dr. Joaquín Cabrera-Crespo (meu co-orientador), pesquisador do laboratório de Fermentação do Centro de Biotecnologia-Instituto Butantan, pelas sugestões, bibliografias, por ter acompanhado comigo muitos dos experimentos e pelas discussões acerca deste projeto.

Ao Dr. Alexandre P. Y. Lopes, pesquisador do Centro de Biotecnologia-Instituto Butantan por ter me co-orientado e me ajudado com os experimentos na fase inicial deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Lee Ho, pesquisador do Centro de Biotecnologia-Instituto Butantan, por ter aberto seu laboratório para que pudéssemos utilizar não somente os equipamentos e reagentes, mas também a sala de reuniões.

À Dra. Marta M. Tanizaki, do Laboratório Central (Centro de Biotecnologia-Instituto Butantan), por disponibilizar seu laboratório para que pudéssemos realizar alguns dos nossos experimentos.

À Dra. Valdey O. Dias, do Laboratório Central (Centro de Biotecnologia-Instituto Butantan), por contribuir na análise de alguns experimentos e inclusive por ter lido a versão do trabalho, a que foi entregue à banca de exame para a qualificação.

*À Dra. Maria Cristina C. Brandileone, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, por nos fornecer algumas cepas de *Streptococcus pneumoniae* que expressam PspA's das famílias 1 e 2.*

À Dra. Eliane N. Miyaji, por ter de forma expressiva, colaborado para andamento dos experimentos com PsaA e PspA.

À Dra. Márcia Gamberini, por ter me auxiliado com a parte de PsaA (anticorpos anti-PsaA) e por ter me ajudado a procurar moradia (CRUSP), logo que cheguei a São Paulo.

À Dra. Rocilda P. F. Schenckman e aos alunos de iniciação científica, Mariane, Christian e por terem iniciado as primeiras construções dos vetores em pET-32a.

Aos colegas de laboratório, Dr. Ivan, Rogério, Sheyla e Léo, por terem dado suas contribuições desde a preparação de géis de poliacrilamida, Western blot, manipulação dos equipamentos do laboratório até sugestões a respeito deste projeto.

À minha colega de laboratório (Fermentação-Instituto Butantan), Dra. Maria Elizabeth Sbrógio de Almeida (Bete), pela ajuda na preparação e discussão do ensaio de imunologia com as proteínas recombinantes.

Ao Dr. Karim Dahmouche, Dr. Celso V. Santilli e Dra. Sandra Pulcinelli, do Departamento Físico-Química, Instituto de Química-UNESP de Araraquara, por me iniciarem no mundo da pesquisa e por me darem até hoje, suas sugestões, neste cenário de difícil obtenção de recursos para se financiar e desenvolver pesquisa.

Agradecimentos

Ao pessoal do Centro de Biotecnologia-Instituto Butantan, Ana Paula G. B. Silva (Aninha), pela disposição e boa vontade em me ajudar com as imunizações de camundongos com as proteínas recombinantes e com o ELISA. Aos técnicos, Paulinha, Diego, Dani, Rodrigo, Ingrid, Érika, Nábia, Lu, que sem dúvida deram grande suporte ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia-Instituto Butantan, Da. Inês, Máximo, Sr. Hélio, Sr. Lourivaldo pelo apoio técnico, responsabilidade e pela disposição no andamento e execução deste projeto. À Marisa, Sueli, Zezé, Solange, Toninho, Da. Sebastiana, por darem suas contribuições, cada um do seu jeito. Às secretárias, Da. Salete e Fátima, pelo auxílio prestado, desde o projeto inicial até a fase conclusiva deste estudo.

Aos estagiários Rubens, Renata e Silvia, por terem participado, com empenho, em experimentos complementares a este trabalho. Aos colegas de disciplinas (mestrado), Noemi, Ana Venezuelana, Rafa, Mineirinho, Paty, pelas trocas de idéias e pelos grupos de estudo formados após as aulas. O meu muito obrigado pelas dicas.

Ao caro Dr. Pedro, do IB-USP, por ter me dado um help cada vez que o meu micro deu pau e por ter me dado umas dicas quanto ao uso do Photoshop na hora de editar as figuras desta tese. Ao Slow, do Instituto de Química-UNESP, pelas caronas que me deu de Araraquara a São Paulo, e pelos grupos de estudo. À Alliny pelo auxílio na formatação final do texto.

Aos amigos, Concha, Pica-Pau, pelo apoio no campo das idéias, e pelo apoio financeiro, até que meu projeto fosse aprovado pela FAPESP. Obrigado pelo apoio moral também.

Aos amigos, Dr. Marcos (Burguês), IQ-USP, Jô (ICF-UNESP), por terem algumas vezes me dado refúgio em seu apto, quando cheguei a SP. Ele, por ter me dado muitas dicas, inclusive auxiliando-me em alguns experimentos. E ambos, por terem se preocupado comigo quando adiquiri uma pneumonia ou meningite, onde me trouxeram remédios, comidas, etc.

Ao Dr. Celso R. R. Ramos, pesquisador do Laboratório de análise pós-transcricional, Instituto de Química-USP, por ter nos fornecido os plasmídeos pRSET, pAE e por nos ajudar na construção dos nossos vetores.

A todos os funcionários da biblioteca do ICB/USP, dentre eles, Delza, Maria, Paulo, Valmira, Renata, Eva, Wilki, Carmlina, Tereza, pela excelente forma de atendimento.

Aos colegas, Lu, Sandrinha, Lucila, Cris, Ana, João e Lucianinha (Laboratório Central/Instituto Butantan) e Elaine, Adriana, Luís, Sandro, Da. Cleusa (Benção), do IQ-USP, pelas saudáveis trocas de idéias e pelos incentivos nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Aos meus companheiros de apartamento (CRUSP), Sylvinha (quem também se preocupou comigo quando estive doente, ela foi quem preparou os chazinhos, a comida, o remédio, as estorinhas, etc. Brigadinho!!!), Cylaine, André, Miguel e Luís Pé, pelas saudáveis discussões a respeito dos diferentes temas e pelas sugestões que surgiram, a todos, pelos momentos difíceis e de alegria que compartilhamos nesse Estranho Mundo Novo chamado CRUSP.

Aos colegas de CRUSP, Valdirene (pelo apoio de sempre e pelos bandejões que tivemos que dividir), Antônio, Mari, Leandro, Dr. Lucas, Dr. PC, Gaúcho, Roseli, primo, prima, Simone, Alan, Luciana, Rovená, Érika, Lígia, Ailton, Roberto, Jailton, Sr. Hélio, Sr. Fernando, Sr. Edézio, Catarina e várias outras pessoas, passando pelo pessoal da limpeza, porteiros, etc, por também contribuírem para o meu aprendizado.

Às pesquisadoras do Laboratório de Fermentação, Dra. Mickie Takagi, Dra. Júlia B. Ramos e Dra. Viviane M. Gonçalves por terem me ajudado, não somente com as minhas tabelas, gráficos do Excel, manejo de equipamentos, mas também com os cultivos em shaker e em biorreatores.

À bibliotecária do ICB/USP, Maria José (Zezé) por ter feito uma revisão criteriosa, não somente das referências bibliográficas, mas também de toda a formatação do texto.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Clodoaldo, Nanci, Eliane, Ângela e Fábria, pelo esforço em resolver tarefas deles e nossas, aos assistentes do COSEAS, pelo apoio administrativo.

Aos componentes da banca de qualificação: Dra. Lucile Maria Floeter-Winter, do IB-USP, Dr. Adalberto Pessoa Jr (Farmacêuticas-USP) e Dr. Ivo Lebrum, Laboratório e Bioquímica-Instituto Butantan, pelas críticas construtivas e sugestões que contribuíram para a elaboração final desta tese.

Enfim, o meu agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo, que sem as quais, tal realização não seria possível.

A TODOS,

de coração, o meu muitíssimo obrigado.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da

FAPESP

FUNDAÇÃO BUTANTAN

CNPq

PADCT

“(…) Qual é o veredicto da mente mais ampla? Silêncio: o livro do destino está fechado para nós. O homem é um estranho para com sua própria pesquisa; não sabe de onde vem, nem para aonde vai. Átomos atormentados num leito de lama, devorados pela morte, um escárnio do destino, mas átomos pensantes, cujos olhos que enxergam longe, guiados por pensamentos, mediram as fracas estrelas. Nosso ser mistura-se ao infinito; a nós mesmos, nunca vemos ou chegamos a conhecer. Este mundo, este palco de orgulho e do errado, está cheio de tolos e doentes que falam em felicidade.”

Voltaire

RESUMO

SILVA, M. **Clonagem, Expressão e Purificação das Proteínas de Superfície, PsaA e Fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae***: 2000-2005. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia: USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2005.

Streptococcus pneumoniae é o principal causador da pneumonia bacteriana. As vacinas atualmente disponíveis contêm polissacarídeos capsulares dos diferentes sorotipos conjugados ou não com proteínas carreadoras. No entanto, estas apresentam elevado custo ou proteção reduzida nos grupos de risco (crianças abaixo de cinco anos de idade e idosos). Proteínas de superfície de *S. pneumoniae*, como PsaA e PspA, são consideradas fortes candidatas vacinais. Com o objetivo de se desenvolver uma vacina de ampla cobertura e baixo custo contra pneumococos, os genes *psaA* e *pspA* foram clonados em vetores de expressão em *E. coli*, pAE e pET, e as proteínas expressas foram purificadas por cromatografias de afinidade e de troca aniônica. O rendimento de proteína recombinante obtido com a construção baseada em pET foi três vezes maior que o obtido com pAE. Condições de cultivo foram estabelecidas utilizando meio definido com indução por IPTG e/ou por lactose. As cepas recombinantes estão adequadas para serem usadas em estudos para escalonamento da produção em biorreatores.

Palavras-chave: clonagem, pneumonia, purificação, proteínas recombinantes, *Streptococcus* e vacinas.

ABSTRACT

SILVA, M. **Cloning, Expression and Purification of Proteins of Surface: PsaA and Fragments of PspA from *Streptococcus pneumoniae***: 2000-2005. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia: USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2005.

Streptococcus pneumoniae is the main causative agent of bacterial pneumonia. The current vaccines available contain capsular polysaccharide conjugated or not with carrier proteins. However these are either too expensive or do not protect the high-risk groups. Surface proteins of *S. pneumoniae*, such as PsaA and PspA, are considered strong vaccine candidates. With the aim of developing a broad-coverage and low-cost vaccine against pneumococcus, the *psaA* and *pspA* genes were cloned in *E. coli* expression vectors, pAE and pET, and the expressed proteins were purified through affinity and anion exchange chromatography. The yield of the recombinant protein obtained with the construction based in pET was 3-fold higher than that obtained with pAE. Culture conditions were established using defined media with IPTG and/or lactose induction. The recombinant strains are now ready to undergo studies for scale-up of production in bioreactors.

Key words: cloning, pneumonia, purification, recombinant proteins, *Streptococcus* e vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama esquemático dos fatores de virulência de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
Figura 2. Principais domínios do gene <i>pspA</i> da sequência analisada da cepa Rx1.....	29
Figura 3. Classificação das <i>PspA</i> 's em famílias e clados.	30
Figura 4. Esquema ilustrativo do funcionamento do operon <i>lac</i>	38
Figura 5. Vetor de expressão em <i>E. coli</i> , pAE contendo o gene* da proteína recombinante.....	50
Figura 6. Vetor de expressão em <i>E. coli</i> , pET-37b(+) ..	51
Figura 7. Vetores de expressão em <i>E. coli</i> , pAE contendo os genes das proteínas recombinantes..	53
Figura 8. Construção do vetor de expressão de <i>E. coli</i> , pET-f _{pspA} 1..	54
Figura 9. Análise de restrição do vetor pAE-psaA em eletroforese em gel de agarose..	64
Figura 10. Eletroforese em SDS, do extrato de BL21-DE3, transformado com pAE-psaA, induzidos e não induzidos	65
Figura 11. Western blot de extratos de BL21-DE3 transformados com pAE-psaA induzidos e não induzidos.....	67
Figura 12. Western blot de frações de pré-purificação de rPsaA.....	67
Figura 13. Western blot das frações do Extrato Total de BL21(DE3)-pAE-psaA, eluídas da Coluna de Ni ⁺⁺ -Sephadex.....	67
Figura 14. Western blot das frações do Extrato Total de BL21(DE3)-pAE-psaA.....	68
Figura 15. Cromatograma obtido a partir da purificação da rPsaA em resina quelante de níquel.....	69
Figura 16. Cromatografia em Q-Sephadex para purificação de rPsaA.....	70
Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida (Frações purificadas Ni ⁺⁺ e Q-Sephadex).....	71
Figura 18. Western blot das frações de purificação da rPsaA.....	71
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose. Análise de restrição dos plasmídeos pAE e pTARGET-pspA.....	73
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose. Análise de restrição dos Clones de pAE-pspA.....	73
Figura 21. Eletroforese em gel de Poliacrilamida, dos extratos protéicos de <i>E. coli</i> BL21-DE3 transformadas com pAE-f _{pspA} 1 e pAE-f _{pspA} 3.....	74
Figura 22. Cromatografia em Q-Sephadex para purificação de rFPspA1.....	76
Figura 23. Cromatografia em Q-Sephadex para purificação de rFPspA3.....	77
Figura 24. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações de purificação de rFPspA1 e rFPspA3.....	78
Figura 25. Western blot das frações de purificação de rFPspA1 e rFPspA3.....	78
Figura 26. Western blot de Extrato Total de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> que expressam PspA1 ou PspA3.....	82

Lista de Ilustrações

Figura 27. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pAE-fpspA3. Cultivo em meio 2YT em <i>shaker</i> : não induzido e induzido por IPTG (0,1 mM).....	84
Figura 28. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pAE-fpspA3. Cultivo em <i>shaker</i> : com Amp 0,1g/L e 1g/L, indução com IPTG 1mM..	85
Figura 29. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pAE-fpspA1. Cultivo em <i>shaker</i> : não induzido.	86
Figura 30. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida e (B) <i>Western blot</i> dos extratos totais de amostras do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pAE-fpspA1.	87
Figura 31 Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pAE-fpspA1 e consumo de glicose em biorreator (5 L). Cultivo em meio rico, 2YT. Indução com IPTG (1 mM).	88
Figura 32. SDS-PAGE e <i>Western Blot</i> do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pAE-fpspA1 em biorreator em meio 2YT.	88
Figura 33. Eletroforese em gel de agarose. Análise de restrição dos clones da construção pET-fpspA1..	90
Figura 34. Curva de crescimento do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> . Cultivos (2YT + Kan) não induzidos e induzidos com IPTG 1mM.	91
Figura 35. SDS-PAGE e <i>Western Blot</i> do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio 2YT N.I. e induzido com IPTG (1mM).	91
Figura 36. Curva de crescimento do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio 2YT: Não Induzido; Induzido com IPTG 1 mM (IPTG); Induzido com lactose.....	92
Figura 37. SDS-PAGE de amostras do cultivo <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio 2YT e com indução por lactose..	93
Figura 38. SDS-PAGE de frações de purificação de rFPspA1 apartir de extratos de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1.....	95
Figura 39. <i>Western blot</i> de frações de purificação de rFPspA1 apartir de extratos de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1.....	95
Figura 40. Densitometria das frações de purificação de rFPspA1 dos cultivos de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i>	97
Figura 41. Curvas de crescimento e consumo de glicose para o cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio HDF/Kan: Não Induzido; Induzido com IPTG 1 mM (IPTG); Induzido com lactose	99
Figura 42. SDS-PAGE e <i>Western Blot</i> de amostras do cultivo em <i>shaker</i> , de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 meio HDF induzido com IPTG (1 mM).....	100

.....*Lista de Ilustrações*.....

Figura 43. Curva de crescimento do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio HDF/glicose: Cultivo não induzido; Indução com lactose; Indução com IPTG 1mM	101
Figura 44. <i>SDS-PAGE</i> do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em HDF/glicose (20 g/L).	102
Figura 45. Densitometria a partir do <i>SDS-PAGE</i> das amostras do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio HDF/glicose: Cultivo não induzido; Indução por lactose; Indução com IPTG.....	103
Figura 46. Curva de crescimento do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio HDF/glicose com pulso de glicose.	104
Figura 47. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio HDF/glicose: Indução por lactose	105
Figura 48. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio HDF/glicose: Indução por lactose + IPTG (0,1 mM).	105
Figura 49. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio HDF/glicose: Indução por lactose + IPTG (1 mM).	106
Figura 50. <i>SDS-PAGE</i> de amostras do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em HDF/glicose. Indução por lactose; lactose + IPTG 0,1 mM e por lactose + IPTG 1 mM.....	107
Figura 51. Densitometria a partir do <i>SDS-PAGE</i> das amostras dos cultivos em <i>shaker</i> com HDF/glicose: Indução por lactose; por lactose + IPTG 0,1 mM e por lactose + IPTG 1 mM.	108
Figura 52. Curva de crescimento do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> em meio HDF/glicerol.	109
Figura 53. <i>SDS-PAGE</i> dos cultivos de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> . Cultivo em meio HDF/glicerol com indução por lactose / IPTG 1 mM.	110
Figura 54. Densitometria a partir do <i>SDS-PAGE</i> do cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em <i>shaker</i> com HDF/glicerol: Indução com IPTG 0,1 mM (IPTG 0,1 mM); com IPTG 1 mM (IPTG 1 mM); indução com lactose + IPTG 0,1 mM e com lactose + IPTG 1 mM.	110
Figura 55. Cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpspA1 em biorreator em meio HDF/glicose (20 g/L)...	112
Figura 56. Esquema do processo de purificação das proteínas recombinantes.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaios com as proteínas candidatas a antígenos vacinais contra pneumococos em diferentes modelos animais.....	35
Tabela 2 - Exemplos de ligantes para cromatografia de afinidade.....	43
Tabela 3 - Grupos funcionais mais usados em cromatografia de troca iônica	44
Tabela 4 - Purificação de rPsaA a partir de BL21(DE3)-pAE-psaA.....	72
Tabela 5 - Purificação da rFPspA1 a partir de BL21(DE3)-pAE-fpspA1	79
Tabela 6 - Purificação da rFPspA1 a partir de BL21(DE3)-pAE-fpspA3.....	80
Tabela 7 – Indução de anticorpos contra as proteínas recombinantes.....	81
Tabela 8 – Purificação de rFPspA1 de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET37-fpspA1	98
Tabela 9 - Síntese dos cultivos em meio HDF	122
Tabela 10 - Meio rico, 2YT.....	145
Tabela 11 - Meio rico, LB.....	145
Tabela 12 - Meio mínimo definido, HDF.....	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp	- ampicilina
BSA	- bovine serum albumin
C-terminal	- carboxi-terminal
<i>Comassie Blue-R250</i>	- reagente azul, usado para corar géis de acrilamida
<i>Cut-off</i>	- tamanho de poros homogêneo (corte padronizado)
Da	- Dalton
DO	- densidade óptica
EDTA	- ácido etilenodiaminotetraacético
FAPESP	- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
fpspA1	- gene que expressa o fragmento rFpspA1 (fragmento de uma PspA do Clado 1 pertencente à Família 1) de <i>S. pneumoniae</i>
fpspA3	- gene que expressa o fragmento rFpspA3 (fragmento de uma PspA do Clado 3, pertencente à Família 2) de <i>S. pneumoniae</i>
FPLC	- <i>fast protein liquid chromatography</i>
<i>g</i>	- aceleração gravitacional/terra ($\sim 9,81 \text{ m/seg}^2$)
HDF	- meio definido para cultivo de <i>E. coli</i>
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
His	- histidina
IgA	- imunoglobulina A
IgG	- imunoglobulina G
IgM	- imunoglobulina M
L	- litro
LB	- Lúria-Bertani, meio rico para cultivo de microrganismos, meio não definido
LPS	- lipopolissacarídeo
N-terminal	- amino-terminal
OMV	- “outer membrane vesicles”, vesículas de membrana externa
PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb	- pares de base

PBS	- tampão salina fosfato
PCR	- reação de polimerização em cadeia
PdB	- Pneumolisina (proteína de <i>S. pneumoniae</i>) com mutação sítio dirigida para reduzir a toxicidade
% OD	- percentagem de oxigênio dissolvido
PS	- Polissacarídeo Capsular
psaA	- gene que expressa a proteína recombinante, PsaA de <i>S. pneumoniae</i>
PsaA	- <i>Pneumococcal surface antigen A</i>
PspA	- <i>Pneumococcal surface protein A</i>
PspA1	- PspA do Clado 1 pertencente a Família 1
PspA3	- PspA do Clado 3, pertencente a Família 2
PspC	- <i>Pneumococcal surface protein C</i>
rPsaA	- PsaA recombinante
rFPspA1	- fragmento de PspA do clado 1, recombinante
rFPspA3	- fragmento de PspA do clado 3, recombinante
SDS-PAGE	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polycrylamide Gel Electrophoresis</i>
Shaker	- Agitador de frascos, geralmente usado para cultivos de microrganismos, neste pode-se controlar a rotação e a temperatura interna.
TBST	- Tris-Buffered Saline + Tween 20
TCA	- ácido tricloroacético
Tris	- tris(hidroximetil)aminometano
UFC	- Unidades Formadoras de Colônia
UV	- ultravioleta
V	- volume
2YT	- meio rico para cultivo de microrganismos (meio não definido)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 PANORAMA SOBRE PNEUMONIAS E INFECÇÕES COM PNEUMOCOCOS	24
1.2 IDENTIFICAÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DO <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	24
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	26
1.3.1 Cápsula polissacarídica e parede celular	27
1.3.2 Proteína de superfície de pneumococo A, PspA	29
1.3.3 Antígeno de superfície de pneumococo A, PsaA	31
1.3.4 Pneumolisina	32
1.3.5 Proteínas ligantes de colina, CbpA	32
1.3.6 Outros fatores de virulência	33
1.4 VACINAS CONTRA <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	33
1.5 SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i>	35
1.5.1 Vetores de clonagem	36
1.5.2 Vetores de expressão	37
1.6 PRINCÍPIOS DE CULTIVO PARA AMPLIAÇÃO DE ESCALA	39
1.7 PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO	41
1.7.1 Purificação por cromatografia de afinidade	42
1.7.2 Purificação por cromatografia de troca iônica	44
2. OBJETIVOS	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 REAGENTES E MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	49
3.2 VETORES DE EXPRESSÃO EM <i>E. COLI</i>	49
3.2.1 Vetor pAE	49
3.2.2 Vetor pET-37b(+)	50
3.3 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO DE PsAA E PSPA EM <i>E. COLI</i>	52
3.3.1 Construções baseadas em pAE	52
3.3.2 Construção de pET-fpspA1	53
3.4 LINHAGENS <i>E. COLI</i> E DE <i>S. PNEUMONIAE</i> UTILIZADAS	55

Sumário

3.5 TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> DH ₅ α, AMPLIFICAÇÃO E PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS.....	55
3.6 CULTIVO DE <i>E. COLI</i> BL21-DE3 E INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ESCALA DE BANCADA	55
3.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E SOLUBILIDADE.....	56
3.7.1 Eletrofose em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>).....	57
3.7.2 <i>Western Blot</i>	57
3.8 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	58
3.8.1 Obtenção do extrato inicial	58
3.8.2 Cromatografia de afinidade em resina de Sepharose quelante de níquel,	58
Ni ⁺⁺ -Sepharose	58
3.8.3 Cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose	59
3.9 CULTIVOS PREPARATIVOS PARA AMPLIAÇÃO DE ESCALA	60
3.9.1 Obtenção das células	60
3.10 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS E OBTENÇÃO DOS ANTISOROS	61
3.11 DETERMINAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTI-SOROS POR <i>WESTERN BLOT</i> E ELISA	61
4. RESULTADOS	73
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE rPsaA (CONSTRUÇÃO EM PAE).....	64
4.1.1 Construção do vetor para expressão de rPsaA	64
4.1.2 Expressão de rPsaA em <i>E. coli</i> BL21-DE3	65
4.1.3 Análise da solubilidade de rPsaA e pré-análise para purificação	67
4.1.4 Purificação de rPsaA por cromatografia de Afinidade.....	68
4.1.5 Purificação da rPsaA por cromatografia de troca iônica	69
4.1.6 Análise da purificação de rPsaA por <i>SDS-PAGE</i> e por <i>Western blot</i>	70
4.1.7 Rendimento de purificação de rPsaA	72
4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE PspA (CONSTRUÇÃO EM PAE).....	72
4.2.1 Construção de vetores de expressão dos fragmentos de PspA	72
4.2.2 Expressão de rFPspA em <i>E. coli</i> BL21-DE3	74
4.2.3 Purificação de rFPspA dos clados 1 e 3 (construção em pAE)	75
4.2.3.1 Purificação de rFPspA por cromatografia de afinidade	75
4.2.3.2 Purificação da rFPspA por cromatografia de troca iônica	76
4.2.3.3 Análise da purificação de rFPspA por <i>SDS-PAGE</i> e <i>Western blot</i>	77

Sumário

4.2.3.4 Rendimento de purificação de rFPsA (construção em pAE).....	79
4.3 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DA IMUNOGENICIDADE E DA REATIVIDADE DOS ANTI-SOROS GERADOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	80
4.3.1 Análise da reatividade dos anti-soros verificada por <i>Western blot</i> contra extratos de <i>S. pneumoniae</i>	81
4.4 EXPERIMENTOS PREPARATÓRIOS PARA ESCALONAMENTO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS rPSAA, rFPsA1 E rFPsA3	82
4.4.1 Cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada com pAE-fpsA3 em meio rico 2YT/Amp.	83
4.4.2 Cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pAE-fpsA1 em fermentador em meio 2YT.	87
4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE rFPsA1 USANDO O VETOR pET-37B(+)	89
4.5.1 Construção do vetor de expressão pET37-fpsA1	89
4.5.2 Cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpsA1 em meio 2YT em <i>shaker</i>	90
4.5.3 Cultivo em meio 2YT com indução por lactose em <i>shaker</i>	92
4.6 PURIFICAÇÃO DE rFPsA1 POR CROMATOGRAFIAS DE AFINIDADE E DE TROCA IÔNICA, CONSTRUÇÃO EM PET-37B(+)	93
4.6.1 Rendimento de purificação de rFPsA1 na construção em pET	96
4.7 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM HDF PARA PRODUÇÃO DE rFPsA1.....	98
4.7.1 Cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpsA1 em meio mínimo definido HDF em <i>shaker</i>	98
4.7.2 Cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpsA1 em meio HDF com glicose ou glicerol	100
4.7.2.1 Indução com IPTG ou lactose	100
4.7.3 Cultivos de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET-fpsA1 com HDF/glicose em pulsos em <i>shaker</i>	103
4.7.4 Cultivos em HDF/glicose com indução por lactose, lactose + IPTG 0,1 mM e por lactose + IPTG 1 mM	104
4.7.5 Cultivos em HDF/ glicerol com pulsos de lactose, de lactose + IPTG (0,1 mM) e de lactose + IPTG (1 mM).....	108
4.8 CULTIVO PRELIMINAR DE <i>E. COLI</i> BL21(DE3)-PET-FPSA1 EM BIORREATOR	111
4.8.1 Cultivo em HDF/glicose.....	111
5. DISCUSSÃO	113
6. CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS*	127

.....

1. INTRODUÇÃO

1.1 PANORAMA SOBRE PNEUMONIAS E INFECÇÕES COM PNEUMOCOCOS

Pneumonia é um termo que se aplicam as muitas infecções pulmonares, grande parte das quais causada por bactérias. *Streptococcus pneumoniae* é uma das causas mais comuns de pneumonia bacteriana. A bactéria é também responsável por muitos casos de infecções do ouvido médio (otite média) e um dos mais freqüentes agentes das meningites bacterianas, após *N. meningitidis* e *H. influenzae*¹. É um dos principais patógenos humano, transmitido de pessoa a pessoa por aerossol, que coloniza a nasofaringe, de onde ganha acesso aos pulmões ou ao tubo eustaquiano². É responsável pela denominada *pneumonia típica*, sendo considerada uma das mais sérias infecções das vias aéreas que ocorrem nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Pneumonias causadas por outros microrganismos, como fungos, protozoários, vírus, e outras bactérias são denominadas *pneumonias atípicas*, mas esta distinção está se tornando cada vez menos usada na prática.

As pneumonias pneumocócicas atingem os brônquios e os alvéolos. Os sintomas mais comuns são febres altas, calafrios e tosse³, além de dificuldade respiratória e dor torácica. Os pulmões ficam com um aspecto avermelhado, pois os vasos sanguíneos encontram-se dilatados. Em resposta à infecção, os alvéolos se enchem com hemácias, leucócitos polimorfos nucleares (PMNs) e líquidos dos tecidos circundantes. O escarro freqüentemente tem cor de ferrugem pelo sangue proveniente dos pulmões. Os pneumococos podem invadir a corrente sanguínea, a cavidade pleural que circunda o pulmão e, ocasionalmente, as meninges. Quando a bactéria é inalada, atinge os pulmões, onde sobrevive por evasão da fagocitose pelos macrófagos alveolares. A colonização bacteriana do tubo eustaquiano desencadeia uma resposta inflamatória aguda que provoca febre e dor. A resposta inflamatória do hospedeiro é responsável pela maior parte dos sintomas causados pela infecção. Produtos bacterianos intensificam a resposta imune local, atraindo mais macrófagos e células linfóides para o local da infecção. O rompimento do mecanismo de troca de gases causado pela inflamação leva o paciente à cianose.

1.2 IDENTIFICAÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DO *Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae*, ou pneumococo, é um microrganismo estudado há mais de 100 anos, todavia continua causando a morte, principalmente de crianças e idosos. Quando o

microrganismo foi isolado pela primeira vez em 1881 na França, Louis Pasteur o classificou como “Microbe septicemique du salive”; George M. Stenberg nos EUA, classificou-o como *Micrococcus pasteurii*. Em 1886, Frankel classificou este microrganismo como Pneumococos, pelo fato deste causar doenças pulmonares. Em 1920 este foi denominado *Diplococcus pneumoniae*, em face de sua morfologia, sendo o nome sugerido por WEICHSEBAUM, 1886 *apud* BRANDILEONE, 1999¹¹. A atual denominação foi recebida em 1974, em virtude de este apresentar morfologia em cadeia quando em meio líquido⁴. O *Streptococcus pneumoniae* pertence ao gênero *Streptococcus*, família *Streptococcaceae*⁴. *S. pneumoniae* é um microrganismo Gram positivo, geralmente considerado anaeróbico facultativo⁵ e algumas cepas são dependentes de CO₂ quando isoladas de material clínico. É uma bactéria capsulada com morfologia de cocos (com 0,5 a 1,25 µm de diâmetro), é arranjado em pares (diplococos) ou em cadeias curtas. São organismos imóveis e não formam esporos⁶.

Os pneumococos podem ser isolados do trato respiratório superior (naso-orofaringe), escarro e outras secreções. Podem ser diferenciados de outros streptococos alfa-hemolíticos pela sensibilidade à optoquina (hidroclorato de etilidrocupreína) e solubilidade em bile. Os pares de células são circundados por uma cápsula densa que torna o patógeno resistente à fagocitose. Estas cápsulas são à base da diferenciação sorológica dos pneumococos em mais de 90 sorotipos. Destes, 48 não produzem reações cruzadas entre si⁷. Portanto, o sistema de classificação em sorotipos baseia-se na natureza dos diferentes antígenos polissacarídicos⁸. Existem diferenças de prevalências sorotípicas geográficas. Os sorotipos pediátricos mais importantes nos EUA e na Europa são: 6A, 14, 19F e 23F, responsáveis por quase 60% de todas as infecções, enquanto que, para adultos, os sorotipos 3, 19F e 6A são responsáveis por 31% das infecções¹.

O projeto “SIREVA (“Sistema Regional de Vacinas”) de vigilância epidemiológica de *Streptococcus pneumoniae* na América Latina”, foi proposto em 1993 e coordenado pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), Washington, EUA, implantando a investigação laboratorial de cepas invasivas de *S. pneumoniae* em diferentes países Latino-Americanos⁹. No Brasil, a proposta SIREVA conta com o apoio do Ministério da Saúde (MS), DF e do Centro de Referência Nacional de Meningites, Instituto Adolfo Lutz (IAL), SP, sob coordenação técnica do IAL¹⁰.

Existe uma série de publicações sobre a prevalência dos diferentes sorotipos de pneumococos no Brasil. “Os primeiros dados brasileiros relatando os sorotipos prevalentes e/ou

resistência antimicrobianos do pneumococo são descritos por Pires *et al.* (1982) e Teixeira *et al.* (1988) com amostras das cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente”¹¹. No entanto, é constatado que esta prevalência vai se alterando com o tempo. Em 1990, foi relatado por Taunai *et al.*¹² que os sorotipos mais prevalentes obtidos do Instituto Adolfo Lutz seriam 1, 6B, 18C, 14, 5, 3, 6A, 23F e 38. Em 1994, Sessegola *et al.*¹³ caracterizaram os sorotipos 14, 6B, 23F, 5, 19F, 6A, 1 e 4 como os mais prevalentes. Brandileone *et al.*¹⁴ em 1995, encontraram os sorotipos 1, 6B, 14, 6A, 18C, 3, 5, 23F e 19F, como sendo os de maior prevalência. Em 1997 foram encontrados como prevalentes, também por Brandileone *et al.*¹⁰, os seguintes: 1, 5, 9V, 6A, 14, 6B, 19F e 23F. Outro estudo mostrou que, tanto no Brasil quanto em alguns países da América Latina (Argentina, Colômbia, México, Uruguai e Chile), foram identificados 13 tipos de cápsulas, das quais os sorotipos mais comuns foram 1, 5 e 14. Neste caso, 63,8% das crianças analisadas, eram menores de dois anos de idade¹⁵. Um outro estudo feito na América Latina mostrou que, dos isolados invasivos de pneumococos, 44,1% dos casos referem-se à pneumonia e 41,1% à meningite. Neste estudo foram relatados treze tipos de cápsulas, para 86% dos isolados mencionados: 14, 6A/B, 5, 1, 23F, 18C, 19A, 7F, 9V, 3, 9N e 4¹⁶.

A morbidade e a mortalidade da infecção por pneumococo são tão altas quanto à da diarreia nos países em desenvolvimento¹⁷. Além disso, o uso de antibiótico para controle da doença tem sido frustrado pelo aparecimento de cepas multirresistentes¹⁸. A Pneumonia pneumocócica é responsável por 10 a 25% de todas as pneumonias¹⁹.

Segundo Brandileone¹¹, “no Brasil, em 1996, a mortalidade por pneumonia foi de 21 óbitos por 100.000 pessoas, correspondendo em números absolutos a 33.882 óbitos. Nas faixas etárias nas quais as doenças pneumocócicas são mais incidentes, os coeficientes de mortalidade foram de 153 óbitos por 100.000 pessoas em menores de um ano, 42 em maiores de cinco anos e de 200 em maiores de 60 anos”.

As regiões Sudeste e Sul têm a maior proporção de óbitos por habitante, segundo dados do Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência da bactéria podem ser componentes celulares que atuem na sua aderência, colonização, entrada e sobrevivência nos pulmões, ou na sua habilidade de provocar uma resposta inflamatória³. Apesar do *S. pneumoniae* ter sido estudado há décadas, somente recentemente sabe-se um pouco mais sobre seus fatores de virulência, uma vez que já existem

algumas ferramentas (sistemas de manipulação genéticos) que permitem comprovar o envolvimento destes fatores na patogenicidade da bactéria. Embora o *S. pneumoniae* seja um patógeno humano, a administração intraperitoneal ou intranasal de elevadas doses de algumas cepas em camundongos os levam à morte, e o modelo em camundongo termina sendo amplamente usado para testar fatores de virulência ou eficiência de possíveis candidatos vacinais.

O pneumococo possui três camadas principais na sua superfície: a membrana plasmática, a parede celular e a cápsula polissacarídica³. A parede celular consiste de uma camada tripla de peptidoglicanas, que ancora o polissacarídeo capsular (PS) e proteínas (Figura 1).

Figura 1. Diagrama esquemático dos fatores de virulência de *Streptococcus pneumoniae* adaptado de Jedrzejak *et al.*, 2001²⁰.

1.3.1 Cápsula polissacarídica e parede celular

A cápsula polissacarídica consiste de polímeros de alta massa molar de oligossacarídeos de 2 a 8 monossacarídeos, cuja estrutura é diferente para cada sorotipo^{1, 19}. Muitos sorotipos contêm componentes ácidos (como ácido glutâmico ou grupos fosfato), ribitol ou arabinitol. Em alguns sorotipos, fosforilcolina faz parte do polissacarídeo capsular.

A cápsula polissacarídica é considerada o fator de virulência principal de pneumococo^{1, 3}. Pneumococos virulentos têm cápsulas anti-fagocíticas que evadem a fagocitose por macrófagos

alveolares e neutrófilos, complexando o componente C3b do sistema complemento, impedindo o contato entre o receptor do fagócito e a opsonina. Cepas contendo PS são pelo menos 105 vezes mais virulentas que as não encapsuladas e a dose letal é 50% menor. Cepas mutantes para PS demonstram que a virulência é determinada principalmente pelo tipo de PS. A estrutura química da cadeia polissacarídica, e em parte sua espessura, determinam a capacidade da cepa de sobreviver na corrente sanguínea e de causar a infecção invasiva. A elevada proteção obtida pela indução de anticorpos anti-PS atesta a importância do PS na sobrevivência do pneumococo. A sobrevivência de camundongos a uma dose letal de pneumococo correlaciona-se com o nível sérico de anticorpos anti-PS ¹⁹.

A parede celular é composta majoritariamente por peptidoglicanas de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmuramínico alternadas, interligadas por cadeias peptídicas. Já o PS da parede celular é um ácido teicóico complexo contendo fosforilcolina, que se liga à camada peptidoglicana através do ácido N-acetilmuramínico. Esta fosforilcolina é um sítio de reconhecimento da enzima N-acetilmuramínico-L-alanina amidase, envolvida em divisão celular, mas também chamada de autolisina porque induz lise do pneumococo em fase estacionária de crescimento. Outro componente importante é o ácido lipoteicóico, também conhecido como antígeno de Forssman, que é ancorado à membrana celular pela porção lipídica, e também contém fosforilcolina, sendo inibidor da autolisina¹.

Componentes da parede celular, como ácido teicóico e peptidoglicanas, contribuem para a estimulação da resposta inflamatória exacerbada ao pneumococo, pois ativam a via alternativa do complemento e a produção de IL-1 e TNF- α . Normalmente ocorre a formação de anticorpos contra os componentes da parede celular, mas estes não são protetores e, ao contrário, aumentam a inflamação, ligam-se à superfície bacteriana e ativam o complemento pela via clássica produzindo C5a, que atrai mais neutrófilos. Estes, no entanto, não auxiliam na fagocitose, porque seus receptores não alcançam o C3b ligado à superfície bacteriana. O resultado é um processo inflamatório exacerbado que causa um dano considerável ao tecido, sem diminuir a infecção bacteriana. Os danos provocados às células epiteliais dos vasos sanguíneos permitem à bactéria penetrar na corrente sanguínea e alcançar outros pontos do organismo. O dano ao tecido pulmonar provoca o rompimento do mecanismo de troca de gases e o paciente literalmente sufoca-se ^{1, 19}.

Pneumococos possuem uma proteína de superfície²¹, chamada PspA (*pneumococcal surface protein A*), que mostrou ser necessária para a virulência completa do pneumococo²⁶.

A molécula de PspA está dividida em três domínios (Figura 2). A porção N-terminal, consiste de aproximadamente 40% da molécula, seguida de uma sequência com estrutura rica em α -hélice enovelada, similar a muitas proteínas fibrilares de superfície de bactérias gram-positivas. Este é o domínio mais variável da proteína e é exposto na superfície da célula^{26, 27, 28}. A PspA apresenta variação da massa molar entre os diversos sorotipos de *S. pneumoniae*²⁹. No centro da molécula há uma região de aproximadamente 60-80 aminoácidos, rica em prolina e a parte C-terminal é composta de dez repetições de vinte aminoácidos^{26, 30, 31}, formando domínios de ligação à colina responsável pela ligação da PspA à superfície bacteriana³⁰; esta região se ancora a parede celular do pneumococo²⁰.

Embora as variantes de PspA apresentem alguma reação imunológica cruzada, elas são estrutural e antigenicamente variáveis^{22,28}. Estudos de mapeamento indicam que os principais

epítomos que apresentam proteção cruzada residem numa região de aproximadamente 100 aminoácidos da porção α -hélice (Região B em vermelho da Figura 2), adjacente à região rica em prolina²⁶.

Baseado na variabilidade genética da região B, as PspAs foram divididas em 6 clados que se agrupam em três famílias. Por definição, o grau de identidade entre os clados deve ser > 75% e entre as famílias, > 50% (Figura 3). As famílias 1 (clados 1 e 2) e 2 (clados 3, 4 e 5) representam aproximadamente 50% das cepas de pneumococos circulantes, cada uma. A família 3 (clado 6) compreende a aproximadamente 1% dos pneumococos identificados nos Estados Unidos²⁸. Segundo Brandileone³², esta proporção parece também se repetir no Brasil, pelo menos para as famílias 1 e 2.

Formatado: Cor da fonte: Automática

Formatado: Cor da fonte: Automática

Formatado: Cor da fonte: Automática

Figura 3. Classificação das PspA's em famílias e clados. Figura adaptada de Hollinshead et. al., Infec. Immun., 2000²⁸.

Experimentos de imunização passiva com anticorpos anti-PspA ou imunização ativa com PspA recombinante mostraram induzir proteção em camundongos a um desafio subsequente com pneumococos de diferentes sorotipos, indicando que a PspA pode ser altamente imunogênica³³. Em ensaio clínico de fase I, a PspA recombinante mostrou ser imunogênica como vacina em humanos, uma vez que gerou anticorpos que protegeram passivamente camundongos contra

infecções letais com cepas de *S. pneumoniae* contendo PspAs das famílias 1 e 2^{34, 35, 36}. Outros grupos também tem apontado para a importância de PspA para ser incluída numa possível vacina contra doenças pneumocócicas^{37, 38, 39, 40}. Resultados obtidos em nossos laboratórios mostraram uma possível alternativa do uso de rPspA, pela imunização com vacina de DNA expressando PspA (Miyaji, *et. al.*,^{41, 42, 43}). Outra alternativa é exibida por Oliveira *et. al.*⁴⁴, que mostra a expressão de PspA em *Lactobacillus casei*. Os resultados mostram que o *Lactobacillus* apresenta-se como um bom sistema de expressão de antígeno de *S. pneumoniae*, sistema que pode ser usado na formulação de uma possível vacina oral.

1.3.3 Antígeno de superfície de pneumococo A, PsaA

Outra proteína de superfície é a PsaA, antes denominada *Pneumococcal surface adhesin A* e hoje renomeada, *Pneumococcal surface antigen A*. A proteína apresenta uma massa molar de 37 kDa e está presente em *S. pneumoniae*, nos mais de 90 sorotipos conhecidos^{1,45}. Foi inicialmente considerada uma adesina, por homologia com adesinas de outras espécies de *Streptococcus*⁴⁶. Tanto PsaA, quanto outras adesinas de *Streptococcus* possuem uma sequência de reconhecimento de prolipoproteína LX₁X₂C (onde X₁ geralmente é A, S, V, Q ou T e X₂ é G ou A) na porção carboxila da sequência sinal, que pode sugerir que a porção amino-terminal esteja associada à membrana via uma cisteína amino-acil-glicerídica^{47,48,49}. Recentemente foi demonstrado que pneumococo requer suplementação por manganês e que o operon que codifica para PsaA contém um transportador de manganês^{50, 51}. A estrutura cristalina da PsaA revelou um sítio de ligação a zinco e esta foi caracterizada como uma proteína transportadora de metal ligada a membrana⁵². Portanto, a PsaA poderia ter um papel tanto na adesão como na captação de manganês para o pneumococo.

Estudos utilizando uma cepa mutante de *S. pneumoniae* com deleção do gene PsaA demonstraram que este antígeno é um fator de virulência de pneumococo; pneumococos PsaA-negativos são virtualmente avirulentos⁵³. A análise de restrição do gene *psaA* amplificado por PCR a partir do DNA, indicou baixa variedade genética nas diferentes cepas^{47, 49}. A análise de imunoblots com anticorpo monoclonal contra PsaA produz reação cruzada com 24 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Este anticorpo monoclonal reage positivamente por ELISA e imunofluorescência, sugerindo que esta proteína está exposta na superfície do streptococo; neste estudo, o anticorpo não reagiu com bactérias heterólogas testadas, as quais representam 19

gêneros e 34 espécies de organismos que podem causar doenças respiratórias⁴⁶. Ensaios de proteção em camundongos mostraram que a imunização com esta proteína protege contra desafio com uma cepa virulenta^{54, 55}. Recentemente, foi mostrado que a proteína PsaA recombinante obtida através de baculovírus foi imunogênica, induzindo 90% de proteção após desafio com *S. pneumoniae* da cepa 6B⁵⁶. Por mostrar características conservadas e imunogênicas, a PsaA tornou-se uma forte candidata a componente protéico de vacina contra *S. pneumoniae*^{47,49,18, 57}.

1.3.4 Pneumolisina

O pneumococo, para estabelecer uma infecção, tem que ultrapassar os mecanismos de “clearance” do trato respiratório superior e considera-se que a pneumolisina tenha um papel nesta propriedade. Pneumolisina é uma citotoxina ativada por tiol^{1,3,18}. É uma proteína citoplasmática de 52,8 kDa, relativamente conservada, liberada quando a bactéria é lisada pela ação da autolisina¹. Pneumolisina inibe o batimento ciliar, a atividade bactericida de neutrófilos (inibindo o “Burst” respiratório), a proliferação de linfócitos e a síntese de anticorpos. Pode aumentar o processo inflamatório pela ativação de complemento, pela ruptura do epitélio e pela estimulação da produção de citocinas (TNF e IL-1 β)¹. Mutantes deficientes em pneumolisina apresentaram virulência reduzida em camundongos. Imunização com pneumolisina geneticamente detoxificada, PdB, induziu proteção contra vários sorotipos de pneumococo⁵⁸.

1.3.5 Proteínas ligantes de colina, CbpA

Existe uma família de proteínas de superfície de pneumococos que se liga a colina e tem domínios homólogos à PspA, como PspC, CbpA e SpsA¹⁸. A SpsA demonstrou capacidade de ligação a IgA secretória (sIgA), mas não a IgA sérica. Mutantes de CbpA têm a capacidade de colonização da nasofaringe reduzida, embora sua virulência não seja alterada. Portanto, CbpA tem propriedades que podem ser importantes na patogênese de pneumococo: a interação da superfície bacteriana com o componente secretório e pode interferir com a proteção por sIgA, facilitando a aderência e colonização. Estudos de imunização com CbpA ainda não foram realizados, mas é possível que uma parte da proteção observada com PsaA seja pela reatividade cruzada com CbpA.

1.3.6 Outros fatores de virulência

Outro produto tóxico do pneumococo é o peróxido de hidrogênio³. Foi demonstrado que, em condições microaerófilas, a bactéria produz quantidades de peróxido de hidrogênio comparáveis a neutrófilos ativados, o que poderia contribuir para o dano produzido no tecido pulmonar. A lesão tissular não só fornece nutrientes à bactéria, como também produz um microambiente protegido de fagócitos e outras defesas do organismo.

O pneumococo teve seu genoma recentemente decifrado⁵⁹, o que impulsionou novas descobertas que vão desde fatores de virulência⁶⁰, proteínas, enzimas e rotas metabólicas antes desconhecidos, até fenômenos inéditos de comunicação entre as células, o que deve impulsionar a identificação de novos antígenos vacinais^{61, 62}.

1.4 VACINAS CONTRA *Streptococcus pneumoniae*

Na era pré-antibiótica, aproximadamente 1% dos adultos eram acometidos por pneumonia pneumocócica, com um índice de mortalidade de 30%³. A introdução de antibióticos β -lactâmicos, como penicilina, reduziu drasticamente a ocorrência de infecções por *S. pneumoniae*. Mesmo assim, morrem de pneumonia pneumocócica, mais de 1 milhão de crianças abaixo de 5 anos de idade por ano, em países em desenvolvimento. Até a década de 70, *S. pneumoniae* era uma das poucas bactérias que se mantinha sensível à penicilina, o que levou a considerarem a resistência a antibióticos um problema remoto. Atualmente existem isolados clínicos de cepas resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis e cepas multi-resistentes já foram caracterizadas⁶³.

Companhias farmacêuticas investem menos no desenvolvimento de novos antibióticos por ser um processo lento e custoso, podendo levar até 20 anos para um fármaco chegar ao mercado. Portanto, o ressurgimento de pneumonia pneumocócica incurável é uma perspectiva não muito distante, o que aumenta a importância de se ter uma vacina eficaz contra *S. pneumoniae*.

A primeira vacina a ser introduzida no sistema de imunização contra pneumonia foi constituída apenas de polissacarídeos (PS) das cápsulas de *S. pneumoniae* de 23 diferentes sorotipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, e 33F¹ devido à baixa reatividade cruzada induzida pelos polissacarídeos dos diferentes sorotipos. Nos EUA, a vacina 23-valente cobre 90% dos sorotipos prevalentes naquele país e na

Europa, porém menos que 70% dos sorotipos prevalentes na Ásia. Esta vacina é pobremente imunogênica em idosos (acima de sessenta anos) e não protege crianças abaixo de 4 anos de idade, que são os maiores grupos de risco ¹.

Devido à baixa imunogenicidade da vacina polissacarídica (23-valente) nos grupos de risco, sua substituição por vacinas conjugadas foi proposta pela Organização Mundial de Saúde. Um estudo realizado por Yu *et al* (2003)⁶⁴ detectou após a avaliação de alguns lotes da vacina pneumo-23 (23-valente), a contaminação por proteínas de superfície. Recentemente, foi licenciada para uso nos EUA, uma vacina produzida pela Wyeth contendo polissacarídeos de 7 sorotipos, conjugados com uma toxina diftérica mutada (CRM197). Esta vacina mostrou-se extremamente eficaz nos grupos de risco daquele país. No entanto, apresenta baixa reatividade cruzada com os demais sorotipos^{3,18}, levando a uma cobertura vacinal apenas contra os sorotipos incluídos. Esta vacina apresenta cobertura de 86% nos EUA, mas muito menor no Brasil (58-70%) ⁶⁵. Outras vacinas também estão sendo desenvolvidas, incluindo 9 e 11 polissacarídeos diferentes, conjugados a proteínas carreadoras como toxóide tetânico e/ou diftérico ou OMV (vesícula de membrana externa de *N.meningitidis*)⁶⁶, desenvolvidas por Smith-Kline, Aventis-Pasteur e Merck, respectivamente. Embora as vacinas conjugadas apresentem alta eficiência contra os sorotipos incluídos nelas, a abrangência destas restringe-se aos sorotipos utilizados. Além de apresentar mudança do espectro de prevalência dos sorotipos, estas representam elevado custo para o sistema de saúde, tornando-se inviáveis para ampla aplicação em países em desenvolvimento.

A utilização de antígenos protéicos tem sido considerada como uma alternativa para aumentar a cobertura vacinal a um menor custo. Algumas proteínas de pneumococos, como por exemplo, pneumolisina, autolisina, PspA e PsaA, estão sendo investigadas como possíveis componentes de vacinas^{47,49,67}. Estas proteínas foram testadas em diferentes modelos animais, representando diferentes aspectos de proteção (Tabela 1).

Tabela 1 - Ensaios com as proteínas candidatas a antígenos vacinais contra pneumococos em diferentes modelos animais.

Imunógeno	Bacteremia/Sepsis	Infecção Pulmonar	Colonização
PspA	++	++	+
Pneumolisina (PdB)	0 ou +	++	0
PsaA	0 ou ±	0 ou ±	++
PspC	+	n.d.	++
PspA + PdB	++ ou +++	+++	++
PspA + PsaA	++	++	+++

Brilles D.E. *et al.*/ Vaccine 2000 ³⁵. No experimento, 0, não apresenta proteção; ±, representa baixíssima proteção; o aumento de proteção é representado pelos sinais de +, quanto maior o número de sinal +, maior é a proteção.

A PsaA induz melhor proteção contra colonização e a PspA contra bacteremia. Estudos mais recentes tendem a confirmar que a combinação de PsaA com PspA pode levar a resultados mais eficientes, reforçando o possível papel desses antígenos como candidatas vacinais^{68,69}. Devido ao elevado potencial destes antígenos, esta tese irá desenvolver sistemas de expressão e purificação destes antígenos, para utilização como componentes de uma possível vacina pneumocócica.

1.5 SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *E. coli*.

A produção de proteínas recombinantes expressas em *E. coli* apresenta elevado potencial para produção de proteínas de interesse em saúde pública. A bactéria Gram-negativa, *E. coli*, é um dos hospedeiros mais atrativos pelo fato desta ser geneticamente bem caracterizada e devido a sua habilidade de se multiplicar rapidamente, podendo atingir altas densidades em substratos de baixo custo^{70,71}. Uma importante característica também, é que pode comportar diversos sistemas de expressão construídos e ser usada para a produção de proteínas recombinantes, cuja expressão pode ser induzida de forma simplificada.

1.5.1 Vetores de clonagem

Em geral, o gene de uma proteína heteróloga a ser expressa deverá ser inserido em um sistema capaz de amplificar a informação genética em centenas de cópias. Atualmente, existem diversos vetores usados na metodologia do DNA recombinante que apresentam características especiais que os tornam excelentes veículos de clonagem⁷³. Dentre estes vetores temos como exemplo o bacteriófago λ (fago λ), plasmídeos, cosmídeos e alguns vírus. A distinção entre bacteriófagos e plasmídeos nem sempre é muito clara. Plasmídeos são considerados replicons não-letais (para as suas células hospedeiras), enquanto bacteriófagos são replicons potencialmente letais para a bactéria⁷². O fago se comporta como um vírus da *E. coli* e precisa injetar seu material genético na bactéria hospedeira para sua multiplicação; após a entrada do genoma viral no hospedeiro, o fago pode entrar num ciclo lítico ou lisogênico, dependendo da natureza (se virulenta ou temperada) e do estado fisiológico da célula hospedeira⁷². Quanto aos plasmídeos, são elementos genéticos extra-cromossomais, que variam de 1 a 1000 kb e que se multiplicam independentemente do cromossomo bacteriano. Ao contrário dos bacteriófagos, que podem formar partículas virais que são estáveis fora da célula hospedeira, os plasmídeos não possuem uma forma extracelular⁷². Dentre os plasmídeos, grande parte é formada por moléculas de DNA dupla fita, contendo os elementos necessários para a sua replicação autônoma. São considerados replicons por serem capazes de se auto-replicar independentemente (possuem uma origem de replicação análoga à *oriC* cromossomal).

O número de cópias de um plasmídeo é determinado em última análise pela sua região *ori*, que regula a sua replicação. Esta regulação é necessária para que o plasmídeo não sature a célula com um número excessivo de cópias no caso de uma replicação acelerada, nem seja perdido em decorrência de um processo de replicação muito lento em relação a velocidade do ciclo celular do hospedeiro⁷². Os plasmídeos são classificados em plasmídeos de baixa cópia (1-10 por célula) e de alta cópia (podendo conter centenas deles por células). Os mecanismos de regulação da replicação utilizados por plasmídeos de alta cópia são bastante diferentes daqueles utilizados por plasmídeos de baixas cópias. Os plasmídeos de multicópias necessitam apenas de um mecanismo que iniba o início da replicação plasmidial quando o número de cópias por célula atinge um determinado nível, sendo, por isso, também chamados de plasmídeos relaxados⁷². Já os plasmídeos de baixo número de cópias, necessitam de um mecanismo regulador mais restritivo,

que permita apenas um ou poucos eventos de replicação a cada ciclo celular, e por isso são denominados de plasmídeos estringentes (ou rígidos) ⁷².

1.5.2 Vetores de expressão

Para a expressão de um determinado fragmento gênico de DNA, deve se ter em mente que o propósito será obter a proteína heteróloga. Para tanto, é necessário respeitar o sinal de tradução de genes procarióticos (sinal Shine-Dalgarno), e o DNA deve ser clonado de maneira que sua fase de leitura correta fique em fase com o ATG iniciador⁷³.

Um plasmídeo para se constituir em um vetor de expressão deve apresentar as seguintes características:

- **origem de replicação:** a quantidade de produto de um gene produzida por uma célula pode ser aumentada, incrementando-se o número de cópias do plasmídeo. Tem-se como exemplos bastante usados, os vetores de expressão da série pET e pQE (ambos com replicon derivados de pBR322), que apresentam de 15-20 cópias por célula, enquanto o pRSET e pAE (ambos com replicon derivado de pUC), podem apresentar de 500-700 cópias por célula.
- **marcador para seleção:** gene que confere resistência a antibióticos, como ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina.
- **um promotor para transcrição:** como os vetores de expressão são normalmente projetados no sentido de produzir a proteína em abundância, o DNA codificante para uma dada proteína deve ser colocado sob o comando de um promotor forte e regulável. Um sistema eficiente de expressão deverá manter os níveis basais de expressão do gene insignificantes até a indução. Alguns exemplos de sistema repressor e os respectivos indutores são: o repressor lacI, induzido por análogos de lactose, como por exemplo, isopropil- β -D- tiogalactosídeo (IPTG), que é sintético e não degradável ou o repressor cIts857, induzido por choque térmico.
- **um sítio de múltipla clonagem,** para facilitar a inserção do gene de interesse no sítio e na orientação correta.
- **seqüências para controle da tradução,** como por ex., um sítio de ligação ao ribossomo para a iniciação da tradução (Shine-Dalgarno) e uma seqüência ATG. Um sinal de

terminação da tradução (códon de terminação) também deve estar presente no vetor ou no inserto a ser clonado.

No sistema baseado no operon lac, o DNA (seqüência de interesse) pode ser clonado em fago ou em plasmídeo, contendo o *lacI* (repressor), *lacP* (promotor) e/ou *lacZ* (gene estrutural transcrito para mRNA da β -galactosidase), Figura 4.

Figura 4. Esquema ilustrativo do funcionamento do operon lac ⁷³. (a) Na ausência de indutor. (b) Na presença de indutor.

Uma vez que a seqüência de DNA é ligada ao vetor de expressão, esta molécula híbrida será introduzida na célula hospedeira, neste caso *E. coli*, por um processo denominado transformação, para que o vetor possa se replicar e consequentemente amplificar o número de cópias do plasmídeo. A indução da transcrição é obtida pela adição de um análogo de lactose, IPTG, o qual se associa ao repressor inativando-o e deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase, consequentemente ocorrendo a transcrição do gene (Esquema 1) ⁷³.

Os vetores mais usados em escala de bancada nos laboratórios são os induzidos por IPTG, entretanto, este não é recomendado para uso em escala de produção devido ao seu alto custo e

toxicidade, com isso surge a necessidade de novos vetores e indutores, além das comparações entre eles⁷⁴. Alternativamente, pode-se utilizar para a indução, a própria lactose, onde esta pode apresentar um duplo papel, ser usada tanto como um indutor quanto fonte de energia^{75,76}. Porém, o uso deste açúcar em processos industriais pode apresentar obstáculos, já que às vezes resulta em baixo rendimento volumétrico e dificuldades no controle do processo^{77,78}. Utilizando-se cepas apropriadas e com os mesmos tipos de vetores citados, pode se realizar ainda, a indução por NaCl. Outra forma de indução também utilizada é por temperatura, onde o plasmídeo contém uma sequência cujo produto repressor é inativado por calor⁷⁹.

Neste projeto usaremos vetores de alta e baixa cópia contendo o promotor T7, com regulação do sistema, baseado no operon lac.

1.6 PRINCÍPIOS DE CULTIVO PARA AMPLIAÇÃO DE ESCALA

No Brasil a maioria das vacinas é fornecida e aplicada pelos serviços de Saúde Pública a toda a população, especialmente na população infantil. Esta política de vacinação em massa tem obtido resultados excepcionais, como a erradicação da varíola, redução drástica da poliomielite, etc. Para que as campanhas de vacinação em massa sejam viáveis em países em desenvolvimento, é necessário que o custo de produção por dose de vacina, seja muito baixo.

Alguns grupos no Brasil estão bem adiantados em pesquisas envolvendo biotecnologia em processos de larga escala. O Instituto Butantan, por exemplo, produz a vacina recombinante de Hepatite B a partir de sua expressão em levedura e a proteína é purificada por cromatografia. Quanto à produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, é um processo em geral considerado de baixo custo, mas o escalonamento das condições de cultivo e purificação necessitam ser otimizados, levando a um processo que seja reprodutível, tanto no rendimento como na sua qualidade, e com o menor custo possível. No Brasil a tecnologia de produção de proteína recombinante foi desenvolvida para a produção em larga escala, de insulina humana recombinante, o processo foi desenvolvido por pesquisadores do Departamento de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) em parceria com a empresa Bioquímica do Brasil (Biobrás). Os pesquisadores modificaram geneticamente a bactéria *Escherichia coli* para torná-la capaz de sintetizar o hormônio. Patenteada em 2000, a nova técnica consiste em introduzir na bactéria o gene da pró-insulina humana, precursor da insulina ativa, de forma que a bactéria passe a produzir o hormônio em grandes quantidades. "Outra vantagem é que essa tecnologia também

pode ser aplicada à produção de outras proteínas terapêuticas, como a do hormônio do crescimento^{80,81}. A produção de hormônio de crescimento a partir da expressão em *E. coli* também está em desenvolvimento no Brasil. O hormônio de crescimento humano recombinante (rec-hGH) foi obtido modificando-se o material genético da *E. coli*, com a introdução de um plasmídeo que contém a seqüência codificadora da molécula do hormônio natural, juntamente com aquela do peptídeo sinalizador. Uma protease bacteriana específica cliva esse peptídeo, permitindo sua secreção no espaço periplásmico bacteriano onde a molécula adquire a correta estrutura tridimensional. Essa localização, externa ao citoplasma, permite a extração do hormônio mediante "choque osmótico" (incubação em meio hipertônico seguida de incubação em meio hipotônico), sem ruptura da célula. Após a extração e várias etapas cromatográficas, o produto é obtido com alta pureza⁸². A produção do hormônio brasileiro é resultado das pesquisas da empresa Genosys Biotecnológica, com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)⁸².

Um dos objetivos principais das pesquisas em engenharia bioquímica é maximizar a produtividade volumétrica (g/L/h)^{83,84} ou seja, a quantidade do produto por unidade de volume e por unidade de tempo⁸⁵. A produtividade volumétrica total é proporcional à produtividade específica, (g produto/g biomassa/h) e a concentração final da biomassa, (g biomassa/L). A produtividade específica depende da cepa, modificações genéticas, promotores, indutores, etc; a concentração da biomassa depende das condições do cultivo. Atualmente é possível frequentemente separar uma fase de crescimento celular de uma fase de síntese do produto. Cultivo em alta densidade é uma das técnicas mais efetivas para obter alta produtividade volumétrica. Além disso, podem-se obter outras vantagens como, o menor consumo de meios de cultura, facilitar os processos de purificação posterior, reduzir o consumo de água e energia, a produção de resíduos e os custos na compra de equipamentos, etc,⁸⁴.

Altas densidades celulares de *E. coli* não recombinante de 100 a 190 g de peso seco por litro foram obtidos em cultivos descontínuos alimentados; cultivos com *E. coli* recombinante ficam ao redor de 100 g de peso seco/L, chegando a alguns casos a 145 g de peso seco/L^{83,84}. A produtividade vai depender do nível de expressão da proteína recombinante a partir do vetor de expressão utilizado. A estabilidade do plasmídeo será essencial para se obter um cultivo de alta densidade.

As tendências atuais para a obtenção de proteínas recombinantes e outros produtos em culturas de alta densidade visam evitar dois problemas: 1) inibição por substrato: o crescimento de *E. coli* é inibido com glicose superior a 50 g/L, amônia 3 g/L, ferro 1,15 g/L, etc,⁸⁴, e 2) inibição por subprodutos metabólicos, por exemplo acetato, que é inibidor do crescimento de *E. coli*, e outros subprodutos como propionato, lactato, etanol, etc, também podem ser inibitórios dependendo da concentração destes no meio ou ainda das espécies de microrganismos^{86,87}.

Os cultivos são realizados em meios definidos ou semi-definidos, com concentrações dos substratos inferiores às inibitórias e especialmente controlando a concentração da fonte de carbono⁸⁸. Os cultivos são, em geral, descontínuos alimentados, tendo diversas estratégias na fase de alimentação. No caso de *E. coli* recombinante há três fases: 1) descontínua, até que a fonte de carbono seja consumida; 2) alimentação de fonte de carbono de forma controlada para evitar o acúmulo de acetato; 3) indução da síntese da proteína recombinante (stress metabólico)⁸⁹.

Neste sentido investigaremos, diferentes meios de cultura, condições de cultivo e indutores alternativos, para atingir alta densidade celular de *E. coli*, com otimização da expressão das proteínas recombinantes.

1.7 PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO

Após o cultivo para obtenção da biomassa contendo a proteína recombinante, iniciam-se os processos de purificação. O “produto bruto” é processado até obter-se o grau de pureza requerido para o seu uso. Os princípios dos processos de purificação em escala de bancada e escala piloto ou industrial são semelhantes, mas a produção em escala focaliza-se no aumento da produtividade e redução de custo. As estratégias dos processos de purificação baseiam-se em diferenças nas propriedades físico-químicas do produto de interesse e dos contaminantes. Essas diferenças podem ser na sua localização intra ou extracelular, massa molar, carga elétrica, hidrofobicidade, solubilidade, afinidade, etc. Os processos para purificação de proteínas intracelulares e peptídeos são muito dependentes das propriedades da molécula e de sua concentração dentro da célula⁹⁰. É recomendável que a purificação das proteínas para uso farmacêutico contenha ao menos duas etapas baseadas em propriedades diferentes e sempre se tendo em mente a possibilidade do método usado ser facilmente amplificável para uma escala industrial^{91,92}. Para a purificação das proteínas devem-se seguir linhas gerais de purificação

industrial. Todas as resinas e aparelhos devem apresentar estabilidade e resistência aos processos de limpeza e sanitização *in situ* (CIP-*cleaning in place* e SIP-*sanitization in place*). As linhas gerais do processo de purificação são:

- a) Separação das células do meio de cultura por centrifugação convencional ou contínua, microfiltração tangencial ou convencional^{93, 94}.
- b) Extração das proteínas intracelulares por desintegração das bactérias por homogeneizador contínuo de alta pressão ou lise química^{95, 96, 97}.
- c) Clarificação do homogenato, eliminação de material particulado e insolúvel, por centrifugação ou filtração convencional/ tangencial ou cromatografias de leito fluidizado^{93, 94}.
- d) Purificação primária: nesta etapa elimina-se a maior quantidade de contaminantes e aproveitando-se diferenças marcantes entre suas propriedades físico-químicas. Precipitações e cromatografia(s) de afinidade, de adsorção por troca iônica, hidrofóbicas, etc são as mais usadas^{98, 99}.
- e) Purificação de alta resolução, separação de contaminantes com propriedades físico-químicas muito semelhantes às do produto. As técnicas normalmente utilizadas são precipitações seletivas, cromatografia de filtração em gel, cromatografia de afinidade, etc^{101, 105}.
- f) Acondicionamento por cromatografia de filtração em gel, diafiltração, concentração, esterilização, etc^{100, 101, 105}.

Na ampliação de escala, além destes princípios, busca-se a maximização da recuperação e minimização dos custos. Além da pureza das proteínas, os produtos apresentam requerimentos em relação à quantidade contaminante de ácidos nucleicos, ausência de pirógenos, limites relativos à coloração, ausência de atividades enzimáticas nocivas ao produto e ao seu uso (por ex: proteases e atividade hemolítica), etc. O custo da purificação de um produto biotecnológico varia de 20 a 80% do custo total^{100, 101}.

1.7.1 Purificação por cromatografia de afinidade

Esta técnica de separação explora a especificidade de ligação das biomoléculas, em um processo análogo a sua função biológica. O ligante deve estar ligado a um suporte inerte de tal maneira que suas propriedades não sejam seriamente afetadas; para isso são utilizados “braços” espaçadores. A eluição pode ser realizada de maneira específica, com uma molécula que tenha

mais afinidade pelo ligante que a substância de interesse, ou de maneira inespecífica, por mudança do pH ou aumento da força iônica¹⁰².

Os ligantes podem ser divididos em 3 grupos de acordo com seu uso: 1) específicos para determinadas proteínas, por exemplo: anticorpos monoclonais, proteína A, inibidores enzimáticos; 2) gerais ou grupos específicos, tais como íons metálicos imobilizados, que ligam proteínas ricas em histidina; 3) artificiais, como os corantes têxteis, que ligam principalmente proteínas que têm nucleotídeos como cofatores (Tabela 2)¹⁰³.

Tabela 2 - Exemplos de ligantes para cromatografia de afinidade

Ligantes	Especificidade
Específicos	
Anticorpos monoclonais	Antígeno
Proteína A	Região Fc das IgGs
Heparina	Fatores de crescimento
Grupo-específicos	
Arginina	Proteases
Metal quelado	Histidina, triptofano e cisteína
Artificiais	
Cibacron Blue	Enzimas com cofatores com NAD e NADP
Procion red	Enzimas com cofatores com NAD e NADP

A cromatografia de afinidade a íon metálico imobilizado (IMAC) explora a afinidade das moléculas em solução por íons metálicos quelatados. O princípio do IMAC baseia-se no fato de que os metais de transição podem coordenar com alguns aminoácidos tais como histidina, cisteína e triptofano, através dos grupos doadores de elétrons nas cadeias laterais desses aminoácidos¹⁰⁴. A utilização destas interações para fins cromatográficos requer que o íon metálico seja imobilizado num suporte insolúvel. Esta imobilização pode ser efetuada ligando-se um grupo quelante à matriz cromatográfica. Existem vários agentes quelantes usados no IMAC, sendo o ácido iminodiacético (IDA) o mais utilizado¹⁰⁴. Este composto pode ser acoplado a várias matrizes como, por exemplo, a Sepharose 6B, Sepharose 4B ou Sephadex G100, através de um braço espaçador hidrófilo. O braço espaçador assegura que o metal quelante esteja totalmente acessível para todos os centros de ligação disponíveis numa proteína¹⁰⁴. Como os metais poderão coordenar com 4 a 6 ligantes, os centros de coordenação restantes estarão ocupados com moléculas de água ou íons de soluções tampão que podem ser removidos ou desalojados por

grupos funcionais apropriados da proteína¹⁰⁴. As histidinas presentes nos aminoácidos de muitas proteínas formam complexos com os íons de metais de transição, como por exemplo, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , etc. A resina de Sepharose quelante, contendo os íons metálicos imobilizados, irá reter seletivamente proteínas com cauda de histidinas expostas (Catálogos de purificação de proteínas da Qiagen e da Invitrogen Co). A força da ligação é afetada pelo pH, força iônica do tampão, e pelo íon metálico selecionado.

A purificação de proteínas heterólogas expressas em fusão com cauda de histidina baseia-se na sua afinidade por metais bivalentes (ex: Ni^{+2}), imobilizados na resina. Esta é uma técnica simples, de baixo custo e muito útil na purificação de proteínas recombinantes.

1.7.2 Purificação por cromatografia de troca iônica

Na cromatografia de troca iônica, moléculas contendo cargas ligam-se de forma reversível a grupos trocadores de cargas opostas, que se apresentam imobilizados na matriz. Os trocadores podem ser aniônicos, que trocam ânions, por isso são positivamente carregados, ou catiônicos, negativamente carregados. Estes carregadores podem ser ainda, fortes ou fracos (Tabela 3). Trocadores fracos são aqueles que não mantêm suas cargas a valores extremos de pH, enquanto que os trocadores fortes as mantêm¹⁰⁵. As matrizes em que o grupo trocador pode ser imobilizado são celulose, agarose ou dextrana, para cromatografia de proteína¹⁰².

Tabela 3 - Grupos funcionais mais usados em cromatografia de troca iônica

Trocadores aniônicos	Grupo funcional	Força
Dietilaminoetil (DEAE)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	fraco
Aminoetil quaternário (QAE)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	forte
Amônio quaternário (Q)	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	forte
Trocadores catiônicos	Grupo Funcional	Força
Carboximetil (CM)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$	fraco
Sulfopropil (SP)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	forte
Metil sulfonato (S)	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	forte

Biomoléculas e outros polieletrólitos (polímeros poli-iônicos) que levam ambas as cargas positivas e negativas podem ligar ou trocar ânions ou cátions dependendo da carga líquida deles. A ligação de uma determinada proteína à matriz vai depender da presença de íons presentes na superfície desta, que se associam com as cargas imobilizadas na resina. Regiões de troca de íons na proteína, o pH e forças iônicas das soluções influenciam as cargas líquidas das proteínas¹⁰⁶. Uma vez que as biomoléculas possuem carga com sinal e densidade dependentes do pH, estas propriedades são aproveitadas para realização da cromatografia de troca iônica. A força e a seletividade da ligação são controladas pelo pH e força iônica inicial e as substâncias são eluídas (dessorvidas) seletivamente por aumento da força iônica ou mudança do pH¹⁰³.

As proteínas, para serem separadas, são solubilizadas em tampão de equilíbrio, com pH e concentração de sal apropriados, e então aplicados à resina na coluna contendo os íons trocadores. Quando a coluna é lavada com os tampões adequados, as proteínas com afinidades relativamente baixas e os íons trocadores movem-se através da coluna, permanecendo somente as proteínas com maior afinidade por esta. O efluente da coluna é coletado numa série de frações. As proteínas ligadas aos íons trocadores podem ser eluídas com a aplicação de um tampão, chamado de eluente, que apresenta uma alta concentração de sal ou um pH que reduz a afinidade com que a proteína liga-se à matriz¹⁰⁶. As frações eluídas podem, então, ser utilizadas para estudos da proteína de interesse.

A concentração de proteínas eluentes da coluna é geralmente monitorada por espectroscopia de absorbância. As medidas são freqüentemente feitas com comprimento de onda próximo a 280 nm, região onde muitas proteínas absorvem luz ultravioleta. Esta absorbância depende da quantidade de resíduos aromáticos e de outros grupos que absorvem luz nesta região do espectro. Independentemente das proteínas recombinantes serem usadas diretamente como vacinas ou se será ainda necessário realizar outros passos, os componentes iniciais devem apresentar uma alta pureza e serem produzidos a um custo mínimo.

Foi proposto neste trabalho a purificação das proteínas de pneumococo expressas em *E. coli*, por processo baseado em cromatografia de afinidade em resina quelante de níquel, uma vez que estas são expressas em fusão com cauda de histidina, seguida por cromatografia de troca iônica.

.....

2. OBJETIVOS

Dentro da proposta de se investigar abordagens alternativas para o desenvolvimento de vacinas contra pneumococos, vacinas que apresentem maior cobertura e menor custo, propusemos: investigar a expressão e purificação das proteínas de superfície de pneumococo, PsaA e PspA.

São objetivos específicos:

- i) subclonar o gene *psaA* e o gene dos fragmentos de *pspA* dos clados 1 e 3 de *Streptococcus pneumoniae*, em vetores de expressão em *E. coli*;
- ii) expressar os genes em *E. coli* BL21(DE3) e purificar as proteínas recombinantes rPsaA, rFPspA1 e a rFPspA3 em escala de bancada;
- iii) caracterizar de forma preliminar a imunogenicidade e reatividade dos anticorpos induzidos contra as proteínas recombinantes;
- iv) avaliar a estabilidade das cepas de *E. coli* transformadas com diferentes vetores de expressão, visando o escalonamento da produção das proteínas heterólogas.
- v) avaliar diferentes meios de cultivo e indutores em preparação para iniciar os estudos de cultivos de alta densidade de *E. coli*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Foram utilizadas enzimas de restrição e de modificação, *Bam* HI; *Hind* III; *Eco* RI; *Kpn* I; *Xho* I; *Nde* I e *Eco* RI, T4 DNA polimerase e Taq polimerase da Amersham Pharmacia Biotech ou Invitrogen. Marcadores de massa molar utilizados para DNA: λ DNA-*Hind* III Digest (Amersham Pharmacia Biotech) e para proteínas: Mid-Range Protein Molecular Weight Markers (Promega), Low Range (Low Molecular Weight-Pre-Stained (Bio-Rad)), Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad).

Os métodos descritos nesta seção foram realizados basicamente segundo Sambrook *et al.* (1989)¹⁰⁷. Por estarmos trabalhando com organismos geneticamente modificados (OGM) e as proteínas clonadas serem oriundas de organismos patogênicos classe II, foram seguidas as normas de biosegurança da CNTBio para OGM classe II. O Centro de Biotecnologia tem o certificado de qualidade em biosegurança, CQB 0039/98.

3.2 VETORES DE EXPRESSÃO EM *E. coli*

3.2.1 Vetor pAE

O plasmídeo pAE de 2800 pb que é um derivado do pRSET-A da Invitrogen, foi construído pelo Dr. Celso R. Ramos, no laboratório do Dr. Paulo Lee Ho^{108, 109}, Instituto Butantan. Este vetor contém o promotor T7, sítio de ligação ao ribossomo (RBS), códon ATG de início de tradução, sequência que codifica para 6 histidinas, sequência de terminação de transcrição, T7 terminal e marcador de resistência a ampicilina (Figura 5). Os sítios de clonagem foram construídos para permitir a fusão das proteínas com uma cauda de 6 histidinas, para utilização em purificação por cromatográfica de afinidade a metal¹¹⁰. O plasmídeo contém origem de replicação de pRSETA, que é de alta cópia. O vetor pAE foi desenhado para a obtenção de alto nível de expressão de proteínas recombinantes e tem sido bastante utilizado em nossos laboratórios, permitindo a expressão e a purificação de diversas proteínas recombinantes.

O pAE permite também, com o uso de um hospedeiro apropriado, a indução por cloreto de sódio em alta concentração.

Figura 5. Vetor de expressão em *E. coli*, pAE contendo o gene* da proteína recombinante. O vetor pAE sem o gene* possui 2800 pb. Promotor (P_{T7}), cauda de histidina (6xHis), Terminador ($T7_{term}$), marcador de resistência a ampicilina (AmpR), Origem de replicação do plasmídeo ColE1 (ColE1), Origem de replicação do fago F1 (F1 ori).

3.2.2 Vetor pET-37b(+)

Vários vetores encontram-se disponíveis no mercado para expressão de proteínas recombinantes com ou sem fragmentos de fusão em *E. coli*. Dentre eles, existem os vetores da série pET (plasmid for expression by T7 RNA polimerase), cuja expressão está sob o controle do promotor de transcrição $\Phi 10$ e dos sinais de iniciação de tradução *s10* da proteína do gene 10 (a principal proteína do capsídeo) do bacteriófago T7. A grande vantagem deste vetor é que ele é transcrito pela T7 RNA polimerase, a qual é muito seletiva e ativa, sendo capaz de alongar cadeias de RNA aproximadamente 5 vezes mais rápido que a RNA polimerase de *E. coli*. Alguns vetores da série pET apresentam o promotor T7-lac, colocando a expressão da proteína sob o controle do repressor lac e assim, reduzindo o “background” de expressão da proteína alvo na ausência do agente indutor (um exemplo é o vetor pET-37b(+)).

O plasmídeo pET-37b(+) é um vetor de expressão em *E. coli* produzido pela Novagen que pode ser induzido por IPTG ou lactose. Contém o promotor T7, sítio de ligação ao ribossomo,

(Figura 6).

Figura 6. Vetor de expressão em *E. coli*, pET-37b(+), Novagen. Este vetor possui 5932 pb, promotor (P₁₇), cauda de histidina (6xHis), Terminador (T_{7term}), marcador de resistência a kanamicina (KanR), Origem de replicação do plasmídeo pBR322, Origem de replicação do fago F1 (F1 ori). Sequência que codifica para uma proteína de ligação a celulose (CBD) e repressor lacI (lacI).

3.3 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO DE PsaA e PspA EM *E. coli*

3.3.1 Construções baseadas em pAE

O gene *psaA* havia sido amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *S. pneumoniae* de cepas sorotipo 1 e 6B, e clonado no vetor pET32a(+) da QIAGEN, pela Dra. Rocilda Schenckman do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. Os genes *psaA* (930 pb) dos dois sorotipos 1 e 6B foram seqüenciados em seqüenciador automático (ABI-Pelkin Elmer), mostrando-se idênticos à seqüência depositada no banco de dados Gen Bank. O gene *psaA*, sem a seqüência sinal, foi amplificado por PCR a partir do vetor de expressão pET-32a-*psaA* previamente construído, e foi inserido no vetor pAE, gerando pAE-*psaA*, Figura 5A.

As cepas de *S. pneumoniae* utilizadas para obtenção dos genes *pspA* foram isoladas e cedidas pela Dra. Maria Cristina Brandileone do Instituto Adolfo Lutz¹⁴. Os fragmentos de *pspA* pertencentes aos clados 1 e 3 (*fpspA1* e *fpspA3*) foram amplificados por PCR com oligonucleotídeos específicos, classificados após seqüenciamento e clonados no vetor pTARGET (vetor de expressão em mamíferos, Promega) pela Dra. Eliane N. Miyaji⁴². O gene *pspA* proveniente da cepa 435/96 (sorotipo 1) foi classificado como sendo da família 1 e do clado 1. O gene da cepa 259/98 (sorotipo 14) foi classificado na família 2 e clado 3. Os genes (fragmentos) amplificados iniciam-se pela sua porção N-terminal e terminam na região rica em prolinas.

Os fragmentos de *pspA* dos clados 1 e 3, aqui denominados de *fpspA1* e *fpspA3*, de 1092 e 1119 pb, respectivamente, que se encontravam no vetor pTARGET foram removidos por reações de restrição com as enzimas específicas *Xho I* e *Kpn I*. Estes fragmentos foram purificados a partir de gel de agarose 1%, com o kit "Concert™" (Life Technologies). Os fragmentos *fpspA1* e *fpspA3* purificados, foram inseridos no vetor de expressão pAE, (ambos, previamente digeridos com as enzimas *Xho I* e *Kpn I*) através de reação de T4-ligase, de acordo com as especificações do fabricante, gerando as construções pAE-*fpspA1* e pAE-*fpspA3* (Figura 7). As proteínas expressas a partir destas construções serão chamadas de rFpspA1 e rFPspA3, respectivamente.

Figura 7. Vetores de expressão em *E. coli*, pAE contendo os genes das proteínas recombinantes. **A:** pAE contendo o gene *psaA* (930 pb); **B:** pAE contendo o fragmento do gene *pspA*, proveniente do clado 1 (*fpspA1*) de 1092 pb; **C:** pAE contendo o fragmento do gene *pspA* de 1119 pb, proveniente do clado 3 (*fpspA3*).

3.3.2 Construção de pET-fpspA1

O vetor pAE-fpspA1 foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*, liberando o fragmento de *pspA* do clado 1, *fpspA1* (1119 pb). Este fragmento foi purificado a partir de um gel de agarose 1%, utilizando-se o kit “ConcertTM” (Life Technologies). O pET-37b(+) de 5932 pb foi digerido com as mesmas enzimas eliminando a região que contém o CBD, S-tag, sítio do Factor Xa e sítio de trombina (aproximadamente 660 pb). O vetor linearizado (5269 pb) foi purificado e o *fpspA1* reclonado entre *NdeI* e *EcoRI* através de reação com T4-ligase. *E. coli* DH₅α competente foi transformada com o plasmídeo pET-fpspA1, e após a amplificação, o plasmídeo foi purificado e estocado a -20°C; a clonagem foi confirmada por análise de restrição. Nesta construção os sítios CBD, poli His, S-tag, factor Xa e trombina foram eliminados. O fragmento de *fpspA1* contém as 6 histidinas (6 His) na região amino terminal provenientes da construção em pAE (Figura 8).

Figura 8. Construção do vetor de expressão de *E. coli*, pET-fpspA1. O fragmento fpspA1 de 1119 pb (região em vermelho) proveniente do clado 1 que estava clonado em pAE, foi digerido com as enzimas de restrição *EcoR I* e *Nde I* e reclonado em pET entre os sítios de *Nde I* e de *EcoR I*.

3.4 LINHAGENS *E. coli* E DE *S. pneumoniae* UTILIZADAS

A cepa *E. coli* DH₅α foi utilizada para construção dos plasmídeos e a cepa de *E. coli* BL21(DE3) para expressão das proteínas recombinantes. As transformações foram feitas de acordo com HANAHAN¹¹¹.

As cepas de *S. pneumoniae*, 435/96 (sorotipo 1), classificada como família 1 e clado 1 e a cepa 259/98 (sorotipo 14), família 2, clado 3, foram cedidas pela Dra. Maria Cristina Brandileone¹⁰.

3.5 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* DH₅α, AMPLIFICAÇÃO E PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

A competência das bactérias *E. coli* DH₅α e BL21-DE3 foi realizada segundo descrito por HANAHAN (1983)¹¹¹. Células de *E. coli* DH₅α ou de *E. coli* BL21-DE3 competentes foram transformadas com os vetores de expressão por choque térmico, como descrito por SAMBROOK *et al*, 1989¹⁰⁷. O teste de viabilidade durante o cultivo e após o congelamento foi realizado em meios de cultivo rico, LB/agar ou 2YT/agar contendo ampicilina (100 µg/mL) ou kanamicina (20 µg/mL). A composição dos meios (2YT¹⁰⁷ e LB¹⁰⁷) será mostrada no ANEXO 1, Tabelas 10 e 11.

Colônias *E. coli* DH₅α transformadas foram cultivadas em meio líquido a 37 °C sob agitação por aproximadamente 12 h. O cultivo foi centrifugado a 8000 g e o precipitado, utilizado para a purificação dos plasmídeos por mini-preparações de DNA plasmidial utilizando-se Kit Concert (Life Technologies).

3.6 CULTIVO DE *E. coli* BL21-DE3 E INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ESCALA DE BANCADA

Colônias de *E. coli* BL21-DE3 resistentes a ampicilina ou kanamicina, transformadas com os vetores de expressão dos genes de interesse, foram semeadas em 5 ou 20 mL de meio de cultura líquido, m (2YT/Amp ou 2YT/Kan) em erlenmeyer de 50 mL e incubadas durante uma noite a 37° C sob agitação em *shaker* (Incubador Shaker-SERIES 25, New Brunswick Scientific Co.,Inc.). Este cultivo foi utilizado como inóculo (DO_{600 nm} = 0,001) em 200 mL de meio líquido

2YT (com ou sem antibiótico) em um erlenmeyer de 1 L, incubado sob agitação a 37° C. Quando a densidade óptica atingiu sua fase exponencial ($DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,6 e 0,8) foi realizada a indução por 3 h com Isopropil-tio- β -D-galactosídeo (IPTG 1 mM). Amostras controle foram feitas com o cultivo de células transformadas com o vetor contendo ou não os insertos. Depois da indução, a cultura (5 ou 200 mL), foi dividida em duas frações de 2,5 ou 100 mL, respectivamente e centrifugadas a 12000 g por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado foi estocado a -20 °C.

3.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E SOLUBILIDADE

Para análise de expressão das proteínas recombinantes, uma alíquota de 1 mL de cada cultura de *E. coli* BL21-DE3 transformada com os vetores de expressão, foi colhida separadamente, antes e depois da indução e centrifugada a 12000 g por 3 min para posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, *SDS-PAGE* (ver 3.7.1). O precipitado das amostras dos cultivos não induzidos foi lisado com tampão Tris 25 mM, pH 8, contendo SDS e β -mercaptoetanol e fervido em banho maria por 5 min¹⁰⁷ e submetido a *SDS-PAGE*. O mesmo procedimento foi efetuado com as amostras dos cultivos induzidos, e posteriormente os extratos (dos cultivos não induzidos e induzidos) foram também analisados por *Western Blot* (ver 3.7.2).

Uma amostra de 1 mL precipitada do cultivo de *E. coli* BL21-DE3 transformada com o vetor de expressão foi ressuspensa em 2 mL de tampão Tris 25 mM, pH 8, sonificada e centrifugada a 12000 g por 3 min; o sobrenadante e o precipitado foram guardados a 4 °C, para análise posterior. O precipitado do restante do cultivo foi tratado com uréia 8 M, sendo novamente centrifugado nas mesmas condições descritas. O sobrenadante inicial e o sobrenadante do precipitado com uréia, foram submetidos à incubação com resina de Ni^{++} -Sephrose (0,5 mL) e eluídos com tampão Tris 50 mM e imidazol 500 mM. Todas as frações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e por *Western Blot*.

A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (kit Bio Rad) e por medidas de absorção a 280 nm; $A_{280\text{ nm}}: 1DO = 1\text{ mg/mL}$ ¹¹², em espectrofotômetro UV/Visível (Ultrospec 2000 – Amersham Pharmacia Biotech).

3.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas do extrato total de *E. coli* recombinante foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE (12%) e os géis, corados com azul de Comassie¹⁰⁷. A intensidade das bandas foi analisada por densitometria, em Scanner JX-330 (Sharp) com processador de imagem “Image Master Software” (Amersham Pharmacia Biotech).

3.7.2 Western Blot

Amostras dos extratos protéicos foram analisadas por SDS-PAGE. As proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Protran; Schleicher & Schuell) pelo método semi-seco através de protocolo adaptado do método descrito por SAMBROOK, *et al* (1989)¹⁰⁷. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado, molico (5%), durante uma noite a 4 °C e em seguida, incubadas por 2 h a temperatura ambiente com anticorpo anti-rPsaA, anti-rFPspA1 ou anti-rFPspA3 (diluição 1:1000 em leite desnatado, molico, 5%). A seguir, as membranas foram lavadas com tampão TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; Tween 20, 0,5 g/L), 3 lavagens de 10 min. Em seguida as membranas foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), também em leite desnatado, molico 5% (a diluição foi de 1:10000) e novamente lavadas nas condições acima. A reação foi detectada utilizando o “kit” ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

O anticorpo anti-PsaA foi produzido no nosso laboratório, em camundongos inoculados com PsaA recombinante (rPsaA) obtida de *E. coli* transformada com o vetor pET32a-psaA, pela Dra. Márcia Gamberini^{41,42,43}. Este soro reconhece a PsaA nativa de pneumococo. Os anticorpos policlonais anti-rFPspA1 e rFPspA3, foram produzidos em camundongos e obtidos pela Dra. Eliane N. Miyaji⁴³, a partir de PspA purificada de extrato de *S. pneumoniae*, utilizando cloreto de colina. Obtivemos ainda os anticorpos policlonais anti-rPsaA, anti-rFPspA1 e rFPspA3, a partir de experimentos com as proteínas recombinantes purificadas durante este projeto.

3.8 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.8.1 Obtenção do extrato inicial

Para a purificação preliminar das proteínas heterólogas, o precipitado bacteriano que estava estocado a -20°C , proveniente de cultivos com volumes de até 100 mL (em *shaker*), foi ressuscitado em 10 mL de tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM, pH 8,0; e dividido em 4 alíquotas de 2,5 mL, a fim de se obter uma boa sonicação. Em seguida as alíquotas (amostras) foram sonicadas por 3 min em banho de gelo a 60 Hz, com pulsos alternados de 6 em 6 segundos, em aparelho Ultrasonic Processor. O lisado total (homogenato), foi centrifugado a 4°C por 3 min a 12000 g e o sobrenadante filtrado em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$.

Para a purificação das proteínas recombinantes de cultivo bacteriano com volume a partir de 1 L, o extrato inicial foi obtido por ruptura das células por alta pressão em *French Press*. O precipitado bacteriano foi ressuscitado a uma concentração de 10% p/v em Tampão Tris 50 mM, pH 8+Triton X-100 0,01% e aplicado à *French Press* a uma pressão de 2000 psi (138 bar); a suspensão foi passada 3 vezes, com resfriamento entre cada passagem.

Os homogenatos obtidos com alta pressão foram centrifugados a 8000 g por 60 min a 4°C , e os sobrenadantes foram mantidos a -20°C até sua aplicação, após filtração, nas resinas cromatográficas. As amostras foram equilibradas com a mesma concentração salina que o tampão de equilíbrio utilizado para as cromatografias (itens 3.8.2; 3.8.3).

3.8.2 Cromatografia de afinidade em resina de Sepharose quelante de níquel, Ni^{++} -Sepharose

Para a cromatografia de afinidade utilizou-se a coluna pré-empacotada, HiTrapTM Chelating HP (5 mL). As cromatografias foram realizadas em aparelhos, Äkta Prime, Bio Pilot ou Äkta Explore e as frações foram coletadas utilizando-se coletores de frações Frac-100 ou RediFrac (Amersham Pharmacia Biotech).

Procedimento:

A primeira lavagem da coluna foi com água, 3 volumes de coluna (3V); seguida por lavagens com 3 V de EDTA 50 mM; 3 V de H_2O ; 3 V de NaOH 0,5 M; 10 V de H_2O ; a ligação do níquel à resina, ocorreu após a aplicação de 3 V de NiSO_4 300 mM à coluna; foi realizada uma nova

lavagem com 3 V de H₂O, para extrair o excesso de níquel; seguida pela aplicação de Tampão de Equilíbrio (3 V de tampão Tris 25 mM, pH 8, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM); Após ter equilibrado a coluna, a amostra (extrato inicial) foi aplicada à coluna cromatográfica. A fração não adsorvida ou *Flow-through*, foi denominada F1-Ni; lavou-se novamente a coluna com 5 V de tampão de equilíbrio; a eluição foi realizada com 5 V de Tris 50mM, imidazol 25 mM, NaCl 500 mM, pH 8, fração F2-Ni; em seguida foi realizada a eluição descontínua com Tris 50mM, imidazol 250 mM, pH 8, fração F3-Ni; a regeneração da resina foi feita com imidazol 500 mM, fração F4-Ni.

Para equilibrar e regenerar a coluna para a aplicação da amostra utilizou-se fluxo de 5 mL/min e para a eluição, 3 mL/min, coletando-se frações de 2,5 mL. A eluição foi acompanhada por medida de absorção a 280 nm.

A amostra da F3-Ni com alta concentração de NaCl e imidazol foi diluída com H₂O e concentrada por ultrafiltração tangencial em sistema LabScale TFF (Millipore) com membranas de 10 kDa (Pelicon XL Biomax Millipore) com pressão de entrada de 2 bar (30 psi) e saída livre (PTM=1 bar/15 psi). Esta etapa foi repetida até a solução alcançar a mesma condutividade do tampão de equilíbrio da Q-Sepharose.

3.8.3 Cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose

Uma coluna pré-empacotada HiTrapTM Q HP (Amersham Pharmacia Biotech) de 5 ml foi utilizada na segunda etapa da purificação das proteínas recombinantes, a partir de F3-Ni.

Procedimento:

A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (5V de tampão Tris 50 mM, pH 8) e a fração F3-Ni foi aplicada à coluna. A amostra estava na mesma concentração iônica que o tampão de equilíbrio. Obteve-se a fração não adsorvida, F1-Q ou *flow-through*; lavou-se a coluna (a resina) com mais 5V de tampão de equilíbrio; a eluição foi realizada por gradiente descontínuo; 5V de tampão Tris 50 mM contendo NaCl. Os patamares de NaCl foram 100 mM para F2-Q, 200 mM para F3-Q, 300 mM para F4-Q e 500 mM para F5-Q. A regeneração da coluna foi feita com NaCl 500 mM + ácido acético 1M, seguida de lavagem com 10 V de H₂O; A resina foi armazenada em etanol 20%. O acompanhamento da cromatografia, fluxos e fracionamento, foram similares aos já descritos para cromatografia em Ni⁺⁺-Sepharose.

3.9 CULTIVOS PREPARATIVOS PARA AMPLIAÇÃO DE ESCALA

Foram preparados estoques de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os respectivos vetores de expressão; a bactéria foi cultivada conforme já descrito e quando a $DO_{600\text{ nm}}$ alcançou 0,7 foi adicionado o mesmo volume de glicerina estéril, até concentração final de 50%. O frasco foi agitado e o volume distribuído em criotubos de 1,5 mL para estocagem a -70°C . Destes criotubos pôde-se obter colônias isoladas após semear em meio sólido 2YT/Amp ou Kan.

A partir de uma colônia isolada em meio sólido 2YT/Kan, iniciou-se um cultivo em meio líquido, 2YT/Kan ou HDF¹¹³/Kan (a composição do meio mínimo definido, HDF, será apresentada no ANEXO 1, Tabela 12), incubado durante uma noite a 37°C sob agitação a 200 rpm (em *Shaker*). Este cultivo foi usado como inóculo, em volumes adequados de 2YT/Kan ou HDF/Kan para atingir uma $DO_{600\text{ nm}}$ de aproximadamente 0,1. Quando o cultivo atingiu uma $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,6, foi realizada a indução por IPTG 1 mM ou lactose 28 mM.

Para determinar a velocidade de crescimento bacteriano, amostras foram coletadas de hora em hora para a medida da $DO_{600\text{ nm}}$. A morfologia celular e as densidades ópticas (DO) no decorrer do cultivo foram avaliadas em microscópio Alphaphot-2 (YS2/Nikon) e espectrofotômetro UV/Visível (Ultrospec 2000 – Pharmacia Biotech). Aliquotas de 1 mL foram centrifugadas a 12000 g por 3 min a 4°C e os sobrenadantes congelados a -20°C . Os precipitados foram lavados com salina fisiológica, centrifugados novamente a 12000 g por 3 min a 4°C , os sobrenadantes descartados e as células, congeladas a -20°C para posterior análise. A massa seca foi obtida a partir de aliquotas do cultivo em biorreator de 5 L, centrifugadas e o precipitado mantido a 60°C por aproximadamente 48 h.

A glicose foi quantificada nos sobrenadantes pelo método da glicose oxidase (kit Glicose Enz-Color, Biodiagnostica). O glicerol é quantificado pelo método enzimático para determinação de triglicérides (Triglicérides 120, da Dolis Reagentes), usando um padrão apropriado.

3.9.1 Obtenção das células

Após a indução, os cultivos de até um litro, foram centrifugados a 8000 g por 20 min e os sobrenadantes, descartados. Os precipitados foram lavados com salina a 4°C , centrifugados também a 8000 g por 20 min e os precipitados estocados a -70°C .

O cultivo obtido no biorreator de 5 L, foi resfriado a 4°C, concentrado por filtração tangencial em membrana de 0,22 µm (em cassetes de Pelicon da Millipore). Até o volume de 2 L, quando foi adicionado 10 L de solução salina fria a 4°C, de 2 em 2 L. A pressão de entrada foi de 20 psi e a de saída 10 psi (15 psi - Pressão Trans Membrana). O volume foi então reduzido para entre 1 e 2 L e centrifugado a 12000 g por 20 min. O precipitado foi armazenado em sacolas plásticas a - 70°C.

3.10 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS E OBTENÇÃO DOS ANTISOROS

Grupos de 6 camundongos BALB/c fêmeas de 4 semanas (de aproximadamente 20 g), foram inoculados por via subcutânea com as proteínas recombinantes, rPsaA, rFPspA1 e rFPspA3 purificadas, em diferentes combinações: Grupo 1 (G1): rPsaA, Grupo 2 (G2): rFPspA1, Grupo 3 (G3): rFPspA3, Grupo 4 (G4): rPsaA + rFPspA1 + rFPspA3, Grupo 5 (G5): rPsaA + rFPspA1 + rFPspA3, Grupo 6 (G6): vacina Pneumo-23 (Aventis Pasteur) e Grupo 7 (G7): salina. Do G1-G4 a primeira dose foi administrada com o Adjuvante Completo de Freund (CFA), enquanto a segunda e terceira foram administradas com o adjuvante incompleto de Freund (IFA), respectivamente 14 e 28 dias após a primeira dose. Cada dose aplicada foi de 10 µg de proteína recombinante. O adjuvante usado no G5 foi o Al(OH)₃, 100 µg por dose. Foi utilizada como controle a vacina pneumocócica polivalente (pneumo 23) da Aventis Pasteur, que foi aplicada via intraperitoneal, 1/20 da dose humana (0,5 mL) indicada pelo fabricante.

Uma semana após a última inoculação, os animais foram submetidos a sangrias via plexo ocular. Os soros separados foram mantidos a -20 °C para os ensaios posteriores.

3.11 DETERMINAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTI-SOROS POR *WESTERN BLOT* E ELISA

Para testar a reatividade cruzada dos anti-soros gerados contra as proteínas recombinantes, foram feitas *SDS-PAGE* (2 géis preparativos); em um se aplicou o extrato total de *S. pneumoniae* de uma cepa que expressa PspA1 e no outro, de uma cepa que expressa PspA3. As proteínas de cada gel foram transferidas para 2 membranas de nitrocelulose e estas foram incubadas com os

anti-soros obtidos dos camundongos imunizados com as proteínas rPsaA, rFPspA1, rFPspA3 e controles (G1 a G7), análise denominada *Western blot*.

A análise da especificidade e título dos anticorpos contra as proteínas recombinantes foi realizada também pelo método imunoenzimático, ELISA¹¹⁴. Placas de microtitulação de poliestireno (Cell WellsTM da Corning) foram sensibilizadas com 1 µg/mL de proteína recombinante diluída para um volume final de 100 µL por poço. A diluição é realizada com tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6. As placas foram incubadas a 4 °C durante 14 h e em seguida por mais 30 min a 37 °C. Estas foram então, submetidas a 3 lavagens sucessivas com tampão fosfato de sódio 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Em seguida adicionou-se 200 µL da solução bloqueadora (leite desnatado, molico) 10%, mantendo-se a 37°C por 1 h. Após um novo ciclo de lavagens, aplicou-se a cada poço 100 µL dos soros obtidos dos animais de G1 a G7 em diluições seriadas com tampão de incubação (PBS, pH 7,4, contendo soroalbumina bovina 1%, BSA) e incubou-se novamente a 37 °C por 2 h. Após outro ciclo de lavagens, as placas foram incubada a 37 °C por 1 h com anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase diluído 1: 20000 com tampão de incubação (100 µL por poço). Após mais um ciclo de lavagens, a reação foi revelada pela adição de 100 µL de mistura cromógena (o-phenilediamina dihidrocloro - OPD) 0,4 mg de OPD/mL de tampão fosfato-citrato 0,2 M, pH 5,0, contendo 0,06% de H₂O₂. Após 7 min de incubação das placas no escuro a temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 30%. A reação foi acompanhada pela leitura de absorbância a 492 nm em leitor de microplacas Multiskan EX Uniscience Labsystems. O título de anticorpos foi determinado pela recíproca da diluição máxima do soro capaz de resultar em uma leitura próxima de 0,100. Os títulos foram extrapolados utilizando-se o programa Microcal Oring 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE rPsaA (CONSTRUÇÃO EM pAE)

4.1.1 Construção do vetor para expressão de rPsaA

O gene *psaA* foi amplificado por PCR a partir do vetor de expressão pET-32a-*psaA* (construído pela Dra. Rocilda Schenkman do Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan) e foi inserido no vetor pAE. Para confirmar a presença do gene *psaA* no vetor, os plasmídeos obtidos das mini-preparações foram digeridos com as enzimas utilizadas para a clonagem, *BamH* I e *Hind* III, para verificar a liberação da banda referente ao *psaA*, e também com *EcoR* I, que cliva o gene *psaA* internamente (sítio único).

A digestão do clone 1 de pAE-*psaA* com *BamH* I e *Hind* III produziu duas bandas de pesos moleculares 2800 e 930 pb (Figura 9), tamanhos esperados para o vetor vazio, pAE e para o inserto, gene *psaA*, respectivamente. A digestão de pAE-*psaA* com *EcoR* I resultou em uma banda que corresponde à linearização do vetor (3700 pb). Estes resultados confirmam a construção do vetor de expressão, pAE-*psaA*. A sequência do gene *psaA* foi confirmada por sequenciamento automático.

Figura 9. Análise de restrição do vetor pAE-*psaA* em eletroforese em gel de agarose (1%). 1- padrão de peso (pb) molecular (1Kb plus DNA ladder); 2- Vetor pAE não digerido; 3- Vetor pAE digerido com *BamH* I e com *Hind* III; 4- Vetor pAE digerido com *EcoR* I; 5- Clone 1, pAE-*psaA* não digerido ; 6- clone 1 digerido com *BamH* I e *Hind* III; 7- Clone 1 digerido com *EcoR* I.

4.1.2 Expressão de rPsaA em *E. coli* BL21-DE3

E. coli BL21-DE3 competente, foi transformada com o DNA plasmidial pAE-psaA (clone 1) ou com pAE (vetor vazio, controle negativo de expressão), e selecionada em meio contendo ampicilina. Sete clones foram analisados para verificar a expressão da PsaA recombinante (rPsaA). As culturas em meio líquido foram feitas em meio 2YT utilizando-se ampicilina como antibiótico e IPTG como indutor (indução por 3 h). Para cada clone foi retirada uma amostra controle antes da indução (amostra não induzida) e após a adição do indutor as amostras de 1 mL foram coletadas de hora em hora. As células coletadas foram por centrifugação e estocadas a -20°C até sua análise por eletroforese em gel de poliacrilamida e por *Western blot* contra anticorpos específicos.

Extratos bacterianos de *E. coli* BL21-DE3 transformados com pAE-psaA, foram sonificados e centrifugados e os sobrenadantes foram analisados por *SDS-PAGE*. No entanto, não foi possível verificar por *SDS-PAGE*, uma banda diferenciada próxima à região de 37 kDa, referente à rPsaA (Figura 10). Uma outra forma de se tentar verificar a expressão da proteína recombinante (rPsaA) foi submeter estas amostras à *Western* (Figura 11).

Figura 10. Eletroforese em SDS 12% do extrato de BL21-DE3, transformado com pAE-psaA, induzidos (I) e não induzidos (NI) com IPTG. 1- Padrão de massa molar (kDa), (Low Range/Bio-Rad); *E. coli* BL21-DE3 transformada com: 2- pAE (NI); 3- pAE (I); 4- pE-psaA, clone 7 (NI); 5- pAE-psaA, clone 7 (I);

Dois clones de *E. coli* BL21(DE3)-pAE-psaA foram analisados por *Western blot*, antes e após a indução. O anticorpo anti-rPsaA, reconheceu uma banda na região de 37 kDa (análise por *Western blot*), evidenciando a expressão da rPsaA (Figura 11), expressão que não foi observada por SDS-PAGE.

Figura 11. *Western blot* de extratos de BL21-DE3 transformados com pAE-psaA induzidos (I) e não induzidos (NI) com IPTG. 1- clone 7 (NI); 2- clone 7 (I); 3- clone 8 (NI); 4- clone 8 (I); 5- Controle positivo (extrato de *Streptococcus pneumoniae*).

Esta análise também revelou a ocorrência de um escape de expressão da proteína recombinante antes da indução com IPTG, principalmente no clone 7, que após a indução, mostra sua expressão aumentada. Já o clone 8, não expressa a rPsaA antes da indução; porém, sua expressão é bastante significativa após a indução. Estes resultados demonstraram a expressão de rPsaA em BL21-DE3 transformada com pAE-psaA.

4.1.3 Análise da solubilidade de rPsaA e pré-análise para purificação

Um ensaio foi realizado para verificar se a proteína estava sendo expressa na forma solúvel ou insolúvel. O cultivo bacteriano foi sonificado, o precipitado separado do sobrenadante e estes analisados por *Western blot*. A proteína recombinante estava presente no sobrenadante do sonificado, portanto, rPsaA foi expressa na forma solúvel (Figura 12, poço 2). Como esperado, a solubilização do precipitado com uréia, também não mostrou a presença de rPsaA (Figura 12, poços 4 e 5). Neste experimento, também foi analisada a capacidade de rPsaA, de se ligar à resina de afinidade, Ni^{++} -Sephrose em batelada, visto que a proteína foi expressa em fusão com uma cauda de histidina. Pode-se observar que, a proteína recombinante que se liga à resina de Ni^{++} -Sephrose, começa a ser eluída com 50 mM de imidazol (Figura 12, poço 8).

Figura 12. Western blot de frações de pré-purificação de Extrato Total de BL21(DE3)pAE-psaA. 1- Padrão de massa molar (Kaleidoscope Pre-stained Standards-Bio-Rad); 2- Extrato do sonificado, sobrenadante; 3- Extrato do sonificado, precipitado; 4- Sobrenadante do precipitado solubilizado com uréia 8 M; 5- Precipitado do extrato tratado com uréia 8 M; 6- Flow-Through do sobrenadante (sonificado, sem uréia) da coluna de Ni^{++} -Sepharose; 7- Flow-Through fração não ligante do sobrenadante (tratado com uréia 8 M); na coluna de Ni^{++} -Sepharose 8- Fração Eluída da coluna de Ni^{++} -Sepharose com imidazol 50 mM em tampão Tris 50 mM, pH 8; 9- Fração eluída da Ni^{++} -Sepharose (tratada com uréia 8 M).

Foram analisadas diferentes concentrações de imidazol para a eluição de rPsaA da resina de Ni^{++} -Sepharose. Confirmou-se que a rPsaA está presente no extrato inicial (Figura 13, poço 2), e que se liga à resina, uma vez que houve a ausência da proteína na fração não ligante, Flow Through, poço 3). Foi demonstrado que a rPsaA não é eluída com 25 mM de imidazol (poço 5) e confirmado que começa a ser eluída da resina quelante de níquel, a partir de 50 mM de imidazol (poços 6 e 7).

Figura 13. Western blot das frações do Extrato Total de BL21(DE3)-pAE-psaA, eluídas da Coluna de Ni^{++} -Sepharose 1- Padrão de massa molar (Kaleidoscope Pré-stained Standards-Bio-Rad); 2-Extrato total (sobrenadante do Sonificado); 3- Fração não ligante ("Flow Through"); 4- 1ª lavagem com tampão Tris 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8; 5- 1º volume (lavagem) com tampão Tris 50 mM, imidazol 25 mM; 6- 1º volume eluído da Ni^{++} -Sepharose com tampão Tris 50 mM, imidazol 50 mM; 7- 2º volume eluído da Ni^{++} -Sepharose com tampão Tris 50 mM, imidazol 50 mM.

Estes resultados demonstraram a expressão solúvel de rPsaA em *E. coli* BL21-DE3, através do vetor pAE-psaA, e forneceram informações preliminares das condições de ligação e eluição da proteína recombinante da resina de afinidade, Ni^{++} -Sepharose.

4.1.4 Purificação de rPsaA por cromatografia de Afinidade

Visando aprimorar a purificação da rPsaA na resina de Ni^{++} -Sephareose, foi determinada a concentração ótima de eluição da proteína recombinante, utilizando concentrações crescentes de imidazol. Inicialmente foi realizada uma lavagem com tampão de equilíbrio (Tris 50 mM, imidazol 5 mM, NaCl 150 mM e com pH 8). A proteína heteróloga não foi eluída da coluna com imidazol nas concentrações 10, 15 e 25 mM (dados não apresentados). A eluição da proteína recombinante pôde ser observada a partir da lavagem com imidazol 50 mM (Figura 14, poços 1; 2 e 3). Pôde-se notar ainda, uma banda na mesma região (37 kDa), para a eluição com 100 mM imidazol e a eluição com 150 mM é baixa, mas ainda ocorre, Figura 14. Não há mais eluição de proteína a 200 mM e 250 mM. Visto que a eluição da rPsaA ocorreu nas concentrações de imidazol, entre 50 a 150 mM, e que mesmo assim as frações ainda continham contaminantes, estas foram submetidas a um segundo passo de purificação, onde se fixou uma concentração de imidazol igual a 250 mM, de modo a evitar o arraste da eluição nas várias frações.

Figura 14. SDS-PAGE das frações do Extrato Total de BL21(DE3)-pAE-psaA eluídas de coluna de Ni^{++} -Sephareose. PM- padrão de massa molar (Low Range/Bio-Rad); Poços de 1-3) 1a a 3a frações /imidazol 50 mM; 4-6, 1a a 3a frações eluídas com tampão tris 50 mM/imidazol 100 mM; 3- 7-9, 1a a 3a frações /imidazol 150 mM.

Uma vez demonstrada a afinidade da rPsaA pela Ni^{++} -Sephareose, esta foi utilizada como a principal etapa de purificação da proteína recombinante. Os precipitados bacterianos dos cultivos induzidos foram coletados por centrifugação e estocados a -20°C . Para a purificação, foram ressuspensos em tampão adequado, lisados e centrifugados. O sobrenadante do lisado, denominado Extrato Total, foi submetido à cromatografia de afinidade em uma coluna HiTrapTM Chelating HP (Amersham Pharmacia Biotech), previamente adsorvida com níquel (ver Materiais e Métodos).

A eluição total da rPsaA foi realizada em uma única fração, a 250 mM de imidazol (Figura 15). O pico referente à proteína recombinante foi recolhido e posteriormente analisado por *SDS-PAGE* e *Western blot*. As frações contendo rPsaA foram submetidas à cromatografia de troca iônica, a fim de se eliminar contaminantes de alta e baixa massa molar, que não foram eliminados na cromatografia de afinidade.

Figura 15. Cromatograma obtido a partir da purificação da rPsaA em resina quelante de níquel. O Extrato Total foi aplicado em tampão Tris 50 mM, NaCl 500 mM. Eluição com 250 mM imidazol e lavagem final com 500 mM de imidazol.

4.1.5 Purificação da rPsaA por cromatografia de troca iônica

Uma vez que as frações contendo rPsaA eluídas da coluna de Ni^{++} -Sephrose com imidazol ainda continham contaminantes, foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sephrose, visando eliminar, não somente as impurezas, mas também o imidazol adicionado para a eluição na rPsaA durante a cromatografia de afinidade. A eluição da rPsaA foi realizada por um

gradiente de 0-500 mM de NaCl (Figura 16) e o pico majoritário (eluído com aproximadamente 140 mM de NaCl), coletado para posterior análise por *SDS-PAGE* e *Western blot*.

Figura 16. Cromatografia em Q-Sepharose para purificação de rPsaA. A fração eluída da coluna de Ni^{++} -Sepharose, foi aplicada em uma coluna de troca iônica (HiTrap Q HP) previamente equilibrada em tampão Tris 50 mM, pH 8. A eluição foi feita com um gradiente de NaCl (0-500 mM), usando-se um fluxo de 0,5 mL/min em tampão de equilíbrio (linha vermelha). O pico majoritário (traço verde) foi coletado.

4.1.6 Análise da purificação de rPsaA por *SDS-PAGE* e por *Western blot*

As frações de purificação da rPsaA foram analisadas por *SDS-PAGE*. Novamente observou-se que o extrato inicial não revela claramente por *SDS-PAGE* a banda esperada para a proteína de interesse (rPsaA). Embora possa se observar que a fração coletada da cromatografia de afinidade apresente uma purificação considerável de rPsaA (Figura 17, poço 3), pode se notar ainda a presença de algumas bandas contaminantes, de baixa massa molar (aproximadamente 26 kDa), que foram eliminadas quando a fração foi submetida à cromatografia de troca iônica (Figura 17, poço 4). Por outro lado, os resultados indicam que o pico majoritário coletado na eluição com 140 mM de NaCl, deve ser a rPsaA purificada.

Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida (Frações purificadas Ni^{++} e Q-Sepharose). 1- Padrão de massa molar (Low Range/Bio-Rad); 2- Extrato total de BL21(DE3)-pAE-psaA; 3- Fração eluída da Coluna de Ni^{++} -Sepharose com Tris 50 mM pH 8, imidazol 250 mM; 4- Fração protéica coletada da Coluna Q-Sepharose com tampão Tris 50 mM e gradiente de NaCl de 0-0,5 M.

A identidade da rPsaA purificada em todas as frações de purificação foi confirmada por *Western blot* (Figura 18, poços 1-3), uma vez que a proteína foi reconhecida pelo anticorpo anti-rPsaA. Pode se observar ainda na Figura 18 que a rPsaA apresenta massa molar comparável ao do controle positivo, Extrato Total de *Streptococcus pneumoniae*. Estes resultados demonstram que os métodos cromatográficos utilizados são eficientes, resultando na purificação da proteína recombinante.

Figura 18. *Western blot* das frações de purificação da rPsaA. 1-Extrato Total de BL21(DE3)-pAE-psaA; 2- Fração eluída da Coluna de Ni^{++} -Sepharose com Tris 50 mM pH 8, imidazol 250 mM; 3- Fração eluída da Coluna Q-Sepharose com tampão Tris 50 mM, com NaCl 140 mM; 4- Extrato total de *Streptococcus pneumoniae*.

4.1.7 Rendimento de purificação de rPsaA

Uma vez que não foi possível quantificar a rPsaA existente no Extrato Total, não se pode calcular com certeza o rendimento em cada etapa de purificação, neste caso considerou-se como 100% a recuperação de rPsaA em uma das etapas de purificação. Portanto, o fator de purificação é calculado pela eliminação das proteínas de *E. coli*, que se espera sejam majoritariamente contaminantes, uma vez que não foi observado por *Western blot* a presença da rPsaA nas demais frações da purificação conforme a Tabela 4. A recuperação final de rPsaA obtida foi de 10 mg por litro de cultivo.

Tabela 4 - Purificação de rPsaA a partir de BL21(DE3)-pAE-psaA

Amostra	Proteína* Total (mg)	Fator de Purificação
Extrato Total ^a	55	1
Ni ⁺⁺ -Seph-I 250 ^b	1,8	31
Q-Seph-140 ^c	1,0	54

a) O extrato Inicial foi obtido a partir de uma cultura de aproximadamente 100 mL; **b)** Fração eluído da coluna de Ni⁺⁺-Sephrose, com imidazol 250 mM, em tampão Tris 50 mM e pH 8; **c)** Fração eluída da coluna Q-Sephrose com gradiente de NaCl de 0-500 mM (eluído com 140 mM de NaCl) em tampão Tris 50 mM, pH 8. * Concentração protéica determinada pelo método de Bradford. **Observação:** considerou-se a recuperação da proteína igual a 100% em todas as etapas de purificação.

4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE PspA (CONSTRUÇÃO EM pAE)

4.2.1 Construção de vetores de expressão dos fragmentos de PspA

Os fragmentos N-terminais de PspA clados 1 e 3, aqui denominados f_{pspA1} e f_{pspA3}, foram obtidos a partir de vetores pTARGET contendo estes fragmentos, que foram construídos no nosso laboratório pela Dra. Eliane N. Miyaji⁴³. Os vetores pAE e pTARGET-f_{pspA1} e f_{pspA3} foram digeridos com as enzimas de restrição *Xho* I e *Kpn* I e analisados em eletroforese em gel de agarose. Pode se verificar que a digestão do vetor pAE vazio, produz uma banda na região de

3000 pb (Figura 19, poço 2). A digestão de pTARGET-fpspA1 e 3 (poços 3 e 4), libera uma banda, referente aos insertos de pspA dos clados 1 e 3, de 1092 e 1119 pb, respectivamente. Os genes pspA de ambos os clados havia sido previamente seqüenciados.

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose (1%). Análise de restrição dos plasmídeos pAE e pTARGET-*pspA*. 1- Padrão de massa molar (1Kb plus DNA ladder); 2- Vetor pAE digerido com *Kpn* I e *Xho* I; 3- Plasmídeo pTARGET-fpspA1, digerido com *Kpn* I e com *Xho* I; 4- Plasmídeo pTARGET-fpspA3, digerido com *Xho* I e *Kpn* I.

O vetor pAE e os insertos, *fpspA1* e *fpspA3*, obtidos por digestão com *Xho*I e *Kpn*I, foram purificados a partir do gel de agarose, tendo sido realizadas as reações de ligação entre o vetor e os insertos purificados. Os produtos de ligação foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* DH α competentes. Colônias selecionadas em meio contendo ampicilina foram utilizadas para as mini-preparações de DNA. Os clones de cada construção foram digeridos com as enzimas *Kpn* I e *Xho* I e analisados em gel de agarose, mostrando a liberação dos insertos de aproximadamente 1000 bp e uma banda em torno de 3000 pb, que confirmam a inserção dos genes (*fpspA1* e *fpspA3*) nos vetores de expressão (Figura 20).

Figura 20. Eletroforese em gel de agarose (1%). Análise de restrição dos clones de pAE-*pspA*. 1- Padrão de massa molar (1Kb plus DNA ladder); 2 a 9- plasmídeos derivados da ligação pAE com os fragmentos contendo *pspA*-1 alternados, clone não digerido, seguido pelo mesmo clone digerido com *Kpn* I e *Xho* I; 10 a 15- clones de pAE-*pspA*-3), alternados não digeridos e digeridos.

4.2.2 Expressão de rFPspA em *E. coli* BL21-DE3

E. coli BL21-DE3 competentes foram transformadas com os vetores de expressão pAE-fpspA1 e 3 ou com o vetor vazio (controle negativo de expressão). Foram obtidos transformantes para ambas as construções. Algumas colônias de cada construção foram selecionadas e cultivadas em meio líquido 2YT contendo ampicilina e induzidos com IPTG. Um clone de cada transformante foi selecionado para que se estudasse a expressão e purificação das proteínas, rFPspA1 e rFPspA3.

Os respectivos extratos protéicos foram analisados em gel de *SDS-PAGE* usando-se as amostras induzidas e não induzidas com IPTG. Não foi possível verificar no gel uma diferença de expressão, quando comparados os clones induzidos com seus controles não induzidos (Figuras 21 A e 21 B). No entanto, quando se comparam por *Western blot* (dados não apresentados) estes extratos aos do controle negativo, é possível observar um aumento da expressão de uma banda na região de 60 kDa, massa molar esperada para rFPspA, tanto para os induzidos quanto para os não induzidos. Isto poderia indicar um possível escape na expressão antes da indução.

Figura 21. Eletroforese em gel de Poliacrilamida, dos extratos protéicos de *E. coli* BL21-DE3 transformadas com pAE-fpspA1 e pAE-fpspA3. **A)** 1 - Padrão de massa molar (Low Range, pré-corado, Bio-Rad); 2- pAE, vetor vazio não induzido (NI); 3- pAE (I); 4- pAE-fpspA1, não induzido (NI); 5- Mesmo, induzido (I). **B)** Transformantes pAE-fpspA3. 1- Padrão de massa molar; 2- pAE, vetor vazio (NI); 3- pAE vazio (I); 4- pAE-fpspA3 (NI); 5- pAE-fpspA3 (I).

4.2.3 Purificação de rFPsA dos clados 1 e 3 (construção em pAE)

Após o estabelecimento do esquema de purificação para a rPsaA, as mesmas condições foram empregadas na purificação de rFPsA1 e rFPsA3.

4.2.3.1 Purificação de rFPsA por cromatografia de afinidade

Uma vez que rFPsA foi expressa em fusão com uma cauda de histidina, sua afinidade pela resina quelante de níquel foi utilizada como a principal etapa de purificação. Os precipitados bacterianos dos cultivos de *E. coli* BL21-DE3 transformadas com os vetores de expressão pAE-fpsA1 e pAE-fpsA3, foram ressuspensos em tampão de equilíbrio, lisados por sonicação e centrifugados. O Extrato Total, sobrenadante do lisado após centrifugação, foi submetido à cromatografia de afinidade em uma coluna HiTrapTM-Chelating HP (Amersham Pharmacia Biotech), previamente carregada com níquel. A eluição da rFPsA ocorreu nas mesmas condições utilizadas para rPsaA (item 3.9.2.), exibindo um perfil cromatográfico muito parecido com o apresentado para rPsaA (não apresentado).

4.2.3.2 Purificação da rFPspA por cromatografia de troca iônica

Os procedimentos da purificação de rFPspA1 e rFPspA3 em Q-Sepharose foram os mesmos utilizados para rPsaA (item 3.9.3). As Figuras 22 e 23 mostram os cromatogramas de purificação de rFPspA1 e de rFPspA3, respectivamente, apresentando 3 picos principais, sendo que o pico central é o que contém as proteínas recombinantes. Os demais picos são de proteínas contaminantes, que foram posteriormente verificados por *Western blot*.

Figura 22. Cromatografia em Q-Sepharose para purificação de rFPspA1. A fração protéica (10 mL) eluída da coluna de Ni^{++} -Sepharose, foi aplicada na coluna de troca iônica (HiTrap Q HP) previamente equilibrada em tampão Tris 50 mM, pH 8. A eluição foi feita com um gradiente de NaCl (0-500 mM), usando-se um fluxo de 0,5 mL/min em tampão de equilíbrio (linha vermelha). O pico majoritário (barra verde) foi coletado para ser identificado por *Western blot*.

Figura 23. Cromatografia em Q-Sepharose para purificação de rPspA3. A fração protéica (10 mL) eluída da coluna de Ni^{++} -Sepharose, foi aplicada na coluna de troca iônica (HiTrap Q HP) previamente equilibrada em tampão Tris 50 mM, pH 8. A eluição foi feita com um gradiente de NaCl (0-500 mM), usando-se um fluxo de 0,5 mL/min em tampão de equilíbrio (linha vermelha). O pico majoritário (barra verde) foi coletado para ser identificado por *Western blot*.

4.2.3.3 Análise da purificação de rFPspA por SDS-PAGE e Western blot

As frações de purificação de rFPspA1 em colunas de Ni^{++} -Sepharose e Q-Sepharose, foram separadas em *SDS-PAGE* e coradas com corante *comassie blue* (Figura 24 A). Não foi possível observar a banda referente a rFPspA1 no Extrato Total (extrato inicial). No entanto, pode se observar uma banda majoritária localizada em torno de 60 kDa, na fração eluída da Ni^{++} -Sepharose, além de pequena quantidade de contaminantes de maior e menor massa molar. A fração eluída da Q-sepharose, mostra uma banda bem distinta, livre dos contaminantes.

Da mesma forma, as frações de purificação de FPspA3 foram analisadas por *SDS-PAGE*. Também nesta construção, não foi observada uma banda clara de rFPspA3 no Extrato Total (Figura 24 B). A banda esperada para rPspA3 em torno de 60 kDa, está bem definida nas frações eluídas das colunas de Ni^{++} -Sepharose e de Q-Sepharose. Os contaminantes visíveis na fração eluída da Ni^{++} -Sepharose foram eliminados pela cromatografia na Q-Sepharose.

Figura 24. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações de purificação de rFPspA1 e rFPspA3. **A)** 1- Padrão de massa molar (Low Range); 2 – Extrato inicial de BL21(DE3)-pAE-fpA1; 3 – Fração eluída da coluna de Ni^{++} -Sephacrose com Tris 50 mM pH 8, imidazol 250 mM; 4- Fração eluída da coluna Q-Sepharose com tampão Tris 50 mM, gradiente de NaCl de 0-500 mM; **B)** 1- Padrão de massa molar; 2 – Extrato inicial de BL21(DE3)-pAE-fpA3; 3 – Fração eluída da coluna de Ni^{++} -Sephacrose com Tris 50 mM pH 8, imidazol 250 mM; 4- Fração eluída da coluna Q-Sepharose com tampão Tris 50 mM, gradiente de NaCl de 0-500 mM.

As frações de purificação de rFPspA, clados 1 e 3 foram analisados por *Western blot* utilizando anticorpos específicos contra rFPspA1 e rFPspA3 para confirmar a identidade das bandas observadas em *SDS-PAGE*. Na Figura 25, pode-se observar que os anticorpos anti-rFPspA1 e anti-rFPspA3, reagiram com uma banda na região de 60 kDa, confirmando a identidade das proteínas recombinantes purificadas.

Figura 25. *Western blot* das frações de purificação de rFPspA1 e rFPspA3: **A)** rFPspA1/anticorpo anti-rFPspA1. purificada, eluída da Ni-Sephacrose. 1- Extrato inicial (sobrenadante do Sonicado); 2- Fração eluído da Ni^{++} -Sephacrose com tampão Tris 50 mM com imidazol 250 mM; 3- Fração eluída da coluna Q-Sepharose com gradiente de NaCl 0-500 mM 4- Extrato Total de *Streptococcus pneumoniae*; **B)** rFPspA3/anti corpo anti-rFPspA3, 1- Extrato total (sobrenadante do Sonicado); 2- Fração eluído da Ni^{++} -Sephacrose com tampão Tris 50 mM com imidazol 250 mM; 3- Fração eluída da coluna Q-Sepharose com gradiente de NaCl (0-500 mM).

4.2.3.4 Rendimento de purificação de rFPspA (construção em pAE)

A purificação de rFPspA1 foi feita a partir de um cultivo de aproximadamente 100 mL e o Extrato Total obtido após a sonicação, continha 26 mg totais de proteína rFPspA1 (Tabela 5).

A etapa de purificação na Ni^{++} -Sephrose apresentou um fator de purificação igual a 13, recuperando 2,0 mg de proteína. A cromatografia em Q-Sephrose eliminou as impurezas, aumentando o fator de purificação para 24, considerando-se como 100% a recuperação de rFPspA1 em cada uma das etapas de purificação, a recuperação de proteína recombinante purificada foi igual a 1,1 mg. Portanto, o rendimento de rFPspA1 foi de 11 mg por litro de cultivo.

Tabela 5 - Purificação da rFPspA1 a partir de BL21(DE3)-pAE-fpspA1

Amostra	Proteína. Total* (mg)	Fator de Purificação
ExtratoTotal ^a	26	1
Ni^{++} -Seph-I 250 ^b	2,0	13
Q-Seph-500 ^c	1,1	24

a) O Extrato Total foi obtido a partir de uma cultura de aproximadamente 100 mL, centrifugado e ressuspendido em 10 mL de tampão de sonicação e sonicado conforme descrito em materiais e métodos. **b)** Fração eluído da coluna Ni^{++} -Sephrose, com 250 mM de imidazol em tampão Tris 50 mM, pH 8. **c)** Fração eluído da coluna Mono Q-Sephrose com gradiente (0-500 mM) de NaCl. * Concentração protéica determinada pelo método de Bradford. **Observação:** considerou-se a recuperação da proteína igual a 100% em todas as etapas de purificação.

De forma semelhante, *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpspA3 apresentou em seu Extrato Total, 29 mg de proteína (Tabela 6). As etapas de purificação também foram eficientes e o rendimento obtido foi semelhante. Quando extrapolados os dados, o rendimento seria de 11,2 mg de rFPspA3 purificada por litro de cultivo.

Tabela 6 - Purificação da rFPspA1 a partir de BL21(DE3)-pAE-fpspA3

Amostra	Proteína Total* (mg)	Fator de Purificação
Extrato Total^a	29	1
Ni⁺⁺-Seph-I 250^b	2,3	13
Q-Seph-500^c	1,1	26

a) O Extrato Total foi obtido a partir de uma cultura de aproximadamente 100 mL, centrifugado e ressuspendido em 10 mL de tampão de sonicação e sonicado conforme descrito em materiais e métodos. **b)** Fração eluído da coluna Ni⁺⁺-Sephrose, com 250 mM de imidazol em tampão Tris 50 mM, pH 8. **c)** Fração eluído da coluna Mono Q-Sephrose com gradiente (0-500 mM) de NaCl. * Concentração protéica determinada pelo método de Bradford. **Observação:** considerou-se a recuperação da proteína igual a 100% em todas as etapas de purificação.

Os cultivos para produção de rFPspA dos dois clados apresentam uma quantidade inicial de proteínas totais próximas (26 e 29 mg) e o rendimento final foi comparável (aproximadamente 12 mg/L). Portanto, estes resultados sugerem que ambos os clones expressam as proteínas recombinantes em níveis equivalentes.

4.3 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DA IMUNOGENICIDADE E DA REATIVIDADE DOS ANTI-SOROS GERADOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Camundongos BALB/c, em grupos de 6 animais, foram inoculados com diferentes combinações das proteínas recombinantes purificadas, com Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou Al(OH)₃, em aplicações subcutâneas, com os respectivos controles, de acordo com a Tabela 7. A vacina Pneumo-23 foi aplicada por via intraperitonal. Os soros foram coletados 3 semanas após a primeira inoculação, reunidos em um único “pool” para cada grupo e analisados por ELISA quanto à presença de anticorpos anti-rPsaA, anti-rFPspA1 e anti-rFPspA3.

Pode-se observar que as proteínas recombinantes isoladas, administradas em CFA, induziram altos títulos de anticorpos contra as proteínas homólogas, mas com baixa reatividade cruzada contra as proteínas heterólogas (Tabela 7). Por outro lado, quando as proteínas foram administradas conjuntamente, usando-se CFA como adjuvante, os títulos foram inferiores aos obtidos com cada proteína injetada separadamente. Este efeito foi menos evidente usando-se

Al(OH)₃ como adjuvante. A Vacina Pneumo-23, composta de polissacarídeos de 23 sorotipos, não induziu a formação de anticorpos contra estas proteínas.

Tabela 7 – Indução de anticorpos contra as proteínas recombinantes

Títulos obtidos por ELISA			
Grupos	rPsaA	rFPspA1	rFPspA3
rPsaA/CFA (G1)	62.828	16	58
rFPspA1/CFA (G2)	0	87.790	156
rFPspA3/CFA (G3)	100	448	153.229
rPsaA + rFPspA1 + rFPspA3/CFA (G4)	24.584	6.489	40.799
rPsaA + rFPspA1 + rFPspA3/Al(OH) ₃ (G5)	57.738	30.411	101.105
Vacina Pneumo-23 (G6)	< 50	< 50	< 50
Salina (G7)	0	0	0

Camundongos BALB/c imunizados com 10 µg das proteínas recombinantes em CFA na 1ª dose e em IFA nas 2ª e 3ª doses (a 14 e 28 dias). Os grupos imunizados com as proteínas recombinantes em Al(OH)₃ receberam 2 doses em iguais condições. Os títulos de anticorpos foram obtidos por ELISA.

4.3.1 Análise da reatividade dos anti-soros verificada por *Western blot* contra extratos de *S. pneumoniae*

Visando verificar se os anticorpos produzidos por camundongos inoculados com as proteínas recombinantes e suas combinações reconheceriam as proteínas nativas, os soros obtidos de cada grupo de animais foram utilizados em *Western blot* contra extratos de cepas de *S. pneumoniae* que expressam PsaA e PspA dos clados 1 ou 3. Pode-se observar que o soro de camundongos imunizados com a rPsaA (anti-rPsaA, G1) reconheceu PsaA em ambas as cepas de pneumococos (Figura 26), coluna 1 e 8. O soro de animais imunizados com rFPspA1, anti-

rFPspA1 reconheceu a respectiva proteína nativa, PspA1 no extrato total de *S. pneumoniae* (Figura 26, coluna 2), mas não a da cepa heteróloga, PspA3 nativa (Figura 26, coluna 9). O anti-soro anti-rFPspA3 reconheceu a proteína PspA3 nativa no extrato de pneumococo (Figura 26, coluna 10) e apresentou ainda, baixa reatividade cruzada contra a PspA1 nativa, da cepa 435/96 (Figura 26, coluna 3). Embora pareça ter ocorrido agregação e/ou degradação das proteínas nos respectivos extratos bacterianos, estas bandas não são reconhecidas nas cepas heterólogas. Os grupos de animais inoculados com as combinações das proteínas recombinantes (G4, com adjuvante de Freud, e G5, com $Al(OH)_3$, como adjuvante) induziram anticorpos que reconheceram as proteínas nativas de *Streptococcus* de ambas as cepas (Figura 26, colunas 4, 5, 11 e 12).

Figura 26. Western blot de Extrato Total de cepas de *Streptococcus pneumoniae* que expressam PspA1 (cepa 435/96) ou PspA3 (cepa 259/98). Os poços de 1 e 8 foram incubados com anti-soro de G1 (rPsaA); 2 e 9 com anti-soro de G2 (rFPspA1); 3 e 10 com anti-soro de G3 (rFPspA3); 4 e 11 com anti-soro de G4 (rPsaA+rFPspA1 e 3); 5 e 12 com anti-soro de G5 (rPsaA e rFPspA1 e 3); 6 e 13 de G6 (Vacina Pneumo-23); 7 e 14 de G7 (Salina).

4.4 EXPERIMENTOS PREPARATÓRIOS PARA ESCALONAMENTO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS rPsaA, rFPspA1 E rFPspA3

Para o escalonamento e a obtenção de cultivos em alta densidade celular, é necessário alcançar $DO_{600nm} > 50^{74,115}$. As três cepas de BL21(DE3) transformadas com os respectivos

vetores de expressão foram inicialmente analisadas quanto à recuperação das colônias a partir de estoques em glicerol mantidos a -70°C . Amostras foram plaqueadas em meio sólido 2YT, com e sem ampicilina. Observou-se que a construção BL21(DE3)-pAE-psaA apresentou 0,05% de colônias resistentes a ampicilina (AmpR), a construção com pAE-fpspA1, 5,5% AmpR e pAE-fpspA3, 0,4% AmpR. Porém, o número de células totais em meio sem Amp estava alto, aproximadamente 100.000 CFU/mL. Estes resultados indicam que o plasmídeo estava sendo perdido durante o processo de congelamento.

4.4.1 Cultivo de *E. coli* BL21(DE3) transformada com pAE-fpspA3 em meio rico 2YT/Amp.

Inicialmente foram realizados cultivos em *shaker* com *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpspA3 com e sem indução por IPTG. Os cultivos foram acompanhados medindo-se a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ a cada hora durante todo o cultivo. A adição de IPTG (1 mM) foi às 3,5 h de cultivo, quando a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ estava 0,88. Pode-se notar que as curvas de crescimento apresentam um perfil semelhante, tanto para o cultivo não induzido quanto para o cultivo induzido por IPTG (Figura 27). Em geral é esperado que após a indução, o cultivo apresente uma diminuição significativa do crescimento, devido ao estresse metabólico imposto às células, o que não ocorreu neste caso. As amostras de 2; 3,5; e 6,5 h dos cultivos foram utilizadas para analisar a estabilidade do plasmídeo. As amostras foram plaqueadas em 2YT e em 2YT/Amp. Verificou-se que antes da indução, na segunda hora, havia 1% AmpR; na hora da indução, a 3,5 h, existia 0,4% AmpR; a 6,5 h havia 0% AmpR, tanto para o cultivo não induzido, quanto para o induzido. Já o plaqueamento no meio sem antibiótico apresentou um crescimento de aproximadamente 100%.

Figura 27. Curvas de crescimento dos cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpsA3 em meio 2YT em *shaker*: Cultivo não induzido e induzido por IPTG (0,1 mM). A adição de IPTG foi a 3,5 h do cultivo.

A resistência a Amp se dá por uma β -lactamase secretada no meio; por este motivo em placas de meio sólido com Amp pode-se observar micro colônias (ou satélites). Uma forma de minimizar esse problema é aumentar a quantidade de Amp no meio. Desta forma, esperamos manter uma maior porcentagem de AmpR na população do cultivo. Foram realizados cultivos com *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpsA3, nas mesmas condições (0,1g Amp/L) ou com concentração 10 vezes maior de Amp (1g/L), Figura 28. O cultivo com Amp (1 g/L) apresentou 67% de AmpR antes da indução e 13% AmpR no final do cultivo. O cultivo nas condições normais (0,1g/L) confirmou os resultados anteriores. Verifica-se um aumento na fase Lag, no cultivo com maior concentração de Amp, o que era esperado. A porcentagem de colônias AmpR ao longo e ao final do cultivo foi maior quando utilizou-se maior concentração de ampicilina.

Figura 28. Curvas de crescimento dos cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpsA3. Cultivo em *shaker*: com Amp 0,1g/L e 1g/L. A indução foi com IPTG 1mM. A adição de IPTG foi na 6ª h de cultivo.

Estes mesmos experimentos foram realizados para a construção BL21(DE3)-pAE-psaA e as curvas apresentaram um perfil similar. Foram também realizados cultivos com a construção BL21(DE3)-pAE-fpsA1 em Amp 0,1 g/L. Os cultivos não induzido e induzido por IPTG (1 mM) apresentaram curvas de crescimento com perfis semelhantes e portanto será apresentada apenas a curva para o cultivo não induzido. Este cultivo começou com $DO_{600\text{ nm}} = 0,1$ e 58% de células AmpR; no momento da indução apresentou 30% AmpR; já no final do cultivo verificou-se por plaqueamento, apenas 6,3% de colônias AmpR (Figura 29).

Figura 29. Curva de crescimento de *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpspA1. Cultivo em *shaker*: não induzido.

Amostras deste cultivo foram analisadas por *SDS-PAGE* e por *Western blot* (Figuras 30, A e B). Através de *SDS-PAGE*, não foi possível identificar com clareza uma banda na região de 60 kDa referente à proteína recombinante após a indução, como já demonstrado para o cultivo a DO mais baixas. O *Western blot* mostra a expressão de rFPspA1 antes da indução por IPTG. Uma hora antes da indução, a intensidade relativa (% relativa) da banda é 21% do total, e vai diminuindo com o tempo, independente da indução (Figura 30, B). Este resultado é contrário ao esperado. O sistema parece não estar reprimindo a expressão da proteína recombinante antes da adição do indutor.

Figura 30. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) e (B) Western blot dos extratos totais de amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpSpA1: 1- 30 min. antes da indução com IPTG; 2- 0 h de indução; 4- 2 h de indução. PM- Padrão de massa molar (Low Range Bio Rad);

Para tentar resolver o problema com o escape de expressão, nos próximos experimentos foi adicionada glicose, que poderia funcionar como um repressor do sistema operon Lac; com isso esperava-se uma melhoria na recuperação de células Amp^R e da expressão.

4.4.2 Cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpSpA1 em fermentador em meio 2YT.

Foi realizado um cultivo em biorreator de 5 L em meio 2YT com 1g/L de Amp, glicose 2 g/L e indução por IPTG 1 mM, com a finalidade de se obter uma quantidade maior da rFPspA1. Pode-se verificar na Figura 31, que a DO_{600 nm} no momento da indução foi 7,3 e a observada no final do cultivo, 15,5. Este resultado foi comparável ao obtido em *shaker*, que apresentou DO₆₀₀ 7,8 na hora da adição do indutor e 12,3 no final do cultivo.

Figura 31 Curva de crescimento de *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpspA1 (azul) e curva de consumo de glicose em biorreator de 5 L (vermelha). Cultivo em meio rico, 2YT. Indução com IPTG (1 mM) a 6 h.

A análise por *SDS-PAGE* e *Western Blot* das amostras do cultivo em biorreator, mostrou o escape de expressão de rFPspA1 antes da adição do IPTG e redução dos níveis de expressão ao longo do cultivo (Figura 32, A e B), confirmando os resultados obtidos em *shaker*.

Figura 32. *SDS-PAGE* e *Western Blot* do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pAE-fpspA1 em meio 2YT em biorreator.

De forma geral, estes experimentos indicaram que as construções baseadas em pAE não foram estáveis em *E. coli*, e portanto, não seriam adequadas para o escalonamento da produção das proteínas recombinantes. Vários problemas foram identificados, como baixa recuperação de células contendo o plasmídeo a partir dos estoques a -20°C (perdas elevadas de células resistentes a Amp durante o cultivo), não alteração nas curvas de crescimento dos cultivos após indução e vazamento de expressão antes da indução. Portanto, decidimos realizar novas construções para expressão de fragmentos de PspA, utilizando um vetor de baixa cópia, baseado em pET com resistência a kanamicina, na expectativa de estabilizar as cepas recombinantes e aperfeiçoar a expressão.

4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE rFPspA1 USANDO O VETOR pET-37b(+)

4.5.1 Construção do vetor de expressão pET37-fpspA1

Os vetores pAE-fpspA1 e pET-37b(+), de 5932 pb, foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde* I e *Eco*R I e os produtos analisados em eletroforese em gel de agarose. A digestão de pET-37b(+) com estas enzimas deve eliminar o fragmento CBD, o S-tag e o sítio de trombina (660 pb). As bandas verificadas no gel de agarose, referentes ao inserto fpspA1 e ao vetor pET-37b(+) digerido, foram purificadas do gel. Uma reação de ligação foi realizada para inserir o gene fpspA1 no vetor de expressão pET37, nos sítios de restrição *Nde* I e *Eco*R I. O produto desta reação foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH α competentes. Colônias selecionadas em meio contendo kanamicina foram utilizadas para as mini-preparações de DNA, que foram analisadas em gel de agarose.

Para verificar se os plasmídeos continham o inserto, fpspA1, foram realizadas digestões dos plasmídeos de 4 clones com as enzimas *Nde* I e *Eco*R I. Os produtos foram analisados em gel de agarose, onde se pôde observar a liberação dos insertos (de aproximadamente 1000 bp) e uma banda em torno de 5200 pb, que corresponde ao vetor pET-37b(+) sem o fragmento fpspA1 (Figura 33). Estes resultados demonstram que o vetor para expressão de rFPspA1 em *E. coli* foi adequadamente construído. O gene fpspA1 havia sido previamente seqüenciado.

Figura 33. Eletroforese em gel de agarose. Análise de restrição dos clones da construção pET-fpspA1. 1 Padrão de massa molar (1 kb plus DNA ladder); 2- Vetor pET não digerido; 3, 5, 7 e 11- clones de 1-4 não digeridos; 4, 6, 8 e 12- clones 1-4 digeridos com *EcoR* I e *Nde* I; 10- DNA de colônia satélite digerido com *EcoR* I e *Nde* I.

4.5.2 Cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em meio 2YT em shaker

E. coli BL21-DE3 competente foi transformada com o novo vetor de expressão pET-fpspA1. As colônias resistentes a kanamicina foram estocadas em glicerol a -20°C até serem utilizadas. A recuperação de colônias a partir do estoque de glicerol a -20°C , em meio sólido 2YT/Kan foi realizada com sucesso. Amostras do estoque a -20°C foram plaqueadas em 2YT e 2YT/Kan, demonstrando recuperação de 100% de colônias KanR.

Todos os pré-inóculos usados apresentaram entre 95-100% KanR. O cultivo em shaker de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em 2YT/Kan foi realizado sem indução e com indução por IPTG. A indução foi realizada a 2,5 h com uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 2,0. Pode se notar que as curvas de crescimento apresentam uma diferença na velocidade de crescimento do induzido em relação ao não induzido (Figura 34). A recuperação de colônias KanR foi muito boa: o cultivo em 2YT, não induzido, apresentou 97% KanR a 0 h e na 10^a h havia 100% de KanR; no cultivo em 2YT induzido, obtivemos 97% a 0 h, 92% a 3,5 h e 100% a 7,5 h. O cultivo induzido apresentou uma fase exponencial mais curta, dentro do esperado.

Figura 34. Curva de crescimento do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker*. Cultivos (2YT + Kan) não induzidos e induzidos com IPTG 1mM. A adição do indutor foi na 2,5 h do cultivo.

A análise da expressão de rFPspA1 por *SDS-PAGE* e por *Western Blot* mostrou a expressão da proteína recombinante através de *SDS-PAGE*, comprovada por *Western Blot* (Figura 35). Pode se observar pelos dados de densitometria, que não ocorreu expressão significativa antes da indução e que a expressão aumentou de 7% a 20% até a 5ª hora da indução, diminuindo para 14% na 7ª hora.

Figura 35. *SDS-PAGE* e *Western Blot* do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker* em meio 2YT induzido com IPTG (1mM); % relativa da banda obtida de *SDS-PAGE*, análise por densitometria.

4.5.3 Cultivo em meio 2YT com indução por lactose em *shaker*

Foram realizados cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em meio rico 2YT, onde se testou a indução com lactose, analisando o consumo de lactose e a expressão de rFPspA1. Pode-se observar que o crescimento e indução com lactose seguem um padrão comparável ao obtido com IPTG (Figura 36). O consumo de lactose foi de aproximadamente 45%. A lactose, além de estar sendo utilizada como um indutor, pode estar servindo como fonte de carbono para a bactéria.

Figura 36. Curva de crescimento do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker* em meio 2YT: Curva de crescimento referente ao cultivo não Induzido; Curvas de crescimento referentes: ao cultivo induzido com IPTG 1 mM (Induzido por IPTG); ao cultivo Induzido com lactose 28 mM (Induzido por Lactose); Concentração de lactose (g/L). O indutor foi adicionado ao meio, na 3ª h de cultivo.

Figura 37. SDS-PAGE de amostras do cultivo *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker* em meio 2YT e com indução por lactose. Padrão de massa molar (MM).

O SDS-PAGE das amostras do cultivo realizado em meio rico, 2YT, revelou que a lactose induziu a expressão de rFPspA1, uma hora após a adição desta ao meio (Figura 37), assim como na indução com IPTG.

Foi verificado nos cultivos em meio 2YT, que pode ocorrer um pequeno escape de expressão da rFPspA1, observável apenas por *Western blot*. No entanto, a adição de glicose (2 ou 4 g/L) retardou ou inibiu este escape (dados não apresentados).

4.6 PURIFICAÇÃO DE rFPspA1 POR CROMATOGRAFIAS DE AFINIDADE E DE TROCA IÔNICA, CONSTRUÇÃO EM pET-37b(+)

A fim de se comparar o rendimento de rFPspA1 obtido do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1 com o verificado para a construção anterior (pAE-fpspA1), foi realizado um processo de purificação semelhante. Para a purificação da proteína recombinante partiu-se de um cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1 em meio 2YT/Kan. A purificação foi realizada a partir de um volume de 200 mL de cultivo em *shaker*, onde a massa celular foi ressuspensa em tampão apropriado e rompida por sonicação. O lisado total foi centrifugado e o sobrenadante, filtrado em membrana de 0,45 µm foi denominado Extrato Total. O Extrato Total foi equilibrado com tampão de lise para ser utilizado nas cromatografias. Primeiramente a amostra foi aplicada a uma coluna de Ni⁺⁺-Sephrose previamente equilibrada, que foi lavada com vários tampões de eluição. A proteína recombinante foi eluída com imidazol, como já descrito. Pelo fato da fração

eluída da cromatografia de afinidade conter ainda uma quantidade significativa de impurezas, a fração foi submetida a uma coluna de troca iônica (Q-Sepharose), eluída com NaCl. As frações cromatográficas foram coletadas e posteriormente analisadas por *SDS-PAGE* e por *Western blot*.

Pode se observar pela análise das amostras das frações cromatográficas em *SDS-PAGE*, uma banda na região de 60 kDa referente à rFPspA1, que não é observada na amostra não induzida (Figura 38). A fração F2-Ni não apresenta nenhuma banda visível no gel, indicando que não ocorreu perda de rFPspA1 nas lavagens. A fração F3-Ni mostra uma banda majoritária na região esperada para rFPspA1, com baixa proporção de contaminantes em relação às frações anteriores. Como F3-Ni apresentava ainda algumas impurezas, esta foi submetida a uma nova cromatografia (troca iônica). Estando a fração F3-Ni com alta concentração de imidazol e em grande volume, a fração foi concentrada e lavada com Tris 25 mM, utilizando-se uma membrana com *cut off* de 10 kDa. Quando a força iônica diminuiu, verificou-se sobre a membrana, a formação de um precipitado. Uma alíquota de F3-Ni concentrada, contendo o precipitado, foi analisada por *SDS-PAGE* (Figura 38, poço 7) e mostrou além da proteína de interesse (rFPspA1), outras proteínas, que são aqui consideradas como impurezas. A F3-Ni contendo o precipitado foi centrifugada a 12000 g por 30 min e o sobrenadante analisado em *SDS-PAGE*, demonstrando uma considerável eliminação de impurezas. O precipitado proveniente da fração F3-Ni concentrada foi analisado por *SDS-PAGE* e também por *Western blot*, apresentando uma grande quantidade de impurezas e uma baixa concentração de rFPspA1 insolúvel (dados não apresentados). Portanto, a F3-Ni concentrada e clarificada foi aplicada a uma coluna de troca iônica, Q-Sepharose e a eluição foi feita em gradiente de NaCl. As frações de F1-Q à F3-Q não apresentaram bandas. A fração F4-Q mostra bandas de impurezas nas regiões abaixo de 30 kDa e acima de 66 kDa. A fração F5-Q apresenta uma banda na região de 60 kDa, referente à rFPspA1. A F6-Q apresenta uma baixa concentração de rFPspA1, porém com muitas impurezas. Já as frações F7-Q e F8-Q parecem ter mais impurezas que rFPspA1.

Figura 38. SDS-PAGE de frações de purificação de rFPspA1 apartir de extratos de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpA1. 1- Marcador de massa molar (MM); 2- Extrato total de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpA1, não induzido (NI); 3- Extrato total de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpA1, induzido com IPTG; 4- F1-Ni; 5- F2-Ni; 6- F3-Ni; 7- F3-Ni concentrado em membrana de 10 kDa; 8- Sobrenadante do concentrado em 10 kDa; 9- MM; 10- F1-Q; 11- F2-Q; 12- F3-Q; 13- F4-Q; 14- F5-Q; 15- F6-Q; 16- F7-Q; 17- F8-Q.

As frações provenientes das duas cromatografias foram analisadas por *Western blot*, confirmando a identidade da proteína recombinante (rFPspA1), reconhecida pelo anticorpo anti-rFPspA1 (Figura 37). A fração F5-Q, contendo a rFPspA1 purificada (Figuras 38, poço 7), foi utilizada em experimentos de imunização de camundongos para avaliação da imunogenicidade.

Figura 39. Western blot de frações de purificação de rFPspA1 apartir de extratos de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpA1. 1- Extrato total não induzido (NI); 2- Extrato total induzido por IPTG; 3- Extrato total (clarificado); 4- F3-Ni; 5- F3-Ni concentrado em membrana de 10 kDa; 6- Sobrenadante do concentrado em 10 kDa; 7- F5-Q; 8- Extrato total de *E. coli* sem o plasmídeo; 9- Extrato total de *Streptococcus pneumoniae* (linhagem 435/96, sorotipo 1).

4.6.1 Rendimento de purificação de rFPspA1 na construção em pET

O Extrato Total (sobrenadante da bactéria lisada) continha 125 mg de proteínas (Tabela 8). A densitometria da SDS-PAGE do Extrato Total (Figura 40, A) mostrou que 16% desta, apresentou a massa molar esperada para rFPspA1, o que corresponderia a 20 mg, considerando-se a aproximação de que este pico seria majoritariamente a proteína recombinante. Para se determinar a percentagem de proteína específica, rFPspA1, em cada uma das frações da purificação, foram realizadas análises por densitometria das amostras separadas em *SDS-PAGE* referentes a cada fração do processo.

A fração F3-Ni-10 kDa, refere-se à fração de eluição da Ni-Sepharose com imidazol que contém a maior quantidade da proteína recombinante, após concentração em membrana de 10 kDa. Esta fração continha 31 mg, com aproximadamente 55% de rFPspA1, o que representaria 17 mg. Isto significa uma recuperação de aproximadamente 84% da proteína recombinante nesta etapa, com um fator de purificação de 3,5 (Tabela 8). O sobrenadante clarificado desta fração (F3-Ni-10 kDa/clarificado) eliminou uma parte dos contaminantes, mas também rFPspA1, com uma recuperação total de 65% e fator de purificação 4,0. Na última etapa de purificação em Q-Sepharose, recuperou-se 6 mg, com 89% de proteína recombinante (Figura 40, C), ou seja 5 mg de rFPspA1. Esta etapa apresentou uma menor recuperação, ao redor 40% de proteína recombinante ou 25% do total inicial, apresentando um fator de purificação global de 5,6 (Tabela 8).

Figura 40. Densitometria das frações de purificação de rFpspA1 dos cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em shaker. A curva em verde representa a absorção, a curva rosa refere-se à linha de base. Lane 2 (A): extrato inicial; Lane 8 (B): F3-Ni concentrada em membrana de 10 kDa e clarificada e o lane 6 (C): F5-Q.

Tabela 8 – Purificação de rFPspA1 de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1

Amostras	Prot. Total (mg)	rFPspA1 (%)	rFPspA1 (mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação
Extrato Total	125	16	20	100	1
[F3-Ni 10 kDa]	31	55	17	84	3,5
[F3-Ni-10 kDa] clarificado	21	63	13	65 (77)*	4,0 (1,1)*
F5-Q	6	89	5	25 (39)*	5,6 (1,4)*

O extrato total provém de 200 mL de cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1. ()* refere-se à percentagem de recuperação e fator de purificação em relação ao passo anterior.

Estes resultados indicam que a nova construção (pET37-fpspA1) produziria aproximadamente 30 mg de rFPspA1 por litro de cultivo, o que representa um aumento de 3 vezes no rendimento.

4.7 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM HDF PARA PRODUÇÃO DE rFPspA1

4.7.1 Cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em meio mínimo definido HDF em shaker

Foi inicialmente realizado o cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 com HDF/Kan, em shaker, com e sem indução por IPTG 1mM. A adição do indutor foi a 4,5 h, quando a DO_{600nm} estava em aproximadamente 1,5 (Figura 41). Pode se notar uma diferença no perfil da curva de crescimento, quando comparados os cultivos induzido e não induzido. *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 inoculada em meio HDF sem kanamicina e sem indução mostrou recuperação de 100% KanR ao longo de todo o cultivo. O cultivo induzido tem uma fase exponencial mais curta que a do não induzido, o que está de acordo com a literatura.

Figura 41. Curvas de crescimento e de consumo de glicose para o cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em shaker em meio HDF/Kan: Curvas de crescimento dos cultivos: não Induzido (NI), Induzido com IPTG 1 mM; Consumo de glicose nos cultivos: não induzidos (Cons. glicose NI) e nos cultivos induzidos com IPTG (Cons. glicose IPTG). A adição do indutor foi na 4,5 h.

A expressão da proteína recombinante é facilmente observada no *SDS-PAGE* e comprovada por *Western Blot* (Figura 42); a expressão vai aumentando de 12 a 30% até a 5^a h da indução; neste caso não foi observada a diminuição da expressão.

Figura 42. SDS-PAGE e Western Blot de amostras do cultivo em *shaker*, de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 meio HDF induzido com IPTG (1 mM) a 4,5 h; % relativa da banda obtida por densitometria.

4.7.2 Cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em meio HDF com glicose ou glicerol

4.7.2.1 Indução com IPTG ou lactose

Foram realizados alguns experimentos com cultivos em *shaker* com meio definido, HDF/glicose ou HDF/glicerol. Na indução, também foi investigado o uso de IPTG (1mM) ou de lactose. A lactose pôde ainda ser testada como fonte de carbono (Figura 43). A recuperação de colônias KanR foi de aproximadamente 90-100% do início do cultivo até o momento da indução. Após 5 horas de indução por lactose a recuperação foi de 52% KanR. Os cultivos induzidos por IPTG apresentaram recuperação de aproximadamente 17% KanR.

Figura 43. Curvas referentes aos cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker* em meio HDF/glicose. Curvas de crescimento dos cultivos: não induzido (NI), Induzido com lactose, Induzido com IPTG (1mM); Curvas de consumo de glicose: para o cultivo não induzido (Cons. glicose NI), para o cultivo induzido por lactose (Cons. glicose Lactose), para o cultivo induzido por IPTG (Cons. glicose IPTG); Curva de consumo de lactose no cultivo induzido com lactose (Cons. Lactose). A adição do indutor foi a 4,5 h.

As curvas de consumo de glicose apresentaram um perfil semelhante para todos os cultivos induzidos e não induzidos (NI) por lactose ou IPTG. O consumo de lactose nestes experimentos foi baixo (10%). Estes mesmos experimentos foram realizados para o cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 com HDF/glicerol e se mostraram semelhantes (dados não apresentados).

As amostras dos cultivos foram analisadas por *SDS-PAGE*. No cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-f_hspA1 em meio HDF/glicose, a indução feita por IPTG ocorre 1,5 h depois da adição do indutor, enquanto a indução por lactose ocorre de 2,5 a 3 h depois da adição (Figura 44).

Figura 44. *SDS-PAGE* do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-f_hspA1 em HDF/glicose (20 g/L) Poço 1: Padrão de massa molar (MM); 3-4,5: Amostras do cultivo controle, não induzido (NI); 5-10: Amostras induzidas por lactose e/ou IPTG.

Os dados de indução nos cultivos em HDF/glicose, foram analisados por densitometria (Figura 45), confirmando que a indução de expressão por lactose ocorre mais tarde. Os resultados para os cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em meio HDF/glicerol foram similares (não apresentados).

Figura 45. Densitometria a partir do *SDS-PAGE* das amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker* em meio HDF/glicose: Curvas para os cultivos: não induzido; Induzido por lactose; Induzido com IPTG. A adição do indutor foi a 4,5 h do início do cultivo.

4.7.3 Cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 com HDF/glicose em pulsos em *shaker*

Foram realizados experimentos em *shaker* com HDF utilizando glicose como fonte de carbono. Os cultivos começavam com concentração de glicose 5g/L e quando esta alcançou valores próximos de zero, em 5 h, foi dado um pulso do substrato (10 g/L), Figura 46. Este foi quase totalmente consumido em mais 5 h de cultivo.

Nestas condições, a $DO_{600\text{ nm}}$ no final do cultivo alcançou aproximadamente 7 e estabilizou-se. Para cultivos onde se dá o pulso de glicerol ou lactose, as curvas apresentam um perfil similar (dados não apresentados). A formação de ácido acético nesses cultivos foi baixa.

Figura 46. Curva de crescimento do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker* em meio HDF/glicose com pulso de glicose: Curvas de: crescimento do cultivo não induzido; formação de ácido acético; consumo de glicose durante o cultivo. O pulso de glicose foi dado na 5ª h.

4.7.4 Cultivos em HDF/glicose com indução por lactose, lactose + IPTG 0,1 mM e por lactose + IPTG 1 mM

Foram realizados cultivos com HDF/glicose, com indução por pulso do indutor: lactose 10 g/L, lactose + IPTG 0,1 mM ou lactose + IPTG 1 mM. Todas as curvas de crescimento apresentaram $DO_{600\text{ nm}}$ entre 10 e 12, após 10 h de cultivo (Figuras 47, 48 e 49). As curvas de consumo de glicose, que começam com 5 g/L, chegam a zero em 5 h, ponto em que é adicionado o indutor. No caso das curvas induzidas por lactose ou lactose + IPTG 0,1 mM é observado um período de latência entre 5 e 7 h de cultivo (Figuras 47 e 48), o que não se verifica para o cultivo com lactose + IPTG 1 mM (Figura 49). Este período de latência pode ser explicado pela troca de glicose por lactose e pelo fato do cultivo ter ficado algum tempo sem a fonte de carbono. Pôde-se observar que o consumo de lactose foi de quase 100% e a formação de ácido acético, aproximadamente zero.

Figura 47. Curva de crescimento de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em shaker em meio HDF/glicose ($DO_{(600\text{ nm})}$). Indução por lactose (Lactose); Curvas de: Consumo de glicose (Glicose); Consumo de lactose (Cons. Lactose); formação de ácido acético (Ac. Acético). A adição do indutor foi na 5ª h de cultivo.

Figura 48. Curva de crescimento de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em shaker em meio HDF/glicose ($DO_{(600\text{ nm})}$). Indução por lactose + IPTG (0,1 mM); Curvas de: Consumo de lactose (Cons. Lactose); formação de ácido acético (Ac. Acético). A adição do indutor foi na 5ª h de cultivo.

Figura 49. Curva de crescimento de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em shaker em meio HDF/glicose (DO_(600 nm)). Indução por lactose + IPTG (1 mM); Curvas de: Consumo de glicose (Glicose); Consumo de lactose (Lactose); formação de ácido acético (Ác. Acético). A adição do indutor foi na 5ª h de cultivo.

Amostras dos cultivos induzidos por pulsos de lactose com e sem IPTG foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 48). A expressão induzida por lactose é verificada aproximadamente 3,0 h após a adição do indutor, com expressão máxima após 6 h. Na indução por lactose + IPTG 0,1 mM a expressão é observável entre 2-3 h da indução e é máxima após 3 h. Já na indução por lactose + IPTG (1 mM) a expressão foi vista nitidamente a partir de 2 h e é máxima 3 h após.

Estes dados são comprovados por densitometria (Figura 51). Estes resultados mostram que o cultivo em HDF/glicose com indução apenas por lactose é eficiente, mas ocorre mais tarde que a indução por lactose na presença de IPTG 0,1 ou 1 mM.

Figura 50. SDS-PAGE de amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker* em HDF/glicose. Indução por lactose; lactose + IPTG 0,1 mM e por lactose + IPTG 1 mM. Poço 1-Padrão de massa molar (MM). A adição do indutor foi na 5ª h de cultivo.

Figura 51. Densitometria a partir do *SDS-PAGE* das amostras dos cultivos em *shaker* com HDF/glicose. Curvas de Indução por: lactose (Lactose); por lactose + IPTG 0,1 mM e por lactose + IPTG 1 mM. A adição do indutor foi na 5ª h de cultivo.

4.7.5 Cultivos em HDF/ glicerol com pulsos de lactose, de lactose + IPTG (0,1 mM) e de lactose + IPTG (1 mM)

Foram realizados cultivos em *shaker*, em meio HDF usando-se o glicerol como fonte de carbono. Os cultivos começavam com concentração de glicerol de 10 g/L e quando essa concentração atingia valores próximos de zero, dava-se um pulso de aproximadamente 10 g/L de lactose com ou sem IPTG. As curvas de consumo de glicerol chegam a zero em aproximadamente 12 h (Figura 52). A adição do indutor (lactose 10 g/L, lactose + IPTG 0,1 mM ou lactose + IPTG (1 mM)), ocorreu na 7ª hora de cultivo. As curvas de crescimento apresentam a $DO_{600\text{ nm}}$ próxima de 7, no tempo 10 h. Estas curvas apresentam perfis semelhantes e por isso optamos por mostrar apenas as curvas do cultivo com pulso de lactose + IPTG 0,1 mM. Os cultivos induzidos não apresentaram a fase de adaptação (latência), observada nos cultivos com HDF/glicose. No entanto, houve pouco consumo de lactose após o pulso. Além disso, observou-se pouco crescimento do cultivo após a indução.

Figura 52. Curva de crescimento do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em *shaker* em meio HDF/glicerol (DO 600 nm). Curvas de: Consumo de glicerol durante o cultivo (Cons. Glicerol); consumo de lactose (Cons. Lactose) e de formação de ácido acético (Ac. Acético). A adição do indutor (Lactose + IPTG 1 mM) foi na 7ª h de cultivo.

As amostras dos cultivos em HDF/glicerol foram analisadas por *SDS-PAGE* e a expressão de rFPspA1 após indução por lactose foi baixa. Nestes experimentos temos indução e expressão, porém, quase sem consumo da lactose. A lactose pode ser consumida concomitantemente com o glicerol, que não é repressor catabólico da lactose (Figura 52). O cultivo com indução por lactose + IPTG 0,1 mM, apresentou uma banda expressiva na região de 60 kDa a partir da 8ª h de cultivo, 1-2 hora, após a indução (Figura 53). Já o cultivo induzido por lactose + IPTG 1 mM exibiu no *SDS-PAGE*, um comportamento parecido, porém com a expressão mais elevada. Todos os cultivos em HDF/glicerol apresentam expressão máxima, 2 h após a adição do indutor. Estes resultados foram comprovados por densitometria (Figura 54).

Figura 53. SDS-PAGE dos cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em shaker. Cultivo em meio HDF/glicerol com indução por lactose / IPTG 1 mM. Poço 1-Padrão de massa molar (MM). A adição do indutor foi na 7ª h de cultivo.

Figura 54. Densitometria a partir do SDS-PAGE do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em shaker com HDF/glicerol. Curvas referentes à: Indução com IPTG 0,1 mM (IPTG 0,1 mM); com IPTG 1 mM (IPTG 1 mM); indução com lactose + IPTG 0,1 mM e com lactose + IPTG 1 mM. A adição do indutor foi na 7ª h de cultivo.

4.8 CULTIVO PRELIMINAR DE *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 EM BIORREATOR

4.8.1 Cultivo em HDF/glicose

Um cultivo foi realizado em meio HDF/glicose em biorreator de 5 L, coletando-se alíquotas para serem analisadas posteriormente. Como as dosagens de glicose demoram em torno de 20 min, tornando-se inviáveis para o acompanhamento do processo, usamos o aumento da concentração de oxigênio dissolvido, como sinal do esgotamento da fonte de carbono (% OD > 50). Entre 7 e 8 h de cultivo houve um aumento da percentagem de oxigênio dissolvido; com isso, esperava-se que a fonte de carbono estivesse se esgotando (concentração entre 0-1 g/L), momento que seria ideal para a adição do indutor. Neste momento, deu-se um pulso de lactose (20 g/L). Depois de finalizado o cultivo, algumas alíquotas foram separadas e aplicadas em HPLC, a fim de se analisar alguns parâmetros, como consumo de glicose e de lactose, e a quantidade de ácido acético formado durante o cultivo (Figura 55). Os resultados obtidos indicaram que, no momento da adição da lactose (indutor), a fonte de carbono não havia sido esgotada, o que não é ideal para indução da expressão da PspA recombinante.

Figura 55. Cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-pET-fpspA1 em biorreator em meio HDF/glicose (20 g/L): Curva de crescimento (DO 600 nm); curva de consumo de glicose (Cons. Glicose); consumo de lactose (Cons. Lactose); Percentagem de Oxigênio Dissolvido (OD%); formação de ácido acético (Ac. Acético). A adição de indutor (na forma de pulso com lactose) ao meio de cultivo foi entre 7-8 h.

As amostras foram analisadas em *SDS-PAGE* e *Western blot*, e não se observou a expressão da proteína recombinante. Isto poderia ser atribuído ao fato de a adição do indutor ter ocorrido antes da glicose ter sido totalmente esgotada, o que poderia inibir a indução da expressão.

.....

5. DISCUSSÃO

Infecções por *Streptococcus pneumoniae* representam um sério problema de saúde pública, acometendo indivíduos de todas as idades, sobretudo crianças abaixo de 5 anos de idade e adultos acima de 60 ¹¹⁶. Até a década de 1970, *S. pneumoniae* era uma das poucas bactérias que se mantinha sensível à penicilina. Atualmente, existem isolados clínicos de linhagens resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis e linhagens multi-resistentes já foram caracterizadas ⁶³. Diversas linhas de pesquisa têm auxiliado no planejamento e estratégias de controle, na tentativa de se reduzir a mortalidade e morbidade, causadas por infecções pneumocócicas ^{116, 117}. Nas últimas décadas, características importantes desse agente têm sido apontadas, como por exemplo, a caracterização de alguns fatores de virulência, como o polissacarídeo (PS) e proteínas de superfície, como por exemplo, PsaA e PspA, que surgem como fortes candidatas a antígenos vacinais ^{118, 119}. Visto que o PS é um dos principais fatores de virulência, uma primeira vacina (Pneumo-23) foi desenvolvida apenas por PS de diversos sorotipos, embora esta tenha se mostrado eficiente para uma parcela da população infectada (acima de 5 anos de idade), mostrou-se pouco eficaz nos principais grupos de risco (abaixo de 5 anos de idade e maiores que 60). Para ampliar o espectro de cobertura contra as infecções causadas por pneumococos, uma das primeiras alternativas foi a conjugação de PS com proteínas carreadoras como, por exemplo, a toxina diftérica mutada. Essa vacina mostra-se eficiente nos principais grupos de risco, porém apresenta um alto custo. Diversas linhas de pesquisa estão sendo investigadas, visando o desenvolvimento de uma vacina de ampla cobertura vacinal e de baixo custo. Uma das características importante de um candidato vacinal seria sua expressão constitutiva e sua conservação nas linhagens circulantes. Há indícios de que a PsaA apresenta essas propriedades. Isso levou as Dras. Eliane N. Miyaji e Márcia Gamberini, em colaboração com a Dra. Maria Cristina C. Brandileone (IAL) a estudos acerca da conservação dos genes *psaA* de 3 cepas dos sorotipos mais prevalentes no Brasil (1, 6B e 14). Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de BCG Recombinante, do Instituto Butantan. Após a amplificação dos genes por PCR, verificou-se que as seqüências eram praticamente idênticas às seqüências de *psaA* disponíveis no GenBank. Em complemento, investigou-se a reatividade cruzada de anti-soro gerado contra a rPsaA com um painel de cepas isoladas no Brasil, SILVA *et al.*, 2004 (em fase de elaboração)¹. De forma geral, os resultados confirmaram a conservação de PsaA no cenário das

¹ SILVA *et al.*, São Paulo, 2004 (em fase de elaboração).

cepas de pneumococos de ação invasiva, isoladas no Brasil, reforçando a possibilidade do uso dessa proteína, como componente de uma vacina de ampla cobertura.

Expressão e purificação de rPsaA

A PsaA foi purificada pela primeira vez, a partir de *S. pneumoniae* sorotipo 22 F por THARPE e RUSSEL (1996)¹²⁰. Foi liberada e purificada das células por lise na presença de *n*-laurilsarcosino, seguida por precipitação com sulfato de amônio e subsequente focalização isoelétrica. O rendimento foi de 200 µg de PsaA por g de extrato total de pneumococo (massa úmida). Este procedimento foi usado para caracterizar a PsaA, mas não seria conveniente para a produção industrial como componente de uma vacina protéica. Assim sendo, necessitaria de uma alternativa, como a expressão recombinante, na tentativa de encontrar um sistema satisfatório para escalonamento.

O grupo de Pilling (1998)¹²¹ clonou o gene *psaA* no vetor pLE-30 que continha uma sequência codificadora de uma cauda de histidina. As bactérias transformadas com este vetor foram cultivadas e em seguida a cultura foi lisada por uma prensa francesa, “French pressure”. O sobrenadante foi submetido à cromatografia em DEAE-Sepharose e a cromatografia de afinidade. A fração eluída apresentou uma pureza de 95% em *SDS-PAGE* e rendimento de 12 mg/L de cultura. A proteína foi usada para ensaios preliminares de análise cristalográfica.

De, B.K. et. al., 1999⁵⁶ amplificou o gene *psaA* de *S. pneumoniae* e o clonou em um sistema de expressão em Baculovírus. Para gerar baculovírus recombinantes expressando PsaA pelo protocolo Bac-to-Bac, duas linhagens de células de inseto foram utilizadas (Sf9 e High-Five). A rPsaA foi parcialmente purificada por partição em tampão PBS/Triton X-114 e por cromatografia em filtro de troca iônica fracamente básica. O rendimento foi de aproximadamente 2,5 mg/L de cultura. A expressão foi verificada por *SDS-PAGE* e por *Western blot* e ensaios de ELISA mostraram que anti-soros anti-rPsaA reconheceram a proteína nativa (cepa 6B). Como se verifica, estes dados apresentam um modelo difícil de trabalhar, além de um rendimento bem abaixo daquele mostrado pelo grupo de Pilling¹²¹.

Em outro trabalho do grupo do De, B.K. (2000)¹²², a PsaA foi expressa em *E. coli* HMS174-DE3/pLysS transformada com os plasmídeos pOPsaA.7 e pLF100. A cultura foi centrifugada e tratada com lisozima, DNase e Triton X^R-114. Para remover o Triton do isolado de rPsaA, aplicou-se a amostra a um filtro cromatográfico de troca iônica, como no trabalho anterior. Para concentrar a rPsaA eluída, foi usada uma coluna de troca iônica (Q-100), a

dessalinização foi feita usando-se um micro concentrador Centricon-100. A pureza da rPsaA foi de aproximadamente 90%. O rendimento de purificação foi de 5 mg/L. Ambas as proteínas foram testadas em camundongos e apresentaram respostas similares por ELISA. O rendimento é um pouco melhor que o obtido no trabalho anterior deste mesmo grupo (De, B.K., 2000)¹²², porém ainda abaixo do verificado para o grupo do Pilling¹²¹.

De, B.K *et al*, (2003)¹²³, analisam por espectrometria de massa, uma PsaA recombinante acilada. O gene *psaA* foi expresso como uma proteína acilada, não fusionada, em um sistema de expressão em *E. coli*. Na purificação foi feito um primeiro tratamento com Triton X^R-114, como descrito no trabalho anterior, submetida a uma cromatografia em coluna DEAE-Sepharose, seguido por uma cromatografia de afinidade. Paralelamente foi purificada a PsaA nativa a partir de *S. pneumoniae*, usando processo similar. Para remover o restante de Triton X^R-114 e o excesso de sal, algumas diálises foram necessárias. O rendimento da rPsaA purificada foi de 8-10 mg/L de cultivo, resultado próximo ao obtido por Pilling¹²¹. A análise da rPsaA por espectrometria de massa confirmou 98% da sequência esperada para a proteína.

As diversas tentativas de expressão e de purificação de PsaA descritas até o momento, utilizam-se de processos laboriosos e/ou obtêm baixo rendimento de proteína recombinante. Diante da possibilidade de inclusão desta proteína em uma nova vacina anti-pneumocócica protéica combinada, surgiu a necessidade de se desenvolver um processo de expressão e purificação mais eficiente.

É neste contexto que se insere a primeira parte desta tese, onde nosso objetivo foi melhorar os processos para a expressão e purificação de rPsaA maximizando o rendimento. Neste projeto o gene *psaA* (930 pb) foi clonado sem a sequência sinal e com uma cauda de histidina no vetor de expressão em *E. coli*-pAE. Os cultivos foram realizados em meio 2YT e a indução foi feita por IPTG. A rPsaA foi expressa na forma solúvel em *E. coli* BL21-DE3 e um processo de purificação simplificado foi desenvolvido de acordo com o esquema a seguir (Figura 56), esquema também utilizado para a purificação de rFpSpA1 e rFpSpA3. Cabe ressaltar que a sonicação não é aplicada à larga escala, assim sendo, a sonicação pode ser substituída por moinho de bolas ou prensa francesa (alta pressão).

Figura 56. Esquema do processo de purificação da PsaA recombinante.

A purificação de rPsaA a partir do Extrato Total foi realizada inicialmente por cromatografia de afinidade em coluna Ni^{++} -Sepharose e a eluição foi feita por imidazol. A análise por *SDS-PAGE* e *Western blot* das frações coletadas durante esta cromatografia confirmaram a eluição de rPsaA por imidazol (a partir de 50 mM). Portanto, fixou-se a concentração de 250 mM de imidazol, a fim de se evitar o arraste de eluição da proteína de interesse nas frações e com isso obteve-se um pico majoritário referente a rPsaA em uma única fração. Pelo fato de ainda restar uma quantidade significativa de proteínas contaminantes de alta e baixa massa molar, esta fração foi submetida à cromatografia de troca iônica. Esta cromatografia eliminou principalmente os contaminantes de baixa massa molar (abaixo de 30 kDa), mas não conseguiu eliminar totalmente os de alto peso (acima de 40 kDa). A recuperação de rPsaA foi de 10 mg/L de cultura, o que é comparável aos rendimentos descritos na literatura. Porém, o processo desenvolvido envolve um menor número de etapas de purificação quando comparado com os demais processos descritos; mesmo assim, ainda será necessário o aprimoramento das condições de cultivo e otimização do

processo de purificação, para a ampliação da escala de produção. A rPsaA purificada mostrou ser funcional, inibindo a adesão dos pneumococos às células epiteliais (experimentos realizados em nosso laboratório, pela Dra. Eliane N. Miyaji) e os soros produzidos contra a rPsaA reconheceram a PsaA nativa em extratos celulares de pneumococos, SILVA *et al*, 2004 (em fase de elaboração)^{II}.

A expressão de rPsaA continua sendo investigada em outros sistemas. O grupo do Cullen (2003)¹²⁴ construiu e avaliou um plasmídeo (pDUMP) para a expressão de lipoproteínas em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Neste sistema foi mostrado que o alto nível de expressão de proteínas recombinantes aciladas ocorre quando são induzidas as seqüências que codificam formas processadas de lipoproteínas Gram-negativas e Gram-positivas, e que a proteína é exportada para a superfície celular da *E. coli*.

Expressão e purificação de PspA

A PsaA é mais conservada e induz principalmente proteção contra colonização. Por outro lado, a PspA mostra-se altamente imunogênica, apresentando-se relativamente conservada e agrupada em clados e famílias. Uma vez que a PspA também se mostrou protetora contra bacteremia e infecção pulmonar em camundongos é considerada uma forte candidata vacinal. No entanto, a presença da região de ligação desta a colina, dificulta a expressão da PspA em sistemas heterólogos. Diante das dificuldades para se expressar e purificar a PspA nativa em *E. coli*, alguns grupos tem relatado estudos de expressão e purificação de fragmentos de PspA.

Jedrzejewski *et al* (2000)²⁰ utilizaram o vetor de expressão pET-20b, contendo o promotor T7, em *E. coli* BL21-DE3 (ambos, promotor e bactéria, são os mesmos utilizados em nosso projeto) expressou e purificou um fragmento de 303 aminoácidos (1-303), da porção N-terminal de PspA de *Streptococcus pneumoniae*, da cepa Rx1. A purificação da rPspA (34 kDa) ocorreu em 4 etapas, incluindo cromatografia em Ni⁺⁺-Sephadex, Mono Q-Sephadex e Gel Filtração, apresentando um rendimento de aproximadamente 12 mg/L.

Lamani *et al* (2000)¹²⁵, utilizaram os vetores de expressão, pET-15b e pET-21a, contendo também o promotor T7, inserindo fragmentos da porção amino terminal de PspA, também amplificados por PCR a partir da cepa Rx1. O tamanho destes fragmentos foi de 24 a 32 kDa, correspondendo aos aminoácidos 67-272 (rPspA-206), 1-236 (rPspA-236) e 1-272 (rPspA-272). A expressão também foi realizada em *E. coli* BL21-DE3 e a indução, feita por IPTG. Para a

^{II} SILVA *et al.*, São Paulo, 2004 (em fase de elaboração).

purificação das proteínas foram utilizadas: DEAE-Sepharose, Ni-Sepharose (eluição com imidazol 1M), Mono Q-Sepharose (eluição com NaCl 0,5 M), e por fim, uma Gel Filtração. Este processo apresentou um rendimento de aproximadamente 12 mg/L. Lamani testou ainda, a expressão com e sem cauda de histidina, vindo a verificar, que praticamente não houve diferença no rendimento de purificação das proteínas recombinantes.

Diante das perspectivas da utilização de PspA para composição de uma vacina protéica, o objetivo da segunda parte desta tese foi desenvolver um processo de expressão e purificação de fragmentos de PspA contendo os epítomos mais importantes de PspA.

Utilizamos fragmentos N-terminais de PspA (incluindo a região rica em prolina) um pouco maiores (1092 e 1119) que os descritos na literatura. Optamos por estudar os clados 1 e 3 pertencentes às famílias 1 e 2, uma vez que estas duas famílias representam praticamente 99% da prevalência nos sorotipos até agora isolados. Os fragmentos de pspA, fpSP1 e fpSP3 foram clonados no vetor de expressão, pAE. *E. coli* BL21-DE3 transformadas com os vetores pAE-fpSP1 e pAE-fpSP3 foram selecionadas para se estudar a expressão e purificação das proteínas recombinantes, rFPSP1 e rFPSP3.

Para a obtenção das proteínas rFPSP1 e rFPSP3 utilizou-se condições de cultivo e purificação similares às estabelecidas na purificação de rPsaA, uma vez que estas também foram expressas solúveis. A fração em que a proteína foi eluída da Ni-Sepharose, não eliminou todas as impurezas e portanto, esta foi também submetida à cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose). A identidade das proteínas purificadas foi confirmada por *SDS-PAGE* e *Western blot*.

Os rendimentos de purificação obtidos foram também semelhantes aos descritos na literatura, 11 e 12 mg/L de cultivo, para rFPSP1 e de rFPSP3, respectivamente. Portanto, pode-se considerar que a purificação destas proteínas mostrou-se satisfatória, uma vez que foram obtidos rendimentos comparáveis aos já descritos, utilizando um processo desenvolvido com menor número de etapas de purificação. Além disso, rFPSP1 e rFPSP3 são eluídas da Ni⁺⁺-Sepharose, com menor concentração de imidazol, o que poderia reduzir ainda mais o custo do processo. Mesmo assim, consideramos que ainda é possível uma otimização do processo na ampliação de escala.

Resposta imune induzida em camundongos contra rPsaA, rFPSP1 e rFPSP3

Um experimento de imunização foi realizado, visando caracterizar a imunogenicidade das proteínas recombinantes. A administração de rPsaA induziu elevado título anti-psaA, com pouca

reatividade cruzada com rFPspA1 e rFPspA3. Os grupos imunizados com rFPspA1 ou rFPspA3 também apresentaram elevado título contra as respectivas proteínas, e como esperado, observou-se baixa reatividade cruzada dos anti-soros com as proteínas de diferentes famílias. Os experimentos nos quais se utilizou o CFA como adjuvante indicaram haver alguma competição antigênica entre as proteínas quando estas foram combinadas, porém este efeito foi menor quando se usou Al(OH)₃ como adjuvante. No geral, o experimento mostrou a indução de elevados títulos de anticorpos contra as proteínas recombinantes. Outros ensaios serão realizados para caracterizar a proteção induzida por estas proteínas recombinantes contra desafio com as cepas das famílias 1 e 2.

Experimentos para a ampliação de escala e para aprimorar a expressão de rPsaA, rFPspA1 e rFPspA3

Uma vez que foi possível obter as proteínas recombinantes com bom rendimento (10-30 mg/L) e que estas se mostraram imunogênicas, tornou-se interessante investigar a ampliação de escala de produção de proteínas recombinantes. Foi necessário preparar os lotes sementes e caracterizar a estabilidade dos plasmídeos, para depois estabelecer as condições de cultivo em biorreatores. A utilização de cultivos de alta densidade de *E. coli* é utilizada quando se deseja obter alta produtividade. Portanto, os estoques de *E. coli* BL21-DE3 com as três construções (pAE-psaA, pAE-fpspA1 e pAE-fpspA3) foram analisados quanto à recuperação de colônias a partir de estoques mantidos a -70 °C. Embora o plaqueamento em meio 2YT sem o antibiótico tenha mostrado um alto número de células totais para todas as construções (100.000 CFU/mL), o plaqueamento das células em 2YT com ampicilina (Amp) apresentou uma baixa percentagem de recuperação de colônias resistentes (AmpR 0,0 – 6,3%), sugerindo a perda do plasmídeo durante o processo de estocagem (congelamento).

Na tentativa de se minimizar a perda dos plasmídeos, foram realizados cultivos de *E. coli* BL21-DE3 com todas as construções, aumentando em 10 vezes a concentração de ampicilina (1 g/L). No cultivo com maior concentração de antibiótico as curvas de crescimento apresentaram o mesmo perfil, mas verificou-se um aumento da fase Lag, o que era esperado. A recuperação de células AmpR ao longo dos cultivos com todas as construções, foi um pouco maior.

Por outro lado os resultados de *Western blot* mostraram não somente a diminuição da expressão das proteínas ao longo do cultivo, mas também um grande escape de expressão da proteína recombinante, antes mesmo da adição do agente indutor. O que se espera deste tipo de

experimento é que ocorra exatamente o inverso, nenhuma expressão antes da indução e uma expressão maior após a adição do indutor. Foi realizado ainda, um experimento onde se adicionou glicose ao meio de cultura, na perspectiva de minimizar ou retardar o escape de expressão antes da indução, mas não se obteve melhora. Em suma, estes dados sugerem sérios problemas com a estabilidade do plasmídeo, o que poderia estar acontecendo por vários motivos concomitantemente¹²⁶: 1) a bactéria hospedeira pode estar apresentando alterações no repressor LacI, que não reprimiria adequadamente a expressão antes da indução, resultando na auto-indução; o LacI da *E. coli* BL21-DE3 é conhecido por apresentar esse problema¹²⁷. A indução da expressão das proteínas recombinantes antes da adição do indutor é uma das principais causas de instabilidade plasmidial, a qual deve estar bem reprimida em ausência do indutor^{128, 129, 130}; 2) O plasmídeo pAE, com origem de replicação de pUC é de alta cópia, 200 a 700/célula, o que produz mais stress metabólico quando está expressando a proteína e maior instabilidade¹³¹; 3) Tradicionalmente é usada a ampicilina como pressão seletiva para manutenção do plasmídeo, muito embora esta não seja a mais adequada, especialmente quando se deseja atingir cultivos de altas densidades ou em maior escala^{132, 133}. Além disso, o uso de antibióticos penicilínicos na fermentação para produção de fármacos de uso humano não está permitido^{134, 135, 136}. Dessa forma, seria conveniente mudar a marca de seleção para kanamicina (Kan).

Expressão de PspA a partir de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpsA1

Diante da instabilidade das construções no vetor de expressão pAE, partimos para uma nova construção, baseada no vetor de expressão pET37, já que este contém uma cópia de lacI, o mesmo promotor T7 que o pAE, mas contém o gene de resistência a Kan como marcador de seleção. A Kan é um aminoglicosídeo que tem mecanismo de ação e de resistência diferente do de ampicilina (que é um beta-lactâmico). Enquanto Amp interfere numa etapa específica de síntese da parede celular bacteriana, Kan está envolvida na inibição da síntese de proteínas, além disso, a Kan está autorizada para uso em humanos.

Decidimos testar primeiramente apenas um dos genes de interesse, o fpsA1. Portanto, o gene fpsA1 foi clonado no vetor de expressão pET37. *E. coli* BL21-DE3 transformada com pET37-pspA1 foi plaqueada em meio 2YT ou HDF, com ou sem kanamicina. Todos os pré-inóculos apresentaram de 95-100% de células resistentes a kanamicina (KanR), e até o final do cultivo, houve uma recuperação de quase 100% de células KanR.

A expressão de rFPspA1 foi observada por *SDS-PAGE* e confirmada por *Western blot*. Pôde se observar ao longo do cultivo, o aumento da expressão de rFPspA1. Com a nova construção utilizando pET37, os cultivos realizados em 2YT apresentaram algum escape de expressão, porém bem menor que o observado para a construção no vetor pAE; este escape não foi observado para os cultivos em meio definido HDF. Na tentativa de minimizar ou eliminar este pequeno escape utilizou-se glicose como repressor; a adição de glicose provocou um deslocamento da auto-indução para tempos maiores. A lactose funcionou não somente como indutor, mas também como fonte de carbono.

Resumo dos cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1 em meio HDF

Para a produção das proteínas recombinantes em larga escala e em condições GMP, é necessária a utilização de meio de cultura definido para os cultivos de *E. coli*. Os cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1 foram realizados em meio HDF/glicose ou HDF/glicerol e apresentaram a expressão de rFPspA1 quando se induziu o sistema com IPTG, lactose ou pulsos de lactose + IPTG, conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Síntese dos cultivos em meio HDF

Condições de Cultivo	Indutor	Consumo de glicose (%)	Consumo de glicerol (%)	Consumo de lactose (%)	DO _{final}	Produção relativa de rFPspA1 após 11 h de cultivo (%) [*]
HDF/glicose	IPTG (1 mM)	100			11	30
HDF/glicose	lactose	100		100	12	30
HDF/glicose	lactose + IPTG 0,1 mM	100		100	10	30
HDF/glicose	lactose + IPTG 1 mM	100		100	11	30-35
HDF/glicerol	lactose		100	0	7	30
HDF/glicerol	lactose + IPTG 0,1 mM		100	0	7	30
HDF/glicerol	lactose + IPTG 1 mM		100	0	7	45

^{*}Cálculos baseados nas curvas obtidas por densitometria dos géis de poliacrilamida.

Nos cultivos em meio HDF/glicose, induzidos com lactose ou IPTG, a glicose foi totalmente consumida, mas ocorreu pouco consumo de lactose (10%). Nos cultivos em meio mínimo HDF/glicose, a expressão por IPTG pôde ser observada 1,5 h após a adição do indutor,

enquanto que por lactose, esta foi observada após 2,5 h. Já os cultivos induzidos por pulsos de lactose, lactose + IPTG 0,1 mM e lactose + IPTG 1 mM, consumiram totalmente a glicose e a lactose. Estes cultivos apresentam DO_{600nm} finais de 10-12. A densitometria das amostras em *SDS-PAGE* dos cultivos em HDF/glicose mostrou uma expressão comparável quando o sistema foi induzido com IPTG, lactose ou lactose + IPTG. A densitometria mostra ainda que, embora o cultivo induzido apenas com lactose demore um pouco mais para iniciar a expressão da proteína recombinante, a expressão final é praticamente a mesma, quando comparados com os demais cultivos. Com isso, pode-se concluir que para os cultivos posteriores, o IPTG pode ser substituído pela lactose, mostrando-se uma boa alternativa, pois a lactose não é tóxica, além de apresentar um custo bem menor que o do IPTG.

Os cultivos em HDF/glicerol apresentaram consumo de 100% de glicerol, praticamente sem consumo de lactose, alcançando DO_{600nm} final em torno de 7 e com expressão 2 h após a adição do indutor. A densitometria das amostras em *SDS-PAGE* destes cultivos evidenciou uma maior expressão quando o sistema foi induzido com lactose + IPTG 1 mM. De forma geral os resultados utilizando glicerol como fonte de carbono foram semelhantes aos obtidos quando se usou glicose, porém o fato de se alcançar DO finais mais elevadas com glicose indicaria esta última como sendo mais vantajosa.

Embora se tenha conseguido um avanço nos experimentos com lactose, estes ainda não estão bem definidos, devido às dificuldades de manejo na hora de adicionar a lactose. Portanto, precisa-se ajustar o tempo no qual a concentração de glicose esteja suficientemente baixa para se adicionar a lactose de forma que não ocorra a repressão do sistema.

Purificação de rFPspA1 a partir de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1

Os Extratos Totais obtidos de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1 isoladas das culturas em meio 2YT foram submetidos primeiro a cromatografia em Ni-Sepharose, apresentando uma considerável eliminação das impurezas, porém, ainda restando contaminantes. Para se obter a rFPspA1 mais purificada, a fração da Ni-Sepharose foi submetida à cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, permitindo obter as proteínas com 95% de pureza, quando analisadas por *SDS-PAGE* e suas identidades foram confirmadas por *Western blot*. Ao final da cromatografia em Q-Sepharose a recuperação de rFPspA1 foi de 25-28 mg/L de cultivo, o que representou um aumento de aproximadamente 3 vezes em relação ao obtido a partir da construção pAE-fpspA1. Os resultados demonstraram que a nova construção é mais adequada para os estudos de

ampliação de escala para produção de rFPspA. Em suma, o processo desenvolvido se torna mais viável, utilizando apenas 2 passos cromatográficos, não sendo necessária uma gel filtração.

Cultivo preliminar de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1 em biorreator

Foi realizado um cultivo preliminar de *E. coli* BL21(DE3)-pET37-fpspA1 em biorreator utilizando meio HDF/glicose e indução por lactose. A indução não pôde ser realizada com base na dosagem da fonte de carbono, pois os testes enzimáticos demoraram aproximadamente 20 min (para cada ponto do cultivo). Nos biorreatores é praxe seguir o oxigênio dissolvido (% OD) como indicação do esgotamento da fonte de carbono (assume-se que os outros nutrientes estão em excesso) e, portanto, este é o sinal para a adição do indutor. No entanto, um aumento circunstancial na percentagem de oxigênio dissolvido nos levou à adição de lactose, antes mesmo do esgotamento da fonte de carbono.

O cultivo atingiu uma $DO_{600\text{ nm}}$ final de aproximadamente 20. A glicose foi totalmente consumida até o final do cultivo, porém no momento da indução, a concentração de glicose estava em torno de 7 g/L, e não a próximo de zero conforme se esperava. Este pode ser um dos motivos pelo qual a expressão da proteína recombinante não foi verificada por *SDS-PAGE*, pois provavelmente a concentração de glicose, que ainda estava alta, foi suficiente para reprimir o sistema de expressão. Uma pequena indução foi observada apenas por *Western blot*, 4 h após a adição de lactose, quando a concentração de glicose já se aproximava de 0 g/L. Consequentemente constatou-se que praticamente não houve consumo de lactose durante o cultivo e a formação de ácido acético alcançou aproximadamente 4 g/L. Em resumo, os experimentos com cultivos em biorreator necessitam ainda de alguns ajustes.

Em suma, propusemos o desenvolvimento de sistemas que levem à obtenção de candidatos vacinais contra pneumococos. Foi possível a clonagem, a expressão dos genes, a purificação das proteínas recombinantes, além da avaliação de diferentes vetores, diferentes meios de cultivo e indutores.

Definimos sistemas com bom rendimento (de forma geral, melhores que os descritos na literatura) e principalmente escalonáveis. Obtivemos preparações vacinais que se mostraram imunogênicas, utilizando-se de tecnologia acessível, com possibilidade de obtenção de um produto final de baixo custo.

.....

6. CONCLUSÃO

- ✓ Na primeira etapa deste projeto foi possível clonar os genes *psaA*, *fpspA1* e *fpspA3* no vetor para expressão em *E. coli*, pAE. A expressão das proteínas rPsaA, rFPspA1 e rFPspA3 em *E. coli* BL21-DE3 foi obtida na forma solúvel. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose e por cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose. Os resultados mostram que as proteínas recombinantes foram obtidas com rendimentos compatíveis àqueles descritos na literatura, aproximadamente 10-12 mg/L de cultivo. De acordo com os resultados obtidos em escala de bancada e em comparação com os dados da literatura, as construções obtidas para expressão das proteínas estas e os processos de purificação utilizados estariam adequados para prosseguir com os experimentos iniciais para o escalonamento da produção.
- ✓ O ensaio preliminar visando caracterizar a imunogenicidade e reatividade induzida pelas proteínas recombinantes obtidas mostrou que os anti-soros de todas as proteínas reconhecem as respectivas proteínas nativas nos extratos de pneumococos de 2 cepas contendo PsaA e PspA de 2 famílias.
- ✓ Devido à instabilidade dos plasmídeos construídos baseados em pAE, uma nova construção foi realizada, baseada no vetor de expressão pET-37b(+). A nova construção mostrou-se mais estável em todos os cultivos, e não apresentou escape de expressão antes da indução.
- ✓ A purificação de rFPspA1 a partir dos cultivos com a construção em pET mostrou um aumento no rendimento (3x) em relação ao obtido pela construção em vetor pAE e em relação aos dados da literatura.
- ✓ Foram avaliados os cultivos em meio definido (HDF) e a utilização de fontes de carbono e indutores alternativos. Esses estudos demonstram que os cultivos podem ser realizados em meio HDF com glicose ou glicerol e que os cultivos realizados com glicose alcançaram densidades óticas finais mais elevadas. Os cultivos induzidos apenas com lactose alcançaram níveis de expressão semelhantes àquela obtida pela indução por IPTG, porém a expressão máxima ocorre em tempos maiores (2-3 h após). Além disso, a indução com lactose ou lactose mais IPTG 0,1 mM pode substituir o IPTG 1 mM, permitindo uma possível redução do custo nesta etapa.
- ✓ Os resultados desta tese lançam as bases para o escalonamento da produção dessas proteínas recombinantes para a composição de uma possível vacina contra *Streptococcus pneumoniae*.

REFERÊNCIAS*

1 De VELASCO, A. E.; VERHEUL, A. F.; VERHOEF, J.; SNIPPE, H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 591-603, 1995.

2 PRESCOTT, L. M. **Microbiology**, Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers, 1996.

3 SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis**: a molecular approach. Washington, DC: ASM Press, 1994.

4 DEIBEL, R. H.; SEELEY JR, H. W. Family II: *Streptococcaceae*. Farm. Nov. In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E., ed. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974, p 490-517.

5 HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.555.

6 BROOME, C. V.; FACKLAN, R. R. Epidemiology of clinically significant isolates of *Streptococcus pneumoniae* in United States. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, p. 277-280, 1981.

7 HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33: 2759-2762, 1995.

8 AUSTRIAN, R. Pneumococcus: the first one hundred years. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3: 183-189, 1981.

9 Di FABIO, J.L.; HOMMA, A.; QUADROS, C. Pan American Health Organization Epidemiological Surveillance Network for *Streptococcus pneumoniae*. **Microb. Drug Resist.**, v. 3, p. 131-133, 1997.

*** De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus., 2001.

Available from:

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi

www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html

10 BRANDILEONE, M. C. C.; VIEIRA, V. S.; CASAGRANDE, S. T.; ZANELLA, R. C.; GUERRA, M. L.; BOKERMANN, S.; De MORAES, J. C.; BALDACCI, E. R.; CHAMONE, C. B.; OLIVEIRA, M. A.; De MATOS, D. G.; ARRUDA, T. M.; COELHO, M. F.; D'AVILA, S. M.; Dos SANTOS, A. R.; Di FÁBIO, J. L.; Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of *streptococcus pneumoniae* strains isolated from Brazilian children with invasive infections.

Pneumococcus Study Group in Brazil for the SIREVA Project. Regional System for Vaccines in Latin Ameican. **Microb. Drug Resist.**, v. 3, n. 2, p. 141-146, 1997.

11 BRANDILEONE, M. C. C. **Distribuição de Sorotipos, Resistência Antimicrobiana e Perfil Molecular de *Streptococcus pneumoniae* Isolado de Doença Invasiva no Brasil: 1993 a 1998.** 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1999.

12 TAUNAY, A. E.; AUSTRIAN. R. L; GRAF, I. M.; VIEIRA, M. F.; MELLES, C. E.; Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from cerebrospinal fluid in 1977-1988 in São Paulo City, Brazil. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 32, n. 1, p. 11-15, 1990.

13 SESSEGOLO, J. F.; LEVIN, A. S.; LEVY, C. E.; ASENSI, M.; FACKLAM, R. R.; TEIXEIRA, L. M. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 906-911, 1994.

14 BRANDILEONE, M. C. C.; VIEIRA, V. S.; ZANELLA, R. C.; LANDGRAF, I. M.; MELLES, M. E.; TAUNAY, A.; De MORAES, J. C.; AUSTRIAN, R. Distribution of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater São Paulo area, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 10, p. 2789-2791, 1995.

15 HORTAL, M.; RUVINSKI, R.; ROSSI, A.; AGUDELO, C. I.; CASTANEDA, E.; BRANDILEONE M. C. C.; CAMOU, T.; PALACIO, R.; ECHANIZ, G.; Di FABIO, J.L. Impact of *Streptococcus pneumoniae* on pneumonia in Latin American children. SIREVA-Vigia Group. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 8, n. 3, p. 185-195, 2000.

16 Di FABIO, J. L.; CASTANEDA, E.; AGUDELO, C. I.; De La HOZ, F.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ECHANIZ-AVILES, G.; NOEMI, M.; BARAJAS, C.; HEITMANN, I;

HORMAZABAL, J. C.; BRANDILEONE M. C. C.; DIAS VIERA, V. S.; REGUEIRA, M.; RUVINSKI, R.; CORSO, A.; LOVEGREN, M.; TALBOT, J. A.; De QUADROS, C. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, n. 10, p. 959-967, 2001.

17 PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Acute respiratory infections in children**. Washington: PAHO, 1983. 60p.

18 PATON, J. C.; ANDREW, P. W.; BOULNOIS, G. J.; MITCHELL, T. J. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. **Annual. Rev. Microbiol.**; Palo Alto, v. 47, p. 89-115, 1993.

19 LEE, C.-J.; BANKS, S. D.; JEAN, P. L.; Virulence Imunity and Vacines Related to *S.Pneumoniae*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 18, n. 2, p. 89-144, 1991.

20 JEDRZEJAS, M. J.; HOLLINGSHEAD. S. K.; LEBOWITZ, J.; CHANTALAT, L.; BRILES, D. E.; LAMANI, E.; Production and characterization of the functional fragment of pneumococcal surface protein A. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 116-125, 2000.

21 TALKINGTON, D. F.; VOELLINGER, D. C.; McDANIEL, L. S.; BRILES, D. E. Analysis of pneumococcal PspA microheterogeneity in SDS polyacrylamide gels and the association of PspA with the cell membrane. **Microb Pathog.**, v. 13, n. 5, p. 343-55, 1992.

22 CRAIN, M. J.; WALTMAN, W. D.; TURNER, J. S.; YOTHER, J.; TALKINGTON, D. E.; McDANIEL, L. M.; et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3293-3299, 1990.

23 REN, B.; SZALAI, A. J.; THOMAS, O.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun.**, v. 71, n. 1, p. 75-85, 2003.

24 TU A-IIT.; FULGHAM, R. L.; McCORY, M. A.; BRILES, D. E.; SZALAI, A. J. Pneumococcal surface protein A (PspA) inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun.**, v. 67, p. 4517-4519, 1999.

25 HAKANSSON, A.; ROCHE, H.; MIRZA, S.; McDANIEL, L. S.; WALTER, A. B.; BRILES, D. E. Characterization of Binding of Human Lactoferrin to pneumococcal surface protein A. **Infect. Immun.**, p 3372-3381, 2001.

26 McDANIEL, L. S.; SHEFFIELD, J. S.; SWIATLO, E.; YOTHER, J.; CRAIN, M. J.; BRILES, D. E. Molecular localization of variable and conserved regions of pspA and identification of additional pspA homologous sequences in *Streptococcus pneumoniae*. **Microb Pathog.**, v. 13, n. 4, p. 261-9, 1992.

27 McDANIEL, L. S.; RALPH, B. A.; McDANIEL, D. O.; BRILES, D. E. Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. **Microb. Pathog.**, v. 17, p. 323-337, 1994.

28 HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 5889-5900, 2000.

29 WALTMAN, W. D.; McDANIEL, L. S.; GRAY, B. M.; BRILES, D. E. Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. **Microb Pathog.**, v. 8, n.1, p. 61-69, 1990.

30 YOTHER, J.; HANDSOME, G. L.; BRILES, D. E. Truncated forms of PspA that are secreted from *Streptococcus pneumoniae* and their use in functional studies and cloning of the pspA gene. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 610-618, 1992.

31 YOTHER, J.; WHITE, J. M. Novel surface attachment mechanism of the *streptococcus pneumoniae* protein PspA. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 2976-2985, 1994.

32 BRANDILEONE M. C. C.; ANDRADE, A. L. S. S.; TELES E. M.; ZANELLA, R. C.; YARA, T. I.; Di FABIO, J. L.; HOLLINGSHEAD, S. K. Typing of pneumococcal surface

protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine**, 22, p. 3890–3896, 2004.

33 NABORS, G. S. et al. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to Heterologous PspA Molecules. **Vaccine**, 17, p. 1743-1754, 2000.

34 BRILES, D. E.; HOLLINSHEAD, S. K.; KING, J.; SWIFT, A.; BRAUN, P. A.; PARK, M. K.; FERGUSON, L. M.; NAHM, M. H.; NABORS, G. S. Immunization of Humans with Recombinant Pneumococcal Surface Protein A (rPspA) Elicits Antibodies That Passively Protect Mice from Fatal Infection with *Streptococcus pneumoniae* Bearing Heterologous PspA. **The J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1694-1701, 2000.

35 BRILES, D. E.; HOLLINSHEAD, S. K.; BROOKS-WALTER, A.; NABORS, G. S.; FERGUSON, L. M.; SCHILLING, M.; GRAVENSTEIN, S.; BRAUN, P. A.; KING, J.; SWIFT, A. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection pneumococcal infection. **Vaccine**, v. 18, p. 1707-1711, 2000.

36 BRILES, D. E.; ADES, E.; PATON, J. C.; SAMPSON, J. S.; CARLONE, G. M.; HUEBNER, R. C.; VIROLAINEN, A.; SWIATLO, E.; HOLLINSHEAD, S. K. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 796-800, 2000.

37 VIROLAINEN, A.; RUSSELL, W.; CRAIN, M. J.; RAPOLA, S.; KAYHTY, H.; BRILES DE. Human antibodies to pneumococcal surface protein A in health and disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 19, n. 2, p. 134-8, 2000.

38 McCOOL, T. L.; CATE, T. R.; MOY, G.; WEISER, J. N. The Immune Response to Pneumococcal Proteins during Experimental Human Carriage. **J. Exp. Med.** The Rockefeller University Press., v. 195, n. 3, p. 359–365, 2002.

39 SWIATLO, E.; KING, J.; NABORS, G. S.; MATHEWS, B.; BRILES, D. E. Pneumococcal Surface Protein A Is Expressed In Vivo, and Antibodies to PspA Are Effective for Therapy in a Murine Model of Pneumococcal Sepsis. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 12, p. 7149–7153, 2003.

40 MOLLERACH, M.; REGUEIRA, M.; BONOFIOLIO, L.; CALLEJO, R.; PACE, J.; DI FABIO, J.L.; HOLLINGSHEAD, S.; BRILES, D. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity. **Epidemiol Infect.**, v. 132, n. 2, p. 177-184, 2004.

- 41 MIYAJI, E. N.; DIAS, W. O.; GAMBERINI, M.; GEBARA, V.; SCHENKMAN, R. P.; WILD, J.; RIEDL, P.; REIMANN, J.; SCHIRMBECK, R.; LEITE, L. C. C. PsaA (pneumococcal surface adhesin A) and PspA (pneumococcal surface protein A) DNA vaccines induce humoral and cellular immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, n. 5-6, p. 805-12, 2001.
- 42 MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, A. P. Y.; BRANDILEONE, M. C. C.; DIAS, W.O.; LEITE, L. C. C. Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5086-5090, 2002.
- 43 MIYAJI, E. N.; DIAS, W. O.; TANIZAKI, M. M.; LEITE, L. C. Protective efficacy of PspA (pneumococcal surface protein A) based DNA vaccines: contribution of both humoral and cellular immune responses. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 53-57, 2003.
- 44 OLIVEIRA, M. L. S.; MONEDERO, V.; MIYAJI, E. N.; LEITE, L. C. C.; HO, P. L.; PÉREZ-MARTINES, G. Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA (pneumococcal surface antigen A) and PspA (pneumococcal surface protein A) by *Lactobacillus casei*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 227, p. 25-31, 2003
- 45 CROOK, D. W.; SPRATT, B. G. Multiple antibiotic resistance in *S. pneumoniae*. **Br. Med. Bull.**, v. 54, n. 3, p. 595-610, 1998.
- 46 RUSSEL, H.; THARPE J. A.; WELLS D. E.; WHITE E. H.; JOHNSON J. E. Monoclonal antibody recognizing a species-specific protein from *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, 28, p. 2191-2195, 1990.
- 47 TAM, R.; M.H.SAIER, Jr. Structural, functional and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 320-346, 1993.
- 48 SAMPSON, J. S.; FURLOW, Z.; WHITNEY, A. M.; WILLIAMS, D.; FACKLAM, R.; CARLONE, G. M. Limited Diversity of *Streptococcus pneumoniae* psaA among Pneumococcal Vaccine Serotypes. In: **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1967-1971, 1994.
- 49 SAMPSON, J. S.; O'CONNOR, S. P.; STINSON, A. R.; THARPE, J. A.; RUSSEL, H.; Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of psaA, the *Streptococcus pneumoniae* Gene Encoding a 37 kDa Protein Homologous to previously reported *Streptococcus sp.* adhesins. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 319-324, 1994.

50 DINTILHAC, A.; ALLOING, G.; GRANADEL, C.; CLAVERYS, J-P. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. **Mol. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 727-739, 1997.

51 NOVAK, R.; BRAWN, J. S.; CHARPENTIER, E.; TUOMANEN, E. Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: The ABC type manganese permease complex Psa, **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 1285-1286, 1998.

52 LAWRENCE, M. C.; PILLING, P. A.; EPA, V. C.; BERRY, A. M. ; OGUNNIYI, A. D.; PATON, J. C. The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein. **Structure**, v. 6, p. 1553-1561, 1998.

53 BERRY, A. M.; PATON, J. C. Sequence Heterogeneity of PsaA, a 37-kDa putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5255-5262, 1996.

54 TALKINGTON, D. F.; KOENIG, A.; RUSSEL, H. The 37 kDa Protein of *Streptococcus pneumoniae* protects mice against fatal challenge, abstr. **Am. Soc. Microbiol.**, E-29, p. 149. Abstr. 92nd. Gen. Meet. 1992.

55 TALKINGTON, D. F.; BROWN, B. G.; THARPE, J. A.; KOENIG, A.; RUSSEL, H. Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesion A (PsaA). **Microb. Pathog.**, v. 21, p. 17-22, 1996.

56 De, B. K.; SAMPSON, J. S.; ADES, E. W.; JOHNSON, S. E.; STINSON, A. R.; CROOK, J.; THARPE, J. A.; HUEBNER, R. C.; CARLONE, G. M. Baculovirus expression, purification and evaluation of recombinant pneumococcal surface adhesin A of *Streptococcus pneumoniae*. **Pathobiology**, v. 67, n. 3, p. 115-22, 1999.

57 PATON, J. C. Novel pneumococcal surface proteins: role in virulence and vaccine potential. **Trends Microbiology**, v. 6, p. 85-88, 1998.

58 BERRY, A. M.; OGUNNIYI, A. D.; MILLER, D. C.; PATON, J. C. Comparative virulence of *Streptococcus pneumoniae* strains with insertion-duplication, point, and deletion mutation in the pneumolysin gene. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 981-988, 1999.

59 TETTELIN, H.; NELSON, K. E.; PAULSEN, I. T.; EISEN, J. A.; READ, T. D.; PETERSON, S.; HEIDELBERG, J.; DeBOY, R. T.; HAFT, D. H.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GWINN, M.; KOLONAY, J. F.; NELSON, W. C.; PETERSON, J. D.; UMayAM, L. A.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; LEWIS, M. R.; RADUNE, D.; HOLTZAPPLE, E.; KHOURI, H.; WOLF, A. M.; UTTERBACK, T. R.; HANSEN, C. L.; McDONALD, L. A.; FELDBLYUM, T. V.; ANGIUOLI, S.; DICKINSON, T.; HICKEY, E. K.; HOLT, I. E.; LOFTUS, B. J.; YANG, F.; SMITH, H. O.; VENTER, J. C.; DOUGHERTY, B. A.; MORRISON, D. A.; HOLLINGSHEAD, S. K.; FRASER, C. M. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Science**, v. 293, p. 498-506, 2001.

60 PATON, J. C.; BERRY, A. M.; LOCK, R. A. Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. **Microb. Drug Resist.**, v. 3, p. 1-10, 1997.

61 HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. *Streptococcus pneumoniae*: new tools for an old pathogen. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 71-77, 2001.

62 CASAL, J.; TARRAGÓ, D. Immunity to *Streptococcus pneumoniae*: factors affecting production and efficacy. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 219-224, 2003.

63 NASCIMENTO-CARVALHO, C. M.; LOPES, A. A.; GOMES, M. D.; MAGALHÃES, M. P.; OLIVEIRA, J. R.; VILLAS-BOAS, A. L.; FERRACUTTI, R.; BRANDILEONE, M. C.; GUERRA, M. L.; ALVES, N. N.; ATHAYDE, L. A.; CALDAS, R. M.; BARBERINO, M. G.; DUARTE, J.; BRANDÃO, M. A.; ROCHA, H.; BENGUIGUI Y.; Di FABIO, J. L. Community acquired pneumonia among pediatric outpatients in Salvador, Northeast Brazil, with emphasis on the role of pneumococcus. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11290310&dopt=Abstract>. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 1, p. 13-20, 2001.

64 YU, J.; BRILES, D. E.; ENGLUND, J. A.; HOLLINGSHEAD, S. K.; GLEZEN, W. P.; NAHM, M. H. Immunogenic protein contaminants in pneumococcal vaccines. **J Infect Dis.** v. 187, n. 6, p. 1019-1023, 2003

65 BRANDILEONE, M. C. C.; ANDRADE, A. L. S. S.; Di FABIO, J. L.; GUERRA, M. L. L. S.; AUSTRIAN, R. Appropriateness of Pneumococcal Conjugate Vaccine in Brazil: Potential Impact of Age and Clinical Diagnosis, Emphasis on Meningitis. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1206-1212, 2003.

66 WOODROW, G. C. New and improved vaccines against diseases for which there already exist licensed vaccines. In: LEVINE, M. M.; WOODROW, G. C.; KAPER, J. B.; COBON, G. S. (Ed.). **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 417-436.

67 PALANIAPPAN, R.; SINGH, S.; SINGH, U. P.; SAKTHIVEL, S. K.; ADES, E. W.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; PATON, J. C.; SAMPSON, J. S.; LILLARD, J. W. Jr. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 2, p. 1006-1013, 2005.

68 BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S.; BROOKS-WALTER, A.; NABORS, G. S.; FERGUNSON, L.; SCHILLING, M.; GRAVENSTEIN, S.; BRAUN, P.; KING, J.; SWIFT, A. The potential to PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1707-1711, 2000.

69 OGUNNIYI, A. D.; FOLLAND R. L.; BRILLES D. E.; HOLLINGSHEAD S. K.; PATON, J. C. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 5, p. 3028-3033, 2000.

70 FRANÇOIS, B. Recombinant Protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, p. 411-421, 1999.

71 MAKRIDESS, C. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews. **Am. Soc. Microbiol.**, p. 512-538, 1996.

72 ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 2nd ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. p. 75-87.

73 Tecnologia do DNA recombinante Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Ribeirão Preto, SP. Disponível em: <<http://www.morpheus.fmrp.usp.br/td/apostila/apost3.htm#90>>. Acesso em: 21 de set. 2004.

74 SEEGER, A.; SCHNEPPE, B.; Mac CARTHY, J. E. G.; DECKWER, W. D. and RINAS, U. Comparison of temperature and isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.17, p. 947-953, 1995.

75 HOFFMAN, B. J.; BROADWATER, J. A.; JOHNSON, P.; HARPER, J.; FOX, B. G.; KENEALY, W. R. Lactose Fed-Batch Overexpression of Recombinant Metalloproteins in *Escherichia coli* BL21(DE3), p. Process Control Yielding High Levels of Metal-Incorporated, Soluble Protein. **Prot. Expres. Purif.**, v.6, p. 646-654, 1995.

76 GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **J. Biotechnol.**, v. 60, p. 47-54, 1998.

77 MENZELLA, H. G.; CECCARELLI, E. A.; GRAMAJO, H. C. Novel *Escherichia coli* Strain Allows Efficient Recombinant Protein Production Using Lactose as inductor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 82, n. 7, 2003.

78 LIN, L. L.; HSU, W. H. Lactose –induced expression of *Bacillus* sp. TS-23 amylase gene in *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 365-368, 1997.

79 SCHMIDT, M.; BABU, K. R.; KHANNA, N.; MARTEN, S.; RINAS, U. Temperature induced production of recombinant human insulin in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 68, p. 71-73, 1999.

80 Novo método para produzir insulina artificial, <<http://www2.uol.com.br/cienciahoje/chdia/n341.htm>>.Ciência Hoje/RJ. Acesso em: 24 de abril de 2001.

81 <http://www.redetec.org.br/repict/download/anais1998.zip>. Acesso em: agosto de 2003.

82Hormôniode Crescimento. Disponível em: <http://www.uol.com.br/cienciahoje/chdia/n419.htm>, <http://www.fapesp.br/tecnolo431.htm>, <http://epoca.globo.com/>. Acesso em: dezembro de 2001.

83 RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High cell density cultivation of microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.51, p. 422-430, 1999.

84 LEE, S. Y. High cell density culture of *Escherichia coli*. **TIBTECHT**, v. 14, p. 98-105, 1996.

85 KORZ, D. J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E. A. and DECKWER, W. D. Simple fed batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 39, p. 59-65, 1995.

86 ZHANG, J.; GREASHAM, R.; Chemically defined media for commercial fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 407-421, 1999.

87 SUÁREZ, D. C.; KILIKIAN, B. V. Acid acetic accumulation in aerobic growth of recombinant *E. coli*. **Process Biochem.**, v. 35, p. 1051-1055, 2000.

88 GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **J. Biotechnol.**, v. 60, p. 47-54, 1998.

89 KILIKIAN, B. V. et al. Process strategies to improve heterologous protein production in *E. coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochem.**, v. 35, p. 1019-1025, 2000.

90 WARD, O. P. **Fermentation Biotechnology: Principles, Process and Products**. New York: John Wiley & Sons, 1989. p 87-88.

91 ASENJO, J. A.; PATRIK, I. Large scale protein purification. In. HARRIS, E.; ANGAL, S. (Ed.). **Protein Purification Applications: a Practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1990.

92 WHEELWRIGHT, S. M. **Protein purification: design and scale up of downstream processing**. New York: Hanser Publishers, 1991.

93 BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU W.S. **Bioseparations: Downstream Processing For Biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1988.

94 MUNIR, C. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Lancaster, Pa: Technomic Pub. Co, 1998.

95 MIDDELBERG, A. P. J. Process scale disruption of microorganism. **Biotechnol. Adv.**, 13, n. 3, p. 491-551, 1995.

96 WOO-SEOK, C.; MIDDELBERG, A. P. J. Selective precipitation of DNA by spermine during the chemical extraction of insoluble cytoplasmic protein. **Biotechnol. Prog.**, v. 17, p. 1107-1113, 2001.

97 WOO-SEOK, C.; MIDDELBERG, A. P. J.; Direct chemical extraction of a recombinant viral coat protein from Escherichia coli at high cell density. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 75, n. 4, p. 451-455, 2001.

98 SOFER, G. K.; NYSTRÖM, L. E. **Process chromatography: a practical guide**. New York: Academic Press, 1989.

99 SOFER, G. K.; NYSTRÖM, L. E. **Process chromatography**. New York: Academic Press, 1991.

100 SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3rd. ed. New York: Springer Verlag, 1993.

101 JANSON, J. C.; RYDEN, L. **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**. 2nd ed. New York: WILEY-VCH Publishing, 1990.

102 DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. London: Academic Press, 1995.

103 JAGSCHIES, G. Process-scale chromatography. In: **ULLMANN'S Encyclopedia of industrial chemistry**. Weinheim: VH, 1988., v. B3.

104 KARMALI, A. Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes. Separação e Purificação de Proteínas, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, **Boletim de Biotecnologia**. Lisboa, Portugal 2001.

105 WARD, O. P. **Bioprocessing**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

106 VOET, D.; VOET, J. G. **Fundamentals of biochemistry**. New York: Charlot W. Pratt, John Willey & Sons, 1999. p. 96-105.

107 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. [S.l.]: CSH press, 1989.

108 RAMOS, C. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagget fusion peptide. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v.37, p.1103-1109, 2004.

109 RAMOS, C. R.; VILAR, M. M.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L.; THAUMATURGO, N.; EDELENYI, R.; ALMEIDA, M.; DIAS, W. O.; DIOGO, C. M.; TENDLER, M. r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 131-135, 2001. Suppl.

110 La VALLIE, E. R.; MCCOY, J. M. Gene fusion expression system in *Escherichia coli*, **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 6, p. 501-506, 1995

111 HANAHAN, D. Studies on transformation of *E. coli* with plamids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.

112 DEUTSCHER, M. P. Protein purification. **Met. Enzymol.**, v. 182, p. 889, 1990.

113 RIESENBERG, D. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. **Rev. Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 3, p. 380-384, 1991.

114 HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 726 p.

115 KWON, S.; KIM, S.; KIM, E. Effects of Glycerol in β -Lactamase Production During High Cell Density Cultivation of Recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Prog.**, v. 12, p. 205-208, 1996.

- 116 BOGAERT, D.; HERMANS, P. W.; ADRIAN, P. V.; RUMKE, H. C.; GROOT, R. Pneumococcal vaccine: na update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, (17-18), p. 2209-2220, 2004.
- 117 BARIL, L.; BRILES, D. E.; CROZIER, P.; KING, J.; PUNAR, M.; HOLLINGSHEAD, S. K.; McCormick, J. B. Characterization of antibodies to PspA and PsaA in adults over 50 years of age with invasive pneumococcal disease. **Vaccine**, p. 789-793, 2004.
- 118 LAINE, C.; MWANGI, T.; THOMPSON, C. M.; OBIERO, J.; LIPSITCH, M.; SCOTT, J. A. G. Age-Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgA to Pneumococcal Protein Antigens in Coastal Kenya. **Infect. Immun.**, p. 3331-3335, 2004.
- 119 BARIL, L.; BRILES, D. E.; CROZIER, P.; KING, J. D.; HOLLINGSHEAD, S. K.; MURPHY, T. F.; McCORMICK, J. B. Natural materno-fetal transfer of antibodies to PspA and to PsaA. **Clin Exp Immunol.** v. 135, n.3, p. 474-477, 2004.
- 120 THARPE, J. A.; RUSSEL, H. Purification and Seroreactivity of Pneumococcal Surface Adhesin A (PsaA). **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, p. 227-229, 1996.
- 121 PILLING, P. A.; LAWRENCE, M. C.; BERRY, A. M.; OGUNNIYI, A. D.; LOCK, R. A.; PATON, J. C. Expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of PsaA, a putative metal-transporter protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.**, D54, p. 1464-1466, 1998.
- 122 De, B. K.; SAMPSON, J. S.; ADES, E. W.; HUEBNER, R. C.; JUE, D. L.; JOHNSON, S. E.; ESPINA, M.; STINSON, A. R.; BRILES, D. E.; CARLONE, G. M. Purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* palmitoylated Surface Adhesin A expressed in *Escherichia coli*. **Vaccine**, v. 18, p. 1811-1821, 2000.
- 123 De, B. K.; WOOLFITT, A. R.; BARR, J. R.; DANESHVAR, M. I.; SAMPSON, J. S.; ADES, E. W.; CARLONE, G. M. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 419, p. 147-157, 2003.
- 124 CULLEN, P. A.; LO, M.; BULACH, D. M.; CORDWELL, S. J.; ADLER, B. Construction and evaluation of a plasmid vector for the expression of recombinant lipoproteins in *Escherichia coli*. **Plasmid**, v. 49, p. 18-29, 2003.
- 125 LAMANI, E.; McPHERSON, D. T.; HOLLINGSHEAD, S. K.; JEDRZEJAS, M. J. Production, Characterization, and Crystallization of Truncated Forms of Pneumococcal Surface Protein A from *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.**, v. 20, p. 379-388, 2000.
- 126 THIRY, M.; CINGOLANI, D. Optimizing Scale-up Fermentation Process. **Trends Biotechnol.**, v. 20, p. 103-105, 2002.

127 CHAO, Y. P.; CHINAG, C. J.; HUNG, W. B. Strigent Regulation and High-Level Expression of Heterologous Genes in *Escherichia coli* Using T7 System Controllable by the araBAD Promoter. **Biotechnol. Prog.**, v. 18, p. 394-400, 2002.

128 CORCHERO, J. L.; VILLAVERDE, A. Plasmid Maintenance in *Escherichia coli* recombinant Cultures is Dramatically, Steadily, and Specifically Influenced by Feature of the Encoded Proteins. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 58, n. 6, p. 625-631, 1998.

129 CAZORLA, D.; FERRER-MIRALLES, N.; FELIU, J. X.; CARBONELL, X.; VILLAVERDE A. Plasmid Maintenance and Recombinant Cell Fitness Explored in Bacterial Colonies. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 831-838, 2001.

130 PAN, S. H.; MALCOLM, B. A. Reduced Background Expression and Improved Plasmid Stability with pET Vectors in BL21(DE3). **Biotechniques**, v. 29, p. 1234-1238, 2000.

131 GLASCOCK, C. B.; WEICKERT, M. J. Using Chromosomal LacIQ1 to Control Expression of Genes on High-Copy-Number Plasmid in *Escherichia coli*. **Gene**, p. 221-231, 1998.

132 KOLODNY, N.; KITOV, S.; VASSEL, M. A.; MILLER, V. L.; WARE, L. A.; FEGEDING, K.; De La VEGA, P.; SACCI, J. B.; LANAR, D. E. Two-Step Chromatographic Purification of recombinant Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein From *Escherichia coli*. **J. Chromatogr.**, v. 762, p. 77-86, 2001.

133 KIM, C. H.; LEE, J. Y.; KIM, M. G.; SONG, K. B.; SEO, J. W.; CHUNG, B. H.; CHANG, S. J.; RHEES, K. Fermentation Strategy To Enhance Plasmid Stability During The Cultivation of *Escherichia coli* For The Production of Recombinant Levansucrase. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 86, n. 4, p. 391-394, 1998.

134 MENDOZA-MARÍ, Y.; ESPINOSA, A. E. S.; UBIETA, R.; BATISTA, O. F.; FERNÁNDES, M. L. Effect Of The Selection Marcker On The Viability And Plasmid Stability Of Two Human Proteins With Neurotrophic Action Expressed in *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 258, p. 29-31, 1999.

135 FIEDLER, M.; SKERRA, A. proBA Complementation of Auxotrophic *Escherichia coli* Strain Improves Plasmid Stability and Expression Yield During Fermenter Production of a Recombinant Antibody Fragment. **Gene**, v. 274, p. 111-118, 2001.

136 SARASWAT, V.; LEE, J.; KIM, D. Y.; PARK, Y. H. Synthesis of Recombinant Human Interleukin 2 Via Controlled Feed of Lactose - Complex Media in Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli* BL21(DE3) [pT7-G3IL2]. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 261-265, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1

Composição dos meios de cultivo

Tabela 10 - Meio rico, 2YT

Componentes	Concentração (g/L)
Triptona	16
Extrato de levedo	10
NaCl	5
H ₂ O Milli-Q	q.s.p

* Foi ajustado o pH do meio 2YT a 7,0 , seguido de autoclavação.
Meio de cultivo usado para crescimento de *E. coli*.

Tabela 11 - Meio rico, LB

Componentes	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de levedo	5
NaCl	10
H ₂ O Milli-Q	q.s.p.

* Foi ajustado o pH do meio LB a 7,0 , seguido de autoclavação.
Meio de cultivo usado para crescimento de *E. coli*.

Tabela 12 - Meio mínimo definido, HDF

Componentes	Concentração final
Glicose (autoclavar separada)	20 g/L
MgSO ₄ * 7H ₂ O (autoclavar separado)	1,2 g/L
KH ₂ PO ₄	13,3 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g/L
Ácido Cítrico*H ₂ O	1,7 g/L
Citrato de Ferro (III)	100,8 mg/L
CoCl ₂ *6H ₂ O	2,5 mg/L
MnCl ₂ *4H ₂ O	15 mg/L
CuCl ₂ *2H ₂ O	1,5 mg/L
H ₃ BO ₄	3 mg/L
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	2,1 mg/L
Zn(CH ₃ COOH) ₂ * 2H ₂ O	33,8 mg/L
EDTA	14,1 mg/L
Tiamina (esterilizar por filtração em 0,22 µm)	4,5 mg/L
Anti-espumante (polipropilenoglicol)	0,1 mg/L
H ₂ O q.s.p.	Ajusta-se o volume p/ 1 L

* Foi ajustado o pH do meio HDF em 6,3 com 5N de Na OH, seguido de autoclavagem

* Ampicilina 100 µg/mL (100mg/L), esterilizada por filtração em 0,22 µm

* Kanamicina 20 µg/mL (20mg/L), esterilizada por filtração em 0,22 µm

* 16 g/L Agar para meios sólidos

ANEXO 2A

Sequência nucleotídica da rPsaA

189 atgaaaaaattaggtacattactcgttctctttctttctgcaatc
M K K L G T L L V L F L S A I
234 attctttagcatgtgctagcggaaaaaaagatacaacttctggt
I L V A C A S G K K D T T S G
279 caaaaactaaaagttgttgctacaaaactcaatcatcgctgatatt
Q K L K V V A T N S I I A D I
324 actaaaaatattgctggtgacaaaattgaccttcatagtatcggt
T K N I A G D K I D L H S I V
369 ccgattgggcaagaccacacgaatacgaaccacttctgaagac
P I G Q D P H E Y E P L P E D
414 gttaagaaaacttctgaggctgatttgattttctataacggtatc
V K K T S E A D L I F Y N G I
459 aaccttgaaacaggtggcaatgcttgggttacaaaattggtagaa
N L E T G G N A W F T K L V E
504 aatgccaagaaaactgaaaacaaagactacttcgcagtcagcgac
N A K K T E N K D Y F A V S D
549 ggcgttgatgttatctaccttgaagggtcaaatgaaaaaggaaaa
G V D V I Y L E G Q N E K G K
594 gaagaccacacgcttggcttaaccttgaaaacggtattatttt
E D P H A W L N L E N G I I F
639 gctaaaaatatcgccaacaattgagcgccaaagaccctaacaat
A K N I A K Q L S A K D P N N
684 aaagaatttctatgaaaaaaatctcaaagaatatactgataagtta
K E F Y E K N L K E Y T D K L
729 gacaaacttgataaagaaagtaaggataaatttaataagatccct
D K L D K E S K D K F N K I P
774 gctgaaaagaaactcattgtaaccagcgaaggagcattcaaatac
A E K K L I V T S E G A F K Y
819 ttctctaaagcctatggtgtccaagtgcctacatctgggaaatc
F S K A Y G V P S A Y I W E I
864 aatactgaagaagaaggaactcctgaacaaatcaagaccttggtt
N T E E E G T P E Q I K T L V
909 gaaaaacttcgccaacaaaagttccatcactctttagaatca
E K L R Q T K V P S L F V E S
954 agtgtggatgaccgtccaatgaaaaactgtttctcaagacacaaac
S V D D R P M K T V S Q D T N
999 atcccaatctacgcacaaatctttactgactctatcgcagaacaa
I P I Y A Q I F T D S I A E Q
1044 ggtaaaagaaggcgacagctactacagcatgatgaaatacaacctt
G K E G D S Y Y S M M K Y N L
1089 gacaagattgctgaaggattggcaaaa~~taa~~ 1118
D K I A E G L A K *

ANEXO 2B

Sequência nucleotídica da rFPspA1

4 atgatccttaggggctgggttttgttacgtctcaaccttcttttcta
M I L G A G F V T S Q P S F V
49 agagcagaagaagcgcccgtagctagtcagtcctaaagctgagaaa
R A E E A P V A S Q S K A E K
94 gactatgatgcagcagtgaaaaaatatgaagctgctaagaaggaa
D Y D A A V K K Y E A A K K E
139 tatgaggacggaaaagctgctcagaaaaagtatgaagatgatcag
Y E D G K A A Q K K Y E D D Q
184 aagaaaactgaggagaaaagcggaagaagaagaaaagcttctgaa
K K T E E K A E E E R K A S E
229 gaagaacaagctgcaaatctgaaatatcaacaagatttggttaaa
E E Q A A N L K Y Q Q E L V K
274 tatatacgtgaaaatgatccaacaaaaaagctgaagctaagaaa
Y I R E N D P T K K A E A K K
319 gcaatggatgaggctgagaaagagtataagaaaaaacaacggaa
A M D E A E K E Y K K K Q T E
364 tttgctgaagttcgtgcaaaggttaattcctagcgcggaagaatta
F A E V R A K V I P S A E E L
409 aaaaagactagacaaaaagcagaagaggctaaagcaaaagaagca
K K T R Q K A E E A K A K E A
454 gaacttactaaaaagtagaagaagctgagaaaaaagttattgaa
E L T K K V E E A E K K V I E
499 gccaaacaaaagtggatgcagacatgtgaagaagtcgttcctcaag
A N K S G C R H V K K S F L K
544 ttaaaatcggtgaattggaacatgaagttcagaaaacttagaaaa
L K S L N W N M K F R N L E K
589 gctctcaaagagattgatgagtcgtattcagaagattatgttaaa
A L K E I D E S D S E D Y V K
634 gaaggctctccgtgttcctcttcaatttgattggatgttaagcaa
E G L R V P L Q F E L D V K Q
679 gctaaactatcaaaactgaagagttgagtgataagattgatgag
A K L S K L E E L S D K I D E
724 ttagacgctgaaattgcaaaactgaaaaagatgtagaagatttc
L D A E I A K L E K D V E D F
769 aaaaactcagacggtagcaagctggacaataccttgctgcagct
K N S D G E Q A G Q Y L A A A
814 gaagaagacttagttgctaaaaaagctgaattagaaaaaactgaa
E E D L V A K K A E L E K T E
859 gctgaccttaagaaagcagttaatgagccagaaaaaccagctgaa
A D L K K A V N E P E K P A E
904 gaaactccagctccagcaccacaaaaccagagcaaccagctgaacaa
E T P A P A P K P E Q P A E Q
949 ccaaaaccagcgccggctcctcaaccagaaaaaccagctgaagag
P K P A P A P Q P E K P A E E
994 cctgagaatccagcttcagcaccacaacca 1023
P E N P A S A P Q P

ANEXO 2C

Sequência nucleotídica da rFPspA3

1 atgatcttaggggctgggttttgttacgtctcagcctacttttgta
M I L G A G F V T S Q P T F V
46 agagcagaagaagctcccgtagctagtcagtcctaaagctgagaaa
R A E E A P V A S Q S K A E K
91 gactatgatgcagcagtgaaaaaatctgaagctgctaagaaacat
D Y D A A V K K S E A A K K H
136 tatgaagaagttaaaaagaaagcagaagacgctcagaagaaatat
Y E E V K K K A E D A Q K K Y
181 gacgaggggtcagaagaaaacggtagaaaaagcaaagcgagaaaaa
D E G Q K K T V E K A K R E K
226 gaagcttctgaaaagatagctgaggcaacaaaagaagttcaacaa
E A S E K I A E A T K E V Q Q
271 gctagcaacgaaagtcagagaaaagggcagataagaagataaaa
A S N E S Q R K E A D K K I K
316 gaagctacgcaacgcaaagatgaggcggaagctgcatttgctact
E A T Q R K D E A E A A F A T
361 attcgaacaacaattgtagttcctgaaccaagtgagttagctgag
I R T T I V V P E P S E L A E
406 actaagaaaaaagcagaagaagctaaagcagaagaaaaagtagct
T K K K A E E A K A E E K V A
451 aagagaaaatatgattatgcaactctaaaggtagctctagcgaag
K R K Y D Y A T L K V A L A K
496 aaagaagtagaggctaaggaacttgaaattgaaaaacttcaatat
K E V E A K E L E I E K L Q Y
541 gaaatttctacttttggaacaagaagttgctactgctcaacatcaa
E I S T L E Q E V A T A Q H Q
586 gtagataatttgaaaaaacttctgctggcggaatcctgatgat
V D N L K K L L A G A D P D D
631 ggcacagaagttatagaagctaaattaacaaaaggagaagctgag
G T E V I E A K L N K G E A E
676 ctaaacgctaaacaagctgagtttagcaaaaaacaaacagaactt
L N A K Q A E L A K K Q T E L
721 gaaaaaacttcttgacagccttgatcctgaaggtaagactcaggat
E K L L D S L D P E G K T Q D
766 gaattagataaagaagcagaagaagctgagttggataaaaaagct
E L D K E A E E A E L D K K A
811 gatgaacttcagaataaagttgctgatttagaaaaagaaattagt
D E L Q N K V A D L E K E I S
856 aaccttgaaatattacttgagggggctgattctgaagatgatact
N L E I L L G G A D S E D D T
901 gctgctcttcaaaataaattagctactaaaaaagctgaattggaa
A A L Q N K L A T K K A E L E
946 aaaactcaaaaagaattagatgcagctcttaatgagttagccct
K T Q K E L D A A L N E L G P
991 gatggagatgaagaagaactccagcgccggctcctcaaccagag
D G D E E E T P A P A P Q P E
1036 caaccagctcctgcacaaaaccagagcaaccagctcaagcacca
Q P A P A P K P E Q P A Q A P
1081 aaatctagataaa 1092
K S R *