

CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DE *E. coli* E DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE SOB DIFERENTES NÍVEIS DE INDUÇÃO

J.H. BONOMO¹, G. G. SILVA¹, G. CAMPANI¹, C. B. BORGES¹, M. M. JESUS¹, J.V.L. ANDRADE¹, V. M. GONÇALVES² e T. C. ZANGIROLAMI¹

¹Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

²Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia

E-mail para contato: jessica.hbonomo@gmail.com

RESUMO –*Escherichia coli* é uma bactéria gram negativa amplamente utilizada em bioprocessos para produção de proteínas recombinantes por ser bem caracterizada e apresentar alta produtividade. No entanto, a superexpressão de proteínas heterólogas gera estresse celular e provoca diferentes respostas celulares. Objetivando estudar o efeito da produção de proteína sobre a morfologia celular, realizaram-se cultivos de *E. coli* expressando a proteína recombinante PspA sob diversas condições de crescimento e indução. Os experimentos foram conduzidos em câmara incubadora, com acompanhamento da morfologia celular através de observação de lâminas em microscópio ótico e análise de imagens, bem como do crescimento celular e da produção de proteína. Observou-se que o tempo de cultivo aparentemente influenciou a morfologia celular, mas não foi possível estabelecer o efeito da produção da proteína sobre a morfologia. Os resultados contribuem para a determinação de estratégias de cultivo de *E. coli*.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* tem sido amplamente usado para a produção de moléculas de interesse em diversas áreas, por ser um sistema bem conhecido e estudado (Lee et al., 2001) e de alta produtividade em relação a outros sistemas. A produção de uma proteína heteróloga, no entanto, é um processo não natural ao metabolismo da célula, desencadeando respostas celulares que podem inclusive afetar a produção da proteína de interesse. Condições de cultivo como temperatura, composição do meio de cultura, tipo de indutor empregado e condições de aeração são os principais fatores que afetam a produção de proteína em estudos conduzidos em câmara incubadora ou biorreator.

A exposição a condições estressantes durante a fase de indução, relacionadas com a produção de proteínas e o esgotamento de nutrientes, pode afetar a célula provocando alterações metabólicas e morfológicas (Koolae et al., 2006). De fato, foi observada por Silva et al. (2013) a presença de células alongadas durante cultivos em biorreator de *rE. coli* expressando a proteína PspA e também por Kyle et al. (2012), no cultivo de *rE. coli* expressando o peptídeo lunasina. Estes últimos autores atribuíram o fenômeno observado a falhas no ciclo da divisão celular, que parece ter sido inibido em

uma fração das células, resultando em células alongadas, não septadas, com comprimentos de até 100µm.

Este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito de diferentes condições de cultivo e indução sobre a morfologia de *E. coli* durante a produção de proteína recombinante (PspA).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi *Escherichia coli* BL21(DE3) pET37b+PspA4Pro gentilmente cedido por gentilmente cedida pela Dra. Eliane N. Miyaji, denominado *E. coli* PspA4Pro, que expressa o fragmento da proteína PspA da família 2, do clado 4, contendo a porção N-terminal, a região definidora de clado e a região rica em prolina da molécula. O vetor pET37b+ contém o promotor T7/lac (induzido por IPTG ou lactose), gene do repressor LacI, sítio de ligação ao ribossomo (RBS), códon ATG de início de tradução, sinal de terminação de transcrição “T7 terminal” e gene de resistência a canamicina. Para o controle negativo, foi utilizada *Escherichia coli* BL21(DE3) pET37b Ø, contendo os mesmos componentes da construção anterior, exceto o fragmento proteico de PspA.

[F1] Comentário: Arrumar grafia.

[JB2] Comentário:

2.2. Meio de cultivo

Foi utilizado meio de cultivo complexo, com a seguinte composição: 2 g/L de glicose, 10 g/L de glicerol, 10 g/L de proteína de soja hidrolisada (Phytone®), 5 g/L de extrato de levedura, 9 g/L de Na₂HPO₄, 2,7 g/L de NH₄Cl, 0,7 g/L de Na₂SO₄, 0,5 g/L de MgSO₄.7H₂O, 3,4 g/L de K₂HPO₄, 100,8 mg/L de Fe(III)citrato, 2,5 mg/L de CoCl₂.6H₂O, 15 mg/L de MnCl₂.4H₂O, 1,5 mg/L de CuCl₂.2H₂O, 3 mg/L de H₃BO₃, 2,1 mg/L Na₂MoO₄.2H₂O, 33,8 mg/L de Zn(CH₃COOH)₂.H₂O, 14,1 mg/L de EDTA, 45 mg/mL de tiamina e 100 µg/mL de canamicina. Para os experimentos conduzidos sob a estratégia de autoindução, o meio foi acrescido de lactose na concentração de 5g/L.

[F3] Comentário: Arrumar

2.3. Métodos analíticos

Durante os cultivos foi feito o acompanhamento da concentração celular através da medida de densidade óptica das suspensões celulares a 600nm, bem como através do método da massa seca (MS), ao final do cultivo, a qual foi utilizada para estabelecer uma correlação entre as medidas de DO_{600nm} concentração de biomassa em g/L ($Cx=0,4*DO_{600nm}$). A concentração de proteínas solúveis totais produzida foi avaliada através do método de Bradford, e a concentração da proteína de interesse, PspA, foi estimada através de densitometria da banda correspondente à proteína de interesse após eletroforese da fração solúvel, com o uso do software ImageJ. A fração de proteínas solúveis totais foi obtida por centrifugação (4000 rpm, 4°C, por 1h) após o rompimento de suspensão celular em tampão 20mM tris, NaCl 250mM, pH 8,0 (DO = 1,0) por sonicação (5 minutos, pulsos de 30s e amplitude de 20%) conforme descrito em Santos, 2012. Foi calculada também a produção específica de PspA dividindo-se a concentração da proteína na fração solúvel pela concentração em massa seca da suspensão sonicada, expressa em mgPspA/gMS.

[F4] Comentário: Separar unidade do número.

[F5] Comentário: Separar a unidade de medida do número.

Para a determinação da retenção do plasmídeo, foi realizada a repicagem de unidades formadoras de colônias em meio LB-ágar contendo 100mg/L de canamicina e em meio LB-ágar sem o antibiótico (controle). A retenção plasmidial foi estimada como a porcentagem de colônias que cresceram sob pressão seletiva em relação às que cresceram na placa controle.

A morfologia celular foi acompanhada através da visualização em microscópio ótico de lâminas feitas durante o cultivo coradas pelo método de Gram (Kyle et al., 2011). Imagens de cada lâmina foram adquiridas através de câmera digital acoplada ao microscópio. Estas imagens foram binarizadas usando o software ImageJ e processadas em rotina desenvolvida em Matlab para determinação do diâmetro e comprimento da população de células em cada amostra (Andrade et al., 2013; Zimer et al. 2013).

2.4. Procedimento experimental

Uma suspensão de células armazenada a -80°C em glicerol a 10% v/v foi estriada em placa de LB-ágar contendo 100mg/L de canamicina e incubada por 24h a 37°C. Foram preparados erlenmeyers estéreis contendo 30mL de meio de cultivo complexo que receberam, cada um, uma colônia crescida em meio sólido. Os frascos foram incubados em mesa rotativa a 250rpm e 30°C até DO_{600nm} entre 2,0 e 2,5. As suspensões resultantes foram utilizadas como inóculo para os estudos de produção de proteína. Um total de 6 experimentos, cujas principais características são resumidas na Tabela 1, foram realizados. Os cultivos foram conduzidos em frascos de 500mL contendo 100mL de meio de cultura complexo, mantidos a 300rpm e 31°C durante a fase de crescimento. Quando a absorbância atingiu DO_{600nm} entre 2,0 e 2,5, foi realizada a adição do pulso de indutor (5g/L de lactose ou 1mM de IPTG – concentração final), dando início à fase de produção da proteína (Exp1 e Exp2). No momento da adição do pulso, a temperatura foi ajustada para 37°C. Não houve adição de indutor no Exp3 (controle). O experimento 3 foi conduzido a 37 °C na ausência de indutor para avaliar o crescimento e a morfologia sem produção de proteína. Exp4 foi conduzido com o clone não produtor de PspA e teve por objetivo avaliar a toxicidade do IPTG sobre a célula. Os experimentos 5 e 6 foram realizados sob a estratégia de autoindução, não havendo adição de indutor após o início do cultivo, e a temperatura foi mantida desde o início no valor desejado (27°C ou 37°C).

Tabela 1 – Micro-organismo, estratégia de indução e temperatura empregados nos estudos de produção de PspA.

| | Micro-organismo | Indutor | Temperatura |
|------|-----------------------------------|-----------------------|-------------|
| Exp1 | <i>E. coli</i> PspA4Pro | IPTG (pulso) | 37°C |
| Exp2 | <i>E. coli</i> PspA4Pro | Lactose (pulso) | 37°C |
| Exp3 | <i>E. coli</i> PspA4Pro | - | 37°C |
| Exp4 | <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b Ø | IPTG (pulso) | 37°C |
| Exp5 | <i>E. coli</i> PspA4Pro | Lactose (autoindução) | 27°C |
| Exp6 | <i>E. coli</i> PspA4Pro | Lactose (autoindução) | 37°C |

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

[F6] Comentário: Separar as unidades de medida dos números. Isto para todo o texto.

[C7] Comentário: Colocar na ordem de apresentação da Tabela 1. Assim, fica confuso.

[C8] Comentário: Corrigir para a nova ortografia.

O perfil de crescimento das células para os 6 experimentos realizados estão apresentados na Figura 1. A concentração inicial foi de ~ 0,4g/L, chegando a um máximo de 2,6g/L, no experimento 3, no qual não houve adição de indutor. Valores superiores a 2,4 para a concentração celular final também foram obtidos nos experimentos conduzidos sob a estratégia de autoindução (Exp5 e Exp6). Menor formação de biomassa foi observada no Exp4 (1,6 g/L) e no Exp1 (2,0 g/L), ambos tendo IPTG como indutor, o que confirma o efeito tóxico deste composto.

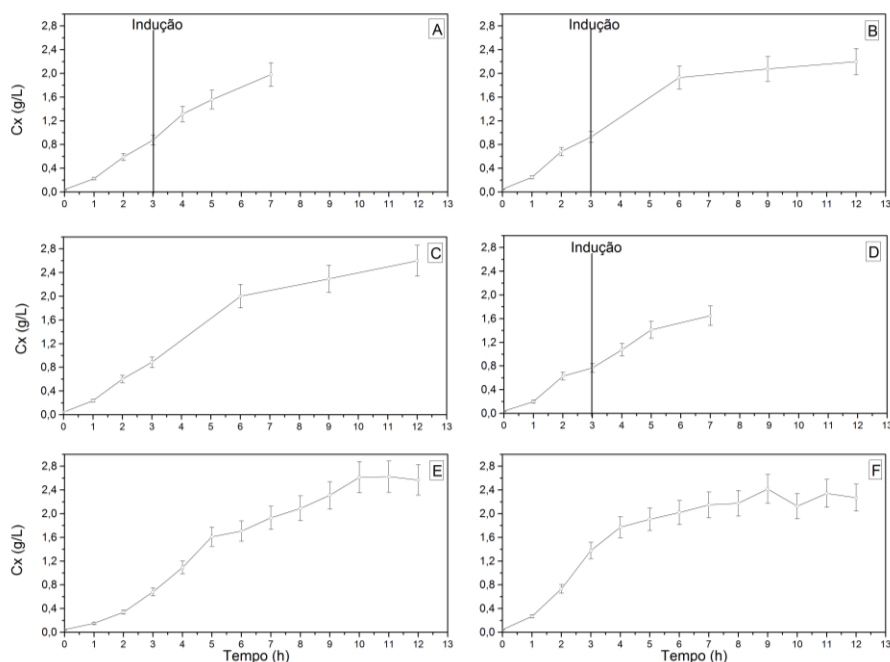


Figura 1 – Perfil de crescimento da *rE.coli* nos estudos de produção de proteína: A: Exp1, B: Exp2, C: Exp3, D: Exp4, E: Exp5, F: Exp6.

A estratégia de indução empregada apresentou forte influência sobre a retenção plasmidial. Nos experimentos induzidos por lactose (Exp2, 5 e 6), a retenção do plasmídeo ao final do cultivo foi de 100%, 83% e 78%, respectivamente, valores similares à retenção plasmidial na ausência de indução (Exp3) foi de 98%. Esta estabilidade não foi observada quando IPTG foi o agente indutor usado. Nos experimentos 1 e 4, apenas 48% e 17%, respectivamente, das células ao final do experimento apresentavam retenção do plasmídeo. Isso explica a menor formação de biomassa observada nestes experimentos.

As curvas representando a produção específica de PspA nos cultivos nos quais houve sua expressão são mostradas na Figura 2. A análise não foi feita para o Exp4, pois este foi realizado com

[C9] Comentário: Colocar letra maiúscula no começo da palavra.

micro-organismo que não possuía o gene para a expressão da proteína. O experimento que apresentou maior produção específica de PspA foi Exp6, tendo máximo de 134,5mgPspA/gMS após 9 horas de indução, que ocorreu de forma gradual com lactose (autoindução). O Exp1 aproximou-se bastante do valor máximo obtido, com produção específica de 158,1mgPspA/gMS em 4 horas de indução por IPTG. Os experimentos 2 e 5 também apresentaram bons níveis de produção de proteína. O experimento 3, no qual não houve adição de indutor, também apresentou significativa produção de proteína. Este fato já foi relatado na literatura (SANTOS, 2012) e está associada a compostos presentes no extrato de levedura e no Phytone, que podem ativar a síntese de proteína.

[C10] Comentário: Arrumar conforme nova ortografia.

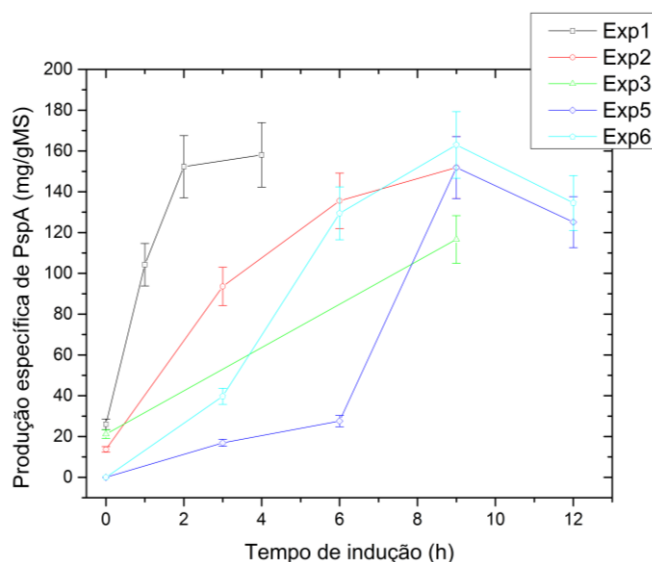


Figura 2 – Produção específica da proteína PspA nos diferentes experimentos.

[C11] Comentário: Esta informação pode ser removida da legenda da figura, pois está descrita no texto.

Em relação à análise da morfologia, para os experimentos 1 e 4, o comprimento das células foi avaliado 0, 1, 2 e 4 horas após a indução. Já para os experimentos 2 e 3, foram colhidas amostras nos tempos 0, 3, 6 e 9 horas após a indução e para os experimentos 5 e 6, nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 horas após a indução. O perfil de comprimento das células é apresentado na Figura 3. Através de análises de ANOVA, comprova-se que, com significância de 0,05, ocorre uma diminuição no comprimento celular da população entre 0 e 1 hora de indução nos experimentos Exp2 e Exp3, entre 1 e 2 horas de indução em Exp4, bem como entre os tempos 3 e 6 horas de indução em Exp5 e Exp6. O comprimento médio da população volta aos valores iniciais no Exp2 entre 6 e 9 horas de indução e no Exp3 entre 3 e 6 horas de indução. No Exp6, após a diminuição do comprimento, a média volta ao valor inicial 9 horas após a indução, porém volta a cair 3 horas mais tarde. Nos experimentos Exp5 e Exp6, o comprimento médio populacional é mantido até 3 horas de indução, possivelmente, devido ao fato de, nestes experimentos, a análise da morfologia ter sido realizada desde o início do cultivo, 3

horas mais cedo em relação à mesma análise nos outros cultivos. A Figura 4 mostra a relação entre o comprimento médio das células e as produções específicas de proteína solúvel total e PspA.

[C12] Comentário: Colocar letra maiúscula no começo da palavra.

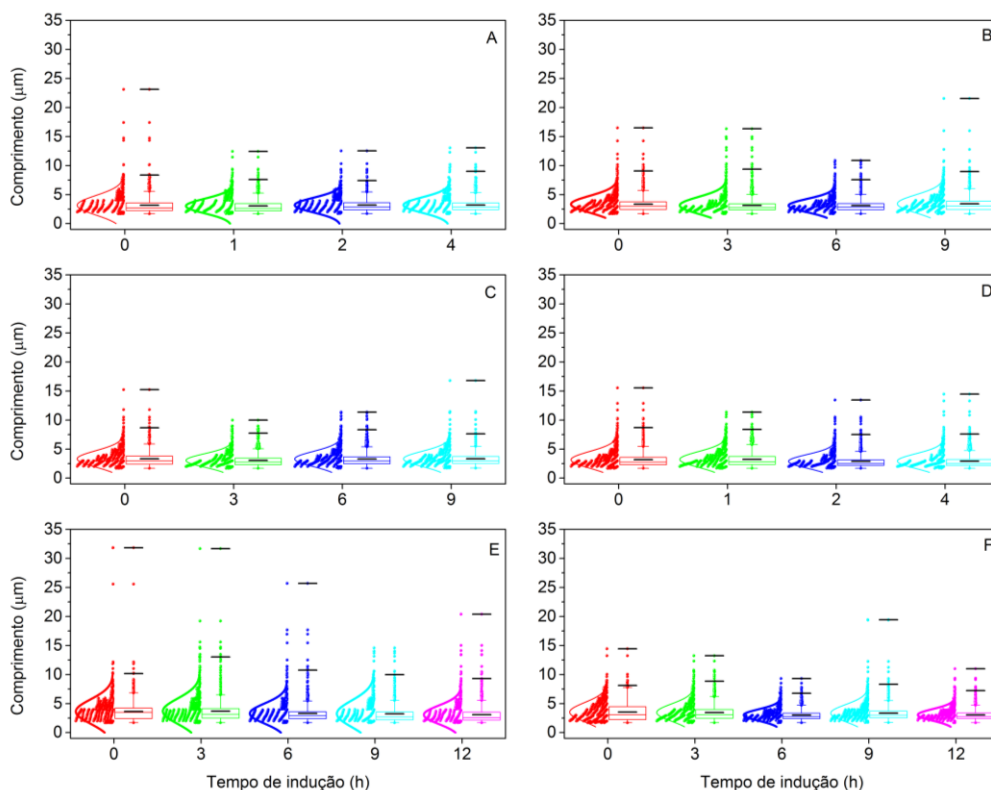


Figura 3 – Perfil de variação do comprimento das células durante os experimentos. A: Exp1 B: Exp2 C: Exp3 D: Exp4 E: Exp5 F: Exp6. Os traços horizontais marcam o comprimento máximo entre as células amostradas, o comprimento que compreende 99% das células amostradas e a média de seu comprimento.

Excetuando o experimento Exp4, a média do comprimento das populações tende a cair com a indução, podendo voltar a subir após 6 horas de indução, quando dado o tempo. Nos experimentos Exp5 e Exp6, a média do comprimento é mantida até o tempo 3 possivelmente pelo fato de, nestes experimentos, a análise da morfologia ter sido realizada desde o início do cultivo, 3 horas mais cedo em relação à mesma análise nos outros cultivos.

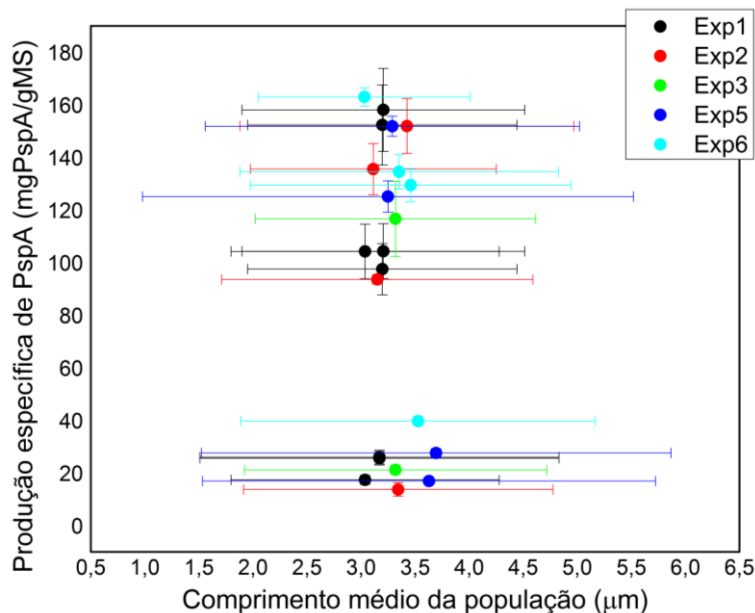


Figura 4 – Variação das médias do comprimento da população em relação à produção específica de PspA em cada experimento.

Observando a relação entre a produção específica de proteínas e o comportamento morfológico da população (Figura 4), não se pode encontrar um padrão sugerindo que as alterações morfológicas estão relacionadas com o tempo de cultivo. É importante notar que a metodologia empregada para análise da morfologia é altamente suscetível a erro. Além disso, a heterogeneidade da população de células aumenta com o tempo de cultivo, o que também influencia a morfologia, juntamente com os possíveis efeitos do estresse causado pela produção da proteína heteróloga, dificultando a análise isolada deste último.

[C13] Comentário: Colocar este trecho antes da Figura 4.

4. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o emprego da lactose como indutor, à temperatura de 37 °C, favorece a produção de biomassa e a estabilidade do plasmídeo, em comparação com o IPTG. Verificou-se ainda que de fato há alteração no comprimento celular da população de *rE. coli* em todas as condições estudadas onde há a produção da proteína recombinante. No entanto, esta alteração parece estar mais relacionada ao tempo de cultivo do que à produção de proteína, como previamente suposto.

[C14] Comentário: Descrever sob qual situação este fenômeno é observado e conclusivo.

A elucidação do comportamento morfológico de *E. coli* durante processos de produção de proteínas de interesse pode ajudar no desenvolvimento de novas metodologias e estratégias de processo e controle, contribuindo para estudos envolvendo a produção heteróloga de proteínas. Agradecimentos à FAPESP e à CAPES.

5. REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHAES, P. J.; RAM, S. J. Imageprocessing with Image J. Biophotonics International, v.11, p. 36-42, 2004.
- ANDRADE, J.V.L; CARRA, M.; SILVA, G.G.; CAMPANI JR., G.; ZANGIROLAMI, T.C. Acompanhamento de mudanças morfológicas em cultivos de *Escherichia coli* recombinante por análise de imagens utilizando recursos computacionais. Trabalho aceito para publicação nos Anais do X Congresso Brasileiro de Iniciação Científica, Vassouras, RJ, 2013.
- KOOLAE, S.M.V.; SHOJAOSADATI, S.A.; BABAEIPOUR, V.; GHAEEMI, N. Physiological and morphological changes of recombinant *E. coli* during over-expression of human interferon- γ in HCD. Iranian Journal of Biotechnology, v 4 (4), p. 230-238, out. 2006.
- KYLE, S.; JAMES, K.A.R.; MCPHERSON, M.J. Recombinant production of the therapeutic peptide *lunasin*. Microbial Cell Factories, v. 11, fev. 2012.
- LEE, J.; SARASWAT, V.; KOH, I.; SONG, K.B.; PARK, Y.H.; RHEE, S.K. Secretory production of *Arctobacter levan* fructotransferase from recombinant *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters, v.195, p.127-132, 2001.
- SANTOS, M.P. Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – PPG-EQ/UFSCar.
- SILVA, G. G., CAMPANI Jr., G., SANTOS, M. P., SARGO, C. R., HORTA, A. C. L., GONÇALVES, V. M., BADINO Jr., A. C., ZANGIROLAMI, T. C. Estudo reológico dos caldos de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 19, 2013, Foz do Iguaçu. Anais... 1 DVD.
- ZIMER, A. M.; CARRA, M. A. S.; RIOS, E. C.; PEREIRA, E. C.; MASCARO, L. H. Initial stages of corrosion pits on AISI 1040 steel in sulfide solution analyzed by temporal series micrographs coupled with electrochemical techniques. Corrosion Science, v. 76, p. 27-34, nov. 2013.