

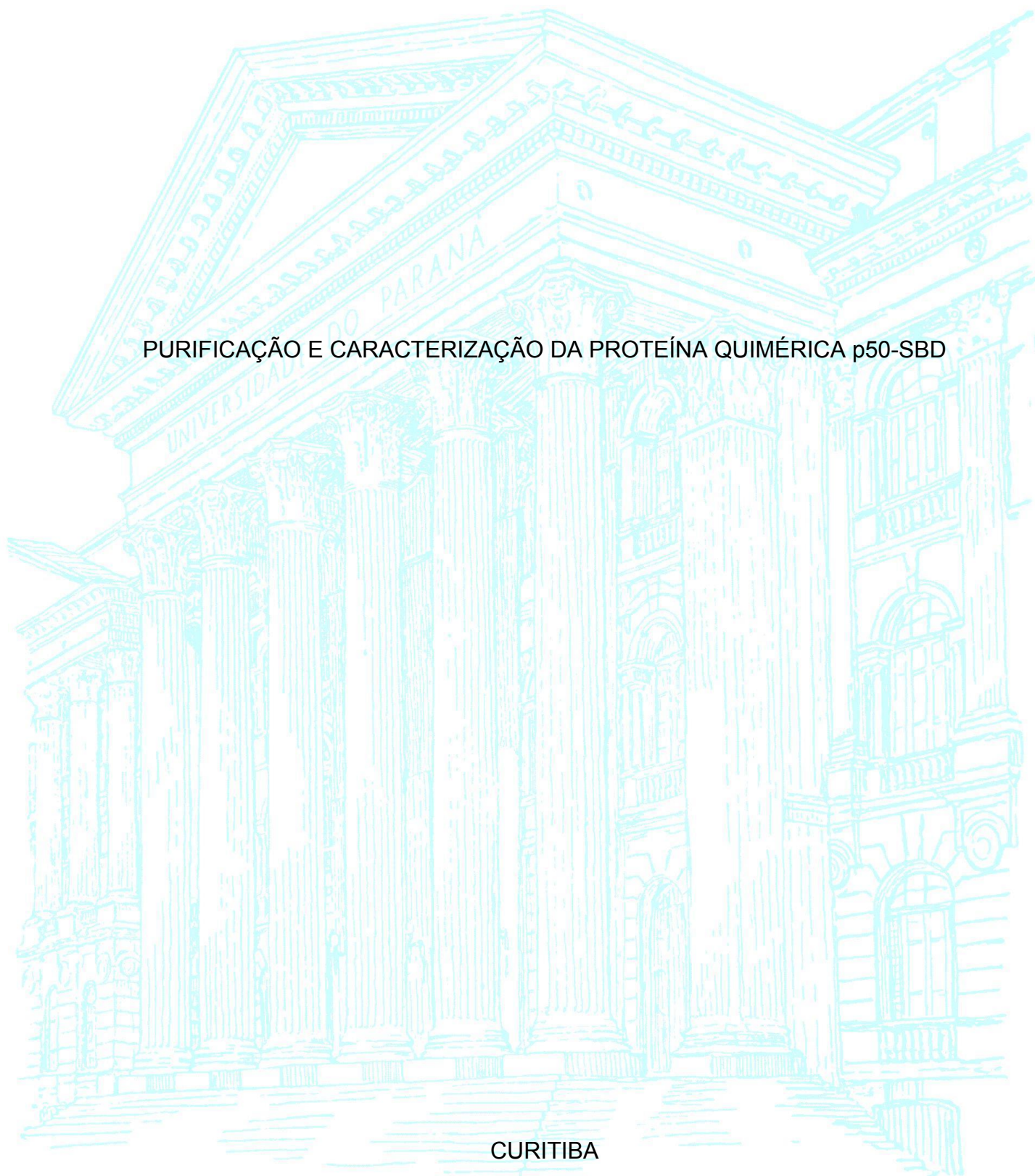
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNEMARIE SANTOS RAUTMANN

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA p50-SBD

CURITIBA

2023



ANNEMARIE SANTOS RAUTMANN

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA p50-SBD

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Coorientador: Dr. Ryu Masaki

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marcelo Müller dos Santos, meu orientador, que me possibilitou iniciar minha carreira científica com a oportunidade de trabalhar neste projeto. Por ser atencioso ao me ensinar, por me instigar na pesquisa e por sempre ser muito solícito.

Ao Dr. Ryu Masaki, meu coorientador, parceiro de projeto e amigo, que me ensinou o básico do laboratório até os "pulos do gato" da biologia molecular. Conseguimos deixar este trabalho "lindão da vó".

Aos meus amigos e colegas da 279 por todos os ensinamentos dentro e fora do laboratório e por todas as descontrações. Sempre me fizeram sentir bem-vinda e parte do laboratório.

A todos os meus amigos por não me deixarem desistir e me incentivarem a todo momento.

À Mariana Etcheverry Gnoato não só por me escutar, me apoiar e me incentivar, mas por sempre estar comigo.

E, por último, porém mais importante, aos meus pais, Maristela e Wolfram. Sem eles nada disso teria sido possível. Seja pelo investimento na minha educação desde pequena ou pelas conversas mais sem sentido em casa, sem vocês eu não estaria escrevendo esses agradecimentos da minha monografia - a última etapa para eu me tornar a bióloga pesquisadora que vocês tanto me apoiaram a ser.

"Gott sei Dank! Nun ist's vorbei
Mit der Übeltätere!"

Max und Moritz

RESUMO

Vacinas são o método mais eficaz de reduzir mortalidade ou morbidade causadas por doenças infecciosas. Existem diversos tipos de vacinas com diferentes mecanismos de ação, como de vírus atenuado, de vírus inativo, de subunidades e outras. Mais recentemente, as vacinas de DNA têm ganhado destaque. Essas são capazes de induzir uma resposta imune celular e humoral, além de serem rápidas, baratas e mais fáceis de serem produzidas em larga escala. Entretanto, as vacinas de DNA apresentam dificuldade na entrega do fármaco, já que o plasmídeo sozinho pode ser degradado pelas nucleases do paciente ou pode não adentrar a célula por conta das cargas negativas do material genético. Desse modo, o uso da proteína quimérica p50-SBD como adjuvante é interessante. A proteína p50 selvagem possui a capacidade de se ligar a uma sequência específica de DNA com alta afinidade, em constantes de dissociação (K_d) em nível de picomolar. Além dessa vantagem, a proteína quimérica p50-SBD é fusionada com um domínio SBD (*Substrate Binding Domain*) na porção N-terminal. Este domínio confere a habilidade da proteína ligar-se a nanopartículas de PHB (polihidroxibutirato), moléculas biocompatíveis, biodegradáveis e de fácil produção. O uso de nanopartículas conferiria a proteção do material genético da ação proteolítica e facilitaria a incorporação dele pela célula. Este trabalho teve como objetivo geral expressar, purificar e caracterizar a proteína p50-SBD. Para isso, foram feitos testes de expressão e purificação, a fim de determinar as melhores condições para a proteína. Foram realizados, também, ensaios de ligação da proteína p50-SBD ao DNA alvo, para caracterizar como uma ligação específica, e ensaios de ligação às nanopartículas de PHB, para verificar a ligação da proteína ao domínio SBD. Os resultados encontrados mostram que a proteína é capaz de se ligar ao DNA alvo com alta especificidade e, também, é capaz de ser imobilizada pela nanopartícula de polihidroxibutirato (PHB).

Palavras-chave: vacina de DNA; p50; ligação proteína-DNA; polihidroxibutirato (PHB).

ABSTRACT

Vaccines are the most effective method of reducing mortality or morbidity caused by infectious diseases. There are several types of vaccines with different mechanisms of action, such as attenuated virus, inactive virus, subunits, and others. More recently, DNA vaccines have gained attention. They can induce a cellular and humoral immune response, in addition to being fast, inexpensive and easier to produce on a large scale. Yet DNA vaccines have difficulty in drug delivery since the naked plasmid can be degraded by the host nucleases, or it may not enter the cell due to its negative charges. Thus, the use of p50-SBD chimeric protein as an adjuvant is interesting. The wild-type p50 protein can bind to specific DNA sequence with high affinity, at dissociation constants (K_d) at the picomolar level. In addition to this advantage, the p50-SBD chimeric protein is fused with an SBD domain (Substrate Binding Domain) in the N-terminal portion. This domain confers the ability of the protein to bind to PHB (polyhydroxybutyrate) nanoparticles, biocompatible, biodegradable, and easily produced molecules. The use of nanoparticles would protect the genetic material from proteolytic action and facilitate its incorporation by the cell. This work aimed to express, purify and characterize the p50-SBD protein. Therefore, expression and purification tests were performed to determine the best conditions for the protein. Binding assays of the p50-SBD protein to the target DNA were also carried out to characterize a specific binding and binding assays to PHB nanoparticles, to verify the binding of the protein to the SBD domain. The results show that the protein can bind to the target DNA with high specificity and can be immobilized by the polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticle.

Keywords: DNA vaccine; p50; DNA binding; polyhydroxybutyrate (PHB).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Conformação esperada da proteína quimérica p50-SBD.....	17
FIGURA 2 - Conformação esperada da proteína selvagem p50.....	17
FIGURA 3 - Conformação esperada do domínio SBD.....	17
FIGURA 4 - Esquema de expressão da proteína p50 em <i>E. coli</i> e sua ligação no sítio de reconhecimento no mesmo plasmídeo.....	18
FIGURA 5 - Ilustração da interação entre o domínio SBD de PhaZRpiT1 e do PHB	19
FIGURA 6 - Modelo de um grânulo de PHB em <i>R. eutropha</i>	20
FIGURA 7 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 37°C com 0,5 mM de IPTG.....	30
FIGURA 8 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 37°C com 1 mM de IPTG.....	31
FIGURA 9 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 30°C com 0,5 mM de IPTG.....	31
FIGURA 10 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 30°C com 1 mM de IPTG.....	32
FIGURA 11 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 19°C com 0,5 mM de IPTG.....	33
FIGURA 12 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 20 mM de imidazol.....	34
FIGURA 13 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 100 mM de imidazol.....	34
FIGURA 14 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 200 mM de imidazol.....	35
FIGURA 15 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 20 mM de imidazol.....	36
FIGURA 16 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 100 mM e 200 mM de imidazol.....	36
FIGURA 17 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da diálise das frações de 100 mM e	

200 mM de imidazol.....	37
FIGURA 18 - Gel de agarose do ensaio de ligação.....	38
FIGURA 19 - Gel de agarose de curva de ligação.....	39
FIGURA 20 - Gel de agarose de ligação específica.....	40
FIGURA 21 - Géis de SDS-PAGE das frações de proteína ligada a nanopartículas.....	42
FIGURA 22 - Géis de SDS-PAGE das frações de proteína não ligada a nanopartículas.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estirpes de bactérias utilizadas neste trabalho e suas características..	22
TABELA 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho e suas características.....	22
TABELA 3 - Composição de 1 mL de Buffer KF pH 7 ou pH 8.....	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
APCs	Células apresentadoras de antígenos profissionais
D.O.	Densidade Ótica
DTT	Ditiotreitol
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo
Km	Caramicina
LA	Meio Ágar Luria Bertani
LB	Meio Luria Bertani
NPs	Nanopartículas
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
rpm	Rotação por minuto
SBD	Substrate Binding Domain
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 VACINAS GÊNICAS.....	15
2.1.1 Otimização das vacinas gênicas.....	15
2.2.1 Ligação da proteína ao DNA alvo.....	18
2.2.2 Ancoragem de proteína quiméricas a nanopartículas.....	18
2.3 POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB).....	19
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 ESTIRPES UTILIZADAS E SUAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	22
4.2 PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO.....	22
4.3 TÉCNICAS DE CLONAGEM DE DNA.....	23
4.3.1 Preparo de células quimiocompetentes e transformação bacteriana.....	23
4.3.2 Extração e manutenção de plasmídeos.....	24
4.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p50-SBD.....	24
4.4.1 Testes de expressão da proteína p50-SBD.....	25
4.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD.....	25
4.5.1 Testes de purificação.....	25
4.6 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD AO DNA ALVO.....	26
4.7 ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD.....	27
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	28
4.8.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	28
4.8.2 Eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE).....	29
4.8.3 Quantificação de DNA por análise de imagem.....	29
4.8.4 Quantificação de proteínas.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30

5.1 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p50-SBD EM Escherichia coli.....	30
5.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD.....	33
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD.....	37
5.3.1 Ligação da proteína p50-SBD ao DNA alvo in vitro.....	37
5.3.2 Imobilização da proteína p50-SBD por NPs de PHB in vitro.....	41
5.4 RESULTADOS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS.....	44
5.4.1 Quantificação de DNA por análise de imagem.....	44
5.4.2 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.....	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Vacinações têm sido a maneira mais eficaz de reduzir mortalidade ou morbidade causadas por doenças infecciosas. Acredita-se que de 2 a 3 milhões de vidas são salvas no mundo, por ano, devido às vacinas (DELANY, 2014). Doenças como varíola (STRASSBURG, 1982) e poliomielite (MINOR, 2009) foram ou praticamente erradicadas por conta de programas de vacinação em massa.

Atualmente, existem diversos tipos de vacinas com diferentes mecanismos de ação. As mais comuns são as vacinas produzidas a partir de vírus atenuado, que contêm patógenos mais fracos para não serem capazes de causar a doença em si, ou de vírus inativo, em que o patógeno é incapaz de se replicar, porém sua imunogenicidade é mantida. Há, também, vacinas de subunidades, as quais são feitas a partir de fragmentos selecionados do patógeno (VETTER *et al.*, 2017). Mais recentemente, graças ao avanço da biotecnologia, foram desenvolvidas as vacinas de DNA (SHAFATI *et al.*, 2022).

Segundo Cui (2005), vacinas de DNA são desenvolvidas a partir da inserção de um gene que codifica um antígeno de interesse em um plasmídeo adequado, que contém uma região promotora de células eucarióticas. Então, os plasmídeos capturados adentram as células, chegando até o núcleo, onde o gene é transcrito pela maquinaria do próprio indivíduo. O antígeno não é reconhecido como endógeno, logo é gerado uma resposta imune contra ele.

As vacinas gênicas apresentam diversas vantagens em relação às outras vacinas. Diferente das vacinas de vírus atenuado ou de subunidade, as vacinas de DNA são capazes de induzir uma resposta imune celular e humoral, uma vez que permitem que as células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) processem o antígeno e apresentem o epítipo do antígeno às moléculas MHC de classe I e II (SAADE; PETROVSKY, 2012). As vacinas de DNA são rápidas, baratas e mais fáceis de serem produzidas em larga escala, além de serem relativamente estáveis em temperatura ambiente (SHAFATI *et al.*, 2022). Segundo Barbosa *et al.* (2021), a vacina gênica é mais segura, uma vez que o indivíduo não tem contato direto com o patógeno, assim sendo também mais indicada para as pessoas imunossuprimidas. Em comparação com as vacinas tradicionais, a vacina de DNA é capaz de atingir múltiplos patógenos ou mais de um componente de um patógeno

com uma só vacina, já que é possível combinar mais de um gene em um único plasmídeo (CUI, 2005).

Porém, as vacinas de DNA enfrentam alguns obstáculos na entrega do fármaco quando compostas apenas pelo plasmídeo, visto que é dificilmente incorporado pela célula do hospedeiro devido às cargas negativas do material genético. Há, também, a possibilidade desse DNA ser degradado pelas nucleases do paciente (HO *et al.*, 2021). Desse modo, o uso de adjuvantes com as vacinas gênicas asseguraria a entrega do fármaco intacto, aumentando a imunogenicidade da vacina (SAADE; PETROVSKY, 2012).

À vista disso, o uso da proteína quimérica p50-SBD torna-se interessante para o desenvolvimento de uma vacina de DNA. Isso se dá pela proteína p50 apresentar alta afinidade de ligação a plasmídeos que contêm seu sítio de reconhecimento, com constantes de dissociação (K_d) em nível de picomolar (SPEIGHT *et al.*, 2001).

Além disso, a proteína quimérica p50-SBD é composta por um domínio SBD (*Substrate Binding Domain*) na porção C-terminal. Este domínio é responsável pela ligação da proteína à nanopartícula de PHB de forma específica (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Segundo Pati *et al.* (2018), nanopartículas carreadoras são capazes de proteger a vacina de degradação prematura, melhorar a estabilidade e ajudar na entrega do antígeno às APCs. Assim, nanopartículas (NPs) de polihidroxibutirato (PHB) são ótimas alternativas, já que apresentam excelente biocompatibilidade, são biodegradáveis e fáceis de processar (SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013). Além disso, o polímero é vantajoso, visto que pode ser adquirido através de processos de fermentação utilizando microrganismos como *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Bacillus spp* ou até *E. coli* modificada geneticamente (BAROUTI; JAFFREDO; GUILLAUME, 2017).

Uma vez que as nanopartículas são capazes de proteger o material genético da degradação enzimática e facilitar a incorporação pela célula, a proteína quimérica p50-SBD seria responsável por garantir a entrega do DNA. Desse modo, a proteína p50-SBD em conjunto com as NPs de PHB, aparenta ser uma estratégia promissora para aumentar a eficiência das vacinas de DNA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VACINAS GÊNICAS

A vacina de DNA foi primeiramente reconhecida quando injetaram um plasmídeo via intramuscular (IM) em ratos e obtiveram a produção das proteínas que o plasmídeo injetado codificava (WOLL *et al.*, 1990).

Vacinas em geral atuam gerando uma resposta imune inata para que seja ativada uma resposta imune adaptativa em relação ao antígeno (VETTER *et al.*, 2017). As vacinas de DNA possuem este papel, além de serem tecnologias promissoras para tratamentos de doenças como câncer, aterosclerose e diabetes (KUTZLER; WEINER, 2008). Uma vez dentro do organismo, as vacinas gênicas vão codificar o antígeno, que estimula uma resposta imune ao mimetizar o patógeno. O antígeno é processado pelas células APCs que o apresentam aos linfócitos, responsáveis por matar os patógenos (LIM *et al.*, 2020). Assim, induzem uma resposta imune celular e humoral (SAADE; PETROVSKY, 2012).

Em relação às vacinas convencionais, as vacinas de DNA apresentam diversas vantagens, como baixo custo de produção em larga escala, maior estabilidade, fácil manipulação, expressão de um específico antígeno, maior segurança e imunogenicidade (ALPAR; PAPANICOLAOU; BRAMWELL, 2005).

Vacinas gênicas são adaptáveis, já que o alvo da vacina pode ser modificado a partir da alteração do gene contido no plasmídeo (LIM *et al.*, 2020), e podem ser rapidamente produzidas, grande motivo do controle da pandemia do vírus SARS-COV-19 (VAN RIEL; WIT, 2020), reduzindo a mortalidade e a disseminação da doença (JABŁOŃSKA; ABALLÉA; TOUMI, 2021).

2.1.1 Otimização das vacinas gênicas

Apesar das inúmeras vantagens, as vacinas gênicas enfrentam alguns obstáculos para que possam ser efetivas. Para isso, o plasmídeo precisa ser protegido da degradação por nucleases do organismo, internalizado pela célula, transportado até o núcleo onde será transcrito e traduzido como antígeno (NGUYEN *et al.*, 2009) e não pode ser inativado por interações não específicas por outras proteínas (LIM *et al.*, 2020).

2.2 PROTEÍNA QUIMÉRICA p50-SBD

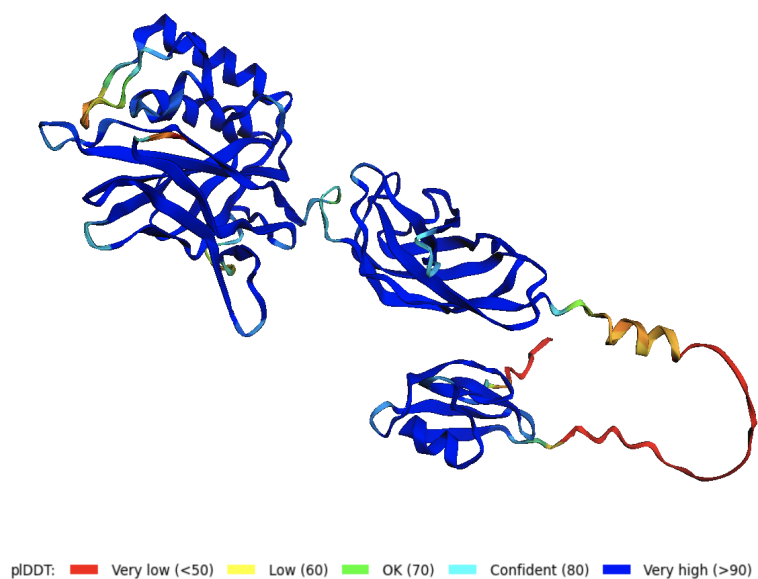
A proteína quimérica p50-SBD é composta por três principais partes. A primeira é inerente à proteína selvagem p50, a qual é capaz de se ligar ao DNA alvo (GHOSH et al., 1995). A segunda, é o domínio SBD (Substrate Binding Domain) fusionado na porção C-terminal da proteína, que é proveniente da enzima PHA depolimerase de *Alcaligenes faecalis*. E, por terceiro, há uma cauda His Tag de 6 histidinas, que permite uma purificação simples da proteína por cromatografia de afinidade a metal (PARK et al., 2008).

A possível estrutura tridimensional da proteína p50-SBD (FIGURA 1) foi gerada pelo programa AlphaFold2, a partir da sua sequência de aminoácidos, assim como a região de ligação ao DNA alvo (FIGURA 2) e o domínio SBD (FIGURA 3). As predições do programa têm se mostrado precisas (KILIM et al., 2023). Assim o programa tem sido usado cada vez mais, uma vez que métodos como cristalografia de raios-x, ressonância magnética nuclear e criomicroscopia são complexos, caros e demandam tempo (BERTOLINE et al., 2023).

A partir das figuras 2 e 3, pode-se visualizar onde está localizado e como cada domínio da proteína quimérica p50-SBD se enovela, sendo possível entender melhor como ocorrem as ligações da proteína ao DNA e às nanopartículas de PHB.

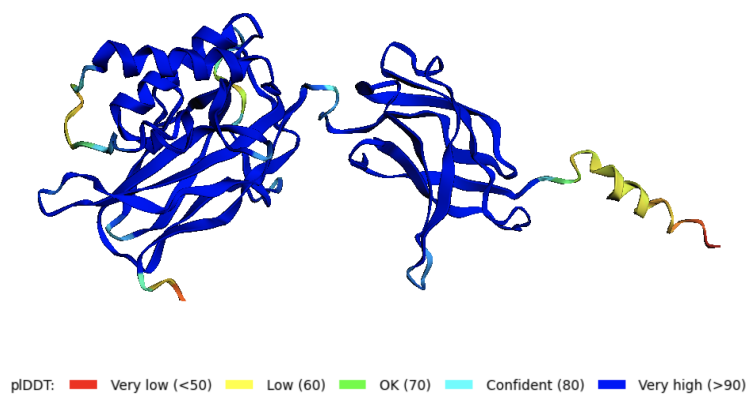
Segundo GHOSH et al. (1995), a proteína p50 assemelha-se a uma borboleta, em que os domínios são as asas que ligam-se ao DNA helicoidal, formando uma extensa superfície de contato. Portanto, a p50 é formada por duas partes que são ligadas por um segmento curto que atua como uma dobradiça, para que a proteína abra-se e feche-se para agarrar o DNA. Além disso, uma das partes é responsável por entrar em contato com os pares de bases, enquanto a outra interage com os fosfatos do DNA (MÜLLER et al, 1995).

FIGURA 1 - Conformação esperada da proteína quimérica p50-SBD



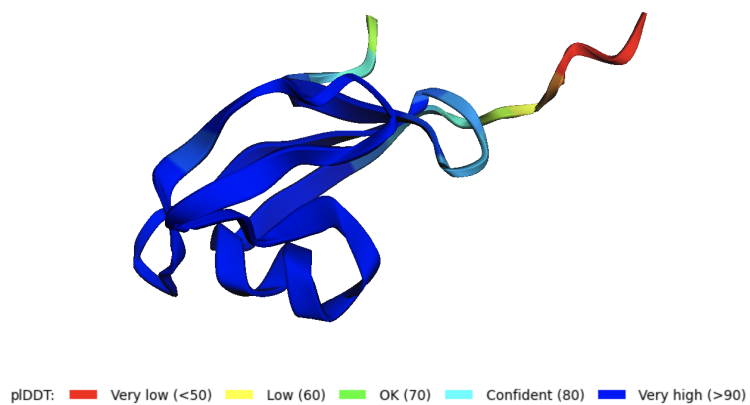
Fonte: A autora; AlphaFold2 (2023).

FIGURA 2 - Conformação esperada da proteína selvagem p50



Fonte: A autora; AlphaFold2 (2023).

FIGURA 3 - Conformação esperada do domínio SBD



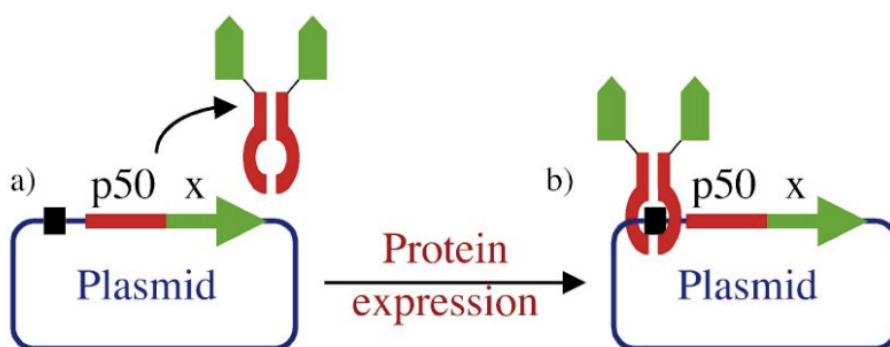
Fonte: A autora; AlphaFold2 (2023).

2.2.1 Ligação da proteína ao DNA alvo

A proteína p50 faz parte de um grupo de proteínas chamado Família Rel. Essas proteínas formam um fator de transcrição chamado NF- κ B, que é responsável pela regulação de vários genes em mamíferos (MÜLLER *et al.*, 1995). Os membros desta família podem formar heterodímeros ou homodímeros e são capazes de se ligarem a sítios de sequências específicas em genes alvos. Os fatores de transcrição NF- κ B apresentam domínios de ligação ao DNA normalmente menores e, por isso, mais específicos e de alta afinidade ao DNA alvo (GHOSH *et al.*, 1995).

Segundo Takakura *et al.* (2001), sistemas de entrega de fármaco são manipulações da disposição do fármaco em questão para otimizar o efeito dele. A partir disso, a alta afinidade de ligação a plasmídeos que contêm seu sítio de reconhecimento (FIGURA 4), com constantes de dissociação (K_d) em nível de picomolar (SPEIGHT *et al.*, 2001), é uma estratégia que pode favorecer o sistema de entrega de vacinas de DNA.

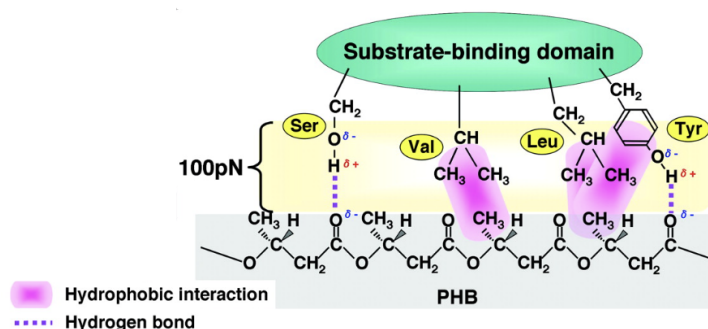
FIGURA 4 - Esquema de expressão da proteína p50 em *E. coli* e sua ligação no sítio de reconhecimento no mesmo plasmídeo



Fonte: Adaptado de SPEIGHT *et al.* (2001).

2.2.2 Ancoragem de proteína quiméricas a nanopartículas

O domínio SBD é responsável por apresentar uma ligação específica ao polímero de PHB (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Estudos propõem que a ligação entre o domínio SBD ao polímero de PHB é formada por pontes de hidrogênio e por interações hidrofóbicas (FIGURA 5) (NUMATA; ABE; IWATA, 2009).

FIGURA 5 - Ilustração da interação entre o domínio SBD de PhaZ_{RpIT1} e do PHB

Fonte: Adaptado de Hiraishi *et al.* (2006).

Além disso, a ligação é estável e se mostra altamente resistente a solventes (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Com isso, o uso do domínio SBD na região C-terminal aparenta ser uma estratégia eficiente para a imobilização de proteínas, visto que fornece uma ligação a uma superfície tridimensional sem alterações químicas, fazendo com que o método seja simples e barato (PARK *et al.*, 2008).

O domínio SBD já foi utilizado na ancoragem de nanopartículas de PHB, mostrando-se eficiente em métodos utilizando microarrays (PARK *et al.*, 2008) e em imunodiagnósticos (PARK *et al.*, 2006).

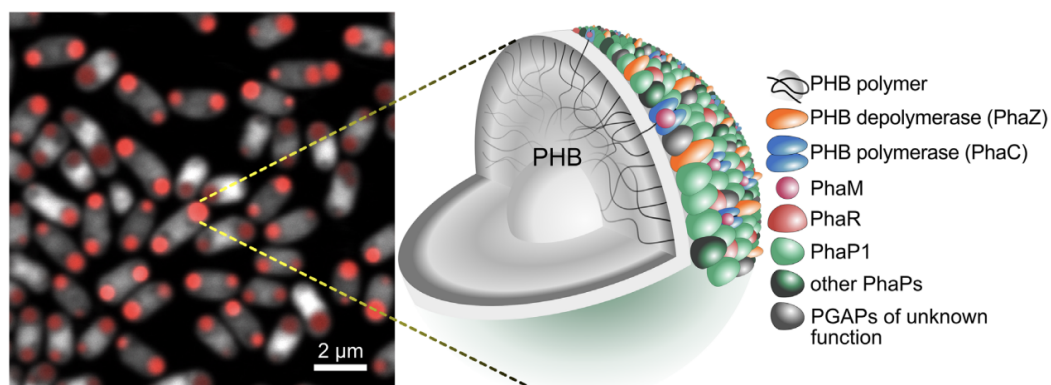
2.3 POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

Moléculas de PHA (polihidroxialcanoatos) são grânulos intracelulares que formam um grupo de componentes de carbono acumulados por um desequilíbrio, como o excesso de carbono ou a falta de outros nutrientes, no crescimento de algumas bactérias. O PHB (Polihidroxibutirato) é o poliéster mais comumente produzido por bactérias (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). O PHB é produzido pela fermentação de condições de culturas controladas em diferentes tipos de bactérias, pelo menos 75 gêneros de bactérias (BUCCI; TAVARES; SELL, 2005) (FIGURA 6).

Moléculas de PHB são biodegradáveis, biocompatíveis, atóxicas, fáceis de serem processadas e controladas. As moléculas de PHA apresentam uma vantagem na área médica, já que podem ser inseridas no organismo humano e não precisam ser removidas (SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013).

Desse modo, o polímero já vem sendo usado na medicina como em vacinas (PARLENE *et al.*, 2014; PARLENE *et al.*, 2012; PARLENE *et al.*, 2011) e imunodiagnósticos (PARK *et al.*, 2006). Isso se dá, uma vez que nanopartículas otimizam a farmacocinética, são capazes de proteger o fármaco contra enzimas e entregam-o preferencialmente às células APCs (HO *et al.*, 2021).

FIGURA 6 - Modelo de um grânulo de PHB em *R. eutropha*



Fonte: Adaptado de Müller-Santos *et al.* (2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a proteína quimérica p50-SBD, desde sua expressão até sua caracterização, a fim de utilizá-la na produção de vacinas de DNA.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as condições de expressão da proteína p50-SBD na bactéria *Escherichia coli*;
- Purificar a proteína p50-SBD por cromatografia;
- Caracterizar a proteína p50-SBD quanto a capacidade de ligar plasmídeos *in vitro*;
- Caracterizar a proteína p50-SBD quanto a capacidade de imobilização com nanopartículas de polihidroxibutirato *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTIRPES UTILIZADAS E SUAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1. A estirpe *E. coli* TOP10 foi utilizada para clonagem, manutenção e propagação de plasmídeos, enquanto *E. coli* BL21 (DE3) para expressão da proteína p50-SBD em sistema pET.

TABELA 1 – Estirpes de bactérias utilizadas neste trabalho e suas características

Organismo	Estirpe	Característica	Referência
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	F– <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG</i> <i>recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ [–]	Invitrogen Inc.
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)	strain B; F [–] <i>ompT gal dcm lon</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B[–]m_B[–]</i>) λ (DE3) [<i>lacI</i> <i>lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>] [<i>malB*</i>] _{K-12} (λ ^S)	Studier FW et al., 1990

Fonte: A autora (2023).

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB, composto por triptona 10g.L^{–1}, extrato de levedura 5 g.L^{–1} e NaCl 10 g.L^{–1} e água destilada. Os cultivos foram incubados em agitador orbital de 120 rpm a 37°C.

4.2 PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram sintetizados pela empresa GenScript (EUA) e estão listados na Tabela 2. O sistema pET foi utilizado para expressão da proteína quimérica p50-SBD, enquanto o plasmídeo pUC57 foi utilizado para testes de especificidade da proteína (item 4.6).

TABELA 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho e suas características

Plasmídeos	Características
pET29b	Vetor de expressão; Km ^R
pET29b_p50-SBD	Expressa a proteína p50 com a tag SBD da PHA depolimerase de <i>Alcaligenes faecalis</i> , com

	cauda 6His do pET29b, a partir de um promotor T7/lacO. Km ^R
pUC57	Plasmídeo vazio. Amp ^R
pUC57_p50-array	Contém a sequência de reconhecimento e ligação da proteína quimérica p50-SBD. Amp ^R

Fonte: A autora (2023).

4.3 TÉCNICAS DE CLONAGEM DE DNA

4.3.1 Preparo de células quimiocompetentes e transformação bacteriana

Para o preparo de células quimiocompetentes, foi utilizado o método de cloreto de cálcio (CHAN et al., 2013). Primeiramente, foi feito um inóculo das estirpes de *E. coli* em meio LB, que foi mantido a 37°C em agitação orbital a 160 rpm durante 16 horas. A partir disso, foi incubado 0,5% de inóculo em 50 mL de cultivo a 30°C no agitador orbital a 160 rpm até atingir a DO₆₀₀ de, aproximadamente, 0,3. Ao atingir a DO₆₀₀, a cultura foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com 25 mL de CaCl₂ 100 mM gelado. Após isso, as amostras foram incubadas no gelo durante 1 hora e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 2 mL de CaCl₂ 100 mM com 15% glicerol (m.V⁻¹) para deixar em estoque no freezer a -80°C.

Para a transformação bacteriana foi utilizado o método de choque térmico (MULHARDT, 2007). Foi adicionado 1 µL de plasmídeo às bactérias quimiocompetentes e a mistura foi incubada em banho de gelo por 30 min. O tubo foi transferido para água aquecida a 42°C por 90s, e em seguida para um banho de gelo por 2 min. Logo depois, 900 µL de meio LB foram adicionados à amostra, que foi mantida na estufa a 37°C por 1 hora. Por fim, as bactérias transformadas foram inoculadas em meio LA, contendo antibiótico Km como marcador de seleção, e mantidas a 37°C por 24 horas.

4.3.2 Extração e manutenção de plasmídeos

A extração plasmidial de *E. coli* TOP10 foi feita pelo método de mini-preparação por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2000). Os plasmídeos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e armazenados no freezer -20°C.

4.3.3 Restrição e purificação de DNA

As reações de restrição e ligação foram realizadas de acordo com o fabricante (ThermoFisher Scientific), sendo utilizadas as enzimas XbaI e SpeI para clivagem e a enzima T4 DNA Ligase para ligação do DNA.

A purificação do material genético foi feita pelo método Freeze-Squeeze (THURING *et al*, 1975). Trinta μL de amostra de DNA com 3 μL de tampão FSUDS (0,025% de azul de bromofenol, 0,025% de xileno cianol, 0,1% de SDS e 20% de Ficoll em tampão Tris-HCl pH 8,0 10 mmol.L⁻¹ e EDTA pH 8,0 1 mmol.L⁻¹) foram aplicados em gel de agarose 0,08%. Após a corrida, o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 15 minutos. Em seguida, foi cortado o fragmento de DNA de interesse do gel de agarose, colocado em ponteira de 20 μL com filtro e congelado, deixando por 1 hora no freezer -80°C. Então, as amostras congeladas foram centrifugadas a 4°C e 14.000 rpm durante 15 min e a fração aquosa que continha o DNA foi coletada. As amostras de DNA foram precipitadas por acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) e etanol 100%. A purificação foi confirmada por eletroforese de gel de agarose.

4.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p50-SBD

A fim de determinar as condições de expressão da proteína quimérica p50-SBD, foram feitos 5 ensaios com diferentes concentrações de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e diferentes temperaturas de cultivo. A proteína foi expressa a partir do vetor pET29b_p50-SBD em *E. coli* e foi utilizado como controle *E. coli* BL21(DE3) com plasmídeo vazio pET29b. Em todos os testes, as culturas de *E. coli* foram cultivadas em 10 mL de meio LB sob agitação constante de 120 rpm.

4.4.1 Testes de expressão da proteína p50-SBD

Ao atingir a DO_{600} para a indução, as culturas passaram por diferentes testes de expressão por indução de IPTG. Foram realizados dois testes a 37°C, sendo um deles com adição de 0,5 mM de IPTG e o outro com 1 mM de IPTG. Outros dois testes foram realizados, porém ambos a 30°C, com adição de 0,5 mM IPTG e o outro com 1 mM IPTG. A indução continuou por 4 horas em todos os ensaios. Por fim, foi feito um último teste em que foram adicionados 0,5 mM de IPTG após a cultura atingir a DO_{600} , necessária para a indução, e a indução ocorreu durante 24 horas a 16°C.

Após a indução, os cultivos foram centrifugados (5.000 rpm a 4°C por 10 min), para decantar as células e separar o sobrenadante. O precipitado de bactérias foi ressuspensionado em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) e as células foram rompidas por sonicação. As amostras são novamente centrifugadas (20.000 rpm a 4°C por 10 minutos), para separar a fração solúvel da fração insolúvel. São retiradas as frações bruta, solúvel e insolúvel para análise por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).

4.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD

A proteína p50-SBD foi purificada por cromatografia de afinidade His-tag em coluna HiTrap Chelating de 1 mL carregada com cloreto e níquel, já que possui cauda de 6 histidinas na porção N-terminal.

4.5.1 Testes de purificação

Para os testes de purificação da proteína p50-SBD, as melhores condições de expressão da proteína foram adotadas. As culturas foram induzidas e sonicadas, em seguida centrifugadas.

No primeiro teste, a fração solúvel foi aplicada em coluna HiTrap-Chelating-Ni²⁺ de 1mL e foi eluída em tampão Tris-HCl 50mM pH 8 NaCl 150 mM com gradiente de imidazol (20 mM, 100 mM, 200 mM). As amostras purificadas

foram analisadas por SDS-PAGE e o imidazol foi retirado por diálise em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, em temperatura ambiente, durante 24 horas.

No segundo teste, a fração solúvel, também, foi aplicada em coluna HiTrap-Chelating-Ni²⁺ de 1 mL, porém eluída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, DTT 5 mM com gradiente de imidazol (20 mM, 100 mM, 200 mM). As amostras foram aplicadas e analisadas por SDS-PAGE. A diálise foi feita em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, DTT 5 mM durante 24 horas a 4°C.

4.6 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD AO DNA ALVO

Foram realizados quatro ensaios de ligação da proteína ao DNA. No primeiro ensaio foi adicionado em microtubos 1 µL de proteína (na concentração de 0,31 mg.mL⁻¹), 1 µL do plasmídeo pUC57_p50-array e 8 µL de buffer KF de pH 7,5 ou pH 8, cuja composição está descrita na tabela 3. Como controle negativo foi adicionado somente o plasmídeo e como controle do ensaio foi utilizado 1 µL da proteína p50-SBD desnaturada (a 100°C por 15 min), 1 µL do plasmídeo pUC57_p50-array e 8 µL de buffer KF de pH 7,5 ou pH8. Neste ensaio foram utilizadas proteínas provenientes de diferentes eluições com imidazol (100 mM ou 200 mM). Os microtubos foram incubados em temperatura ambiente por 30 min. Após esse período, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%.

Nos outros dois ensaios, foram feitas curvas de ligação com a proteína diluída. Em um dos ensaios, a proteína foi diluída em água ultrapura de 5 a 1.000 vezes e no outro a diluição foi de até 10 vezes. Ambos os ensaios foram realizados com 1 µL de proteína, 1 µL do plasmídeo pUC57_p50-array e 8 µL de buffer KF pH 8, como controle foi utilizado o plasmídeo pUC57_p50-array sem proteína p50-SBD. As amostras foram incubadas durante 30 min e aplicadas em gel de agarose 0,8%.

Por último, foram feitos dois ensaios a fim de determinar se a proteína ligava-se de forma específica. Para estes ensaios foi usada a p50-SBD em concentração de 0,4 mg.mL⁻¹. No primeiro experimento, foi adicionado 1 µL do plasmídeo pUC57_p50-array, 1 µL de proteína e 8 µL de buffer KF pH 8,0 no primeiro microtubo. No segundo, foi adicionado 1 µL do p50-array, 1 µL de proteína e 8 µL de buffer KF pH8. E, no terceiro, o plasmídeo foi clivado enzimas XbaI e SpeI, para que no microtubo contivesse tanto o plasmídeo pUC57 quanto o p50-array, sendo adicionado 1 µL desta amostra com 1 µL de proteína e 8 µL de buffer KF pH8.

Os microtubos foram incubados em temperatura ambiente por 30 min. Após esse período, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%.

No segundo experimento, assim como no primeiro, foi adicionado 1 μL do plasmídeo pUC57_p50-array, 1 μL de proteína e 8 μL de buffer KF pH8 no primeiro microtubo e 1 μL do p50-array, 1 μL de proteína e 8 μL de buffer KF pH8 no segundo microtubo. Porém, no terceiro microtubo, o plasmídeo pUC57_p50-array foi clivado apenas com a enzima SpeI, para que ficasse linear, então foi adicionado 1 μL desta amostra com 1 μL de proteína e 8 μL de buffer KF pH8. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, depois de 30 min de incubação em temperatura ambiente.

TABELA 3 - Composição de 1 mL de Buffer KF pH 7 ou pH 8

Composto	Concentração	Volume
Tris HCl pH 7,5 ou pH 8	10 mM	10 μL
KCl	100 mM	33 μL
DTT	3 mM	3 μL
Triton X-100	0,02%	1 μL
Glicerol	10%	200 μL
EDTA	0,2 mM	0,4 μL
BSA	400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	200 μL
Água ultrapura		552,6 μL

Fonte: A autora (2023).

A ligação da proteína ao DNA foi analisada por corrida eletroforética em gel de agarose de 0,8% a 80 V durante 30 a 40 min sem adição de tampão SUDS. Cada poço continha 10 μL de reação. Então, os géis foram tratados com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para serem observados em luz UV a 302 nm no sistema acoplado de vídeo-imagem (UVP).

4.7 ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD

A fim de realizar uma curva de imobilização da proteína a nanopartícula, foram misturados 50 μL de PHB (na concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) com 50 μL de proteína (na concentração de $0,44 \text{ mg.mL}^{-1}$), contendo diferentes massas de

proteína (2,5 µg; 5 µg; 7,5 µg; 10 µg; 12,5 µg; 15µg e 20 µg). Cada ponto da curva foi feito em triplicata. Com isso, as misturas foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente e, logo após, foram centrifugadas a 7.600 x g por 2 min. O sobrenadante foi coletado para ser analisado posteriormente como fração não ligada. O *pellet* foi ressuspenso com 100 µL de tampão Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM e DTT 5 mM e, novamente, centrifugado a 7.600 x g por 2 min. O sobrenadante foi coletado, agora como fração de lavagem. O *pellet* foi ressuspenso com 15 µL de tampão Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM e DTT 5 mM, consistindo na fração de proteínas ligadas às nanopartículas. Neste ensaio, foi usada somente a proteína p50-SBD como controle.

A fim de verificar a imobilização, todas as frações foram aplicadas em gel SDS-PAGE, porém a fração correspondente às proteínas ligadas às NPs foi corada com Coomassie Blue R-250 (0,05%, V V⁻¹), enquanto a fração não ligada foi lavada e corada com Sypro Ruby Protein Gel Stain (Sigma) e reveladas com luz UV a 254 nm.

A quantificação de imobilização foi observada pelo método de Bradford (1976). Em microplacas, 170 µL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e 30 µL das amostras contendo as frações não ligadas às NPs foram adicionadas aos poços em duplicata. A curva padrão foi feita a partir de BSA (albumina sérica bovina) em concentrações de 0 a 6µg por poço. A leitura da absorbância foi feita a 600 nm.

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.8.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose (0,8% m.V⁻¹) em cuba horizontal (Biorad) (Sambrook *et al.*, 1989). Os géis foram preparados em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3), o mesmo utilizado para a corrida. Para as análise de amostras de DNA, foi adicionado tampão FSUDS (0,025% de azul de bromofenol, 0,025% de xileno cianol, 0,1% de SDS e 20% de Ficoll em tampão Tris-HCl pH 8,0 10 mmol.L⁻¹ e EDTA pH 8,0 1 mmol.L⁻¹) às amostras, porém nos ensaios de ligação da proteína ao DNA não foi utilizado corante. Em seguida, as amostras com e sem corante foram aplicadas no gel e submetidas a uma corrida de 80 V durante 30 a 40 min. Finalizada a corrida, os géis foram tratados com brometo

de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para serem observados em luz UV a 302 nm no sistema acoplado de vídeo-imagem (UVP).

4.8.2 Eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE)

Para amostras de proteína foram utilizados géis de poliacrilamida desnaturante (LAEMMLI, 1970). O gel separador foi feito na concentração de 12,5% m.V^{-1} e o gel de empilhamento na concentração de 4,5% m.V^{-1} . Foi adicionado tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, $0,0625 \text{ mol L}^{-1}$ de Tris-HCl pH 6,8 e 5% de β -mercaptoetanol) e as amostras foram fervidas por 10 min, então aplicadas no gel. As eletroforeses em gel SDS-PAGE foram feitas em sistema vertical Biorad em tampão de corrida Tris-Glicina (3 g.L^{-1} Tris- base, 14 g.L^{-1} Glicina e 1 g.L^{-1} SDS) em 200 V. Após a corrida, os géis foram corados com corante Coomassie Blue R-250 (0,05%, V.V^{-1}) e descoradas com solução descorante de metanol e ácido acético (10%, V.V^{-1}).

4.8.3 Quantificação de DNA por análise de imagem

Para quantificar os materiais genéticos utilizados no trabalho, os plasmídeos foram aplicados em gel de agarose (descrito no item 4.8.1) e analisados por densitometria usando o software ImageJ.

4.8.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). Em microplacas, $170 \mu\text{L}$ de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e $30 \mu\text{L}$ de amostra foram adicionados aos poços em triplicata. A curva padrão foi feita a partir de BSA (albumina sérica bovina) em concentrações de 0 a $6 \mu\text{g}$ por poço. A leitura da absorbância foi feita a 600 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p50-SBD EM *Escherichia coli*

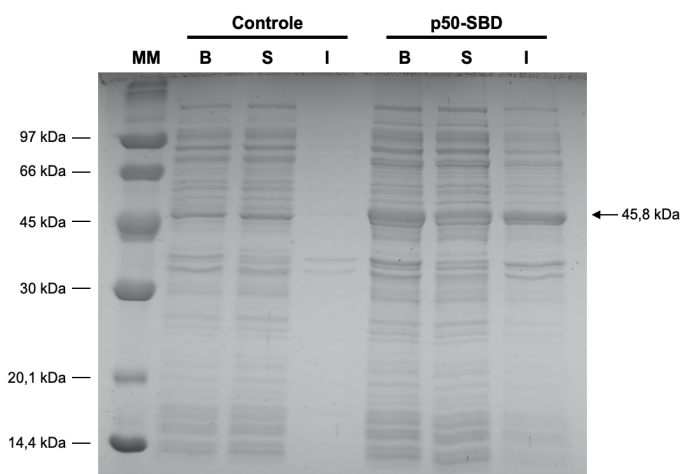
Os ensaios de expressão da proteína p50-SBD em *E. coli* tiveram como finalidade determinar as melhores condições de expressão para serem aplicadas na purificação e nos ensaios de caracterização da proteína. Para a expressão foi utilizado o vetor pET29b em estirpe de *E. coli* BL21 (DE3).

As culturas cresceram em 10 mL de meio LB sob agitação constante de 160 rpm até atingir a DO_{600} , de aproximadamente 0,4, para que fossem, então, induzidas. Foram realizados testes de expressão por indução com IPTG, descritos no item 4.4.1.

A análise dos testes foi feita em gel de poliacrilamida SDS-PAGE com base na solubilidade da proteína. Para isso, as bactérias foram sonicadas, a fim de rompê-las e liberar as proteínas, e as amostras foram separadas em fração solúvel e insolúvel por centrifugação (20.000 rpm a 4°C por 10 minutos).

Primeiramente, foram feitos dois teste a 37°C, porém com diferentes concentrações de IPTG, 0,5 mM (FIGURA 7) e 1 mM (FIGURA 8).

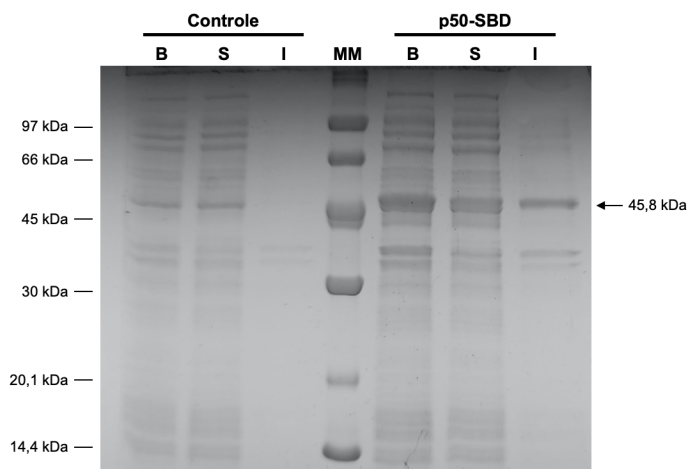
FIGURA 7 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 37°C com 0,5 mM de IPTG



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B), fração solúvel (S) e fração insolúvel (I). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

FIGURA 8 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 37°C com 1 mM de IPTG

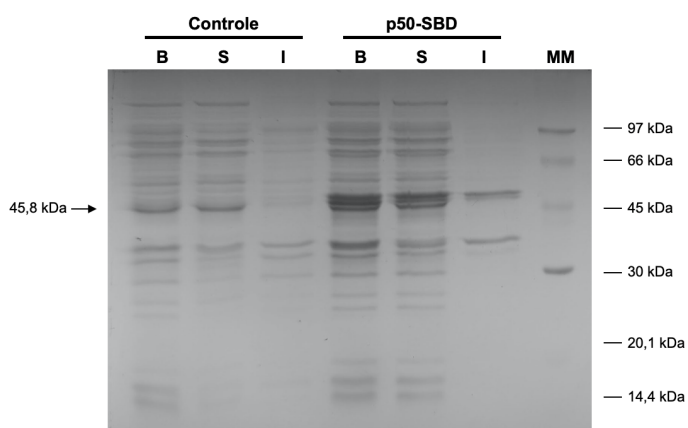


FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B), fração solúvel (S) e fração insolúvel (I). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

As expressões a 30°C não apresentaram resultados satisfatórios, visto que havia uma quantidade considerável de proteína na fração insolúvel, de acordo com a análise do gel SDS-PAGE. Dessa forma, outros dois testes foram feitos, porém a 30°C com 0,5 mM (FIGURA 9) e 1 mM (FIGURA 10) de IPTG. Com base no gel SDS-PAGE, ainda havia muita proteína nas frações insolúveis.

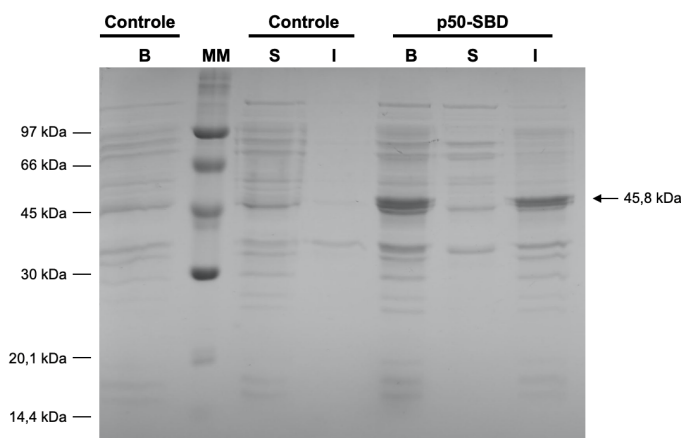
FIGURA 9 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 30°C com 0,5 mM de IPTG



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B), fração solúvel (S) e fração insolúvel (I). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

FIGURA 10 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 30°C com 1 mM de IPTG.



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B), fração solúvel (S) e fração insolúvel (I). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

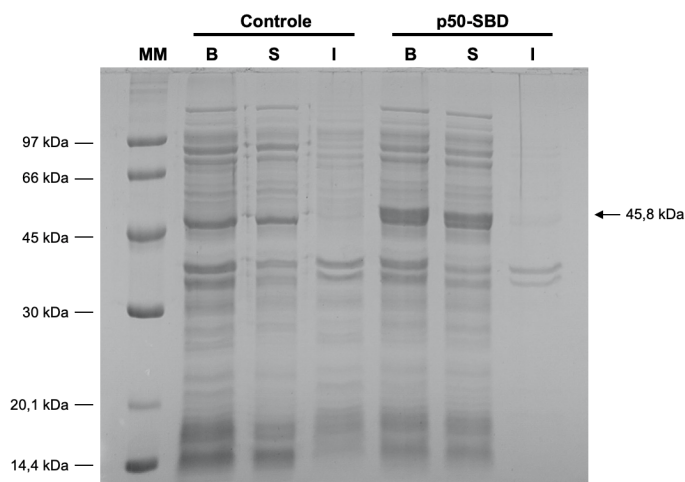
A expressão de proteínas recombinantes em altas quantidades tende a gerar um acúmulo de agregados proteicos insolúveis, chamados de corpos de inclusão (VERA *et al.*, 2007). Proteínas expressas como corpos de inclusão podem ser inativas, insolúveis e requerem redobramento (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Há estudos que mostram que corpos de inclusão podem também ser proteínas com o enovelamento correto e atividades biológicas mantidas (GONZÁLEZ-MONTALBÁN; GARCÍA-FRUITÓS; VILLAVERDE, 2007), porém a solubilização desses corpos requer etapas complementares extensas (SINGH *et al.*, 2015).

Assim, algumas estratégias podem ser adotadas a fim de melhorar a solubilidade das proteínas para evitar erros no enovelamento em *E. coli* (VERA *et al.*, 2007), a redução da concentração de IPTG e, também, menores temperaturas durante a indução (GALLOWAY; SOWDEN; SMITH, 2003). Segundo Vera *et al.*, baixas temperaturas, normalmente, favorecem rendimentos mais altos e melhoram a atividade biológica da proteína solúvel.

Dessa forma, um último teste de expressão foi realizado, visando aumentar a expressão de proteína na fração solúvel. Para isso, a cultura cresceu até atingir a DO_{600} e, então, foi adicionado 0,5 mM de IPTG e a expressão ocorreu durante 24 horas a 19°C. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE (FIGURA 11).

Este protocolo mostrou-se mais eficiente que os demais testes e foi utilizado para os testes de purificação.

FIGURA 11 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da expressão da proteína p50-SBD a 19°C com 0,5 mM de IPTG.



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B), fração solúvel (S) e fração insolúvel (I). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

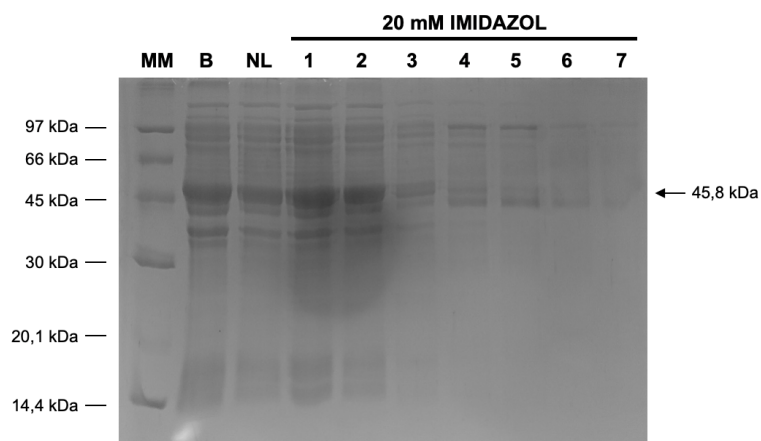
5.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD

Para os ensaios de purificação, foram adotadas as melhores condições de expressão da proteína p50-SBD, estabelecidas e descritas no item 5.1. A proteína quimérica foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap-Chelating equilibrada com NiCl_2 , por apresentar uma cauda de 6 histidinas.

Após a expressão da proteína, as células coletadas foram sonicadas e centrifugadas (20.000 rpm a 4°C por 10 minutos), assim separadas em extratos bruto, solúvel e insolúvel. Nos dois testes a amostra solúvel foi aplicada em coluna HiTrap-Chelating- Ni^{2+} de 1 mL.

No primeiro teste, a proteína foi eluída através do gradiente de imidazol (20 mM, 100 mM, 200 mM) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM e a pureza das frações foi avaliada por SDS-PAGE (FIGURAS 12, 13 e 14). As frações mais concentradas e com a menor concentração de contaminantes foram dialisadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM durante 24 horas, em temperatura ambiente. No entanto, a proteína precipitou durante a diálise.

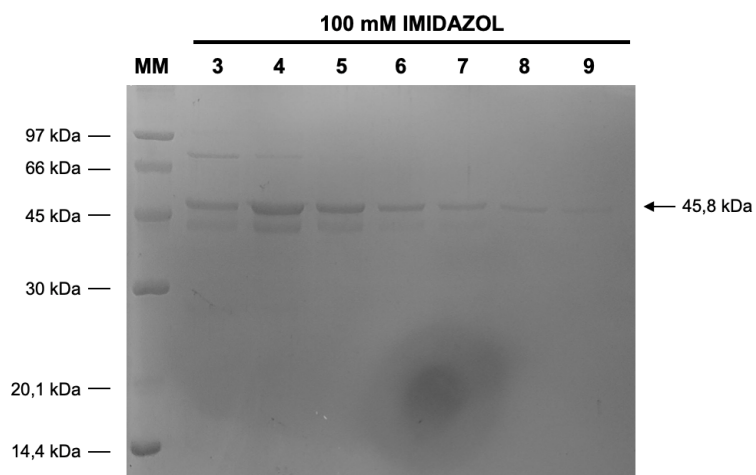
FIGURA 12 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 20 mM de imidazol.



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B) e fração não ligada à coluna (NL). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

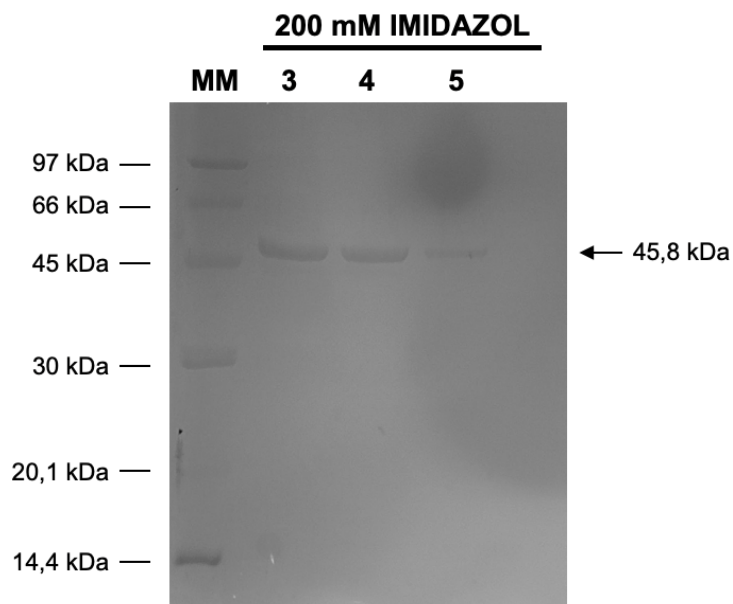
FIGURA 13 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 100 mM de imidazol



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

FIGURA 14 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 200 mM de imidazol



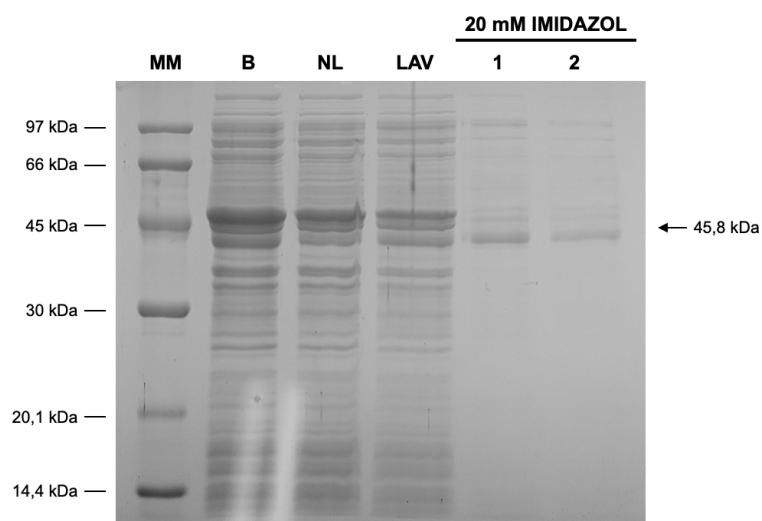
FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

Portanto, foi realizado um segundo teste de purificação, no qual foi adicionado DTT nos tampões de purificação e diálise. Isto se dá pelo DTT (Ditiotreitol) ser um agente redutor que impede que a proteína forme pontes de dissulfeto não nativas (BONDOS; BICKNELL, 2003).

Então, a amostra solúvel foi aplicada em coluna HiTrap-Chelating-Ni²⁺ de 1 mL e eluída através do gradiente de imidazol (20 mM, 100 mM, 200 mM) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, DTT 5 mM. Foram coletadas as amostras e foram analisadas por gel de SDS-PAGE (FIGURAS 15 e 16). As frações mais puras foram dialisadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, DTT 5 mM durante 24 horas a 4°C (FIGURAS 17). A proteína foi dosada pelo método de Bradford, encontrando-se na concentração de 0,31 mg mL⁻¹.

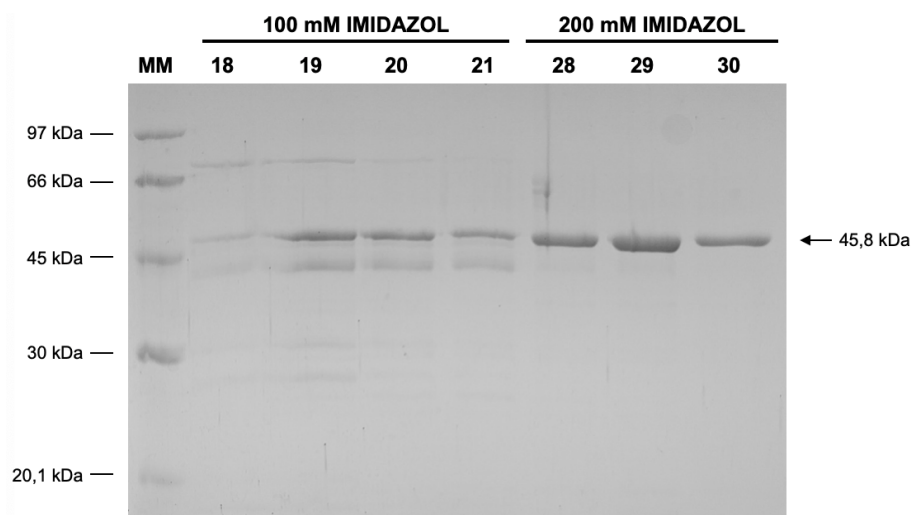
FIGURA 15 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 20 mM de imidazol.



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B), fração não ligada à coluna (NL), fração lavada (LAV). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

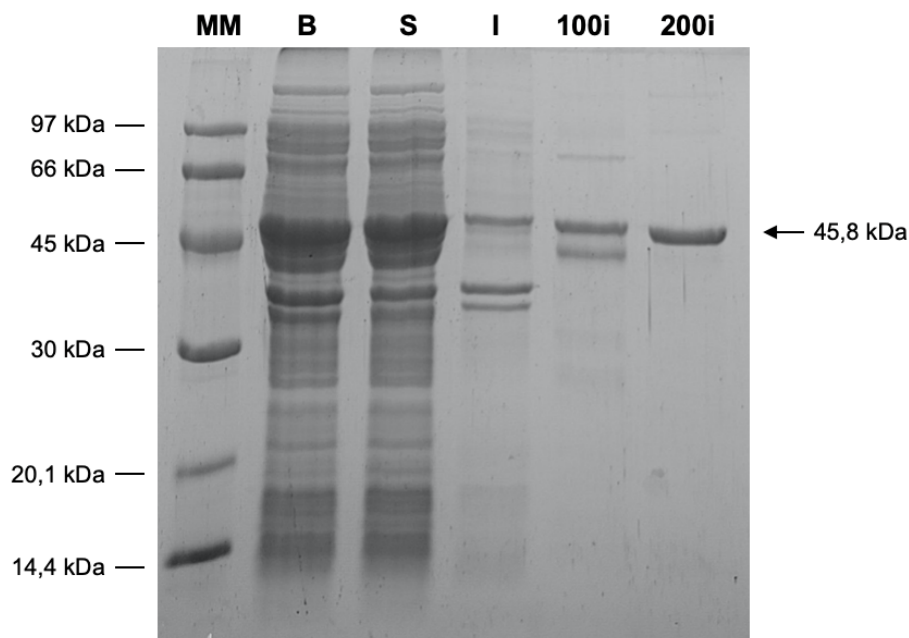
FIGURA 16 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas em 100 mM e 200 mM de imidazol.



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

FIGURA 17 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da diálise das frações de 100 mM e 200 mM de imidazol.



FONTE: A autora (2022).

Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B), fração solúvel (S) e fração insolúvel (I). A seta indica a posição da banda da proteína p50-SBD e sua massa aproximada em kDa.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA p50-SBD

5.3.1 Ligação da proteína p50-SBD ao DNA alvo *in vitro*

Foram realizados ensaios de ligação da proteína quimérica p50-SDB ao DNA alvo, a fim de verificar se a atividade de ligação observada na proteína selvagem ainda permanecia na proteína recombinante.

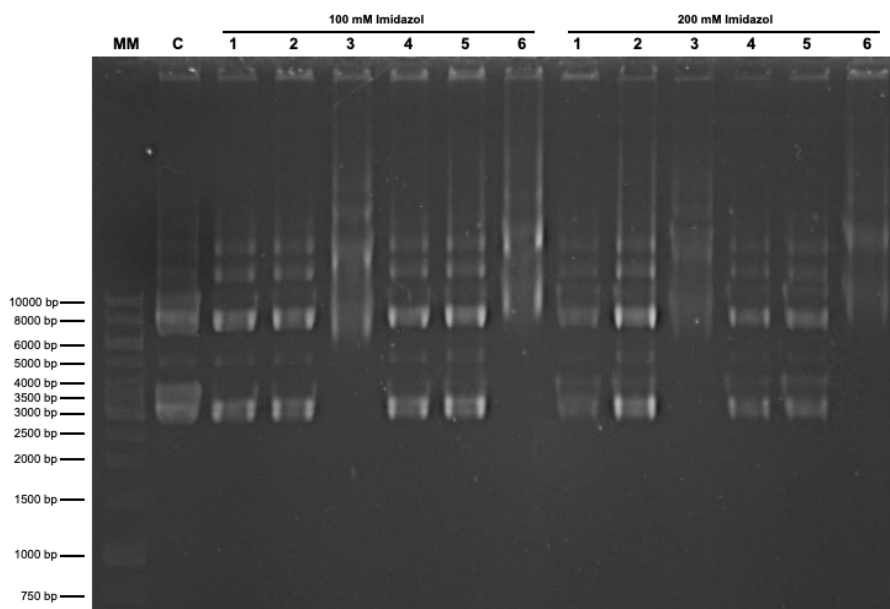
Primeiramente foi realizado um ensaio com dois buffers, de mesma composição (descritos na tabela 3, no item 4.6), porém diferentes pH, e proteínas de diferentes eluições de imidazol (100 mM ou 200 mM). Neste primeiro ensaio (figura 16), foi adicionado 1 μ L de proteína (na concentração de $0,31 \text{ mg.mL}^{-1}$), 1 μ L do plasmídeo pUC57_p50-array e 8 μ L de buffer KF de pH 7,5 ou pH 8 em cada microtubo. Como controle negativo foi adicionado somente o plasmídeo, enquanto como controle do ensaio foi utilizado 1 μ L da proteína p50-SBD desnaturada (a 100°C por 15 min) misturada com 1 μ L do plasmídeo pUC57_p50-array e 8 μ L de

buffer KF de pH 7,5 ou pH 8. Os microtubos foram incubados em temperatura ambiente durante 30 min, sendo esse o tempo necessário para que a ligação atinja seu máximo (LI *et al.*, 1994).

A partir da análise do gel de agarose (FIGURA 18), é possível verificar que a proteína p50-SBD liga-se ao DNA. Isso se dá, uma vez que a lane 3 e 6, as quais contêm 1 μ L de proteína, 1 μ L do plasmídeo pUC57_p50-array e 8 μ L de buffer KF de pH 7,5 ou pH8, apresentam um padrão de migração diferente do padrão do controle (C), em que há somente a proteína. Em outros estudos foi observado que quando há ligação da proteína ao DNA, a migração é mais lenta (URBAN; SCHRECK; BAEUERLE, 1991; SPEIGHT *et al.*, 2001), apresentando um padrão mais curto como observado na figura 18.

Além disso, os controles em que não contém a proteína ou a proteína foi desnaturada, o padrão de migração se mantém igual ao do plasmídeo pUC57_p50-array sozinho, indicando que nessas condições a proteína não se liga ao DNA. Em relação ao Buffer KF, é possível ver que os ensaios feitos com buffer pH 8 apresentam um arraste menor no gel, indicando melhor ligação.

FIGURA 18 - Gel de agarose do ensaio de ligação



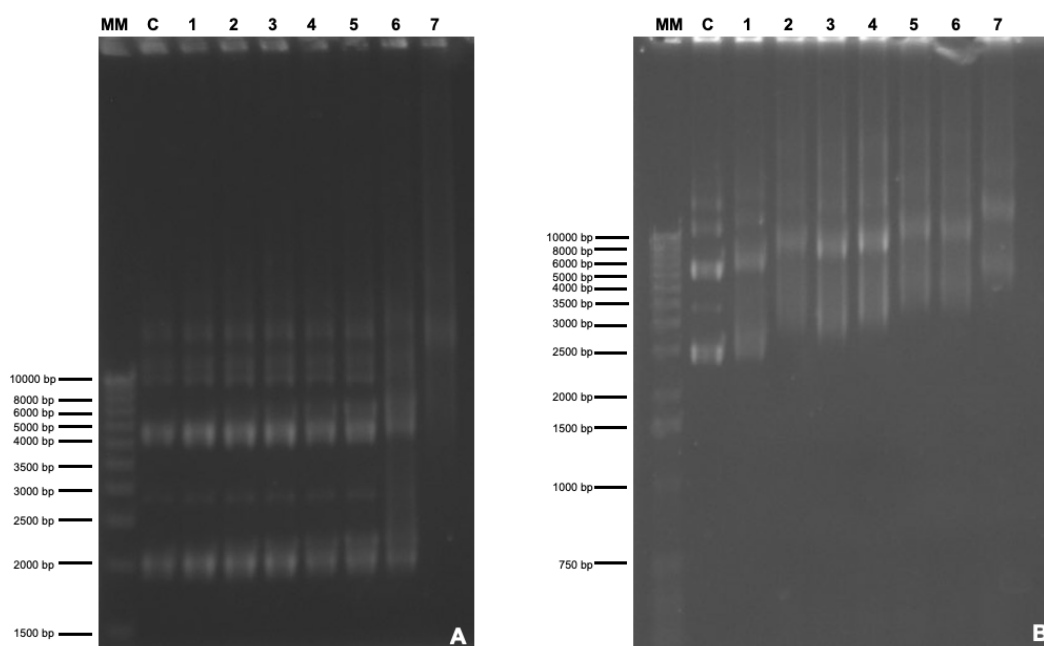
FONTE: A autora (2023).

Marcadores de massa molecular (MM), controle negativo (C), DNA e Buffer KH pH 7,5 (1), p50-SBD desnaturada, DNA e Buffer KF pH 7,5 (2), p50-SBD, DNA e Buffer KF pH 7,5 (3), DNA e Buffer KH pH 8 (4), p50-SBD desnaturada, DNA e Buffer KF pH 8 (5) e p50-SBD, DNA e Buffer KF pH 8 (6).

Visto que a proteína liga-se ao DNA, foram feitos ensaios com a proteína p50-SBD diluída, a fim de se obter uma curva de ligação (FIGURA 19). Em um dos ensaios, a proteína foi diluída em água ultrapura de 5 até 1.000 vezes (A) e, no outro, foi feita uma diluição seriada em até 10 vezes (B). Ambos os ensaios foram realizados com 1 μ L de proteína e suas diluições, 1 μ L do plasmídeo pUC57_p50-array e 8 μ L de buffer KF pH 8, determinado pelo teste anterior, e como controle foi utilizado o plasmídeo pUC57_p50-array.

Foram criadas duas curvas de ligação, com diferentes diluições, sendo possível determinar que a proteína liga-se melhor sem ser diluída. O padrão de migração de ligação se mantém através do teste de ligação ao DNA.

FIGURA 19 - Gel de agarose de curva de ligação



FONTE: A autora (2023).

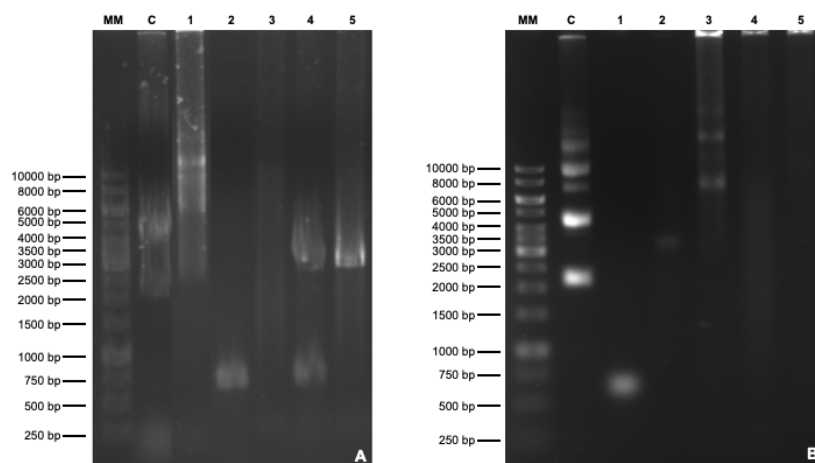
Marcadores de massa molecular (MM), controle (C). Em A, diluição em 1000 vezes (1), diluição em 500 vezes (2), diluição em 100 vezes (3), diluição em 50 vezes (4), diluição em 10 vezes (5), diluição em 5 vezes (6) e a proteína não diluída (7). Em B, diluição em 0,1 vezes da concentração original (1), diluição em 0,5 vezes da concentração original (2), diluição em 0,6 vezes da concentração original (3), diluição em 0,7 vezes da concentração original (4), diluição em 0,8 vezes da concentração original (5), diluição em 0,9 vezes da concentração original (6) e a proteína não diluída (7).

Por fim, foram feitos testes para determinar a especificidade da proteína p50-SBD. Em um ensaio (Figura 20A), foram utilizados o plasmídeo pUC57_p50-array, apenas o p50-array e o plasmídeo pUC57 vazio digerido pelas enzimas XbaI e SpeI. No segundo ensaio (Figura 20B), foram utilizados o plasmídeo

pUC57_p50-array, o p50-array e o plasmídeo pUC57_p50-array linearizado. Ambos ensaios foram realizados em Buffer KF pH 8, incubados durante 30 min em temperatura ambiente e aplicados em gel de agarose 0,8% para análise.

Com base no gel de agarose (FIGURA 20), é possível afirmar que a proteína p50-SBD liga-se especificamente ao DNA alvo. Isso é explicado pela banda do p50-array não está mais presente na lane 3 em A e na lane 4 em B, apenas um padrão arrastado da ligação já observado em testes de ligação anteriores. O p50-array é a sequência de bases que configura um site de reconhecimento no plasmídeo para a proteína (SPEIGHT *et al.*, 2001). É possível, também, verificar a especificidade da proteína nas lanes 5 em A e 5 em B. Na lane 5 em A, está presente no microtubo de ensaio o plasmídeo pUC57 vazio e o p50-array extraído deste plasmídeo, assim é visível que somente a banda do array não aparece mais na presença da proteína, o que aparenta ser a ligação entre as moléculas. Além disso, na lane 5 de B, a banda do plasmídeo pUC57_p50-SBD também não aparece mais, visto que a proteína liga-se a sequência específica presente no plasmídeo. O padrão de ligação da proteína com o p50-array e com o DNA linearizado é diferente que o padrão da ligação com o plasmídeo não digerido, indicando que talvez a conformação do DNA mude seu aspecto de gel de agarose.

FIGURA 20 - Gel de agarose de ligação específica.



FONTE: A autora (2023).

Marcadores de massa molecular (MM), controle (C). Em A, plasmídeo pUC57_p50-array e proteína p50-SBD (1), p50-array (2), p50-array e proteína p50-SBD (3), plasmídeo digerido (4), plasmídeo digerido, p50-array e proteína p50-SBD (5). Em B, p50-array (1), plasmídeo pUC57_p50-array linearizado (2), plasmídeo pUC57_p50-array e proteína p50-SBD (3), p50-array e proteína p50-SBD (4), plasmídeo pUC57_p50-array linearizado e proteína p50-SBD (5).

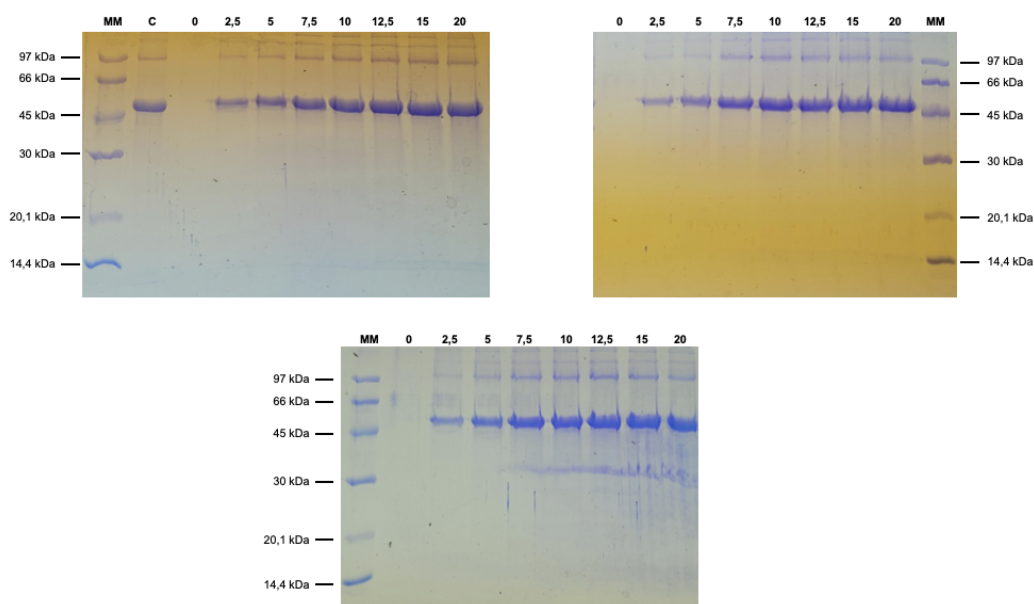
A partir desses resultados, é possível observar que a proteína tem um potencial de ser usada para garantir a entrega do fármaco, mas os testes devem ser repetidos com um DNA de melhor qualidade.

5.3.2 Imobilização da proteína p50-SBD por NPs de PHB *in vitro*

Para os ensaios de imobilização, foram misturados 50 μL de proteína (na concentração de $0,44 \text{ mg.mL}^{-1}$) com 50 μL de PHB (na concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), em triplicata. Com isso, foi construída uma curva de imobilização a partir do gradiente de quantidade de proteína. As misturas foram incubadas, centrifugadas, fervidas e aplicadas em gel de SDS-PAGE (descrito no item 4.7). Como controle foi utilizado a proteína p50-SBD.

Os géis com as frações ligadas às NPs (Figura 21) foram coradas com Coomassie Blue R-250, enquanto os géis das frações não ligadas às NPs (Figura 20) foram coradas com Sypro Ruby Protein Gel Stain (Sigma) e reveladas com luz UV a 254 nm.

FIGURA 21 - Géis de SDS-PAGE das frações de proteína ligada a nanopartículas.

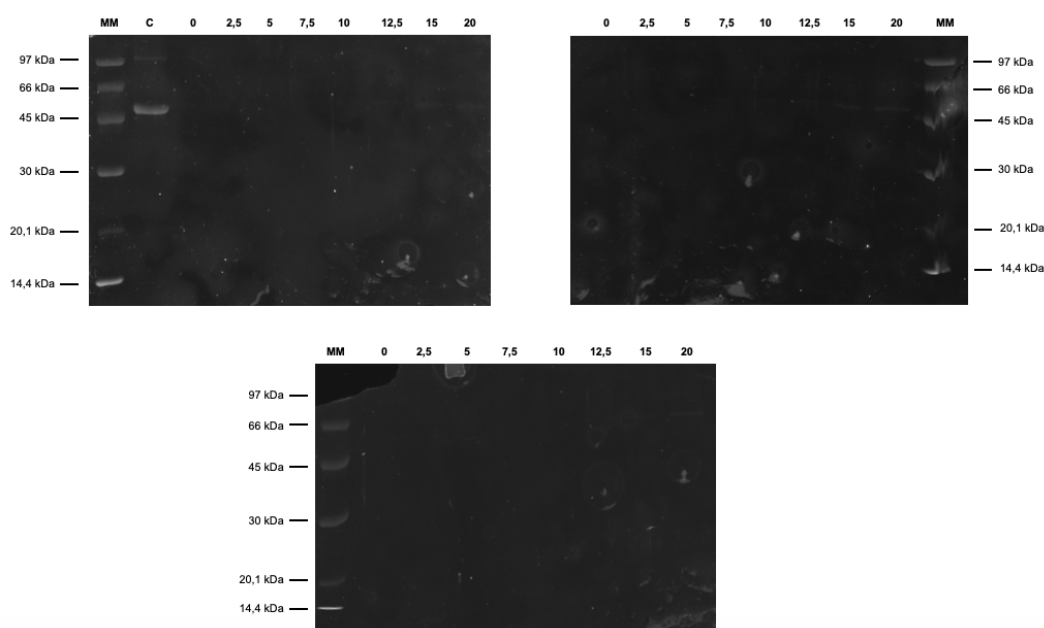


FONTE: A autora (2023).

Marcadores de massa molecular (MM), controle (C) e quantidades de proteína de cada ensaio.

A partir da figura 21, é possível verificar a presença de proteína, indicando que a ancoragem das proteínas pela moléculas de PHB ocorreu. Além disso, é possível, também, observar que as bandas ficam mais fortes conforme mais proteína foi oferecida para a imobilização.

FIGURA 22 - Géis de SDS-PAGE das frações de proteína não ligada a nanopartículas.



FONTE: A autora (2023).

Marcadores de massa molecular (MM), controle (C) e quantidades de proteína de cada ensaio.

Já na figura 22, não há tanta proteína, validando a imobilização. Porém, nas frações com maior quantidade de proteína, é possível observar uma banda de proteína na fração não ligada, o que demonstra a saturação da ancoragem.

Para analisar a quantidade de proteína que não se ligou à NPs de PHB, foi realizada uma quantificação das frações com 12,5 µg, 15 µg e 20 µg pelo método de Bradford (1976). Na fração de 12,5 µg foi quantificado 0,468375 µg de proteína, um número baixo e muito próximo do branco, com desvio padrão de 0,090203 µg. Já as frações 15 µg e 20 µg apresentaram 1,854719 µg e 3,114621 µg de proteína não ligada com 0,143371 µg e 0,337258 µg de desvio padrão, respectivamente.

5.4 RESULTADOS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS

5.4.1 Quantificação de DNA por análise de imagem

Para quantificar os materiais genéticos utilizados no trabalho, os plasmídeos foram analisados por densitometria usando o software ImageJ. O padrão de DNA usado foi 1 μL plasmídeo pUC57_p50-array linearizado em 10 μL de reação, obtendo-se $9,66 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de DNA.

5.4.2 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A quantificação de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). Em microplacas, 170 μL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e 30 μL foram adicionados aos poços em triplicata. A curva padrão foi feita a partir de BSA (albumina sérica bovina) em concentrações de 0 a $6 \mu\text{g}$ por poço. A leitura da absorbância foi feita a 600 nm.

Foram utilizados dois lotes diferentes de proteínas nos ensaios de ligação ao DNA e de imobilização pela nanopartículas de PHB, avaliados em $0,31 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,44 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste trabalho foi possível determinar as melhores condições de expressão da proteína quimérica p50-SBD, além de estabelecer sua purificação por cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} .

Com os ensaios de ligação ao DNA, a proteína p50-SBD mostrou-se capaz de se ligar ao DNA de maneira específica, visto que ligou-se somente ao plasmídeo que continha o p50-array. Aliás, o experimento provou-se ser reproduzível, visto que a proteína continuou ligando-se de forma específica com proteínas de diferentes lotes.

E, por fim, foi verificado a ancoragem da proteína quimérica p50-SBD às nanopartículas de PHB, tornando os ensaios mais baratos e promissores.

Desse modo, foi possível visualizar de maneira geral o funcionamento da proteína p50-SBD. É esperado que em futuros trabalhos sejam feitos ensaios de ligação da proteína ao DNA e às nanopartículas simultaneamente. Para isso, seria ideal estudar mais a fundo a ligação e a imobilização desta proteína, com o propósito de utilizarmos a proteína quimérica p50-SBD em modelos de vacinas gênicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPAR, H Oya; PAPANICOLAOU, Irene; BRAMWELL, Vincent W. **Strategies for DNA vaccine delivery**. Expert Opinion On Drug Delivery, v. 2, n. 5, p. 829-842, set. 2005. Informa UK Limited.

BARBOSA, Fernanda Malheiros et al. **VACINAS DE DNA CONTRA O VÍRUS INFLUENZA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**: dna vaccines against influenza virus: a systematic review. Atenas Higeia, v. 3, n. 1, p. 41-45, 2021.

BAROUTI, Ghislaine; JAFFREDO, Cédric G.; GUILLAUME, Sophie M.. **Advances in drug delivery systems based on synthetic poly(hydroxybutyrate) (co)polymers**. Progress In Polymer Science, v. 73, p. 1-31, out. 2017. Elsevier BV.

BERTOLINE, Letícia M. F. et al. **Before and after AlphaFold2**: an overview of protein structure prediction. Frontiers In Bioinformatics, 28 fev. 2023. Frontiers Media SA.

BONDOS, Sarah e; BICKNELL, Alicia. **Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification**. Analytical Biochemistry, v. 316, n. 2, p. 223-231, maio 2003. Elsevier BV.

BRADFORD, Marion M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUCCI, D.Z.; TAVARES, L.B.B.; SELL, I.. **PHB packaging for the storage of food products**. Polymer Testing, v. 24, n. 5, p. 564-571, ago. 2005. Elsevier BV.

CHAN, W.; VERMA, C. S.; LANE, D. P.; GAN, S. K. **A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli**. Bioscience Reports, v. 33, n. 6, p. 931–937, 2013.

CUI, Zhengrong. **DNA Vaccine**. Non-Viral Vectors For Gene Therapy, Second Edition: Part 2, p. 257-289, 2005. Elsevier.

DELANY, Isabel; RAPPUOLI, Rino; GREGORIO, Ennio de. **Vaccines for the 21st century**. Embo Molecular Medicine, v. 6, n. 6, p. 708-720, 6 maio 2014. EMBO.

DEMAIN, Arnold L.; VAISHNAV, Preeti. **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms**. Biotechnology Advances, v. 27, n. 3, p. 297-306, maio 2009. Elsevier BV.

GALLOWAY, Chad A.; SOWDEN, Mark P.; SMITH, Harold C. **Increasing the Yield of Soluble Recombinant Protein Expressed in E. coli by Induction during Late Log Phase**. Biotechniques, v. 34, n. 3, p. 524-530, mar. 2003. Future Science Ltd.

GHOSH, Gourisankar *et al.* **Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a κ B site**. Nature, v. 373, n. 6512, p. 303-310, jan. 1995. Springer Science and Business Media LLC.

GONZÁLEZ-MONTALBÁN, Nuria; GARCÍA-FRUITÓS, Elena; VILLAVÉRDE, Antonio. **Recombinant protein solubility—does more mean better?** Nature Biotechnology, v. 25, n. 7, p. 718-720, jul. 2007. Springer Science and Business Media LLC.

HO, William et al. **Next-Generation Vaccines**: nanoparticle -mediated dna and mrna delivery. Advanced Healthcare Materials, v. 10, n. 8, p. 2001812, 18 jan. 2021. Wiley.

JABŁOŃSKA, Katarzyna; ABALLÉA, Samuel; TOUMI, Mondher. **The real-life impact of vaccination on COVID-19 mortality in Europe and Israel**. Public Health, v. 198, p. 230-237, set. 2021. Elsevier BV.

JENDROSSEK, Dieter; HANDRICK, René. **Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates**. Annual Review Of Microbiology, v. 56, n. 1, p. 403-432, out. 2002. Annual Reviews.

KILIM, O., MENTES, A., PÁL, B. et al. **SARS-CoV-2 receptor-binding domain deep mutational AlphaFold2 structures**. Sci Data 10, 134 (2023)

KUTZLER, Michele A.; WEINER, David B.. **DNA vaccines**: ready for prime time?. Nature Reviews Genetics, v. 9, n. 10, p. 776-788, out. 2008. Springer Science and Business Media LLC.

LAEMMLI, Ulrich Karl. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

Li, C. C., Dai, R. M., Chen, E., & Longo, D. L. (1994). **Phosphorylation of NF-KB1-p50 is involved in NF-kappa B activation and stable DNA binding**. The Journal of biological chemistry, 269(48), 30089–30092.

LIM, Michael et al. **Engineered Nanodelivery Systems to Improve DNA Vaccine Technologies**. Pharmaceutics, v. 12, n. 1, p. 30, 1 jan. 2020. MDPI AG.

STRASSBURG, Marc A. **The global eradication of smallpox**. American Journal Of Infection Control, Los Angeles, v. 10, n. 2, p. 53-59, maio 1982.

MINOR, Philip. **Vaccine-derived poliovirus (VDPV)**: impact on poliomyelitis eradication. Vaccine, v. 27, n. 20, p. 2649-2652, maio 2009. Elsevier BV.

MULHARDT, C. **Molecular Biology and Genomics**. Academic Press, 2007.

MÜLLER, Christoph W. *et al.* **Structure of the NF-κB p50 homodimer bound to DNA**. Nature, v. 373, n. 6512, p. 311-317, jan. 1995. Springer Science and Business Media LLC.

MÜLLER-SANTOS, Marcelo *et al.* **The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria.** Fems Microbiology Reviews, v. 45, n. 3, p. 1-13, 28 out. 2020. Oxford University Press (OUP).

NGUYEN, David N. *et al.* **Polymeric Materials for Gene Delivery and DNA Vaccination.** Advanced Materials, v. 21, n. 8, p. 847-867, 23 fev. 2009. Wiley.

NUMATA, Keiji; ABE, Hideki; IWATA, Tadahisa. **Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials.** Materials, v. 2, n. 3, p. 1104-1126, 28 ago. 2009. MDPI AG.

PATI, R.; SHEVTSOV, M.; SONAWANE, A. **Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases.** Front Immunol., v. 9, n. 2224, p. 1–16, 2018.

SAADE, Fadi; PETROVSKY, Nikolai. **Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines.** Expert Review Of Vaccines, v. 11, n. 2, p. 189-209, fev. 2012. Informa UK Limited.

SHAFATI, Maryam *et al.* **A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19.** Future Virology, v. 17, n. 1, p. 49-66, jan. 2022. Future Medicine Ltd.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

SHRIVASTAV, Anupama; KIM, Hae-Yeong; KIM, Young-Rok. **Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System.** Biomed Research International, v. 2013, p. 1-12, 2013. Hindawi Limited.

SINGH, Anupam *et al.* **Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process.** Microbial Cell Factories, v. 14, n. 1, 25 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

SPEIGHT, Robert e et al. **A new plasmid display technology for the in vitro selection of functional phenotype–genotype linked proteins.** Chemistry & Biology, v. 8, n. 10, p. 951-965, out. 2001. Elsevier BV.

TAKAKURA, Y. et al. **Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies.** European Journal Of Pharmaceutical Sciences, v. 13, n. 1, p. 71-76, abr. 2001. Elsevier BV.

THURING, R.W.J.; SANDERS, J.P.M.; BORST, P. **A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels.** Analytical Biochemistry, v. 66, n. 1, p. 213-220, maio 1975. Elsevier BV.

URBAN, M.B.; SCHRECK, R.; BAEUERLE, P.A. **NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit.** The Embo Journal, v. 10, n. 7, p. 1817-1825, jul. 1991. Wiley.

VAN RIEL, Debby; WIT, Emmie de. **Next-generation vaccine platforms for COVID-19.** Nature Materials, v. 19, n. 8, p. 810-812, 23 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

VERA, Andrea et al. **The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures.** Biotechnology And Bioengineering, v. 96, n. 6, p. 1101-1106, 2007. Wiley.

VETTER, Volker et al. **Understanding modern-day vaccines: what you need to know.** Annals Of Medicine, v. 50, n. 2, p. 110-120, 27 nov. 2017. Informa UK Limited.

WOLFF, Jon A. et al. **Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo.** Science, v. 247, n. 4949, p. 1465-1468, 23 mar. 1990. American Association for the Advancement of Science (AAAS).