

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA rBVL-I EM *Pichia pastoris*

KLAFKE, Gabriel¹; MOREIRA, Gustavo¹; PEREIRA, Juliano¹; PINTO, Luciano¹; CONCEIÇÃO, Fabricio¹; DELLAGOSTIN, Odir Antonio¹

¹ Centro de Desenvolvimento Tecnológico-CDTec, Universidade Federal de Pelotas-UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. gabrielklafke@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Lectinas fazem parte de uma classe de proteínas de grande interesse biológico/farmacológico, cuja existência está ligada as mais variadas formas de vida, desde procariotos até plantas e animais (GERLACH et al., 2005). Essas proteínas ou glicoproteínas de origem não imune são capazes de ligarem-se especificamente e reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados. Elas estão envolvidas em inúmeras funções biológicas, tal como: adesão de célula, na migração celular, crescimento celular, indução diferencial da apoptose (WIMER, 2003). Recentemente, efeitos imuno-reguladores de certas lectinas de origem vegetal têm despertado considerável interesse para aplicação em bioterapia de câncer e, mais recentemente, na regeneração tecidual. Dentre as lectinas vegetais para este fim, pode-se destacar a lectina 1 de *Bauhinia variegata* (BVL-I) que já foi parcialmente caracterizada. No entanto, sua produção em larga escala ainda é um fator limitante para aplicação na pesquisa.

Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, muitos sistemas de expressão de proteínas heterólogas foram construídos para promover a produção em larga escala de diversas proteínas. Dentre os sistemas mais utilizados, encontra-se o uso da levedura *Pichia pastoris* que tem possibilitado vantagens como fácil aumento de escala e capacidade de realizar modificações pós-traducionais (CEREGHINO & CREGG, 1999). A partir do exposto acima, o objetivo deste trabalho foi expressar a lectina rBVL-I em *P. pastoris* visando sua posterior utilização com insumo biológico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

A síntese do gene *bvI* (882bp) foi realizada pela empresa Epoch Biolabs® (USA), que procedeu a introdução do gene no plasmídeo pUC18, com os códons preferenciais para a expressão em levedura. A clonagem no vetor pPICZαB foi realizada através dos sítios para as endonucleases *EcoRI* e *XbaI* nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente. Após clonagem, o plasmídeo foi submetido a PCR com os *primers* AOX para confirmação da presença do gene e sequenciamento para avaliação da integridade da construção com o sequenciador MegaBACE™ 1000. Após a confirmação da qualidade do plasmídeo, a cepa X-33 de *P. pastoris* foi transformada com o vetor pPICZαB/*bvI*. Para a expressão da proteína foi utilizado o sistema Easy Select Expression *Pichia* (Invitrogen®). Após quatro dias de indução em placa com meio MM (Minimal Methanol 0,5%), as colônias transformantes foram submetidas à técnica *colony blot* para a avaliação

da expressão da proteína rBVL-I utilizando o soro anti-bvl. As colônias triadas por este método foram submetidas à indução em meio BMMY (Buffered Methanol-complex Medium 0,5%) por cinco dias. Com objetivo de obter um controle negativo da expressão, a *P. pastoris* foi transformada somente com o vetor pPICZαB. Após a indução, foi realizado o *dot blot* do sobrenadante do cultivo. Como controle negativo foi utilizado albumina soro bovina (BSA), outra quimera (GnRH-Itb) produzida em *P. pastoris* e o próprio meio de indução BMMY. A BVL extraída de *Bauhinia variegata* foi usada como controle positivo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A construção do vetor pPICZαB/BVLI pode ser confirmada através da PCR com os *primers* AOX utilizando como DNA molde o vetor recombinante e o vetor pPICZαB (figura 1).

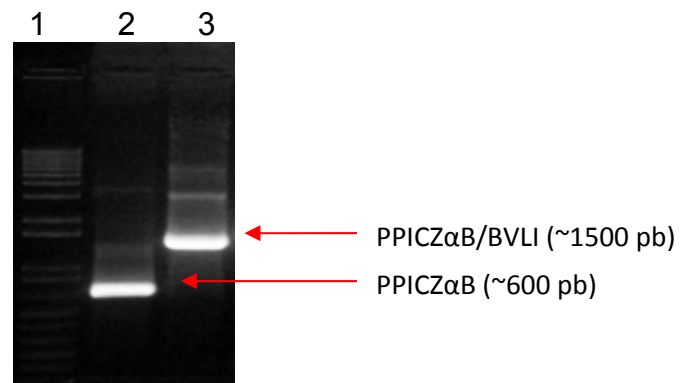


Figura 1 – Confirmação da presença do gene *bvl* no vetor pPICZαB por PCR utilizando os primers AOX. Gel de agarose 1,0%. Marcador 1Kb plus/INVITROGEN (1). Vetor vazio pPICZαB (2). Vetor recombinante pPICZαB/BVLI (3).

Após a separação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose, a banda de ~1500 pb evidenciou a presença do gene no vetor recombinante pPICZαB/BVLI. A análise do sequenciamento com o sequenciador MegaBACE™ 1000, confirmou a integridade da construção possibilitando a transformação da cepa X-33 de *P. pastoris*. A seguir, algumas colônias transformantes escolhidas aleatoriamente foram submetidas à indução com metanol 0,5% de acordo com sistema Easy Select Expression *Pichia* (Invitrogen®). Após quatro dias de indução em placa com o meio MM a 28°C, foi realizada a técnica *colony blot*. As colônias que obtiveram melhores níveis de expressão foram induzidas em BMMY contendo 0,5% metanol. Ao final do processo, foi realizado um *dot blot* que evidenciou a expressão da proteína BVL-I em uma das colônias testadas (figura 2).

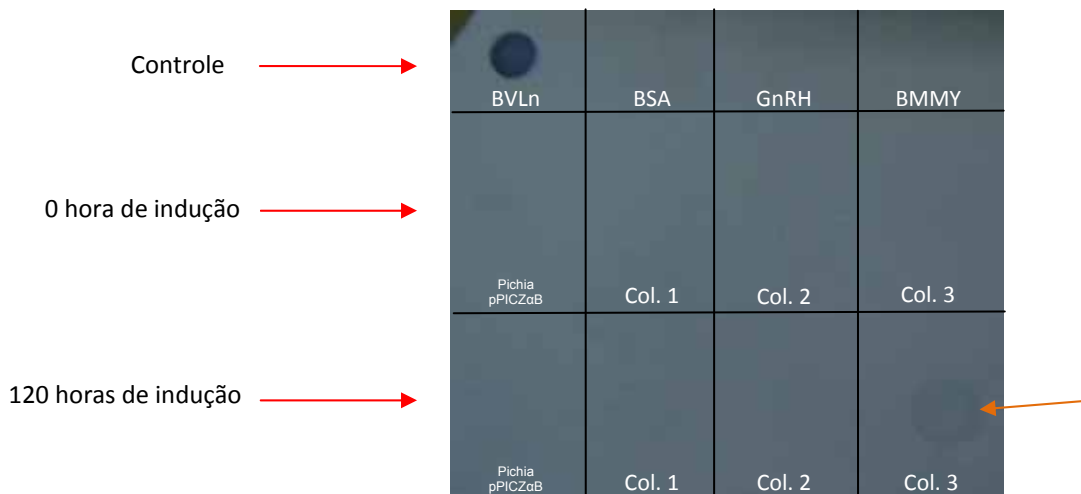


Figura 2 – *Dot blot* do sobrenadante das colônias transformantes que foram submetidas a cinco dias de indução em meio BMMY.

4 CONCLUSÕES

O gene *bvI* foi clonado com sucesso no plasmídeo de expressão PICZαB/BVLI e a proteína rBVLI foi expressa pela cepa X-33 de *P. pastoris*. Cultivos e purificações em maior escala da proteína recombinante serão realizados visando sua posterior utilização como insumo biológico.

5 REFERÊNCIAS

- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, p. 45-66, 1999.
- GERLACH, D.; SCHILOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K. H. N-acetyl-D-galactosamine/N-acetyl-D-glucosamine – recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, p. 223-232, 2005.
- WIMER, B. M. Curative potential of foremost mitogen applications. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**. v. 18 (6), p. 903-916, 2003.