

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE-UFCG

Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas

Cristianne Costa Alves de Souza

**MUTAÇÃO E SUBCLONAGEM DO GENE *PaOLP* EM VETOR DE EXPRESSÃO EM
*Pichia pastoris***

Cuité-PB

2013

UFCG / BIBLIOTECA

Cristianne Costa Alves de Souza

**MUTAÇÃO E SUBCLONAGEM DO GENE *PaOLP* EM VETOR DE EXPRESSÃO
EM *Pichia pastoris***

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Magnólia de Araújo Campos

Cuité-PB

2013



Biblioteca Setorial do CES.

Junho de 2021.

Cuité - PB

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S729m

Souza, Cristianne Costa Alves de.

Mutação e subclonagem do gene *PaOLP* em vetor de expressão em *Pichia pastoris*. / Cristianne Costa Alves de Souza – Cuité: CES, 2013.

42 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCEG, 2013.

Orientadora: Dra. Magnólia de Araújo Campos.

Co-orientadora: Dra. Marília Santos Silva.

1. Proteína antimicrobiana. 2. Gene *PR-5*. 3. Proteína recombinante. I. Título.

CDU 579.61:615.281.9

Cristianne Costa Alves de Souza

**MUTAÇÃO E SUBCLONAGEM DO GENE *PaOLP* EM VETOR DE EXPRESSÃO
EM *Pichia pastoris***

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Magnólia de Araújo Campos (Orientadora) – UFCG

Prof. Dr. Wellington Adriano Sabino

Prof. Dr. Francisco José Victor de Castro

Cuité, 26 de Setembro de 2013.

UFCG / BIBLIOTECA

*A Deus, primeiramente, que tem me abençoado
durante toda essa trajetória;*

E aos meus pais e minha filha, pela força e incentivo.

UFCC/BIBLIOTECA

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus, por me guiar, me dar forças em todos os momentos em que realizei este trabalho.

Ao Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa PIBITI.

A Professora Dra. Magnólia de Araújo Campos, pela orientação, apoio e pela oportunidade de participar de um projeto dessa qualidade.

Aos pesquisadores da EMBRAPA Cerrados, Brasília DF, Dra. Marília Santos Silva e Dr. Rodrigo Fragoso, pela co-orientação e colaboração nas etapas finais da subclonagem.

Ao corpo docente do Curso de Ciências Biológicas, UFCG, Campus Cuité, pelo conhecimento e experiência que adquiri ao decorrer do curso.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Unidade Acadêmica de Educação e Saúde – UFCG/CES, recentemente *LBiotec*. Em especial as minhas parceiras Paula Sousa, Gláucia Medeiros, Rayane Abreu e Graciete Balbino pelo companheirismo, pelas loucuras e amizade cultivada. As técnicas de Laboratório Jacqueline Mendes e Danila Barbosa pela ajuda e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Cerrados e Embrapa Algodão onde parte deste projeto foi desenvolvido, por todo apoio e contribuição.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional.

A minha filha, pela compreensão da minha ausência.

Ao meu namorado, pelo companheirismo e carinho.

Aos meus colegas de curso e da Residência Universitária de Cuité, em especial ao quarto 12 e 08 pelo apoio e amizade.

*Posso, tudo posso naquele que me fortalece.
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir.
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos.
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou para mim e ali estar.*
(PE. FÁBIO DE MELO).

RESUMO

A expressão de proteínas em sistemas heterólogos representa uma poderosa ferramenta para a produção em grande escala de proteínas de interesse, visando demonstrar sua atividade ou aplicações biotecnológicas. Em nosso laboratório foi isolado um gene do tipo *PR-5* de *Physalis angulata* que codifica uma proteína antifúngica, denominada PaOLP. Neste trabalho foi realizada a subclonagem do gene *PaOLP* do vetor de clonagem pGEM-T-Easy para o vetor de expressão em *Pichia pastoris* pPICZ α -A. O gene *PaOLP* foi mutado por PCR, para deletar as regiões codificadoras dos peptídeos sinal e carboxi-terminal, e foi clonado em células de *Escherichia coli* cepa XL-1 Blue, as quais foram resistentes a zeocina e positivas para PCR de colônia usando os primers PPM7 e PPM8, e por digestão com enzimas apropriadas. A estratégia de subclonagem utilizada deve levar a expressão de uma proteína PaOLP recombinante madura, com direcionamento para o meio extracelular de células de leveduras *Pichia pastoris* e com uma calda de histidina apropriada para a purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados. A introdução do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado em células competentes de *Pichia pastoris*, e posterior expressão gênica para a produção da proteína PaOLP madura de fusão em larga escala, são os assuntos atuais desta pesquisa.

Palavras-chave: Proteína antimicrobiana Genes *PR-5*. Proteína recombinante.

ABSTRACT

The protein expression in heterologous systems represents a power tool in order to produce in large scale important proteins, aiming to demonstrate their activity or biotechnological applications. In our laboratory it was isolated a PR5-like gene from *Physalis angulata* that encodes an antifungal protein, denominated PaOLP. In this work it was performed the subcloning of the *PaOLP* gene, from pGEM-T Easy cloning vector to the pPICZ α -A *Pichia pastoris* expression vector. The *PaOLP* gene was mutated by PCR to delete regions encoding the signal and carboxi-termini peptides, and cloned into *Escherichia coli* strain DH5 α cells, which were zeocina selected and positives for colony PCR using PPM7 and PPM8 primers, and by digestion with appropriate enzymes. The used sub-cloning approach may lead to expression of a mature recombinant PaOLP protein, with sorting to the extracellular medium of *Pichia pastoris* yeast cells and possessing an appropriated His-tag to purification on immobilized methal affinity chromatography. The introduction of the pPICZ α -A vector leading the mutated *PaOLP* gene into the *Pichia pastoris* competent cells, and posterior gene expression to in large scale production of the fusion mature PaOLP protein, are the current subjects of this research.

Keywords: Antimicrobial protein. PR-5 genes. Recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Síntese geral das etapas realizadas.....	22
FIGURA 2 - Síntese das etapas realizadas para a purificação do vetor pGEM-T Easy conduzindo o gene <i>PaOLP</i> a partir de <i>E. coli</i>	23
FIGURA 3 - Síntese das etapas realizadas para a mutação PCR no gene <i>PaOLP</i> para produzir proteína madura mutante.....	25
FIGURA 4 - Síntese das etapas realizadas para a purificação do vetor pPICZ α -A a partir de <i>E. coli</i>	26
FIGURA 5 - Síntese das etapas realizadas para a Digestão do fragmento gênico mutado <i>PaOLP</i> e do vetor pPICZ α -A.....	27
FIGURA 6 - Síntese das etapas realizadas para ligação do fragmento gênico mutado <i>PaOLP</i> ao vetor pPICZ α -A.....	28
FIGURA 7 - Síntese das etapas realizadas para a transformação por eletroporação de <i>E. coli</i> XLI-Blue.....	29
FIGURA 8 - Síntese das etapas realizadas para a purificação do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene <i>PaOLP</i> mutado a partir de <i>E. coli</i>	30
FIGURA 9 - Síntese das etapas realizadas para a confirmação da presença do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene <i>PaOLP</i> mutado.....	31
FIGURA 10 - Planta <i>Physalis angulata</i> , presente no Horto Florestal do CES/UFCG...	30
FIGURA 11 - Mapa da construção pPICZ α -A/ <i>PaOLP</i> mutante para expressão em <i>Pichia pastoris</i> (A e B). Representação esquemática da proteína PaOLP recombinante. As sequências dos oligonucleotídeos PPM7 e PPM8 estão descritas em A, os quais estão posicionados nas bordas que flanqueiam o fragmento gênico que codifica a proteína PaOLP madura.....	34
FIGURA 12 - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídeo visualizado sob luz ultravioleta. A) DNA plasmidial pGEM-T-Easy e contendo o gene PaOLP completo isolado de <i>Escherichia coli</i> cepa DH5- α . B) DNA	

plasmidial do vetor pPICZ α A purificado da cepa DH5 α de *E. coli* (1) e Fragmento PaOLP amplificado com os oligonucleotídeos PPM7 e PPM8 (2). Marcador de peso do gene molecular (M)..... 35

FIGURA 13 - Eletroforese em gel de agarose 0.8% (m/v), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta, de produtos das digestões com as enzimas de restrição EcoR I e Sal I. A) Fragmento gênico PaOLP maduro eluído e digerido (1). B) Vetor pPICZ α -A digerido, a seta indica o fragmento linearizado de interesse (1). M, marcador de peso molecular..... 36

FIGURA 14 - Eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. A) Produtos de PCR de colônia contendo o pPICZ α -A/PaOLP mutado usando os primers PPM7 e PPM8 (1). B) DNA plasmidial pPICZ α -A/PaOLP mutado isolado de *Escherichia coli* cepa XL-1 Blue, não digerido (1) e digerido (2) com as enzimas de restrição EcoR I e Sal I. (M) Marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen)..... 37

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – ácido Desoxirribonucléico

His – Histidinas

PaOLP – *Physalis angulata* osmotin-like protein

PR - pathogenesis-related

pPICZ α -A – vetor utilizado para expressar e secretar proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*

PCR – Reações em Cadeia da Polimerase

pGEM-T Easy – vetor para clonagem de genes

RNA – Ácido ribonucléico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Justificativa.....	14
2 OBJETIVOS:.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Expressão gênica.....	16
3.2 Sistemas heterólogos de expressão de proteínas em microrganismos.....	17
3.3 Vetores para expressão heteróloga em leveduras.....	19
3.4 Genes <i>PR-5</i>	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Obtenção do inserto gênico <i>PaOLP</i> mutado para recombinação.....	23
4.1.1 Purificação do vetor pGEM-T Easy conduzindo o gene <i>PaOLP</i> a partir de <i>E. coli</i>	23
4.1.2 Mutação por PCR do gene <i>PaOLP</i> para produzir proteína madura mutante.....	25
4.2 Obtenção do vetor pPICZ α -A para recombinação.....	26
4.2.1 Purificação do vetor pPICZ α -A a partir de <i>E. coli</i>	26
4.3 Obtenção do DNA recombinante pPICZ α -A ligado ao <i>PaOLP</i> mutado.....	27
4.3.1 Digestão do fragmento gênico mutado <i>PaOLP</i> e do vetor pPICZ α -A.....	27
4.3.2 Ligação do fragmento gênico mutado <i>PaOLP</i> ao vetor pPICZ α -A.....	28
4.4 Obtenção de clones recombinantes contendo o vetor pPICZ α -A conduzindo o gene <i>PaOLP</i> mutado.....	29
4.4.1 Transformação por eletroporação de <i>E. coli</i> XLI-Blue com vetor pPICZ α -A/ <i>PaOLP</i> mutado.....	29
4.4.2 Purificação do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene <i>PaOLP</i> mutado a partir de <i>E. coli</i>	30
4.5 Confirmação da presença do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene <i>PaOLP</i> mutado.....	31
5 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	32
5.1 Elaboração de estratégia de expressão heteróloga de <i>PaOLP</i> em <i>P. pastoris</i>	32
5.2 Produção do inserto gênico <i>PaOLP</i> mutado ligado ao vetor pPICZ α -A clonado em <i>E. coli</i>	34
5.3 Validação do clone recombinante contendo o vetor pPICZ α -A/ <i>PaOLP</i> mutado.....	37
6 CONCLUSÕES.....	39
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Na era pós-genômica, muitas funções de genes precisam ser elucidadas, compreendidas e validadas tanto para interesses moleculares, médicos, agrônômicos quanto industriais. Portanto, a produção em larga escala de proteínas recombinantes a partir dos genes sequenciados possui elevada demanda nos últimos 15 anos (HUNT, 2004; SØRENSEN, 2010). A expressão de proteínas funcionais em hospedeiros está embasada na biotecnologia moderna, pela geração de DNA recombinante. Esta tecnologia tem por princípio o dogma central da biologia molecular, em que a sequência de aminoácidos da proteína expressa é dependente da sequência de DNA, podendo assim a estrutura e função da proteína ser afetada pela frequência dos códons, uma vez que estes influenciam a estrutura secundária e terciária da proteína (RAI; ADH, 2001; REYES-RUIZ; BARRERA-SALDAÑA, 2006).

Genes cujas funções são desconhecidas ou com funções putativas que ainda não foram comprovadas são clonados em vetores de expressão heteróloga e as proteínas codificadas por eles são produzidas em células hospedeiras diferentes das células de origem. Os sistemas de expressão heteróloga de proteínas são classificados de acordo com a célula hospedeira, sendo conhecidos, de modo geral, como sistemas de expressão em procaríotos e sistemas de expressão em eucariotos, para os quais existem vetores apropriados disponíveis comercialmente (RAI; PADH, 2001; HUNT, 2004; REYES-RUIZ; BARRERA-SALDAÑA, 2006).

Os sistemas de expressão em procaríotos mais usados são cepas de *Escherichia coli*, os quais associam facilidades, rapidez, praticidade, alta produtividade e baixos custos, porém apresentam um fator limitante que é a baixa capacidade de dobrar proteínas e realizar outros processamentos pós-traducionais tão comuns em proteínas de eucariotos (CAMPOS et al., 2008; SAHDEV et al., 2008). Dentre os sistemas de expressão em eucariotos destaca-se a expressão em fungos leveduriformes, tais como *Saccharomyces cerevisiae* (VAN-KHUE; RAO, 2004) e *Pichia pastoris* (KRAINER et al., 2012), além dos sistemas de expressão em fungos filamentosos (NEVALAINEN et al., 2005), em baculovírus/células de insetos, em células de mamíferos (KOST et al., 2005) e em plantas (STREATFIELD, 2007).

1.1 Justificativa

Na busca por novos genes que codificam proteínas com propriedades terapêuticas, em nosso laboratório foi isolado recentemente um gene do tipo *PR-5* que codifica uma proteína denominada PaOLP, isolado do genoma da planta *Physalis angulata*, presente no Horto Florestal do Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité da UFCG. A análise de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida de PaOLP revelou características conservadas dentro da família de proteínas *PR-5*, tendo sido diagnosticado o posicionamento correto de resíduos funcionais implicados na atividade antimicrobiana de membros desta família de proteínas (Dados não publicados).

Genes que codificam proteínas antimicrobianas do tipo *PR-5* representam candidatos importantes para aplicações biotecnológicas. Estas proteínas ocorrem naturalmente como participantes do sistema imune inato de plantas e de animais, e protegem os hospedeiros da invasão por microrganismos patogênicos, incluindo fungos, bactéria e vírus, prevenindo doenças (VAN LOON et al., 2006). Proteínas antimicrobianas do tipo *PR-5*, como as osmotinas, têm sido implicadas como agentes terapêuticos em humanos (ALMEIDA et al., 2008; RAMSDALE, 2008; Wipo Patent Document Number WO/2006/036871: *Plant PR-5 proteins as mammalian therapeutic agents*), além da bem-caracterizada aplicação na engenharia genética de plantas visando resistência a doenças (FAGOAGA et al., 2001). Diferentes atividades têm sido descritas para membros da família de proteínas *PR-5* (SINGH et al., 1987; LAROSA et al., 1989; NEALE et al., 1990; SALZMAN et al., 1998; NEWTON & DUMAN, 2000), especialmente atividade antifúngica/antioomicetal *in vitro* e *in planta* para a maioria deles (ROBERTS & SELITRENNIKOFF, 1990; ABAD ET AL., 1996).

A atividade potente de algumas proteínas *PR-5* levou à hipótese de que elas poderiam ser usadas como uma nova fonte de resistência a fungos. Portanto, a potencial atividade antifúngica da proteína PaOLP precisa ser determinada, visando demonstrar sua atividade para futuras aplicações biotecnológicas. Neste contexto, a expressão de proteínas de interesse em sistemas heterólogos, a partir de genes clonados, representa uma poderosa ferramenta para a produção em grande escala de PaOLP.

Entretanto, vários critérios precisam ser determinados previamente para a produção e purificação da proteína a ser expressa em sistemas heterólogos, que incluem: a escolha do sistema – se em procariotos ou eucariotos; da linhagem da célula hospedeira e vetor de expressão; do direcionamento da proteína expressa – se esta vai para o meio intra ou extracelular da célula hospedeira; do promotor – se este terá expressão induzida ou

constitutiva; e ainda pode-se optar por realizar processamento pós-traducional de clivagem de peptídeos por mutação prévia no gene. Portanto, a elaboração de uma estratégia de expressão da proteína e subclonagem do gene de interesse são as etapas iniciais a serem alcançadas, as quais são consideradas fatores limitantes para o sucesso da obtenção e purificação de proteínas recombinantes.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral

Mutar e subclonar o gene *PaOLP* em vetor de expressão em *Pichia pastoris*, visando à produção da proteína recombinante.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Obter o inserto gênico *PaOLP* mutado apropriado para recombinação, por meio de PCR com primers específicos;
- b) Obter o vetor pPICZ α -A apropriado para recombinação, por meio da purificação;
- c) Obter o DNA recombinante pPICZ α -A ligado ao *PaOLP* mutado;
- d) Obter clones recombinantes de *Escherichia coli* que contenham o vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado, após transformação;
- e) Validar clones recombinantes conduzindo o vetor pPICZ α -A-*PaOLP* mutado, por meio de PCR.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas três décadas, a engenharia genética tem sido empregada com sucesso para transferir um gene de interesse biotecnológico de um organismo a outro. Meios de manipulação e transformação genética foram criados possibilitando que os genes fossem estudados e expressos de forma a se obter melhores características para varias utilizações (CARMO, 2010). Dessa forma, a expressão heteróloga em outras células hospedeiras tem sido empregada para potencializar a obtenção de produtos de interesse biotecnológico. O exemplo mais bem sucedido da aplicação desta tecnologia é a produção da insulina comercializada atualmente para o tratamento da diabete em humanos (LOPES; PESSOA; SANTOS; BARBOSA, 2012).

3.1 Expressão gênica

O conceito molecular de gene é um segmento de uma molécula de DNA que contém um código genético para a síntese de produtos funcionais, RNA e cadeia polipeptídica/proteína. Por definição, a expressão de um gene significa o processo pelo qual as informações genéticas contidas nesse segmento de DNA são utilizadas na síntese de RNA e proteína. A expressão gênica envolve as etapas de Transcrição da informação contida no DNA em RNAm (mensageiro) e de Tradução deste em uma sequencia polipeptídica. Portanto, a expressão gênica pode ser estudada ao nível de RNA (Transcriptoma) e ao nível de proteínas (Proteoma). A expressão de um gene reflete o estado fisiológico da célula e, portanto, está associada a uma função celular do gene no organismo que o possui.

Portanto, a sequencia da proteína depende da sequencia do gene que a codifica e, por sua vez, a expressão de um gene depende de duas sequencias regulatórias denominadas Promotor, que se localiza antes do gene, e Terminador, que se localiza após o gene, no cromossomo. O promotor é responsável por iniciar a expressão do gene, enquanto que o terminador é responsável por parar a transcrição do RNA que será traduzido em uma proteína.

A expressão de um gene só se verifica se o polipeptídio por ele codificado for produzido e estiver funcional. Portanto, para que um gene presente no núcleo se expresse, devem ocorrer às etapas de transcrição, processamento do transcrito, transporte para o citoplasma, tradução, endereçamento e ativação do polipeptídio formado.

O conceito de promotor em eucariotos pode ser entendido como a região na qual estão localizados os sítios para a ligação dos diversos fatores de transcrição necessários para

promover eficiente expressão de um determinado gene. Estes fatores direcionados a região promotora podem promover a iniciação da transcrição por interações diretas ou indiretas com a RNA polimerase. Promotores que são constitutivamente expressos possuem elementos nas regiões *upstream* que são reconhecidos por serem ativadores ubíquos, enquanto que promotores que tem sua ativação em condições específicas, possuem elementos ativadores aparentemente específicos para as classes ou famílias de genes a que pertencem (LEWIN, 2004). Um gene expresso constitutivamente está expresso em todas as células do organismo e durante todo o tempo do seu ciclo de vida, enquanto que o gene que é induzido, o nível de expressão tem um pico máximo e depois cai.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível a manipulação das sequências que envolvem a expressão de um gene, ou seja, promotor, região codificadora ou gene, e terminador. Por esta tecnologia, é possível montar um cassete de expressão contendo um promotor e um terminador de qualquer outro gene ou origem, ligado a qualquer gene de interesse. Este cassete é ligado a um vetor ou carreador, normalmente um plasmídeo, e este vetor recombinante é inserido por transformação para uma célula hospedeira, comumente uma cepa da bactéria *Escherichia coli* ou uma raça de fungo, como as leveduras *Sacharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

O termo expressão heteróloga refere-se a expressão de um gene em uma célula ou organismo diferente daquele de sua origem, ou seja, de onde foi isolado. Por exemplo, quando um gene de planta é expresso em uma bactéria ou um fungo. Como o crescimento desses microrganismos é realizado *in vitro*, isto é, sob condições assépticas laboratoriais, a expressão heteróloga é também dita expressão heteróloga *in vitro*, nestes casos. Com crescimento tipicamente em colônias, cada colônia isolada é crescida a partir de uma única célula, portanto todas as células de uma colônia de bactéria ou levedura são ditas clones geneticamente idênticos. Quando a célula hospedeira é uma planta, diz-se que a expressão ocorre *in planta*. Toda célula ou organismo que possui genes exógenos, ou seja, de outra origem são chamados Organismos Geneticamente Modificados, ou OGM.

3.2 Sistemas heterólogos de expressão de proteínas em microrganismos

Ao contrário das plantas e animais transgênicos, os microrganismos possuem uma longa história de uso para a produção de peptídeos e proteínas heterólogas (BANEYX, 1999; PFEIFER; KHOSLA, 2001).

Os sistemas de expressão em procarióticos são, em princípio, úteis por produzir proteínas recombinantes a partir de genes de origem tanto procariótica quanto eucariótica. Porém, em muitos casos, as proteínas eucarióticas sintetizadas por bactérias são instáveis, não possuem atividade biológica e podem ser contaminadas com toxinas bacterianas, resultando em baixos níveis de produção (RODRIGO, 2004). Em *Escherichia coli*, que é o sistema de expressão procariótico bem mais usado, Vaz (2008) aponta que a expressão da proteína recombinante pode ser considerada um processo estranho à célula, ou seja, não fazendo parte do seu conjunto metabólico natural e geralmente acaba causando problemas a célula hospedeira que reage às condições adversas de varias formas, dificultando a obtenção das proteínas de interesse. Para evitar estes e outros problemas na obtenção de produtos como proteínas, enzimas e hormônios, sistemas de expressão heteróloga eucarióticos utilizando leveduras foram desenvolvidos e são mais atrativos quanto a sua eficiência na elaboração final dos produtos expressos e secretados.

Os fungos têm sido manipulados pelo homem há milhares de anos, sendo que as leveduras (fungos unicelulares) têm tido grande destaque, sobretudo na indústria de alimentos (KINGSMAN; KINGSMAN, 1988). Dentre as leveduras de maior valor biotecnológico destaca-se *Saccharomyces cerevisiae*. Além de suas aplicações tradicionais, *S. cerevisiae* também tem sido utilizada como importante sistema de expressão heteróloga, pois possui tanto as vantagens de sistemas procarióticos (fácil manipulação, crescimento rápido, genética molecular bem caracterizada) quanto de eucarióticos (capacidade de realizar processamentos e modificações pós-traducionais típicas de sistema eucariótico). De fato, muitas proteínas eucarióticas não puderam ser eficientemente expressas em sistema procariótico, como em *Escherichia coli*, devido à ausência de modificações pós-traducionais e defeitos no dobramento o que pode levar a baixos níveis de expressão. Entretanto, uma das limitações encontradas nesse sistema é o fato desta levedura hiperglicosilar certas proteínas que são secretadas (GURCAN; ELLAR, 2005).

Para contornar este problema, uma alternativa é o uso da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Esta propriedade foi explorada na década de 60-70 para a produção de *Single Cell Protein* (SCP) com baixos custos de produção para a ração animal e alto teor proteico (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Dentre as leveduras metilotróficas que foram consideradas para a produção de SCP estava *P. pastoris* que hiperexpressava a enzima álcool oxidase, que participa da via metabólica do metanol. Este fato despertou a atenção de pesquisadores que logo perceberam o potencial desta levedura para expressão heteróloga em meios contendo metanol (CREGG *et al.*, 2000).

Na década de 80, a Companhia *Phillips Petroleum*, juntamente com a *Salk Institute Biotechnology/Industrial Inc.* (SIBIA, La Jolla, USA) avaliaram o potencial de *P. pastoris* como sistema para produção de proteínas heterólogas. Desde então, esta levedura tem sido amplamente utilizada na produção de proteínas de interesse acadêmico e biotecnológico (CEREGHINO; CREGG, 2000). Neste sentido, a levedura *P. pastoris* tem se mostrado um modelo de sucesso de produção de proteínas heterólogas, já que além de ser de fácil manipulação, produz e secreta altos níveis da proteína desejada e faz modificações necessárias no polipeptídeo nascente, como glicosilação e faz as modificações necessárias no processamento proteolítico (CEREGHINO E CREGG, 2000; HAMILTON, 2003). Devido sua importância biotecnológica, seu genoma foi sequenciado (SCHUTTER *et al.*, 2009).

De modo geral, as vantagens de usar o sistema de expressão heteróloga de proteínas em *Pichia pastoris* incluem: (o crescimento a alta densidade celular (>500 OD600), uma via eucariótica de secreção capaz de promover modificações pós-traducionais, tais como a formação de pontes dissulfeto e O- e N-glicosilação, expressão de proteínas em altos níveis, tanto intracelular como extracelular, apresenta um promotor forte induzível que dirige a expressão das proteínas heterólogas (AOX), pode aumentar a expressão em até 100 vezes quando na presença do indutor metanol, depois de estabelecidas as condições de cultivo em pequena escala, o escalonamento não necessita de grandes modificações, existência de linhagens protease deficientes que secretam baixas quantidades de proteínas endógenas no meio de crescimento facilitando as etapas seguintes de purificação (TACHOPP *et al.*, 1987; CEREGHINO *et al.*, 2002; DALY; HEARN, 2005).

A utilização de promotores constitutivos é atrativa para a produção de proteínas em larga escala, tendo a vantagem de não requererem agentes indutores e permitem a purificação da proteína recombinante sob condições de fermentação contínua. Porém, existe a desvantagem de não poderem ser utilizados para a expressão de genes cujos produtos são tóxicos (ARRUDA, 2008).

3.3 Vetores para expressão heteróloga em leveduras

Quanto aos vetores para expressão heteróloga de proteínas em *P. pastoris*, estes foram desenvolvidos apresentando algumas características em comum no cassete de expressão: sequência promotora, que pode ser para expressão induzida ou constitutiva, sítios de restrição únicos para inserção do gene de interesse, sequência de terminação transcricional do gene *AOX1* de *P. pastoris* que direciona um correto processamento e poliadenilação dos mRNA.

Alguns vetores contem, ainda, sequencias flanqueadoras do gene *AOXI* utilizadas para direcionar a integração do cassete de expressão por recombinação homologa neste *locus* (CREGG *et al.*, 2000).

Outros vetores de expressão heteróloga para *P. pastoris* possuem, também, características especiais para funções especializadas, como a secreção de proteínas heterólogas. Neste caso, após a região promotora existe uma sequencia sinal responsável pela internalização da proteína expressa no reticulo endoplasmático onde a mesma é direcionada para a via de secreção. As sequencias sinais mais utilizadas são derivadas do fator de acasalamento α (α -MF) de *S. cerevisiae* ou do gene *PHO1* (fosfatase ácida) de *P. pastoris*. As sequencias para secreção podem ser substituídas por sequencias sinais nativas da proteína a ser expressa, fator que pode otimizar a secreção de proteínas heterólogas em alguns casos (manual *Pichia Expression Kit* – Invitrogen). Um dos vetores mais utilizados é o plasmídeo pPIC9 (Invitrogen), que possui como sinal de secreção o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* (TORRES; MORAES, 2000).

Outra característica que pode ser encontrada em vetores de expressão é sequencias utilizada para facilitar a detecção ou purificação da proteína expressa, como as sequencias His6 e *myc*. Estas duas “etiquetas” (*tags*) permitem a detecção da proteína expressa usando anticorpos específicos para estas duas sequencias e, no caso do His6, a purificação por cromatografia de afinidade em resinas Ni-NTA (ARRUDA, 2008).

Também são encontrados vetores de expressão com replicação autônoma em *E. coli* e *P. pastoris* e que expressam proteínas recombinantes em ambos os sistemas, o que permite economia na expressão e purificação de proteínas em diferentes hospedeiros sem a necessidade de subclonagens (LUEKING *et al.*, 2000).

Segundo Higgi & Cregg (1998), o sistema de expressão em *P. pastoris* é um dos mais produtivos sistemas de expressão eucarióticos existindo uma probabilidade de 50 a 75% de expressar uma proteína de interesse em *P. pastoris* em níveis razoáveis. Para estes autores o mais importante é conseguir expressar proteína em qualquer nível, pois existem parâmetros bem definidos que possibilitam a otimização da expressão de proteínas heterólogas neste sistema.

3.4 Genes *PR-5*

A família de genes PR (*Pathogenesis Related*) -5 codificam proteínas relacionadas com a patogenicidade de plantas, ou seja, sob situações de doenças causadas por patógenos

virais, fúngicos ou bacterianos. Proteínas PR-5 de plantas têm sido encontradas como isoformas neutras, ácidas e básicas, todas elas ricas em cisteína, na região da proteína madura, contendo ainda em sua estrutura primária um peptídeo sinal e, em algumas isoformas, um peptídeo vacuolar carboxi-terminal (CAMPOS et al., 2002, CAMPOS et al., 2007).

Atualmente, demonstra-se atividade antifúngica e antibacteriana para muitas proteínas PR. Estas proteínas estão classificadas em 17 grupos, variando de PR-1 até PR-17, de acordo com as características de cada uma. Dentre essas proteínas PR, diferentes atividades têm sido descritas para membros da família de proteínas PR-5 (Singh et al., 1987; LaRosa et al., 1989; Neale et al., 1990; Salzman et al., 1998; Newton & Duman, 2000); As proteínas deste grupo são estruturalmente diversas e aparentemente onipresentes em plantas (Ruiz-Mendrano *et al.*, 1992). A família inclui a taumatina e a osmotina (Singh *et al.*, 1991).

Ainda não está muito bem esclarecido como proteínas PR-5 exercem atividade antifúngica demonstrada pela inibição *in vitro* do crescimento de hifas e germinação de esporos, lise de esporos e redução na viabilidade de esporos germinados. Tem sido proposto que elas podem agir pela permeabilização das membranas de fungos ou interação com receptores de membranas de fungos (Newton & Duman, 2000; Abad et al., 1996; Anzlovar et al., 1998; Yun et al., 1997; Bray et al., 2000; Ibeas et al., 2000). Além disso, já foi demonstrado que um número de proteínas PR-5 se ligam a β -1,3-glucana e tem atividade detectável *in vitro* de β -1,3-glucanase (Grenier et al., 1999; Menu-Bouaouiche et al., 2003). E, ainda, uma osmotina de fumo induz apoptose em *Saccharomyces cerevisiae* (Narasimhan et al., 2001; Almeida et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas deste trabalho foram realizadas nos Laboratórios de Biologia Molecular e Ecologia do CES/UFCG (LBIotec), Cuité PB, em colaboração com o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Cerrados, Planaltina DF. Os protocolos utilizados para cada etapa foram adaptados com base em Oliveira *et al*, 2007. E a síntese geral das etapas realizadas está descrita na figura 1.

Figura 1. Síntese geral das etapas realizadas.

1. Obtenção do inserto gênico *PaOLP* mutado para recombinação

2. Obtenção do vetor pPICZ α -A para recombinação

3. Obtenção do DNA recombinante pPICZ α -A ligado ao *PaOLP* mutado

4. Obtenção de clones recombinantes contendo o vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado

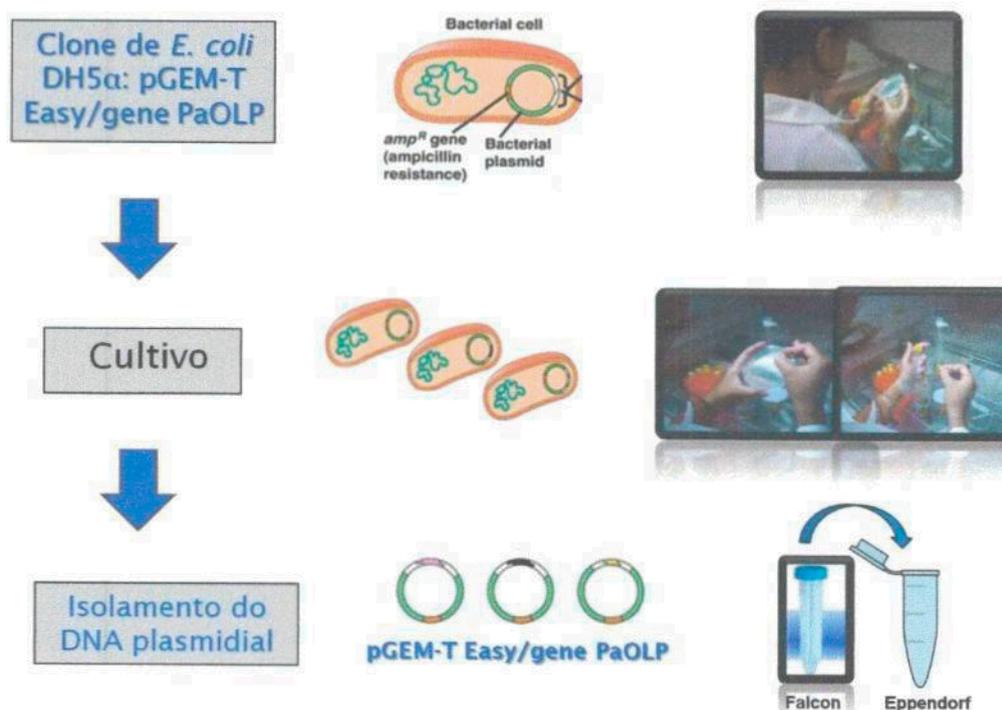
5. Validação de clones recombinantes conduzindo o vetor pPICZ α -A-*PaOLP* mutado, por meio de PCR e digestão.

Fonte: Dados desta pesquisa.

4.1 Obtenção do inserto gênico *PaOLP* mutado para recombinação

4.1.1 Purificação do vetor pGEM-T Easy conduzindo o gene *PaOLP* a partir de *E. coli*

Figura 2. Síntese das etapas realizadas para a purificação do vetor pGEM-T Easy conduzindo o gene *PaOLP* a partir de *E. coli*



Fonte: Dados desta pesquisa.

A bactéria *Escherichia coli* cepa DH5α conduzindo o vetor recombinante pGEM-T Easy ligado ao gene *PaOLP* foi cultivada por semeadura em placa de Petri contendo o meio de cultura LB Agar (Luria Bertani, Caseína Hidrolisada 10 g/L; Extrato de Levedura 5 g/L; Cloreto de Sódio 10 g/L; Ágar 15 g/L; pH 7,5) e 100 µg/mL do antibiótico ampicilina, durante 16 – 22 horas a 37 °C em câmara de crescimento tipo B.O.D. A partir desta placa, colônias puras foram inoculadas em tubos de polipropileno do tipo falcon de 15 mL contendo 5 mL de LB Amp líquido e crescidas durante 16 – 22 horas a 37 °C sob agitação de 350 r.p.m.

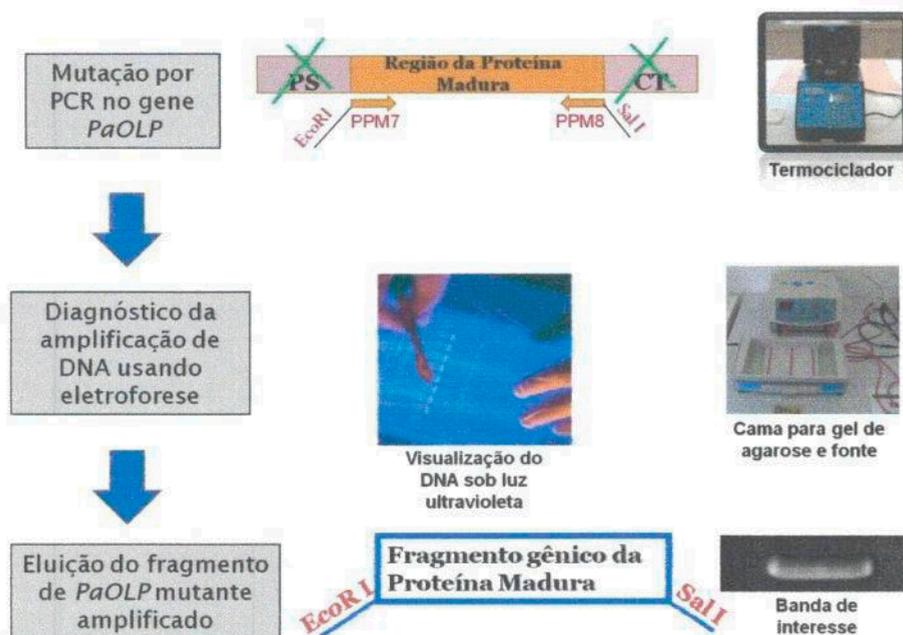
O isolamento do DNA plasmidial foi realizado a partir dos 5 mL da colônia previamente cultivada, como segue: as bactérias foram concentradas em tubos de eppendorf (1,5 mL) por centrifugação de 2 minutos a 12.000 r.p.m. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de bactéria foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0) e 200 µL de solução II (0,2 M NaOH; 1 % SDS – Sódio

Dodecil Sulfato), e incubado no gelo por 5 min. Em seguida, 150 μL de solução III (3 M K; 5 M Ac) foi adicionado ao tubo, incubando-o em gelo por mais 5 min., e posteriormente centrifugado a 10.000 r.p.m./5 min. O sobrenadante foi coletado e o DNA plasmidial foi precipitado usando 450 μL de isopropanol e coletado por centrifugação a 10.000 r.p.m./5 min. O pellet seco foi ressuscitado em 150 μL de TE e o DNA plasmidial foi precipitado novamente usando 10 % de acetato de sódio 3 M (v/v) e 450 μL de etanol absoluto gelado e, depois, centrifugado a 10.000 r.p.m./10 min. O pellet de DNA plasmidial foi lavado duas vezes com 500 μL de Etanol 70 % (v/v), seco, ressuscitado em 100 μL de TE e tratado com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da enzima Ribonuclease A, durante 30 min. A 37 °C, em banho-maria. Para eliminar a enzima, o DNA foi submetido à nova precipitação em Acetato de Sódio e etanol e, o pellet foi ressuscitado em 40 μL de TE e armazenado a -20 °C.

O DNA plasmidial isolado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) contendo 5 μL de brometo de etídeo em tampão T.A.E. (40 mM de Tris Base; 20 mM de Ácido acético glacial e 1 mM de EDTA pH 7,5). O DNA migrou no gel sob uma corrente elétrica com voltagem de 80 V/30 min. e, posteriormente, visualizado sob fluorescência do Brometo de Etídeo em contato com a luz ultravioleta e foto documentado. O DNA plasmidial foi quantificado por meio de espectrofotômetro do tipo NanoDrop luz U.V (comprimento de onda) e armazenado a -20 °C até realizar a etapa de digestão enzimática.

4.1.2 Mutação por PCR no gene *PaOLP* para produzir proteína madura mutante

Figura 3. Síntese das etapas realizadas para a mutação PCR no gene *PaOLP* para produzir proteína madura mutante.



Fonte: Dados desta pesquisa.

Um par de oligonucleotídeos foi desenhado dentro da sequência do gene *PaOLP*, localizados nas extremidades que flanqueiam as regiões codantes dos peptídeos sinal e carboxi-terminal para posteriormente efetuar a amplificação do fragmento por procedimento de PCR, de forma a obter mais quantidade de DNA e consequentemente aumentar a probabilidade de união ao vetor.

A PCR foi realizada para amplificação do gene *PaOLP*, usando o DNA plasmidial como molde. A reação foi realizada em volume de 25 μ L utilizando tampão da Taq IX; 2 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTPs; 0,25 mM de cada um dos primers Forward PPM7 (direção 5' > 3') e o Reverse PPM8 (direção 3' > 5'); 10 ng/ μ L de DNA, Taq DNA Polimerase 0,4 U (Fermentas). As condições térmicas da reação foram uma etapa para o processo inicial de desnaturação a 95 °C/2min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95° C/30seg. para separação das fitas do DNA, anelamento a 35 °C/45 seg., para pareamento dos primers com DNA molde e extensão a 72 °C/1min, para a polimerização do fragmento de DNA amplificado. Por fim, uma etapa de extensão final a 72 °C/7min. Re-PCR foram realizadas nas mesmas condições, exceto pela substituição da amostra de DNA por uma alíquota de 2 μ L da PCR, visando aumentar a quantidade de amplicons.

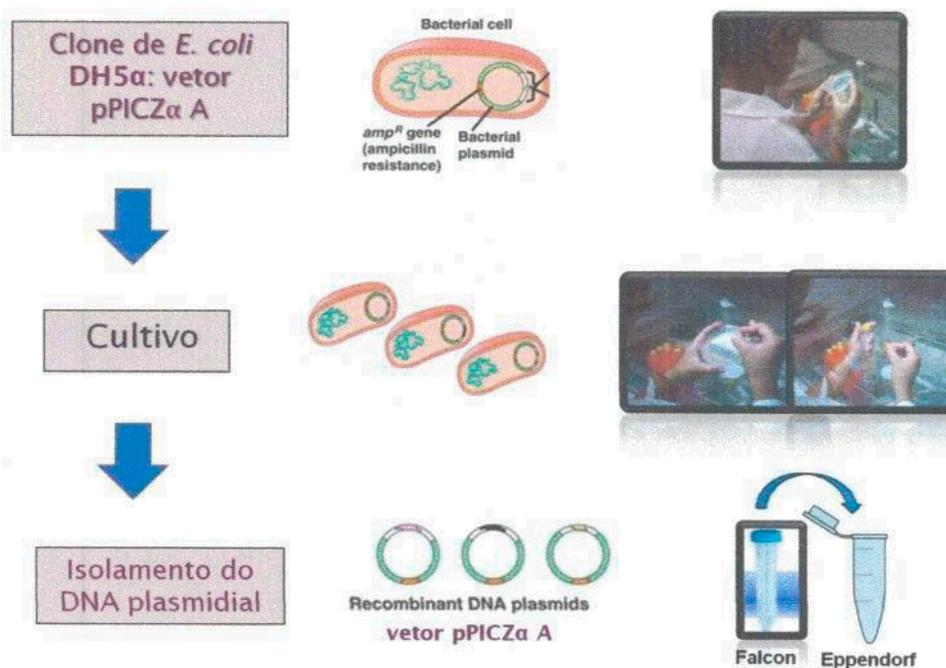
O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) contendo 5 μ L de brometo de etídeo em tampão T.A.E. (40 mM de Tris Base; 20 mM de Ácido acético glacial e 1 mM de EDTA pH 7,5), sob condições descritas no item anterior. Os fragmentos amplificados foram foto documentado e eluídos.

A eluição do gene *PaOLP* a partir de gel de agarose foi realizada de acordo com o protocolo do Kit QIAquick Gel Extraction (QiaGen). Onde, para cada 100 mg de banda de agarose cortada utilizou-se 300 μ L de tampão Qg – Solubilization Buffer. Em seguida, foi incubado a 50 °C em banho Maria por 10 min. E misturado no vortex de 2 – 3 min. Foi adicionado 300 μ L de isopropanol filtrando em microcoluna, por centrifugação a 10.000 r.p.m por 1 min. Posteriormente, foram adicionado 100 μ L do tampão Qg e centrifugado por mais 1 min. A 10.000 r.p.m. Após a centrifugação, foi adicionado 750 μ L do tampão PE. Em seguida, o DNA foi eluído da coluna usando 10 μ L de eluente. O eluído foi quantificado em espectrofotômetro do tipo Nanodrop luz U.V (comprimento de onda) e armazenado a -20 °C até realizar a etapa de digestão enzimática.

4.2 Obtenção do vetor pPICZ α -A para recombinação

4.2.1 Purificação do vetor pPICZ α -A a partir de *E. coli*

Figura 4. Síntese das etapas realizadas para a purificação do vetor pPICZ α -A a partir de *E. coli*.



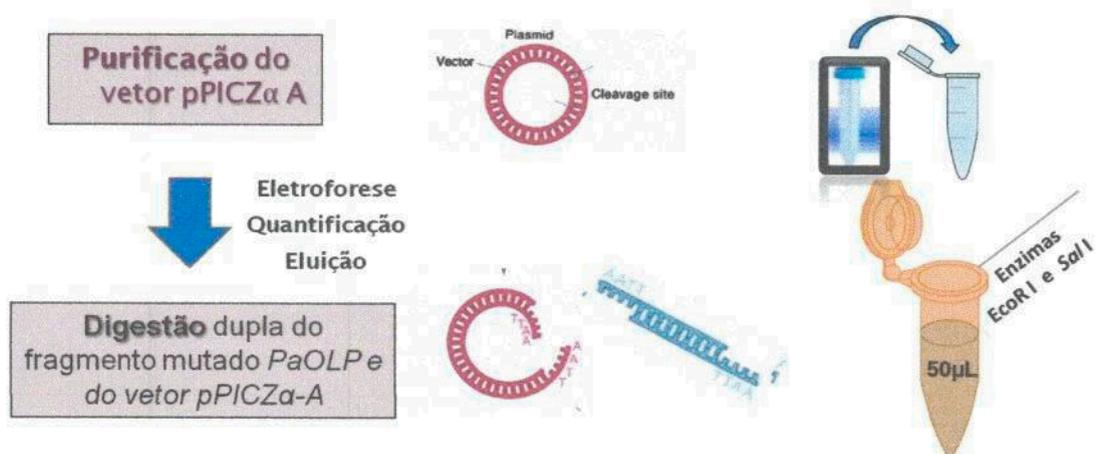
Fonte: Dados desta pesquisa.

Foi realizado o cultivo da bactéria *Escherichia coli* cepa DH5 α conduzindo o vetor pPICZ α -A (Invitrogen) semeando-a em placa de Petri contendo o meio de cultura *Low Salt* agar (Caseína Hidrolisada 7,5 g/L; Extrato de Levedura 3,75 g/L; Cloreto de Sódio 7,5 g/L; Ágar 11,25 g/L; pH 7,5) e 25 μ g/mL de Zeocina, durante 16 – 22 hrs a 37 °C em câmara de crescimento tipo B.O.D. A partir desta placa, colônias puras foram inoculadas em tubos de polipropileno do tipo falcon de 15 mL contendo 10 mL do meio *Low Salt* líquido e crescidas *overnight* (16 – 22 horas) a 37 °C sob agitação de 350 r.p.m. O vetor pPICZ α -A foi purificado e diagnosticado por eletroforese utilizando os protocolos descritos anteriormente. O eluido foi quantificado por meio de espectrofotômetro do tipo NanoDrop luz U.V (comprimento de onda) e armazenado a - 20 °C até digestão com enzimas de restrição.

4.3 Obtenção do DNA recombinante pPICZ α -A ligado ao *PaOLP* mutado

4.3.1 Digestão do fragmento gênico mutado *PaOLP* e do vetor pPICZ α -A

Figura 5. Síntese das etapas realizadas para a Digestão do fragmento gênico mutado *PaOLP* e do vetor pPICZ α -A



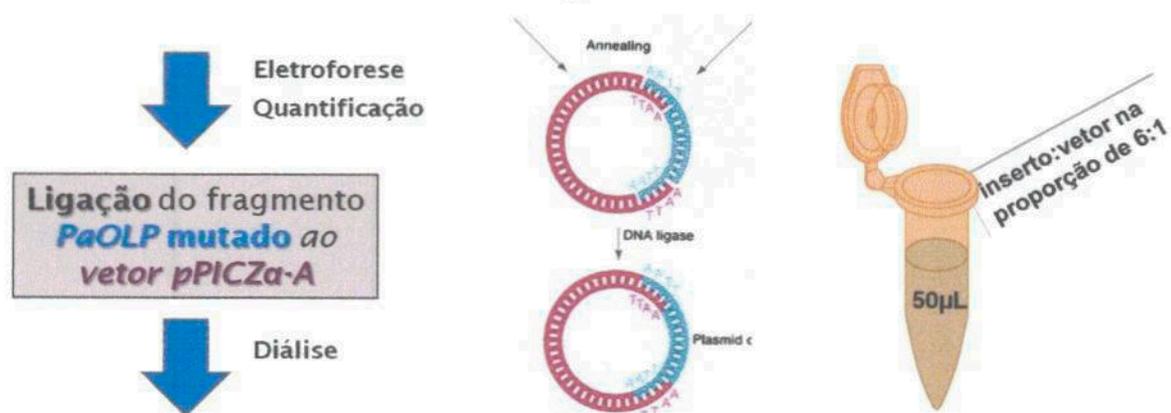
Fonte: Dados desta pesquisa.

O fragmento eluído do *PaOLP* mutado e o vetor pPICZ α -A foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Sal* I, para gerar extremidades compatíveis para a ligação posicional. Para cada DNA, uma reação de digestão dupla foi preparada, em tubos separados, a um volume final de 50 μ L contendo amostra (125 ng de inserto; 100 ng de vetor), 1 X de tampão de reação NEB 3, 10 U de *EcoR* I, 10 U de *Sal* I, 5 μ g de BSA. A reação foi realizada a 37 °C/2 horas em banho-maria. Produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) a 80 V/1h. Fragmentos de interesse foram cortados e eluídos do gel

de agarose, conforme descrito anteriormente, quantificados e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem utilizados em reação de ligação.

4.3.2 Ligação do fragmento gênico mutado *PaOLP* ao vetor pPICZ α -A

Figura 6. Síntese das etapas realizadas para ligação do fragmento gênico mutado *PaOLP* ao vetor pPICZ α -A



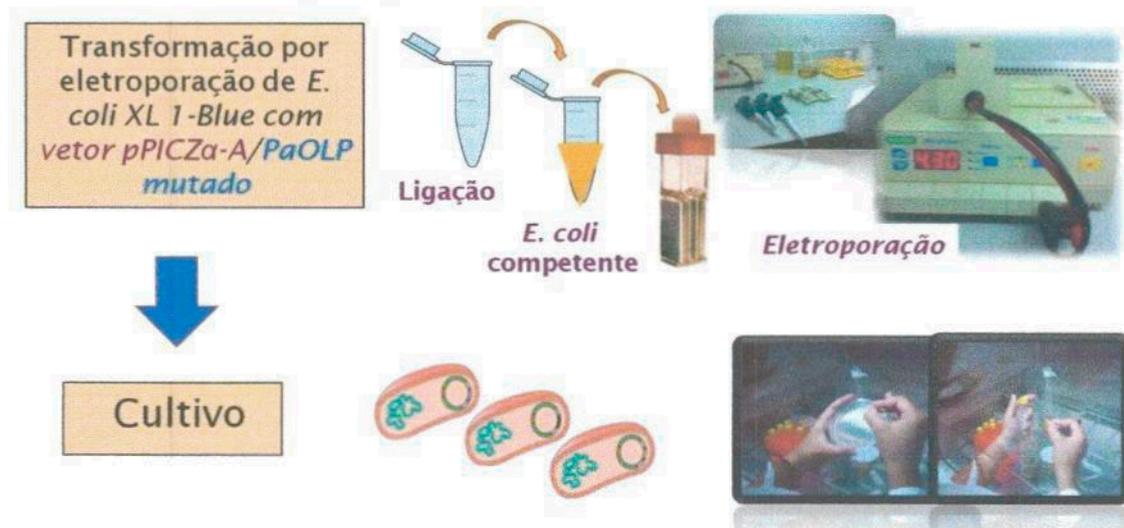
Fonte: Dados desta pesquisa.

Os fragmentos digeridos e eluídos, *PaOLP* mutado e vetor pPICZ α -A, foram ligados em reação de ligação com volume final de $10\text{ }\mu\text{L}$, contendo inserto:vetor na proporção de 6:1, 1 X de tampão da enzima e da enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ /overnight e, posteriormente, dialisada contra água estéril. O volume de amostra dialisada foi seco e ressuspenso para $2\text{ }\mu\text{L}$, os quais foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem usados para transformação.

4.4 Obtenção de clones recombinantes contendo o vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado

4.4.1 Transformação por eletroporação de *E. coli* XL 1-Blue com vetor pPICZ α -A/*PaOLP* mutado

Figura 7. Síntese das etapas realizadas para a transformação por eletroporação de *E. coli* XL 1-Blue com vetor pPICZ α -A/*PaOLP* mutado



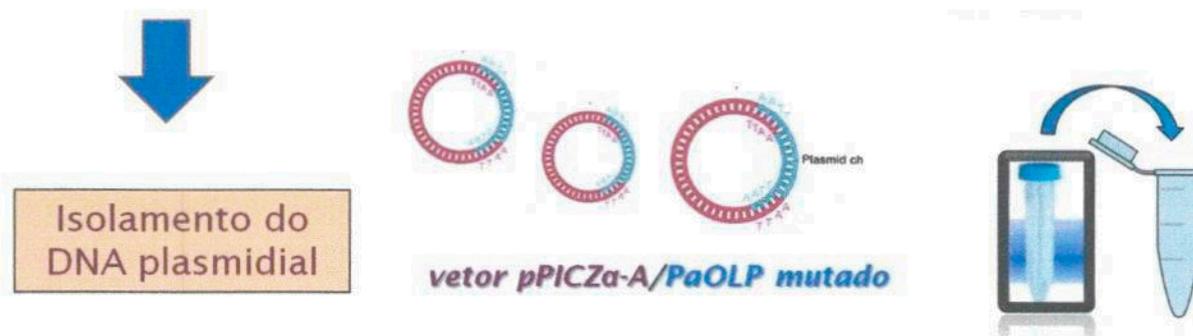
Fonte: Dados desta pesquisa.

O vetor recombinante pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado foi inserido em células competentes de *E. coli* linhagem XL-1 Blue, via eletroporação, visando à obtenção em grande quantidade de DNA plasmidial para inserção em *P. pastoris*. Sob condições estéreis, em um microtubo contendo 40 μ L de células competentes foram adicionados 2 μ L da ligação descrita anteriormente. O volume foi misturado e transferido para cuvetas de eletroporação estéril e o vetor foi inserido dentro das células via pulso elétrico usando um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser™. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura *Low Salt* (Caseína Hidrolisada 7,5 g/L; Extrato de Levedura 3,75 g/L; Cloreto de Sódio 7,5 g/L pH 7,5) e incubadas durante 1 hora, a 37 °C. Após esse período, as células foram plaqueadas em placas de Petri com meio *Low Salt Agar*, contendo 25 μ g/mL de Zeocina e incubadas em estufa do tipo B.O.D a 37 °C, durante aproximadamente 16 horas. Após este período, os clones transformantes individuais resistentes a Zeocina foram cultivados em 5 mL de líquido *Low Salt Agar*, contendo 25 μ g/mL de Zeocina, a 37 °C, durante aproximadamente 16 horas em incubadora do tipo Shaker, sob 150 r.p.m. Uma

alíquota de 850 μL da cultura foi armazenada para conservação em glicerol puro, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o restante usado para isolamento do DNA plasmidial.

4.4.2 Purificação do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado a partir de *E. coli*.

Figura 8. Síntese das etapas realizadas para a purificação do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado a partir de *E. coli*.

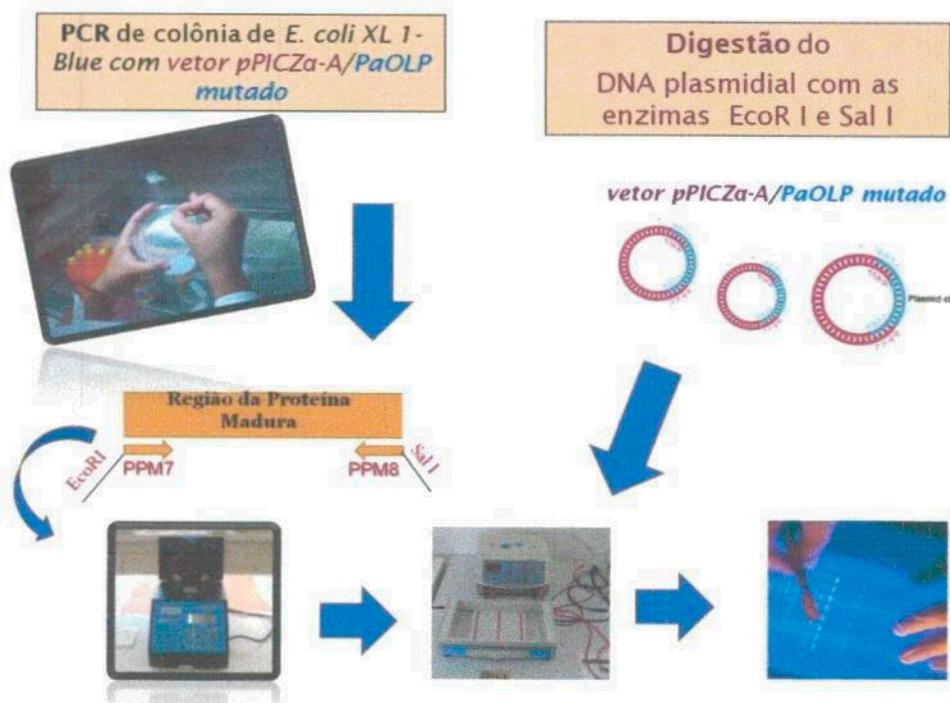


Fonte: Dados desta pesquisa.

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o GEN ELUTE™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma). Para início do procedimento foi concentrado a célula por centrifugação por 5 minutos a 14.000 r.p.m. Em seguida, a célula foi ressuspensa em 200 μL de ressuspensão com RNase A e para lise da célula foram adicionados 200 μL da solução de lise invertendo o tubo de 6 – 8 vezes levemente, durante 1-5 minutos. Na etapa de neutralização o DNA presente no lisado celular foi precipitado em 350 μL da solução de neutralização, invertida de 4 – 6 vezes e centrifugada por 10 minutos a 14.000 r.p.m. A coluna foi preparada pela adição de 500 μL da solução de preparo de coluna, centrifugado por 1 minuto a 14.000 r.p.m e o líquido foi descartado. O lisado claro ou sobrenadante foi transferido para esta coluna e o DNA foi centrifugado por 1 minuto a 14.000 r.p.m. O DNA ligado à coluna foi lavado usando 750 μL da solução de lavagem contendo etanol e centrifugado por 1 min./14.000 r.p.m. Por fim, o DNA foi eluído da coluna para novo tubo de 1,5 mL usando 100 μL de H₂O destilada autoclavada, após centrifugação por 1 min./14.000 r.p.m e, em seguida, armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5 Confirmação da presença do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado

Figura 9. Síntese das etapas realizadas para a confirmação da presença do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado



Fonte: Dados desta pesquisa.

A presença do vetor pPICZ α -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado após purificação do DNA plasmidial a partir das células de *E. coli* linhagem XL-1 Blue foi verificada por digestão com as enzimas de restrição usadas para gerar as extremidades clonáveis. O DNA plasmidial isolado a partir de clones recombinantes foi digerido em uma reação com volume final de 20 μ L, contendo 3 μ g de DNA, 1X de tampão NE 3, 6 U de *EcoR* I, 6 U de *Sal* I e 2 μ g de BSA, incubada por 16 horas a 37 $^{\circ}$ C. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v). Além da digestão do DNA plasmidial recombinante, a presença do gene *PaOLP* mutado em clones recombinantes resistentes a zeocina também foi verificada por PCR, usando uma pequena quantidade da colônia como molde. A reação foi realizada em volume de 25 μ L utilizando tampão da Taq 10 X; 50 mM de MgCl₂; 10 mM de dNTPs; 10 mM de cada um dos primers Forward PPM7 (direção 5'-3') e a Reverse PPM8 (direção 3'-5'); Taq DNA Polimerase 5 U/ μ L.

5 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste trabalho desenvolveu-se uma estratégia para a expressão da proteína PaOLP como proteína mutante de fusão direcionadas para o meio extracelular de células de *P. pastoris*, a partir da subclonagem do gene *PaOLP* do vetor de clonagem pGEM-T Easy para o vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZaA, clonado em células de *Escherichia coli* XL-1 Blue. As etapas desenvolvidas representam fundamentais na direção da determinação da potencial atividade antifúngica da proteína PaOLP.

O gene *PaOLP* faz parte da família de genes do tipo PR-5 e foi isolado recentemente no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité, a partir do genoma da planta *Physalis angulata* (Figura 10), presente no Horto Florestal do CES/UFCG, em Cuité PB.

Figura 10. Planta *Physalis angulata*, presente no Horto Florestal do CES/UFCG. Cuité PB, 2011.



Fonte: Rayane Alexandre Abreu.

5.1 Elaboração de estratégia de expressão heteróloga de PaOLP em *P. pastoris*

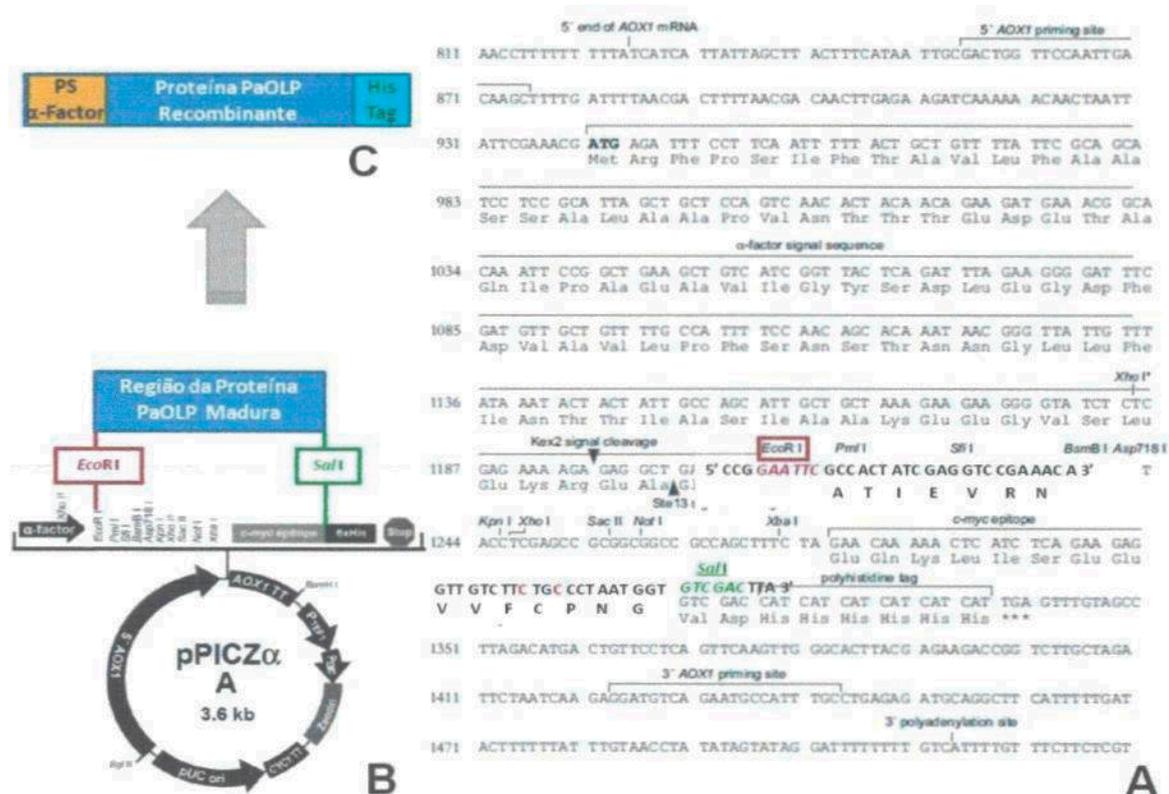
Em virtude de o gene ter sido isolado de um organismo eucarioto, a primeira etapa deste trabalho foi elaborar uma estratégia para a subclonagem do gene *PR-5 PaOLP*, previamente clonado em vetor pGEM-T-Easy, para expressar a proteína PaOLP de *Physalis*

angulata no sistema heterólogo de expressão em células eucarióticas. A levedura *Pichia pastoris* e o vetor pPICZ α -A foram selecionados para obtenção da proteína expressa madura mutante de fusão, de modo a se esquivar de eventuais processamentos pós-traducionais da proteína nativa e utilizar as facilidades de sequências sinais da própria levedura. O mapa da construção pPICZ α -A/*PaOLP* mutante de fusão para expressão em *Pichia pastoris* está esquematizado na Figura 11.

A proteína PaOLP recombinante será produzida em *Pichia pastoris* na forma madura, contendo um peptídeo sinal de exportação de levedura (α factor) e uma extensão de seis resíduos de histidina para facilitar a purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados. A estratégia elaborada para gerar mutações por deleção no gene *PaOLP* envolveu a eliminação dos peptídeos amino- e carboxi-terminal por meio da técnica PCR (Reações em Cadeia da Polimerase) com *primers* desenhados contendo os sítios de restrição para *EcoR* I e *Sal* I, para clonagem posicional no vetor pPICZ α -A, os quais foram denominados PPM7 e PPM8, respectivamente (Figura 11).

O vetor pPICZ α -A disponibiliza a presença da sequência do peptídeo sinal de uma proteína de levedura, posicionado antes do sítio de clonagem do fragmento gênico da proteína PaOLP madura. Portanto, o fator α representará a região amino-terminal da proteína recombinante, que será responsável pelo direcionamento da proteína PaOLP expressa para o meio extracelular. Por outro lado, a calda de histidina estará posicionada na região carboxi-terminal da proteína PaOLP expressa.

Figura 11. Mapa da construção pPICZ α -A/*PaOLP* mutante para expressão em *Pichia pastoris* (A e B). Representação esquemática da proteína *PaOLP* recombinante. As sequências dos oligonucleotídeos PPM7 e PPM8 estão descritas em A, os quais estão posicionados nas bordas que flanqueiam o fragmento gênico que codifica a proteína *PaOLP* madura.

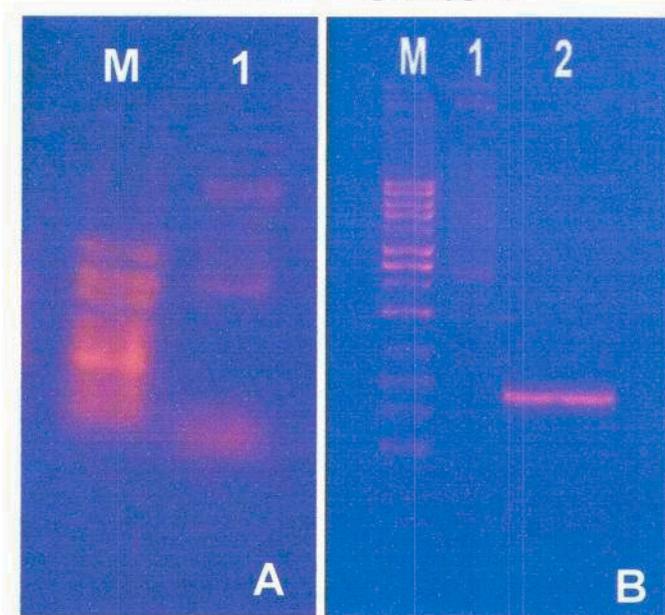


Fonte: Dados desta pesquisa.

5.2 Produção do inserto gênico *PaOLP* mutado ligado ao vetor pPICZ α -A clonado em *E. coli*.

Para obtenção do gene *PR-5 PaOLP* em larga escala, a bactéria *Escherichia coli* cepa DH5- α , contendo o vetor pGEM-T-Easy conduzindo o gene *PaOLP* completo, foi cultivada em meio seletivo líquido para a multiplicação do vetor por divisões celulares a partir de uma colônia pura, previamente sequenciada. O DNA plasmidial pGEM-T-Easy-*PaOLP* completo foi posteriormente isolado (Figura 12A.1). Dessa mesma forma, o vetor pPICZ α -A também foi isolado a partir da cepa DH5 α de *E. coli* com a quantidade e qualidade desejada em ambos os casos (Figura 12B.1).

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. A) DNA plasmidial pGEM-T-Easy contendo o gene *PaOLP* completo isolado de *Escherichia coli* cepa DH5- α . B) DNA plasmidial do vetor pPICZ α A purificado da cepa DH5 α de *E. coli* (1) e Fragmento do gene *PaOLP* mutado amplificado com os oligonucleotídeos PPM7 e PPM8 (2). (M) Marcador de peso molecular 300bp (Axygen).



Fonte: Dados desta pesquisa.

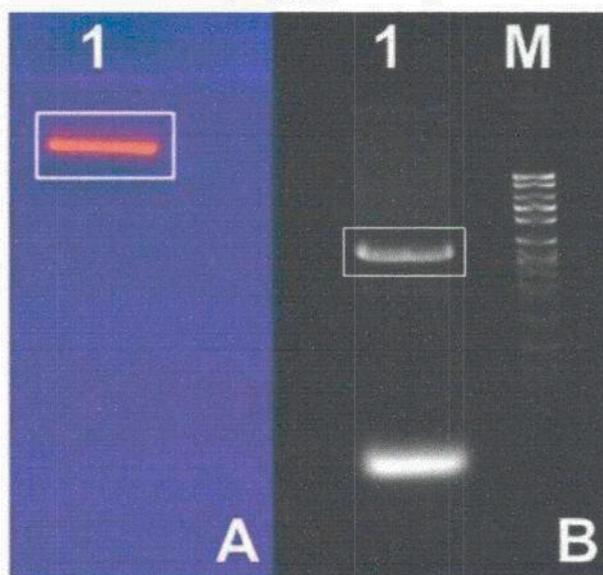
Como é possível observar a partir da Figura 12A.1, a visualização do plasmídeo pGEM-T Easy-PaOLP completo purificado após eletroforese em gel de agarose revelou três bandas. Esta observação é comum, uma vez que o DNA plasmidial, por ser DNA circular, adquire conformações que são visualizadas como três bandas em gel de agarose, após migração por eletroforese, as quais representam as suas formas não espiraladas (a banda maior, superior), espiraladas (banda do meio) e superespiraladas (menores, abaixo). Da mesma forma, a migração do DNA plasmidial pPICZ α -A também resultou em mais de uma banda, sendo que neste caso a intensidade da fluorescência do brometo de etídeo sob luz ultravioleta foi fraca, indicando baixa quantidade de DNA plasmidial aplicado no gel (Figura 12B.1).

Para obtenção do inserto da PaOLP mutada, o DNA plasmidial pGEM-T Easy-PaOLP foi usado como molde para amplificação por PCR apenas do fragmento gênico que codifica a região da proteína madura, a qual produziu fragmentos únicos de tamanho esperado (indicado pelo quadrado) e em quantidade suficiente para as etapas subsequentes da subclonagem para o

vetor de expressão (Figura 12B.2). Por esta razão, esse fragmento amplificado foi eluído do gel de agarose.

Para a subclonagem do segmento de DNA que codifica a região da proteína PaOLP madura em vetor pPICZ α -A, tanto os amplicons eluídos quanto o DNA plasmidial pPICZ α -A foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas *EcoR* I e *Sal* I (Figura 13) e os produtos da digestão de tamanhos esperados, indicado pelo quadrado, foram eluídos de gel de agarose 0,8 % (p/v).

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 0.8% (p/v), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta, de produtos das digestões com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Sal* I. A) Fragmento gênico *PaOLP* maduro eluído e digerido (1). B) Vetor pPICZ α -A digerido, a seta indica o fragmento linearizado de interesse (1). M, marcador de peso molecular 300bp (Axygen).



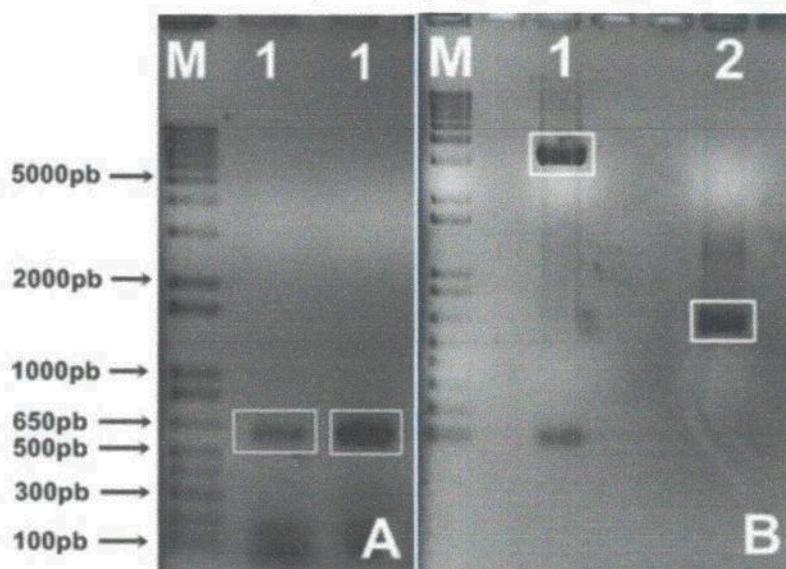
Fonte: Dados desta pesquisa

Os fragmentos inserto, *PaOLP* mutado e vetor pPICZ α -A possuindo extremidades clonáveis ou apropriadas para recombinação, isto é, abertas pelas enzimas de restrição apropriadas para clonagem posicional, foram ligadas. Esse vetor, denominado pPICZ α -A-*PaOLP* mutado foi clonado em células de *E. coli* cepa XL-1 Blue para multiplicação do vetor recombinante. Como resultado, apenas um clone contendo o vetor pPICZ α -A conduzindo o fragmento gênico *PaOLP* mutado foi selecionado na resistência ao agente seletivo zeocina.

5.3 Validação do clone recombinante contendo o vetor pPICZ α -A-*PaOLP* mutado

A presença e especificidade do vetor contendo o pPICZ α -A/*PaOLP* mutado dentro do clone resistente a zeocina foi comprovada por digestão do referido vetor com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Sal* I, após purificação a partir de *E. coli* (Figura 14B) e por PCR de colônia, usando os primers específicos PPM7 e PPM8 (Figura 14A). Como é possível notar a partir da Figura 14B.1, o vetor pPICZ α -A/*PaOLP* mutado não digerido apresentou padrão de banda relaxado, de peso molecular de tamanho esperado, com banda acima de 3 Kb. Por outro lado, a presença de um fragmento liberado após digestão possui o tamanho esperado do inserto gênico *PaOLP* mutado, entre 500 e 600 pb (Figura 14B.2), o qual foi também observado nas duas repetições por amplificação por PCR de colônia (Figura 14A). Estes dados são indicativos de que a clonagem foi realizada, no entanto o DNA plasmidial desse vetor foi submetido para sequenciamento, para confirmação dos resultados.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. A) Produtos de PCR de colônia contendo o pPICZ α -A/*PaOLP* mutado usando os primers PPM7 e PPM8 (1). B) DNA plasmidial pPICZ α -A/*PaOLP* mutado isolado de *Escherichia coli* cepa XL-1 Blue, não digerido (1) e digerido (2) com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Sal* I. (M) Marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen).



Fonte: Dados desta pesquisa

A obtenção do DNA plasmidial da construção pPICZ α -A/PaOLP mutado clonado em bactéria representa uma etapa fundamental para alcançar as etapas subsequentes de expressão, purificação e teste da atividade antifúngica. Para obter a expressão em levedura, células competentes de *Pichia pastoris* foram produzidas, nas quais o vetor pPICZ α -A/PaOLP mutado será inserido por transformação. Devido a sua potencial atividade antifúngica, a produção da proteína PaOLP mutada de fusão em levedura deverá ser otimizada para níveis não tóxicos, além da sua exportação para o meio apoplástico. A proteína assim produzida terá sua atividade testada inicialmente contra o crescimento de fungos e oomicetos de interesse agrônômico para a região nordeste e para o país.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- Todas as etapas da subclonagem do gene *PaOLP* do vetor de clonagem pGEM-T-Easy para o vetor de expressão em *Pichia pastoris* pPICZ α -A foram realizadas, exceto o sequenciamento.

- O gene *PaOLP* mutado por PCR, para deletar as regiões codificadoras dos peptídeos sinal e carboxi-terminal, está clonado em células de *Escherichia coli* cepa XL-1 Blue, resistentes a zeocina e confirmadas por PCR de colônia, usando os primers PPM7 e PPM8, e por digestão com enzimas apropriadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estratégia de subclonagem realizada neste trabalho deve levar a expressão de uma proteína PaOLP recombinante madura, com direcionamento para o meio extracelular de células de leveduras *Pichia pastoris* e com uma calda de histidina apropriada para a purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados. A introdução do vetor pPICZa-A conduzindo o gene *PaOLP* mutado em células competentes de *Pichia pastoris*, e posterior expressão gênica para a produção da proteína PaOLP madura de fusão em larga escala, são os assuntos atuais desta pesquisa.

Quanto à busca do conhecimento, esta pode ser adquirida de maneiras distintas e a pesquisa científica tem contribuído bastante nesse sentido. No caso do licenciado em Ciências Biológicas esse conceito vai mais além, o conhecimento científico vem contribuir para a formação do profissional que, de alguma forma, está direcionado exclusivamente a educação, proporcionando desenvolver habilidades ligadas ao processo científico, que inclui a expectativa frente às novidades biotecnológicas. Sendo assim, sua revolução atingiu fortemente o universo acadêmico. Além disso, sendo a genética uma área atual e de difícil compreensão e domínio por parte dos docentes e discentes de Ensino Médio e Superior, a manipulação genética aqui realizada e estudada, contribuíram significativamente com a formação nesta área de ponta.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, Andreilisse. **Utilização do promotor de gene *PGK1* de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga.** 2008.
- BANEYX, F. **Recombinat protein expression in *Escherichia coli*.** *Curr Opin Biotechnol.* Oct; 10 (5): 411-21; 1999.
- CAMPOS, M. A.; RIBEIRO, S. G.; RIGDEN, D. J.; MONTE, D. C.; GROSSI DE SÁ, M. F. Putative pathogenesis-related genes within *Solanum nigrum* var. *americanum* genome: Isolation of two genes coding for PR5-like proteins, phylogenetic and sequence analysis. ***Physiological and Molecular Plant Pathology*** v. 61, p. 205-216, 2002.
- CAMPOS, M. A., ROSA, D. D., TEIXEIRA, J. É. C., TARGON, M. L. P. N., SOUZA, A. A., PAIVA, L. V., STACH-MACHADO, D. R., MACHADO, M. A. PR gene families of citrus: Their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. ***Genetics and Molecular Biology***. v. 30, n.3, p 917-930, 2007.
- CAMPOS, M. A., SILVA, M. S., MAGALHÃES, C. P., RIBEIRO, S. G., SARTO, R. P. D., VIEIRA, E. A., GROSSI DE SÁ, M. F. Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. ***Microbial Cell Factories***. v.7, n. 7, 2008 (doi: 10.1186/1475-2859-7-7, online version).
- CEREGHINO, G. P. C.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the ethylophilic yeast *Pichia pastoris*. ***FEMES Microbiology***, 24: 45-66; 2000.
- FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAREJOS, C.; TUSET, J. J.; ARNAU, J., PINA, J. A., NAVARRO, L.; PENA, L. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. ***Molecular Breeding***. v. 7, p.175-185, 2001.
- GURKAN, C.; ELLAR, D. J. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. ***Microbial Cell Factories***, 4 (33): 1-8; 2005.
- HUNT, I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. ***Protein Expression and Purification***. v.40, p.1-22, 2004.
- KINGSMAN, S. M.; KINGSMAN, A. J. ***Genetic engineering***. Oxford: Blackwell Scientific Publication; 1988.
- KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. ***Nature Biotechnology***. v. 23, p. 567 – 575, 2005.
- KRAINER, F. W.; DIETZSCH, C.; HAJEK, T.; HERWIG, C.; SPADIUT, O.; GLIEDER, A. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. ***Microbial Cell Factories***. v. 11, n. 22, p 1-14, 2012.
- LEWIN, B. ***Genes VIII***. Pearson Prentice Hall. Londres; 2004.

LOPES, Drielle Silva Andrade; PESSOA, Mitsuê Hamada Nery; SANTOS, Rodrigo da Silva; BARBOSA, Mônica Santiago; **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 10, n. 1, p. 234-245, 2012.

NEALE, A. D.; WAHLEITHNER, J. A.; LUND, M.; BONNETT, H. T.; KELLY, A.; MEEKS-WAGNER, D. R.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Chitinase, -1,3 glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **The cell** v. 2, p. 673-684, 1990.

NEVALAINEN, K. M. H.; TE'O, V. S. J.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**. v.23, n.9, p.468-474, 2005.

NEWTON, S. S.; DUMAN, J. G. An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. **Plant Molecular Biology** v. 44, p. 581-589, 2000.

OLIVEIRA, Márcia Cristina de Sena [*et al.*] **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de Reação em cadeia da polimerase** [recurso eletrônico]. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Current Science**, v.80, n.9, p. 1121-1128, 2001.

REYES-RUIZ, J. M.; BARRERA-SALDAÑA, H. A. Proteins in the worlds: expression systems for their study. **Revista de Investigación Clínica**. v.58, n.1, p.47-55, 2006.

RODRIGO, A. S. *Estudi del metabolisme central del carboni de Pichia pastoris*. Tesi Doctoral, University Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanha. 324pp; 2004.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular Cell Biochemistry**. v.307, p. 249-264, 2008.

SINGH, N. K.; BRAKER, C. A.; HASEGAWA, P. M.; HANDA, A. K.; HERMODSON, M. A.; PFANKOCH, E.; REGNIER, F. E.; BRESSAN, R. A. Characterization of osmotin. **Plant Physiology** v. 85, p. 529-536, 1987.

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS Michael J. **Fundamentos da Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SØRENSEN, H. P. Towards universal systems for recombinant gene expression. **Microbial Cell Factories**. v.9, n.27, p.1-4, 2010.

STREATFIELD, S. J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. **Plant Biotechnology Journal**. v. 5, n. 1, p. 2-15, 2007.

VAN LOON, L. C., REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**. v. 44, p.135-162, 2006.

VAN-KHUE, T.; RAO, R. Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. v. 287, p. C580-C589, 2004.