

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA QUIMERA LTB/GnRH EM *Pichia pastoris*

PEREIRA, Juliano Lacava¹; KLAFKE, Gabriel Baracy¹; MOREIRA, Gustavo¹; PINTO, Luciano da Silva¹; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo¹; LEITE, Fábio Pereira Leivas¹

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

1 INTRODUÇÃO

O GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) é um decapeptídeo responsável pela estimulação da biossíntese e secreção do LH (Hormônio Luteinizante) e do FSH (Hormônio Folículo Estimulante) pela hipófise anterior, os quais são fundamentais no processo reprodutivo (CHENG & LEUNG, 2005).

Atualmente, pesquisas com vacinas anti-GnRH estão sendo testadas em animais domésticos, selvagens e em humanos (ZENG et al., 2002; PARKINSON et al., 2004; LOPES et al., 2005). Em suínos, as vacinas proporcionam a redução dos androgênios sexuais e a consequente queda da deposição de escatol no tecido adiposo, reduzindo o odor desagradável da carne do macho inteiro (não castrado) (ZENG et al., 2002; BONNEAU & ENRIGHT, 1995). Já em humanos com câncer de próstata em estágio avançado, vacinas anti-GnRH demonstraram redução dos níveis de testosterona, redução da próstata e dos níveis de PSA (Antígeno Prostático Específico) (PARKINSON et al., 2004).

O objetivo deste estudo foi clonar e expressar a quimera LTB/GnRH em *Pichia pastoris* X33 visando sua utilização como um possível imun contraceptivo.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Como o GnRH é um hapteno, a molécula foi fusionada à subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), um potente adjuvante da imunidade sistêmica e de mucosas (CONCEIÇÃO, 2005). Portanto, é possível que a LTB além de carreadora do GnRH também exerça o papel de adjuvante na vacina.

O gene de 390pb, que codifica para a quimera LTB/GnRH foi construído *in silico* com o auxílio do programa Vector NTI v.11 (Invitrogen). Para isso, foram utilizadas sequências gênicas com códons preferenciais de *Pichia pastoris*, visando otimizar a expressão da quimera em sistemas heterólogos. No processo de montagem, foram adicionados sítios para as endonucleases *EcoRI* e *XbaI* nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente. A síntese do gene foi realizada pela empresa Epoch Biolabs (USA), que procedeu a clonagem do gene no vetor de expressão pPICZαB. O plasmídeo contendo a sequência de interesse foi inserido em *Escherichia coli* TOP 10 para propagação. Logo, foi extraído o DNA plasmidial das bactérias com um kit da marca Qiagen, para transformação das leveduras por eletroporação. As colônias transformantes foram selecionadas pela resistência ao antibiótico de seleção e PCR, através da amplificação do gene inserido. A seguir, as colônias supostamente transformadas foram submetidas à indução em placa com metanol 0,5% realizada de acordo com sistema *Easy*

Select Expression Pichia (Invitrogen). Ao final do processo de indução, as colônias foram submetidas à técnica *Colony Blotting* para avaliação da expressão da quimera com o uso de anticorpos anti-CT. Posteriormente, o clone que apresentou melhor expressão em placa, foi selecionado para a expressão em BMMY líquido. Após cultivo em caldo do clone selecionado, o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi liofilizado e ressuspendido em água ultrapura. Foram realizadas as técnicas de *Dot blot*, *SDS PAGE* e *Western blot*, com anticorpos anti-CT.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A expressão *in vitro* da proteína recombinante LTB/GnRH foi apresentada pela técnica de *Colony blotting* (figura 1), utilizando soro anti-CT. Esta técnica foi eficiente para a triagem inicial dos transformantes. Com a colônia do clone escolhido para expressão em caldo, foi realizada a PCR, com primers AOX, que gerou um fragmento com cerca de 982pb (592pb do vetor, 390pb do gene de interesse) (figura 2). Após, a mesma colônia citada anteriormente, que demonstrou uma das melhores expressões pelo ensaio de *Colony blotting* foi selecionada para cultivo em caldo BMMY e a cultura foi induzida com 1% de metanol a cada 24h por cinco dias. O sobrenadante referente ao último dia foi liofilizado, e seu produto submetido à técnica de *Dot blot* com soro anti-CT (figura 3). A reação foi positiva a partir do terceiro dia, até o último. Logo, o material concentrado foi submetido à técnica de *SDS PAGE* com gel a 12%, onde exibiu uma banda acima do controle "LTB". Portanto, realizamos o método *Western blot* com soro anti-CT (figura 4). A reação foi positiva e as bandas apresentaram-se com maior peso molecular, possivelmente, pela formação de pentâmeros (CONCEIÇÃO, 2005).

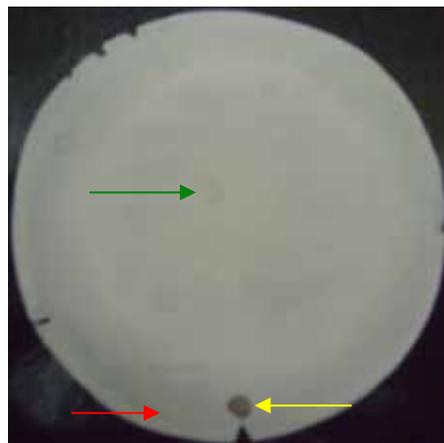


Figura 1. *Colony blotting*, seleção de colônias recombinantes. A seta verde indica o clone escolhido para a indução em meio líquido. A vermelha indica controle negativo (*P. pastoris* X33 recombinante que expressa uma proteína de *Neospora caninum* e *P. pastoris* X33 não transformada). A seta amarela indica o controle positivo LTB/P42.

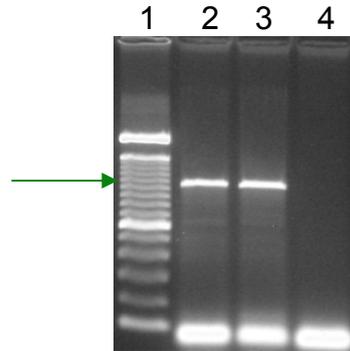


Figura 2 – Confirmação da presença do gene *ltb-gnrh* no vetor pPICZαB por PCR utilizando os primers AOX. Gel de agarose 1,0%. Marcador 1Kb plus/INVITROGEN (1). Vetor recombinante pPICZαB/LTB-GnRH (2 e 3). Controle negativo (4).



Figura 3. *Dot blot* do sobrenadante do cultivo induzido com 1% de metanol. A seta preta indica o controle positivo (LTB) e a seta amarela o negativo. Na linha superior, ao lado do controle positivo, as amostras do primeiro ao quinto dia de expressão, respectivamente, não concentradas. Na linha inferior, ao lado do controle negativo, as amostras liofilizadas do primeiro ao quinto dia de expressão. Os círculos indicam os pontos das amostras reagentes.



Figura 4. *Western blot* do sobrenadante liofilizado utilizando soro anti-CT. LTB purificada de *E. coli* (1). Sobrenadante de *Pichia pastoris* X33 não transformada (2). Sobrenadante liofilizado puro (seta vermelha) (3). Sobrenadante liofilizado diluído 1:2 (4). Sobrenadante liofilizado diluído 1:4 (5).

4 CONCLUSÕES

Concluimos que a expressão da quimera LTB/GnRH em *P. pastoris* X33 foi realizada com sucesso. Estudos prospectivos continuarão sendo desenvolvidos pelo grupo para explicar a possível formação de pentâmeros dessa quimera. Ainda, serão realizados testes em animais para avaliar o efeito imun contraceptivo da proteína fusionada.

5 REFERÊNCIAS

BONNEAU, M.; ENRIGHT, W. J. Immunocastration in cattle and pigs. **Livestock Production Science**. v. 42, p.193-200, 1995.

CHENG, C. K.; LEUNG, P. C. K. Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and Their Receptors in Humans. **Endocrine Reviews**. v. 26 (2), p. 283-306, 2005.

Conceição, Fabricio Rochedo. **Produção e avaliação de uma vacina de subunidade recombinante contra a pneumonia enzoótica suína** Fabricio Rochedo Conceição; orientador Odir Antônio Dellagostin. Pelotas, 2005. 69f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

DUMMER, L. A.; CONCEICAO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; MORAES, C. M.; ROCHA, A. S. R.; SOUZA, L. L.; ROOS, T. B.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of *Bovine herpesvirus* type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**. v. 161, p. 84-90, 2009.

LOPES, C. A. P.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; FIGUEIREDO, J. R. Imunocontracepção em mamíferos com ênfase no controle populacional de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 29, p.159-166, 2005.

PARKINSON, R. J.; SIMMS, M. S.; BROOME, P.; HUMPHREYS, J. E.; BISHOP, M. C. A vaccination strategy for the long-term suppression of androgens in advanced prostate cancer. **European Urology**. Pages 171-175, 2004.

ROGAN, D.; BABIUK, L. A. Novel vaccines from biotechnology. **Rev. sci. tech.** v. 4 (1), p. 159-174, 2005.

ZENG, X. Y.; TURKSTRA, J. A.; TSIGOS, A.; MELOEN, R. H.; LIU, X. Y.; CHEN, F. Q.; SCHAAPER, W. M. M.; OONK, H. B.; GUO, D. Z.; WIEL, D. F. M. Effects of active immunization against GnRH on serum LH, inhibin A, sexual development and growth rate in Chinese female pigs. **Theriogenology**. v. 58, p. 1315-1326, 2002.