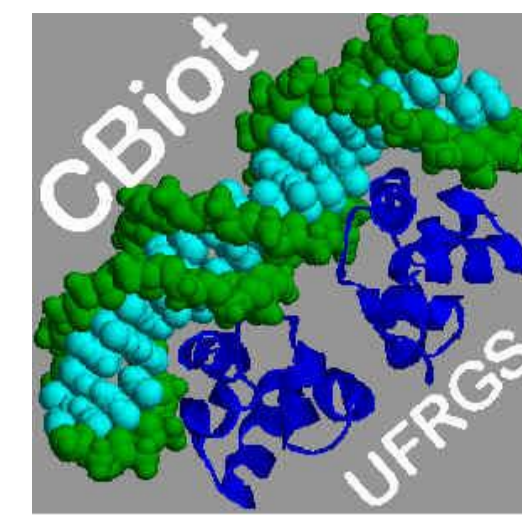


Clonagem e expressão de uma subunidade recombinante do AgB de *Echinococcus*

granulosus em *Pichia pastoris*

Alexia Nedel Sant'Ana¹, Arnaldo Zaha² (Orientador)



INTRODUÇÃO

O *Echinococcus granulosus* é um helminto parasita da classe Cestoda, e sua fase larval (cisto hidático), que se desenvolve nas vísceras do hospedeiro intermediário, é causadora da hidatidose cística (Fig 1.) (MCMANUS & SMYTH, 1986). O cisto hidático (Fig. 2) contém o fluido hidático, com os produtos de excreção e secreção do parasito, sendo o antígeno B (AgB) o mais abundante. O AgB é uma lipoproteína formada por oligômeros de 8 kDa (MAMUTI et al., 2006), codificados por uma família multigênica (*AgB8/1-AgB8/5*) (CHEMALE et al., 2005). O AgB possui grande importância na sobrevivência do parasito no hospedeiro (SHEPHERD; AITKEN; MCMANUS, 1991).

A levedura *Pichia pastoris* é utilizada como um sistema de expressão eucarioto, devido a sua habilidade de realizar modificações pós-traducionais necessárias às proteínas eucarióticas (CEREGHINO; CREGG, 1999).

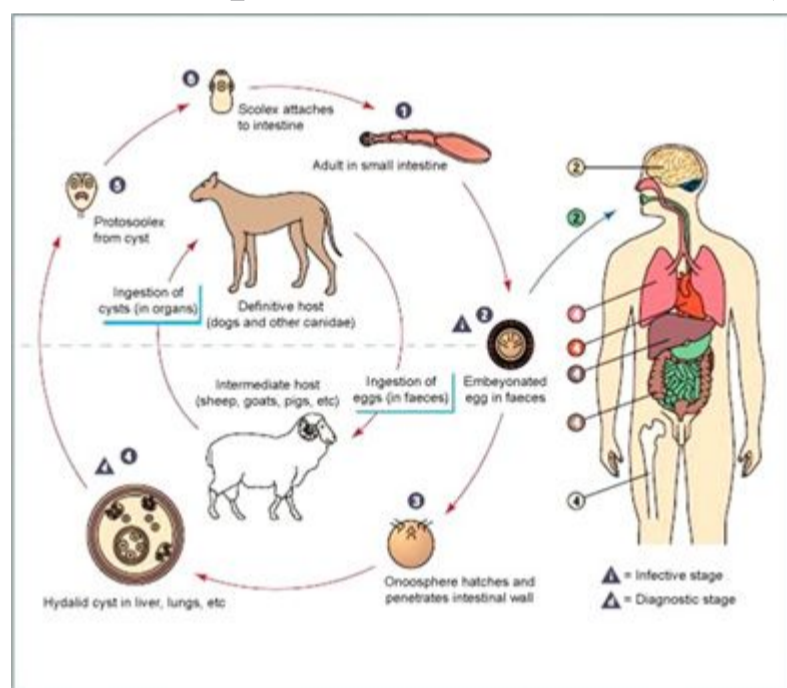


Fig. 1: Ciclo de vida de *E. granulosus* (Adaptado de MORO; SCHANTZ, 2009).

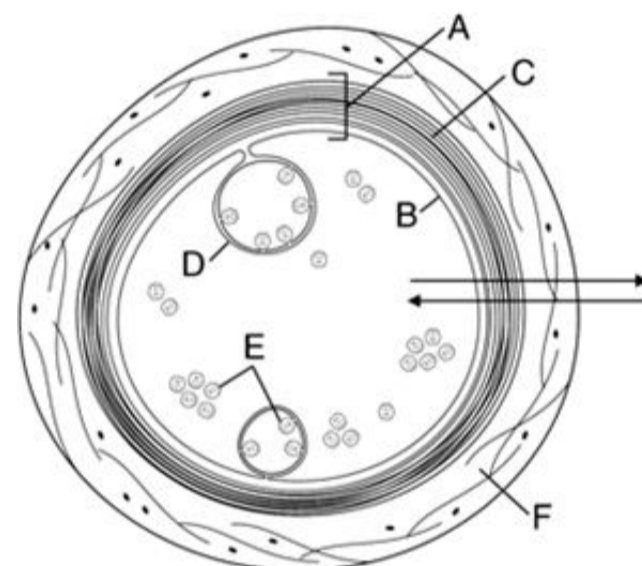


Fig. 2: Cisto hidático de *E. granulosus*. (A) Parede do cisto. (B) Camada germinativa. (C) Camada laminar: camada acelular que protege o cisto. (D) Cápsula prolífera: contém protoescolices em seu interior. (E) Protoescolices. (F) Camada adventícia produzida pela resposta inflamatória do hospedeiro (Adaptado de MONTEIRO et al., 2010).

OBJETIVO

Realizar a clonagem do gene codificador da subunidade AgB8/1 no vetor de expressão pPICZαC, para posterior expressão da proteína recombinante em *P. pastoris*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência codificadora foi amplificada por um PCR primário, e o produto deste foi o molde para um PCR secundário, esses PCRs aumentam a homologia com o vetor nas extremidades do produto amplificado. O vetor de expressão pPICZαC foi linearizado por clivagem com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI, defosforilado com a enzima SAP, e purificado com o kit de purificação DNA GFX. As células da linhagem DH5α de *Escherichia coli* foram transformadas por choque térmico, e foi realizada a clonagem por recombinação homóloga. O DNA plasmidial extraído das 2 colônias recombinantes foi utilizado como molde para um PCR com os oligonucleotídeos iniciadores AOX1F e AOX1R, que amplificam a região de clonagem do vetor. Os clones foram linearizados com a enzima SacI, defosforilados com a SAP e purificados com o kit de purificação DNA GFX.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma PCR primária foi realizada a partir do gene *AgB8/1* previamente clonado no vetor pGEX. O fragmento esperado de 242 pb foi obtido, sendo utilizado como molde para uma segunda PCR, resultando em um fragmento de 292 pb.

Esse fragmento de DNA foi utilizada para a transformação por choque térmico juntamente com o vetor para expressão pPICZαC. O fragmento de interesse e o vetor se ligam por possuírem uma região de homologia, ocorrendo clonagem por recombinação homóloga. Foram obtidas 40 colônias transformantes, e 2 colônias recombinantes, das quais foi extraído o DNA plasmidial, que, em seguida, foi utilizado em uma reação de PCR para amplificação do sítio de clonagem (Fig. 3)

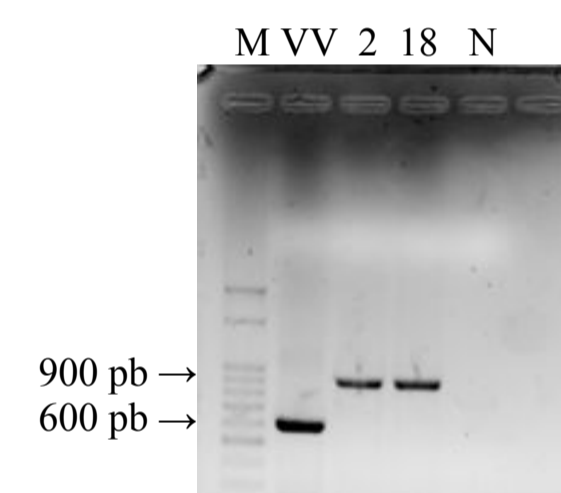


Fig. 3: PCR dos clones com iniciadores que amplificam um fragmento de 669 pb. (M – Marcador de peso molecular; VV – Vetor vazio; 2 e 18 – Clones; N – Controle negativo da reação.)

Os clones foram linearizados e purificados (Fig. 4) para posterior inserção no genoma da levedura *P. pastoris*.

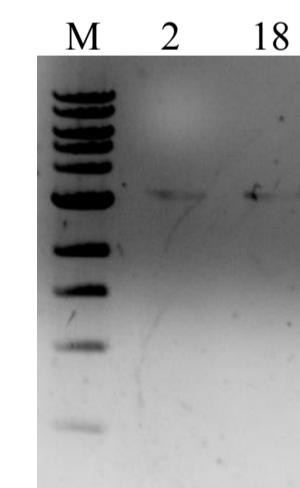


Fig 4: Clones linearizados e purificados. (M - Marcador de peso molecular; 2 e 18 - Clones lineares.)

PERSPECTIVAS

- Padronização do PCR com um novo iniciador que se ligue mais perto do sítio de clonagem, para posterior sequenciamento dos clones;
- Transformação na levedura *P. pastoris*;
- Expressão e purificação da proteína de estudo.

REFERÊNCIAS

- CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, n. 5, p. 422-427, 1999.
- CHEMALE, G. et al. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1747, n. 2, p. 189-194, 2005.
- MAMUTI, W. et al. Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitology International*, v. 55, n. SUPPL., p. 57-62, 2006.
- MCMANUS, D P; SMYTH, J. D. Hydatidosis: Epidemiology and Speciation. *Parasitology Today*, v. 2, n. 6, 1986.
- MONTEIRO, K. M. et al. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics*, v. 10, n. 10, p. 1985-1999, 2010.
- MORO, P.; SCHANTZ, P. M. Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 13, n. 2, p. 125-133, 2009.
- SHEPHERD, J. C.; AITKEN, A.; MCMANUS, D. P. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 44, n. 1, p. 81-90, 1991.

(Apoio financeiro: CNPq, CNPq-PIBIC).