

CONSTRUÇÃO DE VETORES PLASMÍDICOS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO: ENDOSTATINA + PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA

Felipe Senne de Oliveira Lino e Lígia Ely Morganti Ferreira Dias
Centro de Biologia Molecular - CBM

OBJETIVO

O objetivo do projeto neste período foi a obtenção de um vetor plasmídico para expressão de endostatina solúvel em bactérias BL-21.

O objetivo final do projeto é obter proteínas de fusão endostatina-BH3 de proteínas apoptóticas da família da Bcl-2. Estas proteínas devem apresentar as vantagens da endostatina de especificidade pelas células endoteliais tumorais ativadas e maior grau de apoptose após internalização. Essas proteínas de fusão deverão se apresentar mais efetivas do que a endostatina no tratamento de tumores em camundongos, sem apresentação de efeitos colaterais graves.

METODOLOGIA

A técnica de PCR foi utilizada para realizar a cópia do gene da endostatina, clonado no vetor pED-endo (vetor utilizado para expressão em células eucariotas), utilizando-se como primers sequências complementares às sequências a 5' e a 3' do gene e introduzindo-se as sequências das enzimas de restrição NcoI e EcoRI.

Os primers foram desenhados e sintetizados. A temperatura de anelamento (58,2°C) e também a concentração de primers (750ng) foram padronizadas para se obter banda de aproximadamente 500 pb na eletroforese em gel de agarose, referente ao gene da endostatina. A banda de 500 pb foi cortada, purificada, digerida com as enzimas NcoI e EcoRI e clonada no vetor pET20b+ digerido com as mesmas enzimas de restrição. Este DNA

foi transformado em bactérias DH5 α competentes. Análise de restrição foi utilizada para a detecção do gene da endostatina nos plasmídeos purificados das bactérias que cresceram em agar contendo ampicilina. Os plasmídeos recombinantes contendo o gene da endostatina foram transformados em *E. coli* da cepa BL-21 e selecionadas em agar LB contendo ampicilina. A cultura dessas bactérias foi realizada em meio líquido (LB), sendo a expressão de endostatina ativada pela adição de IPTG (1mM). O procedimento de choque osmótico foi utilizado para extração das proteínas presentes no espaço periplasmático bacteriano. A análise da presença de endostatina recombinante no fluido obtido será realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida e também por Western blotting.

RESULTADOS

O vetor pET20b+ (Novagen) é utilizado para expressão de proteínas recombinantes baseado no sistema de expressão que utiliza a T7RNA polimerase [1]. O vetor pET20b+ contém ainda o peptídeo sinal da proteína bacteriana pelB, o que permite que a proteína recombinante seja secretada para o espaço periplasmático bacteriano, sob a forma solúvel.

Foi obtida uma banda de aproximadamente 500 pb, referente ao gene da endostatina, após o procedimento de PCR. A clonagem do gene da endostatina no vetor pET20b+ foi confirmada por análise de restrição dos plasmídeos purificados. Os plasmídeos

contendo o gene da endostatina foram utilizados para transfecção de bactérias BL-21 competentes. Foi realizada a cultura dessas bactérias e o choque osmótico para extração das proteínas presentes no espaço periplasmático bacteriano. A análise da presença de endostatina no fluido obtido por choque osmótico ainda está em andamento.

CONCLUSÕES

O gene da endostatina foi copiado pela técnica de PCR, sendo introduzidas as sequências para as enzimas de restrição NcoI e Eco RI, permitindo a clonagem do gene da endostatina no pET20b+ em fase de leitura com o peptídeo sinal (pelB). Desta maneira as bactérias BL-21 transformadas com este vetor deverão expressar a proteína 6His-endostatina quando adequadamente ativadas pela presença de Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Studier, F.W.; Rosenberg, A.H.; Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) use of T7 RNA Polymerase to direct expression of cloned genes Meth. Enzymol 185:60-89

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

PIBIC