17938
Ana Raquel de Souza Monteiro

*Expressão de hormônio de crescimento da
carpa Hypophthalmichthys molitrix em
leveduras*

Tese apresentada ao Programa de
Pós Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

**São Paulo
2011**

Ana Raquel de Souza Monteiro

*Expressão de hormônio de crescimento da
carpa Hypophthalmichthys molitrix em
leveduras*

Tese apresentada ao Programa de
Pós- Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Butantan/IPT
para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi
Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisabete
José Vicente

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Monteiro, Ana Raquel de Souza.

Expressão de hormônio de crescimento da carpa
Hypophthalmichthys molitrix em leveduras / Ana Raquel de Souza
Monteiro. — São Paulo, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética de Microrganismos.

Versão do título para o inglês: Expression in yeasts of the growth
hormone of the carp *Hypophthalmichthys molitrix*.

Descritores: 1. Biologia 2. Genética 3. Genética Microbiana
4. *Saccharomyces cerevisiae* 5. *Pichia pastoris* 6. Hormônio de
crescimento I. Spartaco, Prof. Dr. Astolfi Filho II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan
III. Título.

ICB/SBIB029/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Ana Raquel de Souza Monteiro.

Título da Tese: Expressão de hormônio de crescimento da carpa
Hypophthalmichthys molitrix em leveduras. .

Orientador(a): Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a 30 / 06 / 2011, considerou

☒ Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Claudete Rodrigues Paula
Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura:
Nome: José Augusto Ferraç de Lima
Instituição: ICB- USP, Instituto de Física de São Carlos

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Monica Bucciarulli Rodrigues
Instituição: UFMG

Examinador(a): Assinatura:
Nome: João Lucio de Azevedo
Instituição: ESAL/USP

Presidente: Assinatura:
Nome: Elisabete Jose Vicente
Instituição: ICB- USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 383/10 referente ao projeto intitulado: *"Expressão de hormônio de crescimento de carpa hypophthalmichthys molitrix em leveduras"* sob a responsabilidade de **Ana Raquel de Souza Monteiro**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 27 de abril de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Dedico esta tese aos meus pais Agílio e Sandra,
por me apoiarem em minhas decisões, por me
darem força e carinho quando precisei,
por entenderem minhas ausências.
E acima de tudo por me amarem.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Elisabete José Vicente por todo apoio, conhecimento que me transmitiu e oportunidades profissionais que me ofereceu. Obrigada também pelas conversas cheias de lições de vida!!!!

Ao meu orientador Spartaco Astolfi Filho por ter me aceitado como sua aluna, mesmo me conhecendo muito pouco e ainda assim ter confiado em mim.

À minha orientadora do mestrado Mônica Bucciareli Rodriguez, que mesmo deixando de ser minha professora, não deixou de me ajudar e transmitir conhecimentos. Muito obrigada por, além de tudo, ter se tornado uma amiga verdadeira.

À Ana Clara Shenberg pelas oportunidades e conhecimentos que me proporcionou, mesmo não sendo minha orientadora direta.

Às amigas do laboratório Jéssica e Carol, pelos momentos divertidos no “canto da misantropia” e também pela troca de conhecimentos profissionais. Muito obrigada!

Aos amigos de laboratório Belisa, Poliana, Ana Cristina, Ilana e Fábio pelo companheirismo no aprendizado de nossas leveduras.

À amiga de laboratório Cecília, que surgiu no final do doutorado e foi uma grande companhia nessa fase importante.

Aos amigos de laboratório Ronaldo, Claudionor, Felipe e Oeber, sempre dispostos a ajudar e trocar conhecimentos.

À amiga de laboratório Kazui, que sempre me ajudou e deu socorro quando pedi. Principalmente nas viagens! Muito obrigada, querida Kazui!

Às amigas de laboratório Norma e Leninha sempre presentes e com uma solução para um problema de última hora.

Aos meus amigos, quase irmãos Diogo Marquezoni e Vinícius Santana. Muito obrigada pelos bons momentos de convivência, por todos os favores e alegrias que me proporcionaram.

Às minhas amigas e amigos de BH. Vocês que foram muito importantes nesse período da minha vida. Denis, João, Lília, Janini, Juliana, Laura, Ana Luísa, Érika e Gilka.

Às amigas e amigos de São Paulo. Obrigada pela presença em momentos felizes e tristes, meus queridos Priya, Renata (BH), Renato (BH), Carolina Antunes, Mariana Rangel, Husam e Lucas Almeida.

Especialmente à minha grande amiga Katarzyna Pilipiuk!!!!

Aos meus pais, Agílio Monteiro Filho e Sandra Nelma de Souza Monteiro, por sempre me apoiarem e pensarem na minha felicidade e dos meus irmãos acima de tudo.

Aos meus irmãos, Cássia Juliana e Messias Antônio, por serem meus amigos e me amarem.

*“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou
construir um castelo...”
(Fernando Pessoa)*

RESUMO

Monteiro ARS. Expressão de hormônio de crescimento da carpa *Hypophthalmichthys molitrix* em leveduras. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A demanda por produtos da piscicultura vem crescendo rapidamente, sendo economicamente relevante considerar os avanços da moderna biotecnologia. Um aumento na taxa de crescimento de peixes poderia ser alcançado empregando-se a suplementação alimentar com proteínas recombinantes produzidas por leveduras. Já foram demonstrados efeitos extremamente satisfatórios resultantes da introdução de hormônio de crescimento de peixe. Neste trabalho, foram construídas linhagens recombinantes das leveduras *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* que expressam hormônio de crescimento da carpa *Hypophthalmichthys molitrix* (GHc), visando aplicações futuras na suplementação alimentar de peixes. Para expressão em *P. pastoris*, o cDNA codificador de GHc foi inserido nos plasmídeos pHILD2 (expressão interna) e pPIC9K (expressão e secreção) dando origem aos plasmídeos pHILGH e pPICGH. Para a expressão em *S. cerevisiae* o cDNA codificador de GHc foi inserido entre o promotor e terminador PGK de modo que o cassete de expressão ficasse ladeado por elementos δ , dirigindo a integração em múltiplas cópias no genoma de *S. cerevisiae*. Ainda, visando obter altos níveis de secreção da proteína GHc, foi construído também, um plasmídeo onde a sequência codificadora de GHc foi fusionada à uma sequência sinal modificada (sequência sinal da proteína “killer” de *Kluyveromyces lactis*, fusionada a fragmento de interleucina humana). Os clones recombinantes derivados de *S. cerevisiae* e *P. pastoris* expressaram uma proteína recombinante de aproximadamente 20 KDa. Um dos clones recombinantes de *S. cerevisiae* excreta cerca de 5 vezes mais proteínas totais quando comparado com o controle. As proteínas recombinantes apresentaram hibridação específica contra anticorpo anti GHc comercial. Os resultados indicam que as proteínas recombinantes produzidas neste trabalho são biologicamente ativas.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*. *Pichia pastoris*. Proteína heteróloga. Piscicultura. Produção de alimento.

ABSTRACT

Monteiro ARS. Expression in yeasts of the growth hormone of the carp *Hypophthalmichthys molitrix*. [Ph. D. Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The demand for fishery products is an expanding area, and it is thus considered economically interesting to find new biotechnological solutions. The increase in the growth rate of fishes is an economic factor that could be reached with the use of well defined molecular strategies, as the production of heterologous proteins in yeasts. Preliminary studies showed a successful effect of the introduction of the purified fish GH (growth hormone). In this work, recombinant strains of the yeasts *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae* which express the *Hypophthalmichthys molitrix* carp growth hormone (GHc), were constructed aiming its future use feeding supplementation. In order to achieve the GHc expression in *P. pastoris*, the GHc coding cDNA was introduced into the plasmids pHILD2 (intracellular expression) and pPIC9K (expression and secretion), originating the plasmids pHILGH and pPICGH. The expression of the GHc in *S. cerevisiae* was driven by the PGK promoter and terminator and the cassette was flanked by the δ elements, which provide for the integration of multiple copies into the *S. cerevisiae* genome. We also constructed a plasmid in which the GHc cDNA sequence was fused to a modified signal sequence (*Kluyveromyces lactis* killer protein signal sequence fused to a human interleukin fragment), aiming to reach high levels of secretion of the heterologous protein. *P. pastoris* and *S. cerevisiae* recombinant clones were shown to express a recombinant protein of 20 KDa. One of the *S. cerevisiae* recombinant clones secreted 5 times more total proteins when compared to the control. The recombinant proteins showed hybridization of the bands against antibody anti-commercial GHc. The results indicate that the recombinant proteins produced in this work are biologically active.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*. *Pichia pastoris*. Heterologous protein. Fishing. Feeding supplementation.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg:	Micrograma
µm:	Micron
µl:	Microlitro
µF:	Microfarad
Ω:	Ohm
ADE2:	Gene codificador do aminoácido adenina de <i>S. cerevisiae</i>
Abs ₆₀₀ :	Absorbância no comprimento de onda 600 nm
Amp ^R :	Resistência a ampicilina
ARS:	Atividade de replicação autônoma
AOX1:	gene da álcool oxidase 1 de <i>Pichia pastoris</i>
BD:	"Becton, Dickinson and Company"
BSA:	Soro albumina bovina
CAN1:	Gene codificador da permease de arginina
cDNA:	DNA complementar sem presença de introns
DCJ:	Doença Creutzfeldt-Jakob
EDTA:	Ácido etileno diamino tetracético
FDA:	"Food and drug administration"
G418 ^R :	Resistência à geneticina
G418 ^S :	Sensível à geneticina
GH:	Hormônio de crescimento
GHc:	Hormônio de crescimento de carpa
GHch:	Hormônio de crescimento de carpa <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>
GRAS:	"Generally regarded as safe"
hG-CSF:	"Human granulocyte stimulating factor". Fator estimulante de granulócito humano
HIS4:	Gene codificador da protein histidinol desidrogenase de <i>S. cerevisiae</i>
IGF-1:	"fator de crescimento semelhante à insulina"/"Insulin-like growth factor"
IgG:	Imunoglobulina G
Kb:	1000 pares de bases
KEX2:	Sítio de serina protease
Kgf:	Quilograma força
KV:	Quilovolt
LB:	Meio de cultura Luria-Bertani, para cultivo de bactérias

LEU2:	Gene codificador do aminoácido leucina de <i>S. cerevisiae</i>
LiAC:	Acetato de lítio
LTR:	“Long Terminal Repeat”
mA:	miliampere
MIC:	Concentração inibitória mínima
MPA:	Ministério da pesca e agricultura do Brasil
ng:	nanograma
nm:	nanômetros
NCBI:	“National Center for Biotechnology Information”
p/v:	peso por volume
pb:	pares de bases
PBS:	Solução salina tamponada de fosfato
PCR:	Reação em cadeia de polimerase
PEG:	Polietilenoglicol
PGK:	Gene codificador da fosfoglicerato quinase de <i>S. cerevisiae</i>
pmol:	picomol
mRNA:	RNA mensageiro
rpm:	Rotações por minuto
SD:	Meio mínimo para leveduras
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SS:	Sequência sinal
ss:	“single strand” (fita simples de DNA)
TCA:	Ácido Tricloroacético
Ty:	“Yeast Transposon” (retrotransposon de levedura)
TRP1:	Gene codificador do aminoácido triptofano em <i>S. cerevisiae</i>
U:	Unidades
URA3:	Gene codificador do aminoácido uracila em <i>S. cerevisiae</i>
YNB:	“Yeast nitrogen base” (base nitrogenada para leveduras)
YPD:	Extrato de levedura, peptone, dextrose. Meio rico para crescimento de leveduras
Wt:	“Wild type” (genótipo selvagem)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alinhamento da sequência do cDNA da carpa <i>H. molitrix</i> , contra as sequências que apresentaram maior identidade no banco de dados do NCBI. Foram selecionados apenas os alinhamentos que tiveram um “e-value” de valor 0.....	27
Tabela 2 - Tabela 2 – Expressão de GH de peixes em microrganismos.....	30
Tabela 3 - Proteínas produzidas utilizando-se o sistema de <i>Pichia pastoris</i>	34
Tabela 4 - Vantagens e desvantagens do uso do promotor AOX de <i>P. pastoris</i>	35
Tabela 5 - Linhagens de levedura.....	42
Tabela 6- Plasmídeos empregados neste trabalho.....	45
Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores de PCR utilizados neste trabalho.....	50
Tabela 8 – Exemplo de cálculo de número de cópias de GHch inseridas no genoma de levedura recombinante.....	54
Tabela 9 – Dosagem de proteína total presente no sobrenadante da cultura de clones recombinantes.....	74
Tabela 10 – Valores de média de C_t e número de cópias inseridas no genoma de clones recombinantes de <i>P. pastoris</i>	77
Tabela 11 – Eficiência de transformação de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> com o plasmídeo pAJ50.....	93
Tabela 12 – Dosagem de proteína total presente no sobrenadante da cultura de clones recombinantes.....	97
Tabela 13 – Valores obtidos com reações de PCR Real Time e cálculo do número de cópias inseridas nos genomas de clones de <i>S. cerevisiae</i>	100
Tabela 14 – Características físico químicas das sequências de aminoácidos de GH de <i>H. molitrix</i> , <i>A. melanoleuca</i> e <i>H. sapiens</i>	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Alinhamento das sequenicas de aminoácidos da proteína GH das espécies de carpas <i>H. molitrix</i> e <i>C. idella</i>	31
Figura 2 –Alinhamento das sequenicas de aminoácidos da proteína GH das espécies de carpas <i>H. molitrix</i> e <i>C. carpio</i> . Setas indicam aminoácidos divergentes entre as sequências.....	31
Figura 3 - Características da glicosilação em humanos e em leveduras.....	39
Figura 4 - Sequência de interleucina β humana utilizada para potencializar a secreção em <i>S. cerevisiae</i> destacada em negrito. A) Sequência sem alterações. B) Sequência melhorada a partir da adição de um sítio a mais de glicosilação, indicado pelas setas vermelhas nos resíduos 7 e 15.....	40
Figura 5– A) Sequência de interleucina- β humana com os sítios de glicosilação destacados; B) Sequência final sintetizada com todos os sitos de restrição e componentes destacados; C) Esquema de síntese da sequência final desejada pela reação de PCR, a partir de anelamento entre as extremidades dos oligonucleotídeos. D) Visualização do anelamento dos oligonucleotídeos na sequência completa. E) Esquema de sequência final obtida, com todos os componentes e sítios de restrição de interesse para a clonagem do cDNA de GHch.....	56
Figura 6 – Curva de calibração da proteína BSA realizada pelo método de Bradford.....	63
Figura 7 – Alinhamento da sequência de cDNA do hormônio de crescimento da carpa <i>H. molitrix</i> (GHc) presente no plasmídeo pCGH1 contra a sequência do cDNA do hormônio de crescimento da carpa <i>H. molitrix</i> , disponível no NCBI (EU157194.1).....	65
Figura 8 – Alinhamento da sequência de aminoácidos do cDNA de GH de <i>H. molitrix</i> (GHc) presente no plasmídeo pCGH1 com a sequência de aminoácidos de GHc disponível no NCBI (EU157194.1).....	66

- Figura 9- Esquema da clonagem de GHch no vetor comercial pCR® 2.1-TOPO® da Invitrogen a partir do plasmídeo pCGH1 (Santos, 2000). Ao lado migração em gel de agarose de fragmentos de DNAs plasmidiais isolados de clones de transformantes bacterianos, resultantes da digestão com a enzima de restrição *Eco* RI. A seta indica a posição da banda de aproximadamente 609 pb, correspondente a GHch..... 67
- Figura 10 – A) Esquema de clonagem de GHch em plasmídeos de expressão em *P. pastoris*. (Invitrogen). B) Migração em gel de agarose de DNAs plasmidiais extraídos de transformantes bacterianos contendo as misturas de ligação: 1 e 14– padrão de tamanho molecular 1KB, 500ng (Fermentas^R); 2-10 – misturas de ligação de pPIC9K e GHch; 11, 12, 13, 15-21 - misturas de ligação de pHILD2 e GHch. As setas brancas indicam tamanho após a restrição com a enzima Sac I. 69
- Figura 11 – Clones de *P. pastoris* GS 115/PICGH crescidos em meio sólido YPD acrescidos de diferentes concentrações de G418. A) sem adição de G418; B) 0,10 mg/ml; C) 0,15 mg/ml; D) 0,20 mg/ml; E) 0,25 mg/ml;. O círculo preto indica o local onde foi feito inóculo do clone transformante obtido com plasmídeo pPIC9K (controle)..... 70
- Figura 12 – SDS-PAGE de proteína extraída da linhagem recombinante *P. pastoris*/HILGH. 1 - *P. pastoris* GS115 (controle negativo); 2-6 – clone recombinante GS115/HILGH4 após indução com metanol por 1 a 5 dias; 7 – padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas^R)..... 72
- Figura 13 – “Western Blot” das proteínas do extrato celular do clone GS115/HILGH contra anticorpo anti-GHc. 1 e 2 – GS115 após indução com metanol nos dias 0 e 4; 3 e 4 – GS115/pHILD2 após indução com metanol nos dias 0 e 4 (controles negativos); e, 5-9 – GS115/HILGH após indução com metanol por 0, 1, 2, 3, 4, dias consecutivos; padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas^R)..... 73
- Figura 14 – Curva de crescimento em meio mínimo (SD-Biotina), em frascos agitados, a 28 °C, das linhagens transformantes de *P. pastoris* GS115/PICGH, que expressam e excretam GHch..... 75

Figura 15 – Curva de crescimento em meio mínimo (SD-Biotina), em fracos agitados, a 28 °C, das linhagens transformantes de <i>P. pastoris</i> GS115/HILGH, que expressam GHch.....	75
Figura 16– Amplificação por PCR do cDNA de GHch inserido no DNA cromossômico dos clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> . 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng Fermentas ^R ; 2 – controle negativo da reação de PCR, “branco”; 3 e 4 – amplificação com DNA genômico extraído de clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> GS115/PICGH como molde; 5 e 6 - amplificação com DNA genômico extraído de clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> GS115/HILGH como molde.	76
Figura 17 – Esquema geral de clonagens realizadas para a expressão de GHch em <i>S. cerevisiae</i> : A) construção dos plasmídeos de expressão pMAGH (epissomal) e pGEM-dGHd (δ-integração); B) Construção dos plasmídeos de expressão e secreção pMAILGH, pMAKTGH (epissomais) e pGEM-dILGHd (δ-integração).....	78
Figura 18 – A) Esquema da construção do plasmídeo pMAGH. B) Análise da orientação da inserção por restrição com as enzimas <i>Hind</i> III e <i>Sac</i> I e posterior eletroforese em gel de agarose 0,8%. As setas indicam as bandas correspondentes aos tamanhos esperados pela clonagem correta do fragmento (aproximadamente 770pb, 1700pb e 7500pb). 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb 500 ng Fermentas ^R ; 2-8 e 10-12 – clones recombinantes que não apresentaram padrão de bandas esperados ou que tiveram visualização de má qualidade; 9 – clone que apresentou padrão de bandas esperado e com visualização eficiente.....	80
Figura 19- Esquema de construção do plasmídeo pGEM-dGHd.....	82
Figura 20 – A) Esquema de construção do plasmídeo TOPOSSIL, seguido de gel de agarose submetido a eletroforese com <i>amplicons</i> do fragmento SSIL, onde: 1- padrão de tamanho molecular “GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder” Fermentas ^R ; 2- controle negativo (branco)da reação de PCR; 3 e 4 – <i>amplicons</i> resultantes de reações idênticas de PCR para amplificação de SSIL. B) Esquema de construção do plasmídeo TOPOGHSAL, seguido de gel de agarose submetido a eletroforese para análise da amplificação de GHch, onde: 1- padrão de tamanho molecular “GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder” Fermentas ^R ; 2- controle negativo (branco)da reação de PCR; 3-5 - <i>amplicons</i> resultantes de reações idênticas de PCR para amplificação de GHch.....	84

- Figura 21 – A) Esquema de construção do plasmídeo TOPOSSILGH. B) Análise em gel de agarose de DNA plasmidial isolado em clones recombinantes, após digestão com *Sac* I. 1- padrão de tamanho molecular “GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder” Fermentas^R; 2-4 e 6 – DNA plasmidial de clones que não apresentaram padrão de bandas esperado; 5 – DNA plasmidial que apresentou perfil esperado, com presença de fragmento, aproximadamente, 334 pb..... 85
- Figura 22 – A) Esquema de construção do plasmídeo pMAILGH. B) Identificação dos plasmídeos recombinantes obtidos com a mistura de ligação de pMA91 e inserto, digestão com *Hind* III. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb Fermentas^R; 2-4 – DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que apresentaram padrão de bandas esperado com presença de fragmentos de DNA de aproximadamente 2627 pb, 3500 pb e 4134 pb; 5-9 - DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que não apresentaram padrão de fragmentos de DNA esperado C) Identificação dos plasmídeos recombinantes obtidos com a mistura de ligação de pMA91 e inserto pela digestão com *Sac* I. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb Fermentas^R; 2-4 - DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que apresentaram padrão de fragmentos de DNA esperado com pela liberação do fragmento. de aproximadamente 334 pb; 5 - DNA plasmidial isolado de clone recombinante sem padrão de fragmentos de DNA esperado..... 87
- Figura 23 – A)Esquema de construção do plasmídeo TOPGKSILGH. B) Identificação dos plasmídeos recombinantes por análise de restrição com a enzima *Bam* HI. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2 e 6 - DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que não apresentaram padrão de fragmentos de DNA esperado; 3-5, 7 e 8 - DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que apresentaram padrão de fragmentos de DNA esperado (aproximadamente 3000 pb e 4000 pb)..... 89
- Figura 24 – A) Esquema de construção do plasmídeo pGEM-dILGHd. B) Digestão de DNAs plasmidiais de clones transformantes bacterianos. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2- pGEM-dILGHd; 3- pGEM-dILGHd digerido com enzima de restrição *Eco* RI..... 90

Figura 25 – Esquema de construção do plasmídeo pMAKTGH: A) Amplificação por PCR utilizando o plasmídeo pMAILGH como molde; B) Plasmídeo pMAKTGH obtido após amplificação do plasmídeo pMAILGH; C) Análise de restrição do plasmídeo do clone transformante com <i>Hind</i> III. 1 – padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500ng, Fermentas ^R ; 2 – plasmídeo pMAKTGH; 3- plasmídeo pMAKTGH digerido com <i>Hind</i> III, bandas com tamanhos de aproximadamente 2500 pb, 3500 pb e 4100 pb.....	92
Figura 26 - A e B: seleção dos clones recombinantes que receberam o fragmento dGHd. 1 e 21 - padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500ng, Fermentas ^R ; 2-20 e 22-31 - clones recombinantes de YPH252. As setas indicam os clones YPH252/dGHd29, YPH252/dGHd30, YPH252/dGHd45 e YPH252/dGHd49, consecutivamente; C e D: seleção dos clones recombinantes que receberam o fragmento dILGHd. 1, 21 e 41 - padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas ^R ; 2-20, 22-40 e 42-60: clones recombinantes de YPH252. As setas indicam os clones YPH252/dILGHd29, YPH252/dILGHd49 e YPH252/dILGHd64, consecutivamente.....	94
Figura 27 – SDS-PAGE. 1- YPH 252 /pMAGH; 2 a 4- YPH252/dGHd; 5- YPH 252 sem introdução de DNA exógeno; 6 - padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas ^R).....	95
Figura 28 – A) SDS- PAGE de proteínas de extrato celular de clones de <i>S. cerevisiae</i> YPH252/dGHd.1 – padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas ^R); 2 – Controle YPH252; 3- YPH 252/dGHd29; 4 – YPH 252/dGHd30; 5 – YPH 252/dGHd45; 6 - YPH252/dGHd49. B)“Western Blot” com anticorpo anti-GHc comercial de proteína de extrato celular dos clones YPH 252/dGHd29, YPH 252/dGHd30, YPH/dGHd45 e YPH252/dGHd49.....	96
Figura 29 – A) SDS- PAGE de precipitado de meio de cultura de inóculo de clones transformantes de <i>S. cerevisiae</i> YPH252dILGHd. 1 – padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas ^R); 2 – Controle YPH252; 3- YPH 252/dILGHd29; 4 – YPH 252/dILGHd49; 5 – YPH 252/dILGHd64. B)“Western Blot” com anticorpo anti-GHc comercial de precipitado de meio de cultura de inóculo dos clones YPH 252/dILGHd29, YPH 252/dILGHd49, YPH/dILGHd64.....	96
Figura 30 – Curva de crescimento dos transformantes de <i>S. cerevisiae</i> YPH252/dGHd que expressam GHch.....	98
Figura 31 – Curva de crescimento dos transformantes de <i>S. cerevisiae</i> YPH252/dILGHd que expressam e excretam GHch.....	98

Figura 32– Amplificação por PCR do cDNA de GHch inserido em clone recombinante de <i>S. cerevisiae</i> . 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas ^R ; 2 – controle negativo da PCR, “branco”; 3- amplificação com DNA genômico extraído de clone recombinante de de <i>S. cerevisiae</i> YPH252/dGHd como molde.....	99
Figura 33 – Amplificação de cDNA de GHch, utilizando-se DNA genômico de clones de <i>P. pastoris</i> GS115 como DNA molde. 1 - pHILGH4; 2 - pHILGH5; 3 - pPICGH16; 4 - pPICGH25; 5 - pPICGH4; 6 - pPIC9K (controle negativo); 7 - GS115 (controle negativo); 8 - pHILGH; 9 e10 – controle negativo, branco; 11 – pPICGH; 12 - padrão de peso molecular 1 Kb Fermentas ^R	102
Figura 34 - Alinhamento das sequências de aminoácidos do hormônio de crescimento de humano e do hormônio de crescimento de <i>H. molitrix</i>	108
Figura 35 - Alinhamento das sequências de aminoácidos do hormônio de crescimento de panda (<i>A. melanoleuca</i>) e do hormônio de crescimento de <i>H. molitrix</i>	109
Figura 36 – Curva de dissociação obtida em ensaio de PCR Real Time realizada com DNA genômico de clones de <i>P. pastoris</i> e <i>S. cerevisiae</i> apresentando expressão da proteína GH.....	113
Figura 37 – Curva padrão obtida com os C _s dos padrões.....	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – “Codon usage” de <i>S. cerevisiae</i>	111
Quadro 2 – “Codon usage” de <i>P. pastoris</i>	111

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (GH)	25
2.2 GH DE PEIXE	26
2.3 EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	32
2.4 A LEVEDURA <i>Pichia pastoris</i>	33
2.5 TRANSFORMAÇÃO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> POR δ “INTEGRATION”	36
2.6 FRAGMENTO DE INTERLEUCINA- β HUMANA POTENCIALIZANDO A SECREÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	38
3 OBJETIVO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 LINHAGENS DE BACTÉRIA	42
4.2 LINHAGENS DE LEVEDURA	42
4.3 MEIOS DE CULTURA	43
4.3.1 Meios para cultivo de bactérias	43
4.3.2 Meios para cultura de leveduras	43
4.4 PLASMÍDEOS	45
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DE BACTÉRIA - MINI-EXTRAÇÃO	46
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE LEVEDURA	47
4.7 GEL DE AGAROSE	48
4.8 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE DNA DE GEL DE AGAROSE	48
4.9 PRECIPITAÇÃO COM ACETATO DE AMÔNIO	49
4.10 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	49
4.11 DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO	49
4.12 OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS EM REAÇÕES DE PCR	50
4.13 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	51
4.14 PCR EM TEMPO REAL	52
4.15 SEQUÊNCIA SINAL MODIFICADA CONTENDO O FRAGMENTO N- TERMINAL DE INTERLEUCINA-B HUMANA	55
4. 16 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA BACTÉRIA <i>E. coli</i>	57
4. 17 TRANSFORMAÇÃO DE <i>S. cerevisiae</i>	57
4.18 TRANSFORMAÇÃO DE <i>P. pastoris</i>	58

4.19 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GHc POR METANOL EM <i>P. pastoris</i>	59
4.20 PREPARAÇÃO DE EXTRATO DE PROTEÍNA DE LEVEDURA	59
4.21 PRECIPITAÇÃO PARCIAL DA PROTEÍNA PRODUZIDA PELOS CLONES RECOMBINANTES	60
4.22 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (SDS-PAGE)	61
4.23 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA GHc EM CAMUNDONGOS E COELHOS	61
4.24 "WESTERN BLOT"	61
4.25 DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD	62
4.26 CURVA DE CRESCIMENTO	63
5 RESULTADOS	64
5.1 OBTENÇÃO DO FRAGMENTO CONTENDO O cDNA DE GHc	64
5.1.2 Obtenção do cDNA de GHc sem a sequência sinal	66
5.1.3 Clonagem do fragmento GHch	67
5.2 OBTENÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES DE <i>P. pastoris</i> PRODUTORAS DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE CARPA	68
5.2.1 Construção dos plasmídeos para expressão em <i>P. pastoris</i> pHILGH e pPICGH	68
5.2.2 Obtenção de transformantes de <i>P. pastoris</i> com pPICGH e pHILGH	69
5.2.3 Caracterização bioquímica do hormônio de crescimento de carpa produzido por GS115/HILGH	71
5.2.4 Caracterização imunológica do hormônio de crescimento de carpa produzido por GS115/HILGH	72
5.2.5 Caracterização da proteína GHc produzida por GS115/PICGH	73
5.2.6 Dosagem de GHc no meio de cultura de clones GS115/PICGH	74
5.2.7 Curvas de crescimento dos clones de <i>P. pastoris</i> recombinantes	74
5.2.8 Determinação do número de cópias de GHch inserido no genoma dos clones recombinantes de <i>P. pastoris</i>	76
5.3 OBTENÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES <i>S. cerevisiae</i> PRODUTORES DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE CARPA <i>H. molitrix</i> (GHch)	78
5.3.1 Construção do plasmídeo episomal para expressão de hormônio de crescimento de carpa <i>H. molitrix</i> em <i>S. cerevisiae</i>	79
5.3.2 Construção do plasmídeo pGEM-dGHd (δ -integração)	80

5.3.3 Construção do plasmídeo epissomal pMAILGH para expressão e excreção de GHch em <i>S. cerevisiae</i>	82
5.3.4 Construção do plasmídeo pGEM-dILGHd, adequado para transformação de <i>S. cerevisiae</i> por δ-integração	88
5.3.5 Construção do plasmídeo epissomal pMAKTGH para expressão e excreção em <i>S. cerevisiae</i> de GHc	91
5.3.6 Obtenção de clones recombinantes de <i>S. cerevisiae</i>	93
5.3.7 Caracterização bioquímica e imulógica da proteína GHch produzida por clones recombinantes de <i>S. cerevisiae</i>	95
5.3.8 Dosagem de GHc em meio de cultura por clones YPH252/ILGH	97
5.3.9 Curvas de crescimentodos clones de <i>S. cerevisiae</i> recombinantes	97
5.3.10 Obtenção do número de cópias de GHch inseridas no genoma dos clones recombinantes de <i>S. cerevisiae</i>	99
6 DISCUSSÃO	101
6.1 EXPRESSÃO DE GHch EM <i>P. pastoris</i>	101
6.2 EXPRESSÃO DE GHch EM <i>S. cerevisiae</i>	103
6.3 A EXPRESSÃO DE GH DE PEIXE EM LEVEDURAS E PERSPECTIVAS FUTURAS	104
7 CONCLUSÃO	107
ANEXO1 – Análise de sequências de hormônio de crescimento e codon usage de leveduras	109
ANEXO 2 – Dados brutos de PCR em Tempo Real	114
REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2010, o Ministério da Pesca e Aquicultura do Brasil (MPA) divulgou dados que mostravam o grande potencial do país, em se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado. A atividade pesqueira no país gera um PIB de R\$ 5 bilhões por ano. Além disso, mobiliza cerca de 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores e proporciona 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. O levantamento estatístico feito em 2010 mostra que nos últimos anos houve um crescimento significativo da atividade pesqueira. De 2003 para 2009, a produção na atividade pesqueira que era de 278 mil toneladas, passou para 415 mil toneladas, o que representa um aumento de aproximadamente 49% em menos de uma década (Brasil, 2010).

As espécies de peixes mais cultivadas no país variam entre as regiões, sendo que no norte do país as espécies mais cultivadas são o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o Pirarucu (*Arapaima gigas*). No nordeste e sudeste, destaca-se a Tilápia (*Tilapia sp*). No sul há um grande cultivo de diferentes espécies de Tilápias e Carpas, assim como ostras e mexilhões. No centro oeste destacam-se o Tambaqui, Pacus e Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Brasil, 2010).

Devido a esse grande crescimento na piscicultura do país, é economicamente interessante que os avanços na área da biotecnologia, venham a ser aplicados. Um aumento na taxa de crescimento de peixes é um fator econômico determinante que poderá ser alcançado com o uso de estratégias moleculares bem trabalhadas para este fim, como a produção de proteínas heterólogas em leveduras.

Em trabalho anterior, o grupo de pesquisas do Professor Spartaco Astolfi Filho (UFAM), já havia obtido a sequência codificadora hormônio de crescimento da carpa (GHc) *Hypophthalmichthys molitrix*. Neste trabalho buscou-se alcançar a expressão do GHc a partir de diversas linhagens de leveduras recombinantes que foram construídas e parcialmente caracterizadas.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi escolhida como hospedeira tanto para a expressão intracelular quanto para a expressão extracelular, devido ao seu bem conhecido potencial como hospedeira de proteínas heterólogas. Além disso, buscou-se desenvolver um novo sistema que possibilitasse secreção potencializada e para tanto foi empregada a sequência sinal da proteína “killer” da levedura

Kluyveromyces lactis fusionada ao fragmento de interleucina- β humana, que já havia sido descrita para essa finalidade.

A levedura *Pichia pastoris* também foi selecionada como uma alternativa para superprodução de Ghc tanto intracelular quanto extracelular, que seria conseguida graças ao promotor forte de expressão AOX1 e da alta densidade celular possível de ser alcançada com esta levedura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (GH)

A glândula pituitária é a grande responsável pela síntese e secreção do hormônio de crescimento ou somatotropina (GH). Entretanto, já foi verificado que a síntese de GH pode ocorrer em outros locais nos vertebrados. Em mamíferos, a síntese já foi localizada em linfócitos, placenta, tecido mamário, glândula pineal e cérebro (Butler e Le Roith, 2001).

Nas últimas décadas, muito esforço tem sido feito no sentido de se elucidar as funções e a regulação do GH. Presente em todos os vertebrados, já foi esclarecido que este hormônio está envolvido em muitas outras funções, além do crescimento somático. Pode-se destacar o desenvolvimento de gônadas, comportamento social, mobilização de energia e apetite (Canosa et al., 2007).

GH é capaz de modular a sensibilidade de tecidos à insulina. Entretanto, pouco é entendido quanto a sequência de eventos moleculares que levam à essas mudanças na sensibilidade tecidual. GH possui efeitos crônicos e agudos no metabolismo de carboidratos e lipídios. Sobre condições de privação de GH os efeitos são agudos, causando decréscimo na concentração de glicose sanguínea, estímulo de captura de glicose pelo músculo esquelético, estímulo de transporte de glicose e lipogênese em adipócitos isolados. Posteriormente, ocorrem os efeitos crônicos que são: aumento na concentração de glicose sanguínea, resistência a insulina, estimulação da lipólise (quebra de triglicerídeos) e inibição no transporte de glicose (Dominici et al., 2002).

Uma das principais ações de GH no crescimento é estimular a secreção de IGF-I ("fator de crescimento semelhante à insulina"). Tal estímulo resulta na proliferação de condrócitos, proliferação e diferenciação de mioblastos, levando ao crescimento ósseo e desenvolvimento muscular (Bowen, 2003).

A secreção de GH é regulada pela somatostatina, hormônio produzido no hipotálamo, responsável pela repressão da secreção do GH. Alguns estudos apontam que a somatostatina atua também na repressão da síntese e tradução do mRNA de GH, e não só na sua secreção (Sheridan e Hagemeister, 2010).

Com os avanços no desenvolvimento biotecnológico, houve uma grande

expansão no uso terapêutico de GH, sendo extremamente aplicado em tratamentos de nanismo, fratura óssea, queimaduras e outros (Lee et al., 1999; Murray et al., 2000).

A terapia de doenças relativas à deficiência de crescimento em humanos era primeiramente feita utilizando-se GH produzido a partir de extrato de glândulas pituitárias de cadáveres. A partir de 1985, esta prática foi descontinuada, devido ao relato de três mortes causadas pela doença Creutzfeldt-Jakob (DCJ) nos Estados Unidos e uma morte na Inglaterra. A DCJ é uma encefalopatia espongiiforme transmissível, causada por príons, que não possui tratamento. A princípio, acreditou-se que era uma doença causada por um vírus lento. Todavia, sabe-se hoje que se trata de uma doença fatal que leva à demência progressiva que logo se associa à ataxia cerebelar, deterioração visual e uma variedade de sintomas neurológicos. A pessoa se torna muda e imóvel no estágio terminal. Pessoas contaminadas morrem em cerca de 1 ano após o aparecimento dos sintomas (Johnston e Conly, 2001).

As vítimas relatadas da doença DCJ haviam feito terapia com GH de origem pituitária humana nas décadas de 60 e 70, o que levou à co-relação das mortes ao uso desta fonte de GH. A partir do ano de 1985, houve um grande avanço no uso de GH sintético, produzido por bactéria, considerado seguro, já que neste não há a possibilidade de contaminação viral (Milner, 1985). Este GH sintético é chamado, muitas vezes, de met-GH, devido à presença no aminoácido metionina no início da sequência protéica, necessária para dar início à tradução em bactéria.

2.2 GH DE PEIXE

As proteínas GH de peixes são extremamente conservadas nas várias espécies e gêneros (Tabela 1). Possuem cerca de 190 aminoácidos, aproximadamente 22KDa. Assim como em outros vertebrados, a síntese de GH em peixes ocorre na glândula pituitária e em outros tecidos extra-pituitários. De fato, foi possível identificar mRNA de GH em gônadas de truta e cérebro de dourado (Biga et al., 2004; Li et al., 2005; Canosa et al., 2007). A expressão de mRNA em tecidos extra-pituitários tem sido indicativo de que possam existir ações parácrinas (ação em células vizinhas) e autócrinas (ação na própria célula) de GH, resultando na

Tabela 1 – Alinhamento da sequência do cDNA da carpa *H. molitrix*, contra as sequências que apresentaram maior identidade no banco de dados do NCBI. Foram selecionados apenas os alinhamentos que tiveram um “e-value” de valor 0.

Nº de Acesso	Descrição	Máximo de Score	Cobertura	E-Value	Identidade Máxima
<u>EU157194.1</u>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>1170</u>	100%	0.0	100%
<u>X60473.1</u>	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i> (Bighead carp) mRNA for growth hormone	<u>1170</u>	100%	0.0	100%
<u>X60475.1</u>	<i>H.molitrix</i> (Silver carp) mRNA for growth hormone	<u>1153</u>	100%	0.0	99%
<u>X60474.1</u>	<i>C.idellus</i> (Grass carp) mRNA for growth hormone	<u>1147</u>	100%	0.0	99%
<u>AY170124.1</u>	<i>Megalobrama amblycephala</i> growth hormone (GH) mRNA, cds completas	<u>1131</u>	100%	0.0	98%
<u>AY616661.1</u>	<i>Ctenopharyngodon idella</i> growth hormone (gh) mRNA, cds completas	<u>1125</u>	100%	0.0	98%
<u>EU157193.1</u>	<i>Ctenopharyngodon idella</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>1114</u>	100%	0.0	98%
<u>EU147277.1</u>	<i>Cyprinus carpio</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>1114</u>	100%	0.0	98%
<u>EF611098.1</u>	<i>Schizothorax prenanti</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>1109</u>	100%	0.0	98%
<u>M27094.1</u>	<i>Ctenopharyngodon idella</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>1098</u>	100%	0.0	97%
<u>AF389238.1</u>	<i>Mylopharyngodon piceus</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>1092</u>	100%	0.0	97%
<u>DQ980027.1</u>	<i>Tinca tinca</i> growth hormone (GH) mRNA, cds completas	<u>1070</u>	100%	0.0	97%
<u>EU367959.1</u>	<i>Tanichthys albonubes</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>1053</u>	100%	0.0	96%
<u>AB299438.1</u>	<i>Gnathopogon caeruleus</i> GH mRNA for growth hormone, cds completas	<u>1037</u>	100%	0.0	96%
<u>AY643399.1</u>	<i>Pimephales promelas</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>1014</u>	100%	0.0	95%
<u>AF332563.2</u>	<i>Megalobrama terminalis</i> growth hormone mRNA, cds parciais	<u>1003</u>	89%	0.0	98%
<u>AF337033.1</u>	<i>Megalobrama amblycephala</i> growth hormone (GH) mRNA, cds parciais	<u>998</u>	89%	0.0	98%
<u>X13670.1</u>	<i>Cyprinus carpio</i> mRNA for growth hormone	<u>976</u>	100%	0.0	94%
<u>AY160977.1</u>	<i>Carassius auratus</i> X <i>Cyprinus carpio</i> X <i>Carassius cuvieri</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>976</u>	100%	0.0	94%
<u>AJ640135.1</u>	<i>Cyprinus carpio</i> mRNA for growth hormone 1 (gh1 gene)	<u>970</u>	100%	0.0	94%
<u>AF389237.1</u>	<i>Carassius cuvieri</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>953</u>	100%	0.0	93%
<u>EU157192.1</u>	<i>Carassius auratus</i> growth hormone mRNA, cds completas	<u>942</u>	100%	0.0	93%
<u>AF069398.1</u>	<i>Carassius auratus</i> growth hormone I mRNA, cds completas	<u>942</u>	100%	0.0	93%
<u>EU863219.1</u>	<i>Procypris rabaudi</i> growth hormone I mRNA, cds completas	<u>937</u>	100%	0.0	93%
<u>DQ350437.1</u>	<i>Carassius auratus</i> growth hormone precursor, mRNA, cds completas	<u>937</u>	100%	0.0	93%
<u>AY265352.1</u>	<i>Carassius auratus gibelio</i> growth hormone (GH) mRNA, cds completas	<u>920</u>	100%	0.0	92%
<u>DQ350436.1</u>	<i>Cyprinus carpio</i> growth hormone precursor, mRNA, cds completas	<u>920</u>	100%	0.0	92%
<u>AF069399.1</u>	<i>Carassius auratus</i> growth hormone II mRNA, cds completas	<u>920</u>	100%	0.0	92%
<u>M27000.1</u>	<i>Cyprinus carpio</i> growth hormone (GH) mRNA, cds completas	<u>915</u>	100%	0.0	92%

Tabela 1 – Alinhamento da sequência do cDNA da carpa *H. molitrix*, contra as sequências que apresentaram maior identidade no banco de dados do NCBI. Foram selecionados apenas os alinhamentos que tiveram um “e-value” de valor 0.

<u>EU368689.1</u>	Carassius auratus gibelio growth hormone mRNA, cds completas	<u>904</u>	100%	0.0	92%
<u>AJ640136.1</u>	Cyprinus carpio mRNA for growth hormone 2 (gh2 gene)	<u>893</u>	100%	0.0	92%
<u>AY707317.1</u>	Gymnocypris przewalskii growth hormone mRNA, cds completas	<u>887</u>	100%	0.0	91%
<u>DQ350434.1</u>	Myxocyprinus asiaticus growth hormone precursor, mRNA, cds completas	<u>876</u>	100%	0.0	91%
<u>AF140281.2</u>	Cirrhinus mirigala growth hormone precursor, mRNA, cds completas	<u>876</u>	100%	0.0	91%
<u>AY691183.1</u>	Labeo gonius growth hormone mRNA, cds completas	<u>870</u>	100%	0.0	91%
<u>AY691182.1</u>	Labeo fimbriatus growth hormone mRNA, cds completas	<u>870</u>	100%	0.0	91%
<u>GQ845447.1</u>	Schizothorax prenanti growth hormone mRNA, cds completas	<u>867</u>	100%	0.0	91%
<u>AY691184.1</u>	Labeo kontius growth hormone mRNA, cds completas	<u>865</u>	100%	0.0	91%
<u>AY053361.1</u>	Catla catla growth hormone protein mRNA, cds completas	<u>859</u>	100%	0.0	91%
<u>AY691181.1</u>	Morulius calbasu growth hormone mRNA, cds completas	<u>848</u>	100%	0.0	90%
<u>AY691180.1</u>	Labeo bata growth hormone mRNA, cds completas	<u>837</u>	100%	0.0	90%
<u>AY375302.1</u>	Ictiobus bubalus growth hormone II (GHII) mRNA, cds completas	<u>832</u>	100%	0.0	90%
<u>AF140282.2</u>	Catla catla growth hormone precursor, mRNA, cds completas	<u>822</u>	100%	0.0	90%
<u>AF332594.1</u>	Cyprinus carpio growth hormone (GH) mRNA, cds parciais	<u>821</u>	89%	0.0	92%
<u>AF416490.1</u>	Labeo rohita growth hormone protein precursor RNA, cds completas	<u>817</u>	100%	0.0	90%
<u>AF134200.1</u>	Labeo rohita growth hormone precursor, mRNA, cds completas	<u>817</u>	100%	0.0	90%
<u>AY375301.1</u>	Ictiobus bubalus growth hormone I (GHI) mRNA, cds completas	<u>815</u>	100%	0.0	89%
<u>AF458105.1</u>	Cirrhinus molitorella growth hormone mRNA, cds completas	<u>815</u>	88%	0.0	92%
<u>AF401273.1</u>	Carassius auratus auratus growth hormone II precursor (GH-II) mRNA, cds parciais	<u>809</u>	89%	0.0	92%
<u>AF401272.1</u>	Carassius auratus auratus growth hormone I precursor (GH-I) mRNA, cds parciais	<u>809</u>	89%	0.0	92%
<u>U28388.1</u>	Carassius auratus growth hormone mRNA, cds parciais	<u>809</u>	89%	0.0	92%
<u>NM_001020492.2</u>	Danio rerio growth hormone 1 (gh1), mRNA >gb BC116501.1	<u>804</u>	100%	0.0	89%
<u>AJ937858.1</u>	Danio rerio mRNA for growth hormone (gh gene)	<u>793</u>	100%	0.0	89%
<u>DQ350432.1</u>	Paramisgurnus dabryanus growth hormone precursor, mRNA, cds completas	<u>771</u>	100%	0.0	88%
<u>DQ350433.1</u>	Misgurnus anguillicaudatus growth hormone precursor, mRNA, cds completas	<u>760</u>	100%	0.0	88%
<u>AY334554.1</u>	Misgurnus anguillicaudatus growth hormone mRNA, cds completas	<u>737</u>	100%	0.0	87%
<u>GU937849.1</u>	Carpilodes cyprinus growth hormone (GHI) gene, cds parciais	<u>728</u>	95%	0.0	88%

produção local de “fator de crescimento semelhante à insulina”(IGF-1) ou outros fatores relacionados à outras funções além do crescimento somático (Waters et al., 1999).

Em peixes, o GH está relacionado ao crescimento, metabolismo lipídico e protéico, reprodução, função imune, aspectos comportamentais e, diferencialmente dos outros vertebrados, está também relacionado à osmorregulação. O aumento de GH na circulação de peixes, durante o processo de adaptação de água doce para água salgada é essencial e fortemente ligado com a ativação de potencial resposta imune não-específica e estimulação de macrófagos (Ryynanen et al., 2006).

Os cDNAs codificadores de GH de vários peixes já foram clonados e expressos em vários sistemas como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* e outros (Tabela 2). Em *S. cerevisiae*, o cDNA de truta (*Oncorhynchus mykiss*) foi clonado em plasmídio epissômico, controlado por promotor constitutivo de *S. cerevisiae* (Ppgk – promotor do gene da fosfoglicerato quinase). A proteína GH expressa (cerca de 3% das proteínas totais) foi administrada na alimentação de larvas de Tilápia e produziu aumento no crescimento desses peixes (Jin et al., 1999). Em *P. pastoris*, foram clonados os cDNAs de Carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) e Seabass japonês (*Lateolabrax japonicus*) (Wei et al., 2008; Wang et al., 2003). A clonagem do cDNA de GH da carpa *C. idella*, resultou em uma produção de aproximadamente 50 mg/L de proteína GH (Wei et al., 2008).

Em piscicultura, a administração exógena de GH recombinante, assim como a produção de peixes transgênicos resultam em um grande aumento no crescimento dos peixes. Pitkanen e colaboradores (1999) verificaram um aumento de cerca de 14 vezes no peso de *Salvelinus alpinus* (Salvelino-ártico) com 10 meses de idade, em comparação com o controle (animal selvagem). Além da alteração no tamanho, também foi observado um aumento na quantidade de DNA em tecidos do fígado, coração e músculo. Isto sugere que a suplementação com GH provoca um aumento no tamanho e número de células, assim como possível poliploidia das células destes tecidos (Pitkanen et al., 2001). Estudos da carcaça de peixes transgênicos que super expressam GH demonstram que estas contêm maior conteúdo de proteínas e menor conteúdo de gordura (Raven et al., 2008).

Tabela 2 – Expressão de GH de peixes em microrganismos.

Microorganismo Hospedeiro	Origem do GH	Referência
<i>E. coli</i>	Truta (<i>Salmo gairdneri</i>)	Agellon e Chen, 1986
<i>E. coli</i>	Enguia japonesa (<i>Anguilla japonica</i>)	Saito et al., 1988
<i>E. coli</i>	Atum (<i>Thunnus thynnus</i>)	Sato et al., 1989
<i>E. coli</i>	Salmão (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Nicoll et al., 1987
<i>E. coli</i>	Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Rentier-Delrue et al., 1989
<i>E. coli</i>	Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Rentier-Delrue et al., 1989
<i>E. coli</i>	Enguia (<i>Anguilla japonica</i>)	Sugimoto et al., 1990
<i>E. coli</i>	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	Fine et al., 1993
<i>E. coli</i>	Savelha (<i>Seriola quinqueradiata</i>) e Linguado (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Watahiki et al., 1992
<i>E. coli</i>	Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Lorens et al., 1993
<i>E. coli</i>	Atum (<i>Acanthopagrus latus houttuyn</i>)	Tsai et al., 1993
<i>E. coli</i>	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	Zhao et al., 1996
<i>E. coli</i>	Atum (<i>Acanthopagrus latus</i>)	Tsai et al., 1995
<i>E. coli</i>	Robalo Riscado (<i>Morone saxatilis</i>).	Cheng et al., 1995
<i>E. coli</i>	Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Martínez-Barberá et al., 1994
<i>E. coli</i>	Peixe Dourado (<i>Carassius auratus</i>)	Mahmoud et al., 1998
<i>E. coli</i>	Carpa Capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	Wang et al., 2001
<i>E. coli</i>	Peixe Gato Indiano (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	Anathy et al., 2001
<i>E. coli</i>	Carpa da Índia (<i>Labeo rohita</i>)	Thayanithy et al., 2002
<i>E. coli</i>	Peixe Dourado (<i>Carassius auratus</i>)	Chan et al., 2003
<i>E. coli</i>	Peixe-Gato Gigante (<i>Pangasianodon gigas</i>)	Promdonkoy et al., 2004
<i>E. coli</i>	Peixe- Rei (<i>Odontesthes bonariensis</i>)	Sciara et al., 2006
<i>E. coli</i>	Dourada (<i>Sparus sarba</i>)	Deane e Woo, 2006
Cianobactéria (<i>Aegmellum quadruplicatum</i>)	Salmão (<i>Oncorhynchus masou</i>)	Kawata et al., 1991
Baculovirus (TnNPV)	Peixe Dourado (<i>Carassius auratus</i>)	Lin et al., 1997
Baculovirus (BMNPV)	Carpa (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	Ho et al., 1998
<i>S. cerevisiae</i>	Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Jin et al., 1999
<i>P. pastoris</i>	Carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	Wang et al., 2003
<i>P. pastoris</i>	Seabass japonês (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	Wei et al., 2008

Um estudo direcionado à análise das células miogênicas e do metabolismo muscular em salmão transgênico revelou que o aumento de crescimento observado, pode estar diretamente relacionado ao aumento de células miogênicas e à idade destes peixes (Levesque et al., 2008).

O GH da carpa *Hypophthalmichthys molitrix*, objeto desse trabalho, possui 210 aminoácidos e peso molecular de 23580 Da. A sequência dos nucleotídeos codificadores de GH de *H. molitrix* apresenta uma conservação que varia de 98 a 100% de identidade com as sequências codificadoras de GH de outras espécies de carpas. Entre outros de peixes, é possível verificar uma similaridade de aminoácidos, aproximadamente, 95%.

Figura 1 – Alinhamento das sequenicas de aminoácidos da proteína GH das espécies de carpas *H. molitrix* (nossa) e *C. idella* (Fonte: NCBI).

Figura 2 – Alinhamento das sequenicas de aminoácidos da proteína GH das espécies de carpas *H. molitrix* e *C. carpio*. Setas indicam aminoácidos divergentes entre as sequências (Fonte: NCBI).

Como pode ser observado na Tabela 2, as sequências codificantes dos GHs das carpas *Cyprinus carpio* e *Ctenopharyngodon idella* foram as sequências de GHs de carpas mais clonadas entre todos os microorganismos presentes na Tabela. As sequências de cDNA dos GHs dessas 2 espécies de carpa possuem exatamente o mesmo tamanho da sequência de cDNA do GH de *H. molitrix* (633 pb), alvo de estudo desse trabalho. As sequências dos cDNAs dos GHs de *C. idella* e *H. molitrix*,

diferem em 8 nucleotídeos, sendo que as sequências de aminoácidos destes dois GHs são exatamente iguais (Figura 1). Já entre as sequências dos cDNAs dos GHs de *C. carpio* e *H. molitrix*, ocorre uma divergência de 10 nucleotídeos e a divergência na sequência de aminoácidos ocorre em 2 posições (Figura 2).

2.3 EXPRESSÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM Saccharomyces cerevisiae

O uso de sistemas de expressão em leveduras cresceu muito nas últimas décadas, sendo que uma grande variedade de proteínas de origem animal e vegetal é produzida com sucesso em diferentes sistemas de expressão de leveduras. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* vêm sendo utilizadas, com grande sucesso, como hospedeiras para produção de proteínas heterólogas. Por serem as mais utilizadas, um grande volume de informações sobre essas leveduras se encontra disponível. Outras leveduras têm apresentado resultados satisfatórios na produção de proteínas heterólogas, como *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces lactis*. Petruco-Danila e colaboradores (2010) descreveram sistemas de expressão, peptídeos sinais, processamento pós traducional e sistemas de secreção que funcionam de forma eficiente na levedura *S. pombe*. Uma grande variedade de técnicas e linhagens próprias para produção de proteínas heterólogas encontram-se hoje disponíveis para a levedura *K. lactis* (Van Ooyen et al., 2006).

A facilidade na utilização de leveduras para produção de proteínas heterólogas, se dá principalmente pelo fato de ser um organismo unicelular, fazendo com que a sua manipulação seja muito parecida com a manipulação de bactérias. Além disto, as leveduras são capazes de realizar modificações pós traducionais, fator que não pode ser alcançado quando as proteínas são produzidas em bactérias. Proteínas de origem animal que exigem modificações tais como glicosilação (Kuruzinska et al., 1987), acilação (Towler et al., 1988) e fosforilação (Miyamoto et al., 1985) podem ser produzidas de forma eficiente em leveduras. Estas modificações contribuem para a integridade estrutural do produto final e garantem a atividade biológica do produto.

Em 1981, foi publicado o primeiro artigo relatando a expressão de proteína heteróloga em *S. cerevisiae*. Células de *S. cerevisiae*, foram capazes de expressar um interferon humano, que se mostrou biologicamente ativo (Hitzeman et al., 1981).

O sucesso no uso de *S. cerevisiae* nas últimas décadas gerou um grande

acúmulo de informações sobre este organismo, assim como o desenvolvimento de diversas técnicas para sua manipulação. Foram desenvolvidos marcadores auxotróficos e promotores naturais fortes constitutivos ou induzíveis. Essa grande quantidade de informações sobre *S. cerevisiae* permite que seja possível selecionar características na expressão da proteína heteróloga desejada, como qual o promotor que será utilizado para direcionar a expressão, modulação do número cópias do cassete de expressão utilizado, o marcador de seleção que será utilizado, padrão de replicação do vetor utilizado, integração ou não ao genoma da levedura (Strausberg e Strausberg, 2001)

S. cerevisiae possui um genoma extremamente compacto de aproximadamente 12.000 Kb, constituído por pouco menos de 6000 genes, cujas informações estão disponíveis em rede desde 1996 (Goffeau et al., 1996). Devido a este genoma extremamente compacto, a introdução de material genético pode causar um estresse para levedura, gerando alta instabilidade de algumas linhagens, principalmente quando o produto gerado pode causar toxicidade.

2.4 A LEVEDURA *Pichia pastoris*

A levedura *P. pastoris* chamou atenção nos anos 1970, devido a sua capacidade de utilizar metanol como fonte de carbono. Nessa época, houve um grande interesse na utilização desta levedura como SCP ("Single Cell Protein") para suplementação de alimentação de animais. Entretanto, a crise do petróleo dos anos 70, levou a um grande aumento no preço do petróleo e atenção se desviou das leveduras que como a *Pichia* são metilotróficas, para produtos oriundos da soja. Na década seguinte, de *P. pastoris* passou a ser considerada para a produção de proteínas heterólogas e foi a partir daí que pesquisadores da SIBIA ("Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc.") isolaram o gene e o promotor da enzima álcool oxidase, fortemente expressa nesta levedura. A partir daí foram desenvolvidos vetores, linhagens e protocolos para sua manipulação genética. A combinação das técnicas de fermentação para SCP e a utilização do forte promotor isolado, fez com que fossem alcançados altos níveis de produção de proteínas heterólogas, o que chamou a atenção da área científica para este organismo novamente (Cereghino e

Cregg, 2000). Na Tabela 3 pode-se encontrar uma série de exemplos do uso de *P. pastoris* para a expressão heteróloga de proteínas.

Tabela 3- Proteínas produzidas utilizando-se o sistema de *Pichia pastoris*

Proteína expressa	Função	Nível de expressão
Cadeia pesada de Serotipo F de <i>Clostridium botulinum</i>	Antígeno	205mg/Kg de células
Enzima fitase de <i>Escherichia coli</i>	Uso na indústria de alimentação animal para liberação de fosfato inorgânico	117~U/ml
Proteína de fusão "cellulose binding module" de <i>Neocallimastix patriciarum</i> e lipase de <i>Candida antarctica</i>	Lipase	1,3 g/L
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	Catalisa quebra de triglicérides	19 U/mL
Dehidrogenase cellobiose de <i>Trametes versicolor</i>	Oxidação de grupos de ponta reduzida em celobiose.	225 U/mL
Laccase de <i>Trametes versicolor</i>	Fenoloxidase	23,9 U/mL
Antígeno de <i>Boophilus microplus</i>	Protégé o gado de infestação por <i>B. microplus</i>	550,0 mg/L
Catepsina L de <i>Pandalus borealis</i> (camarão)	Proteinase cysteine	60,0 mg/L
Cadeia leve de enterokinase bovina (EKL)	Proteinase serine duodenal	350,0 mg/L
Lactoferrina equina	Proteína ligante a metal, família das transferinas	40,0 mg/L
Endostatina de camundongo	Supressora de crescimento de tumor	133,33 mg/L
Fragmento Anti-HBs Fab	Prevenção e tratamento do vírus da hepatite B	50,0 mg/L
Receptor de Dopamina D2S	Proteína G	3–13 pmol/mg
DNA topoisomerase I (hTopo I)	Replicação do DNA, transcrição, recombinação e condensação do cromossomo	11–58 mg/L
Albumina	Ligação e transporte, pressão osmótica	13,4 mg/g
Proteinase cisteína (Mir1) de milho	Germinação de sementes, senescência	Insolúvel/Inativa
α -amylase (Amy 1A/3D) de arroz	Hidrólise de amido	340,0 mg/L
β -D-fructofuranosidase (<i>Osβfruct3</i>) de arroz	Hidrólise de sacarose	0,35 U/L
Nucleoproteína viral Measles (MeN)	Responsável pelo empacotamento do genoma viral	29% de proteína total

Fonte: Adaptada de Macauley-Patrick et al., 2005.

O forte promotor de *P. pastoris*, que é considerado como peça principal no seu alto potencial de organismo hospedeiro de proteínas heterólogas, é o promotor do gene *AOX1* (álcool oxidase). O gene *AOX1* é regulado transcricionalmente sendo que o mecanismo de repressão/desrepressão é extremamente sensível; em presença de metanol, cerca de 5% do RNA com cauda poli A total corresponde ao transcrito *AOX1*. Na presença de outra fonte de carbono é indetectável a presença de produto de *AOX1* (Cereghino e Cregg, 2000). Para a ativação da indução, é necessário que não haja qualquer traço de glicose ou outra fonte de carbono para se garantir a eficiência do promotor. A alta sensibilidade do promotor *AOX1* é muito interessante, pois no caso de se trabalhar com uma proteína heteróloga que seja tóxica para a célula, é possível alcançar uma alta densidade celular e ativar o sistema de expressão somente no momento oportuno para que sejam alcançados altos níveis de produção. Uma vez que a proteína heteróloga possa ser deletéria para a célula quando expressa em altos níveis, a possibilidade de manter a sua expressão em um estado reprimido ou desligado é altamente desejável. Trata-se de uma importante precaução para minimizar a seleção de mutantes que não expressam o produto heterólogo durante o crescimento da cultura (Byrne et al., 2005; Ilgen, 2005). A Tabela 4 descreve uma série de vantagens e desvantagens no uso do promotor do gene *AOX1*.

Tabela 4 - Vantagens e desvantagens do uso do promotor *AOX 1* de *P. pastoris*.

Vantagens	Desvantagens
A transcrição do gene heterólogo é fortemente regulada e controlada por um mecanismo de repressão/indução.	O monitoramento do metanol é usualmente difícil.
Altos níveis de proteína heteróloga podem ser expressos, mesmo que ela seja tóxica para a célula.	Existe o risco de incêndio ao lidar com metanol. Estocar grandes quantidades de metanol não é desejável, já que pode causar cegueira irreversível.
A repressão obtida pela fonte inicial de carbono garante que um bom crescimento celular seja atingido antes que o produto gênico seja superexpresso.	Metanol é um derivado do petróleo muito tóxico, o que pode não ser seguro na produção de certos produtos alimentícios e aditivos.
A indução da transcrição é facilmente ativada pela adição de metanol.	Duas fontes de carbono são necessárias, com a troca de uma fonte por outra em um momento preciso.

Fonte: Adaptada de Macauley-Patrick et al., 2005.

Além das interessantes características de crescimento, a levedura *P. pastoris*, assim como *S. cerevisiae*, é considerada totalmente segura para humanos, sendo reconhecida como “GRAS” (“Generally Regarded As Safe”).

O número de informações e técnicas de biologia molecular que facilitam o trabalho com *P. pastoris* vem crescendo muito nos últimos anos. Em 2009 foi realizado e liberado para acesso público o genoma completo da linhagem de *P. pastoris* GS115 (De Schutter et al., 2009).

Células de *P. pastoris* podem ser transformadas por eletroporação, esferoplasto ou métodos utilizando-se lítio e polietilenoglicol, como em *S. cerevisiae*. *P. pastoris* é capaz de realizar recombinação homóloga de forma eficiente a partir da introdução de um DNA linearizado que possua sequência homologa à sequência presente no genoma de *P. pastoris* ladeando a sequência de interesse de integração ao genoma. Todavia, a recombinação homóloga não acontece em tão alta frequência quanto ocorre em *S. cerevisiae* (Cereghino e Cregg, 2000).

Para a manipulação genética de *P. pastoris*, foi necessário que fossem isolados mutantes. Todas as linhagens de *P. pastoris* são derivadas da linhagem NRRL-Y 11430 ("Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL"). Os vetores de expressão desenvolvidos para *P. pastoris* são todos bifuncionais para *Escherichia coli* e *P. pastoris*, o que facilita muito as etapas de manipulação dos vetores. São poucos os marcadores auxotróficos empregados em *P. pastoris*. Entretanto, já foram selecionadas linhagens mutantes com marcadores auxotróficos em mais de 3 genes, como JC 308- *ade1*, *arg4*, *his4*, e *ura3*. O marcador mais utilizado é *his4*, que foi desenvolvido em 1985 (Cregg et al., 1985).

2.5 TRANSFORMAÇÃO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE POR δ -INTEGRAÇÃO

Em um estudo das bases moleculares do gene *SUP4* de *S. cerevisiae*, foi encontrado e descrito o retrotransposon *Ty1* de *S. cerevisiae*. Neste estudo, foram identificadas regiões repetitivas no genoma com localização variável (Cameron et al., 1979). Em *S. cerevisiae*, existem pelo menos 5 famílias de *Ty* (*Ty1-Ty5*) que têm sido bem estudadas quanto às suas sequências. Estudos mostram que as famílias de transposons *Ty1* e *Ty2* são as que apresentam um maior número de similaridades (Voytas, 1996; Plant et al., 2000).

Em 1996, quando foi liberada a sequência completa do genoma haplóide da linhagem S288C de *S. cerevisiae*, foi possível verificar que haviam 217 cópias do

elemento Ty1 no genoma desta levedura, sendo que destas 217 cópias, 32 apresentavam sequências completas do transposon. Do transposon Ty2, foram verificadas 32 cópias, sendo que 13 delas são cópias completas (Goffeau et al., 1996; Goffeau et al., 1997; Kim et al., 1998; Plant et al., 2000). Os elementos Ty representam aproximadamente 3% do genoma total de *S. cerevisiae* (Goffeau et al., 1996; Garfinkel et al., 2005).

As “Long Terminal Repeats” (LTR), que também chamadas de elementos δ , ladeiam todos os elementos Ty e são sequências conservadas em Ty1 e Ty2. Os elementos δ são considerados cicatrizes evolutivas de *S. cerevisiae*. A presença de elementos δ mostra que naquele local do genoma foram inseridas e retiradas informações genéticas por transferência lateral. Essas marcas, presentes em abundância no genoma, já foram empregadas como alvos para inserção de informações genéticas no genoma de linhagens de *S. cerevisiae* haplóides (Saito et al., 1996; Kim et al., 1998) e diplóides selvagens (Guerra et al., 2006), conforme descrito abaixo.

A possibilidade da integração de diversas cópias de informação gênica de interesse pudesse ser realizada com sucesso, fez com que nosso grupo desenvolvesse um sistema que conseguiu com sucesso realizar a integração gênica em linhagens industriais de *S. cerevisiae*. Foi construído o vetor pGEM-TEasy- δ , que possui a sequências do elemento δ com sítios de clonagem no meio. Isso permite que haja recombinação homóloga entre o vetor contendo a sequência de interesse e as sequências δ presentes no genoma da levedura, seja ela haplóide ou diplóide. Como o vetor não possui marca de seleção, é realizada uma co transformação juntamente com o plasmídeo pAJ50 (2 μ m, *LEU2*, G418^R). O plasmídeo pAJ50 permite que seja feita uma pré-seleção dos clones, seja por complementação gênica de auxotrofia em linhagens haplóides; ou por aquisição de resistência à geneticina, em linhagens diplóides. Após esta pré-seleção, os clones transformantes desejados são selecionados pelo fenótipo expresso a partir da integração. Quando não é possível detectar um fenótipo, como no caso de um gene repórter, deve-se realizar uma análise de sequência, por amplificação do gene de interesse utilizando-se o DNA genômico da levedura como molde. No trabalho realizado pelo nosso grupo, foram selecionados transformantes oriundos da linhagem industrial empregada em usinas de fermentação alcoólica (PE-2) contendo mais de 16 cópias da informação genética

inseridas (c-DNA da glicoamilase de *A. awamori*) estavelmente no genoma (Guerra et al., 2006).

2.6 FRAGMENTO DE INTERLEUCINA- β HUMANA POTENCIALIZANDO A SECREÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

A interleucina β (IL) é uma citocina primariamente sintetizada como um precursor protéico inativo de 31 KDa e posteriormente é processada em sua forma ativa de 17 KDa. Possui atividades proinflamatórias e imunoestimulatórias e é naturalmente secretada, apesar da ausência de sequência sinal específica (Rubartelli et al., 1990). Apesar de ser produzida em diversos tipos de células, é especialmente encontrada em monócitos ativados no sangue periférico.

Em 1999, Lee e colaboradores utilizaram a um fragmento de 24 aminoácidos da forma ativa da proteína da interleucina- β humana [resíduo Ser (5) ao Ala (28)], que foi fusionado à sequência sinal da proteína “killer” de *Kluyveromyces lactis*, para potencializar a secreção. Isto resultou em um aumento de cerca de 3-4 vezes na secreção de hG-CSF (“Human granulocyte stimulating factor”), uma proteína de 19,6 KDa). Neste mesmo trabalho, foi verificado que a inibição da N- glicosilação da interleucina humana, por adição de tunicamicina (capaz de inibir a glicosilação de proteínas) no meio de cultura, levou à níveis de secreção próximos de zero de hormônio de crescimento humano. Isso evidenciou a grande importância da N- glicosilação do fragmento de interleucina humana como potencializador da secreção de proteínas heterólogas. A N- glicosilação que ocorre na levedura *S. cerevisiae* é bem diferente daquela que ocorre em humanos. Apesar da glicosilação ocorrer em *S. cerevisiae* de maneira eficiente para gerar a potencialização da secreção, conforme descrito em Lee e colaboradores (2003), este processo promove a adição de apenas grupos de manose, não adicionando monossacarídeos mais complexos, como N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Wildt e Gerngross, 2005) (Figura 3).

Figura 3 - Características da glicosilação em humanos e em leveduras.
Fonte: Adaptada de Wildt e Gerngross, 2005.

Com o objetivo de investigar o efeito da N-glicosilação na secreção potencializada pela interleucina humana, Han et al. (2005), desenvolveram estudos, onde diferentes condições para secreção de hG-CSF foram avaliadas. Os mutantes criados haviam sofrido perda do sítio da N-glicosilação ou a introdução de um sítio a mais de N-glicosilação. Foi visto que, a adição de um sítio de N-glicosilação no resíduo 15 da interleucina humana (Figura 4), resultou no aumento de cerca de 2 vezes nos níveis de secreção, quando comparada com a sequência selvagem.

Figura 4 - Sequência de interleucina β humana utilizada para potencializar a secreção em *S. cerevisiae* destacada em negrito. A) Sequência sem alterações (Lee et al., 2003). B) Sequência melhorada a partir da adição de um sítio a mais de glicosilação, indicado pelas setas vermelhas nos resíduos 7 e 15 (Han et al., 2005).

Neste trabalho, foram construídos clones recombinantes derivados da levedura *P. pastoris* que expressam intracelularmente e outros que expressam e excretam o hormônio de crescimento da carpa *H. molitrix*. Os clones de expressão interna poderiam vir a ser utilizados como forma de suplementação na alimentação de peixes. Os clones de expressão e excreção visavam à obtenção de altos níveis de hormônio de crescimento de *H. molitrix*, possibilitando a purificação da proteína heteróloga em grandes quantidades.

A expressão em *S. cerevisiae* também foi feita de modo que fossem obtidos clones recombinantes com expressão interna e com expressão e excreção da proteína heteróloga, visando às mesmas aplicações futuras de *P. pastoris*. Para os clones com expressão e excreção, seria empregado o fragmento de interleucina humana fusionado a uma sequência sinal. Para isso, seria realizada a síntese da sequência sinal da proteína “killer” da levedura *K. lactis* fusionada ao fragmento de interleucina β humana, contendo os dois sítios de glicosilação descritos por Han e colaboradores (2005). A síntese seria feita de modo que a sequência sintetizada seguisse o “codon usage” da levedura *S. cerevisiae*.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi a construção e caracterização de linhagens recombinantes derivadas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* que tivessem a capacidade de produzir o hormônio de crescimento da carpa *Hypophthalmichthys molitrix* (GH_{ch}), com expressão intracelular e extracelular (expressão e excreção).

Objetivos específicos:

Os objetivos específicos deste trabalho foram a expressão de GH_{ch} nas leveduras:

- *S. cerevisiae*:

- expressão intracelular; e,
- expressão extracelular empregando excreção potencializada resultante de fusão da "sequência sinal da proteína "killer" da levedura *Kluyveromyces lactis*" e um "fragmento da proteína interleucina- β humana".

- *P. pastoris*:

- expressão intracelular; e,
- expressão extracelular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS DE BACTÉRIA

A linhagem de bactéria *E. coli* hospedeira utilizada no trabalho é de origem laboratorial e encontra-se estocada no Banco de Linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

♦ *Escherichia coli* DH5 α : *supE44*; Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15); *hsdR17 recA1*; *endA1*; *gyrA96*; *thi-1*; *relA1* (Meselson e Yuan, 1968).

4.2 LINHAGENS DE LEVEDURA

Todas as linhagens de leveduras utilizadas no trabalho, de coleções de cultura e selvagens empregadas em processos industriais, encontram-se estocadas no Banco de Linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Tabela 5).

Tabela 5 - Linhagens de levedura

LINHAGENS	ESPÉCIE, GENÓTIPO, CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERÊNCIA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
S288C	<i>MATα</i> , wt, <i>CAN1</i> , linhagem padrão, com genoma seqüenciado.	Goffeau et al., 1997
YPH250 ^a	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp1-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>CAN1</i>	Sikorski e Hieter, 1989
YPH252 ^a	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp-d1</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-d1</i> , <i>CAN1</i> , G418 ^S (MIC: 50 μ g/ml)	Sikorski e Hieter, 1989
<i>Pichia pastoris</i>		
GS115	<i>his4</i>	Invitrogen Corporation - Research Corporation Technologies, Inc.

G418^S : fenótipo sensível a geneticina G418
wt: linhagem selvagem, sem marcas auxotróficas, "wild type"
a: linhagem gentilmente cedidas por R.S. Sikorski e P. Hieter.
MIC: concentração inibitória mínima de G418.

4.3 MEIOS DE CULTURA

4.3.1 Meios para cultivo de bactérias

Neste trabalho foram empregados os seguintes meios de cultivo de bactérias:

LB: Triptona (1.0%), extrato de levedura (0.5%), NaCl (1.0%).

Obs: Ágar (1.5%) para meio LB sólido

SOB: Bactotriptona (1.0%), extrato de levedura (0.5%), NaCl (10mM), KCl (2.5 mM), MgCl₂ (10mM), MgSO₄ (10mM).

SOC: Meio SOB (100ml), solução glicose 2M estéril (1ml), solução de Mg²⁺ 2M (MgSO₄ 1M + MgCl₂ 1M) (1ml).

2xYT: Bactopeptona (1.0%), extrato de levedura (0.5%), NaCl (1.0%), pH 7.4

Para seleção de clones transformantes, foi utilizada ampicilina na concentração final de 100µg/µl, que foi adicionada aos meios após terem atingido a temperatura de, no máximo, 50 °C.

Os reagentes para o preparo dos meios de cultura foram de procedência da marca BD (Becton, Dickinson and Company) e os sais da marca Sigma – Aldrich.

Todos os meios de cultura foram preparados segundo Sambrook et al. (1989) e esterilizados em autoclave (120 Kgf/cm², por 15 minutos) antes de serem utilizados.

4.3.2 Meios para cultura de leveduras

Neste trabalho foram empregados os seguintes meios de cultivo de leveduras:

YPD (meio completo): Extrato de levedura (1.0%), peptona (2.0%), dextrose (2.0%).

SD (meio mínimo): YNB w/ aa (yeast nitrogen base without aminoacids – base nitrogenada de levedura sem aminoácidos) (0.67%), dextrose (2.0%)

Para elaboração de meios sólidos, foi adicionado ágar 2.0%.

Para complementação de meio mínimo (SD) foram empregados os seguintes aminoácidos: triptofano (30µg/ml), leucina (20 µg/ml), lisina (30 µg/ml), histidina (30 µg/ml); e/ou as seguintes bases nitrogenadas: uracila (20 µg/ml), adenina(20 µg/ml); nas concentrações finais indicadas em cada caso. As soluções de aminoácido e base nitrogenada foram esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio já esterilizado por autoclavação (120 Kgf/cm² – 15 minutos), após terem atingido a temperatura máxima de 50 °C.

BMU-U (meio para expressão de *P. pastoris*): Extrato de levedura (1.0%), peptona (2.0%), YNB w/ aa (1.34%), biotina (4x10⁻⁵%), tampão fosfato (10mM).

BMY-U (meio para expressão de *P. pastoris*): BMU-U, glicerol (1.0%).

BMMU-U (meio para expressão de *P. pastoris*): BMU-U, metanol/ (0.5%).

SD-Biotina (meio mínimo para seleção de transformantes de *P. pastoris*): YNB w/ aa (0.67%), dextrose (2.0%), Biotina (4x10⁻⁵%)

A solução de biotina foi feita em estoque na concentração de 0,01%, esterilizada por filtração e adicionada ao meio já esterilizado por autoclavação (120 Kgf/cm², por 15 minutos), após terem atingido a temperatura de, no máximo, 50 °C.

Os reagentes para o preparo dos meios de cultura foram de procedência da marca BD (Becton, Dickinson and Company), sais da marca Sigma – Aldriche, e o metanol da marca MERCK.

Quando não especificado, todos os meios e soluções foram esterilizados em autoclave (120 Kgf/cm², por 15 minutos).

4.4 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos empregados no trabalho se encontram na Tabela a seguir:

Tabela 6- Plasmídeos empregados neste trabalho

(continua)

Nome	Descrição	Referência
pGEM-TEasy- δ (3348 pb)	Plasmídeo pGEM-TEasy com adição do elemento δ	Guerra et al., 2006
pPIC9K ^(a) (9276 pb)	Plasmídeo comercial de transformação genética de <i>P. pastoris</i>	Invitrogen Corporation - Research Corporation Technologies, Inc.
pHIL-D2 ^(a) (8209 pb)	Plasmídeo comercial de transformação genética de <i>P. pastoris</i> .	Invitrogen Corporation - Research Corporation Technologies, Inc.
pAJ50 (9000 pb)	(2 μ m, <i>LEU2</i> , G428 ^R)	Jimenez & Davis, 1980.
pcGH1 (3274 pb)	Plasmídeo pUC18 com a inserção do gene de GH de <i>H. molitrix</i> clonado no sítio <i>Eco</i> RI	Santos, 2000.
pMA91 (9500 pb)	Plasmídeo episomal de expressão em <i>S. cerevisiae</i> . Possui promotor forte constitutivo e o terminador PGK do gene de <i>S. cerevisiae</i> . Pode ser empregado em <i>S. cerevisiae</i> (marca auxotrófica <i>LEU2</i>) e em <i>E. coli</i> (marca ampicilina)	Mellor et al., 1983.
TOPOGH (4540 pb)	Plasmídeo comercial pCR [®] 2.1-TOPO [®] com a inserção de Ghch	Construído neste trabalho.
TOPOGHSAL (4509 pb)	Plasmídeo comercial pCR [®] 2.1-TOPO [®] com a inserção de Ghch ladeado por sítio de restrição <i>Sal</i> I	Construído neste trabalho
TOPOSSILGH (4692 pb)	Plasmídeo comercial pCR [®] 2.1-TOPO [®] contendo a inserção de Ghch fusionada à sequência sinal modificada	Construído neste trabalho.
TOPGKSILGH (6558 pb)	Plasmídeo comercial pCR [®] 2.1-TOPO [®] contendo cassete Ppgk-ILGHch-Tpkg	Construído neste trabalho
pPICGH (9867 pb)	Plasmídeo para expressão e excreção de GHch em <i>P. pastoris</i> .	Construído neste trabalho.

Tabela 6- Plasmídeos empregados neste trabalho

(conclusão)

pHILGH (8800 pb)	Plasmídeo para expressão de GHch em <i>P. pastoris</i> .	Construído neste trabalho.
pMAGH (10103 pb)	Plasmídeo episomal para expressão de Ghch em <i>S. cerevisiae</i> .	Construído neste trabalho.
pMAILGH (10261 pb)	Plasmídeo episomal para expressão e excreção de Ghch em <i>S. cerevisiae</i> - sequência sinal modificada.	Construído neste trabalho.
pMAKTGH (10189 pb)	Plasmídeo episomal para expressão e excreção de Ghch em <i>S. cerevisiae</i>	Construído neste trabalho.
pGEM-dGHd (5817 pb)	Plasmídeo fonte do fragmento de DNA –cassete de expressão de GHch para ser empregado na transformação de <i>S. cerevisiae</i> por δ -integração.	Construído neste trabalho.
pGEM-dILGHd (5975 pb)	Plasmídeo fonte do fragmento de DNA –cassete de expressão e excreção de GHch para ser empregado na transformação de <i>S. cerevisiae</i> por δ -integração.	Construído neste trabalho.

Obs. ^(a) Esses vetores possuem cassetes de expressão formados pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene AOX1 de *P. pastoris*. A marca de seleção utilizada é o gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) de *P. pastoris*, que permite a seleção dos clones transformantes de *Pichia pastoris* prototróficos His⁺ a partir de uma linhagem hospedeira His⁻.

Todas as construções plasmídeais foram verificadas por análise de tamanho dos fragmentos obtidos com enzimas e restrição, e posteriormente foram seqüenciadas.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DE BACTÉRIA - MINI-EXTRAÇÃO

Para extração do DNA plasmidial de bactéria, foi empregado o protocolo de lise alcalina de pequenos volumes de cultura (mini-extração). Uma colônia da bactéria selecionada para extração foi inoculada em 5ml de meio LB com antibiótico (ampicilina 100 µg/µl) e incubada para crescimento por cerca de 16 horas, a 37 °C, com agitação. O inóculo foi transferido para tubo apropriado e centrifugado (11200 g, por 10 minutos, a 4 °C). Após centrifugação, as células foram ressuspensas em

100µl de Solução I. Adicionou-se 200 µl de Solução II fresca, girou-se o tubo gentilmente na posição horizontal e incubou-se por 5 minutos em gelo picado. Foram adicionados 150 µl de Solução III e a mistura foi agitada em agitador tipo vortex. Foi realizada a centrifugação (11200 g, por 10 minutos, a 4 °C) e recuperou-se o sobrenadante em microtubos. Foram adicionados 400 µl de fenol:clorofórmio 1:1, agitou-se com uso de agitador do tipo vortex, e a mistura foi centrifugada por 1 minuto (11200 g, a 4 °C). Foram adicionados 400 µl de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1, agitou-se com agitador do tipo vortex e a mistura foi centrifugada por 1 minuto (11200 g, a 4 °C). Foram adicionados 400 µl de isopropanol a 4 °C. A mistura foi agitada em vortex e incubada a -20 °C, por pelo menos 24 horas. Após incubação, a mistura foi centrifugada (11200 g, por 15 minutos, a 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de etanol absoluto e centrifugado novamente (11200 g, por 5 minutos, a 4 °C). Descartou-se o sobrenadante, e, após a secagem do sedimento, este foi ressuspenso em 20 µl de H₂O mili-Q esterelizada.

Solução I: Glicose (dextrose) - 0.9% (p/v); EDTA 0.5 M – 2%; Tris-Cl 1M (pH 8.0) - 2.5%; em H₂O mili-Q.

Solução II: NaOH 5N – 4%; SDS 10% - 10%; H₂O mili-Q

Solução III: Acetato de potássio 5M – 60%; Ácido acético glacial – 11.5%; H₂O mili-Q esterelizada para volume final ajustado.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE LEVEDURA

Para extração do DNA genômico de levedura, uma colônia da linhagem de interesse foi utilizada para inóculo em 2 ml de meio YPD e incubada a 28 °C por, aproximadamente, 24 horas. As células de 1,5 ml da cultura foram centrifugado por 5 minutos a 11200 g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 µl de tampão de lise*. O tubo contendo a suspensão foi imerso e incubado em nitrogênio líquido por 2 minutos, e em seguida, transferido para um banho-maria, a 95 °C, por 1 minuto. Repetiu-se o choque térmico mais uma vez e, em seguida, o tubo foi agitado em equipamento vortex por 30 segundos. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio e agitou-se em equipamento vortex, por 2 minutos. A mistura foi centrifugada por 3 minutos, a 11200 g, a temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um tubo limpo contendo 400

μl de etanol 100%, a 4 °C. Em seguida, a mistura foi agitada em equipamento do tipo vortex. Incubou-se a -20 °C, por no mínimo, 30 minutos. Foi realizada a centrifugação a 11200 g, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com etanol 70%, a 4 °C. O sedimento foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 10 a 20 μl de H₂O deionizada.

(*)Tampão de lise: Triton X-100, 2%; SDS, 1%; NaCl, 100mM; Tris-HCL pH 8, 10mM; EDTA pH 8, 1mM.

4.7 GEL DE AGAROSE

Para análises dos tamanhos de fragmentos de DNA, a mostra a ser analisada foi aliqotada em gel de agarose 0,8% (SIGMA-ALDRICH) e, o gel foi submetido a uma corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X com 0,5μg/mL de brometo de etídio. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas contendo tampão TBE 0,5X, geralmente a 80 V, por 30 minutos a 2 horas. (Sambrook et al., 1989; Sambrook e Russel, 2001).

Tampão TBE 10X (10 ml): 500μl Tris-HCl 2M; 200μl EDTA 0,5M; completar volume final foi completado com H₂O milli-Q esterelizada por autoclavação (DNase free).

4.8 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE DNA DE GEL DE AGAROSE

A solução com o DNA foi aplicada em gel de agarose 0,8% e submetida a corrida eletroforética até total separação das bandas. A banda contendo o fragmento de DNA de interesse foi excisada do gel visualizado por UV longa. A banda foi colocada em um microtubo pequeno (0.5 ml) contendo um furo na base e lâ de vidro autoclavada cobrindo o furo. O microtubo foi colocado dentro de outro microtubo grande (1.5 ml) sem tampa e estes foram levados para centrifugação a 3.500 g, por 20 segundos, em temperatura ambiente. O DNA contido no líquido recuperado no microtubo maior foi precipitado com acetato de amônio (Material e Métodos, item 4.9).

4.9 PRECIPITAÇÃO COM ACETATO DE AMÔNIO

A solução de DNA teve seu volume completado para 100 µl. Foram adicionados 25 µl de acetato de amônio 10M (concentração final de 2,5M). A solução foi agitada em equipamento tipo vortex e adicionou-se 250 µl de etanol absoluto (2 volumes). A solução foi novamente agitada em equipamento do tipo vortex e incubada em freezer a -20°C, por pelo menos 24 horas. Em seguida, foi realizada centrifugação por 15 minutos, a 11.200 g, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensado no volume apropriado de H₂O mili-Q estéril.

4.10 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

Para a ligação de fragmentos de DNA procurou-se evitar que o volume final excedesse a 10µl. Adicionou-se 100ng do plasmídeo, 3x a quantidade equivalente molar de inserto, e H₂O mili-Q. Esta solução foi incubada em banho-Maria a 60 °C e, em seguida, o banho foi desligado. Somente quando o banho-Maria atingiu a temperatura ambiente, adicionou-se o tampão da ligase (10% do volume final) e 1µl de DNA ligase de fago T4 ("Invitrogen Corporation", 10 U/µl). Para ligações de fragmentos de DNA com pontas coesivas, a ligação foi realizada incubando-se a 22 °C, por 16 horas; e, para ligações de fragmentos com pontas cegas, a ligação foi realizada incubando-se a 16 °C, por 16 horas.

4.11 DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Para cada µg de DNA a ser digerido foi adicionado 1 unidade de enzima de restrição, sendo que o volume de enzima não ultrapassou 10% do volume final da solução final. Adicionou-se tampão apropriado para enzima utilizada na quantidade de 10% do volume final da solução de digestão e o volume final foi completado com H₂O mili-Q estéril. Foi verificado que a eficiência da digestão era maior quando esta era feita com concentração final de DNA igual ou inferior a 0.1µg/µl. A digestão foi incubada em temperatura apropriada de acordo com a temperatura ótima de ação da enzima de restrição por um período de 3 a 5 horas. Foram utilizadas enzimas das marcas Fermentas^R e "Invitrogen Corporation".

4.12 OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS EM REAÇÕES DE PCR

A seguir estão apresentados todos os oligonucleotídeos utilizados nas reações de polimerização em cadeia (PCR) neste trabalho (Tabela 7).

Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores de PCR utilizados neste trabalho (continua)

Nome	Finalidade	Sequência (Todas na direção 5'-3')	Temperatura de "Melting"	Tamanho esperado do <i>amplicom</i>
GHForwardBglIIIEcoRI	Amplificação do cDNA de GHch com sítios de restrição apropriados para posterior clonagem em vetores de expressão de <i>P. pastoris</i> e <i>S. cerevisiae</i> .	AGATCTGAATTCATGGAG AACCAGCGGCTTTTCAAC AAC	66 °C	609 pb
GHReverseBglIIIEcoRI		AGATCTGAATTCGGTAGA CATGATACGATTCTACAG GG	64 °C	609 pb
SSILForw	Síntese do fragmento de interleucina humana que potencializa a secreção em <i>S. cerevisiae</i> .	GGATCCGAGCTCATGAAC ATCTTCTACATCTTCTTGT TCTTGTGTCTTTCGTTCA AGGTTCACTGAACGCACG TTGAGAGACTCACAGAAT AAAAGTTT	75 °C	183 pb
SSILReve		GGATCCCTAAGATGATGA TGATGATGAGATCCCGCG GAACCAGGTCGACTGCCT TCAGTTCATATGGACCAG ACATCCCAAACTTTATTTC TGTGAGT	77 °C	183 pb
ForGHSalKEX	Amplificação de cDNA de GHch contendo sítio de restrição <i>Sal</i> I e sítio da protease KEX2.	GTCGACAAAAGAGAGAAC CAGGGCTTTTCAACA ACG	66 °C	578 pb
RevGHSal	Amplificação de cDNA de GHch contendo sítio de restrição <i>Sal</i> I	GTCGACCAGGTGCAGTTT GAATCCAGGG	64 °C	578 pb
ForSeqSin	Oligonucleotídeos para reação do fragmento de interleucina humana que potencializa a secreção em <i>S. cerevisiae</i>	GGATCCGAGCTCATGAAC ATCT	55 °C	183 pb
RevSeqSin		GGATCCCTAATGATGATG ATGATGAT	55 °C	183 pb
ForkT	Síntese do fragmento contendo sequência sinal padrão de <i>S. cerevisiae</i> .	GGATCCGAGCTCATGAAC ATCTTCTACATCTTCTTGT TCTTGTGTCTTTCGTTCA AGGT	71 °C	111 pb
RevKT		GGATCCCTAATGATGATG ATGATGATGAGATCCACG CGGAACCAGGTCGACACC TTGAAC	74 °C	111 pb

Tabela 7 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

(conclusão)

ForBamPGK	Oligonucleotídeos para amplificação de cassetes de expressão flanqueados por sítios de <i>Bam</i> HI nas extremidades.	CGGGATCCCGAAGCTTTC TAACTGATCTATCCAAA	64 °C	Variável de acordo com o DNA molde
RevBamPGK		CGGGATCCCGAAGCTTTA ACGAACGCAGAATT	64 °C	Variável de acordo com o DNA molde
ForpPGK	Oligonucleotídeos para seqüenciamento de DNAs clonados entre o promotor e terminador PGK	GGTCAATGCAGAAATACA TATTTGGTCTTTTC	58 °C	Variável de acordo com o DNA molde
Revtpgk		CACCACCACCGTAGAGAC ATGGG	61 °C	Variável de acordo com o DNA molde
GHForwardBgIII EcoRI (já informado acima)	Oligonucleotídeo para obtenção de produto de PCR para análise de Real Time PCR	AGATCTGAATTCATGGAG AACCAGCGGCTTTTCAAC AAC	62 °C	206 pb
RevGH206	Oligonucleotídeo para obtenção de produto de PCR para análise de Real Time PCR	CAACATAGAGCTCTTCTG CGTTTCATCTTTTCCA	62 °C	206 pb
KTSmaF	Oligonucleotídeos para amplificação total dos plasmídeos de <i>S. cerevisiae</i> com a seqüência sinal de <i>K. lactis</i> .	AAGGCACCCGGGAAAAGA GAGAACCAGCGGCTTTTC AACAACGCAGTCATCCGT GTTCA	75 °C	Variável de acordo com o DNA molde
KTSmaR		CATGCGCCCGGGACCTTG AACGAAAGACAACAAGAA CAAGAAGATGTAGAAGAT GTTCATG	73 °C	Variável de acordo com o DNA molde

4.13 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

As reações de PCR realizadas neste trabalho foram feitas em aparelho termociclador da marca AB Applied BiotechnologiesTM. Utilizou-se as enzimas Taq polimerase ou Taq polimerase High Fidelity da marca Fermentas^R, com seus respectivos tampões e as condições recomendadas pelos fabricantes. As temperaturas de anelamento foram calculadas para, pelo menos serem, 4°C abaixo da temperatura de melting (Tabela 7). As demais características quanto as reações realizadas foram feitas segundo Sambrook et al. (1989) e Sambrook e Russel (2001).

4.14 PCR EM TEMPO REAL

O PCR-RT foi realizado utilizando-se o Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG, da Invitrogen e o equipamento da "Applied Biosystems", modelo 7500 Real Time PCR System. Para a reação, seguiram-se as recomendações do fabricante do Kit. Foram utilizados 10ng de DNA molde de cada uma das amostras, cujas dosagens haviam sido feitas empregando-se espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific Uniscience). Os controles foram realizados com reações contendo 5ng, 10ng e 20ng. As amostras foram todas oriundas de extrações dos DNAs genômicos dos clones recombinantes selecionados. A amplificação se dava apenas no fragmento correspondente ao cDNA de GHc com um produto final (*amplicon*) de 206 pb.

Como iniciadores, foram utilizados os oligonucleotídeos GHForwardBgIIIIEcoRI e RevGH206 (Tabela 7). Cada uma das amostras de DNA genômico foi realizada paralelamente às amostras dos DNAs plasmidiais controles, todos em triplicatas.

Para o cálculo do número de cópias de cDNA de GHch inseridas nos genomas das linhagens recombinantes derivadas de *P. pastoris* e *S. cerevisiae*, seria ideal se dispor de clones recombinantes de cada uma das leveduras contendo 1 única cópia de cDNA de GHch inserida em seus genomas que seriam empregadas como controles (padrões). Todavia, estes clones não estavam disponíveis. Assim, foi elaborada uma estratégia que permitisse realizar a quantificação aproximada do número de cópias de cDNA de GHch, por PCR em tempo real (RT-PCR).

Os controles (padrões) foram os DNAs plasmidiais contruídos neste trabalho, pPICGH (9.867 pb) e pHILGH (8.800 pb) considerando-se que cada molécula destes plasmídeos possui apenas 1 cópia de GHch.

O tamanho do DNA genômico de *S. cerevisiae* é de 12.068.000 pb (Goffeau et al., 1996); o tamanho do DNA genômico de *P. pastoris* é de 9.430.000 pb (De Schutter et al., 2009).

Foram considerados os seguintes fatores:

- 1) O C_t é o número do ciclo da reação RT-PCR em que o sinal de fluorescência emitido cruza a linha "threshold";

- 2) O valor de C_t permite chegar ao número de cópias de GHch por unidade de molécula DNA molde; e, é inversamente proporcional à quantidade de DNA molde empregado;
- 3) Como o DNA molde das amostras são maiores, a amplificação de GHch se inicia tardiamente em relação aos controles, pois a frequência de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores é muito inferior àquela que ocorre nos controles;
- 4) Se fosse empregada a mesma quantidade de DNA nas reações RT-PCR, seria esperado que os C_{ts} das amostras (DNAs genômicos) seriam inferiores aos valores dos C_t s dos padrões (plasmídeos), considerando-se:
1 cópia de GHch para 1 unidade de DNA molde (1 plasmídeo ou 1 DNA genômico);

5) Os seguintes valores:

G_A : Tamanho do DNA total da amostra (pb);

G_P : Tamanho do DNA total do plasmídeo empregado como padrão (pb);

R_{AP} : Relação do tamanho do DNA da amostra pelo tamanho do DNA do padrão.
Quantas vezes o DNA da amostra é maior que o DNA do padrão;

DM_R : Quantidade de DNA molde utilizado na reação;

C_{tP} : C_t do padrão;

C_{tA} : C_t da amostra;

- 6) Para avaliação do número de cópias de GHch inseridas nos genomas das linhagens de leveduras recombinantes (NCi), foram considerados:
 - Os tamanhos dos DNAs genômicos das amostras e os tamanhos dos DNAs plasmidiais dos padrões;
 - Os valores de C_{ts} obtidos nas reações RT-PCR;

7) A seguinte formula foi aplicada:

$$NCi = \frac{2^{(C_{tA} - C_{tP})}}{R_{AP}}$$

Tabela 8 – Exemplo de cálculo de número de cópias de GHch inseridas no genoma de levedura recombinante.

Linhagem original do clone recombinante	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>
Tamanho do genoma da linhagem de levedura original - G _A (pb)	12.068.000	9.430.000
Quantidade de DNA utilizado na reação (ng)	10	10
Tamanho do padrão – G _P pPICGH (pb)	9.867	9.867
Tamanho do padrão – G _P pPHILGH (pb)	8.800	8.800
R _{AP} (G _A / pPICGH)	1.223,07	955,71
R _{AP} (G _A / pHILGH)	1.371,36	1.071,59
Ct do padrão pPICGH	9,76	9,76
Ct do padrão pPHILGH	9,43	9,43
C _t da amostra	21,39	20,51
Número de cópias GHch inseridas no genoma, quando se emprega como padrão pPICGH	3,25	2,27
Número de cópias GHch inseridas no genoma, quando se emprega como padrão pPHILGH	2,31	1,61

OBS: Em todos estes RT-PCRs (amostra e controle) foram empregados 10 ng de DNA molde.

8) Exemplos de determinações do número de cópias de GHch em levedura recombinante:

A diferença do número de ciclos RT-PCR para que a amostra alcance o mesmo sinal de fluorescencia (linha "threshold") que o padrão pPICGH é dado por:

NCi (S.c-pPICGH):

$$NCi = \frac{2^{(CtA - CtP)}}{R_{AP}} = \frac{2^{11,63}}{1371,36} = \frac{3169,413}{1371,36} = 2,31 \text{ cópias de GHch integradas no genoma.}$$

NCi (S.c- pPHILGH):

$$NCi = \frac{2^{(CtA - CtP)}}{R_{AP}} = \frac{2^{10,91}}{1371,36} = \frac{1.924,14}{1371,36} = 1,40 \text{ cópias de GHch integradas no genoma.}$$

e

NCi (*P.p*-pPICGH):

$$NCi = \frac{2^{(CtA - CtP)}}{R_{AP}} = \frac{2^{11,03}}{995,71} = \frac{2.091,03}{995,71} = 2,10 \text{ cópias de GHch integradas no genoma.}$$

NCi (*S.c*- pPHILGH):

$$NCi = \frac{2^{(CtA - CtP)}}{R_{AP}} = \frac{2^{9,26}}{1071,59} = \frac{613,11}{1071,59} = 0,57 \text{ cópias de GHch integradas no genoma.}$$

4.15 SEQUÊNCIA SINAL MODIFICADA CONTENDO O FRAGMENTO N-TERMINAL DE INTERLEUCINA-B HUMANA

Para se obter a sequência sinal de excreção de *S. cerevisiae* modificada, contendo a fusão da sequência sinal da toxina killer de *K. lactis* e o fragmento de interleucina β humana (Figura 5A), para potencializar a excreção, foi realizada uma reação de PCR onde 1 oligonucleotídeo tinha uma de suas extremidades anelada a outra extremidade do segundo oligonucleotídeo, sendo assim capazes de dar início à síntese completa da sequência desejada. Cada um dos oligonucleotídeos tem 101 nucleotídeos de extensão, e ambos possuem anelamento de 19 nucleotídeos em suas extremidades 3' (Figuras 5C e 5D). Após a amplificação, foi obtida uma sequência com 183 nucleotídeos que continham os sítios de restrição apropriados para a realização das clonagens futuras (Figuras 5B e 5E). No processo de desenho das sequências que seriam sintetizadas, foram retirados os sítios de restrição indesejados e foi considerado o "codon usage" de *S. cerevisiae*.

Figura 5— A) Sequência de interleucina-β humana com os sítios de glicosilação destacados; B) Sequência final sintetizada com todos os sítios de restrição e componentes destacados; C) Esquema de síntese da sequência final desejada pela reação de PCR, a partir de anelamento entre as extremidades dos oligonucleotídeos. D) Visualização do anelamento dos oligonucleotídeos na sequência completa. E) Esquema de sequência final obtida, com todos os componentes e sítios de restrição de interesse para a clonagem do cDNA de GHch.

4. 16 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA BACTÉRIA E. coli

Para a transformação genética de bactéria *E. coli* DH5 α foi empregado o protocolo de transformação por eletroporação descrito em Sambrook et al. (1989) e Sambrook e Russel (2001). As células eletrocompetentes foram descongeladas, incubando-se em gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 μ l da solução de DNA (concentração de $\sim$ 20ng/ μ l), e as células foram incubadas em gelo picado por 5 minutos. As células com o DNA foram transferidas para cubetas de eletroporação (2 mm) e submetidas a um choque elétrico de 2.5 KV (resistência 200 Ω s, capacitância de 25 μ FD). Foi adicionado 1ml de meio SOC e a suspensão foi transferida para microtubo. Foi realizada a incubação a 37 °C, sem agitação, por 1 hora. As células foram semeadas em placas contendo meio seletivo LB com amplicilina (100 μ g/mL).

4. 17 TRANSFORMAÇÃO DE S. cerevisiae

Para transformação de linhagens da levedura *S. cerevisiae* foi empregado o o método de transformação de células intactas, com acetato de lítio, receita para 12 transformações (Gietz et al., 1995).

Uma colônia da linhagem selecionada foi utilizada para inóculo em 5ml de meio YPD. A cultura foi incubada a 30 °C com agitação por 24 horas. 20 μ l dessa cultura foram utilizados para inocular em 10 ml de meio YPD. Esta nova cultura foi incubada por cerca de 16 horas a 30 °C, com agitação. As células foram contadas e uma alíquota dessa cultura foi utilizada para inocular 75 ml de meio YPD a uma concentração inicial de 5×10^7 células/ml. O crescimento foi acompanhado até atingir uma concentração de 1.6 a 2.0×10^7 células/ml. O volume equivalente a 1×10^8 células foi centrifugado por 5 minutos, a 6000 g, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1ml de H₂O mili-Q esterelizada. As células foram novamente centrifugadas por 30 segundos, a 11.200 g, a temperatura ambiente e ressuspensas em 400 μ l de LiAc 0,1M. O procedimento de centrifugação anterior e ressuspensão com LiAc 0,1M foi repetido mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados, na seguinte ordem: 240 μ l de PEG 350 50% (p/v), 36 μ l de LiAc 1M, 25 μ l de 2mg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado (ss-DNA), 50 μ l da solução de plasmídeo (1 μ g). A mistura foi agitada em equipamento tipo vortex e incubada em banho-Maria a 30 °C, por 30

minutos. As células foram submetidas a um choque térmico de 42 °C, por 30 minutos. As células foram centrifugadas a 11.200 g por 30 segundos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 500 µl H₂O mili-Q esterilizada. As células foram semeadas em placas contendo meio seletivo.

Soluções utilizadas:

LiAc dissolvido em H₂O mili-Q esterilizada nas concentrações 0,1M e 1M (solução esterilizada por filtração);

PEG 3350 dissolvido em H₂O mili-Q estéril a 50% (p/v) (solução esterilizada por autoclave - 20 Kgf/cm² – 15 minutos);

ss-DNA (2mg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado por ter sido previamente incubado a 100 °C, por 5 minutos, e em seguida incubado a 0 °C, por 3 minutos) dissolvido em H₂O mili-Q estéril

4.18 TRANSFORMAÇÃO DE *P. pastoris*

Para transformação da levedura *P. pastoris* foi empregado o método de transformação descrito por Cregg e Barringer, (1989); Invitrogen Corp., San Diego, CA.

Uma colônia da linhagem *P. pastoris* GS115 de foi inoculada em 10 ml de meio YPD e cultivada por aproximadamente, 14 horas com agitação, a 28 °C, até atingir a Absorbância_{600nm} de aproximadamente 3,0. Dessa cultura, 2 ml foram inóculados em 250 ml de meio YPD. A nova cultura foi incubada por, aproximadamente, 8 horas, até atingir a Absorbância_{600nm} entre 1,0 e 1,3. A cultura foi centrifugada por 5 minutos, a 4 °C, 11.200 g, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento de células foi ressuspensão em 250 ml de água deionizada estéril, a 4 °C, com o uso de pipeta. A suspensão foi centrifugada novamente, nas mesmas condições anteriores. O sedimento de células foi ressuspensão em 125 ml de água deionizada estéril, a 4 °C. Após outra centrifugação, o sedimento foi ressuspensão em 20 ml de sorbitol 1 M, a 4 °C. A suspensão foi centrifugada novamente e o sedimento ressuspensão em 0,5 ml de sorbitol 1 M , a 4 °C. A suspensão foi mantida em gelo picado. Uma alíquota de 80µl suspensão de células foi empregada para eletroporação. À esta alíquota foram adicionados 10µl de solução de DNA previamente linearizado por tratamento com enzima de restrição (Material e Métodos, item 4.11) na quantidade de,

aproximadamente, 8 μ g/ μ l. A mistura de células e DNA foi acondicionada em uma cubeta de eletroporação de 2mm, previamente resfriada em gelo picado, e incubada em gelo, por 5 minutos. O exterior da cubeta foi bem seco e acondicionada no Eletroporador, onde foi aplicado o pulso (400 Ω - resistência/25 μ FD-capacitância/1500V- voltagem). Imediatamente após o choque, ressuspendeu-se a mistura em 1 ml de sorbitol 1 M filtrado, a 4 °C, e transferiu-se a mistura para um tubo de ensaio estéril. Este tubo foi incubado, sem agitação a 28 °C, por 2 horas. Alíquotas de 200 μ l foram semeadas em placas contendo meio de seleção SD-Biotina (Material e Métodos, item 4.3.2).

4.19 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GHc POR METANOL EM P. pastoris

Foram realizadas culturas dos clones recombinantes derivados da levedura *P. pastoris* selecionados para indução de produção de GHch, em 25 ml de meio BMGY-U contido em erlenmeyer de 250 ml, e incubadas a 30 °C, sob agitação (150 rpm), até atingirem a Absorbância_{600nm}= 2-6 (Aproximadamente 24 horas). Para indução da produção de GHch, as células foram centrifugadas (20 minutos, 8000 g, temperatura ambiente) e ressuspensas em 250 ml de meio BMMY-U em frascos erlenmeyer de 1 L, de modo que a cultura estivesse na Absorbância_{600nm}= 1.0. Foi realizada a incubação sob agitação a 30 °C. A cada 24 horas, foram adicionados 0,5% de metanol a cada cultivo e foram recolhidas alíquotas (24, 48, 72, 96 horas) que foram estocadas a -20 °C, para as análises posteriores.

4.20 PREPARAÇÃO DE EXTRATO DE PROTEÍNA DE LEVEDURA

Para preparação do extrato de proteína total de levedura, células de uma colônia da levedura foram inoculadas em 5 ml de meio completo (YPD), e a cultura foi incubada a 28 °C, para crescimento por cerca de 16 horas. Ao atingir Absorbância_{600nm} de, aproximadamente, 2,5 (aproximadamente 2,3 mg de peso seco), as células foram centrifugadas por 5 minutos, a 11200 g, em temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 100 μ l de H₂O destilada, e logo após foram acrescentados 100 μ l de NaOH 0,2 M. Incubou-se por 5 minutos, à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram resuspensas em 50 μ l de tampão de amostra para

corrida de gel de poliacrilamida contendo SDS (Material e Métodos, item 4.22). Essa ressuspensão foi incubada em banho-maria, a 100 °C, durante 3 minutos. A suspensão foi centrifugada (6000 g, por 5 minutos, em temperatura ambiente) e o sobrenadante foi recuperado (este contém as proteínas). Alíquotas de 6 a 15 µl foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo SDS (Material e Métodos, item 4.22).

4.21 PRECIPITAÇÃO PARCIAL DA PROTEÍNA PRODUZIDA PELOS CLONES RECOMBINANTES

Para precipitação parcial das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de levedura derivados de *P. pastoris* GS115, foram feitos cultivos para indução da expressão da proteína GHch (Material e Métodos, item 4.19). Foram recolhidas alíquotas a cada dia de indução, e estas foram submetidas ao protocolo de precipitação parcial da proteína. Para a precipitação das proteínas produzidas pelos clones recombinantes de levedura derivados de YPH252 *S. cerevisiae*, foram feitos cultivos de aproximadamente 24 horas em meio completo (YPD), a partir de inóculos iniciados à uma densidade de 1×10^8 células/ml. Cada cultura foi centrifugada e o sobrenadante (meio de cultura) recuperado. Adicionou-se solução de TCA na concentração final de 10%. Incubou-se no gelo por 10 minutos e centrifugou-se a 11200 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspense com 200µl de acetona a 4°C. Repetiu-se o passo centrifugação e ressuspensão em acetona a 4° C por, pelo menos, 2 vezes. Secou-se o sedimento em banho seco a 95 °C, por cerca de 5 minutos. O sedimento foi ressuspense em Tampão Tris-NaCl Tween.

Solução de TCA 100%: 100g de TCA dissolvido em 20 ml de H₂O deionizada. Após diluição, o volume foi completado para 100 ml.

Tampão Tris-NaCl Tween: 100 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH 7,6

4.22 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (SDS-PAGE)

Foram feitos géis de poliacrilamida com SDS, conforme Laemmli, 1970. O gel de corrida foi de 15% e o empilhamento de 4,5% de acrilamida, ambos de espessura de, cerca dde, 1mm. A corrida foi realizada com amostras ressuspensas em cerca de 10µl de tampão de amostra, a 20 mA, para o empilhamento; e, 25 mA, para a separação. Após a eletroforese, o gel foi corado com "comassie blue" 0,25% em 50% metanol, ácido acético glacial 10%, durante 2 horas, em temperatura ambiente. O gel foi descorado por lavagens sucessivas com imersão, em temperatura ambiente, com uma solução de metanol 30% e ácido acético glacial 10%.

Tampão de amostra (10 ml): Glicerol 10% (p/v) - 1,0g; β-mercaptoetanol 0,5ml; SDS 2,3% (p/v) - 0,23 gr; Tris-HCl 0,0625 M - 1,25 ml (estoque 0,5 M pH 6,8); Bromophenol Blue 0,2% - 0,02 gr; H₂O (mili-q) estéril para completar volume final.

4.23 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA GHc EM CAMUNDONGOS E COELHOS

Foram produzidos anticorpos policlonais contra GHc no Instituto Butantan, com a colaboração da professora Maria Elisabete Sbrogio de Almeida.

O antígeno utilizado na imunização dos animais: "recombinant carp growth hormone" (GH Carp) liofilizado (200 µg) foi adquirido da "ProSpec (Protein Specialists)".

4.24 "WESTERN BLOT"

A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada e identificada pela técnica de "Western Blot" (Burnete, 1981). Para tanto, as proteínas produzidas, foram aplicadas em quantidades equivalentes no gel de SDS-PAGE 15% acrilamida-bisacrilamida. As proteínas fracionadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,22 µm, BA-583, Schleicher & Schuell), por 2 horas a 30 mA, imersas em Tampão de transferência (25 mM Tris-Base; 192 mM Glicina; 20% Metanol; 0,1% SDS; pH 8,3). Após a transferência, a membrana foi imersa em solução de bloqueio (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 5% leite Molico Nestlé®, 10% soro fetal bovino e 10% soro de cavalo) a 4 °C, por 16 horas. Em

seguida, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo anti-GHc diluído em Tampão diluente (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 5% leite Molico Nestlé ®) na proporção de 1:2000, por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação. Após três lavagens seguidas com Tampão Tris-NaCl Tween (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6), foi feita a incubação com o segundo anticorpo conjugado (anti-IgG) com peroxidase diluído no mesmo tampão de diluente do anticorpo primário na proporção de 1:2000, por período de 2 horas a temperatura ambiente, e sob agitação. Após três lavagens com tampão Tris-NaCl Tween 20 (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20), a membrana foi revelada com os reagentes do KIT SuperSignal[®]West Pico Chemiluminescent Substrate da marca PIERCE, segundo as instruções do fabricante.

4.25 DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

Para as medidas das concentrações de proteínas presentes nos extratos brutos celulares, construiu-se uma curva de calibração com a proteína com BSA (New England Biolabs), de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976). Para construção da curva, utilizou-se reagente de Bradford (BioRad), que foi diluído em H₂O mili-q esterilizada, na concentração de 1%. 1,4 ml do reagente diluído foram adicionados a uma série de tubos, cada um contendo uma concentração conhecida de BSA (0,0 µg/ml; 16,6 µg/ml; 33,3 µg/ml; 50,0 µg/ml; 66,6 µg/ml; 83,3 µg/ml; 100,0 µg/ml; 166,6 µg/ml; 200,0 µg/ml) em um volume final de 30 µl, sendo que a BSA foi diluída em PBS-Tween 20 (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,3). Foi realizada a leitura da Absorbância_{595nm} de cada uma das misturas contidas nos tubos. Foi construída uma curva de calibração dos valores da Absorbância_{595nm} versus a concentração de BSA (Figura 6). Para cada ponto foram feitas 2 ensaios e foi plotada a média dos valores.

Figura 6 – Curva de calibração da proteína BSA realizada pelo método de Bradford.

4.26 CURVA DE CRESCIMENTO

Para realizar a curva de crescimento das linhagens de levedura foram feitos pré-inóculos de 5 ml de cada clone em meio YPD líquido, e as culturas foram incubadas por, aproximadamente, 24 horas, com agitação em “shaker” (120 rpm), a 28 °C. Uma alíquota de 50 μl do inóculo foram adicionados à 50 ml de meio YPD líquido e foi realizada a incubação com agitação em “shaker” (120 rpm), a 28 °C. Foram feitas leituras da Absorbância_{600nm}, em espectrofotômetro, a cada 2 horas, durante 12 horas. Após este período, as leituras foram feitas a cada 12 horas.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DO FRAGMENTO CONTENDO O cDNA DE GHc

No início do trabalho, o cDNA do hormônio de crescimento da carpa *H. molitrix* (GHc), havia sido clonado em *E. coli* por Elen Bethleen Pedraça dos Santos, aluna de mestrado do Professor Astolfi Filho. O plasmídeo pCGH1, que havia sido construído naquele trabalho, nos foi gentilmente cedido e o cDNA de GHc (625 pb) foi obtido por amplificação por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos cedidos também pelo grupo do professor Astolfi Filho e o plasmídeo pCGH1 como molde. Este produto de PCR foi submetido a sequenciamento e a sequência obtida foi analisada e utilizada como base para o desenho dos oligonucleotídeos posteriores que foram utilizados no trabalho.

A sequência obtida foi alinhada com a sequência de cDNA de GHc disponibilizada no banco de dados do NCBI ("National Center for Biotechnology Information"), empregando o programa disponível em rede "Multialign" (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Isto permitiu a constatação de que o cDNA da carpa *H. molitrix* que dispúnhamos (GHc) contém 6 nucleotídeos divergentes da sequência de cDNA de GH de carpa *H. molitrix* depositada no NCBI (código de acesso GenBank: EU157194.1), conforme destacado por setas na Figura 7.

Apesar das divergências nucleotídicas, a sequência de aminoácidos de GHc (210 aa) possui divergência de apenas 1 aminoácido. Trata-se da substituição de uma valina por uma alanina, na quarta posição, conforme destacado por seta na Figura 8.

Figura 8 – Alinhamento da sequência de aminoácidos do cDNA de GH de *H. molitrix* (GHc) presente no plasmídeo pCGH1 com a sequência de aminoácidos de GHc disponível no NCBI (EU157194.1).

Considerando-se que os 23 primeiros aminoácidos correspondem à sequência sinal (ss) original do GHc no NCBI, a proteína recombinante, que seria expressa em leveduras seria idêntica à sequência encontrada no banco de dados.

5.1.2 Obtenção do cDNA de GHc sem a sequência sinal

Para obtenção do cDNA de GHc que seria empregado neste trabalho, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores adequados para anelar no plasmídeo pCGH1, internamente à sequência do cDNA de GHc (Material e Métodos, item 4.6, Tabela 6) de modo que o *amplicom* obtido por PCR consistisse em um fragmento de DNA de 609 pb, codificador de GHc sem a sequência sinal (187 aa). No desenho destes oligonucleotídeos, foram adicionados à região 5' os nucleotídeos codificadores do aminoácido iniciador metionina (AUG) e, em ambas as extremidades, os sítios de restrição adequados para as etapas futuras de clonagem.

O fragmento de DNA correspondente ao cDNA de GHc sem a sequência sinal (ss) passou a ser denominado GHch.

5.1.3 Clonagem do fragmento GHch

O *amplicom* GHch, obtido por PCR, foi inserido no plasmídeo comercial pCR® 2.1-TOPO®, para que ficasse ladeado pelos sítios de restrição *Eco* RI e *Bgl* II, facilitadores das etapas seguintes de clonagem, obtendo-se ao final o plasmídeo TOPOGH (Figura 9).

Figura 9- Esquema da clonagem de GHch no vetor comercial pCR® 2.1-TOPO® da Invitrogen a partir do plasmídeo pCGH1 (Santos, 2000). Ao lado migração em gel de agarose de fragmentos de DNAs plasmidiais isolados de clones de transformantes bacterianos, resultantes da digestão com a enzima de restrição *Eco* RI. A seta indica a posição da banda de aproximadamente 609 pb, correspondente a GHch.

5.2 OBTENÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES DE *P. pastoris* PRODUTORAS DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE CARPA

5.2.1 Construção dos plasmídeos para expressão em *P. pastoris* pHILGH e pPICGH

Para a construção de vetores de expressão de hormônio de crescimento da carpa *H. molitrix* de *P. pastoris*, o plasmídeo TOPOGH foi digerido com *Eco* RI e o fragmento de DNA referente a GHch, de 591 pb, foi extraído e purificado. Os plasmídeos de *P. pastoris* de expressão, pHILD2 e expressão e excreção pPIC9k, foram linearizados com a enzima *Eco* RI (Figura 10A). As misturas de ligação de cada um dos plasmídeos digeridos com o fragmento GHch (509 pb) foi empregada na transformação de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, item 4.16). Com cada uma das misturas de ligação foram obtidos, aproximadamente, 250 clones Amp^R. Para verificação da orientação da inserção do fragmento, foram digeridos DNAs plasmidiais de 10 clones transformantes obtidos com cada mistura de ligação, com a enzima *Sac* I (Figura 10B), já que o sítio desta enzima está localizado no início do promotor AOX 1 nos 2 plasmídeos, e a 197 nucleotídeos da sequência 5' de GHch.

Figura 10 – A) Esquema de clonagem de GHch em plasmídeos de expressão em *P. pastoris*. (Invitrogen). B) Migração em gel de agarose de DNAs plasmidiais extraídos de transformantes bacterianos contendo as misturas de ligação: 1 e 14 – padrão de tamanho molecular 1KB, 500ng (Fermentas[®]); 2-10 – misturas de ligação de pPIC9K e GHch; 11, 12, 13, 15-21 – misturas de ligação de pHILD2 e GHch. As setas brancas indicam tamanho após a restrição com a enzima Sac I.

Assim, a obtenção dos plasmídeos desejados resultou na obtenção de 2 fragmentos de DNA: pPICGH (aproximadamente 8600 pb e 1200 pb); e pHILGH (aproximadamente 7800 pb e 960 pb). Entre os clones transformantes obtidos, os DNAs plasmidiais de pPICGH e pHILGH foram isolados. Estes plasmídeos foram, respectivamente, do clone 5 (pPICGH) e 3 (pHILGH). Estes foram purificados e a sequência inserida foi confirmada por seqüenciamento.

5.2.2 Obtenção de transformantes de *P. pastoris* com pPICGH e pHILGH

Os plasmídeos de pHILGH e pPICGH foram empregados na transformação genética da linhagem GS115 de *P. pastoris*. Para transformação, ambos os plasmídeos foram linearizados com a enzima *Sal* I, para promover a inserção no genoma da levedura e obtermos apenas transformantes do tipo His⁺ Mut⁺. Os clones transformantes de *P. pastoris* foram selecionados por complementação gênica, pelo crescimento em meio mínimo sem histidina. A eficiência de transformação observada foi de 1.10^1 transformantes por micrograma do DNA plasmidial pHILGH;

e, $2,4 \cdot 10^1$ transformantes por micrograma do DNA plasmidial pPICGH.

Os clones transformados com o plasmídeo pPICGH (GS115/PICGH) foram analisados quanto a sua capacidade de crescer em meio contendo concentrações de G418, já que é possível fazer uma analogia entre o número de cópias integradas no genoma e o nível de resistência à esta droga (Scorer et al., 1994). Dentre os clones analisados, não foi possível identificar clones que apresentassem resistência a G418 superior a 0,20 mg/ml (Figura 11).

Os clones transformantes GS115/HILGH não puderam ser analisados quanto à resistência a G418, pois o plasmídeo pHLD2 não possui este gene de resistência. Assim, estes transformantes foram selecionados apenas pela marca auxotrófica His⁺.

Figura 11 – Clones de *P. pastoris* GS 115/PICGH crescidos em meio sólido YPD acrescidos de diferentes concentrações de G418. A) sem adição de G418; B) 0,10 mg/ml; C) 0,15 mg/ml; D) 0,20 mg/ml; E) 0,25 mg/ml. O círculo preto indica o local onde foi feito inóculo do clone transformante obtido com plasmídeo pPIC9K (controle).

5.2.3 Caracterização bioquímica do hormônio de crescimento de carpa produzido por GS115/HILGH

Para analisar a proteína GHc produzida pelos clones *P. pastoris* GS 115/HILGH, o extrato bruto dos cultivos foram analisados em gel SDS-PAGE (Material e Métodos, item 4.22). Foi realizada indução da produção, cultivando-se em meio mínimo com metanol acondicionados em frascos agitados (Material e Métodos, item 4.19), foram analisadas as amostras após de 1 a 5 dias. Este procedimento permitiu a verificação de que uma proteína de 20 KDa, correspondente ao tamanho esperado de GHch, não observada no extrato bruto da linhagem hospedeira GS115, foi produzida logo após 1 dia de incubação e, que maior quantidade desta proteína foi produzida ao longo dos 5 dias (Figura 12).

Figura 12 – SDS-PAGE de proteína extraída da linhagem recombinante *P. pastoris*/HILGH. 1 - *P. pastoris* GS115 (controle negativo); 2-6 – clone recombinante GS115/HILGH4 após indução com metanol por 1 a 5 dias; 7 – padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas^R).

5.2.4 Caracterização imunológica do hormônio de crescimento de carpa produzido por GS115/HILGH

Para analisar as características imunobiológicas da proteína GHc recombinante produzida por GS115/HILGH, foi realizado um ensaio de “Western blot” utilizando anticorpo anti-GHc, produzido em camundongo (Material e Métodos, item 4.24). Esta abordagem resultou na observação de uma hibridação específica de tamanho aproximado de 20 KDa, compatível à proteína GHc (Figura 13).

Figura 13 – “Western Blot” das proteínas do extrato celular do clone GS115/HILGH contra anticorpo anti-GHc. 1 e 2 – GS115 após indução com metanol nos dias 0 e 4; 3 e 4 – GS115/pHILD2 após indução com metanol nos dias 0 e 4 (controles negativos); e, 5-9 – GS115/HILGH após indução com metanol por 0, 1, 2, 3, 4, dias consecutivos; padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas[®]).

5.2.5 Caracterização da proteína GHc produzida por GS115/PICGH

Esperava-se que a proteína recombinante produzida pelos clones recombinantes GS115/PICGH estivesse sendo excretada para o meio de cultura. Para análise dessa proteína, foram realizadas culturas em meio contendo metanol (Material e Métodos, item 4.3.2), e após recuperação do meio de cultura onde havia sido realizado o cultivo em presença de metanol, as proteínas presentes no sobrenadante foram submetidas à precipitação com TCA (Material e Métodos, item 4.21). Após a precipitação, as amostras foram para aplicação em SDS-PAGE. Não foi possível visualizar uma banda de tamanho compatível com a proteína recombinante GHc. Ainda assim, foi realizado o ensaio de hibridação por “western-blot” e não foi possível observar qualquer banda. Este procedimento foi repetido por várias vezes, com cerca de 5 clones diferentes.

5.2.6 Dosagem de GHc no meio de cultura de clones GS115/PICGH

A proteína GHch possivelmente excretada no meio de cultura pelos clones GS115/pPICGH foi dosada. Foram analisadas as culturas dos controles negativos (GS115 e GS115/PIC9K) e de culturas de GS115/PICGH. Foram retiradas amostras ao longo de 4 dias de indução da expressão da proteína com metanol, de onde foram retiradas alíquotas de 1 ml diariamente, que foram precipitadas com TCA (Material e Métodos, 4.20). Observou-se uma maior produção das proteínas totais até 24 horas de indução, e esta produção sofreu uma queda após este período (Tabela 9).

Tabela 9 – Dosagem de proteína total presente no sobrenadante da cultura de clones recombinantes.

Clone de <i>P. pastoris</i> -Horas de indução com metanol	Proteínas totais
GS115 - 0	62 µg/ml
GS115 /PIC9K - 0	62 µg/ml
GS115 /PICGH25 - 0	92 µg/ml
GS115 /PICGH25 - 24	96 µg/ml
GS115 /PICGH25 - 48	78 µg/ml
GS115 /PICGH25 - 72	62 µg/ml

5.2.7 Curvas de crescimento dos clones de P. pastoris recombinantes

Alguns dos clones recombinantes obtidos tiveram suas curvas de crescimento em meio SD-Biotina (Material e Métodos, item 4.3.2) (contido em frascos agitados) analisadas (Material e Métodos, item 4.22). As curvas de crescimento dos transformantes de *P. pastoris*/PICGH e *P. pastoris*/HILGH encontram-se apresentadas nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Encontram-se também apresentadas as curvas de crescimento das linhagens controle *P. pastoris* GS115, *P. pastoris*/pPIC9K e *P. pastoris*/pHIL D2.

Figura 14 – Curva de crescimento em meio mínimo (SD-Biotina), em frascos agitados, a 28 °C, das linhagens transformantes de *P. pastoris* GS115/PICGH, que expressam e excretam GHch.

Figura 15 – Curva de crescimento em meio mínimo (SD-Biotina), em frascos agitados, a 28 °C, das linhagens transformantes de *P. pastoris* GS115/HILGH, que expressam GHch.

As curvas de crescimento de todas as linhagens apresentaram pequenas diferenças entre os clones transformantes e os controles negativos.

5.2.8 Determinação do número de cópias de GHch inserido no genoma dos clones recombinantes de *P. pastoris*

Para obter-se uma aproximação do número de cópias de GHch inseridas no genoma de *P. pastoris*, procedeu-se a uma análise por PCR Real Time (Material e Métodos, item 4.14), empregando o DNA total das linhagens recombinantes. Foram selecionados 3 clones GS115/PICGH (capazes de expressar e secretar a da proteína GHc) e 3 clones GS115/HILGH (produção interna da proteína). Estes clones tiveram seus DNAs genômicos extraídos e empregados como molde para amplificação por PCR convencional de um fragmento interno de 206 pb de GHch (Material e Métodos, item 4.13), para que os oligonucleotídeos fossem testados inicialmente quanto à sua especificidade. O DNA total de todos os clones de *P. pastoris* recombinantes resultou na amplificação um único fragmento de DNA de tamanho esperado, de 206 pb, e ausência de bandas inespecíficas (Figura 16).

Figura 16— Amplificação por PCR do cDNA de GHch inserido no DNA cromossômico dos clones recombinantes de *P. pastoris*. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng Fermentas^R; 2 – controle negativo da reação de PCR, “branco”; 3 e 4 – amplificação com DNA genômico extraído de clones recombinantes de *P. pastoris* GS115/PICGH como molde; 5 e 6 - amplificação com DNA genômico extraído de clones recombinantes de *P. pastoris* GS115/HILGH como molde.

Foram realizados 4 ensaios de PCR Real time. A média dos valores de C_t obtidos foi utilizada para o cálculo do número de cópias aproximado de GHch inseridas no genoma de *P. pastoris* (Material e Métodos, item 4.14). Os resultados se encontram apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de média de C_t e número de cópias inseridas no genoma de clones recombinantes de *P. pastoris*.

Clone de <i>P. pastoris</i>	Média do C_t obtido	Nº de cópias utilizando-se o padrão pHILGH	Nº de cópias utilizando-se o padrão pPICGH	Média do nºo de cópias
GS115/HILGH I	20,51	1,61	2,27	1,94
GS115/HILGH 4	21,25	2,68	3,78	3,24
GS115/HILGH 5	20,44	1,53	2,17	1,85
GS115/PICGH 2	20,30	1,40	1,96	1,68
GS115/PICGH16	22,22	5,28	7,45	6,36
GS115/PICGH 25	22,28	5,48	7,72	6,60

A tabela 10 apresenta os valores aproximados de números de cópias inseridas nos genomas dos clones selecionados de *P. pastoris* recombinantes GS115/HILGH e GS115/PICGH, em 2 situações de cálculo, conforme demonstrado em Material e Métodos, item 4.14. Na primeira situação considerou-se o plasmídeo pHILGH como padrão para o cálculo, e, na segunda situação, o plasmídeo pPICGH foi considerado o padrão. Os dados indicam que foram obtidos clones GS115/HILGH com inserção de 2 a 3 cópias do cassete de expressão; e, foram obtidos clones GS115/PICGH com inserção de 2 a 7 cópias do cassete de expressão.

5.3 OBTENÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES *S. cerevisiae* PRODUTORES DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE CARPA *H. molitrix* (GHch)

Foram realizados vários passos intermediários de clonagem para obtermos os plasmídeos necessários para serem empregados na transformação genética de *S. cerevisiae*, e, assim, conseguir obter clones recombinantes que expressam e excretam hormônio de crescimento da carpa *H. molitrix* (GHch). A seguir, é apresentado um esquema geral das clonagens que foram realizadas (Figura 16), que estão detalhadas nos tópicos seguintes.

Figura 17 – Esquema geral de clonagens realizadas para a expressão de GHch em *S. cerevisiae*: A) construção dos plasmídeos de expressão pMAGH (epissomal) e pGEM-dGHd (δ-integração); B) Construção dos plasmídeos de expressão e secreção pMAILGH, pMAKTGH (epissomais) e pGEM-dILGHd (δ-integração).

5.3.1 Construção do plasmídeo episomal para expressão de hormônio de crescimento de carpa *H. molitrix* em *S. cerevisiae*

Para se obter a expressão do hormônio de crescimento de carpa *H. molitrix* (GHch) sob controle do promotor forte e constitutivo de *S. cerevisiae* PGK (gene da fosfoglicerato quinase), foi realizada a construção do plasmídeo pMAGH (Figura 18). Para tanto, o fragmento contendo GHch (603 pb) foi retirado do plasmídeo TOPOGH com a enzima de restrição *Bgl* II; e, o plasmídeo pMA91 foi digerido com *Bgl* II. A mistura de ligação de ambos foi empregada na transformação genética de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, item 4.16). Foram obtidos, aproximadamente, 300 clones Amp^R. Foram selecionados 11 clones para análise da orientação da clonagem, por análise de restrição dupla com as enzimas *Hind* III e *Sac* I. Foram visualizadas bandas correspondentes a fragmentos de 3 tamanhos (aproximadamente 800pb, 1700pb e 7500pb), compatíveis com os esperados caso fosse obtido sucesso (Figura 18B).

Figura 18 – A) Esquema da construção do plasmídeo pMAGH. B) Análise da orientação da inserção por restrição com as enzimas *Hind* III e *Sac* I e posterior eletroforese em gel de agarose 0,8%. As setas indicam as bandas correspondentes aos tamanhos esperados pela clonagem correta do fragmento (aproximadamente 770pb, 1700pb e 7500pb). 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2-8 e 10-12 – clones recombinantes que não apresentaram padrão de bandas esperados ou que tiveram visualização de má qualidade; 9 – clone que apresentou padrão de bandas esperado e com visualização eficiente.

Caso a inserção estivesse em orientação contrária, seriam vistos fragmentos de aproximadamente 600pb, 1900 pb e 7500pb. Apenas 2 clones apresentaram o perfil esperado de bandas. Estes clones foram analisados novamente para certificação da clonagem. O sucesso da obtenção do plasmídeo pMAGH foi confirmado por sequenciamento.

5.3.2 Construção do plasmídeo pGEM-dGHd (δ -integração)

O cassete de expressão de GHch (Ppgk-GHch-Tpgk, 2469pb) foi removido do plasmídeo pMAGH, por digestão com a enzima *Hind* III. O vetor de integração pGEM-TEasy Delta foi linearizado com a enzima *Acc* I. Após tratamento do plasmídeo e do inserto com o fragmento Klenow da enzima DNA polimerase, procedeu-se a ligação de ambos com a enzima DNA T4 ligase (Figura 19). A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, item 4.16). Foram obtidos, aproximadamente, 40 clones Amp^R.

Figura 19- Esquema de construção do plasmídeo pGEM-dGHd.

Foram selecionados, ao acaso, 20 clones para análise da clonagem, por análise de restrição com a enzima *Not I* e apenas 2 clones apresentaram liberação de fragmento de tamanho esperado de, aproximadamente, 2800 pb. O DNA plasmidial desses clones foi posteriormente utilizado como molde em reação de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos GHForwardBglII EcoRI e GHReverseBglII EcoRI (Material e Métodos 4.12, Tabela 7). O *amplicom* obtido foi submetido à sequenciamento, que confirmou o sucesso da clonagem e, portanto, da construção do plasmídeo pGEM-dGHd.

5.3.3 Construção do plasmídeo episossomal pMAILGH para expressão e excreção de GHch em *S. cerevisiae*

Conforme descrito em Revisão Bibliográfica, item 2.6, foi verificado que um fragmento de interleucina humana, contendo mutações pontuais estratégicas, fusionado a sequência sinal da toxina killer de *Kluyveromyces lactis* inserido à

montante de um gene, resulta na super expressão e excreção do seu produto gênico.

Clonagem de sequencia sinal modificada (SSIL):

Para a construção do plasmídeo de expressão em *S. cerevisiae* capaz de produzir altos níveis de expressão e de excreção de GHch, foi realizada a inserção de um fragmento de DNA potencialmente potencializador da expressão e excreção à montante 5' de GHch.

Assim, para obter esta sequência, foi realizada uma PCR com oligonucleotídeos iniciadores extensos, que continham sítios de restrição apropriados, a sequência sinal, o fragmento de interleucina humana, sítio da protease trombina e cauda de histidina (Material e Métodos, item 4.15, Figura 5). Nesta reação de PCR não foi utilizado DNA molde, já que os próprios oligonucleotídeos se anelavam em uma das extremidades e serviam tanto como iniciadores como molde da reação.

O produto de PCR (183 pb) foi inserido no plasmídeo comercial pCR® 2.1-TOPO®. A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de *E. coli* DH5α (Material e Métodos, item 4.16). Foram obtidos, aproximadamente, 100 clones Amp^R, dos quais 10 clones foram selecionados para análise da clonagem por análise de restrição com a enzima *Bam* HI. A análise apresentou 6 clones com o padrão esperado de bandas em gel de agarose submetido a eletroforese (fragmentos de aproximadamente 200 pb e 3900 pb). Esta clonagem deu origem ao plasmídeo TOPOSSIL (Figura 20A).

Clonagem de GHch com sítio KEX2:

Para esta clonagem, foi realizada a introdução dos sítios de restrição apropriados e também o sítio da protease KEX2 em GHch. Sendo assim, foram desenhados novos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de GHch, sendo que estes continham em ambas extremidades o sítio da enzima de restrição *Sal* I; e, à montante o sítio KEX2 (Material e Métodos, item 4.12, Tabela 7). Como DNA molde, foi utilizado o DNA plasmidial TOPOGH (Resultados, item 5.3.1). A reação de PCR produziu um *amplicom* de tamanho esperado de, aproximadamente, 600 pb (Figura 20B). O produto de PCR foi inserido no plasmídeo comercial pCR® 2.1-TOPO®. A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de *E. coli*

DH5 α (Material e Métodos, item 4.16). Foram obtidos, aproximadamente, 150 clones Amp^R, dos quais 10 clones selecionados tiveram os seus DNAs submetidos a restrição com a enzima *Bam* HI. A análise apresentou 10 clones com plasmídeos com o padrão esperado de bandas em gel de agarose submetido a eletroforese (fragmentos de aproximadamente 600 pb e 3900 pb). Esta clonagem deu origem ao plasmídeo TOPOGHSAL (Figura 20B).

A

Figura 20 – A) Esquema de construção do plasmídeo TOPOSSIL, seguido de gel de agarose submetido a eletroforese com *amplicons* do fragmento SSIL, onde: 1- padrão de tamanho molecular "GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder" Fermentas^R; 2- controle negativo (branco) da reação de PCR; 3 e 4 – *amplicons* resultantes de reações idênticas de PCR para amplificação de SSIL. B) Esquema de construção do plasmídeo TOPOGHSAL, seguido de gel de agarose submetido a eletroforese para análise da amplificação de GHch, onde: 1- padrão de tamanho molecular "GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder" Fermentas^R; 2- controle negativo (branco) da reação de PCR; 3-5 – *amplicons* resultantes de reações idênticas de PCR para amplificação de GHch.

Construção da fusão:SSIL-KEX-GH

O plasmídeo TOPOSSIL foi linearizado com a enzima de restrição *Sal* I, e o fragmento KEX-GHch foi retirado do plasmídeo TOPOGHSAL por digestão com a enzima de restrição *Sal* I (Figura 21A). Ambos os fragmentos foram ligados com a enzima T4 DNA ligase. A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de *E. coli* DH5α (Material e Métodos, item 4.16). Foram obtidos, aproximadamente, 10 clones Amp^R, que foram analisados por análise de restrição com a enzima *Sac* I. O plasmídeo de apenas 1 dos clones apresentou o perfil de tamanho compatível com o esperado (Figura 21B). Esta análise mostrou não só o sucesso da clonagem do fragmento no plasmídeo, como também a orientação

correta que a inserção ocorreu. Os fragmentos SSIL e GHch possuem sítios de *Sac* I. Quando os fragmentos SSIL e GHch estão fusionados na orientação correta, ocorre a liberação de um fragmento de 334 pb. Caso a clonagem houvesse ocorrido na orientação contrária, seria liberado um fragmento de, aproximadamente, 500pb. O plasmídeo final foi denominado TOPOSSILGH.

Figura 21 – A) Esquema de construção do plasmídeo TOPOSSILGH. B) Análise em gel de agarose de DNA plasmidial isolado em clones recombinantes, após digestão com *Sac* I. 1- padrão de tamanho molecular "GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder" Fermentas^R; 2-4 e 6 – DNA plasmidial de clones que não apresentaram padrão de bandas esperado; 5 – DNA plasmidial que apresentou perfil esperado, com presença de fragmento, aproximadamente, 334 pb.

O fragmento de DNA de 761 pb formado pela “sequência sinal, seguida do fragmento de interleucina, do cDNA de GH, sítio de trombina e cauda de histidina” do plasmídeo TOPOSSILGH, ladeado pelo sítio de restrição *Bam* HI foi retirado do plasmídeo TOPOSSILGH, com a enzima *Bam* HI. O plasmídeo pMA91 foi aberto com a enzima *Bgl* II, entre o promotor e terminador PGK. Foi realizada a mistura de ligação do fragmento de DNA e plasmídeo linearizado (Figura 22A). A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, item 4.16).

Figura 22 – A) Esquema de construção do plasmídeo pMAILGH. B) Identificação dos plasmídeos recombinantes obtidos com a mistura de ligação de pMA91 e inserto, digestão com *Hind* III. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2-4 – DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que apresentaram padrão de bandas esperado com presença de fragmentos de DNA de aproximadamente 2627 pb, 3500 pb e 4134 pb; 5-9 - DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que não apresentaram padrão de fragmentos de DNA esperado C) Identificação dos plasmídeos recombinantes obtidos com a mistura de ligação de pMA91 e inserto pela digestão com *Sac* I. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2-4 - DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que apresentaram padrão de fragmentos de DNA esperado com pela liberação do fragmento. de aproximadamente 334 pb; 5 - DNA plasmidial isolado de clone recombinante sem padrão de fragmentos de DNA esperado.

Foram obtidos, aproximadamente, 10 clones Amp^R, que tiveram os seus DNAs plasmidiais analisados por, análise de restrição com a enzima *Hind* III. A análise apresentou 3 clones (clones 2, 3 e 4, Figura 22B) contendo plasmídeos com perfis de restrição esperados (fragmentos de aproximadamente 2627 pb, 3500 pb e 4134 pb). Esta clonagem deu origem ao plasmídeo pMAILGH (Figura 22A).

Os clones tiveram a clonagem confirmada novamente por análise de digestão com a enzima de restrição *Sac* I, que apresentou padrão esperado de bandas no gel de agarose submetido a eletroforese, com a liberação de fragmento de aproximadamente 334 pb (Figura 22C). A orientação do inserto foi confirmada por sequenciamento, confirmando o sucesso da construção do plasmídeo pMAILGH.

5.3.4 Construção do plasmídeo pGEM-dILGHd, adequado para transformação de *S. cerevisiae* por δ -integração

O plasmídeo pMAILGH foi utilizado como molde para amplificação por PCR do “cassete P-pgk, sequência sinal potencializada (SSIL), cDNA de GHch e sítio de trombina (ST), por causa de histidina (His), T-pgk”. Foi realizada a mistura de ligação deste fragmento com o plasmídeo comercial pCR® 2.1-TOPO® (Figura 23A). A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, item 4.16). Foram obtidos 20 clones Amp^R, e o DNA plasmidial de 7 clones tiveram seus DNAs plasmidiais isolados e analisados por análise de restrição com a enzima *Bam* HI. Destes 5 dos 7 DNAs plasmidiais isolados apresentaram o padrão de fragmentos de DNA esperado (aproximadamente 3000 pb e 4000 pb) para clonagem desejada. Obteve-se assim o plasmídeo TOPGKSILGH (Figura 23B).

A

Figura 23 – A) Esquema de construção do plasmídeo TOPGKSILGH. B) Identificação dos plasmídeos recombinantes por análise de restrição com a enzima *Bam* HI. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2 e 6 - DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que não apresentaram padrão de fragmentos de DNA esperado; 3-5, 7 e 8 - DNA plasmidial isolado de clones recombinantes que apresentaram padrão de fragmentos de DNA esperado (aproximadamente 3000 pb e 4000 pb).

O cassete “P-pgk/SSIL/GHch/ST/HT/T-pgk” foi retirado do plasmídeo TOPGKSILGH com a enzima de restrição *Bam* HI. O plasmídeo pGEM-T EasyDelta foi completamente amplificado por reação de PCR com oligonucleotídeos contendo os sítios de *Bam* HI nas extremidades. Obteve-se o plasmídeo pGEMTEasyDelta/*Bam* HI. Foi realizada a mistura de ligação do fragmento e vetor. A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, item 4.16). Foram obtidos 4 clones Amp^R, que tiveram os DNAs plasmidiais analisados por análise de restrição com a enzima *Eco* RI. Dentre os 4 clones obtidos, os plasmídeos de apenas 2 apresentaram o padrão de bandas esperado (aproximadamente 2900 pb e 3100 pb) (Figura 24B). Obteve-se assim o plasmídeo integrativo para secreção de GHch, pGEM-dILGHd (Figura 24).

Figura 24 – A) Esquema de construção do plasmídeo pGEM-dILGHd. B) Digestão de DNAs plasmidais de clones transformantes bacterianos. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2- pGEM-dILGHd; 3- pGEM-dILGHd digerido com enzima de restrição *Eco* RI.

5.3.5 Construção do plasmídeo episomal pMAKTGH para expressão e excreção em *S. cerevisiae* de GHc

Para se obter um padrão de comparação entre a eficiência de excreção proporcionada pela sequência sinal modificada, que foi inserida nos plasmídeos pMAILGH e pGEM-dILGHd, e uma sequência sinal padrão, foi contruído o plasmídeo pMAKTGH. Para construção desse plasmídeo, foi realizada uma amplificação por PCR, na qual utilizou-se o DNA plasmidial de pMAILGH como DNA molde. Os oligonucleotídeos utilizados tinham seu anelamento localizado na região da sequência sinal de *K. lactis* e no início da sequência de GHch, de forma que houvesse a amplificação de todo o plasmídeo, exceto da região entre a sequência sinal KT e o cDNA de GHc (fragmento de interleucina humana) (Figura 25A). Os oligonucleotídeos utilizados (KTSmaF e KTSmaR, Material e Métodos, item 4.12, Tabela 7) possuíam em suas extremidades sítios *Sma* I, além de mais 6 nucleotídeos, que serviram como facilitadores da digestão enzimática do produto de PCR. O sítio *Sma* I foi introduzido neste oligonucleotídeo iniciador, já que é ausente no plasmídeo pMAILGH. O produto de PCR obtido foi submetido a digestão com a enzima de restrição *Sma* I e utilizado para ligação com uso da enzima T4 DNA ligase. A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de *E. coli* DH5 α (Material e Métodos, item 4.16). Foram obtidos 3 clones Amp^R, que tiveram seus DNAs plasmidiais analisados por restrição com a enzima *Hind* III. Apenas 1 dos clones apresentou o padrão de tamanhos de fragmentos esperados (aproximadamente 2500 pb, 3500 pb e 4100 pb). Deste modo obteve-se o plasmídeo pMAKTGH que possui como sequência sinal apenas sequência sinal padrão de *Kluyveromyces lactis* (Figura 25B e C).

Figura 25 – Esquema de construção do plasmídeo pMAKTGH: A) Amplificação por PCR utilizando o plasmídeo pMAILGH como molde; B) Plasmídeo pMAKTGH obtido após amplificação do plasmídeo pMAILGH; C) Análise de restrição do plasmídeo do clone transformante com *Hind* III. 1 – padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500ng, Fermentas[®]; 2 – plasmídeo pMAKTGH; 3- plasmídeo pMAKTGH digerido com *Hind* III, bandas com tamanhos de aproximadamente 2500 pb, 3500 pb e 4100 pb.

5.3.6 Obtenção de clones recombinantes de *S. cerevisiae*

Foram empregadas como hospedeiras de transformação duas linhagens da levedura *S. cerevisiae* YPH 250 e YPH 252. As linhagens foram co-transformadas, utilizando-se 5µg de cada plasmídeo, em duas combinações: pGEM-dGHd + pAJ50 e pGEM-dILGHd + pAJ50. A seleção dos transformantes com os vetores pGEM-dGHd e pGEM-dILGHd foi realizada em duas etapas:

Etapa 1: Seleção dos clones transformantes por complementação gênica

Os transformantes foram selecionados em meio mínimo SD sem leucina.

Tabela 11 – Eficiência de transformação de linhagens de *S. cerevisiae* com o plasmídeo pAJ50

Linhagem	Número aproximado de transformantes	DNAs	Eficiência de transformação (nº de transformantes/µg de DNA)
YPH 250	6.894	dGHd + pAJ50	$0,861 \times 10^3$
YPH 252	5.100	dGHd + pAJ50	$0,637 \times 10^3$
YPH 250	8.400	dILGHd + pAJ50	$1,050 \times 10^3$
YPH 252	8.400	dILGHd + pAJ50	$1,050 \times 10^3$

Etapa 2: Seleção dos clones recombinantes que receberam o fragmento dGHd ou dILGHd.

Para seleção dos clones que receberam o fragmento de DNA dGHd e dILGHd, o DNA total de aproximadamente 100 clones transformantes Leu⁺, obtidos na etapa 1, foi isolado, purificado e empregado como molde em reação de PCR com oligonucleotídeos (GHForwardBgIIIIEcoRI e GHReverseBgIIIIEcoRI; Material e Métodos, item 4.12, Tabela 7) específicos para o DNA de GHch.

Foram identificados 4 clones derivados da linhagem YPH 252 que continham cópias do fragmento dGHd integradas no genoma (YPH252/dGHd29; YPH252/dGHd30; YPH252/dGHd45; YPH252/dGHd49) (Figura 26A e B); e, foram identificados 3 clones contendo cópias do fragmento dILGHd integradas ao genoma (YPH252/dILGHd29; YPH252/dILGHd49; YPH252/dILGHd64) (Figura 26D e D).

Figura 26 - A e B: seleção dos clones recombinantes que receberam o fragmento dGHd. 1 e 21 - padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2-20 e 22-31 - clones recombinantes de YPH252. As setas indicam os clones YPH252/dGHd29, YPH252/dGHd30, YPH252/dGHd45 e YPH252/dGHd49, consecutivamente; C e D: seleção dos clones recombinantes que receberam o fragmento dILGHd. 1, 21 e 41 - padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R; 2-20, 22-40 e 42-60: clones recombinantes de YPH252. As setas indicam os clones YPH252/dILGHd29, YPH252/dILGHd49 e YPH252/dILGHd64, consecutivamente.

5.3.7 Caracterização bioquímica e imulógica da proteína GHch produzida por clones recombinantes de *S. cerevisiae*

A proteína recombinante GHch, produzida no interior celular dos clones recombinantes, foi analisada. Os 3 clones recombinantes obtidos da linhagem YPH 252/dGHd tiveram suas células crescidas em meio completo YPD. Outro clone recombinante que carregava o plasmídeo epissômico pMAGH teve suas células crescidas em meio mínimo seletivo. O extrato celular do sedimento destas culturas foi analisado em SDS-PAGE (Material e Métodos, item 4.22). Podem ser visualizadas bandas de proteínas de, aproximadamente, 20 KDa, que correspondem ao tamanho esperado da proteína heteróloga GHch (Figura 27).

Figura 27 – SDS-PAGE. 1- YPH 252 /pMAGH; 2 a 4- YPH252/dGHd; 5-YPH 252 sem introdução de DNA exógeno; 6 - padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas^R).

Para se ter certeza que a proteína de 20 KDa expressa pelos clones recombinantes era, de fato, o hormônio de crescimento de GHc desejada, foi realizado ensaio de “Western Blot” com anticorpo anti-GHc comercial (Material e Métodos, item 4.24) (Figura 28). Neste ensaio verificou-se uma hibridação fraca do extrato celular de 3 clones de YPH 252/dGHd, sendo eles: YPH 252/dGHd29, YPH 252/dGHd30 e YPH 252/dGHd49.

Figura 28 – A) SDS- PAGE de proteínas de extrato celular de clones de *S. cerevisiae* YPH252/dGHd. 1 – padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas^R); 2 – Controle YPH252; 3- YPH 252/dGHd29; 4 – YPH 252/dGHd30; 5 – YPH 252/dGHd45; 6 - YPH252/dGHd49. B) “Western Blot” com anticorpo anti-GHc comercial de proteína de extrato celular dos clones YPH 252/dGHd29, YPH 252/dGHd30, YPH/dGHd45 e YPH252/dGHd49.

O ensaio de “western Blot” com precipitado de culturas (Material e Métodos, 4.20) dos clones de *S. cerevisiae* capazes de secretar a proteína GHch para o meio externo, mostrou a revelação de apenas uma banda, correspondente ao clone YPH252/dILGH64 (Figura 29).

Figura 29 – A) SDS- PAGE de precipitado de meio de cultura de inóculo de clones transformantes de *S. cerevisiae* YPH252dILGHd. 1 – padrão de tamanho molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas^R); 2 – Controle YPH252; 3- YPH 252/dILGHd29; 4 – YPH 252/dILGHd49; 5 – YPH 252/dILGHd64. B) “Western Blot” com anticorpo anti-GHc comercial de precipitado de meio de cultura de inóculo dos clones YPH 252/dILGHd29, YPH 252/dILGHd49, YPH/dILGHd64.

5.3.8 Dosagem de GHc em meio de cultura por clones YPH252/ILGH

A proteína GHch secretada no meio de cultura pelos clones YPH252/dILGHd foi analisada quanto à sua dosagem. Aliquotas da cultura do controle negativo (YPH252) e dos clones das linhagens recombinantes de YPH252/dILGHd foram precipitadas com TCA (Material e Métodos, 4.20). De acordo com a dosagem de proteínas totais, por comparação com a curva de calibração, (Material e Métodos, item 4.25), houve uma maior produção da proteína GHch pelo clone recombinante YPH252/dILGHd64 (Tabela 12).

Tabela 12 – Dosagem de proteína total presente no sobrenadante da cultura de clones recombinantes.

Clone de <i>S. cerevisiae</i>	Proteínas totais
YPH252 (controle)	226,4 µg/ml
YPH252/dILGHd29	292,8 µg/ml
YPH252/dILGHd49	276,0 µg/ml
YPH252/dILGHd64	1272,0 µg/ml

5.3.9 Curvas de crescimentodos clones de *S. cerevisiae* recombinantes

Alguns dos clones recombinantes obtidos tiveram seu crescimento em meio mínimo, contido em frascos agitados, analisados (Material e Métodos, item 4.22). As curvas de crescimento de transformantes de YPH252/dGHd e YPH252/dILGHd encontram-se apresentadas nas Figuras 30 e 31, respectivamente.

Figura 30 – Curva de crescimento dos transformantes de *S. cerevisiae* YPH252/dGHd que expressam GHch.

Figura 31 – Curva de crescimento dos transformantes de *S. cerevisiae* YPH252/dILGHd que expressam e excretam GHch.

O crescimento de todos os clones ocorreu como esperado com pequena diferença entre os clones transformantes e o controle negativo.

5.3.10 Obtenção do número de cópias de GHch inseridas no genoma dos clones recombinantes de *S. cerevisiae*

Para obter-se uma aproximação do número de cópias de GHch inseridas no genoma de *S. cerevisiae*, procedeu-se a uma análise por PCR Real Time, a partir do DNA total dos clones recombinantes. Foram utilizados os 3 clones YPH252/ILGH (capazes de expressar e secretar a da proteína GHch) e os 4 clones YPH252/GH (produção interna da proteína). Estes clones tiveram seus DNAs genômicos extraídos e empregados como molde para amplificação por PCR convencional de um fragmento interno de 206 pb de GHch (Material e Métodos, item 4.13), para que os oligonucleotídeos fossem testados quanto à sua especificidade (Figura 32).

Figura 32– Amplificação por PCR do cDNA de GHch inserido em clone recombinante de *S. cerevisiae*. 1- padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas[®]; 2 – controle negativo da PCR, “branco”; 3- amplificação com DNA genômico extraído de clone recombinante de *S. cerevisiae* YPH252/dGHd como molde.

Após 4 ensaios de PCR Real time, uma média das medidas de C_t foi obtida e utilizada para os cálculos (Material e Métodos, item 4.14), resultando nos valores apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores obtidos com reações de PCR Real Time e cálculo do número de cópias inseridas nos genomas de clones de *S. cerevisiae*.

Clone de <i>S. cerevisiae</i>	Média do Ct obtido	Nº de cópias utilizando-se o padrão pHILGH	Nº de cópias utilizando-se o padrão pPICGH	Média do nº de cópias
YPH252/ILGH 29	22,44	4,81	6,77	5,79
YPH252/ILGH 49	22,52	5,05	7,12	6,09
YPH252/ILGH 64	22,50	2,93	4,13	3,53
YPH252/GH 29	21,93	3,36	4,74	4,05
YPH252/GH 30	21,39	2,31	3,257399	2,78
YPH252/GH 45	23,19	8,05	11,34292	9,6
YPH252/GH 49	22,88	6,51	9,17084	7,83

A Tabela 11 apresenta os valores aproximados de números de cópias inseridas no genoma dos clones de *S.cerevisiae* em 2 situações de cálculo. Na primeira situação, considerou-se o plasmídeo pHILGH como padrão para o cálculo do número de cópias; e, na segunda situação, o plasmídeo pPICGH foi considerado o padrão. Os dados indicam que foram obtidos clones YPH252/dILGHd com inserção de 4 a 6 cópias do cassete de expressão dILGHd; e, foram obtidos clones YPH252/dGHd com inserção de 3 a 10 cópias do cassete de expressão dGHd.

6 DISCUSSÃO

6.1 EXPRESSÃO DE GHch EM *P. pastoris*

A expressão de hormônio de crescimento da carpa *H. molitrix* da linhagem de *P. pastoris* GS115/HILGH para expressão interna se mostrou eficiente, como foi visto na Figura 12. Foi possível identificar com clareza a banda correspondente à proteína GHch recombinante, de tamanho esperado (20 KDa). O ensaio de hibridação desta proteína contra o anticorpo anti-GHc comercial, indicou especificidade (Figura 13). Entretanto, não foram obtidos mais clones da transformação de *P. pastoris* GS115 com o plasmídeo pHILGH que exibissem este perfil protéico. Apesar de não ter sido evidenciada a produção da proteína, foi possível identificar amplificação, em reações de PCR, de um fragmento de DNA de, aproximadamente, 600 pb (correspondente a GHch), obtido com o DNA total de todos os clones recombinantes empregados como molde. O fato de apenas GS115/HILGH (clone 4) ter produzido a proteína recombinante desejada revelada em SDS-PAGE e “western blot”, é compatível com o fato de ter sido este o clone que apresentou o maior número de cópias integradas de GHch no genoma, dentre todos os clones analisados pelo ensaio de PCR em Tempo Real, cerca de 3 cópias.

Com relação aos clones da linhagem GS115/PICGH que deveriam estar excretando GHch, não foi possível visualizar a banda relativa a GHch recombinante em gel SDS-PAGE ou verificar hibridação pelo ensaio de “western blot”. Estas análises haviam sido realizadas empregando-se o precipitado do sobrenadante da cultura. É possível que a precipitação não tenha sido apropriada, devido ao meio de cultura utilizado que possui alta concentração de sais fosfato.

De fato, segundo a Professora Lídia Moraes da UNB, o meio de cultura utilizado para induzir a expressão em *P. pastoris* pode exercer grande influência no processo de obtenção de proteínas recombinantes de *P. pastoris*, podendo ser extremamente prejudicial nas corridas eletroforéticas das proteínas no gel de poliacrilamida. Para evitar isto, é necessário que seja feito um passo prévio de diálise das proteínas. Isso pode ter afetado a nossa análise da proteína recombinante. Cabe salientar que um fragmento interno do gene GHch foi amplificado por PCR (tamanho do *amplicom* de aproximadamente 200 pb),

utilizando-se o DNA total de clones da linhagem *P. pastoris* GS115/PICGH, como molde e os oligonucleotídeos iniciadores GHForwardBgIIIIEcoRI e RevGH206 (Tabela 7) (Figura 33). Além disso, foi possível verificar resistência a 0,15 mg/ml de geneticina (Figura 11), indicando a inserção do cassete heterólogo no genoma da levedura.

Figura 33 – Amplificação de cDNA de GHch, utilizando-se DNA genômico de clones de *P. pastoris* GS115 como DNA molde. 1 – GS115/HILGH4; 2 – GS115/HILGH5; 3 – GS115/PICGH16; 4 – GS115/PICGH25; 5 – GS115/PICGH4; 6 – GS115/PIC9K (controle negativo); 7 – GS115 (controle negativo); 8 – GS115/HILGH; 9 e 10 – controle negativo, branco; 11 – GS115/PICGH; 12 – padrão de tamanho molecular 1 Kb, 500 ng, Fermentas^R

A análise da dosagem de proteínas totais mostrou que houve aumento na produção de proteínas pelo clone GS115/PICGH25, quando comparado aos controles. Este mesmo clone apresentou tempo de crescimento sem alteração quando comparado aos controles. Apenas os clones GS115/PICGH3 e GS115/PICGH9 (controle) apresentaram crescimento mais lento, o que pode ser devido ao local de inserção das cópias de GHch nos genomas destes clones.

A análise do número de cópias integradas ao genoma dos clones da linhagem GS115/PICGH indicaram a presença de 2 a 7 cópias do gene GHch inseridas no genoma. Essa idéia é aproximada, pois para se ter um valor exato, seria necessário que tivéssemos trabalhado com um padrão que fosse com certeza um clone de *P. pastoris* da mesma linhagem, ou seja, apresentando mesmo tamanho de genoma, e que tivesse inserido em seu genoma apenas uma cópia do cDNA de GHch de peixe. Apenas com o C_t deste padrão seria possível fazer um cálculo efetivo. Como não foi possível obter tal padrão, como controles foram utilizados os plasmídeos construídos neste trabalho, pHILGH e pPICGH. Este padrão foi empregado, pois sabíamos, com certeza, o tamanho do plasmídeo e que havia somente uma cópia de Ghch inserida

nele. Sendo assim, foram realizados cálculos que consideravam o tamanho do DNA total da amostra, o C_t da amostra, o tamanho do plasmídeo padrão, o C_t do plasmídeo padrão e quantas vezes o DNA da amostra seria maior do que o DNA do padrão, já que este tamanho influencia no C_t obtido nas reações, devido à exposição do molde aos oligonucleotídeos na reação.

6.2 EXPRESSÃO DE GHch EM *S. cerevisiae*

A expressão de GHch interna pelos clones da linhagem *S. cerevisiae* YPH252/dGHd foi obtida com sucesso. Foi possível identificar 4 clones com a correta inserção do cDNA de GHch no genoma, pela visualização da amplificação de banda de tamanho correspondente ao do gene Ghch (aproximadamente 600 pb) em gel de agarose (Figura 26A e B). A análise da proteína em gel de poliacrilamida apresentou bandas fracas, mas foi possível visualizar a hibridação contra o anticorpo anti-GHc comercial, em tamanho correto e de forma específica, em 3 clones (Figura 27 e 28).

A expressão e excreção de GHch, utilizando a sequência sinal potencializada, também, foi alcançada. Foram identificados 3 clones positivos YPH252/dILGHd empregando amplificação por PCR do cDNA de GHch, utilizando-se o DNA total dos clones recombinantes como molde (Figura 26C e D). Após a precipitação com TCA, não foi possível visualizar bandas com clareza no gel de SDS. Entretanto, o clone YPH252/dILGHd64, mostrou uma banda nítida e específica da hibridação da proteína heteróloga com o anticorpo anti-GHc comercial (Figura 29). A precipitação com TCA pode não ter sido eficiente. É possível que sejam necessários ajustes na concentração de TCA e nos passos de lavagens do protocolo de precipitação. Talvez com essas adaptações, seja possível identificar bandas, mesmo que mais fracas, de hibridização dos outros clones. Ainda assim, pela análise de dosagem de proteínas totais, foi possível identificar aumento na produção de proteínas totais de todos os clones recombinantes, sendo que o clone YPH252/dILGH64d apresentou o maior nível de produção, cerca de 1272,0 µg/ml (Tabela 12), aproximadamente 6 vezes a mais que o controle.

A curva de crescimento dos clones de *S. cerevisiae* dos clones YPH252/dILGHd recombinantes de expressão e excreção de GHch, não apresentaram diferença quando comparadas com a curva do controle (Figura 31). A

curva dos clones recombinantes da linhagem YPH252/dGHd de expressão interna, apresentou crescimento mais lento de apenas 2 clones (29 e 49) (Figura 30).

A análise do número de cópias inseridas no genoma dos clones recombinantes de *S. cerevisiae*, apontou a inserção de, aproximadamente, 3 a 10 cópias de GHch inseridas no genoma dos clones recombinantes YPH252/dGHd; e, 4 a 6 cópias de Ghch inseridas no genoma dos clones YPH252/dILGHd (Tabela 13). Curiosamente, o clone recombinante YPH252/dILGHd64 apresentou apenas 3 cópias de Ghch inseridas no genoma.

6.3 A EXPRESSÃO DE GH DE PEIXE EM LEVEDURAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Hormônio de crescimento de peixes já foram clonados em vários microrganismos (Tabela 2). Em *S. cerevisiae*, o cDNA do hormônio de crescimento da truta *Oncorhynchus mykiss* foi clonado no plasmídeo epissômico pMA91, sob controle do promotor PGK (Jin et al., 1999). Nesse trabalho, a proteína expressa foi purificada e administrada no peixe Tilápia, e estes apresentaram aumento em seu crescimento.

A expressão interna em *S. cerevisiae*, realizada em nosso trabalho, foi realizada com o objetivo de que os clones recombinantes de levedura possam vir a ser administrados na forma de suplementação alimentar de peixes, eliminando os passos de purificação da proteína, e facilitando o acesso dos peixes à esta proteína. Neste trabalho, foram isolados 3 clones que apresentavam cerca de 3 a 9 cópias do cDNA de GHch inseridas em seus genomas. O extrato celular destes 3 clones, também foi capaz de hibridizar de forma específica contra o anticorpo anti-GHc comercial. Os 3 clones recombinantes de *S. cerevisiae* (YPH252/dGHd29, YPH252/dGHd30 e YPH252/dGHd49) apresentaram expressão eficiente de GHch recombinante. É necessário que estes clones sejam bem avaliados e comparados quanto às suas eficiências de expressão e produção da proteína GHch. Estes resultados indicam grande potencial biotecnológico destes clones. Entretanto, é necessário que sejam feitos mais estudos de caracterização deste clone, como qual a quantidade real de GHch que está sendo expressa. Além disso, seria interessante que fosse feito um estudo para determinar a meia vida do hormônio de crescimento expresso e se ele seria capaz de atingir o trato digestivo do peixe, em forma

biologicamente ativa.

A expressão e excreção de GHch em *S. cerevisiae* recombinante também se mostrou efetiva em um dos clones (YPH252/dILGHd64) que, além de ter tido o seu extrato celular capaz de hibridizar de maneira específica contra o anticorpo anti-GHc comercial, também apresentou um alto nível de produção de proteína total quando comparado com o controle (YPH252). Este clone também possui grande potencial biotecnológico e poderia ser alvo de estudos de purificação da proteína GHch excretada.

Os clones recombinantes de *S. cerevisiae* são de grande interesse e potencial, pois são clones estáveis que possuem várias cópias do cassete de expressão do cDNA de hormônio de crescimento da carpa *H. molitrix* inseridas em seus genomas e estas cópias estão inseridas de maneira estável.

Os cDNAs da carpa *C. idella* e do peixe seabass japonês foram clonados em *P. pastoris* de maneiras diferentes. O cDNA de *C. idella*, foi clonado utilizando-se o plasmídeo pGAPZ- α -B, que possui sequência sinal para direcionar a excreção da proteína heteróloga e o promotor constitutivo de *P. pastoris* GAP (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Esta clonagem e expressão rederam um alto nível de produção da proteína GHc, cerca de 50 mg/L (Wang et al., 2003). Já o cDNA do peixe seabass japonês, foi clonado em plasmídeo de expressão interna de *P. pastoris* (Wei et al., 2008).

Em nosso trabalho foi construída a linhagem *P. pastoris* GS115/HILGH com expressão interna e, também, a linhagem *P. pastoris* GS115/PICGH com expressão e excreção do hormônio de crescimento da carpa *H. molitrix*. O extrato celular de um dos clones com expressão interna, expressão esta, controlada por indução com metanol (promotor do gene *AOX1*), apresentou hibridização específica contra anticorpo anti-GHc comercial. Este clone recombinante possui cerca de 4 cópias do cDNA de GHch inseridas em seu genoma. O clone poderia ser utilizado para suplementação alimentar de peixes. Os clones da linhagem recombinante de *P. pastoris* de expressão e excreção de GHch, não exibiram perfis esperados na avaliação imunobiológica. Seria necessário que estes clones fossem reavaliados e submetidos a uma expressão com o uso de biorreator.

É importante ressaltar que os plasmídeos de expressão interna e expressão e excreção em *S. cerevisiae* e *P. psatoris* construídos neste trabalho, foram obtidos com sucesso, sendo que as clonagens finais foram conferidas por análises com

enzimas de restrição e sequenciamentos; e, poderão ser empregados em trabalhos futuros, para obtenção de mais clones recombinantes, que possam ser avaliados quanto a eficiência na produção da proteína GHch recombinante.

7 CONCLUSÃO

- Foram construídos, com sucesso, os plasmídeos para transformação genética de *P. pastoris*, pHILGH de expressão interna; e, pPICGH de expressão e excreção;
- A expressão interna da proteína heteróloga GHch em *P. pastoris* foi alcançada, o que pode ser avaliado por gel de poliacrilamida contendo SDS e análise de hibridação da proteína heteróloga com anticorpo anti-GHc comercial, pela técnica de “western blot”.
- Foram construídos, com sucesso, os plasmídeos para transformação da levedura *S. cerevisiae*: pMAGH (epissomal de expressão interna de GHch); pMAILGH (epissomal de expressão e excreção de GHch); pMAKTGH (epissomal de expressão e excreção de GHch); pGEM-dGHd (δ -integração de expressão interna de GHch); pGEM-dILGHd (δ -integração de expressão e excreção de Ghch);
- Foi construída, com sucesso, a linhagem de *S. cerevisiae* YPH252/dGHd, de expressão de GHch intracelular;
- 3 clones YPH252/dGHd, produziram proteína heteróloga GHch de tamanho esperado e com atividade biológica contra o anticorpo anti-GHc comercial;
- Foi construída, com sucesso, a linhagem *S. cerevisiae* YPH252/dILGHd, que contém cópias integradas no genoma do cassete de expressão da fusão gênica da sequência sinal potencializada-GHch;
- O clone YPH252/dILGHd64 produziu proteína heteróloga GHch de tamanho esperado e com atividade biológica contra o anticorpo anti-GHc comercial; e, apresentou produção de proteínas totais aumentado em cerca de 6 vezes em relação ao controle YPH252;

- As curvas de crescimento indicaram pequenas alterações no crescimento de alguns clones recombinantes de *P. pastoris* e *S. cerevisiae*, provavelmente devido aos locais de inserção das cópias dos cassetes de expressão contendo o cDNA de GHch.

ANEXO1 – Análise de sequências de hormônio de crescimento e *codon usage* de leveduras

Análise de sequências de hormônio de crescimento

O experimento de precipitação de proteína com TCA utilizado no trabalho foi baseado no protocolo padrão de precipitação por TCA, sendo que a concentração de TCA utilizada de 10% foi selecionada de acordo com o protocolo descrito por Xu et al. (2008). Nesse artigo foi descrita a expressão e excreção do hormônio de crescimento do urso panda *Ailuropoda melanoleuca* na levedura *P. pastoris*. Não foi selecionada uma concentração baseada em precipitações feitas com hormônio de crescimento de peixe expresso em leveduras, pois esta informação não foi dada nos artigos disponíveis, onde havia sido realizado tal protocolo. A definição da escolha pela concentração foi feita após uma análise comparativa das sequências protéicas dos hormônios das duas espécies. Como caráter de comparação, foi feita a mesma comparação com o hormônio de crescimento humano. No gráfico abaixo (Figura 34), verifica-se o alinhamento das sequências de aminoácidos do hormônio de crescimento de humano e do hormônio de crescimento de *H. molitrix*. É possível verificar *gaps* (3%) entre as sequências, além de diferenças de parâmetros como identidade de aminoácidos (38%), aminoácidos com caráter igual, positivos (58%).

Figura 34 - Alinhamento das sequências de aminoácidos do hormônio de crescimento de humano e do hormônio de crescimento de *H. molitrix*.

O programa utilizado (BLASTP 2.2.24) (Altschul et al., 1997 e Altschul et al., 2005) foi capaz de fazer uma cobertura de apenas 93% da sequência, devido às divergências entre elas. O *e-value* foi de 1×10^{-16} .

A análise da sequência de aminoácidos do GH de *H. molitrix* comparada com a sequência de aminoácidos do GH do panda *A. melanoleuca*, mostrou resultados de maiores semelhanças. No gráfico abaixo (Figura 35) verifica-se o alinhamento das duas sequências utilizando-se o programa BLASTP 2.2.24. O programa identificou gaps (2%), identidade de aminoácidos (44%) e aminoácidos positivos (64%). Foi possível fazer uma cobertura de 100% das sequências e com um “*e-value*” bem mais baixo, 8×10^{-32} , o que caracteriza um alinhamento mais preciso, quando comparado com o alinhamento feito contra a sequência de GH humano.

Figura 35 - Alinhamento das sequências de aminoácidos do hormônio de crescimento de panda (*A. melanoleuca*) e do hormônio de crescimento de *H. molitrix*.

Além do alinhamento de sequências, foi feita uma análise quanto as características físico químicas de ponto isoelétrico e peso molecular, utilizando-se o programa ExPASy, disponibilizado pelo Swiss Institute of Bioinformatics (<http://ca.expasy.org/>). A análise na Tabela 14 mostra maior correspondência entre as sequências de *H. molitrix* e *A. melanoleuca*, quando comparadas com *Homo sapiens*.

Tabela 14 – Características físico químicas das sequências de aminoácidos de GH de *H. molitrix*, *A. melanoleuca* e *H. sapiens*.

Origem do GH	Ponto isoelétrico	Peso molecular (Da)
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	5.96	23580.12
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	5.96	24382.98
<i>Homo sapiens</i>	5.41	22992.20

Codon usage de leveduras

Durante o planejamento da clonagem e síntese da sequência potencializadora da excreção em *S. cerevisiae* (Material e Métodos, item 4.15), procurou-se manter na sequência que foi sintetizada apenas o *codon usage* de *S. cerevisiae*. Apesar de toda a clonagem ter sido planejada inicialmente para esta levedura, considerou-se, também, a possibilidade de que a sequência sintetizada fosse aplicada no futuro em outros sistemas de expressão de outras leveduras, como a levedura *P. pastoris*. Para certificação de que a expressão em *P. pastoris* não fosse comprometida devido a escolha inicial pelo “codon usage” de *S. cerevisiae*, realizou-se uma análise para determinar o quanto seriam diferentes os *codon usages* e se isso poderia afetar um futuro sistema de expressão. Esta comparação foi realizada utilizando-se dados obtidos no banco de dados de *codon usage* do site Kazusa DNA Rest. Inst. (<http://www.kazusa.or.jp/e/index.html>). Os dados obtidos permitiram a construção de 2 Quadros para análise (Quadros 1 e 2). Estes Quadros informam o número de sequências codificadores no genoma de cada uma das leveduras, assim como número total de códons utilizados, frequência de cada códon por milhão de códons e número total de cada trinca de códon utilizada.

Quadro 1 – “Codon usage” de *S. cerevisiae*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> – 1437 Sequências codificadoras – 6511964 códons											
Trincas	Frequência (por milhão)	Número de códons	Trincas	Frequência (por milhão)	Número de códons	Trincas	Frequência (por milhão)	Número de códons	Trincas	Frequência (por milhão)	Número de códons
UUU	26,1	170060	UCU	23,4	152620	UAU	18,8	122354	UGU	8,1	52733
UUC	18,4	119910	UCC	14,2	92548	UAC	14,8	96248	UGC	4,8	30943
UUA	26,2	170327	UCA	18,7	121596	UAA	1,0	6799	UGA	0,7	4295
UUG	27,2	176823	UCG	8,6	55800	UAG	0,5	3265	UGG	10,4	67560
CUU	12,3	79881	CCU	13,5	87990	CAU	13,6	88855	CGU	6,4	41669
CUC	5,4	35412	CCC	6,8	44190	CAC	7,8	50602	CGC	2,6	16894
CUA	13,4	87337	CCA	18,3	118921	CAA	27,3	177781	CGA	3,0	19515
CUG	10,5	68195	CCG	5,3	34483	CAG	12,1	78912	CGG	1,7	11328
AUU	30,1	196148	ACU	20,2	131748	AAU	35,7	232548	AGU	14,2	92246
AUC	17,1	111678	ACC	12,7	82630	AAC	24,8	161656	AGC	9,7	63472
AUA	17,8	116024	ACA	17,8	115724	AAA	41,9	272927	AGA	21,3	138740
AUG	21,0	136644	ACG	8,0	51972	AAG	30,8	200886	AGG	9,2	60209
GUU	22,1	143671	GCU	21,2	137737	GAU	37,6	245031	GGU	23,9	155345
GUC	11,7	76454	GCC	12,6	81955	GAC	20,2	131713	GGC	9,8	63684
GUA	11,8	76661	GCA	16,2	105545	GAA	45,6	297191	GGA	10,9	71034
GUG	10,8	70084	GCG	6,2	40267	GAG	19,2	125264	GGG	6,0	39230

Quadro 2 – “Codon usage” de *P. pastoris*

<i>Pichia pastoris</i> - 129 Sequências codificadoras – 77823 códons											
Trincas	Frequência (por milhão)	Numero de códons	Trincas	Frequência (por milhão)	Numero de códons	Trincas	Frequência (por milhão)	Numero de códons	Trincas	Frequência (por milhão)	Numero de códons
UUU	24,1	1878	UCU	24,7	1920	UAU	15,8	1227	UGU	7,7	601
UUC	20,4	1586	UCC	16,5	1284	UAC	18,0	1399	UGC	4,4	341
UUA	15,8	1227	UCA	15,5	1208	UAA	0,9	67	UGA	0,3	22
UUG	31,5	2453	UCG	7,4	578	UAG	0,5	39	UGG	10,1	786
CUU	16,0	1247	CCU	15,9	1236	CAU	11,6	906	CGU	6,8	532
CUC	7,5	586	CCC	6,7	520	CAC	8,9	690	CGC	2,1	166
CUA	10,8	843	CCA	18,9	1469	CAA	25,6	1989	CGA	4,3	335
CUG	14,7	1147	CCG	4,0	313	CAG	16,4	1279	CGG	1,9	151
AUU	31,1	2423	ACU	22,5	1748	AAU	25,3	1966	AGU	12,6	979
AUC	19,4	1508	ACC	14,1	1097	AAC	26,3	2046	AGC	7,9	615
AUA	11,4	888	ACA	13,7	1068	AAA	30,0	2336	AGA	20,2	1575
AUG	18,6	1450	ACG	6,1	476	AAG	33,7	2619	AGG	6,6	516
GUU	26,8	2089	GCU	29,2	2269	GAU	35,8	2787	GGU	25,5	1981
GUC	14,6	1135	GCC	16,6	1293	GAC	25,6	1990	GGC	8,0	619
GUA	9,9	768	GCA	15,2	1183	GAA	37,9	2947	GGA	19,2	1491
GUG	12,2	951	GCG	3,9	304	GAG	28,8	2243	GGG	5,6	438

Considerando-se os dados de frequência por milhão de códons presentes nas sequências codificadoras dessas duas leveduras, pode-se verificar que a diferença na preferência de uso dos códons é muito baixa. Verificou-se uma diferença na preferência no uso de apenas 2 conjuntos de trincas dos quadros (diferenças destacadas em cinza), sendo que mesmo nestes conjuntos, a trinca menos utilizada era a mesma.

ANEXO 2 – Dados brutos de PCR em Tempo Real

Os ensaios de PCR Real time foram repetidos 4 vezes, sendo que todos os ensaios geraram curvas de dissociação e curvas padrão similares. Em todos os ensaios utilizaram-se amostras de DNA genômico de clones recombinantes de *S. cerevisiae* e *P. pastoris*, sendo que todos os DNA foram dosados em aparelho nanodrop e estavam na concentração padrão de 10ng/μl. Para dar uma maior segurança nos cálculos, utilizaram-se 2 controles em todas as reações, os DNAs plasmideais pPICGH e pHILGH, em 3 concentrações diferentes (5 ng, 10 ng e 20 ng). Os cálculos, assim como as especificações do protocolo estão descritas em Materiais e Métodos, item 4.14.

A curva de dissociação apresentada (Figura 36) indica ausência de “dimers” com os oligonucleotídeos, ausência de contaminação e especificidade da reação. Isso pode ser visto pela uniformidade da curva, que indica que a temperatura de “melting” ou dissociação dos oligonucleotídeos, ocorreu no mesmo ponto em todas as reações realizadas no ensaio.

Figura 36 – Curva de dissociação obtida em ensaio de PCR em Tempo Real realizada com DNA genômico de clones de *P. pastoris* e *S. cerevisiae* apresentando expressão da proteína GHch.

As curvas padrão obtidas foram similares, apresentando aspecto linear. Nesta curva são plotadas as concentrações conhecidas dos padrões versus os C_t s obtidos em cada um deles. Pode-se ver que os pontos ficaram próximos da reta, com uma distância um pouco maior nos C_t s obtidos pelas concentrações menores (Figura 37).

Figura 37 – Curva padrão obtida com os C_t s dos padrões.

REFERÊNCIAS¹

Agellon LB, Chen TT. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. DNA. 1986;5(6):463-71.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997;25(17):3389-402.

Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, Yu YK. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. FEBS J. 2005 Oct;272(20):5101-9.

Anathy V, Venugopal T, Koteeswaran R, Pandian TJ, Mathavan S. Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). J Biosci. 2001;26(3):315-24.

Biga PR, Schelling GT, Hardy RW, Cain KD, Overtuf K, Ott TL. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-1, IGF-1 receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen Com Endocrinol. 2004; 135:324-3.

Bowen R. Growth hormone (somatotropin). 2003. Disponível em: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/gh.html>. [2010 12 12].

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-5.

Brasil. Ministério da Pesca e Agricultura. Participação da aquicultura no setor pesqueiro nacional. 2010. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/> [2011 01 15].

Byrne LJ, O'callaghan KJ, Tuite MF. Heterologous Gene Expression in Yeast. Methods in Molecular Biology. 2005;308:51-64.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Burnette WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112 (2): 195–203.

Butler AA, Le Roith D. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:141-64.

Cameron JR, Loh, EY, Davis RW. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell.* 1979;4:739-51.

Canosa LF, Chang JP, Peter RE. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 2007;151:1-26.

Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 2000;24:45-66.

Chan YH, Cheng CH, Chan KM. Recombinant goldfish growth hormones (gfGH-I and -II) expressed in *Escherichia coli* have similar biological activities. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2003;135(4):613-24.

Cheng CM, Lin CM, Shamblott M, Gonzalez-Villasenor LI, Powers DA, Woods C, Chen TT. Production of a biologically active recombinant teleostean growth hormone in *E. coli* cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;108(1-2):75-85.

Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden, KR. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol.* 1985;5:3376-5.

Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 1989;9:479-5.

De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, Van de Peer Y, Callewaert N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol.* 2009;27(6):561-6.

Deane E E, Woo N Y. Molecular cloning of growth hormone from silver sea bream: effects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(4):1077-82.

Dominici FP, Turyn D. Growth hormone-induced alterations in the insulin-signaling system. *Exp Biol Med*. 2002;227:149-7.

Fine M, Sakal E, Vashdi D, Daniel V, Levanon A, Lipshitz O, Gertler A. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: expression, purification and determination of biological activity in vitro and in vivo. *Gen Comp Endocrinol*. 1993;89:51-1.

Gietz RD, Schiestl RH. Transforming yeast with DNA. *Method Mol and Cell Biol*. 1995; 5:255-69.

Goffeau A, Barrel BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. Life with 6000 genes. *Science*. 1996;274:546-67.

Goffeau A, Park J, Paulsen IT, Jonniaux JL, Dinh T, Mondant P, Saier MHJR. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast*. 1997;13(1):43-4.

Guerra OG, Rubio IG, da Silva Filho CG, Bertoni RA, Dos Santos Govea RC, Vicente EJ. A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *Journal of Microbiological Methods*. 2006; Dec;67(3):437-5.

Han KS, Kim SI, Choi SI, Seong BL. N-Glycosylation of secretion enhancer peptide as influencing factor for the secretion of target proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;337:557-2.

Hitzeman RA, Frank E, Hagie FE, Levine HL, David V, Goeddel DV, Ammerer G, Hall BD. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*. 1981; 293:717-2.

Ho WK, Meng ZQ, Lin HR, Poon CT, Leung YK, Yan KT, Dias N, Che AP, Liu J, Zheng WM, Sun Y, Wong AO. Expression of grass carp growth hormone by baculovirus in silkworm larvae. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1381(3):331-9.

Ilgen C, Lin-Cereghino J, Cregg JM. Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eucaryotic Expression Systems. 2005;7:143-62.

Jimenez A, Davis J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. Nature. 1980;287:869-1.

Jin M, Junjie B, Xinhui L, Jianren L, Qing J, Hongjun Z. Expression of rainbow trout growth hormone cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotechnol. 1999;15(4):219-24.

Johnston L, Conly J. Creutzfeldt-Jakob disease and infection control. Can J Infect Dis. 2001;12:332-6.

Kawata Y, Yamano N, Kojima H, Itho S. Expression of salmon growth hormone in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. Biotechnol Lett. 1991;13:851-6.

Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF. Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. Genome Res. 1998;5:464-78.

Kuruzinska MA, Bergh MLE, Jackson BJ. Protein glycosylation in yeast. Ann Rev Biochem. 1987;56:915-44.

Lee J, Choi S, Jang JS, Jang K, Moon JW, Bae CS, Yang DS, Seong, BL. Novel secretion system of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using an n-terminus residue of human IL-1 β as secretion enhancer. Biotechnol Prog. 1999;15:884-90.

Lee J, Park J, Moon J, Kim K, Moon H. The influence of glycosylation on secretion, stability, and immunogenicity of recombinant HBV pre-S antigen synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003;303:427-32.

Levesque HM, Shears MA, Fletcher GL, Moon TW. Myogenesis and muscle metabolism in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) made transgenic for growth hormone. Exp Biol 2008;211:128-37 .

Li WS, Chen D, Wong AO, Lin HR. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Gen Comp Endocrinol. 2005;144:78-89.

Lin G, Wang X, Long Q, Pang Y, Wong AO, Yu K. Production of recombinant goldfish growth hormone I in a baculovirus expression system. *Chin J Biotechnol.* 1997;13(2):91-7.

Lorens JB, Nerland AH, Aasland R, Lossius I, Male R. Expression of growth hormone genes in Atlantic salmon. *J Mol Endocrinol.* 1993;11(2):167-79.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22:249–70.

Mahmoud SS, Wang S, Moloney MM, Habibi HR. Production of a biologically active novel goldfish growth hormone in *Escherichia coli*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1998;120(4):657-63.

Martínez-Barberá JP, Pendón C, Rodríguez RB, Pérez-Sánchez J, Valdivia MM. Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead seabream growth hormone. *Gen Comp Endocrinol.* 1994;96(2):179-88.

Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, Tuite MF, Emtage JS, White S, Lowe PA, Patel T, Kingsman AJ, Kingsman SM. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 1983;24:1-4.

Meselson M, Yuan R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nat.* 1968;217(5134):1110-4.

Milner RDG. Growth Hormone. *British Medical Journal.* 1985;291:1593-4.

Miyamoto C, Chizzonite R, Crowl R, Rupprecht K, Kramaer R, Schaber M, Kumar G, Poonian M, Ju G. Molecular cloning and regulated expression of the human *c-myc* gene in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of the protein products. *Proc Natl Acad USA.* 1985;82:7232-6.

Murray RD, Shalet SM. Growth hormone: current and future therapeutic applications. *Expert Opin Pharmacother.* 2000;1:975–90.

Nicoll CS, Steiny SS, King DS, Nishioka RS, Mayer GL, Eberhardt NL, Baxter JD, Yamanaka MK, Miller JA, Seilhamer JJ. The primary structure of coho salmon growth hormone and its cDNA. *Gen Comp Endocrinol.* 1987;68(3):387-99.

Olson BJ, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci.* 2007;3:3.4.

Petrusco-Danila E, Voicu M, Stanescu R, Stoica B, Rusu M. Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a producer and secretor of heterologous proteins. *Rom Biotechnol Lett* 2009; 14:4201-10.

Plant EP, Goodwin TJ, Poulter RT. Tca5, a Ty5-like retrotransposon from *Candida albicans*. *Yeast.* 2000 Dec;16(16):1509-18.

Pitkanen TI, Krasnov A, Teerijoki H, Molsa H. Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) I. Growth response to various GH constructs. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering.* 1999;15:91-8.

Pitkanen TI, Xie SQ, Krasnov A, Mason PS, Molsa H, Stickland NC. Changes in tissue cellularity are associated with growth enhancement in genetically modified arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) carrying recombinant growth hormone gene. *Mar Biotechnol.* 2001;3:188–97.

Promdonkoy B, Warit S, Panyim S. Production of a biologically active growth hormone from giant catfish (*Pangasianodon gigas*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 2004;26(8):649-53.

Raven PA, Uh M, Sakhrani D, Beckman BR, Cooper K, Pinter J, Leder EH, Silverstein J, Devlin RH. Endocrine effects of growth hormone overexpression in transgenic coho salmon. *Gen Comp Endocrinol.* 2008;159(1):26-37.

Rentier-Delrue F, Swennen D, Mercier L, Lion M, Benrubi O, Martial J A. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. *DNA.* 1989;8(2):109-17.

Rentier-Delrue F, Swennen D, Philippart J C, L'Hoir C, Lion M, Benrubi O, Martial J A. Tilapia growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA.* 1989;8(4):271-8.

Ryyanen HJ, Primer CR. Varying signals of the effects of natural selection during teleost growth hormone gene evolution. *Genome.* 2006;49:42-53.

Rubartelli A, Cozzolinol F, Talio M, Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-

I β , a protein lacking a signal sequence. The EMBO Journal. 1990;9(5):1503-10.

Saito A, Sekine S, Komatsu Y, Sato M, Itoh S. Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli*. Gene. 1988;73(2):545-51.

Saito H, Fujiwara T, Shin S, Okui K, Nakamura Y. Cloning and mapping of a human novel cDNA (NHP2L1) that encodes a protein highly homologous to yeast nuclear protein NHP2. Cytogenet Cell Genet. 1996;72(2-3):191-3.

Sato N, Kawazoe I, Tamai T, Inoue Y, Murata K, Kimura S, Nonaka M, Kimura A. Purification and characterization of recombinant tuna growth hormone produced in *Escherichia coli*. J Ferment Bioeng. 1989;68(2):79-83.

Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press; 1989.

Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Santos EBP. Clonagem e expressão do cDNA de hormônio de crescimento de carpa (*Hypophthalmichthys molitrix*) em *Escherichia coli*. 2000. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal do Amazonas.

Sciara AA, Rubiolo JA, Somoza GM, Arranz SE. Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2006;142(3-4):284-92.

Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. Biotechnology (N Y). 1994;12(2):181-4.

Sheridan MA, Hagemeister AL. Somatostatin and somatostatin receptors in fish growth. Gen Comp Endocrinol. 2010;167:360-5.

Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 1989;122(1):19-27.

Strausberg RL, Strausberg SL. Overview of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Protoc Protein Sci. 2001;5:Unit5.6:

Sugimoto S, Yamaguchi K, Yokoo Y. Isolation and characterization of recombinant eel growth hormone expressed in *Escherichia coli*. J Chromatogr. 1990;515:483-94.

Jin M, Junjie B, Xinhui L, Jianren L, Qing J, Hongjun Z. Expression of rainbow trout growth hormone cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Chinese Journal of Biotechnology. 1999;15(4):219-24.

Thayanithy V, Anathy V, Pandian TJ, Gong GZ, Mathavan S. Molecular cloning of growth hormone-encoding cDNA of an Indian major carp, *Labeo rohita*, and its expression in *Escherichia coli* and zebrafish. Gen Comp Endocrinol. 2002;125(2):236-47.

Towler DA, Gordon JI, Adams SP; Glaser L. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. Ann Rev Biochem. 1988;57:69-99.

Tsai HJ, Lin KL, Chen TT. Molecular cloning and expression of yellowfin porgy (*Acanthopagrus latus houttuyn*) growth hormone cDNA. Comp Biochem Physiol B. 1993;104(4):803-10.

Tsai HJ, Lin KL, Kuo JC, Chen SW. Highly efficient expression of fish growth hormone by *Escherichia coli* cells. Appl Environ Microbiol. 1995;61(11):4116-9.

Van Ooyen AJJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MMA, Jacobs DI, Colussi PA, Taron CH. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. FEMS Yeast Res. 2006;6:381-92.

Voytas DF. Retroelements in genome organization. Science. 1996;274:737-48.

Wang W, Wang YP, Zhu ZY. Prokaryotic expression of recombinant grass carp growth hormone. Yi Chuan Xue Bao. 2001;28(4):306-12.

Wang W, Sun YH, Wang Y P, Zhu ZY. Expression of grass carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris*. Yi Chuan Xue Bao. 2003;30(4):301-6.

Watahiki M, Ohara E, Tsuda M, Shoji K, Masuji A, Tanaka M, Yamakawa M, Ushiro H, Yoneda Y, Nakashima K. Syntheses of recombinant yellowtail and flounder growth

hormones in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem. 1992;56(7):1012-6.

Waters MJ, Shang CA, Behncken SN, Tam SP, Li H, Shen B, Lobie PE. Growth hormone as a cytokine. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1999;26:760-4.

Wei C, Zhou X, Zhang Y. Improving intracellular production of recombinant protein in *Pichia pastoris* using an optimized preinduction glycerol-feeding scheme. Appl Microbiol Biotechnol. 2008 Feb;78(2):257-64.

Wildt S, Gerngross TU. The humanization of n-glycosylation pathways in yeast. Nat Rev Microbiol. 2005;3:119-28.

Xu Q, Wu X, Hou R, Liao M, Hyok K, Shou J, Bian H, Han N, Pan J, Zhang Z, Zhu M. High-level secretory expression, purification and characterization of *Ailuropoda melanoleuca* growth hormone in *Pichia pastoris*. Protein Expres Puri.2008;60(2):182-7.

Zhao X, Li J, Li R, Zhang S, Zhang Y, Yang Z. Amplification, cloning, and sequence comparison of the growth hormone gene for carp (*Cyprinus carpio*) by the polymerase chain reaction. Chin J Biotechnol. 1996;12(3):161-7.