

PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA SUPERFÍCIE CELULAR DE LEVEDURAS: A CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDEO

RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ¹; RODRIGO CASQUERO CUNHA², ALCEU
GONÇALVES DOS SANTOS JUNIOR³, VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES⁴;
FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – renanbiotec@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – alceugsjr@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

A expressão de proteínas recombinantes apresenta-se como um vasto campo que se renova a cada ano, representando um mercado mundial multibilionário (CHEN, 2011). Na biotecnologia industrial, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, células de insetos e de mamíferos continuam sendo as plataformas dominantes na produção de biomoléculas (MATTANOVICH et al., 2012).

A levedura comumente utilizada pela indústria como fermento na produção de cervejas e pães *Saccharomyces cerevisiae*, é também um dos principais modelos para expressão de proteínas recombinantes por apresentar diferentes vantagens como: (a) microrganismo com status GRAS (*Generally Regarded as Safe*); (b) obtém-se uma alta densidade celular utilizando meios de cultivo relativamente baratos; (c) uma amplitude de vetores disponíveis, com diferentes marcas de seleção, promotores e sinais de secreção; (d) provoca modificações pós-traducionais em proteínas expressas; (e) genoma completamente sequenciado e a facilidade no implemento de ferramentas genéticas. Estas são algumas das características que tornam a antigamente conhecida “levedura do pão” uma biofábrica ideal para diferentes finalidades (SHIBASAKI et al., 2009; BILL, 2014; YOUNG; ROBINSON, 2014). Embora a expressão nas formas intracelular e extracelular venha sendo rotineiramente utilizada com *S. cerevisiae*, a superfície celular (incluindo parede celular e membrana plasmática) também demonstra-se como um alvo interessante para expressão heteróloga de genes, sendo a técnica conhecida como *Cell Surface Display* ou *Arming Technology* (UEDA, 2016). Na técnica, geralmente uma proteína alvo é anexada a uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI), capaz de se ligar à membrana plasmática da célula e imobilizar a proteína na parede celular da levedura (SHIBASAKI et al., 2009; UEDA, 2016).

Contudo, para realizar a *Cell Surface Display* alguns passos devem ser seguidos como a construção de um vetor plasmidial que direcione a expressão para superfície celular e a implementação de protocolos para transformação genética de *S. cerevisiae*. Assim, o presente trabalho visou desenvolver um vetor plasmidial adequado e explorar técnicas que permitissem a imobilização de uma proteína modelo na superfície celular da levedura.

2. METODOLOGIA

O Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) possui um banco que reúne diferentes vetores plasmídias e cepas de leveduras como *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* destinadas a expressão de proteínas recombinantes. A cepa BY4741 (*MAT α his3-1 leu2 met15 ura3*) de *S. cerevisiae*, foi selecionada por possuir o gene *ura3* deletado de seu genoma. Este gene é responsável por codificar a enzima Oritidina 5'-fosfato descarboxilase (ODCase), a qual catalisa uma reação na síntese de ribonucleotídeos de pirimidina (componente do RNA). A perda de atividade da ODCase leva a incapacidade da levedura de se desenvolver a menos que uracila ou uridina estejam presentes no meio de cultura. No banco de vetores, foi realizada a pesquisa preliminar selecionando o mais interessante para o desenvolvimento de um novo plasmídeo capaz de direcionar proteínas recombinantes a superfície celular. Dessa forma o plasmídeo pYES2 (Invitrogen™) foi selecionado por: (a) possuir o promotor GAL1, induzido na presença de galactose no meio de cultura; (b) conter um sítio de múltipla clonagem versátil; (c) conferir resistência à ampicilina em células recombinantes de *E. coli*; (d) possuir o gene *ura3*, que possibilita o desenvolvimento da cepa BY4741 em meios sem uracila ou uridina. O gene *ura3* foi então designado como gene marcador para análise de células transformadas com o plasmídeo.

Utilizando o *software* Vector NTI Advance (Invitrogen™), foi adicionado ao plasmídeo pYES2, após a sequência gênica do promotor GAL1, o peptídeo sinal α -factor, que direciona o processamento da proteína recombinante para secreção ao meio extracelular. A proteína modelo para ser expressa de forma recombinante é a glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5, a qual teve sua sequência gênica obtida do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para auxiliar na detecção da proteína a ser imobilizada na parede celular foram adicionados 6 aminoácidos histidina (6x His) e também uma sequência peptídica espaçadora ou *linker*, para permitir que a proteína recombinante esteja mais exposta ao meio extracelular e facilitar seu reconhecimento em técnicas como imunofluorescência. Por fim, foi adicionada à construção a porção C-terminal da α -aglutinina. A α -aglutinina é uma proteína altamente glicosilada expressa constitutivamente na parede celular de células do tipo α de acasalamento de *S. cerevisiae*. Sua região C- terminal contém a sequência sinal de adição da âncora GPI, possibilitando a imobilização desta na superfície celular. Construído o plasmídeo com os novos componentes (Tabela 1), este foi encaminhado para síntese pela empresa GenOne.

Tabela 1: Sequência peptídica dos componentes inseridos ao vetor pYES2

Componente	Sequência de Aminoácidos
α -Factor	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGVSDLEGDFDVAVLPPFSNSTNNGLLFINTTIIASIA AKEEGVSLEKREAEA
6x His	HHHHHH
Glicoproteína D	YIERWHTTGPIPSPFQDQGREQPVEVRYATSAAACDMLALIADPQVGRTLWGAVRRNERTYNATV/IWYKIE SGCARPLYMEYSECDPKKHFGYCRYRTPPFWDGFLAGFAYPTDDELGLVMAAPARLAEGQYRRALYIDG AVAYTDFMLSLPAGDCWFSKLGAEGRYTFGACFPIDQYEQSKVLRLTYLTQYYPQEAHKAIVDYWFMRIE GVVPPYFEESKGYEPPPAVEGASAPPGGDDGEAHGEGGGEEDGAGGQETGGEGEGPAAAGPDGAPPG EPKPGPGGPGADVDRPEGWPSLEAITRPPPTPA
Linker	SGGGGS
Porção C-terminal da α -aglutinina	SAKSSFISTTTTDLTSINTSAYSTGSISTVETGNRTTSEVISHVVTSTKLSPATTSLTIAQTSIYSTDSNITVGT DIHTTSEVISDVETISRETASTVVAAPTSTTGWTGAMNTYISQFTSSSFATINSTPIISSAVFETSDASIVNVH TENITNTAAVPSEPTFVNATRNLSNFSCKQSPSSSYTSPLVSSLVSKTLLSTSFTPSVPTSNITYIKTKNT GYFEHTALTSSVGLNSFSETAVSSGQTKIDTLVSSLIAVPSSASGSQLSGIQNQFTSTSLMISTYEGKASIFFS AELGSIIFLLSYLLF

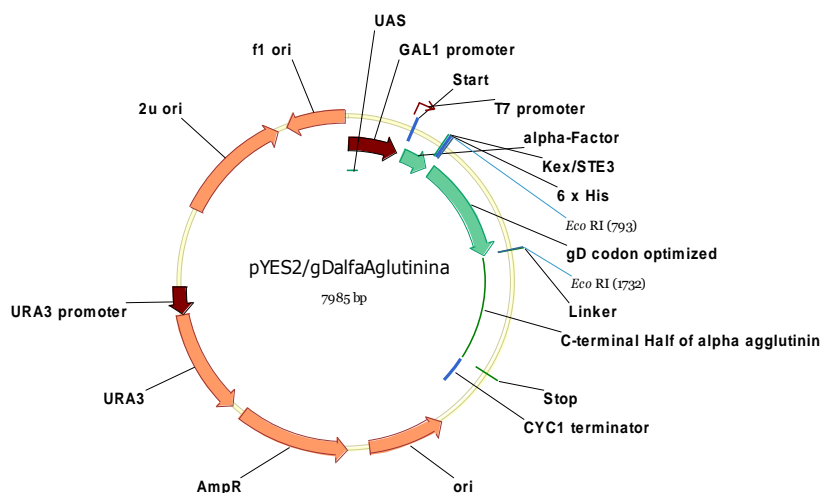
Com o plasmídeo sintético nomeado pYES2/gD α Aglutinina, a próxima etapa foi transformar a cepa *S. cerevisiae* BY4741 pelo método de eletroporação, seguindo protocolo disponível no manual do eletroporador MicroPulser™ (BioRad). Em síntese, o método consiste no preparo de células competentes da levedura através de etapas de lavagem com água ultrapura e sorbitol 1 M em temperaturas baixas, havendo a concentração da massa celular até 1×10^{10} cél/mL. Diferentes concentrações do plasmídeo pYES2/gD α Aglutinina (100 ng, 1500 ng, 3000 ng e 6000 ng) foram adicionadas a 40 μ L de células competentes e submetidas a eletroporação, em cubetas de 0,2 cm, em um pulso de aproximadamente 5 mseg e voltagem de 1.5 kV. Após a eletroporação, 1 mL de sorbitol 1 M foi utilizado para ressuspender o material eletroporado, e então alíquotas de 100 μ L da transformação foram plaqueadas em meio Sc-U agar [2% ágar, 2% dextrose, 0,67% *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sem aminoácidos e 0,19% *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement*], meio mínimo seletivo que contém todos os nutrientes necessários para levedura, porém com a ausência de uracila. As placas foram incubadas por 72 h a 30 °C.

As colônias de BY4741 que cresceram nas placas foram selecionadas e algumas destas foram submetidas ao cultivo em meio Sc-U líquido com glicose [2% dextrose, 0,67% *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sem aminoácidos e 0,19% *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement*], por aproximadamente 20 h a 30 °C. Após o período de crescimento da biomassa em níveis suficientes para a indução da expressão da proteína, um volume adequado foi retirado do cultivo, centrifugado ($1.500 \times g$ por 5 min) e ressuspensionado em meio Sc-U líquido contendo galactose [2% galactose, 0,67% *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sem aminoácidos e 0,19% *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement*] para indução do promotor GAL1. A indução foi mantida durante 24 h e posteriormente houve a centrifugação ($1.500 \times g$ por 5 min) para separação da massa celular do sobrenadante do cultivo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

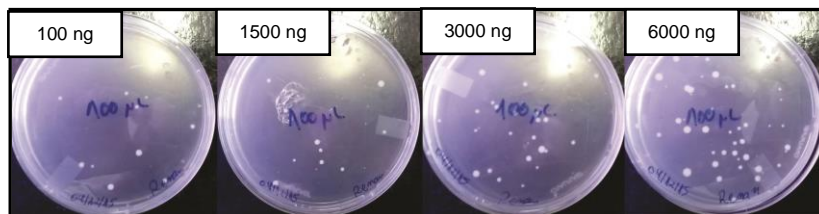
A construção do vetor pYES2/gD α Aglutinina no *software* Vector NTI Advance (Invitrogen™) foi concluída com êxito e disponibiliza para o laboratório de pesquisa uma nova ferramenta para explorar a técnica de *Cell Surface Display* utilizando a levedura *S. cerevisiae*. No *software* observa-se que o novo plasmídeo possui um peso molecular aproximado de 7.985 pb, em que todos os componentes introduzidos possibilitam a fase de leitura correta da proteína recombinante, não provocando a ocorrência de códons *stop* que impeçam sua transcrição correta (Figura 1).

Figura 1: Mapa do plasmídeo pYES2/gD α Aglutinina



O método de eletroporação foi eficiente para a geração de colônias recombinantes, sendo o resultado apresentado na Figura 2. Nota-se que o número de recombinantes segue ordem crescente de acordo com a concentração de plasmídeo utilizada na transformação.

Figura 2: Placas de Sc-U ágar com alíquotas das transformações plaqueadas



A seguir, clones recombinantes foram selecionados para cultivo em meio líquido. Além destes, foi incubada como controle negativo a cepa BY4741 não transformada. Por não sintetizar uracila, o controle não é capaz de desenvolver-se no meio Sc-U. Com as amostras coletadas foram realizadas técnicas como eletroforese em gel de poliacrilamida e imunofluorescência, contudo novos protocolos serão testados para análise dos resultados (dados não apresentados).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o presente trabalho foi importante na criação de um vetor plasmidial e no estabelecimento de protocolos para o desenvolvimento da técnica de *Cell Surface Display* utilizando a levedura *S. cerevisiae*. Como perspectivas futuras, o plasmídeo pYES2/gD α Aglutina e a cepa BY4741 serão utilizados como plataformas de expressão de diferentes proteínas recombinantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILL, R.M. Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.67, n. 3, p. 319-328, 2015.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v.30, n.5, p. 1102-1107, 2012.
- MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P.; DATO, L.; GASSER, B.; SAUER, M.; PORRO, D. Recombinant Protein Production in Yeasts. In: LORENCE, A. **Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols**, Jonesboro: Human Press, 2012. Cap. 17, p. 329-358
- SHIBASAKI, S.; MAEDA, H., UEDA, M. Molecular Display Technology Using Yeast—Arming Technology—. **Analytical Sciences**, v. 25, n.1, p. 41-49, 2009.
- UEDA, M. Establishment of cell surface engineering and its development. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n.7, p. 1243-1253, 2016.
- YOUNG, C.L.; ROBINSON, A.S. Protein folding and secretion: mechanistic insights advancing recombinant protein production in *S. cerevisiae*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 168-177, 2014.