

**VALDILENE CANAZART DOS SANTOS**

**OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *Kluyveromyces lactis* RECOMBINANTES  
PRODUTORAS DO IMUNÓGENO SBm 7462 CONTRA O CARRAPATO  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

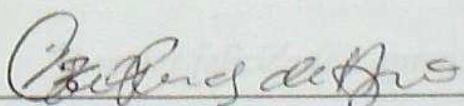
**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007**

VALDILENE CANAZART DOS SANTOS

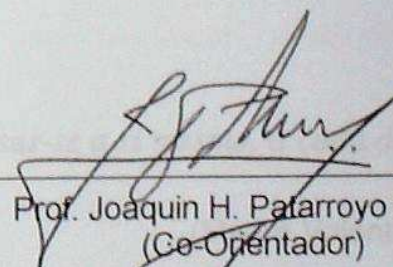
OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *Kluyveromyces lactis* RECOMBINANTES  
PRODUTORAS DO IMUNÓGENO SBm 7462 CONTRA O CARRAPATO  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

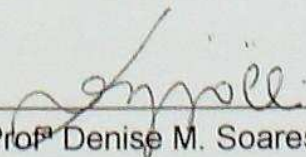
APROVADA: 06 de agosto de 2007.



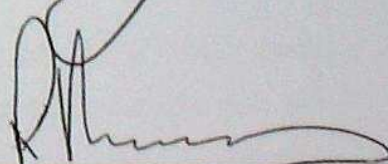
Prof<sup>a</sup>. Elza Fernandes de Araújo  
(Co-Orientadora)



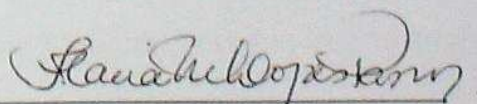
Prof. Joaquin H. Patarroyo Salcedo  
(Co-Orientador)



Prof<sup>a</sup> Denise M. Soares Bazzolli



Prof. Frederico J. Vieira Passos



Prof<sup>a</sup>. Flávia M. Lopes Passos  
(Orientadora)

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237o  
2007

Santos, Valdilene Canazart dos, 1982-

Obtenção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* recombinantes produtoras do imunógeno SBm 7462 contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) / Valdilene Canazart dos Santos.  
– Viçosa, MG, 2007.

xv, 68f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Flávia M. Lopes Passos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 53-68.

1. Proteínas recombinantes. 2. *Kluyveromyces lactis*.  
3. Carrapato. 4. Peptídeos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.6

“A maior felicidade é aprender a ultrapassar-se a si mesmo, a cada dia.”

(Madre Valentina)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo gracioso dom da vida, pela força Nele encontrada e Dele concedida... que com infinito amor concedeu-me a oportunidade de aprender mais, de trabalhar com entusiasmo, em todos os experimentos...mesmo naqueles que por um motivo ou outro tiveram que ser repetidos...obrigada Pai...por não deixar-me desanimar nunca...e por estar comigo sempre...

Agradeço ao CNPq pela grande oportunidade e pelo financiamento dos meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de crescer como profissional em meio a tantas limitações e ao respeito por nós alunos.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), onde se realizou este trabalho, pela acolhida.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, pela orientação, paciência e confiança em todos os momentos.

Aos professores Elza Fernandes de Araújo e Joaquin H. Patarroyo Salcedo, pela amizade, incentivo e apoio para minha formação científica, pelas sugestões nos experimentos.

À minha mãe Ana pelo amor, dedicação, pelas orações e por dividir comigo mais essa conquista. Obrigada, por entender e permitir a continuidade dos meus estudos, pela confiança e paciência em todos os momentos de minha existência.

Aos meus irmãos e irmãs, sobrinhos e sobrinhas pelo imenso amor, por acreditarem, torcerem e rezarem por mim... em especial à minha irmã Vilma e meu irmão Vanderlei que, mesmo à distância, sempre me incentivaram... obrigada pelo carinho e companheirismo.

Ao meu padrinho Max pelo carinho, incentivo e apoio...

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia...vocês foram essenciais durante essa jornada e sabem o quanto sou grata a cada um pela colaboração, incentivo, pelas risadas... pela ótima convivência...

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos, Industrial, Alimentos, Anaeróbios, Petróleo, Micorrizas, Café e de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, pelo incentivo e amizade.

Aos funcionários, pela amizade, pelo carinho e prontidão em ajudar...sou muito grata a vocês: Danilo, Evandro, Sr. Toninho e Sr. Paulo.

À secretaria da Pós – Graduação Nilcéia, pelo apoio e pela atenção; e aos demais funcionários pela agradável convivência.

Aos meus colegas do Curso de Pós graduação em Microbiologia Agrícola, pelo incentivo e companheirismo.

Ao grupo de Estudo Bíblico Semente pela amizade, apoio e crescimento.

À família Fraternidade Pequena Via pelo carinho, aprendizado e oportunidade de desenvolvimento social e humano.

Às minhas amigas Lygia, Lindayane, Talita, Cássia, Nathália, Dayse, Flaviane, Tatiane, minha companheira de república Perciane, meus amigos John Alexander, Rodrigo, Júlio César, Péricles e Juliano, por terem sofrido comigo e me incentivado nas horas mais difíceis da minha vida, alguns mesmo à distância, e pelo apoio neste trabalho.

Aos que de perto acompanharam o desenvolvimento desta tese, Rafael, Janaína, Guilherme e Marcelo, os quais foram os meus braços em certos momentos... sou grata.

Ao Sidimar e Marcinho por toda atenção, ensinamento, paciência e amizade.

Aos demais amigos, próximos e distantes, que souberam entender um “hoje eu não posso ir”, mas que sempre estiveram disponíveis e que sempre estiveram comigo em lugar muito reservado...

Deus abençoe todos vocês!!!

## BIOGRAFIA

VALDILENE CANAZART DOS SANTOS, filha de José dos Santos e Ana Canazartt dos Santos, nasceu em 31 de agosto de 1982, na cidade de João Monlevade, Estado de Minas Gerais.

Em março de 2001, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Bacharelado em Bioquímica, em 28 de julho de 2005.

Em agosto de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 06 de agosto de 2007.

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS.....   | ix  |
| LISTA DE TABELAS.....   | xi  |
| RESUMO.....   | xii |
| ABSTRACT.....   | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1   |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....   | 3   |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 15  |
| 3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....   | 15  |
| 3.2. Plasmídeos e seqüências de nucleotídeos que codificam os imunógenos SBm <sub>3</sub> 7462 e SBm7462.....             | 16  |
| 3.3. Obtenção dos fragmentos de DNA que codificam os imunógenos SBm <sub>3</sub> 7462 e SBm7462.....                      | 18  |
| 3.4. Estratégia de clonagem das seqüências 1 e 4 no vetor pKLAC1 e confirmação da clonagem.....                           | 19  |
| 3.5. Transformação de linhagens de <i>K. lactis</i> CBS2359 com os plasmídeos pKLAC1-seq1, pKLAC1-seq4 e vetor vazio..... | 21  |
| 3.6. Confirmação do local de inserção do cassete de integração no genoma de <i>K. lactis</i> CBS2359.....                 | 22  |
| 3.7. Avaliação da estabilidade dos recombinantes e averiguação da expressão dos peptídeos vacinais.....                   | 24  |
| 3.8. Extração do RNA total de <i>K. lactis</i> CBS2359 cultivada em YNB suplementado com lactose.....                     | 25  |

|   |    |
|---|----|
| 3.9. Síntese de cDNA por RT (Transcriptase Reversa)-PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).....   | 25 |
| 3.10. Indução da expressão dos imunógenos SB <sub>3</sub> m7462 e SBm7462.....  | 27 |
| 3.11. Avaliação de Proteínas totais.....  | 27 |
| 3.12. Avaliação da atividade proteolítica no sobrenadante obtido pelo cultivo das linhagens recombinantes de <i>K. lactis</i> em meio de indução.....             | 28 |
| 3.13. Avaliação das proteínas totais secretadas pelas linhagens recombinantes, e controle, por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....              | 28 |
| 3.14. Detecção de Glicoproteínas em Gel de Poliacrilamida.....  | 29 |
| 3.15. Detecção do rSBm7462 no sobrenadante da cultura das linhagens de <i>K. lactis</i> recombinantes.....  | 30 |
| 4. RESULTADOS .....   | 31 |
| 4.1. Construção do vetor de expressão pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4.....  | 31 |
| 4.2. Transformação da linhagem de <i>K. lactis</i> CBS2359 com pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4 e avaliação da estabilidade mitótica dos recombinantes.....              | 36 |
| 4.3. Detecção dos transcritos que codificam os peptídeos vacinais e análise da secreção de rSBm <sub>3</sub> 7462 e rSBm7462.....                                 | 38 |
| 4.4. Expressão de rSBm <sub>3</sub> 7462 e rSBm7462.....  | 39 |
| 4.5. Avaliação da atividade proteolítica no sobrenadante obtido pelo cultivo das linhagens recombinantes de <i>K. lactis</i> em meio de indução.....              | 43 |
| 4.6. Avaliação das proteínas totais secretadas pelas linhagens recombinantes, e controle, por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....               | 44 |
| 4.7. Detecção de rSBm <sub>3</sub> 7462 e rSBm7462 nos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens de <i>K. lactis</i> recombinantes em meio de indução..... | 46 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 5. DISCUSSÃO.....                  | 48 |
| 6. CONCLUSÕES.....                 | 52 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 53 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |       |
|---|-------|
| Figura 1 - Seqüências de nucleotídeos que codificam os peptídeos SBm7462 e SBm <sub>3</sub> 7462.....   | 17    |
| Figura 2 - Mapa do plasmídeo pSC-A.....   | 17    |
| Figura 3 - Mapa de restrição do plasmídeo pKLAC1 ( <i>New England Biolabs</i> ).....  | 20    |
| Figura 4 - Cassete de integração no promotor <i>LAC4</i> .....  | 21    |
| Figura 5 - Esquema do método utilizado para confirmação do local e o número de inserções do cassete de expressão no genoma de <i>K. lactis</i> 2359.....  | 23    |
| Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) dos fragmentos de DNA obtidos durante a fase de construção do vetor de expressão integrativo pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4.....                                | 32    |
| Figura 7 - Mapa do vetor de expressão pKLAC1-seq1 (A) e pKLAC1-seq4 (B).....  | 33    |
| Figura 8 - Resultado do seqüenciamento dos vetores pKLAC1-seq1 (A) e pKLAC-seq4 (B).....  | 34/35 |
| Figura 9 - Cassete de integração no promotor <i>LAC4</i> , contendo o gene marcador <i>amdS</i> e as seqüências de nucleotídeos 1 e 4 flanqueadas pelas regiões 3'P <sub>LAC4</sub> e 5'P <sub>LAC4</sub> ..... | 36    |

|   |    |
|---|----|
| Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) do DNA, produto de PCR, do DNA genômico de células de <i>K. lactis</i> recombinantes e controles.....   | 37 |
| Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do DNA, produto de RT-PCR, do mRNA de células de <i>K. lactis</i> recombinantes induzidas em lactose.....   | 38 |
| Figura 12 - Membranas de nitrocelulose tratadas com soro de coelho contendo Ig-G contra SBm 7462, reação positiva (A) e soro de coelho contendo Ig-G contra cabra, reação negativa (B) para identificação de linhagens recombinantes capazes de secretar os peptídeos SBm 7462 e SBm <sub>3</sub> 7462..... | 39 |
| Figura 13 - Concentração de proteínas totais no sobrenadante obtido pelo cultivo de <i>K. lactis</i> CBS2359/seq1.....  | 41 |
| Figura 14 - Concentração de proteínas totais no sobrenadante obtido pelo cultivo de <i>K. lactis</i> CBS2359/seq4.....  | 42 |
| Figura 15 - Gel de eletroforese SDS-PAGE 16% (T) das proteínas totais secretadas pelas linhagens de <i>K. lactis</i> controle e recombinantes.....  | 45 |
| Figura 16 - Gel de eletroforese SDS-PAGE 16% (T) dos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens de <i>K. lactis</i> , recombinantes e controle, corado com reagente de Schiff para análise de glicoproteínas.....   | 46 |
| Figura 17 - Membranas de PVDF contendo sobrenadantes das culturas das linhagens de <i>K. lactis</i> controle e recombinantes.....   | 47 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Atividade proteolítica dos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens recombinantes de *K. lactis* CBS2359 em meio de indução YNB suplementado com 4% (p/v) de lactose.....43
- Tabela 2 - Atividade proteolítica dos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens controles de *K. lactis* CBS2359 em meio de indução YNB suplementado com 4% (p/v) de lactose.....43

## RESUMO

SANTOS, Valdilene Canazart, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Obtenção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* recombinantes produtoras do imunógeno SBm 7462 contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)**. Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo e Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

O peptídeo denominado SBm 7462 (Sintético *Boophilus microplus* 7462) é uma vacina desenvolvida a partir da seqüência da proteína intestinal do carrapato *B. microplus* denominada Bm 86 apresentando ação imunogênica contra o mesmo. O carrapato *B. microplus* é um importante artrópode da medicina veterinária devido a perdas econômicas e problemas de saúde causados pelo referido parasita no gado da América Central e do Sul, bem como da Austrália. Este trabalho descreve a obtenção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* recombinantes produtoras do referido peptídeo. Dois vetores de expressão integrativos foram construídos a partir do vetor pKLAC1: pKLAC1-seq1, contendo a seqüência 1 constituída por três cópias da seqüência de nucleotídeos que codifica para o SBm 7462 e o pKLAC1-seq4, contendo a seqüência 4 constituída por uma única cópia da seqüência de nucleotídeos que codifica o SBm 7462. As construções foram confirmadas por sequenciamento. O cassete de integração obtido pela clivagem do vetor com a enzima SacII foi utilizado na transformação da linhagem selvagem de *K. lactis* CBS2359. A integração dos cassetes por recombinação homóloga no *locus LAC4* foi confirmada por PCR. A análise dos recombinantes de *K. lactis* por RT-PCR e a detecção do peptídeo, utilizando anticorpos monoclonais contra SBm 7462, comprovaram a transcrição e a

expressão extracelular dos peptídeos. Os recombinantes foram cultivados em regime de batelada em YPGlicerol, alcançando uma concentração de biomassa de  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A biomassa obtida foi transferida para o meio YNB com 4% (p/v) de lactose para induzir o promotor *LAC4* e a síntese de SBm 7462 recombinante. Amostras foram analisadas quanto à concentração de proteína extracelular, por eletroforese em SDS-PAGE e detecção do imunógeno. A indução da síntese dos peptídeos foi testada sob duas condições: sem pulso adicional de lactose e com pulso de lactose, a cada 24 horas, durante 144 horas de indução. A concentração de proteínas extracelulares na segunda condição foi maior quando comparada com a condição sem pulso adicional de lactose. Atividade proteolítica não foi detectada no sobrenadante. O perfil eletroforético em SDS-PAGE revelando três bandas de aproximadamente 6, 10 e 21 kDa relacionadas ao peptídeo de interesse é discutido. A detecção do peptídeo vacinal com anticorpos monoclonais comprovou a presença extracelular do rSBm 7462.

## ABSTRACT

SANTOS, Valdilene Canazart, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Obtaining of strains of *Kluyveromyces lactis* recombinants producers of the vaccine SBm 7462 against the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-advisers: Elza Fernandes de Araújo and Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

The peptide designated SBm 7462 (Synthetic *Boophilus microplus* 7462) induces an immunogenic response against the tick *B. microplus*, an important arthropods in veterinary medicine due to the economic losses and the health problems caused in cattle production in Central and South America and Australia. Here we describe the construction of recombinant *Kluyveromyces lactis* yeast strains expressing the gene for rSBm 7462. Two integrative expression cassettes harboring one or three copies of the nucleotide sequence coding for the SBm 7462 were built from the vector pKLAC1. The construction of the expression vectors was confirmed by sequencing. The transformation of wild type *K. lactis* CBS2359, was performed and the integration of the cassettes by homologous recombination into the *LAC4* locus of the transformed *K. lactis* genomes was verified by PCR. The transcription and extracellular expression of the peptides have been confirmed in recombinants *K. lactis* strains by RT-PCR and monoclonal antibodies against SBm 7462. The recombinants were cultured in shake-flask YPGlycerol medium generating  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  biomass. The biomass obtained was transferred to mineral medium with lactose 4% (w/v) to induce the *LAC4* promoter and the synthesis of recombinant SBm 7462. Samples were analyzed for total protein, SDS-PAGE and immunogenic detection. The peptide production was investigated under two conditions: with additional lactose pulse at 24 hours intervals during 144 hours of

induction and with no additional lactose pulse. The extracellular protein concentration in the first condition was higher compared to the condition with no additional pulse of lactose. Proteolytic activity was not detected into the medium. Three major protein bands of approximated 6, 10 and 21 kDa related to the desired peptide were detected by SDS-PAGE.

## 1. INTRODUÇÃO

A levedura *Kluyveromyces lactis* reúne características interessantes que a qualifica para produção industrial de proteínas tanto nativas quanto recombinantes. Dentre essas características, destacam-se metabolismo oxidativo com baixa repressão catabólica, o que favorece altos rendimentos de biomassa, e o potencial de secreção com adequado nível de glicosilação, o que atrai a produção de proteínas na indústria farmacêutica.

O imunógeno SBm 7462 (Sintético *Boophilus microplus* 7462) contra o carrapato *B. microplus*, é uma importante vacina na pecuária brasileira, sendo a síntese química, o único processo de produção disponível para a obtenção desta vacina. A produção de vacinas baseadas em peptídeos é realizada selecionando os segmentos “essenciais” das proteínas indutoras da resposta imune no vacinado com posterior produção destes segmentos em laboratório. Estes peptídeos sintéticos representam uma fonte de antígenos puros para a produção de uma potente vacina. A vacina contra o carrapato *B. microplus*, SBm 7462, construída a partir da seqüência primária da proteína intestinal de *B. microplus*, denominada Bm 86, é um exemplo destes peptídeos.

A síntese química de peptídeos vacinais apresenta algumas limitações, tais como presença de possíveis estruturas espaciais no peptídeo de difícil reprodução laboratorial, presença de carboidratos como elementos estruturais essenciais e a necessidade de incluir, na possível vacina, vários segmentos indutores de respostas humoral e celular. Uma alternativa à síntese química de peptídeos é a síntese biológica atualmente ampliada pela tecnologia do DNA recombinante.

As bactérias são hospedeiras mais comuns para expressão de proteínas recombinantes. No entanto, por não possuírem sistema de endomembranas, o

correto processamento das proteínas pode ser afetado. Assim, a expressão de proteínas heterólogas em leveduras tem atraído a atenção, por combinar a facilidade de manipulação genética e as características de crescimento de organismos procariotos permitindo o cultivo desses microrganismos em larga escala. Portanto, a proposta do presente trabalho foi produzir, na levedura do leite, lactose positiva e potencialmente industrial, *K. lactis*, o peptídeo vacinal SBm 7462, destinado a conferir resistência contra o carrapato *B. microplus*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A tecnologia do DNA recombinante veio revolucionar a indústria biotecnológica nas últimas décadas. Hoje, é possível produzir proteínas e peptídeos utilizando organismos nos quais estas moléculas não são sintetizadas naturalmente. Diversos microrganismos entre bactérias, fungos filamentosos e leveduras são utilizados para a expressão de proteínas heterólogas. Contudo, os rendimentos variam muito, dependendo do microrganismo e da proteína expressa.

Nesse contexto, as leveduras alcançaram um papel de destaque como organismos hospedeiros para produção de proteínas heterólogas. Se por um lado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não atendeu plenamente as expectativas de seu uso como hospedeira para produção de proteínas heterólogas (Gellissen & Hollenberg, 1997; Wesolowski-Louvel *et al.*, 1996), outras leveduras não convencionais tais como *Hansenula polymorpha* (Müller *et al.*, 1998; Gellissen G, 2000), *Arxula adenivorans* (Rösel & Kunze, 1998), *Pichia stipitis*, *Schwanniomyces occidentalis* (Piontek *et al.* 1998), *Pichia pastoris* (Cereghino & Cregg, 2000), *Candida boidinii* (Gellissen G, 2000), *Yarrowia lipolytica* (Juretzek *et al.*, 2001) e *Kluyveromyces lactis* (Swinkels *et al.*, 1993) têm revelado um potencial promissor. Em *K. lactis*, comparativamente a *S. cerevisiae*, um amplo conhecimento para manipulação genética foi estabelecido. Projetos de pesquisa básica com *K. lactis* vêm sendo conduzidos por uma comunidade científica ativa que reúne anualmente para compartilhar os avanços há vinte anos (Walker 2006).

A *K. lactis* é uma levedura ascomiceta que evoluiu muito próxima a *S. cerevisiae*. Mesmo pertencendo ao mesmo grupo anaeróbio facultativo, existem diferenças metabólicas entre as duas leveduras, com reflexos tanto em sua aplicação biotecnológica quanto nos estudos que fundamentam a regulação de

processos celulares (González-Siso et al., 2000; Pinheiro et al., 2000). Em *K. lactis* o metabolismo oxidativo coexiste com o metabolismo oxidorreduutivo, enquanto que em *S. cerevisiae*, a levedura tradicional da fermentação alcoólica e natural de ambientes com alta concentração de açúcar, o metabolismo oxidorreduutivo predomina sobre o metabolismo oxidativo e são independentes (González-Siso et al., 2000; Schaffrath & Breunig, 2000).

O *habitat* natural da *K. lactis* é diverso, sendo muitas linhagens isoladas durante o processamento de produtos derivados de leite, nos quais o carboidrato disponível é a lactose. Outra propriedade que também distingue *K. lactis* de *S. cerevisiae* é justamente a habilidade de assimilar lactose como fonte de carbono e energia.

A *K. lactis* apresenta características adicionais interessantes que a qualificam como uma candidata promissora em processos biotecnológicos. Possui o *status* GRAS (*Generally regarded As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) que aprova sua utilização na indústria farmacêutica e alimentícia. O metabolismo predominantemente oxidativo, mencionado anteriormente, garante altos rendimentos de biomassa. E a secreção de proteínas, embora não seja muito comum em leveduras como é em fungos filamentosos, é possível uma vez que a proteína *Killer* de alta massa molecular é produzida por *K. lactis* e liberada no meio de cultura. A disponibilidade de técnicas moleculares e sequenciamento completo do genoma de *K. lactis* concorrem para o desenvolvimento de sistemas de expressão para a referida levedura (Fleer et al., 1991a, b; Romanos et al., 1992; Swinkles et al., 1993; Wesolowski-Louvel et al., 1996; Dujon, 2004).

A expressão de grande número de proteínas de relevância farmacológicas foi testada em *K. lactis* nos últimos anos. Dentre estas proteínas destacam-se a interleucina humana 1 (Fleer et al., 1991a; Blondeau et al., 1994), o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HbsAg) (Martinez et al., 1992), fator de estimulação de colônias de macrófagos (Hua Z et al., 1994), interferon  $\alpha$  (Chen et al., 1992) soroalbumina humana (Fleer et al., 1991b; Saliola et al., 1999; Colussi & Taron 2005), lisozima (Iwata et al., 2004), precursor da insulina (Feng et al., 1997), cadeia leve Fv de anticorpos (Swennen et al., 2002; Robin et al., 2003). Contudo,

tem sido observado que o rendimento das proteínas heterólogas secretadas variam com a linhagem da levedura utilizada, as condições de cultivo e a estrutura da proteína. Baseado neste fato, modificações foram realizadas na hospedeira aumentando seu potencial de secreção.

Alguns estudos sugerem que o número de pontes dissulfídicas na estrutura de algumas proteínas, como na soroalbumina humana (HSA), por exemplo, podem influenciar o correto dobramento da mesma durante a translocação na via de secreção. Uma das proteínas que têm papel fundamental no dobramento de proteínas no retículo endoplasmático rugoso é a dissulfito isomerase (PDI). Com o intuito de favorecer o processamento de proteínas heterólogas em leveduras, o gene que codifica para a PDI no genoma de uma linhagem de *K. lactis*, a MW98-8C, foi duplicado originando as linhagens HP101 e HP108 (Bianchi *et al.*, 1987, Bao *et al.*, 2001). Verificou-se que a duplicação desse gene contribuiu significativamente para o aumento na secreção de soroalbumina humana (Bao *et al.*, 2001).

Outra modificação no genoma de *K. lactis* realizada para aumentar a eficiência na secreção de proteínas heterólogas inclui a interrupção do gene *KIPMR1*. Este gene, com função semelhante ao gene *PMR1* de *S.cerevisiae* (Uccelletti *et al.*, 1999b), codifica para uma  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase localizada no Complexo de Golgi onde é responsável pelo transporte de cálcio e magnésio para o lúmen desta organela (Antebi and Fink, 1992; Dürr *et al.*, 1998). O mutante de *S.cerevisiae* com deleção em *Pmr1* apresenta efeitos pleiotróficos, como alteração na homeostase de cálcio e incompleta glicosilação da cadeia externa de proteínas. Este fenótipo pôde ser revertido pela adição de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  no meio, indicando haver um papel direto do cálcio na função do Golgi (Antebi and Fink, 1992). A inativação deste gene resultou também em um significativo aumento na secreção de proteínas heterólogas (Harmsen *et al.*, 1993; Rudolph *et al.*, 1989). Em *K. lactis*, os resultados foram semelhantes excetuando-se pelo fato de que a adição de cálcio não diminuiu a secreção das proteínas heterólogas (Uccelletti *et al.*, 2004).

A glicosilação é um processo importante na expressão heteróloga de proteínas em leveduras, especialmente quando se trata de uma proteína terapêutica, uma vez que, o padrão de glicosilação naqueles microrganismos, como em fungos filamentosos, difere do padrão de glicosilação de células humanas (Gerngross and Wildt, 2005). Existem basicamente dois tipos de glicosilação: O-glicosilação, quando os carboidratos são ligados ao grupo hidroxil dos resíduos de serina ou treonina da proteína, e N-glicosilação, quando os carboidratos são adicionados ao resíduo de asparagina da cadeia polipeptídica nascente. Pouco se conhece sobre o papel biológico das O-glicosilações, enquanto que, as N-glicosilações são consideradas essenciais para a função do polipeptídeo (Gemmil and Trimble, 1999). As proteínas terapêuticas podem ser divididas, portanto, em duas principais categorias: aquelas com N-glicosilação (glicoproteínas) e aquelas sem N-glicosilação. Essa modificação pós-traducional é de extrema importância porque contribui significativamente para o volume do polímero bem como para suas características funcionais. A falta dessa N-glicosilação pode interferir no tempo de meia vida, na distribuição nos tecidos e na imunogenicidade da proteína terapêutica (Gerngross and Wildt, 2005). Por outro lado, a presença de um padrão diferente de N-glicosilação pode levar a uma resposta imunológica não desejável. Atualmente, verificam-se intensos esforços destinados à “humanização” da via de glicosilação de leveduras pela expressão de algumas enzimas de glicosilação humana nas mesmas (Gerngross and Wildt, 2005). Esta é uma estratégia biotecnológica promissora para produção de proteínas terapêuticas e foi testada em *P. pastoris*, podendo ser útil também em *K. lactis* (Stefan and Tillman, 2005).

A disponibilidade de vetores autônomos ou integrativos para transformação de *K. lactis* favorece seu potencial para síntese de proteínas heterólogas. Ambos possuem vantagens e desvantagens inerentes à suas características. Por exemplo, os vetores episomais podem apresentar um alto número de cópias por célula, mas, por outro lado podem ser bastante instáveis na ausência da seleção. Ao contrário, os vetores integrativos conferem maior estabilidade na ausência da seleção, mas, são usualmente mantidos em baixo número de cópias.

Os vetores epissomais mais utilizados para expressão de proteínas heterólogas em *K. lactis* são derivados do plasmídeo pKD1 proveniente da levedura *Kluyveromyces drosophilarum* (Falcone *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1986). Esse plasmídeo é muito semelhante ao plasmídeo 2  $\mu$ m de *S. cerevisiae* em relação à estabilidade, estrutura e número de 60 a 80 cópias por célula (Chen *et al.*, 1996; Hsieh & DA Silva, 1998). Esse número de cópias do vetor por célula, é reportado ser reduzido para 20, quando na presença de genes heterólogos (Morlino *et al.*, 1999). A instabilidade potencial dos vetores epissomais pode causar problemas para a expressão de algumas proteínas heterólogas, especialmente em escala industrial onde as células estão sujeitas a cultivos por períodos prolongados na ausência de seleção.

Os vetores integrativos, por sua vez, são construídos de modo que apresentem regiões homólogas à região do cromossomo da *K. lactis* para direcionar a inserção do cassete de expressão por recombinação homóloga no genoma. As integrações direcionadas no genoma de *S. cerevisiae* apresentam 100% de eficiência utilizando segmentos de DNA com menos de 40 pb de DNA homólogo. Entretanto, em *K. lactis*, integrações direcionadas, dependendo do *locus*, têm sido menos eficientes, chegando a apresentar apenas 1-2% de eficiência em alguns casos (Stark & Milner, 1989; Zeeman *et al.*, 1998; Zeeman & Steensma, 2003; Colussi *et al.*, 2005). A eficiência de integração no *locus LAC4* é de 90%, normalmente (Albert *et al.*, 2006). Dessa forma, o promotor *LAC4*, que controla a transcrição do gene da  $\beta$ -galactosidase em *K. lactis*, e cuja indução por lactose e galactose tem sido bem documentada, é introduzido na construção de vetores para direcionar a inserção do gene de interesse no *locus LAC4* de *K. lactis* (Van den Berg *et al.*, 1990; Swinkels *et al.*, 1993).

Outros promotores também foram testados. Alguns provenientes de *S. cerevisiae*, constitutivos como o do gene da fosfoglicerato quinase (PGK), outros induzíveis como o que controla a transcrição do gene da fosfatase ácida (PHO5). Entre os promotores induzíveis testados, além do promotor *LAC4*, está o promotor nativo de *K. lactis* *KIADH4*, induzido por etanol e que controla a transcrição do gene da álcool desidrogenase (Saliola *et al.*, 1999).

Recentemente, Colussi & Taron (2005) desenvolveram um vetor integrativo de expressão e secreção de proteínas heterólogas, pKLAC1, cuja integração ocorre no *locus* do promotor *LAC4*. Esse sistema é promissor, embora mais estudos referentes à sua aplicação na produção de proteínas e peptídeos em escala industrial sejam necessários.

Todos os aspectos relatados reforçam o interesse e potencial da levedura *K. lactis* como hospedeira na expressão de proteínas e enzimas, tanto para a indústria de alimentos quanto para expressão de proteínas terapêuticas para a indústria farmacêutica. Contudo, ainda não se tem relatos sobre a utilização desta levedura para a produção de peptídeos sintéticos com função imunogênica ou vacinal. A utilização de um sistema biológico, como alternativa à síntese química para a produção de tais peptídeos, seria uma estratégia interessante.

A vacinação começou a ser amplamente utilizada após o sucesso de Pasteur e Jenner, dois dos primeiros cientistas que obtiveram sucesso no controle de doenças por meio de vacinas, como por exemplo, a raiva. Várias doenças passaram a ser controladas, sendo que um grande triunfo aconteceu na década de 70, quando uma campanha mundial de vacinação praticamente erradicou a varíola - doença que atingia de 10 a 15 milhões de pessoas (Behbehani, 1983). Coube a Louis Pasteur lançar as bases metodológicas do preparo de vacinas. Sucessivamente, vários novos produtos foram descritos como as vacinas contra a cólera aviária, o carbúnculo e a raiva, pelo próprio Pasteur, e a vacina contra a difteria, por Roux e Yersin, esta última utilizando não a bactéria total, mas sim a toxina por ela produzida, e que em laboratório era tornada não-patogênica por ação de agentes químicos como o formol (Silverstein *et al.*, 1981).

No final do século dezenove, foram obtidas ainda as vacinas contra a febre tifóide, peste e cólera, assinalando-se que, até então, todas as vacinas usadas eram inativadas, ou seja, continham microrganismos mortos ou seus produtos modificados pela ação de agentes químicos ou físicos (Baxby *et al.*, 1979).

A resposta do organismo às vacinações e às doenças naturais começou a ser entendida igualmente ao final do século dezenove, quando se reconheceu a existência das duas faces da resposta imune, quais sejam, a formação de

anticorpos (resposta humoral) e a imunidade ligada a células (imunidade celular) (Silverstein *et al.*, 1981). O entendimento dos fenômenos imunológicos envolvidos na resposta às infecções e à aplicação de vacinas e soros imunes possibilitou o surgimento de novas possibilidades de se obter resposta imune. Dentre estas, destacam-se o preparo de peptídeos sintéticos, reproduzindo as estruturas dos antígenos contidos nos microrganismos e as técnicas de DNA-recombinante. Estas novas técnicas surgiram em função da necessidade de se obter vacinas contra vários agentes, tais como o vírus do HIV, o agente da hanseníase, *Chlamydia* e protozoários, para os quais os métodos de preparo de vacinas até então utilizados não produziram resultados satisfatórios.

Os peptídeos sintéticos produzidos quimicamente são seqüências de aminoácidos construídas e derivadas de uma ou várias proteínas com características claramente imunogênicas. O grande interesse na utilização de peptídeos sintéticos decorre com a capacidade de simulação dos sítios antigênicos ou dos receptores protéicos, e da qual provém a seqüência aminoacídica do peptídeo (Patarroyo 1994). Esta nova geração de vacinas tem sido estimulada devido aos estudos de predição computacional, baseados na estrutura primária e nas características bioquímicas das proteínas para identificação de possíveis sítios antigênicos em vírus, bactérias, parasitas e células neoplásicas (Spouge *et al.*, 1987).

Os resultados obtidos com a aplicação desta nova classe de vacinas foram bastante variáveis, de acordo com o agente estudado, e uma extensa literatura acumulada ao longo dos anos demonstra os problemas surgidos e as possíveis soluções. Dentre as dificuldades, podem ser destacadas a presença de estruturas espaciais nas proteínas, de difícil reprodução em laboratório; a presença de carboidratos como elementos estruturais essenciais em muitas glicoproteínas de origem viral e a necessidade de incluir na possível vacina vários segmentos indutores de resposta humoral e celular, o que pode tornar inviável o produto pelo alto custo. Uma possível solução para alguns destes problemas seria a utilização da tecnologia do DNA recombinante e a produção dos peptídeos via microrganismos.

A vacina contra a hepatite B é o exemplo único, até o momento, de um imunizante humano de largo uso, preparado através de técnicas de biologia molecular, com a expressão em leveduras de um segmento do genoma viral, responsável pela formação de anticorpos no indivíduo. Com o advento deste produto, eliminou-se na maioria dos países, inclusive no Brasil, a utilização da vacina pioneira contra a hepatite B, preparada a partir do plasma de indivíduos portadores do vírus.

Um peptídeo de importância para a agropecuária e que, atualmente, ainda é produzido apenas quimicamente, é o imunógeno SBm 7462<sup>1</sup> anti-carrapato *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). Esse composto é uma vacina desenvolvida a partir da seqüência da proteína intestinal de *B. microplus* denominada Bm 86, capaz de reduzir em média 80% de carrapatos (Patarroyo *et al.*, 2002).

O carrapato *R. (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino. Encontram-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania, sendo um dos principais parasitas que afetam a pecuária destas áreas, incluindo o Brasil (Johnston *et al.*, 1986).

O *B. microplus* acarreta diversos danos econômicos (Horn *et al.*, 1985), tornando-se o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (Nari A., 1995). Este parasita é responsável por grandes perdas na produção de leite e carne (Sutherst *et al.*, 1983) e danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato (Seifert *et al.*, 1968). Pode atuar como vetor de doenças, como a Tristeza Parasitária Bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela rickettsia *Anaplasma marginale* (Gonçalves *et al.*, 1999; Young *et al.*, 1986). Além disso, existem diversos prejuízos relacionados à mão-de-obra necessária para o controle desse parasita como despesas com instalações, compra de equipamentos adequados para aplicação de carrapaticida nos rebanhos e aquisição de carrapaticidas (Cordovés, 1999).

---

<sup>1</sup> Pedido de patente Nacional = PI 0001717-5. Pedido de Patente Internacional = PCT/BR01/00057

Estudos realizados na Austrália, calculam uma perda anual de 4 milhões de dólares na criação de gado, 49% desta perda devido aos custos do controle do carrapato e 51% devido a perdas na produção de leite, carne e couro (Jonsson *et al.*, 2000).

O controle de carrapatos está centrado, atualmente, no uso de pesticidas das mais variadas bases químicas. O alvo desses compostos químicos, em geral, é o sistema nervoso do ectoparasito. Recentes pesquisas propõem o uso de ectoparasiticidas, tendo como objetivo, afetar os mecanismos reguladores do crescimento, neuropeptídeos e o sistema neuroendócrino (Taylor, 2001).

O uso indiscriminado de acaricidas, e muitas vezes sem critérios técnicos, levou a uma pressão de seleção, culminando na aquisição de resistência (processo irreversível) por parte dos parasitas aos mais diversos grupos químicos. Resistência a acaricidas é o maior obstáculo à produção pecuária. A definição de resistência, segundo Sangster (2001), é a habilidade de um parasita sobreviver a doses de droga que, normalmente, mataria espécies iguais e no mesmo estágio de desenvolvimento, sendo que esse é um processo relacionado com fatores genéticos, biológicos e operacionais. Existem vários tipos de mecanismos de resistência para cada classe de acaricida. Mutação no local alvo do acaricida representa o principal mecanismo de resistência observado, mas há exemplos de mecanismos metabólicos (Baxter e Barker, 1998; Foil *et al.*, 2004).

Este problema de resistência, aliado ao alto custo dos produtos químicos e da mão-de-obra na aplicação dos produtos, assim como o aparecimento de resíduos tóxicos na carne e no leite e a contaminação do ambiente, levou à procura de novos métodos como formas alternativas de controle do carrapato (Nolan, 1985, Pruet, 1999). Os controles biológicos e imunológicos constituem parte de programas de controle integrado de ectoparasitas, que ainda exigem a utilização de produtos químicos para maior estabilidade operacional (Pruett, 1999).

Os controles biológicos incluem a seleção de raças menos sensíveis ao carrapato; cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre (Farias *et al.*, 1986; Sutherst *et al.*, 1982); ação de predadores naturais, como a garça vaqueira *Egretta ibis* (Alves *et al.*, 1983) e formigas (González, 1975).

O controle de ectoparasitas por meio de vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas. Vacinas anti-carrapatos tem uma vantagem potencial sobre outras formas de controle de carrapatos, que é a possibilidade de ser usada sobre qualquer animal e em qualquer lugar do mundo, dependendo exclusivamente do sistema imunológico do hospedeiro. Não há período de carência para produtos derivados de animais vacinados, fazendo-se adequado para uso em rebanhos leiteiros (Frisch, 2000).

A fabricação de vacinas e seu registro requerem muitas etapas e decisões feitas por especialistas que interagem em seus estudos. A questão central está no controle da qualidade de seu desenvolvimento, de sua produção, armazenamento e uso. É um contínuo processo que envolve desde avanços tecnológicos ao marketing comercial, passando pela identificação e boa caracterização de antígenos protetores; determinação do processo de uma viável produção comercial do antígeno; a formulação desses antígenos mais adjuvantes como uma vacina capaz de fornecer uma resposta imunológica apropriada e sustentável; a validação do protótipo no campo (Nalin, 2002).

Para o desenvolvimento de uma vacina é necessário a identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora e conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do animal. A identificação de antígenos protetores para bovinos contra o *R. (B.) microplus* é crescente visto o impacto econômico e as dificuldades encontradas no controle desse parasita. São pesquisados antígenos larvais; antígenos das glândulas salivares (64TRP); precursores de enzimas proteolíticas; proteínas intestinais (Bm 91, Bm 86, Bm A7); a vitelina e outras glicoproteínas dos ovos dos carrapatos (BYC); a calreticulina, entre outras (Willadsen *et al.*, 1996; Andreotti *et al.*, 2002; De La Fuente e Kocan, 2003; Singh e Ghosh, 2003; Da Silva Vaz Jr. *et al.*, 2004; Trimnell *et al.*, 2005; Pruett *et al.*, 2006; Leal *et al.*, 2006a e 2006b).

Willadsen *et al.* (1989) isolaram uma glicoproteína, de 89.000 Da de massa molecular e ponto isoelétrico entre 5,1 a 5,6, da membrana intestinal de uma amostra de *R. (B.) microplus* australiana (*Yeerongpilly*) e denominaram essa proteína de Bm 86, estando presente em larvas, ninfas e adultos. Oliveira (1998)

determinou que a Bm 86 se localiza, mais precisamente, nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino, sendo altamente concentrada próximo à membrana basal. É uma molécula de 650 aminoácidos com potenciais sítios de glicosilação. O gene *bm86* possui 2225 pares de nucleotídeos.

Em 1994, na Austrália, foi liberada a primeira vacina comercial contra o *R. (B.) microplus*, utilizando clonagem do gene *bm86* em *Escherichia coli* e produção da proteína recombinante Bm 86 (rBm 86), recebendo o nome de TickGARD® (Hoeschst Animal Health, Austrália) e subsequentemente denominada TickGARD Plus® (Smith *et al.*, 1995; Willadsen, 1997). Com as bases do mesmo antígeno foi formulada em Cuba a vacina Gavac® (Heber Biotec AS, Havana, Cuba) e Gavac Plus®, porém essa rBm 86 foi produzida em *Pichia pastoris* (García-García *et al.*, 1998). Todas estas vacinas foram desenvolvidas baseando-se na estrutura completa da proteína Bm 86.

A primeira ocorrência da utilização de peptídeos sintéticos, para eliciar proteção imunológica contra carrapatos, foi feita por Sharp *et al.* (1990). Em seu trabalho foram sintetizados e purificados quatro oligopeptídeos desenvolvidos a partir de cálculos preditivos da seqüência de aminoácidos da glicoproteína Bm 86. Três desses peptídeos foram conjugados com proteínas carreadoras e inoculados em coelhos e bovinos para produção de anti-soro. Todos os anticorpos foram capazes de reconhecer a proteína Bm 86 e a rBm 86 pela técnica de *Western blotting*. Entretanto, apenas um anti-soro produzido foi capaz de reconhecer a Bm 86 nativa no teste de imunofluorescência indireta.

Baseando-se no fato de que a estrutura primária determina a estrutura terciária, alguns pesquisadores desenvolveram modelos matemáticos que levam em consideração algumas propriedades das proteínas como antigenicidade (Hoop e Woods, 1981); potencialidade de alfa e beta hélice (Chou e Fasman, 1978); hidrofobicidade e hidrofiliçidade (Kyte e Doolittle, 1982) para predição de possíveis sítios imunogênicos da proteína íntegra.

Fazendo-se uso dessas ferramentas matemáticas, pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO/Departamento de Veterinária/ Universidade Federal de Viçosa

– MG desenharam três seqüências peptídicas denominadas 4822 (aa 398 – 411), 4823 (aa 21 – 35) e 4824 (aa 132 – 145) a partir da proteína Bm 86. Os números dos peptídeos foram dados de acordo com sua catalogação no livro de seqüências do Instituto de Inmunologia Del Hospital San Juan de Dios em Bogotá – Colômbia, onde foram sintetizados. A junção das seqüências de aminoácidos dos três peptídeos 4822 – 4824 – 4823, nesta ordem, deu origem ao antígeno vacinal SBm 7462 com 43 aminoácidos, e com duas cisteínas no C- e N- terminais. O peptídeo SBm 7462 foi testado e mostrou ser uma alternativa promissora para o controle do carrapato *B. microplus*. Contudo, como mencionado anteriormente, este peptídeo é obtido apenas por síntese química sendo de interesse avaliar processos alternativos como a síntese biológica via microrganismos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Fisiologia de Microrganismos e Biologia e Controle de Hematozoários do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária / BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa / UFV.

#### 3.1. Microrganismos e condições de cultivo

A linhagem de levedura utilizada como hospedeira foi a linhagem selvagem de *K.lactis* CBS2359. Esta linhagem pertence à coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos/Departamento de Microbiologia/ BIOAGRO/UFV.

O meio de cultura para manutenção e ativação das culturas de leveduras foi o YPD (10 g·L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g·L<sup>-1</sup> peptona e 20 g·L<sup>-1</sup> glicose). A seleção de transformantes foi realizada em *Yeast Carbon Base* (YCB, Laboratórios Difco®, Detroit, EUA) ágar suplementado com 5 mM de acetamida. O meio utilizado para obtenção de biomassa das linhagens recombinantes foi o YPG (10 g·L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g·L<sup>-1</sup> peptona e 20 mL·L<sup>-1</sup> glicerol). A indução da produção do imunógeno foi realizada em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) suplementado com 40 g·L<sup>-1</sup> de lactose.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada para a amplificação dos vetores durante a recuperação das seqüências que codificam os peptídeos vacinais bem como o vetor pKLAC1 contendo as seqüências de interesse. Para o cultivo da *E.coli*, utilizou-se o meio *Luria-Bertani* (LB) (Sambrook et al., 1989).

### 3.2. Plasmídeos e seqüências de nucleotídeos que codificam os imunógenos SBm<sub>3</sub>7462 e SBm 7462

As seqüências de nucleotídeos que codificam os antígenos vacinais foram desenhadas a partir da seqüência primária do peptídeo SBm 7462 considerando os códons preferenciais para leveduras (Figura 1). A seqüência de nucleotídeos denominada seqüência 1 constitui uma ORF (*Open reading frame*) de 429 pares de base que codifica o SBm 7462 repetido três vezes (SBm<sub>3</sub>7462), um após o outro, sem códon de parada entre eles. A seqüência 4, por sua vez, representa o SBm 7462 uma única vez e apresenta-se como uma ORF de 162 pares de base. Essas seqüências foram sintetizadas e clonadas no vetor pSC-A (Figura 2). Esta construção foi gentilmente cedida pelo professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo do Departamento de Veterinária/BIOAGRO/UFV- Viçosa, MG.

O vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) foi utilizado nas manipulações das seqüências e o vetor pKLAC1 (*New England Biolab*<sup>®</sup>) na construção do cassete de integração.

#### Seqüência 01

Número total de aminoácidos: 145, MW=16352

```
1          CTCGAGGAAAAGAAGAGAGAAGCAGAAGCTTGTCTTAGCAAGCATGTTCTAAGGAAGTTA
1          L E E K K R E A E A C L S K H V L R K L

61         CAAGCTTGCGAACACTGTGATTGTGGAGAATGGGGAGCTATGAACATGACGACAAGATCA
21         Q A C E H C D C G E W G A M N M T T R S

121        TCGATTTGCTCAGATTTTCGGTAACGAGTTTTGCAGAAACGCTTGTGTTGTCGAAGCATGTC
41         S I C S D F G N E F C R N A C L S K H V

181        TTGAGGAAGTTGCAAGCTTGTGAACACTGTGATTGTGGTGAATGGGGTGCTATGAACATG
61         L R K L Q A C E H C D C G E W G A M N M

241        ACAACCAGATCCTCTATATGCTCTGATTTTCGGTAACGAGTTTTGTAGGAACGCATGCCTT
81         T T R S S I C S D F G N E F C R N A C L

301        TCTAAGCATGTCCTTAGAAAAGCTTCAAGCATGTGAGCATTGTGACTGTGGAGAATGGGGT
101        S K H V L R K L Q A C E H C D C G E W G

361        GCAATGAACATGACTACTAGATCCAGTATCTGTTCCGATTTTCGGAAACGAATTTTGTAGA
121        A M N M T T R S S I C S D F G N E F C R

421        AACGCTTGTTAAGAATTC
141        N A C *
```

## Seqüência 04

Número total de aminoácidos: 56, MW=6364

```
1      CTCGAGGAAAAGAGAGAAGCAGAAGCTTGTCTTAGCAAGCATGTTCTAAGGAAGTTACAA
1      L E E K R E A E A C L S K H V L R K L Q

61     GCTTGCGAACACTGTGATTGTGGAGAATGGGGAGCTATGAACATGACGACAAGATCATCG
21     A C E H C D C G E W G A M N M T T R S S

121    ATTTGCTCAGATTTTCGGTAACGAGTTTTGCAGAAACGCTTGTTAAGAATTC
41     I C S D F G N E F C R N A C *
```

Figura 1 - Seqüências de nucleotídeos que codificam os peptídeos SBm 7462 e SBm<sub>3</sub>7462. As seqüências foram desenhadas a partir da seqüência de aminoácidos do peptídeo SBm 7462 considerando os códons preferenciais de leveduras. Seqüência 1 codifica três cópias do peptídeo SBm 7462 e a seqüência 4 codifica uma única cópia do SBm 7462. \* códon de parada.

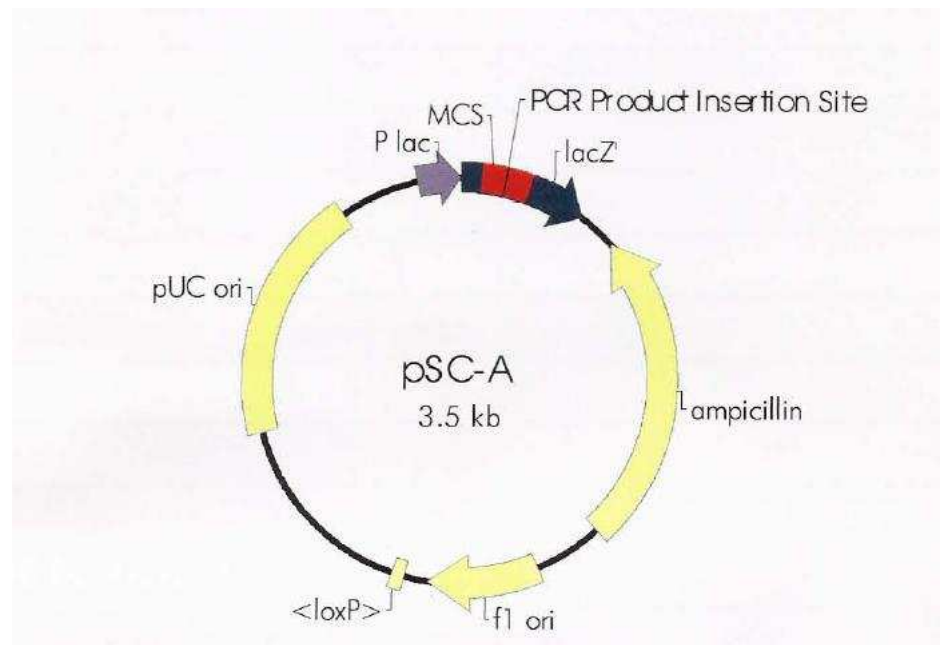


Figura 2 – Mapa do plasmídeo pSC-A. As seqüências 1 e 4 foram construídas a partir de nucleotídeos purificados por HPLC e PAGE. Os fragmentos de DNA foram clonados no pSC-A.

### 3.3. Obtenção dos fragmentos de DNA que codificam os imunógenos SBm<sub>3</sub>7462 e SBm 7462

As seqüências de nucleotídeos codificadoras dos imunógenos SBm<sub>3</sub>7462 e SBm 7462, seqüências 1 e 4 respectivamente, foram obtidas por meio da digestão do DNA plasmidial (pSC-A) com as endonucleases de restrição *Xho I* e *EcoR I*.

Após a clivagem, a mistura de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) em tampão TBE (90 mM Tris borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) contendo brometo de etídeo (20 ng·mL<sup>-1</sup>). Com o auxílio do padrão de tamanho molecular 1kb DNA *Ladder Plus* (Invitrogen), dois fragmentos de DNA foram detectados: um com cerca de 438 (seqüência 1) e outro com 171 (seqüência 4) pares de bases (pb), confirmando a liberação das seqüências de nucleotídeos que codificam os imunógenos. Estes fragmentos de DNA foram purificadas a partir do gel de agarose utilizando o *Kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Após o processo de purificação, as seqüências foram submetidas à reação de ligação com o vetor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas com a mistura de reação e incubadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) para a triagem das colônias recombinantes. O método de transformação de *E. coli* utilizado foi o método de choque térmico segundo Inoue *et al.*, 1990. Foram adicionados 10  $\mu$ L da reação de ligação a uma alíquota de 100  $\mu$ L de células ultracompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , mantida a 0 °C, por 30 minutos. Após o choque térmico de 2 minutos, a 42 °C, 1 mL de meio LB foi adicionado, incubando-se por 1 hora, a 37 °C e sob agitação de 150 rpm. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100  $\mu$ L de meio LB, espalhadas em placas contendo LB e ampicilina 50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> e incubadas a 37 °C, para seleção dos transformantes.

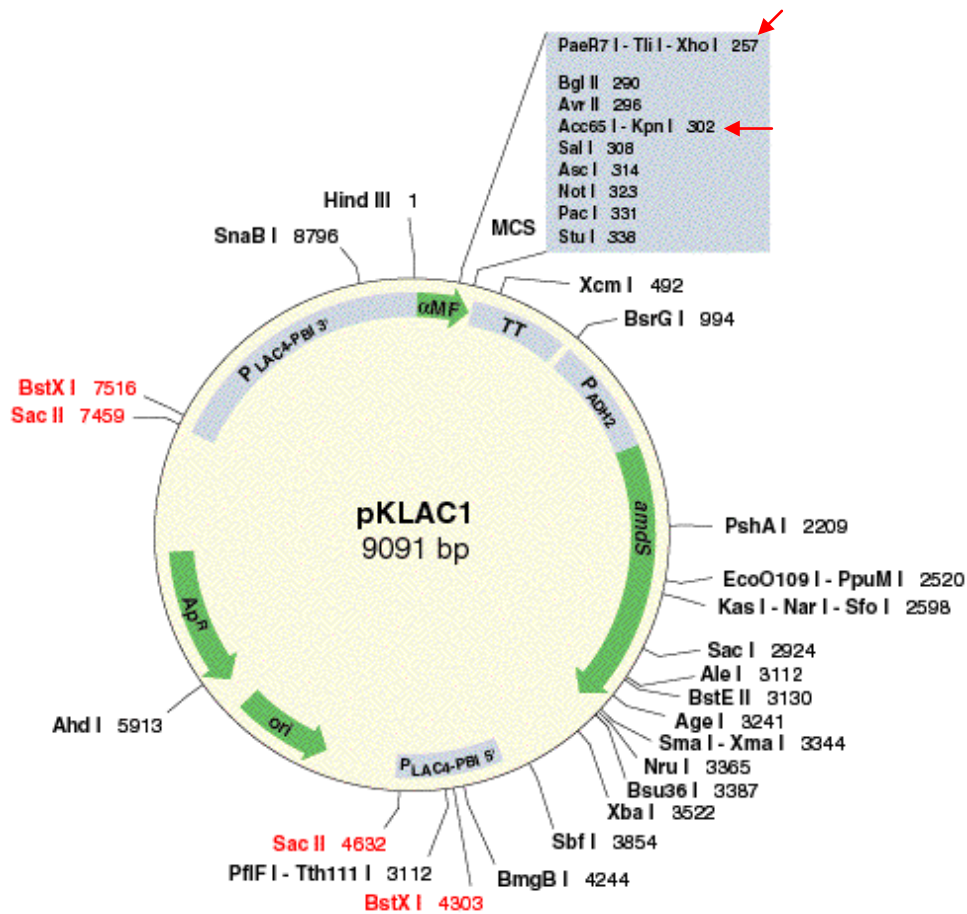
Colônias isoladas foram inoculadas em 15 mL de caldo LB seletivo (50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> de ampicilina) e, após incubação a 37 °C, sob agitação orbital de 180 rpm por cerca de 16 horas, foram realizadas extrações do DNA plasmidial. As extrações de DNA plasmidial seguiram o método de lise alcalina descrita por

Sambrook *et al.*, 1989. Os plasmídeos extraídos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v), após reações de clivagem com as enzimas *Xho I* e *EcoR I* para averiguação de quais deles apresentavam o inserto desejado.

### **3.4. Estratégia de clonagem das seqüências 1 e 4 no vetor pKLAC1 e confirmação da clonagem**

Os plasmídeos pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>, contendo os insertos de interesse, foram submetidos à reação de clivagem com as endonucleases de restrição *Xho I* e *Kpn I* para liberação das seqüências 1 e 4. A mistura de reação foi fracionada por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v). Os fragmentos de DNA de interesse foram novamente purificados a partir do gel de agarose conforme mencionado no item 3.3. Após a purificação, as seqüências 1 e 4 foram submetidas à reação de ligação com o plasmídeo pKLAC1 (*New England Biolab*<sup>®</sup>) (Figura 3), clivado com as respectivas enzimas. Para a reação de ligação utilizou-se a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen).

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas, pelo método de choque térmico (Inoue *et al.*, 1990), com os plasmídeos construídos. As colônias transformantes foram selecionadas em meio LB ágar suplementado com 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ampicilina. Colônias isoladas foram inoculadas em 15 mL de caldo LB seletivo (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ampicilina) e incubadas a 37°C, sob agitação orbital de 180 rpm por cerca de 16 horas, quando então procedeu-se a extração do DNA plasmidial.



Fonte: *New England Biolab*

Figura 3 - Mapa de restrição do plasmídeo pKLAC1 (*New England Biolabs*). Os sítios utilizados para a clonagem estão indicados por setas.

Os plasmídeos pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4 foram submetidos à reação de clivagem com endonucleases de restrição *Xho* I e *Kpn* I. Os produtos da reação foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/V) a 80 volts por cerca de 60 minutos.

Os plasmídeos foram seqüenciados para confirmação da clonagem. O seqüenciamento do DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia por didesorribonucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando o seqüenciador MegaBace (*Amersham Biosciences*). Os oligonucleotídeos utilizados foram: #S1275S  $\alpha$ -Mating Factor e #S1276S pKLAC1 Reverse. As seqüências foram comparadas

com as seqüências originais utilizando-se o programa Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*), na página do *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) acessado em 25 de maio de 2007, às 17:15)

### 3.5. Transformação de linhagens de *K. lactis* CBS2359 com os plasmídeos pKLAC1-seq1, pKLAC1-seq4 e vetor vazio

A levedura *K. lactis* CBS2359 foi transformada pelo método de acetato de lítio (LiOAc), de acordo com Hill *et al.* (1991), com o cassete de integração obtido por meio da digestão das construções com a enzima de restrição *SacII* (Figura 4). As leveduras recombinantes foram selecionadas em meio YCB ágar contendo 5mM de acetamida como única fonte de nitrogênio, 30mM tampão fosfato de sódio pH 7,0.

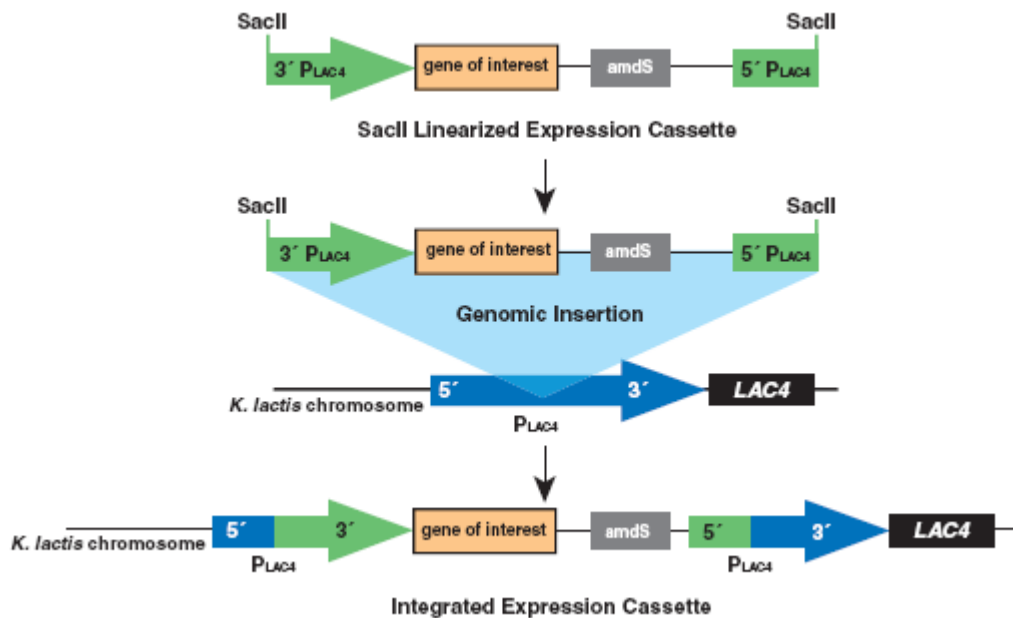


Figura 4 - Cassete de integração no promotor *LAC4*. Esse cassete foi obtido mediante clivagem do plasmídeo pKLAC1-seq 1 e pKLAC1-seq4 com a enzima de restrição *SacII*. Ele contém a seqüência de nucleotídeos de interesse e o gene marcador *amdS*, que codifica acetamidase.

### **3.6. Confirmação do local de inserção do cassete de integração no genoma de *K. lactis* CBS2359**

Para extração do DNA total, leveduras recombinantes e leveduras controle foram cultivados em 5 mL de YPD à 30 °C com uma agitação de 200 rpm por 16 horas. Em seguida, 1,5 mL da cultura foram transferidos para um microtubo e centrifugados a 13000 *g* por 5 segundos. Os sedimentos de células foram ressuspensos em 400 µL do tampão de extração (Triton 100X, SDS 10% (p/v), 1M NaCl, 1M EDTA pH 8) e adicionados 200 µL de fenol-clorofórmio e 0,3 gramas de partículas de vidro (0,45 mm de diâmetro). As células foram lisadas quando submetidas ao vortex por 2 minutos. Em seguida, centrifugadas a 13000 *g* por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo. O DNA total foi precipitado utilizando 1/10 de volume de 5M de acetato de potássio e 2 volumes de etanol refrigerado, incubado por 2 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 13000 *g* por 10 minutos, o DNA total foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e ressuspensado em 20 µL de água ultra pura autoclavada.

A partir do DNA total da levedura, foi realizada amplificação por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), utilizando os seguintes oligonucleotídeos: oligonucleotídeo 1 - 5'TACCGACGTATATCAAGCCCA3', oligonucleotídeo 2 - 5'ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC3' e oligonucleotídeo 3 - 5'CAGTGATTACATGCATATTGT3'.

A reação de amplificação consistiu de 30 ciclos de incubações sucessivas a 95° C por 30 segundos, 60° C por cerca de 30 segundos e a 72° C por 120 segundos e uma incubação final a 72° C por 10 minutos.

A verificação de linhagens com múltiplas cópias do cassete de integração foi realizada pela combinação dos oligonucleotídeos 2 e 3, que resultaria em uma banda de 2,3 kb enquanto a integração única seria confirmada pela presença de uma banda de aproximadamente 2,0 kb, resultado da amplificação com os oligonucleotídeos 1 e 2 (Figura 5).

Os fragmentos de DNA foram visualizados em gel de agarose 1,5% (p/v) submetido a uma diferença de potencial de 80 volts por cerca de 60 minutos, utilizando padrão de tamanho molecular 1kb DNA *Ladder Plus* (Invitrogen).

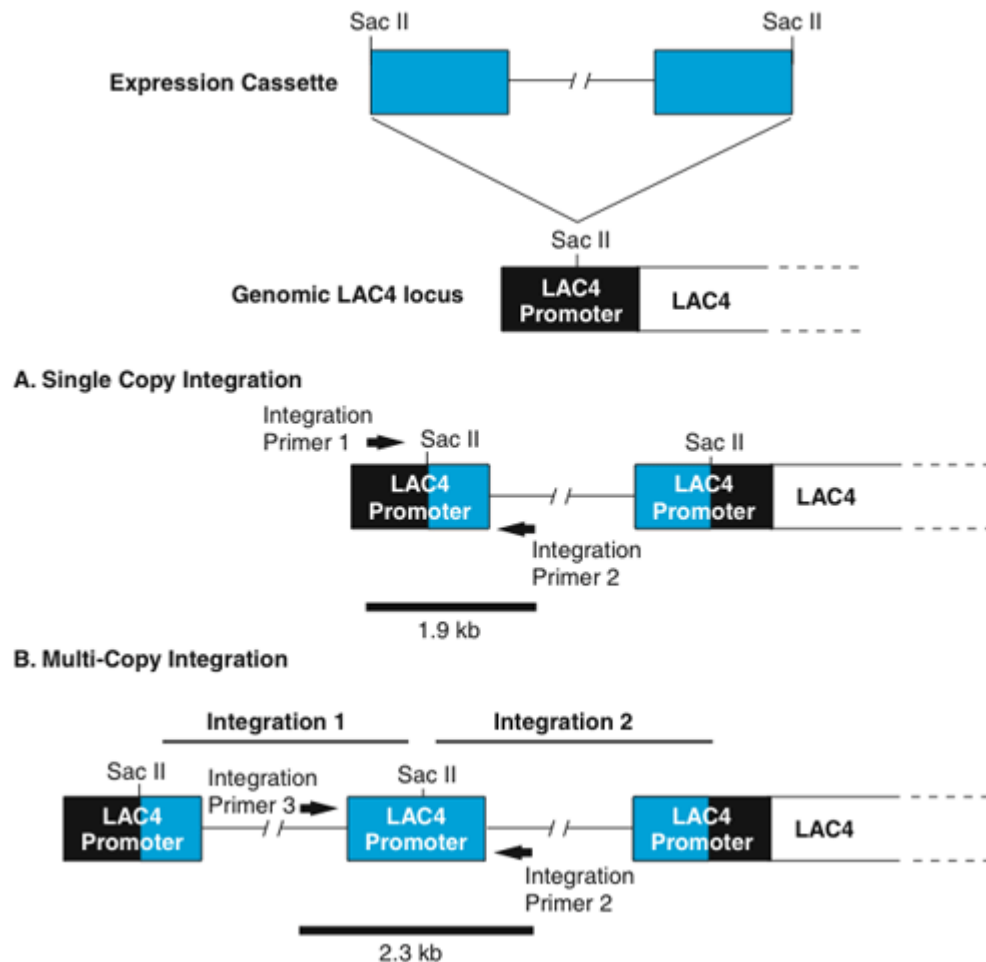


Figura 5 - Esquema do método utilizado para confirmação do local e o número de inserções do cassete de expressão no genoma de *K. lactis2359*. Uma única integração pode ser detectada por PCR utilizando Oligonucleotídeos de integração 1 e 2 para amplificar um fragmento de DNA de 1,9 Kb (A), enquanto integração de mais de um cassete pode ser detectado utilizando Oligonucleotídeos de integração 2 e 3 para amplificar um fragmento de DNA de 2,3 Kb (B).

### **3.7. Avaliação da estabilidade dos recombinantes e averiguação da expressão dos peptídeos vacinais**

Para avaliar a estabilidade genética dos recombinantes, os mesmos foram transferidos para o meio YPD ágar ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  extrato de levedura,  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  peptona,  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glicose,  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Ágar) e incubados a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  até o surgimento de colônias isoladas. Em seguida, cinco colônias de cada transformante foram sucessivamente transferidas para meio completo não seletivo, YPD, em um total de cinco passagens. A cada passagem as placas foram incubadas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 72 horas. No final da quinta passagem, as colônias foram transferidas para meio seletivo (YCB contendo 5 mM de acetamida) e incubadas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por mais 72 horas.

Os transformantes foram submetidos a um ensaio de indução. Inicialmente, eles foram cultivados em meio YPGlicerol ágar por três dias a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e transferidos para meio YPLactose ágar ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  extrato de levedura,  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  peptona,  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  lactose,  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Ágar), meio de indução. Decorridos dois dias de incubação a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , uma membrana de nitrocelulose  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  foi colocada sobre as colônias que foram incubadas por mais dois dias a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A membrana foi bloqueada com tampão salina fosfato (PBS)  $0,05 \text{ M}$  pH7,6 contendo 0,5% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) por 30 minutos. Para revelação dos peptídeos transferidos para a membrana foram utilizados os seguintes soros: soro de coelho primário contendo Ig-G anti-SBm 7462 (1/100) e soro de coelho primário contendo Ig-G contra cabra (1/100). Cada membrana foi imersa em um dos soros primários permanecendo sob agitação por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS-T e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com solução de anticorpo secundário reativo contra o primeiro: Ig-G de cabra Anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) a 1/5000. Logo após, cada membrana foi lavada 3 vezes em tampão PBS-T durante 5 minutos, sob agitação. Procedeu-se a revelação mediante a adição de solução contendo 0,01% (v/v) de água oxigenada (30 volumes), Tris/HCL  $0,05 \text{ M}$  pH7,6, Cloreto de Níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) 0,3% (p/v) e diaminobenzidina

(DAB- *Peroxidase Substrate Tablet Set* – Sigma) 0,1% (p/v). Após 5 minutos, a reação foi interrompida por imersão das membranas de nitrocelulose em água ultra pura e depois, foram colocadas para secar entre folhas de papel de filtro.

### **3.8. Extração do RNA total de *K. lactis* CBS2359 cultivada em YNB suplementado com lactose**

O RNA total de *K. lactis* foi extraído utilizando-se o Kit da QIAGEN® seguindo as recomendações do fabricante. Utilizou-se o protocolo de rompimento mecânico das células por partículas de vidro. As concentrações e o grau de pureza do RNA extraído foram determinados por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

As amostras foram tratadas com a enzima DNase (Promega®). Para cada 10 µg de RNA, adicionou-se 10 µl de tampão RQ1DNase 10X (Promega®), 10 µl de DTT 100mM, 1 U de *RQ1 DNase RNase-free* e água DEPC para completar o volume de 100 µl.

Em seguida cada tubo foi incubado a 37°C, por 45 minutos em banho-maria. Decorrido o tempo de incubação, adicionou-se 1 µl da solução de RQ1 DNase, destinada a interromper a reação. Incubou-se por 10 minutos a 65 °C para inativar a DNase.

### **3.9. Síntese de cDNA por RT (Transcriptase Reversa)-PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)**

Para síntese da primeira fita de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) utilizou-se o Kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis* para RT-PCR (Invitrogen®) em termociclador GeneAmp 9700 (*Applied Biosystems*). Na primeira etapa, 5 µg de RNA total foram adicionados a 1µl de oligo d(T) (10mM) com um volume de água DEPC suficiente para completar 12 µl em tubos de 0,2

ml. A reação foi incubada a 70 °C por 10 minutos e, posteriormente, a 4 °C por 2 minutos.

Na segunda etapa, 7 µl de uma mistura contendo 2 µl do tampão RT 10X; 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 1 µl de dNTP (10 mM) e 2 µl de DTT (0,1 M) foram adicionados em cada tubo e incubados a 42 °C por 5 minutos. Em seguida, 0,5 µl (2,5 U) da enzima SuperScript™ II RT foram adicionados em cada tubo. As misturas foram homogeneizadas e incubadas a 42 °C por 50 minutos e a 70 °C por 15 minutos, finalizando com um banho de gelo por 2 minutos.

Na última etapa da reação foi realizado um tratamento com 0,5 µl de RNase H (10mM) por 20 minutos a 37°C com a finalidade de degradar fitas simples de RNA. Após este tratamento, as amostras foram estocadas a -20 °C em tubos de polipropileno de 1,5 ml até o momento do uso.

A mistura de reação da PCR continha 1X do tampão de PCR 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,3 mM de dNTPs; 2 µl do cDNA; 2 U de Platinum® Taq DNA Polimerase e 0,4 µM de cada oligonucleotídeo em um volume final de 25 µl. Os oligos utilizados para a detecção do transcrito foram os mesmos utilizados para o seqüenciamento.

As reações de PCR foram definidas com uma temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto para extensão das fitas pela Taq DNA polimerase. Ao final dos ciclos foi realizada uma extensão final de 7 minutos à 72°C.

Ao término das reações, 4 µl de tampão de amostra tipo IV (0,25% p/v de azul de bromofenol e 40% p/v de sacarose) foram adicionados em cada tubo, e aplicados em gel de agarose 1,5% (p/v). Foi utilizada uma voltagem de 100 volts em cuba de eletroforese horizontal. Padrão de tamanho molecular DNA *Lambda* (Promega) foi aplicado em uma das canaletas do gel para identificação dos fragmentos de DNA de interesse.

### 3.10. Indução da expressão dos imunógenos SB<sub>3</sub>m7462 e SBm 7462

Para avaliar a secreção de proteínas, as células de *K. lactis* CBS2359 recombinantes foram cultivadas em YPGlicerol para obtenção de biomassa. A cultura foi centrifugada e o sedimento lavado com água peptonada 0,01% (p/v). As células foram ressuspensas em meio de indução contendo 4 g·L<sup>-1</sup> de lactose e cultivadas a 30 °C sob agitação orbital de aproximadamente 200 rpm. A cada 24 horas foram retiradas amostras. Estas foram centrifugadas e o sobrenadante guardado para posteriores análises de proteína total, atividade proteolítica, SDS-PAGE e detecção do rSBm 7462. Paralelamente, foi conduzido um experimento de indução no qual, a cada 24 horas, era dado um pulso de uma solução de lactose 4% (p/v).

### 3.11. Avaliação de Proteínas totais

A determinação de proteína total foi realizada pelo método do ácido bicinonínico descrito por Smith, 1985. Os ensaios foram realizados em microplacas de ELISA. Estas foram submetidas à leitura em Leitora de Microplacas (*Thermo Plate / TP-Reader*), inicialmente vazias e posteriormente contendo as reações. A mistura de reação foi composta de 120 µL da solução de trabalho (um volume de solução de sulfato de cobre penta hidratado e cinquenta volumes de solução de ácido bicinonínico 1% p/v) e 60 µL da amostra a ser analisada. Esta mistura foi incubada a 37° C por 30 minutos e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento. Após este tempo, procedeu-se à leitura a 630 nm. O cálculo da quantidade de proteínas totais da amostra foi realizado mediante uma curva padrão construída com uma solução padrão de 2,0 g·L<sup>-1</sup> de BSA (*Bovine Serum Albumin*).

### **3.12. Avaliação da atividade proteolítica no sobrenadante obtido pelo cultivo das linhagens recombinantes de *K. lactis* em meio de indução**

A atividade proteolítica foi determinada no extrato livre de células, utilizando-se azocaseína como substrato numa concentração de 1,0% (p/v), pH 7,5. A atividade foi monitorada espectrofotometricamente a 440 nm, empregando-se o método descrito por Kunitz 1947 e Ray *et al.*, 1992. Para o ensaio, 100  $\mu$ L do sobrenadante da cultura foram adicionados a 200  $\mu$ L de azocaseína. A mistura de reação foi incubada por 12 horas a 30 °C e, após este tempo, paralisada com ácido tricloroacético 10% (p/v) e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 15000 g por 10 minutos e a leitura de absorvância efetuada a 440 nm. O branco da reação foi o meio de cultura não inoculado submetido ao mesmo procedimento. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a absorvância obtida dividida pela concentração de proteínas totais em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  por unidade de tempo.

### **3.13. Avaliação das proteínas totais secretadas pelas linhagens recombinantes, e controle, por eletroforese em gel de poli-acrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

Proteínas totais dos sobrenadantes das amostras coletadas durante a indução foram precipitadas com acetona e ressuspendidas em 0,2 mL de tampão de amostra [150mM Tris-HCl pH7, 6%  $\beta$ -mercaptoetanol, 12% (p/v) Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 30% (v/v) glicerol e 0,05 (p/v) de *Coomassie Blue* G-250]. As amostras foram aquecidas a 100° C por 5 minutos e analisadas em gel de poli-acrilamida 16% (T). Os géis foram preparados a partir de uma solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 55,5% (p/v), tampão Tris/HCl 3,0  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,45; dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) apenas no gel empilhador, persulfato de amônio 10% (p/v), e N,N,N,N,-tetrametil-etilenodiamino (TEMED). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente na presença de marcadores com padrão de massa molecular. Utilizou-se dois

diferentes tampões de corrida, um para o anodo (Tris/HCl  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0,0225 \mu\text{L}$  de HCl pH 8,9) e outro para o catodo (Tris/HCl  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , tricina  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , SDS 0,1% (v/v); pH 8,25). O gel foi corado com *Coomasie brilliant blue* [50% (v/v) metanol, *Coomasie brilliant blue*  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 10% (v/v) ácido acético glacial] e descorados.

A coloração pelo método de prata também foi realizada. O gel de poliacrilamida foi previamente fixado em solução de ácido acético 10% (v/v), acetado de amônio 100 mM e metanol 50% (v/v) por 60 minutos sob agitação. A seguir, foi lavado com água ultra pura por 3 vezes, 10 minutos cada e, então, incubado em solução de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,005% (p/v) por 60 minutos sob agitação. Na seqüência, o gel foi transferido para uma solução de nitrato de prata 0,1% (p/v) por 60 minutos. O gel foi lavado com água ultra pura por alguns segundos e colocado em solução redutora preparada com carbonato de sódio 2% (p/v) e formaldeído a 0,036% (v/v). Após revelação das bandas, o gel permaneceu em solução de 50 mM de EDTA para interromper a reação.

### **3.14. Detecção de Glicoproteínas em Gel de Poliacrilamida**

A presença de glicoproteínas foi detectada pela coloração com o reativo Schiff, conforme a metodologia descrita por Kapitany & Zebrowski, 1973. Após a corrida eletroforética o gel foi imerso em solução fixadora de ácido tricloroacético 12,5% (v/v) por 60 minutos sob agitação na ausência de luz, seguido de 3 lavagens com água deionizada. O gel foi, então, colocado em solução a 1% (p/v) de ácido periódico (Sigma) preparado em ácido acético a 3% (v/v), por 2 horas. Ao final deste, o gel foi lavado em ácido acético a 15% (v/v) por 1 hora, imerso no reativo de Schiff por 2 horas na ausência de luz, sendo, posteriormente, lavado com solução de ácido acético a 7% (v/v) sob agitação constante.

### **3.15. Detecção do rSBm 7462 no sobrenadante da cultura das linhagens de *K. lactis* recombinantes**

As amostras foram analisadas em membrana de *Polyvinylidene Difluoride* (PVDF) 0,45  $\mu\text{m}$  (*Milipore Corp.*). Para esta análise, foram aplicados, sobre a membrana, 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da cultura concentrado 5 vezes. Esperou-se 30 minutos para a membrana absorver a amostra que foi, em seguida, fixada com metanol por 3 minutos. A revelação foi realizada como descrito no item 3.7.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Construção do vetor de expressão pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4

As seqüências de nucleotídeos 1 (430 pb ) e 4 (160 pb) desenhadas a partir da seqüência primária de aminoácidos do peptídeo SBm 7462 foram obtidas mediante a clivagem do vetor pSC-A com as endonucleases de restrição *XhoI* e *EcoRI* (Figura 6A). Os fragmentos de DNA recuperados do gel de agarose foram subclonadas no vetor TOPO. A clonagem no TOPO foi útil para realizar as clivagens com as enzimas *XhoI* e *KpnI* necessárias à subsequente clonagem no plasmídeo pKLAC1 (Figura 6B).

As construções dos vetores de expressão pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4 (Figura 7) foram confirmadas por meio da clivagem com as endonucleases *XhoI* e *KpnI*, o que resultou em fragmentos de DNA com tamanho esperado, 470 pb e 200 pb, para as seqüências 1 e 4 respectivamente (Figura 6C). O sequenciamento, dos vetores pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4, mostrou que as seqüências foram clonadas em fase com a seqüência de nucleotídeos que codifica o peptídeo sinal  $\alpha$ -Mating Factor ( $\alpha$ -MF) e que, a seqüência para o códon de parada, assim como para o sítio de clivagem da protease Kex, foram mantidas (Figura 8).

A manutenção do sítio Kex, na junção entre o peptídeo sinal  $\alpha$ -MF e o N-terminal da proteína de interesse, é importante para garantir o processamento do peptídeo sinal, o qual dirige a proteína para a via secretória. O sítio de clivagem da endonuclease de restrição *XhoI*, utilizada na clonagem, está localizado imediatamente *upstream* da seqüência de nucleotídeos que codifica o sítio de clivagem da protease Kex. Dessa forma, qualquer gene clonado com a enzima

*XhoI* deve conter, na sua extremidade 5', uma seqüência que reconstitua o sítio de clivagem para Kex permitindo, assim, o processamento da pro-proteína no Complexo de Golgi. Na construção das seqüências 1 e 4 foi inserida a seqüência para reconstituir o sítio de clivagem da Kex no terminal 5'. As seqüências em estudo foram sintetizadas considerando os códons preferenciais de leveduras, incluindo a seqüência para o códon de parada, TAA, mantido durante a clonagem (Figura 8).

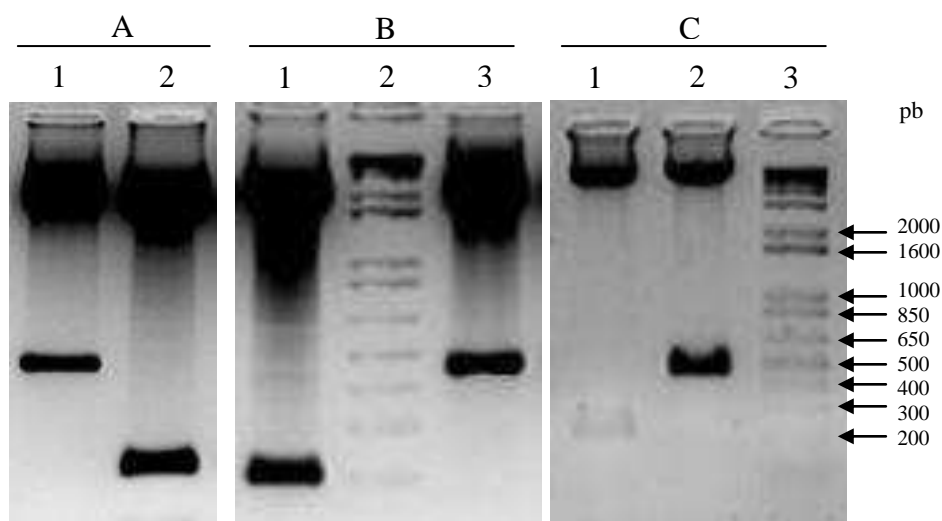


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) dos fragmentos de DNA obtidos durante a fase de construção do vetor de expressão integrativo pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4. (A) Plasmídeo pSC-A clivado com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *XhoI*: pSC-A contendo seqüência 1 (1) e pSC-A contendo a seqüência 4 (2). (B) Plasmídeo TOPO clivado com as endonucleases de restrição *XhoI* e *KpnI*: TOPO contendo seqüência 4 (1), padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen) (2) e TOPO contendo a seqüência 1 (3). (C) Vetor pKLAC1 clivado com as endonucleases de restrição *XhoI* e *KpnI*: pKLAC1 contendo seqüência 4 (1), pKLAC1 contendo a seqüência 1 (2) e padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (3).

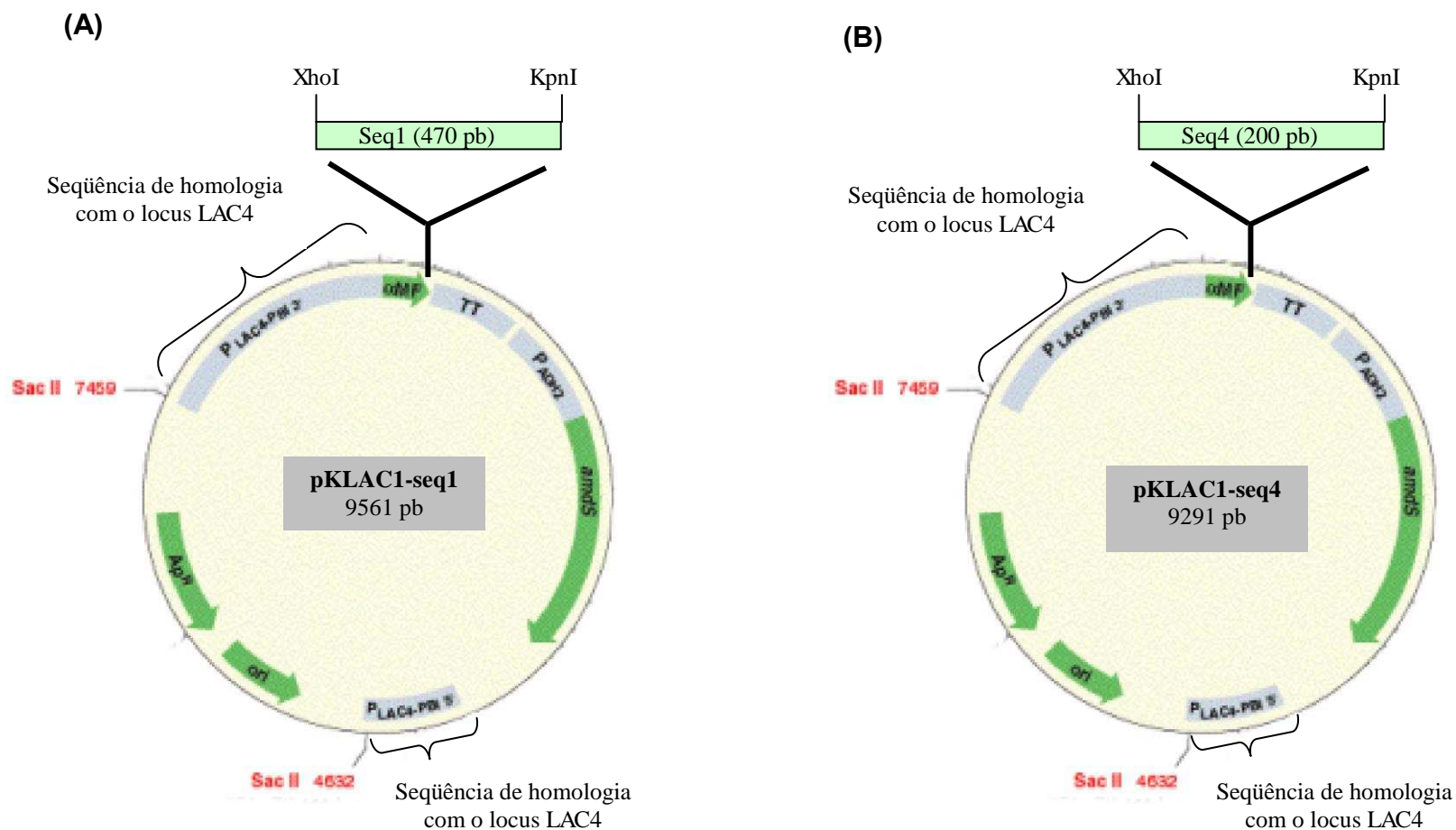


Figura 7 – Mapa do vetor de expressão pKLAC1-seq1 (A) e pKLAC1-seq4 (B). As seqüências 1 e 4 foram clonadas no vetor pKLAC1 utilizando os sítios de restrição das endonucleases *XhoI* e *KpnI* como descrito no Material e Métodos. O cassete de integração é obtido pela reação de clivagem com a enzima *SacII*. As seqüências envolvidas na recombinação homóloga do cassete no *locus LAC4* estão indicadas.

(A)

ATG AAA TTC TCT ACT ATA TTA GCC GCA TCT ACT GCT TTA ATT TCC  
M K F S T I L A A S T A L I S

GTT GTT ATG GCT GCT CCA GTT TCT ACC GAA ACT GAC ATC GAC GAT  
V V M A A P V S T E T D I D D

CTT CCA ATA TCG GTT CCA GAA GAA GCC TTG ATT GGA TTC ATT GAC  
L P I S V P E E A L I G F I D

TTA ACC GGG GAT GAA GTT TCC TTG TTG CCT GTT AAT AAC GGA ACC  
L T G D E V S L L P V N N G T

CAC ACT GGT ATT CTA TTC TTA AAC ACC ACC ATC GCT GAA GCT GCT  
H T G I L F L N T T I A E A A

TTC GCT GAC AAG GAT GAT CTC GAG CTC GAG GAA AAG AAG AGA GAA  
F A D K D D L E L E E K K R E

Sítio de *Xho*I

↑  
Sítio *Kex*I

GCA GAA GCT TGT CTT AGC AAG CAT GTT CTA AGG AAG TTA CAA GCT  
A E A C L S K H V L R K L Q A

TGC GAA CAC TGT GAT TGT GGA GAA TGG GGA GCT ATG AAC ATG ACG  
C E H C D C G E W G A M N M T

ACA AGA TCA TCG ATT TGC TCA GAT TTC GGT AAC GAG TTT TGC AGA  
T R S S I C S D F G N E F C R

AAC GCT TGT TTG TCC AAG CAT GTC TTG AGG AAG TTG CAA GCT TGT  
N A C L S K H V L R K L Q A C

GAA CAC TGT GAT TGT GGT GAA TGG GGT GCT ATG AAC ATG ACA ACC  
E H C D C G E W G A M N M T T

AGA TCC TCT ATA TGC TCT GAT TTC GGT AAC GAG TTT TGT AGG AAC  
R S S I C S D F G N E F C R N

GCA TGC CTT TCT AAG CAT GTC CTT AGA AAG CTT CAA GCA TGT GAG  
A C L S K H V L R K L Q A C E

CAT TGT GAC TGT GGA GAA TGG GGT GCA ATG AAC ATG ACT ACT AGA  
H C D C G E W G A M N M T T R

TCC AGT ATC TGT TCC GAT TTC GGA AAC GAA TTT TGT AGA AAC GCT  
S S I C S D F G N E F C R N A

TGT TAA GAA TTC  
C \*



## 4.2. Transformação da linhagem de *K. lactis* CBS2359 com pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4 e avaliação da estabilidade mitótica dos recombinantes

Os vetores pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4 foram clivados com a enzima *SacII* para transformação da linhagem de *K. lactis* CBS2359. A clivagem de cada vetor resultou em um cassete contendo a seqüência de interesse flanqueada pelas regiões 3'P<sub>LAC4</sub> e 5'P<sub>LAC4</sub>, que direcionam a integração do cassete por recombinação homóloga na região promotora do gene *LAC4*, como representado na Figura 9. A integração correta do cassete, por recombinação homóloga, é de extrema importância, uma vez que, a transcrição do gene de interesse ocorrerá somente se o promotor *LAC4* for reconstituído após a recombinação.

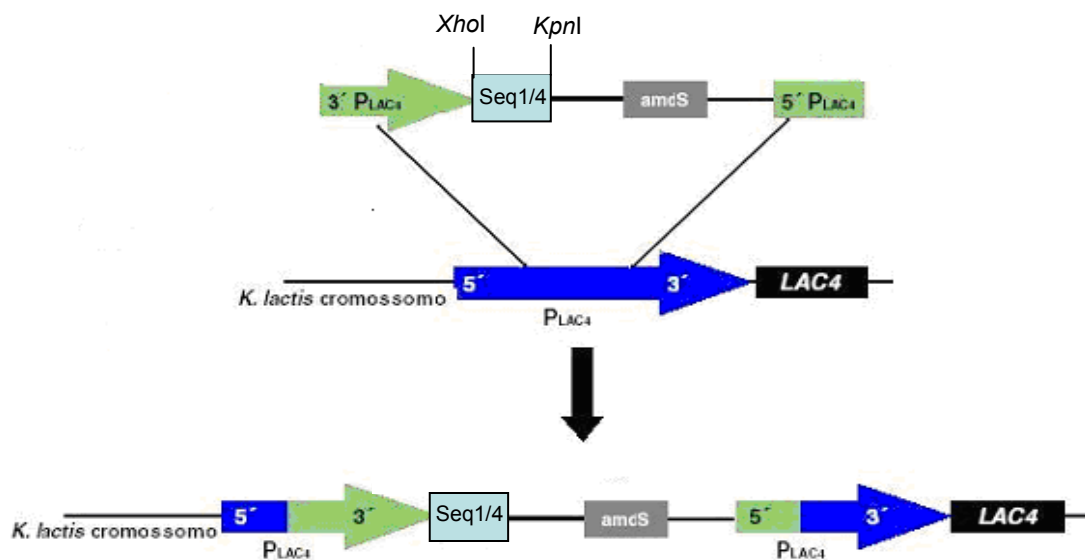


Figura 9 - Cassete de integração no promotor *LAC4*, contendo o gene marcador *amdS* e as seqüências de nucleotídeos 1 e 4 flanqueadas pelas regiões 3'P<sub>LAC4</sub> e 5'P<sub>LAC4</sub>.

A eficiência de transformação foi de  $10^3$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial pKLAC1-seq1 para a CBS2359. A mesma eficiência foi alcançada para a linhagem CBS2359 transformada com pKLAC1-seq4.

Um total de 8 recombinantes CBS2359/pKLAC-seq4 e 9 CBS2359/pKLAC1-seq1 foram analisados quanto à estabilidade mitótica. Todos os recombinantes analisados foram estáveis.

A confirmação da integração do cassete de expressão no genoma das linhagens recombinantes foi realizada por PCR. O DNA total dos recombinantes foi utilizado nas reações de amplificação *in vitro* com os oligonucleotídeos 1 e 2. Detecção de um fragmento de DNA com aproximadamente 2 Kb em gel de agarose confirmou a integração do cassete, no local esperado (Figura 10).

PCR utilizando os oligonucleotídeos 2 e 3 para identificação de linhagens contendo múltiplas cópias do cassete de integração também foi realizada. Há relatos de que esse sistema de expressão baseado no vetor pKLAC1 pode apresentar até 10 inserções no genoma da linhagem hospedeira (Colussi & Taron 2005). Linhagens com múltiplas cópias do cassete, frequentemente, produzem e secretam mais proteínas. Contudo, dentre os recombinantes avaliados, não foram detectados recombinantes com múltiplas integrações (Figura 10).

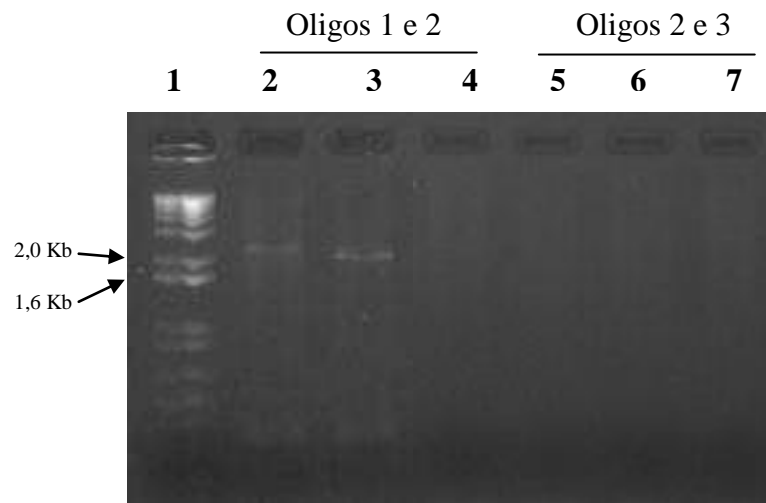


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) do DNA, produto de PCR, do DNA genômico de células de *K. Lactis* recombinantes e controles. Marcador 1Kb DNA ladder (1); CBS2359 transformada com o vetor pKLAC1-seq1 (2 e 5); CBS2359 transformada com o vetor pKLAC1-seq4 (3 e 6); CBS2359 não transformada (4 e 7).

#### 4.3. Detecção dos transcritos que codificam os peptídeos vacinais e análise da secreção de rSBm<sub>3</sub>7462 e rSBm 7462

A comprovação da expressão das seqüências introduzidas no genoma da levedura *K.lactis* foi realizada por meio de um ensaio de indução com a detecção do transcrito e do reconhecimento dos peptídeos secretados por anticorpos monoclonais.

Fragmentos de DNA com aproximadamente 800 pb (470 pb da seqüência 1 somados a 300pb do  $\alpha$ -MF) e 500 pb (200 pb da seqüência 4 somados a 300pb do  $\alpha$ -MF) obtidos por RT-PCR (Figura11) confirmaram a transcrição das seqüências inseridas no genoma de *K. lactis* CBS2359.

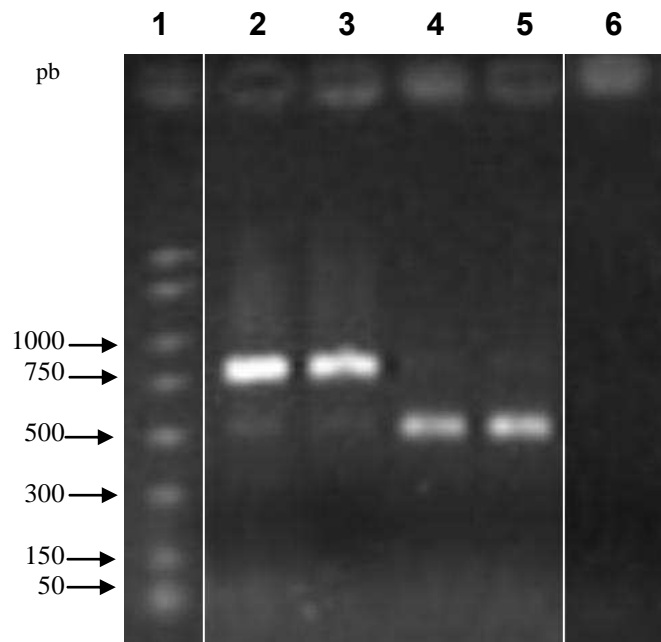


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do DNA, produto de RT-PCR, do mRNA de células de *K. lactis* recombinantes induzidas em lactose. A detecção do mRNA que codifica os peptídeos de interesse confirmou a transcrição das seqüências introduzidas no genoma de *K. lactis*. Marcador de tamanho molecular DNA *Lambda* (1); *K. lactis* CBS2359 transformada com o cassete de integração contendo a seqüência 1 (2 e 3); *K. lactis* CBS2359 transformada com o cassete de integração contendo a seqüência 4 (4 e 5); *K. lactis* CBS2359 não transformada (6).

A averiguação da secreção dos peptídeos de interesse, por meio do reconhecimento dos mesmos por anticorpos monoclonais anti-SBm 7462, revelou que os recombinantes obtidos eram capazes de secretar o referido peptídeo (Figura 12). Os recombinantes selecionados para estudos da expressão do rSBm 7462 estão destacados na Figura 12.

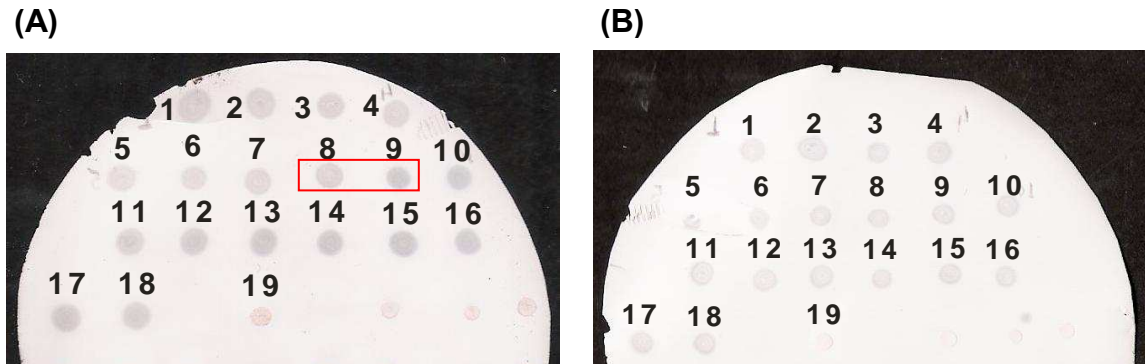


Figura 12 – Membranas de nitrocelulose tratadas com soro de coelho contendo Ig-G contra SBm 7462, reação positiva (A) e soro de coelho contendo Ig-G contra cabra, reação negativa (B) para identificação de linhagens recombinantes capazes de secretar os peptídeos SBm 7462 e SBm<sub>3</sub>7462. Os recombinantes foram previamente crescidos em meio contendo glicerol. Posteriormente, as colônias foram transferidas para meio contendo lactose para a indução da produção e secreção de SBm 7462 e SBm<sub>3</sub>7462. As membranas foram colocadas sobre as colônias durante esta fase. *K. lactis* CBS2359 transformada com o pKLAC1-seq4 (1 - 8); *K. lactis* CBS 2359 transformada com o pKLAC1-seq1 (9 – 18); controle (19).

#### 4.4. Expressão de rSBm<sub>3</sub>7462 e rSBm 7462

A produção do peptídeo vacinal SBm 7462 pelas leveduras recombinantes *K. lactis* CBS2359/pKLAC1-seq1 e CBS2359/pKLAC1-seq4 foi realizada em duas etapas. Na primeira, uma biomassa de aproximadamente 10 g·L<sup>-1</sup>, correspondente a uma DO<sub>600</sub> de 20, foi alcançada para ambas as linhagens recombinantes. Essa etapa foi conduzida em meio contendo glicerol como única fonte de carbono. Na segunda, destinada à indução da síntese do peptídeo, a biomassa recombinante foi concentrada por centrifugação e ressuspensa em meio de indução de modo a

se obter uma concentração inicial de células de  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Essa biomassa não variou significativamente durante o período de indução alcançando, ao final de 144 horas, um valor aproximado de  $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . O mesmo foi observado para as linhagens controle.

Amostras dos sobrenadantes do meio de indução foram avaliadas quanto a proteínas totais após diversos tempos de indução. Foi detectado que os recombinantes secretaram uma maior quantidade de proteínas totais do que a linhagem controle quando a indução foi realizada sem e com pulso de lactose a cada 24 horas (Figura 13 e 14).

Para a linhagem recombinante *K. lactis* CBS2359/pKLAC1-seq1 o pico máximo de secreção de proteínas foi obtido com 72 horas de indução sem pulso de lactose, sendo mantido até 144 horas (Figura 13). Para avaliar se esta estagnação da secreção de proteínas no tempo de 72 horas era devido ao consumo da molécula indutora, uma solução de lactose 4% (p/v) foi adicionada a cada 24 horas durante a etapa de indução. Nestas condições, o pico máximo de secreção de proteínas foi observado em 120 horas.

Logo, o consumo de lactose durante a fase de indução influencia a produção e secreção do peptídeo de interesse. Quando o mesmo tratamento foi aplicado às células controle a variação da concentração de proteínas totais secretadas não foi tão significativa como aquela observada para a linhagem recombinante.

A *K. lactis* CBS2359/pKLAC1-seq4 apresentou o mesmo comportamento que a linhagem recombinante CBS2359/pKLAC1-seq1 durante a indução sem o pulso de lactose. Entretanto, com o pulso de lactose, houve um aumento na concentração de proteínas extracelulares ainda no tempo de 144 horas (Figura 14).

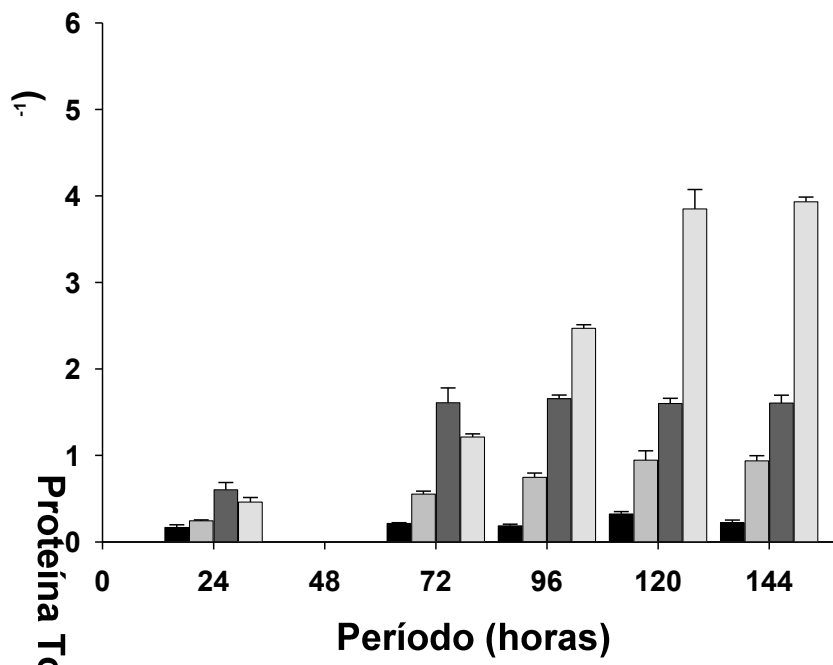


Figura 13 - Concentração de proteínas totais no sobrenadante obtido pelo cultivo de *K. lactis* CBS2359/seq1. ■ Controle sem pulso de lactose; □ Controle com pulso de lactose; ▒ CBS2359/seq1 sem pulso de lactose; ◻ CBS2359/seq1 com pulso de lactose. (Tempo de 48 horas não determinado)

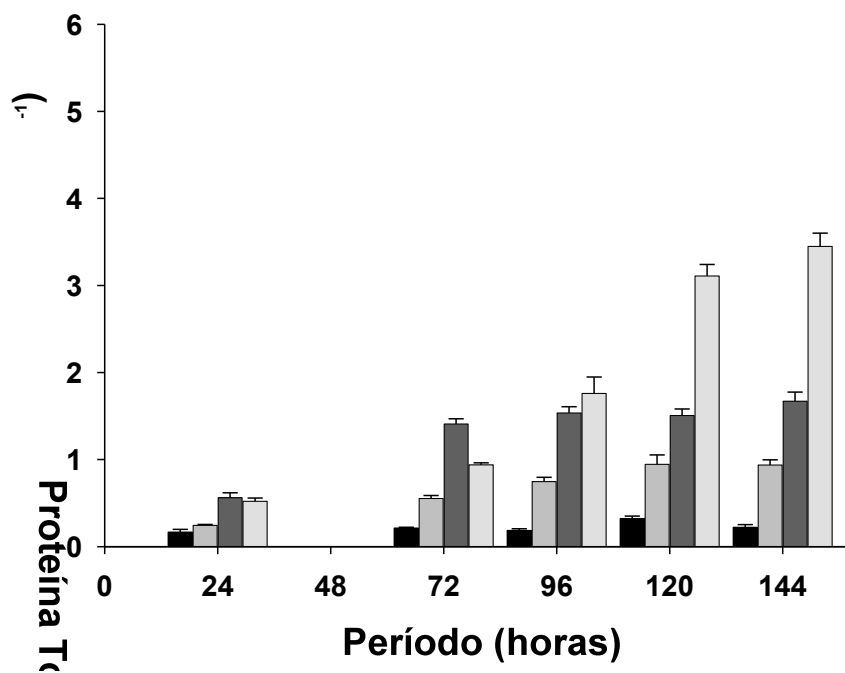


Figura 14 - Concentração de proteínas totais no sobrenadante obtido pelo cultivo de *K. lactis* CBS2359/seq4. ■ Controle sem pulso de lactose; □ Controle com pulso de lactose; ▒ CBS2359/seq4 sem pulso de lactose; ◻ CBS2359/seq4 com pulso de lactose. (Tempo de 48 horas não determinado)

#### 4.5. Avaliação da atividade proteolítica no sobrenadante obtido pelo cultivo das linhagens recombinantes de *K. lactis* em meio de indução

O acúmulo de proteínas totais no meio revelou a estabilidade das proteínas secretadas e ausência de proteases, o que foi confirmado pela análise de atividade proteolítica (Tabelas 1 e 2). Este resultado é muito importante, pois, a ausência de proteases no sobrenadante evita maiores gastos com a inativação das mesmas, uma vez que, elas poderiam comprometer a obtenção do peptídeo de interesse.

Tabela 1 - Atividade proteolítica nos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens recombinantes de *K. lactis* CBS2359 em meio de indução YNB suplementado com 4% (p/v) de lactose.

| Tempo (horas) | Com pulso de Lactose a cada 24 h |              | Sem pulso de Lactose |              |
|---------------|----------------------------------|--------------|----------------------|--------------|
|               | CBS2359/Seq1                     | CBS2359/Seq4 | CBS2359/Seq1         | CBS2359/Seq4 |
| <b>24</b>     | 0,01146                          | 0,01017      | 0,00833              | 0,00863      |
| <b>72</b>     | 0,00365                          | 0,00568      | 0,00315              | 0,00393      |
| <b>96</b>     | 0,00241                          | 0,00348      | 0,00335              | 0,00377      |
| <b>120</b>    | 0,00260                          | 0,00318      | 0,00432              | 0,00402      |
| <b>144</b>    | 0,00319                          | 0,00229      | 0,00423              | 0,00366      |

U = A630 dividida pela concentração de proteínas totais em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  por unidade de tempo.

Tabela 2 - Atividade proteolítica nos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens controles de *K. lactis* CBS2359 em meio de indução YNB suplementado com 4% (p/v) de lactose.

| Tempo (horas) | CBS2359 Com pulso de lactose | CBS2359 Sem pulso de lactose |
|---------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>24</b>     | 0,0248                       | 0,0424                       |
| <b>72</b>     | 0,0123                       | 0,0337                       |
| <b>96</b>     | 0,0093                       | 0,0371                       |
| <b>120</b>    | 0,0075                       | 0,0234                       |
| <b>144</b>    | 0,0078                       | 0,0362                       |

U = A630 dividida pela concentração de proteínas totais em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  por unidade de tempo.

#### **4.6. Avaliação das proteínas totais secretadas pelas linhagens recombinantes, e controle, por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A Figura 15 mostra o perfil eletroforético das proteínas totais secretadas no meio de cultura pelas linhagens recombinantes de *K. lactis* e pelas linhagens controle. Uma proteína nativa com a mesma massa molecular que o peptídeo vacinal, 16 kDa, sobrepôs a banda de interesse. Um diferente perfil de bandas foi observado quando se comparou o perfil eletroforético das proteínas totais presentes nos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens recombinantes e controle. Observou-se a presença de uma banda com massa molecular de 21 kDa no sobrenadante obtido pelo cultivo das linhagens recombinantes, a qual não estava presente nas linhagens controle. A presença de outras duas bandas, uma com aproximadamente 10 kDa e outra com 6 kDa também só ocorreu nos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens recombinantes.

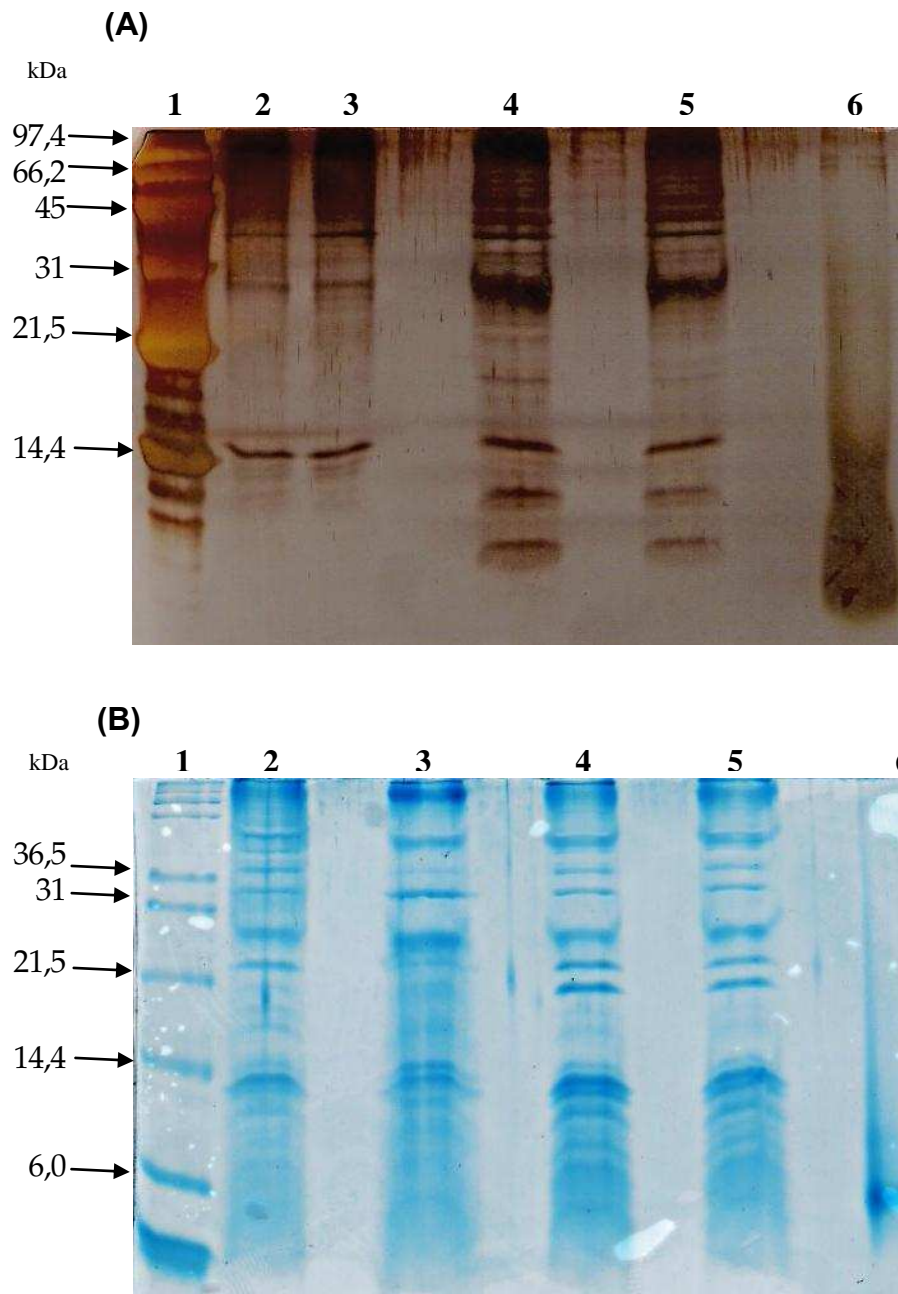


Figura 15 – Gel de eletroforese SDS-PAGE 16% (T) das proteínas totais secretadas pelas linhagens de *K. lactis* controle e recombinantes. Coloração pela prata (A); Coloração por *Coomassie blue* (B). Padrão de LMW (*Low Molecular Weight*) (*Bio-Rad*) (1); CBS2359 controle/ sem transformar (2); CBS2359 controle/ vetor vazio (3); CBS2359/pKLAC1-seq1 (4); CBS2359/pKLAC1-seq4 (5); SBm 7462 (6).

Para avaliar o perfil das proteínas glicosiladas secretadas, amostras dos sobrenadantes foram analisadas por SDS-PAGE e, em seguida, o gel foi tratado com o reativo Schiff. A Figura 16 mostra que o peptídeo com massa molecular de 21 kDa (em destaque) reagiu positivamente a esta coloração, sugerindo que este peptídeo corresponda ao SBm<sub>3</sub>7462 de 16 kDa glicosilado em um dos potenciais sítios de glicosilação disponíveis.

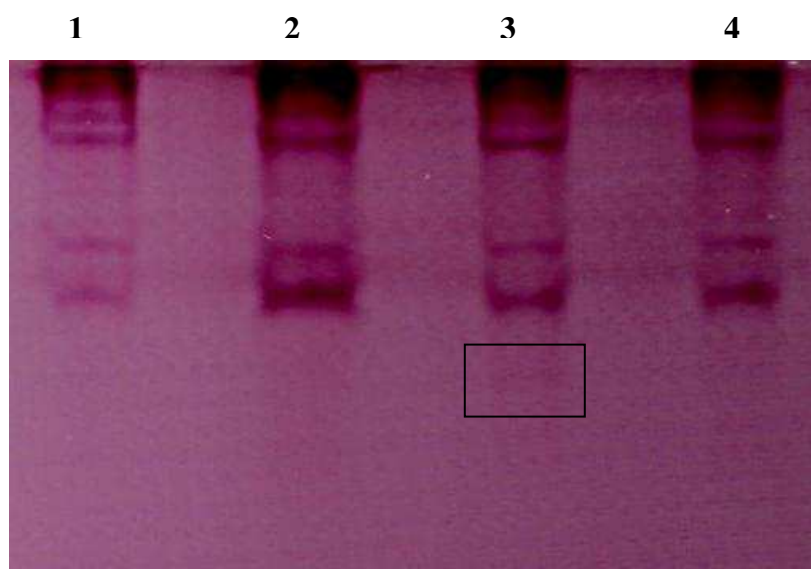


Figura 16 - Gel de eletroforese SDS-PAGE 16% (T) dos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens de *K. lactis*, recombinantes e controle, corado com reativo de Schiff para análise de glicoproteínas. CBS2359 controle/sem transformar (1); CBS2359 controle/vetor vazio (2); CBS2359/pKLAC1-seq1 (3); CBS2359/pKLAC1-seq4 (4).

#### 4.7 Detecção de rSBm<sub>3</sub>7462 e rSBm 7462 nos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens de *K. lactis* recombinantes em meio de indução

A síntese dos imunógenos, rSBm<sub>3</sub>7462 e rSBm 7462, pelas linhagens recombinantes de *K. lactis* foi verificada. Esta análise foi realizada com os sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens controle e recombinantes em meio de indução. Os resultados podem ser visualizados na Figura 17. As

proteínas, presentes nos sobrenadantes analisados, reagiram positivamente com o soro de coelho contendo Ig-G anti SBm 7462, indicando a presença dos imunógenos e não reagiram com o soro puro de coelho (controle negativo). As proteínas, presentes no sobrenadante obtido pelo cultivo da linhagem de *K. lactis* CBS2359 controle, não reagiram com nenhum dos soros utilizados.

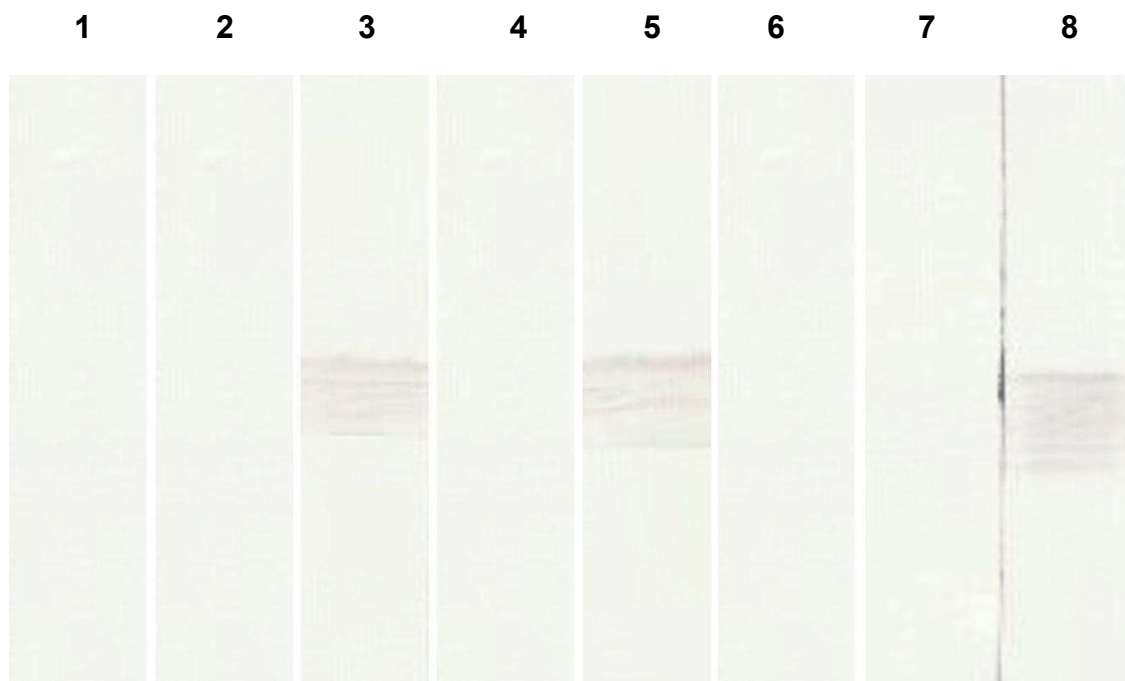


Figura 17 – Membranas de PVDF contendo sobrenadantes das culturas das linhagens de *K. lactis* controle e recombinantes. Essas membranas foram tratadas com soro de coelho anti-SBm 7462 (reação positiva) e soro puro de coelho (reação negativa) para averiguação da secreção dos imunógenos SBm<sub>3</sub>7462 e SBm 7462. CBS2359 controle/ Ig-G coelho anti-SBm 7462 (1); CBS2359 controle/ Ig-G Coelho (2); CBS2359-pKLAC1-seq1/ Ig-G coelho anti-SBm 7462 (3); CBS2359-pKLAC1-seq1/ Ig-G coelho (4); CBS2359-pKLAC1-seq4/ Ig-G coelho anti-SBm 7462 (5); CBS2359-pKLAC1-seq4/ Ig-G coelho (6); SBm 7462/ Ig-G coelho (7); SBm 7462/ Ig-G coelho anti-SBm 7462 (8).

## 5. DISCUSSÃO

As construções dos vetores de expressão pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4, foram confirmadas por análises de restrição e seqüenciamento. A seqüência de nucleotídeos que sinaliza o códon de parada, assim como a seqüência que codifica o sítio de clivagem da protease Kex foram mantidos. O cassete de integração, contendo as seqüências de interesse, foi obtido mediante clivagem do vetor de expressão com a enzima *SacII*. A transformação da linhagem de *K. lactis* CBS2359 com o cassete de expressão bem como a integração do mesmo direcionada ao *locus LAC4* foram realizadas com sucesso.

O cassete de integração utilizado neste trabalho possui regiões de homologia com o promotor *LAC4*, o que diminui, mas não anula a possibilidade de integrações ectópicas. A integração do cassete, no local esperado, foi confirmada pela detecção de um fragmento de DNA com aproximadamente 2 Kb em gel de agarose, realizado com os produtos de PCR do DNA total com os oligonucleotídeos 1 e 2. A análise das linhagens recombinantes de *K. lactis* por RT-PCR e a detecção do peptídeo, utilizando anticorpos monoclonais contra SBm 7462, comprovaram a transcrição e a expressão extracelular dos peptídeos.

A produção do peptídeo vacinal SBm 7462 pela linhagem recombinante de *K. lactis* CBS2359 foi realizada em duas fases. Na primeira fase, glicerol foi assimilado como fonte de carbono e convertido em biomassa. Glicerol foi utilizado como fonte de carbono, no lugar de glicose, para evitar que as linhagens recombinantes, ao serem transferidas para o meio de indução, estivessem com o promotor *LAC4* reprimido pela glicose, embora baixa repressão catabólica por este açúcar tenha sido detectado na maioria das espécies de *K. lactis*. Ao mesmo tempo, esta primeira fase objetivou maximizar a produção de biomassa uma vez

que, a produção da proteína de interesse está diretamente associada à quantidade de biomassa introduzida no meio de indução. Um meio de cultivo rico como YPD ou como o meio natural à base de soro de queijo propicia altas velocidades de crescimento para *K. lactis*, sendo possível alcançar biomassa de aproximadamente 25 mg (DO<sub>600</sub> de 60) (dados não mostrados). Contudo, esses meios podem comprometer a recuperação dos peptídeos de interesse devido à presença de peptídeos próprios. Definir um meio para máxima produção de biomassa é imprescindível para melhorar os rendimentos de rSBm 7462.

Na segunda fase, a indução da síntese do peptídeo em lactose 4% (p/v) mostrou que os parâmetros de indução também são importantes e podem refletir diretamente no rendimento. Duas condições de indução foram testadas: sem pulso adicional de lactose e com pulso de lactose, a cada 24 horas, durante 144 horas de indução. A concentração de proteínas extracelulares na segunda condição foi maior quando comparada com a condição sem pulso adicional de lactose. Com base nestes dados, pode-se inferir que o indutor é consumido com o tempo e que, a adição do mesmo, mantém a síntese e secreção de proteínas. Dessa forma, o pulso de lactose deve ser considerado como uma estratégia para aumentar o rendimento do peptídeo SBm 7462, além da otimização da produção de biomassa.

A impossibilidade de detectar com precisão a banda de interesse, 16 kDa, referente ao SBm<sub>3</sub>7462 por SDS-PAGE 16% (T) constituiu uma dificuldade na detecção do peptídeo secretado no meio. A *K. lactis* controle secreta uma proteína com mesma massa molecular que o peptídeo vacinal, 16 kDa, acarretando uma sobreposição de bandas. A presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 21 kDa, ausente nas linhagens controle, além da presença de outras duas bandas, uma com aproximadamente 10 kDa e outra com 6 kDa, sugeriu alguma modificação pós- traducional nos peptídeos de interesse.

A glicosilação foi sugerida pela constatação de um sítio de glicosilação, no caso de SBm 7462 e três sítios no caso de SBm<sub>3</sub>7462. Teoricamente, se os peptídeos sintetizados estivessem sendo glicosilados, a massa molecular aumentaria em, aproximadamente, 3 kDa para SBm 7462 e cerca de 9 kDa para a SBm<sub>3</sub>7462. Consequentemente, ter-se-ia um peptídeo em torno de 9 kDa de

massa molecular para SBm 7462 e outro em torno de 25 kDa para SBm<sub>3</sub>7462. Variações no padrão de glicosilação também seriam possíveis para SBm<sub>3</sub>7462. Por exemplo, se este peptídeo fosse glicosilado em apenas um sítio em vez dos três, ou em dois, produziria peptídeos com 19 e 22 kDa, respectivamente. Essas modificações explicariam a presença da banda de aproximadamente 21 kDa observada no SDS-PAGE, o que foi confirmado pela coloração com o reativo de Schiff. Com base neste resultado é possível inferir que esta banda representa o peptídeo SBm<sub>3</sub>7462 de 16 kDa glicosilado em apenas um dos sítios disponíveis. Observações semelhantes foram documentadas por Zhaoli *et al.* (2007), onde um peptídeo, de massa molecular teórica de 22 kDa, foi detectado em gel de SDS-PAGE, como duas bandas: uma de 30 kDa e outra de 18 kDa. A proteína de 30 kDa foi confirmada estar glicosilada e a de 18 kDa parcialmente clivada pela protease Kex2.

A presença de bandas menores observadas no gel SDS-PAGE também poderia ser explicada por quebras na estrutura dos peptídeos durante o procedimento de precipitação com acetona. Outra possível explicação para o perfil eletroforético observado seria o fato de que, as seqüências que codificam estes peptídeos, foram sintetizadas de forma a conter, nas regiões C-terminais e N-terminais, dois resíduos de cisteína, um em cada terminal. Esta estratégia foi adotada porque a maioria dos autores concordam que a resposta humoral induzida por peptídeos de 700 a 1500 daltons de massa molecular é de baixa intensidade, necessitando, portanto que sejam acoplados, aos peptídeos, proteínas carreadoras para aumentar a sua imunogenicidade (Van Regenmortel *et al.*, 1990). Contudo, a conjugação destes peptídeos com tais proteínas constitui um problema quanto à estabilidade e controle durante o desenvolvimento da vacina, e pode acarretar uma supressão do epítipo desejado pela ação das diferentes forças químicas da proteína incluída (Schutze *et al.*, 1985; Di John *et al.*, 1989; Schutze *et al.*, 1989).

Esses inconvenientes da conjugação do peptídeo a uma proteína induziram estudos visando-se aumentar a massa molecular sem a inclusão de um carreador à molécula (Jacob *et al.*, 1985; Del Giudice *et al.*, 1986; Borrás-Cuesta *et al.*, 1988;

Posnett *et al.*, 1988; Tam, 1988; Del Giudice *et al.*, 1990; Grillot *et al.*, 1990; Tam *et al.*, 1990; Troalen *et al.*, 1990; Patarroyo, 1994). Dentre as alternativas pesquisadas, encontra-se a polimerização dos peptídeos por oxidação de resíduos de cisteínas em seus terminais amino e carboxílicos (Patarroyo, 2002), estratégia adotada na construção do peptídeo SBm 7462. Dessa forma, levando-se em consideração que as pontes dissulfídicas presentes nas proteínas secretadas são formadas no retículo endoplasmático rugoso, estes peptídeos poderiam formar polímeros de diversas formas e tamanhos dentro desta organela, o que também explicaria o perfil eletroforético observado, uma vez que as ligações dissulfídicas podem ocorrer entre resíduos de cisteínas de uma mesma ou de diferentes cadeias polipeptídicas.

Estudos realizados com outros microrganismos recombinantes produtores de peptídeos heterólogos demonstram que aqueles são capazes de secretar peptídeos em sua conformação nativa de modo a desempenhar suas funções corretamente. Um elevado nível de expressão do peptídeo heterólogo interferon alpha2b (hIFN- $\alpha$ 2b) humano de 18,8 kDa foi alcançado em *P. pastoris*. SDS-PAGE e *Western blotting* demonstraram que hIFN- $\alpha$ 2b foi secretado no meio de cultura e obteve-se 298 mg de proteína por litro de sobrenadante após a purificação (Linmei *et al.*, 2007). Um antimicrobiano híbrido de 3 kDa também foi secretado de forma ativa por *P. pastoris* (Fengliang *et al.*, 2006). Jinshu e colaboradores em 2006 desenharam uma vacina anti-hormônio de liberação da gonadotrofina (GnRH) capaz de estimular uma forte imunogenicidade, quando inoculados em camundongos fêmeas. Esta vacina foi produzida em corpos de inclusão em *E. coli*. Todos estes resultados demonstram o interesse cada vez maior de expressar peptídeos de importância terapêutica em microrganismos. Os resultados obtidos até o momento com *P. pastoris*, *E. coli* e mesmo *K.lactis* são promissores. Este trabalho é pioneiro no que diz respeito à produção de um peptídeo “quimérico” com potencial imunogênico de interesse agropecuário por meio da levedura *K.lactis*.

## 6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1- Os vetores de expressão, pKLAC1-seq1 e pKLAC1-seq4, foram corretamente construídos e confirmados por seqüenciamento;
- 2- A integração dos cassetes de expressão ocorreu por recombinação homóloga no *locus LAC4* do genoma das linhagens hospedeiras de *K. lactis*;
- 3- Os cassetes integrados foram reconhecidos pela maquinaria de transcrição das linhagens hospedeiras e corretamente transcritos;
- 4- Os peptídeos foram secretados para o meio, sendo reconhecidos por anticorpos monoclonais anti-SBm 7462;
- 5- Não foi detectada atividade proteolítica nos sobrenadantes obtidos pelo cultivo das linhagens recombinantes;
- 6- A adição de lactose durante a fase de indução deve ser considerada como uma estratégia para aumentar o rendimento dos peptídeos SBm<sub>3</sub>7462 e SBm 7462, bem como a otimização da obtenção de biomassa.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovaram que a obtenção de linhagens recombinantes de *K. lactis*, secretoras de SBm 7462, foi realizada com sucesso.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT J.J. VAN OUYEN, PETER DEKKER, MICHAEL HUANG, MAURIEN M. A. OLSTHOORN, DENISE I. JACOBS, PAUL A. COLUSSI & CHRISTOPHER H. TARON (2006). Heterologous protein production in yeast *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, 20: 1-12.

ALVES-BRANCO F.P., ECHEVARRIA F.A.M. & SIQUEIRA A.S. (1983). Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. **Comunicado Técnico da EMBRAPA**, 1: 1-4.

ANDREOTTI, R., GOMES, A., MALAVAZI-PIZA, K. C., SASAKI, S. D., SAMPAIO, C. A. M., TANAKA, A. S. (2002). BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, 2: 557 – 563.

ANTEBI, A., FINK, G. R. (1992). The yeast Ca<sup>+2</sup>-ATPase homologue, *PMR1*, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. **Molecular Biology of the Cell**, 3: 633-654.

BAO, W. G., FUKUHARA, H., (2001). Secretion of human proteins from yeast: stimulation by duplication of polyubiquitin and protein disulfide isomerase genes in *Kluyveromyces lactis*. **Gene**, 272: 103-110.

BAXBY D. E. J., WILLIAM W. (1979). And the origins of vaccinia virus. **Journal of the history of medicine and allied sciences**, 34(2):134–162.

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. (1998). Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *R. (B.) microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Biochemical Molecular Biology**, 28: 581 – 589.

BEHBEHANI, A. M. (1983). The smallpox story: life and death of an old disease. **Microbiology Review**, 47(4): 455–509.

BIANCHI, M.M., FALCONE, C., CHEN, X.J., WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M., FRONTALI, L., FUKUHARA, H. (1987). Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1,6 µm circular plasmid pKDI. **Current Genetic**, 12: 185-192.

BLONDEAU K., BOUTUR, O., BOZE, H., JUNG, G., MOULIN, G., GALZY, P. (1994). Development of high-cell-density fermentation for heterologous interleukin 1 beta production in *Kluyveromyces lactis* controlled by the PHO5 promoter. **Applied Microbiology Biotechnology**, 41(3): 324 – 329.

BORRAS-CUESTA, F., FEDON, Y., PETIT-CAMURDAN (1988). A. Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerisation. **European Journal of Immunology**, 18 (2): 199-202.

CEREGHINO J., L., CREGG, J., M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Review**, 24: 45–66.

CHEN, X., J. (1996). Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. **Gene**, 172: 131–136.

CHEN, X., J., GAO, B., SHI, W., LI, Y. (1992). Expression and secretion of human interferon alpha A in yeast *Kluyveromyces lactis*. **Acta Biochemical Biophysm**, 19: 284-288.

CHEN, X., J., SALIOLA, M., FALCONE, C., BIACHINI, M., M., FUKUHARA, H. (1986). Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces drosophilarum*. **Nucleic Acids Research**, 14: 4471-4481.

CHOU, P. Y., FASMAN, G. D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Advances in Enzymology and Related Areas Molecular Biology**, 47: 45 – 148.

COLUSSI. P., A., TARON, C., H. (2005). *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in yeast. **Applied and Environmental Biotechnology**, 71: 7092-7098.

CORDOVÉS C.O. (1999). Carrapato: controle ou erradicação. **Alegrete: Editora Gralha**, 130 p.

DA SILVA VAZ-JR, I. D. S., LOGULLO, C., TERMIGNONI, C., DE OLIVEIRA, P. L., MASUDA, A. (2004). Caracterização de novos antígenos em *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13 (1): 146-149.

DE LA FUENTE, J., KOCAN, K. M. (2003). Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. **Expert Review of Vaccines**, 2: 583-593.

DEL GIUDICE, G., COOPER, J. A., MERINO, J., VERDINI, A. S., PESSI, A., TOGNA, A. R., ENGERS, H. D., CORRADIN, G., LAMBERT, P. H. (1986). The antibody response in mice to carrier-free synthetic polymers of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite repetitive epitope is I-A<sup>b</sup>-restricted: possible implications for malaria vaccines. **Journal of Immunology**, 137 (9): 2952-2955.

DEL GIUDICE, G., TOUGNE, C., LOUIS, J. A., LAMBERT, P. H., BIANCHI, E., BONELLI, F., CHIAPPINELLI, L., PESSI, A. (1990). A multiple antigen peptide from the repetitive sequence of the *Plasmodium malariae* circumsporozoite protein

induces a specific antibody response in mice of various H-2 haplotypes. **European Journal of Immunology**, 20 (7): 1619-1622.

DI JOHN, D., WASSERMAN, S., TORRES, J. R., CORTESIA, M. J., MURILLO, J., LOSONSKY, G., HERRINGTON, D. A., STURCHER, D., LEVINE, M. M. (1989). Effect of priming with carrier on response to conjugate vaccine. **Lancet**, 2 (8677): 1415-1418.

DUJON, B., SHERMAN, D., FISHER, G. (2004). Genome evolution in yeasts. **Nature**, 430: 35-44.

DÜRR, G., STRAYLE, J., PLEMPER, R., ELBS, S., KLEE, S.K., CATTY, P., WOLF, D.H., RUDOLPH, H.K. (1998). The *medial*-Golgi ion pump *PMR1* supplies the yeast secretory pathway with  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mn}^{+2}$  required for glycosylation, sorting, and endoplasmatic reticulum-associated protein degradation. **Molecular Biology of the Cell**, 9: 1149-1162.

FALCONE, C., SALIOLA, M., CHEN, X.J., FRONTALI, L., FUKUHARA, H. (1986). Analysis of a 1.6-micron circular plasmid from the yeast *Kluyveromyces drosophilorum*: structure and molecular dimorphism. **Plasmid**, 15: 248–252.

FARIAS N.A.R., GONZALES J.C. & SAIBRO J.C. (1986). Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 21: 1313-1320.

FENG, Y., M., ZHANG, B., Y., ZHANG, Y., S., HIROSHI, F. (1997). Secretory expression of porcine insulin precursor in *Kluyveromyces lactis* and its conversion into human insulin. **Acta Biochemical Biophysm**, 29: 129-134.

FENGLIANG J., XIAOXIA X., LIEXI WANG., WENQING Z. AND DEXIANG G. (2006). Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1–8)–magainin2(1–

12) in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, 50 (2): 147-156.

FLEER, R., YEH, P., AMELLAL, N., MAURRY, I., FOURNIER, A., BACCHETA, F., BADUEL, P., JUNG, G., L'HÔTE, H., BECQUART, J., FUKUHARA, H., MAYAUX, J.F. (1991a). High-level of secretion correctly processed recombinant human interleukin-1 $\beta$  in *Kluyveromyces lactis*. **Gene**, 107: 285-295.

FLEER, R., YEH, P., AMELLAL, N., MAURRY, I., FOURNIER, A., BACCHETA, F., BADUEL, P., JUNG, G., L'HÔTE, H., BECQUART, J., FUKUHARA, H., MAYAUX, J.F. (1991b). Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. **Bio/Technology**, 9: 968- 974.

FOIL, L.D., COLEMAN, P., EISLER, M., FRAGOSO-SANCHEZ, H., GARCIA-VAZQUEZ, Z., GUERRERO, F. D., JONSSON, N. N., LANGSTAFF, I.G., LI, A.Y., MACHILA, N., MILLER, R.J., MORTON, J., PRUETT, J. H., TORR, S. (2004). Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, 125: 163 – 181.

FRISCH, J. E., O'NEILL, C. J., KELLY, M. J. (2000). Using genetics to control cattle parasites – the Rockhampton experience. **International Journal for Parasitology**, 30: 253 – 264.

GARCIA-GARCIA, J.C., SOTOT, A., NIGRO, F., MAZZA, M., JOGLAR, M., HECHEVARRIA, M., LAMBERTI, J., DE LA FUENTE, J. (1998). Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastori*. **Vaccine**, 16:1053 – 1055.

GELLISSEN, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, 54: 741–750.

GELLISSEN, G., HOLLENBERG, C. P. (1997). Application of yeast in gene expression studies, a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorfa* and *Kluyveromyces lactis*. A review. **Gene**, 190: 87-97.

GEMMIL, T.R. & TRIMBLE, R.B. (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. **Acta Biochemical Biophysm**, 1426: 227-237.

GERNGROSS U. T. AND WILDT S. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. **Microbiology**, 3: 119-128.

GONÇALVES P.M., PASSOS L. M. F & RIBEIRO M. F. B. (1999). Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, 82: 11-17.

GONZALES J.C. (1975). O controle do carrapato bovino. **Porto Alegre: Sulina**, 104 p.

GONZÁLEZ-SISO M.I., FREIRE-PICOS M.A., RAMIL E., GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ M., TORRES A. R., CERDÁN M.E. (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. **Enzyme and Microbiology Technology**, 26: 699-705.

GRILLOT, D., MICHEL, M., MÜLLER, I., TOUGNE, C., RÈNIA, L., MAZIER, D., CORRADIN, G., LAMBERT, P. H., LOUIS, J. A., DEL GUIDICE, G. (1990). Immune responses to defined epitopes of the circumsporozoite protein of the murine malaria parasite, *Plasmodium yoelli*. **European Journal of Immunology**, 20 (6): 1215-1222.

HARMSSEN, M.M., LANGEDIJK, A.C., VAN TUINEN, E. GEERSE, R.H., RAUÉ, H.A., MAAT, J. (1993). Effect of a *PMR1* disruption and different signal sequences

on the intracellular processing and secretion of *Cyamopsis tetragoloba*  $\alpha$ -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, 125: 115-123.

HILL J., IAN, K.A., DONALD, G., DAVID E., GRIFFITHS. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. **Nucleic Acids Research**, 19: 5791.

HOOP, T. P., WOODS, K. R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America U.S.A.**, 78(6): 3824 – 3828.

HORN S.C. & ARTECHE C.C.P. (1985). Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A hora Veterinária**, 23: 12-32.

HSIEH,H., DA SILVA. N. A. (1998). Partial-pKD1 plasmids provide enhances structural stability for heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 49: 411-416.

HUA, Z., LIANG, X., ZHU, D. (1994). Expression and purification of a truncated macrophage colony stimulating factor in *Kluyveromyces lactis*; **Biochemistry and Molecular Biology International**, 34: 419 – 27.

INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. **Gene**, 96: 23 – 28.

IWATA, T., TANAKA, R., SUETSUGU, M., ISHIBASHI M., TOKUNAGA, H., KIKUCHI, M., TOKUNAGA, M. (2004). Efficient secretion of human lysozyme from the yeast, *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, 26: 1803–1808.

JACOB, C. O., ARNON, R., SELA, M. (1985). Effect of carrier on the immunogenic capacity of synthetic cholera vaccine. **Molecular Immunology**, 22 (12): 1333-1339.

JINSHU X., ZHENG Z., PENG D., WENJIA L., YIN Z., JIE W., ZHUOYI H., ROUEL S AND JINGJING L. (2006). Cloning, expression, and purification of a highly immunogenic recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) chimeric peptide. **Protein Expression and Purification**, 50 (2): 163-170.

JOHNSTON L.A.Y., KEMP D.H. & PEARSON R.D. (1986). Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology**, 16: 27-34.

JONSSON N.N., MAYER D.G. & GREEN P.E., (2000). Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, 88: 79-92.

JURETZEK, T., LE DALL, M., T., MAUERSBERGER, R., GAILLARDIN, C., BARTH, G., NICAUD, J., M. (2001). Vectors of gene expressions and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, 18: 97–113.

KAPITANY, R. A. & ZEBROWSKI, E. (1973). A high resolution PAS stain for polyacrilamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, 56: 361-369.

KUNITZ, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. II - General properties. **Journal of Genetics and Physiology**, 30: 291-310.

KYTE, J., DOOLITTLE, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophathic character of a protein. **Journal Molecular Biology**, 157(1): 105 – 132.

LEAL, A. T., POHL, P. C., FERREIRA, C. A. S., NASCIMENTO-SILVA, M. C. L., SORGINE, M. H. F., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E. (2006a). Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk

pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, 45: 107-114.

LEAL, A. T., SEIXAS, A., POHL, P. C., FERREIRA, C. A. S., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E., TERMIGNONO, C., DA SILVA VAZ Jr., MASUDA, A. (2006b). Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 114: 341-345.

LINMEI S., DONGMING W., WEIGUANG C., LUZI C. (2007). Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 54: 220–226.

MARTINEZ. E., MORALES, J., AGUIAR, J., PINEDA, Y., IZQUIERDO, M., FERBEYRE, G. (1992). Cloning and expression of hepatitis B surface antigen in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, 14: 83–86.

MORLINO G. B., TIZZANI L., FLEER R., FRONTALI L & BIANCHI M.M. (1999). Inducible amplification of gene copy number and heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 4808-4813.

MÜLLER, S., SANDAL, T., KAMP-HANSEN, P., DALBOGE, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosacchomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. **Yeast** 14: 1267– 1283.

NALIN, D. R. (2002). Evidence based vaccinology. **Vaccine**, 20: 1624 – 1630.

NARI A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, 57: 153-165.

NOLAN J. (1985). Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, 18: 155-166.

OLIVEIRA, R. C. (1998). Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887). **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 72p.

PATARROYO, J. H. (1994). Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Revista de Patologia Tropical**, 23: 145-146.

PATARROYO J. H., PORTELA R. W., DE CASTRO R. O., COUTO PIMENTEL J., GUZMAN F., PATARROYO M. E., VARGAS M. I., PRATES A. A., DIAS MENDES M. A. (2002). Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 88: 163-172.

PINHEIRO R., BELO I., MOTA M. (2000). Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces lactis* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 756-762.

PIONTEK, M., HAGEDORN. J., HOLLENBERG, C.P., GELLISSSEN, G., STRASSER, A.W. (1998). Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 50: 331-338.

POSNETT, D. N., MCGRATH, H., TAM, J. P. (1988). A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. **Journal Biology Chemistry**, 263 (4): 1719-1725.

PRUETT J.H. (1999). Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. **International Journal for Parasitology**, 29: 25-32.

PRUETT, J. H., UNTALAN, P. M., DAVEY, R. B. (2006). Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. **Veterinary Parasitology**, 140:148-157.

RAY, M. K., UMA DEVI, K., SESHU KUMAR, G., SHIVAJI, S. (1992). Extracellular protease from the Antarctic yeast *Candida humicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, 58: 1918-1923.

ROBIN, S., PETROV, K., DINTINGER, T., KUJUMDZIEVA, A., TELLIER, C., DION, M. (2003). Comparison of three microbial hosts for expression of an active catalytic scFv. **Molecular Immunology**, 39: 729-738.

ROMANOS, M. A., SCORER C. A. CLARE, J. J. (1992). Foreign Gene Expression in Yeast, a Review. **Yeast**, 8: 423-488.

RÖSEL, H., KUNZE, G. (1998). Integrative transformation of the dimorphic yeast *Arxula adenivorans* LS3 based on hygromycin B resistance. **Current Genetic**, 33: 157–163.

RUDOLPH, H.K., ANTEBI, A. FINK, G.R., BUCKLEY, C.M., DORMAN, T.E., LEVITRE, J., LANCE, S.D., MAO,J., MOIR, D.T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of  $Ca^{+2}$ - ATPase family. **Cell**, 58:133-145.

SALIOLA, M., MAZZONI, C., SOLIMANDO, N., CRISA, A., FALCONE, C., JUNG, G., FLEER, R. (1999). Use of the KIADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 53-60.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning. **A laboratory manual**. 2ed. Cold spring harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, s. n.p.

SANGSTER, N. C. (2001). Managing parasiticidaea resistance. **Veterinary Parasitology**, 98: 89 – 109.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977). DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. USA, 74: 5463-5467.

SCHAFFRATH R., BREUNIG K.D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Fungal Genetics and Biology**, 30: 173-190.

SCHUTZE, M. P., DERIAUD, E., PRZEWLOCKI, G., LECLERC, C. (1989). Carrier-induced epitopic supression is initiated through clonal dominance. **Journal of Immunology**, 142 (8): 2635-2640.

SCHUTZE, M. P., LECLERC, C., JOLIVET, M., AUDIBERT, F., CHEDID, L. (1985). Carrier-induced epitopic supression, a major issue for future synthetic vaccines. **Journal of Immunology**, 135 (4): 2319-2322.

SEIFERT G.W., SPRINGELL P.H. & TATCHELL R.J. (1968). Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Parasitology**, 58: 415-430.

SHARP, P. J., MCINERNEY, B. V., SMITH, D. R., TURNBULL, L. F., KEMP, D. H., RAND, K. N., COBON, G. S. (1990). Chromatography and generation specific antisera to synthetic peptides from a protective *B. microplus* antigen. **Journal Chromatography**, 512: 189-202.

SILVERSTEIN A.M., MILLER G. (1981). History of immunology. The royal experiment on immunity: 1721-1722. **Cellular Immunology**, 61(2):437–447.

SINGH, N. K. GHOSH, S. (2003). Experimental immunization of crossbred cattle with glycoproteins isolated from the larvae of *Hyalomma anatolicum* and *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, 31: 297 – 314.

SMITH, D. R., HUNGERFOD, J., WILLADSEN, J. (1995). The development of TickGard – a commercial vaccine against the cattle tick *R. (B.) microplus*. **Indooroopilly: Biotec Australia-CSIRO**, 17 p.

SMITH, P.K., KROHN R. I., HERMANSON G.T., MALLIA A. K., GARTNER F. H., PROVENZANO M. D., FUJIMOTO E. K., GOEKE N. M., OLSON B. J., AND KLENK D.C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, 150: 76-85.

SPOUGE, J. L., GUY, H.R., CORNETTE, J. L., MARGALIT, H., CEASE, K., BERZOFSKY, J. A., DELSI, C. (1987). Strong conformational propensities enhance T cell antigenicity. **Journal of Immunology**, 138 (1): 204-212.

STARK MJ MILINER JS (1989). Cloning and analysis of the *Kluyveromyces lactis* TRO1 gene: a chromosomal locus flanked by genes encoding inorganic pyrophosphatase and histone H3. **Yeast**, 5: 35-50.

STEFAN WILDT AND TILLMAN U. GERNGROSS (2005). The humanization of N-Glycosylation pathways in yeast. **Nature Reviews Microbiology**, 3: 119-128.

SUTHERST R.W., JONES R.J., SCHNITZERLING H.J. (1982). Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, 295: 320-321.

SUTHERST R.W., MAYWALD G.F., KERR J.D. & SIEGEMAN D.A. (1983). The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**, 34: 317-327.

SWENNEN, D., PAUL, M., F., VERNIS, L., BECKRICH, J., M., FOURNIER, A., GAILLARDIN, C. (2002). Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*. **Microbiology**, 148: 41-50.

SWINKELS, B.W., VAN OUYEN, A., BONEKAMP, F. (1993.). The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 64: 187-201.

TAM, J. P. (1988). Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America U.S.A.**, 85 (15): 5409-5413.

TAM, J. P., CLAVIJO, P., LU, Y. A., NUSSENZWEIG, V., NUSSENZWEIG, R., ZAVALA, F. (1990). Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. **Journal of Experimental Medicine**, 171 (1): 299-306.

TAYLOR, M. A. (2001). Recent Developments in Ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, 161: 253-268.

TRIMNELL, A. R., DAVIES, G. M., LISSINA, O., HAILS, R. S., NUTTAL, P. A. (2005). A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. **Vaccine**, 23: 4329-4341.

TROALEN, F., RAZAFINDRATSITA, A., PUISIEUX, A., VOELTZEL, T., BOHUON, C., BELLET, D., BIDART, J. M. (1990). Structural probing of human lutropin using

antibodies raised against synthetic peptides by classical and multiple antigen peptide system approaches. **Molecular Immunology**, 27 (4): 363-368.

UCCELLETTI, D., FARINA, F., MANCINI P. & PALLESCHI, C. (2004). *KIPMR1* inactivation and calcium addition enhance secretion of non-hyperglycosylated heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Biotechnology**, 109: 93-101.

UCCELLETTI, D., FARINA, F., MORRONE, S., PALLESCHI, C. (1999b). The *KIPMR1* gene of *Kluyveromyces lactis* encodes for a P-type  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase. **Yeast**, 15: 593-599.

VAN DER BERG, J. VAN DER LAKEN, K., VAN OUYEN A. J. RENNIERS, T .*et al.* (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene Expression. Expression and Secretion of Prochymosin. **Biotechnology**, 8: 135-139.

VAN REGENMORTEL, M. H. V., BRIAND, J. P., MULLER, S., PLAUE, S. (1990). Synthetic polypeptides as antigens. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**, 19; Amsterdam: ELSEVIER, 227p.

WALKER D.C. (2006). Eighteenth 'Biology of *Kluyveromyces lactis*' meeting, Bratislava, Slovakia, 6 August (2005). **FEMS Yeast Research**, 6: 141.

WÉSOLOWSKI-LOUVEL, M., BREUNIG K., D., FUKUHARA, H. (1996). *Kluyveromyces lactis*. In: Wolf K (ed) Genetics, biochemistry, and molecular biology of non-conventional yeasts. **Springer, Berlin Heidelberg New York**, 139–201.

WILLADSEN, P. (1997). Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, 71: 209-222.

WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S., GOUGH, J. M. (1989). Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *R. (B.) microplus*. **Journal of Immunology**, 143(4): 1346-1351.

WILLADSEN, P., SMITH, D., COBON, G., MCKENNA, R. V. (1996). Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**, 18: 241-246.

YOUNG A.S. & MORZARIA S.P. (1986). Biology of *Babesia*. **Parasitology Today**, 2: 211-219.

ZEEMAN A. M., LUTTIK MAH, THIELE C., VAN DIJKEN JP., PRONK JT & STEENSMA HY (1998). Inactivation of the *Kluyveromyces lactis* KIPDA1 gene leads to loss of pyruvate dehydrogenase activity, impairs growth on glucose and triggers aerobic alcoholic fermentation. **Microbiology**, 144: 3437-3446.

ZEEMAN A. M. & STEENSMA HY (2003). The acetyl co-enzyme A synthase genes of *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, 20: 13-20.

ZHAOLI C., HONG C., XIN W., XIAOLI M., BINGREN H. (2007). Expression, purification, and characterization of secreted recombinant human insulin-like growth factor-binding protein-6 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression & Purification**, 52: 239-248.