

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

Felipe Senne de Oliveira Lino e Lígia Ely Morganti Ferreira Dias
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Centro de Biologia Molecular

INTRODUÇÃO

A endostatina FIG.1 é uma proteína de ação angiostática, que inibe a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes (angiogênese), processo necessário para crescimento de tumores sólidos. Estudos demonstraram que a administração de endostatina em animais com tumores foi eficiente no tratamento, promovendo até a regressão dos tumores sólidos em crescimento [1]. Porém estudos clínicos em humanos não obtiveram bons resultados, apesar da administração se altas doses desta proteína.

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho será: Obter proteínas de fusão apresentando as vantagens da endostatina de especificidade pelas células endoteliais ativadas, e maior grau de apoptose após internalização. Essas proteínas de fusão deverão se apresentar mais efetivas no tratamento de tumores em camundongos, sem apresentação de efeitos colaterais graves.

METODOLOGIA

Após a clonagem do gene eucarioto da endostatina em um vetor de expressão em *E. coli* foram realizadas reações de mutagênese sítio-dirigida [2], a fim de se modificar a estrutura da endostatina inserindo-se em sua estrutura sequências de peptídeos pró-apoptóticos Bax (endostatina-Bax, endostatina-Bax-endostatina) e Bak (endostatina-BaK).

RESULTADOS

Foi construído um vetor de expressão em *E. coli* pET-20b(+) [3, 4] contendo o gene da endostatina, além de vetores contendo as

seqüências da endostatina com as mutações Endo-Bax FIG.2, Endo-Bak e Endo-Bax-Endo FIG.3. Em relação à expressão das proteínas, ainda não se obteve resultados satisfatórios.

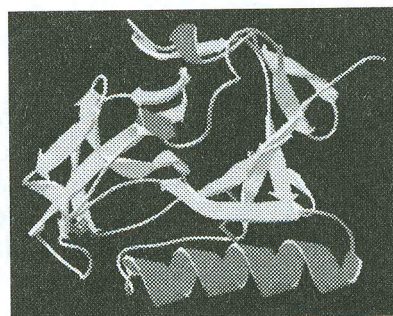


FIGURA 1 - Modelo 1K0E da Endostatina mostrando as α -hélices em vermelho, as folhas beta em amarelo e as pontes dissulfídicas em verde.

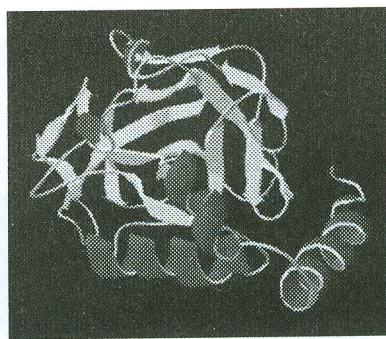


FIGURA 2 - Modelo da fusão C-terminal do fragmento bax com Endostatina. Em azul o peptídeo bax. Em roxo a α -hélice parte da região C-Terminal do domínio endostatina e o linker de glicinas. Em amarelo as folhas β e em vermelho a α -hélice.

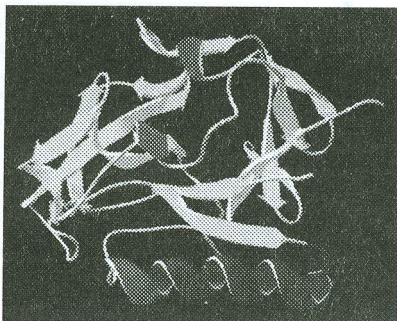


FIGURA 3 - Em azul é mostrado o segmento correspondente ao fragmento de BAX com 16 resíduos, inserido na estrutura do domínio da endostatina. Os dois resíduos da α -hélice da endostatina são indicados em vermelho.

CONCLUSÕES

Concluimos que foi possível construir o vetor de expressão e sintetizar as proteínas de fusão desejadas, através de análise dos seqüenciamentos do material genético dos vetores dos clones isolados (dado não mostrado) e da análise por Western blot e gel SDS-PAGE, em relação à expressão de proteínas recombinantes. Resta ainda obter clones positivos para os mutantes endo-bax-endo, além de resultados satisfatórios em relação à expressão da proteína e testar sua eficiência *in vivo*.

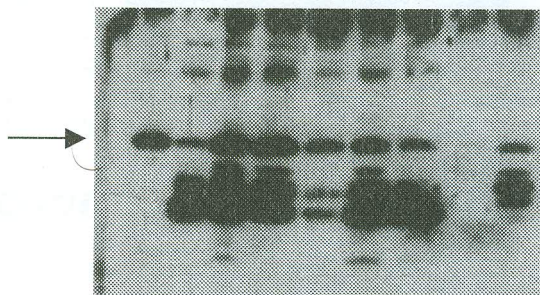


FIGURA 4 - Western blot mostrando a expressão da endostatina e mutantes (endo-Bax e endo-Bak) A seta indica as bandas no tamanho da endostatina (20 Kda).

Vinculado ao projeto: "Estudo de atividade antiangiogênica de proteínas de fusão endostatina-peptídeos com atividade apoptótica".

Processo nº 03/07949-4

Coordenadora: Dra. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] O'Reilly, M.S.; Holmgren, L.; Shing, Y.; Chen, C.; Rosenthal, R.A.; Moses, M.; Lane, W.S.; Cao, Y.; Sage, E.H. and Folkman, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-28, (1994).
- [2] Kunkel, T.A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 82: 488-92, (1985).
- [3] Sambrook, J. and Russel, D.W. in: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York. (2001)
- [4] Studier, F.W.; Rosenberg, A.H.; Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. Use of T7 RNA Polymerase to direct expression of cloned genes *Meth. Enzymol* 185:60-89, (1990).

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/PIBIC