

Lopez, IMR^{1,2}; Souza, CJH³; Franco, MM; Rumpf, R¹; Melo, EO¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB Final W5 Norte, Brasília- DF, 70770-900. ²Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900. ³Embrapa Pecuária Sul, BRI53, Km 595, Bagé-RS, 96400-970.

Clonagem e expressão das regiões gênicas codificadoras do peptídeo maduro dos hormônios BMP15 e GDF9 de clones bovinos

Os genes BMP15 e GDF9 codificam hormônios peptídicos que pertencem uma família de reguladores de crescimento e diferenciação (família TGF- β). O GDF9 e BMP15 são produzidos e secretados pelos ovócitos, e atuam de forma parácrina estimulando o crescimento e diferenciação das células somáticas dos folículos ovarianos. Esses hormônios, assim como outros membros da família TGF- β , são transcritos como pré-próproteínas compostas por um peptídeo sinal, um grande pró-peptídeo e a região madura. Após a remoção do peptídeo sinal, o pró-peptídeo passa por uma clivagem que o separa da região madura bioativa. Recentemente demonstrou-se que, assim como nos demais membros da família TGF- β , a dimerização dos pró-peptídeos é necessária para que a clivagem ocorra e os hormônios sejam secretados. Entretanto, BMP15 e GDF9 não apresentam a quarta cisteína, de um conjunto conservado de sete resíduos de cisteínas, relacionada à formação de pontes dissulfeto e responsáveis pela formação de dímeros, presentes nos demais membros da família TGF- β . Evidências têm demonstrado que GDF9 e BMP15 formam homodímeros e heterodímeros entre si. O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar o peptídeo maduro dos hormônios BMP15 e GDF9 a partir do DNA de bovinos. As sequências codificadoras do peptídeos maduros foram clonadas a partir de PCR do exon2 do DNA genômico extraído do sangue dos clones bovinos Vitória (Simental) e Lenda (Holandesa) da EMBRAPA. O fragmento amplificado foi clonado utilizando-se duas estratégias, o BMP15 foi inicialmente clonado no vetor pGEM-Teasy (Promega) e posteriormente transferido para os vetores de expressão pRSET (Invitrogen) e pET21 (Novagen). O GDF9 foi inserido diretamente no vetor pET21 por meio de sua amplificação com primers contendo sítios de restrição desenhados para clonagem diretamente no vetor de expressão. Ambos peptídeos foram expressos na linhagem BL21 de E. coli, produzindo peptídeos de aproximadamente 19kDa, correspondente ao esperado para as proteínas de fusão. Os peptídeos expressos foram purificados a partir de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e injetados em galinhas para produção de anticorpos. Também foi observado o comportamento de ovoposição dos animais imunizados, já que é esperado que haja uma reação cruzada entre os anticorpos produzidos contra as proteínas bovinas e os hormônios sintetizados nos ovários das galinhas imunizadas. Os anticorpos produzidos serão empregados no estudo da expressão dos hormônios GDF9 e BMP15 em ovinos que sejam portadores de mutações (SNPs) nesses genes e apresentem um fenótipo de ovulação múltipla. ■