

Produção dos Hormônios do Crescimento e Pró-Insulina Humana em Plantas Transgênicas de Milho.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

De Lucca, P.C.1, Sousa, S.M.1, Agostinho, C.F.1, Carneiro, A.2, Paiva, E.2, Carneiro, N.P.2, Carvalho, C.H.S.2, Kiyota, E.1, Abbehausen, C.1, Paniago, M.D.G.1, Jungmann, L.1 e Leite, A.1

1 - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, UNICAMP, Campinas - SP - CP6010,
2 - Centro Nacional de Pesquisa e Milho e Sorgo, EMBRAPA, Sete Lagoas - MG - CP151
pdelucca@unicamp.br

Palavras-Chaves: plantas transgênicas, proteínas heterólogas, milho, pró-insulina e hormônio do crescimento humano

Introdução

Plantas como Biorreatores para produção de proteínas Heterólogas

A agricultura moderna vem sendo transformada pela introdução de plantas transgênicas com propriedades agronômicas incorporadas. Mais recentemente, estas plantas têm sido testadas como biorreatores na produção de produtos industriais, como óleos, carboidratos e proteínas, e de produtos farmacêuticos, como vacinas, anticorpos e hormônios (Giddings et al., 2000; Daniell et al., 2001; Giddings, 2001; Leite, 2001).

O emprego de plantas transgênicas na produção de proteínas heterólogas de interesse farmacêutico e industrial é viável. A capacidade das plantas em promover o processamento pós-traducional representa uma grande vantagem em relação aos sistemas de expressão estabelecidos em bactérias. As plantas, além de permitirem a produção de proteínas com estrutura similar a das proteínas nativas, apresentam baixo custo de produção quando comparados com outros sistemas de expressão eucarióticos como fungos, cultura de células de insetos e de mamíferos, ou ainda animais transgênicos (Whitelam et al., 1993, Moloney & Holbrook, 1997). As sementes apresentam tecidos especializados na estocagem de proteínas, onde naturalmente são armazenadas por longos períodos em condições normais. Além disso, a extração e purificação de proteínas heterólogas produzidas em sementes não requer processos complexos como aqueles empregados nos sistemas de procariotos.

Hormônios Recombinantes

A insulina é um hormônio responsável pelo controle do nível de açúcar no sangue. É produzido no pâncreas como preproinsulina que é convertida em pró-insulina através da retirada do peptídeo sinal e finalmente processado em insulina madura, através da ação de peptidases que retiram o peptídeo C (figura 1). Atualmente a insulina comercial é obtida de suínos, bovinos e de bactérias recombinantes.

O hormônio de crescimento humano (hGH) é produzido pela glândula tireóide, sendo responsável pelo controle da divisão celular. Quando sua síntese não acontece em níveis satisfatórios ocorre o nanismo. Atualmente este hormônio só é obtido a partir de bactérias transgênicas que produzem uma proteína não processada. O processamento final é feito através de repetidas desnaturações e purificações, que torna este hormônio extremamente caro.

Este trabalho objetiva estabelecer biorreatores para produção dos hormônios pró-insulina e do crescimento humano em sementes de milho transgênico.

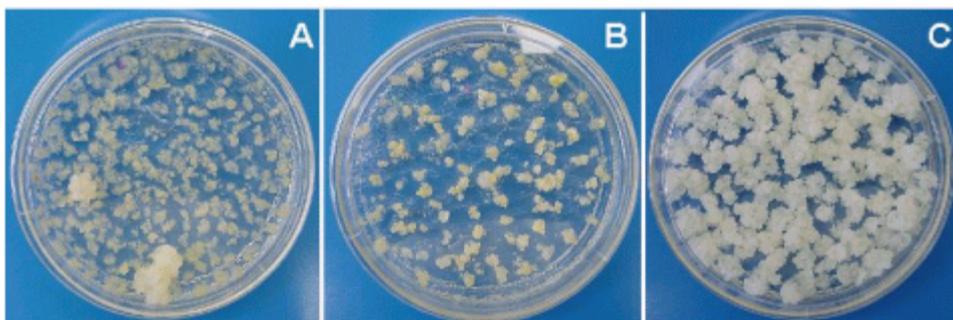


Figura 3. Calos sob seleção in vitro. A- Eventos de transformação, B- Controle negativo, C- Controle positivo.

Resultados e discussão

Pró-insulina: Foram obtidos 30 eventos de transformação que demonstraram, pelos ensaios de Southern, a integração estável do transgene em plantas R0, R1 e R2 (figura 4). A expressão do transgene foi confirmada pela análise de northern (figura 5) que demonstra um pico na expressão nos 20 primeiros dias após a polinização. A proteína heteróloga foi produzida e estocada em níveis esperados considerando a atividade do promotor empregado (figura 6).

hGH: Foram obtidos 20 eventos de transformação resistentes a seleção in vitro que atualmente estão em fase de regeneração (figura 7).



Figura 4. Southern blot de DNA de plantas de milho. 1 e 2- Controles positivos, 3, 4 e 5- Controles negativos, 6 a 20- Plantas submetidas a transformação



Figura 5. Northern blot do endosperma de sementes de milho com diferentes dias após polinização (DAP). 1 - 5 DAP, 2 - 10 DAP, 3 - 15 DAP, 4 - 20 DAP, 5 - 25 DAP, 6 - 35 DAP, 7 - Controle Negativo, 8 e 9 - Controles Positivos.

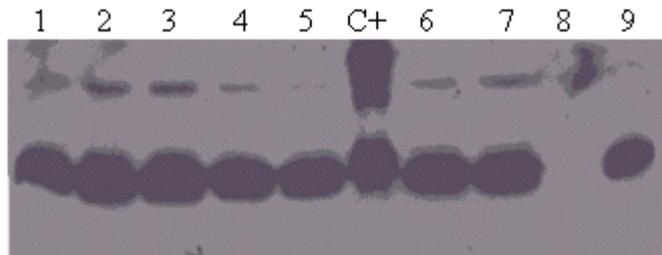


Figura 6. Western blot de farinha de sementes de milho. 1 a 9 - Diferentes eventos de transformação.

C+ - Pró-insulina recombinante produzida em *E.coli* (Biobrás).

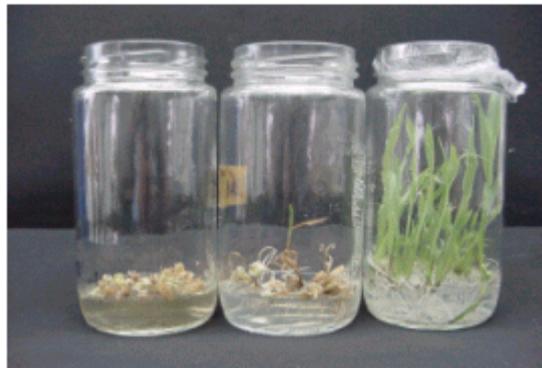


Figura 7. Plântulas com 15 dias de cultivo em luz sob seleção com herbicida. Esquerda e centro - controle negativo e direita - plantas transformadas com a construção contendo o gene hGH.

Bibliografia

- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff k (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* 6: 219-226
- Freitas FA, Yunes JA, da Silva MJ, Arruda P, Leite A (1994) Structural characterization and promoter activity analysis of the g-kafin gene from sorghum. *Mol. Gen. Genet.* 245:177-186.
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 450-454.
- Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* 18: 1151-1155.
- Kemper EL, da Silva MJ and Arruda P (1996) Effect of microprojectile bomb. parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science* 121:85-93.
- Leite A (2001) Expressão de proteínas heterólogas em plantas. 1057-1083. In: Nass LL, Valoois ACC, de Melo IS, Valadares-Inlis MC (eds.) Recursos genéticos & melhoramento - plantas. Fundação MT, Rondonópolis.
- Moloney MM & Holbrook LA (1997) Subcellular targeting and purification of recombinant proteins in plant production systems. *Biotech Genet Eng Rev* 14: 321-336 (1997).
- Ottoboni LMM, Leite A, Yunes JA, Targon MLPN, Souza-Filho GA and Arruda P. (1993) Sequence analysis of 22Kd-like g-prolamin genes from Coix, maize and Sorghum reveals a highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Mol. Biol.* 21: 765-778.
- Whitelam GC, Cockburn B, Gandecha AR, Owen MRL (1993) Heterologous protein production in transgenic plants. *Biotech Genet Eng Rev* 11: 1-29.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC
