

Produção da proteína transportadora de lipídeos recombinante de *Vigna unguiculata* L. Walp. fusionada à proteína verde fluorescente e estudo da interação do peptídeo com *Saccharomyces cerevisiae*

Marissol Santos Miranda de Amorim, Valdirene Moreira Gomes, André de Oliveira Carvalho

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são pequenas moléculas protéicas obtidas de diferentes organismos como plantas e animais. Estes possuem ampla atividade inibitória sobre microrganismos tais como vírus, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos, protozoários e até mesmo células tumorais. E devido a esta ampla atividade antimicrobiana, aos AMPs é dado grande interesse biológico. Apesar deste interesse e dos estudos, o mecanismo de ação envolvido na inibição dos microrganismos não é conhecido para a maioria dos AMPs. O objetivo deste trabalho é a superexpressão da proteína transportadora de lipídeos de *Vigna unguiculata* (rVu-LTP) fusionada à proteína verde fluorescente (GFP) em sistema heterólogo, purificação de peptídeo recombinante e estudo de sua interação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Serão usadas células de *Escherichia coli*, linhagem Rosetta-gami2 que foram transformadas com o clone da rVu-LTP ligado ao plasmídeo pET (construção pET-LTP), o vetor contendo a sequência codificante da (GFP) será adquirido comercialmente. Os fragmentos codificantes da rVu-LTP e da GFP serão amplificados com um conjunto de dois iniciadores específicos para cada, por PCR, usando como molde o vetor pET-LTP e o vetor da GFP. Os fragmentos amplificados serão digeridos com uma enzima de restrição, cujo sítio foi introduzido aos fragmentos codificantes pelos iniciadores, e estes visam a fusão da GFP no N- e C-terminal da rVu-LTP. A construção resultante da rVu-LTP fusionada à GFP (rVu-LTP-GFP) será clonada em células de *E. coli* e os peptídeos recombinantes, nas duas configurações, superexpressos. A rVu-LTP-GFP será purificada do extrato



bacteriano por coluna de afinidade ao metal Ni^{+} . Após purificação o peptídeo será tratado com a Enteroquinase para separar a rVu-LTP-GFP da cauda de tioredoxina-histidina. A etapa final de purificação será em coluna de fase reversa C18 em sistema de alta eficiência. Posteriormente será feita a interação da rVu-LTP-GFP com *Saccharomyces cerevisiae* através de microscopia óptica de fluorescência. Marcadores fluorescentes para as organelas serão usados para verificação da localização intracelular da rVu-LTP-GFP. Este projeto de pesquisa pretende contribuir para uma melhor compreensão da interação entre microrganismos e peptídeos de planta, e entendimento do mecanismo de ação dos AMPs.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, Mecanismo de ação, Peptídeos antimicrobianos.

Instituição de fomento: UENF, CNPq.

