

Clonagem e expressão heteróloga da catalase de 61 kDa do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

MENDONÇA, Yuri de Abreu; SOARES, Célia Maria de Almeida

Palavras-chave: Catalase, *P. brasiliensis*,

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico de uma micose sistêmica conhecida como paracoccidioidomicose (PCM)(Almeida, 1930), uma doença que afeta principalmente a população rural da América Latina. O fungo cresce na forma de micélio em temperaturas inferiores a 26°C e na forma de levedura a 36°C (Carbonell & Rodrigues, 1995). A transição de micélio a levedura, nos pulmões do hospedeiro humano é condição essencial para o estabelecimento da infecção. Em paralelo, produção de catalases é uma estratégia usada por vários microrganismos contra a toxicidade dos oxidantes produzidos pelas células fagocitárias durante a resposta imune. Estudos de nosso laboratório enfocando proteínas de *P. brasiliensis* potencialmente associadas com a interação parasita-hospedeiro identificaram uma catalase de 61 kDa e pI 6.2 (*Pb catP*) reativa com soros de pacientes com PCM (Fonseca *et al.*, 2001). Foi obtido, através de rastreamento de biblioteca de cDNA, uma sequência de 2016 nucleotídeos (*Pb catP*) contendo uma ORF de 1509 pares de bases que codifica uma proteína de 502 aminoácidos, 57 kDa e pI 6.5. Em adição, a expressão da proteína foi induzida quando exposta ao substrato, peróxido de hidrogênio (Moreira *et al.*; 2004). Estudos prévios do laboratório demonstraram que a catalase de 61kDa e pI 6.2 (*Pb CATP*) desempenha papel antigênico em *P. brasiliensis* (Fonseca *et al.*, 2001). A produção de catalases é uma das estratégias utilizada por microrganismos, inclusive o *P. brasiliensis*, contra a toxidade dos oxidantes produzidos em resposta à infecção. O objetivo principal deste trabalho é clonar o cDNA codificante da catalase de 61kDa do fungo *P. brasiliensis* em vetor de expressão, induzir a expressão heteróloga da catalase de 61kDa (*Pb CATP*) do fungo *P. brasiliensis*, purificar a proteína recombinante, e analisar a reatividade imunológica e da atividade catalítica da catalase recombinante do fungo *P. brasiliensis*, através de *Western blot*.

2. METODOLOGIA

2.1 – Construção de oligonucleotídeos para clonagem em pET[®] 19b

Com intuito principal de clonar o cDNA codificante da catalase no vetor de expressão pET[®] 19B (Novagen, Madison, WI), visando finalmente a expressão da proteína recombinante em sistema heterólogo, foram construídos dois oligonucleotídeos, baseados na sequência do vetor descrita no pET System Manual.

Quadro 2- Oligonucleotídeos Construídos

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA	SÍTIO DE RESTRIÇÃO UTILIZADO NO OLIGONUCLEOTÍDEO
CAT-1	5' CTC GAG ATG GGT GCC GAC GTT GCG TCC AG 3'	Xho 1
CAT-2	5' GGA TCC TCA CAG ATG CGA CTG TGG C 3'	BamH 1

2.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação do cDNA codificante da catalase P. de *P. brasiliensis*, foi montado um sistema contendo: 1,5 µL dos oligonucleotídeos CAT1 e CAT2 na concentração de 1 mM; 5µl de DNA plasmidial (*Pb catP*), codificante para a catalase P. , na concentração de 10ng/ µL; 1,5 µL de dNTPs na concentração de 2,5 mM cada; 1 µL de Taq DNA Polimerase na concentração de 2,5 U/ µL; 5 µL de tampão 10 X para Taq DNA Polimerase; 1 µL de MgSO₄ 50 mM e quantidade de água Milli-Q suficiente para um volume final de 50µL. O DNA molde foi desnaturado a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72°C. A partir desta reação, um fragmento de 1510 foi obtido, o qual foi utilizado na clonagem no vetor de expressão pET[®] 19B.

2.3 - Clonagem do cDNA em vetor de expressão pET[®] 19B

O cDNA foi clonado no vetor de expressão pET[®] 19B através de um sistema de ligação contendo: 50 ng de DNA do vetor digerido com endonucleases *BamH I* e *Xho I*, 250 ng de cDNA de catalase P., T₄ DNA ligase na concentração de 2U/µL, tampão da enzima para 1 X, e água Milli-Q para o volume final de 10 µL. Foi feita uma transformação de células de *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3). Dentre os clones obtidos, quatro apresentavam os vetores com o inserto desejado, sendo estes denominados de CAT2, CAT5, CAT7, e CAT 9.

2.4 – Indução da expressão da proteína recombinante

Para a etapa de indução da proteína recombinante, utilizou-se o Overnight Express™ Autoinduction Systems (Novagen, Madison, WI). Este sistema, segundo o fabricante, apresenta desempenho semelhante a protocolos convencionais de indução utilizando IPTG, não sendo necessário porém um monitoramento do crescimento celular. O Overnight Express Autoinduction Systems disponibiliza dois sistemas de indução. Neste trabalho, optamos pelo Overnight Express System 1, contendo três componentes: OnEx™ Solution 1 (solução de indução), OnEx™ Solution 2 (solução tamponante), e OnEx™ Solution 3 (solução de magnésio). A OnEx™ Solution 1 é uma mistura de diversas fontes de carbono com a função de regular o crescimento celular sem indução até uma alta densidade de células, seguido por um alto índice de indução por lactose. A OnEx™ Solution 2 é um tampão concentrado que mantém o pH durante a produção de ácidos metabólicos, além de proporcionar nitrogênio adicional necessário para a sustentação do aumento da síntese protéica. A OnEx™ Solution 3 fornece o magnésio crítico para a densidade celular máxima.

Foram adicionados 600 µl da OnEx™ Solution 1, 1.50 ml da OnEx™ Solution 2, 30 µl da OnEx™ Solution 3, ampicilina para a concentração final de 100 µg/ml , e meio LB líquido para um volume final de 30ml em frascos de 250ml. Cinco sistemas de indução foram montados. Dentre estes, quatro sistemas contendo uma única colônia de cada clone com o fragmento da catalase clonado (CAT 2, CAT 5, CAT 7, e CAT9), e um sistema com um clone destituído deste fragmento. As culturas foram encubadas em shaker a 37° C , 250 rpm, por 16h. As culturas foram centrifugadas para a obtenção de precipitado de células, os quais foram conservados em -20° C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Confirmação dos clones positivos

A primeira marca de seleção dos clones é feita pela adição de antibiótico no meio de cultura durante o plaqueamento. A partir destes clones foi então realizado o sequenciamento da região alvo do vetor no intuito de confirmar se o cDNA codificante para a catalase estava realmente clonada. Os clones CAT 2, CAT 5, CAT 7, e CAT 9 apresentaram a seqüência desejada (Dados não mostrados). Durante os ciclos de cultivos de células contendo um vetor de expressão com um inserto codificante para uma proteína alvo, uma mínima taxa de expressão desta pode ser observada. Quando o inserto codifica para uma proteína a qual é tóxica para a célula. como é o caso da

catalase, há uma tendência de que a sequência seja recombinada e desapareça da população de células da cultura. Uma forma de barrar este processo é com a adição de um inibidor (glicose a 2mM no caso). Mesmo assim, para verificar se o inserto de 1,5 kb ainda mantinha-se clonado no vetor, foi feito um sistema de digestão a 37° C por 16h com as enzimas *Xho I* e *BamH I*, a partir do DNA plasmidial de cada clone. A digestão foi aplicada em gel de eletroforese (agarose 0,8%), e apresentou resultados positivos. Visando a expressão da proteína recombinante, optamos por utilizar uma nova linhagem de *E. coli*, a BL21, seguindo as recomendações preditas no manual do sistema pET do fabricante. Da transformação, foram feitas quatro placas as quais apresentaram bom crescimento celular.

3.2 - Indução da proteína recombinante e rastreamento da proteína recombinante

Foram montados cinco sistemas de indução, como descrito acima, e quatro sistemas nos quais foi adicionado glicose a 2mM, substância inibidora da síntese protéica no vetor pET 19B. Nestes últimos não foram adicionadas as soluções do kit (OnEx™ Solution 1, 2 e 3), servindo assim como controles de expressão para cada clone (não induzido). Este mostraria o padrão de expressão protéica da célula e do vetor sem o fragmento da catalase. Os outros quatro sistemas foram feitos um para cada clone (CAT 2, CAT 5, CAT , e CAT 9), como já descrito anteriormente. Os precipitados de células obtidos no processo foram fervidos por 10 min. e aplicados em gel de poliacrilamida. Nenhum clone apresentou a proteína esperada de 61 kDa.

4. CONCLUSÃO

A clonagem do cDNA e a expressão heteróloga da catalase peroxissomal recombinante irá viabilizar novas análises sobre o papel da catalase de 61 kDa na resposta imune, assim como estudos funcionais acerca dos papéis da proteína no fungo *P. brasiliensis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. Na. Fac. Méd. S. P. 5: 125-141, 1930.
2. CARBONELL, L. M. & RODRIGUES, J. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. In culture and experimental inoculations. J. Bacteriol. 90: 504-510, 1995.
3. FONSECA, C. A.; JESUINO, R. S. A.; FELIPE, M. S. S.; CUNHA, D. A.; BRITO, W. A. & SOARES, C. M. A. Two-dimensionalelectrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. Micro. na Infec. 3: 535-542, 2001.
4. MOREIRA, S. F. I., BAILÃO, A. M., BARBOSA, M. S., JESUINO, R. S. A., FELIPE, M. S. S., PEREIRA, M., SOARES, C. M. A. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. Yeast, 21: 173-82, 2004.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/MCT

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas - ICB - Laboratório de Biologia Molecular, barone009@gmail.com

² Orientadora/ Instituto de Ciências Biológicas/ UFG, celia@icb.ufg.br