ASPARTIL PROTEASE DE *Paracoccidioides brasiliensis*: EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CITOLocalIZAÇÃO E ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Tacco, Bruno Aluisio Coutinho Assis¹, Costa, Milce.¹, Parente, Juliana Alves¹, Felipe, Maria Sueli Soares², Pereira, Maristela.¹ e Soares, Célia Maria Almeida¹

Palavras-chave: Protease, *Paracoccidioides brasiliensis*, Aspartil protease

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da micose humana sistêmica paracoccidioidomicose (PCM) (Almeida, 1930). Segundo Franco *et al.* (1987) a inalação de propágulos provenientes da forma miceliana do fungo pelo hospedeiro é a principal via de entrada do parasita, propiciando a infecção nos pulmões e a disseminação para os órgãos onde se estabelece na forma leveduriforme após transição. *P. brasiliensis* apresenta a habilidade de crescer na forma leveduriforme a 37°C in vitro e no hospedeiro, e na forma miceliana a temperaturas inferiores a 28°C (San-Blas, 1993). Atualmente abordagens moleculares e genéticas têm tomado uma importância substancial no estudo de *P. brasiliensis*. O estudo genético através de análises de genes diferencialmente expressos nas duas fases do fungo, genes relacionados ao metabolismo geral e diferencial em ambas as fases do fungo e genes como possíveis alvos de drogas, poderá gerar informações sobre expressão, diferenciação celular e patogenicidade de *P. brasiliensis*, além de permitir que outras ferramentas para o estudo genético desse fungo sejam aplicadas nos dados gerados (Felipe *et al.*, 2005). Um fator que potencialmente pode estar ligado ao processo de virulência parece ser a produção de enzimas proteolíticas. Aspartil proteases de fungos são secretadas primariamente para fornecer nutrientes para a célula e para executar em variado número de funções especializadas durante o processo infectivo. A proteína permite ao microorganismo evadir das defesas do hospedeiro degradando imunoglobulinas e proteínas do complemento e também promovendo aderência e degradação das barreiras do hospedeiro (Staib 1965). Evidências do papel das SAPs na virulência também tem sido investigada em *Candida albicans* mostrando que estas proteínas se localizam na superfície das mucosas colonizadas por elementos fúngicos, conseguindo evadir dos macrófagos após fagocitose de células de cândida (Borg e Ruchel, 1988). Três aspartil proteases foram encontradas no transcriptoma do *P. brasiliensis*, (Parente *et al.*, 2005). As seqüências primárias deduzidas de aspartil proteases de *P. brasiliensis* foram analisadas pela presença do motivo característico (Asp-Ser/Thr-Gly), uma vez que essas enzimas são diretamente dependentes de ácido aspártico para a atividade catalítica. Apenas uma seqüência codificante para uma aspartil protease homóloga de *P. brasiliensis* foi completamente seqüenciada e

caracterizada, sendo esta isolada como nosso objetivo de estudo nesse projeto. É possível que outras seqüências de aspartil proteases encontradas no transcriptoma de *P. brasiliensis* revelem características moleculares semelhantes à aspartil protease de *P. brasiliensis* (PbAP). Esse trabalho tem o objetivo de determinar a relação de PbAP no contexto infeccioso do fungo a partir das análises molecular e imunológica da proteína recombinante.

2. METODOLOGIA

2.1 – Caracterização de PbAP

Recentemente foi identificado em *P. brasiliensis* um cDNA completo (GenBank-AY278218) codificante para uma Aspartil proteinase homóloga à diversas seqüências de microrganismos já relatadas. Na caracterização do cDNA codificante para PbAP foram utilizadas ferramentas de bioinformática. Bancos de dados disponíveis para pesquisa fornecem informações primordiais relacionadas à estrutura molecular da proteína, incluindo MEROPS - banco de dados que atua como uma fonte de informações para proteases (<http://merops.sanger.ac.uk>) e Pfam (<http://pfam.wustl.edu>). Em adição buscas por similaridade envolvendo BLAST foram feitas utilizando o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Além disso, domínios e sítios ativos preditos foram rastreados usando o ProfileScan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>). Alinhamento de seqüências múltiplas foram geradas utilizando seqüências de maior similaridade com PbAP, usando o programa Clustal X versão 1.81.

2.2 – Clonagem e expressão heteróloga de PbAP

O respectivo produto amplificado de PCR 1,3 Kb foi clonado em vetor de expressão PGEX 4T3 (Amersham Pharmacia Biotech) em sítios de enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. Em seguida o Dna plasmidial foi transformado em células de expressão heteróloga *E. coli* BL21 por choque térmico. A indução da proteína recombinante, após seleção dos clones transformantes, ocorreu com o uso de isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG), de acordo com sua concentração final padronizada. A expressão da proteína foi verificada em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). O vetor pGEX-4T-3 gera uma proteína recombinante fusionada a um domínio de 29 kDa da Glutathione S-transferase de *S. japonicum*.

2.3 – Purificação e obtenção de grande quantidade da proteína recombinante.

A proteína de fusão expressa gerada pelo sistema utilizado foi solubilizada com a utilização de lisozima e sonicação, juntamente com os detergentes sarcosil e triton X-100. As proteínas recombinantes fusionadas à GST são purificadas de lisados bacterianos por cromatografia de afinidade usando glutathione immobilizada a uma matriz de Sepharose. A estrutura da glutathione é complementar ao sítio de ligação da GST. Quando aplicada à coluna que possui esse meio de afinidade, as proteínas de fusão ligam-se à resina e impurezas são eliminadas por lavagem com solução de PBS 1X. A proteína de fusão é então eluída sob condições não desnaturantes que preservam a função da proteína. As condições de purificação da proteína

recombinante são descritas pelo fabricante (Amersham Biosciences). Com o intuito de se produzir anticorpos anti-*PbAP*, elaboração de Western blotting e dosagens da atividade enzimática será necessária a produção da proteína recombinante *PbAP* em grande quantidade, na ordem de miligrama.

2.4 – Produção de anticorpo policlonal anti-*PbAP* e Western blotting

A proteína recombinante fusionada deverá ser clivada com o uso de trombina para ser utilizada na geração de anticorpo policlonal em coelho. A especificidade do anticorpo e o nível de expressão da proteína nativa em diferentes isolados de *P. brasiliensis* e em diversas concentrações de crescimento serão verificados por western blotting. Essa técnica também permitira a análise da presença dessa proteína em diversos soros de pacientes provenientes de Goiás e outros estados.

2.5 – Experimentos de Northern blotting

O nível e a presença de mRNAs codificantes para a aspartil proteinase de *P. brasiliensis* será analisada por experimentos de Northern blotting. Para tanto o RNA total do fungo deverá ser extraído a fim de se determinar o nível de transcritos referentes à *PbAP*, com a utilização de uma sonda específica gerada por reação de PCR (Polimerase Chain Reaction)

2.6 - Preparo de Células para Análise por Microscopia Eletrônica e Citolocalização de *PbAP* de *P. brasiliensis*

As amostras de células de *P. brasiliensis* serão preparadas e em seguida desidratadas como descrito por Boharaeem e Dominiczak (2000). Esses estudos serão realizados em colaboração com a Universidade de Brasília.

2.7 - Análise da Atividade Enzimática da Proteína Recombinante.

De acordo com Mercado-Flores *et al.* (2005) uma Aspartil protease do fungo dimórfico *Ustilago maydis* é capaz de degradar hemoglobina, caseína, albumina e gelatina. Logo, a atividade enzimática da proteína recombinante pode ser monitorada com o uso desses substratos. Para tanto a protease purificada e ressuspensa em solução salina de PBS 1X será adicionada ao seu substrato de azocazeína, na proporção de 1.5 nM para 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, de acordo com Pichová *et al.* (2001). Absorbância dessa solução será determinada em comprimento de onda de 440 nm e a conversão para unidades de atividade de protease será feita através da metodologia empregada por Lorenzo-Morales *et al.* (2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cDNA complete codificante para uma Aspartil proteinase de *P. brasiliensis* foi clonado, seqüenciado e depositado em banco de dados sob o

acesso GenBank-AY278218. O fragmento de 1,3Kb codifica uma proteína de 43,8 kDa e *pl* de 5,7. A análise da seqüência revelou três prováveis sítios de N-glicosilação, uma região conservada presente no sítio ativo da aspartil proteinase e 20 amino ácidos na extremidade N-terminal, característica do peptídeo sinal. *PbAp* apresenta dois motivos altamente conservados DTGSSNLWVPS e DTGTSLALPS, descritos como essenciais para a atividade catalítica. A caracterização de uma aspartil proteinase de *P. brasiliensis* abre a possibilidade de análise do papel de proteases como fatores de virulência nesse fungo. *PbAP* já se encontra clonada no vetor de expressão pGEX 4-T-3 e sua expressão heteróloga em célula BL21 já foi realizada. A condição de expressão melhor observada se deu a 15°C overnight, sob concentração final de 0,1 nM de IPTG. Nessas condições a produção de corpos de inclusão pela célula bacteriana foi suportável para que se tivesse a perfeita solubilização protéica. A purificação e isolamento da proteína recombinante proverá uma ferramenta essencial para o entendimento do papel fisiológico dessa proteína em *P. brasiliensis*. O perfil de transcrição de RNAs de *PbAP* mostrou uma quantidade mais significativa de RNAs em células leveduriformes do fungo, do que em micelianas, sugerindo uma função relevante dessa proteína na patogênese do fungo. Experimentos de Southern blot revelaram que o gene codificante para *PbAP* se encontra em apenas uma cópia no genoma do fungo.

4. CONCLUSÃO

Aspartil proteinase de *P. brasiliensis* apresenta provavelmente um importante significado como enzima hidrolítica na virulência do fungo. O sistema de expressão utilizado no presente estudo tem se mostrado eficiente na produção da proteína recombinante. A futura análise imunológica e o ensaio da atividade enzimática da proteína poderá fornecer o melhor entendimento da função dessa proteína tanto a nível de interação com outras proteínas quanto no processo invasivo do fungo no tecido do hospedeiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidioso nos Estados Unidos e Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. Na. **Fac. Med. S. Paulo**. 5, 125-141, 1930.

FRANCO, M.; MONTEIRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUEZ, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidiodomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 20, .129-132, 1987.

SAN-BLAS, G. 1993. Paracoccidiodomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J.Med.Vet.Mycol. Rev**, 31:99-113

FELIPE MS, TORRES FA, MARANHÃO AQ, SILVA-PEREIRA I, POCAS-FONSECA MJ, CAMPOS EG, MORAES LM, ARRAES FB, CARVALHO MJ, ANDRADE RV, NICOLA AM, TEIXEIRA MM, JESUINO RS, PEREIRA M, SOARES CM, BRIGIDO MM. Functional genome of the human pathogenic

fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol. Med. Microbiol.** 45(3):369-81, 2005

STAIB F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi **Sabouraudia**, 4, 1871965

BORG-VON ZEPPELIN, M., and RUCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic candida spp. Durn experimental infection of oral mucosa. **Infect Immun** 56: 626-631, 1988.

PARENTE JA, COSTA M, PEREIRA M, SOARES CM. Transcriptome overview of *Paracoccidioides brasiliensis* proteases **Genet. Mol. Res.** 4(2):358-71, 2005.
BOHARAEEN AND DOMINICZAK. **Bioquímica Médica**, 1 ed. Manole, Espanha, p. 125-129, 2000.

MERCADO-FLORES Y, TREJO-AGUILAR A, RAMIREZ-ZAVALA B, VILLATANACA L, HERNANDEZ-RODRIGUEZ C. Purification and characterization of an intracellular aspartyl acid proteinase (pumAi) from *Ustilago maydis*. **Can J Microbiol.**; 51(2):171-5, 2005.

LORENZO-MORALES J, ORTEGA-RIVAS A, FORONDA P, ABREU-ACOSTA N, BALLART D, MARTINEZ E, VALLADARES B. RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: Molecular analysis and effect on pathogenicity. **Mol Biochem Parasitol** 144(1):10-5, 2005.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq / MCT; Capes.

1 Laboratório de Biologia Molecular ICB II, Universidade Federal de Goiás – Goiânia – GO – Brasil.

² Laboratório de Biologia Molecular Universidade de Brasília – Brasília – DF – Brasil.