

Expressão heteróloga, citolocalização e atividade enzimática de β -1,3-glucana sintase de *Paracoccidioides brasiliensis*

TOMAZETT, Patrícia Kott; BARBOSA, Mônica Santiago; FARIA, Fabrícia Paula; BAO, Sônia Nair; FÉLIX, Carlos Roberto; SOARES, Célia Maria Almeida; PEREIRA, Maristela.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, glucana sintase, expressão heteróloga.

I. INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da micose humana denominada Paracoccidioidomicose (PCM) (Almeida, 1930). Segundo Franco *et al.* (1987), a inalação pelo hospedeiro humano de micélios e/ou propágulos do fungo é a principal via de entrada do parasita, propiciando o início da infecção pelos pulmões e a disseminação para outros órgãos onde se estabelece na forma de levedura. Dessa maneira, o processo de transição é o primeiro requerimento para o estabelecimento da PCM no hospedeiro (Lacaz *et al.*, 1991).

A parede celular de fungos é uma estrutura essencial, altamente dinâmica e está envolvida em vários processos fisiológicos. Esta ainda é antigênica, participa da adesão e modula a resposta imune contra a infecção (Navaro-Garcia *et al.*, 2001; McKinney *et al.*, 2000).

As principais macromoléculas que compõem a parede celular de fungos são: quitina, glucanas e proteínas. Na transição de micélio para levedura, ocorre uma mudança estrutural quantitativa na parede celular do fungo do polímero de β -glucana para o polímero de α -glucana.

Glucana é o principal componente estrutural que fortalece a parede celular de fungos, entre eles, *P. brasiliensis*. Nós isolamos e caracterizamos o gene de β -1,3-glucana sintase de *P. brasiliensis* (*PbFKS1*) (Pereira *et al.*, 2000). Drogas que inibem β -1,3-glucana sintase, têm apresentado sucesso no tratamento de infecções fúngicas (Andes *et al.*, 2003;). Nosso grupo tem trabalhado com enzimas envolvidas na síntese e degradação de componentes da parede celular de *P. brasiliensis* para a utilização das mesmas no desenvolvimento de drogas antifúngicas.

As similaridades metabólicas e estruturais entre células de fungos e mamíferos têm tornado a escolha de novos alvos para antifúngicos extremamente difícil. Além disso, a diversidade da composição da parede celular e de vias metabólicas entre as espécies de fungos dificulta a escolha de agentes antifúngicos de amplo espectro (Klepser, 2003). Inibidores das enzimas envolvidas no metabolismo da parede celular têm demonstrado causar deformação na morfologia da célula e na formação do fungo (Arelano, 1996).

Várias tentativas têm sido feitas no sentido de obter β -1,3-glucana sintases recombinantes. Assim como outras proteínas localizadas na membrana celular, a β -1,3-glucana sintase apresenta hélices transmembranas altamente hidrofóbicas. Todas essas regiões dificultam sua purificação, e enovelamento correto. Utilizando uma nova estratégia Beauvais *et al.* (2001) obtiveram a proteína recombinante de *A. fumigatus*, entretanto apenas a região catalítica foi utilizada para expressão em *Escherichia coli*. A

proteína predita *PbFks1p* apresenta um domínio catalítico predito de 588 aminoácidos, altamente hidrofílico.

Desta forma, esta mesma estratégia foi utilizada para β -1,3-glucana sintase de *P. brasiliensis* e a região catalítica foi clonada e expressada em *E. coli*. A partir daí foram produzidos anticorpos policlonais em camundongo relativos a essa região, o que possibilitou testes de reatividade imunológica e citolocalização. Além destes testes foi realizado ensaio de atividade enzimática com a proteína recombinante e com a proteína nativa utilizando dois métodos: um radioisotópico e um colorimétrico.

II. Metodologia

II.1. Extração de RNA de *P. brasiliensis*: Foi feita extração de RNA pelo método de trizol nas fases de transição de micélio para levedura e levedura para micélio.

II.2. RT-PCR semi quantitativa: Foi realizada reação de transcriptase reversa utilizando primer de glucana sintase e primer para o controle interno da proteína ribossomal L34. As reações de PCR foram padronizadas em relação a temperatura de anelamento de número de ciclos.

II.3. Obtenção da região catalítica: O clone de glucana sintase de *P. brasiliensis*, *PbFKS1* foi subclonado no vetor pUC 18 sendo a linhagem *E. coli* XL1-Blue utilizada para transformar e o DNA plasmidial foi extraído. Oligonucleotídeos foram construídos para amplificar a região catalítica de *PbFKS1* (*PbFKSc*) sendo o DNA deste gene utilizado como amostra na reação de PCR.

II.4. Obtenção de clones recombinante: O vetor de expressão pGEX 4T3 foi utilizado para clonar *PbFKSc*. Sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* foram utilizados para possibilitar a clonagem. O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células de *E. coli* BL-21.

II.5. Indução da proteína recombinante. A indução do promotor *tac* foi realizada pela adição de IPTG (0,5mM) à cultura. Os clones obtidos de *E. coli* foram induzidos por 1 h a 37 °C.

II.6. Purificação da proteína recombinante: A proteína recombinante induzida passou por um processo de solubilização e em seguida foi realizada sua purificação. Para tanto foi utilizada uma resina de sefarose glutationa que apresenta alta afinidade pela proteína de fusão GST presente no vetor pGEX. O protocolo da purificação foi seguido de acordo com o manual do fabricante (Amersham Biosciences)

II.7. Produção de anticorpo policlonal anti-*PbFkspc*: A proteína recombinante purificada foi utilizada para gerar anticorpo policlonal em camundongos. A produção do anticorpo específico pelos animais foi verificada por “western blotting”.

II.8. Western blotting: Proteínas presentes no gel de poliácridamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Sambrook et al, 1989). A membrana foi incubada com anticorpo primário (anti-*PbFksc*) lavada e incubada com anti-camundongo acoplado à fosfatase alcalina. Posteriormente a membrana foi novamente lavada e a reação revelada pela adição de BCIP/NBT (5-cromo-4-cloro-3-indolilfosfato toluidina-nitroblue tetrazolina).

II.9. Citolocalização: Os ensaios de citolocalização foram realizados em colaboração com a professora Sônia Nair Bao do Laboratório de microscopia da UNB e da doutoranda Mônica Santiago do Laboratório de Biologia Molecular da UFG. Células da

fase de levedura de *P. brasiliensis* foram processadas de acordo com Barbosa *et al.*, 2006 possibilitando cortes ultrafinos da estrutura do fungo para utilização na microscopia de transmissão. Os cortes foram então tratados para reação com anti-*PbFksc* e posterior reação com o anticorpo secundário marcado com partículas de ouro. Após revelação da reação os cortes foram visualizados em um microscópio elétrico de transmissão Jeol 1011.

II.10. Ensaio de atividade enzimática: Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em colaboração com o professor Carlos Roberto Félix do Laboratório de Enzimologia da UNB. A atividade enzimática foi realizada baseada em Billon-Grand *et al.*, 1997. A enzima nativa ou recombinante foi incubada por 1 h a 37 °C na presença de 20 mM tris-HCl, pH 7.0; 100 mM celobiose; 15 mM DTT; 20 mM UDP[¹²C]glicose e 0.25 UDP[¹⁴C]glicose. A reação foi parada com a adição de etanol 95% e precipitada O.N. a -20°C. Em seguida foi adicionado celulose e a reação foi filtrada em filtro de fibra de vidro e lavada com água (2x 4mL) e etanol 95% (2x 4mL). A glicose incorporada foi medida através de cintilador.

III. Resultados e Discussão

III.1. RT-PCR semi-quantitativa: Foi realizada sqRT-PCR das fases de transição M-L e L-M. Com primers de glucana sintase foram feitas reações com 39 ciclos. Foi utilizado um controle interno da reação com primers da proteína ribossomal L34. Ocorre uma diminuição de transcritos na transição de M-L. Na transição L-M não ocorre alteração na expressão dos transcritos.

III.2. Ionagem da região catalítica de *PbFKS1*: A região *PbFKSc* foi isolada por PCR. Análises em gel de agarose mostraram que este fragmento apresenta 1764 pb, como o esperado. *PbFKSc* foi ligada ao vetor pGEX 4T3 (4968 pb) gerando um plasmídeo recombinante que foi utilizado para transformar células de *E. coli* BL-21.

III.3. ução de clones recombinante: Os clones recombinantes obtidos foram induzidos por IPTG durante 1 h a 37°C. A proteína recombinante induzida foi analisada em gel de poliacrilamida corado por comassie blue. Os resultados mostraram uma proteína heteróloga de 88 kDa, como o esperado, sendo aproximadamente 54 kDa referente a *PbFksc* e 29 kDa de GST.

III.4. Purificação da proteína recombinante: Após solubilização da proteína heteróloga foi realizada sua purificação através cromatografia de afinidade com uma sefarose de glutationa. A proteína de fusão foi então desligada da coluna pela utilização de um tampão de eluição, apesar da eluição não ter tido uma eficiência de 100%.

III.5Western Blotting: A proteína recombinante purificada foi transferida para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi colocada para reagir com o anticorpo anti-*PbFksc*. Após a revelação foi possível reconhecer a banda da proteína na membrana, que acendeu com a marcação do anticorpo.

III.6 Citolocalização: A citolocalização foi realizada em células de leveduras de *P. brasiliensis*. A marcação do anti-*PbFksc* foi revelada por partículas de ouro. As fotos da microscopia de transmissão revelaram a presença de partículas de ouro na parede celular e no espaço intracelular.

III.7 Ensaio enzimático: Foi realizado um ensaio enzimático visando verificar se a enzima recombinante estaria em sua forma ativa ou inativa. O ensaio consistiu na utilização do substrato específico de β -glucana sintase marcado com ¹⁴C e verificação

da incorporação do material pelo produto da reação. De acordo com a leitura do cintilador pode-se verificar que houve formação de glucana, mostrando que a enzima recombinante está em sua forma ativa. Este ensaio foi realizado em duplicata e tendo como controle um extrato bruto de membrana celular de *P. brasiliensis*.

IV. Conclusões

Através das reações de sqRT-PCR podemos observar que há expressão dos transcritos em ambas as fases de vida do fungo. De acordo com nossos resultados de M-L ocorre uma diminuição na expressão dos transcritos.

No presente trabalho foi possível isolar a região catalítica de β -1,3-glucana sintase de *P. brasiliensis*. A clonagem de *PbFksc* no vetor pGEX 4T3 e posterior indução do clone recombinante levou à produção de uma proteína de fusão heteróloga de 88 kDa. Até o presente momento apenas Beauvais *et al.* (2001) haviam conseguido clonar a região catalítica de β -1,3-glucana sintase de *Aspergillus fumigatus*. A clonagem do gene inteiro para obtenção da proteína recombinante é muito trabalhosa e até hoje não foi relatada

A proteína heteróloga foi utilizada como antígeno para produção de anticorpos policlonais anti-*PbFksc*, o que possibilitou a realização de um ensaio de citolocalização da proteína em questão. As marcações com partículas de ouro foram observadas na parede celular e no espaço intracelular. De acordo com análises *in silico* β -1,3-glucana sintase é classificada como uma proteína de membrana, no entanto existem relatos de atividade de β -1,3-glucana sintase em membranas microssomais intracelulares.

Pela primeira vez está sendo relatada a obtenção de β -1,3-glucana sintase recombinante na sua forma ativa. O ensaio foi realizado tendo como controle extrato bruto de membrana de *P. brasiliensis* que, de acordo com Dávila *et al.*, 1986 é o extrato com maior atividade de β -1,3-glucana sintase. No momento estamos testando um protocolo novo de atividade enzimática que utiliza um método colorimétrico ao invés do método radioativo.

A proteína recombinante purificada e ativa nos dá a possibilidade de testá-la como alvo para drogas facilitando um rastreamento de novas substâncias que possam ser utilizadas no tratamento da paracoccidiodomicose. As limitações terapêuticas das classes de drogas antifúngicas correntes, (polienos, como anfotericina B e azoles como fluconazol e itraconazol), os quais apresentam toxicidade e um limitado espectro de eficácia e o aumento da incidência de infecções fúngicas ameaçadoras, associado com imunodepressão bem como o surgimento de isolados clínicos resistentes a drogas tem se tornado preocupante. Estes resultados vêm nos mostrar uma ótima perspectiva no intuito de melhorar esse quadro.

IV. Referências Bibliográficas

1. ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidioico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. **An. Fac. Med. S. Paulo**, v.5, p.125-141, 1930.
2. ANDES, D.; MARCHILLO, K.; LOWTHER, J.; BRYSKIER, A.; STAMSTAD, T.; CONKLIN, R. In vivo pharmacodynamics of HMR 3270, a glucan synthase inhibitor, in

murine candidiasis model. **Antimic. Agents and Chemot.**, v.47, n.4, p.1187-1192, 2003.

3. Barbosa, M. S.; Bao, S. N.; Adrenotti, P. F.; Faria, F. P.; Felipe, M. S. S.; Feitosa, L. S.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Soares, C. M. A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect. Immun.**, v.74, n.1, p.382-389, 2006.

4. BEAUVAIS, A.; BRUNEAU, J.M.; MOL, P.C.; BUITRAGO, M.J.; LEGRAND, R.; LATGE, J.P. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resistance Updates**, v.4, p.1 –12, 2001.

5. BILLON-GRAND, G.; MARAIS, M.; JOSELEAU, V. G.; GAY, L.; FEUVRE, M. A novel 1,3-β-glucan synthase from the oomycete *Saprolegnia monoica*. **Microbiology**, v.143, p.3175-3183, 1997.

6. DAVILA, T.; SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Effect of papulacandin B on glucan synthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal Med. Vet. Mycol**, v.24, p.193-202, 1986.

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

8. MCKINNEY, J.D.; HONER ZU BENTRUP, K.; MUNOZ-ELIAS, E.J.; MICZAK, A.; CHEN, B.; CHAN, W.T.; SWENSON, D. SACCHETTINI, J.C.; JACOBS, W.R.JR.; RUSSELL, D.G. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v.17, n.406, p. 735-738, 2000.

9. NAVARRO-GARCIA, F.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C.; PLA, J. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.**, n.25, p.245-268, 2001.

10. PEREIRA, M.; FELIPE, M.S.S.; BRIGIDO, M.M.; SOARES, C.M.A.; AZEVEDO, M.O. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Yeast**, v.16, p.451-462, 2000.

11. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor , New York, 1989.

12. SAN-BLAS, G. Biosynthesis of glucans by subcellular fractions of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Exp. Mycol.** v.3, p. 249-258, 1979.

13. MCKINNEY, J.D.; HONER ZU BENTRUP, K.; MUNOZ-ELIAS, E.J.; MICZAK, A.; CHEN, B.; CHAN, W.T.; SWENSON, D. SACCHETTINI, J.C.; JACOBS, W.R.JR.; RUSSELL, D.G. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v.17, n.406, p. 735-738, 2000.