

Clonagem e expressão dos cDNAs que codificam as subunidades catalíticas da PKA de *Paracoccidioides brasiliensis*

Camila Borges Mesquita¹, Silvia Maria Salem Izacc²
Universidade Federal de Goiás, 74690-903, Brasil
bm.camila@hotmail.com, silviaizacc@gmail.com

PALAVRAS CHAVE: *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomicose, PKA

Lista de Abreviaturas

DO – Densidade Ótica

dNTP – 2-desoxinucleosídeo 5-trifosfato

GST – glutationa S-transferase

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

LB – Luria Bertani

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

X-GAL – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-D-galactopiranosídeo

Lista de Soluções

Tampão A – Tris-HCl pH 8.0 50mM, EDTA pH 8.0 1mM, D-glucose 9mg/mL e água mili-Q para completar 15mL.

Tampão B – Tris-HCl pH 8.0 10mM, Triton X-100 10%, 75 μ L de Tween 20, KCl 3,75mg/mL e água mili-Q para completar 15mL.

Tampão de estocagem 1 – Tris-HCl pH 8.0 50mM, NaCl 100mM, Triton X-100 17mM, glicerol 50% e água mili-Q para completar 50mL.

Tampão de estocagem 2 – Tris-HCl pH 8.0 50mM, NaCl 100mM, Triton X-100 17mM, glicerol 75% e água mili-Q para completar 50mL.

LB líquido – bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0.

LB sólido – bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, Agar 1,2%, pH 7,0.

¹Orientanda. Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás

²Profa. Dra./Orientadora – Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

1 – INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico, agente etiológico da micose sistêmica humana Paracoccidioidomicose (PCM). A PCM é uma micose restrita à América Latina e que infecta, preferencialmente, pessoas do sexo masculino. A infecção tem origem pulmonar e dissemina-se para outras regiões do corpo, como pele, mucosa oral e glândulas supra-renais (Restrepo *et al.*, 2011).

P. brasiliensis apresenta alterações morfológicas em função da temperatura. À temperatura de 22° C – 25° C cresce como micélio, forma saprobiótica, e à temperatura de 35° C – 37° C como levedura, forma patogênica. A infecção ocorre através da inalação dos conídios produzidos pela forma miceliana, que são pequenos o suficiente para atingirem os alvéolos pulmonares do hospedeiro, onde se transformam em levedura (Brummer *et al.*, 1993). A diferenciação morfológica é um mecanismo fundamental para a patogenicidade, sendo que aqueles incapazes de diferenciar também são incapazes de estabelecer a infecção. Assim, os mecanismos envolvidos na transição de micélio para levedura são importantes alvos terapêuticos (Rooney e Klein, 2002).

Apesar da importância de se conhecer os mecanismos moleculares envolvidos no reconhecimento e na transmissão dos sinais que desencadeiam a transição morfológica, eles são pouco conhecidos. Sabe-se que diferentes vias de sinalização celular são fundamentais para a adaptação do fungo às mudanças e também para estabelecimento da infecção. Várias destas vias estão presentes em *P. brasiliensis*, como evidenciado por estudos do transcrito do fungo (Felipe *et al.*, 2003). Fernandes e colaboradores (2005) realizaram uma análise *in silico* das vias de transdução de sinal em *P. brasiliensis*, e observaram várias cascatas de sinalização celular, como MAP quinases; cAMP/PKA (AMP cíclico/proteína quinase dependente de cAMP); proteínas Ras; calmodulina-calcineurina e alvos da rapamicina.

A via de sinalização cAMP/PKA controla a patogenicidade e a mudança morfológica em outros fungos como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Também está relacionada à resposta a privação de nutrientes em *Saccharomyces cerevisiae*, que é uma condição de estresse, assim como a mudança de temperatura (Borges-Walmsley e Walmsley, 2000). Chen e colaboradores (2007) mostraram que os níveis de cAMP aumentam nas células e a via cAMP/PKA é ativada durante a transição morfológica. Além disso, também demonstraram que a transição pode ser modulada por cAMP exógeno.

O cAMP atua como segundo mensageiro, controlando vários processos celulares, sendo que a proteína PKA é seu principal alvo de ação. PKA catalisa a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para serinas ou treoninas específicas, regulando a atividade destas proteínas. A PKA é formada por um complexo com duas subunidades regulatórias e duas subunidades catalíticas. Na ausência de cAMP é inativa e quando ele se liga às subunidades regulatórias altera a conformação da proteína, causando a dissociação do complexo. As subunidades catalíticas são então liberadas na forma ativa. O seu efeito é reversível devido à ação de proteínas fosfatases (Yu *et al.*, 2004).

Diante da importância da PKA e por ser conhecido que os níveis celulares de cAMP aumentam durante a transição morfológica de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, os genes que codificam as subunidades catalíticas da PKA foram identificados no genoma do fungo (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis) e clonados em vetor de expressão. Esse procedimento foi feito com o intuito de avaliar, posteriormente, as interações da PKA com outras proteínas do fungo e seus alvos durante a transição morfológica.

2 – OBJETIVO

Clonar em vetor de expressão os cDNAs correspondentes às subunidades catalíticas da PKA do isolado Pb01 de *P. brasiliensis*, para posterior análise da interação destas moléculas com outras proteínas do fungo.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Desenho de primers

Foram desenhados oligonucleotídeos para amplificação dos cDNAs correspondentes às duas subunidades catalíticas da PKA de *P. brasiliensis*.

As sequências genômica e de cDNA das subunidades catalíticas da PKA de *P. brasiliensis* foram obtidas em http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiDownloads.html. Os códigos de acesso às sequências no banco de dados são PAAG00108.1 e PAAG-03386.1 e elas foram aqui denominadas Pb01PKAc1 e Pb01PKAc2, respectivamente. As extremidades dos oligonucleotídeos direto e reverso foram flanqueadas por sequências

reconhecidas pelas enzimas de restrição EcoRI e Sall, respectivamente, para facilitar a clonagem dos produtos de PCR em vetores de expressão. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa Primer – BLAST (WWW.ncbi.nih.gov/tools/primer-blast).

3.2 – Preparação de Taq Polimerase

A Taq Polimerase utilizada nas PCRs realizadas com objetivo de testar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos foi produzida no Laboratório de Biologia Molecular – UFG a partir de um clone de bactéria contendo o gene que codifica a Taq Polimerase (gentilmente cedido pela Profa. Dra. Raphaela Georg).

Foi feito um pré-inóculo do clone da Taq polimerase em 1mL de LB com 100mg/mL de ampicilina, crescido a 37 °C por 16 horas. O pré-inóculo foi colocado em 500mL de LB, com 100mg/mL de ampicilina e IPTG na concentração final de 0,4 mM, e levado ao agitador a 37 °C, por 16 horas. Os 500 mL de cultura foram centrifugados por 20 minutos a 2500rpm. O precipitado foi ressuscitado em 7,5mL de Tampão A e foram adicionados 60mg de lisozima, seguido de incubação por 25 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, foram acrescentados 15mL de Tampão B e a solução mantida a 75 °C, com agitação leve. O material foi centrifugado a 12000g, por 10 minutos, à 4 °C. Ao sobrenadante foram acrescentados 25 mL de Tampão de estocagem 1 e, posteriormente, 25mL de Tampão de estocagem 2 foram acrescentados e misturados. A Taq polimerase foi armazenada a -20 °C.

3.3 - Obtenção dos cDNAs através de transcrição reversa seguida de PCR

Os mRNAs, obtidos em diferentes tempos da diferenciação de micélio para levedura, foram utilizados para síntese de cDNAs (gentilmente cedidos pela doutoranda Dayane C R Araújo) através da transcrição reversa. Um microlitro de cada reação foi utilizado para amplificação dos cDNAs que codificam as subunidades catalíticas da PKA de *P. brasiliensis* através de PCR. Os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1% e purificados utilizando-se o “GFX purification kit” (GE Healthcare).

3.4 – PCR

Inicialmente, foram realizadas reações de PCR para testar os primers e as condições de amplificação, como descrito a seguir: 1,0µL de cDNA; os oligonucleotídeos direto e reverso, correspondentes à cada subunidade catalítica, na concentração final de 1,0µM cada; dNTPs na concentração final de 0,2mM, MgCl₂ na concentração final de 2,0mM; tampão de reação da

Taq polimerase na concentração final 1x, 5µL de Taq polimerase preparada de acordo com o protocolo já descrito e água Mili-Q para um volume final de 100µL.

As reações de PCR feitas com o objetivo de clonar os genes que codificam PKAc1 e PKAc2 foram feitas utilizando *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), o seu respectivo tampão 1x, MgSO₄ na concentração final de 2,0mM, dNTPs na concentração final de 0,2mM, os oligonucleotídeos direto e reverso na concentração final de 1,0µL, 30ng do respectivo cDNA (Pb01PKAc1 e Pb01PKAc2) e água Mili-Q para um volume final de 25µL.

As reações foram colocadas em um termociclador com a seguinte programação:

- 1 – 94° C por 4 minutos
- 2 – 94° C por 45 segundos
- 3 – 55° C por 1:30 minutos
- 4 – 72° C por 2 minutos
- 5 – 72° C por 5 minutos
- 6 – 4° C por tempo indeterminado

Foram 40 ciclos dos passos 2 ao 4.

3.5 – Digestão das amostras com enzimas de restrição e clonagem dos cDNAs em vetor de expressão

Os produtos de PCR e o vetor de expressão pGEX 4T-1 foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e SalI (*fast digest*, Fermentas). Cada reação foi feita com 1µL de cada enzima de restrição, o tampão universal (Fermentas) na concentração final 1x, e 2µg do respectivo material a ser digerido (os produtos de PCR ou o vetor de expressão pGEX 4T-1), totalizando 10µL. As reações foram colocadas em um termociclador nas temperaturas de 37°C, por 15 minutos e depois 80°C, por 5 minutos.

Os produtos de PCR purificados e digeridos foram ligados ao vetor de expressão pGEX-4T1 (GE Healthcare) digerido, o qual expressa proteínas em fusão com a GST. As reações de ligação foram montadas conforme descrito a seguir: 25 ng de vetor, 5 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), Tampão da enzima (Invitrogen) na concentração final 1x, 30ng de inserto correspondentes à Pb01PKAc1 ou Pb01PKAc2, para um volume total de 10µL. As reações foram mantidas a 14°C por três horas.

3.6 – Preparo de células termocompetentes

Foram preparadas células termocompetentes para transformação com os genes inseridos no vetor de expressão. O pré-inóculo foi feito com um colônia isolada de *E. coli DH5-α* em 5mL de meio LB crescido a 37 °C, por 16 horas. 500 μL do pré-inóculo foram colocados em 250mL de LB e mantidos a 37°C para crescer até uma DO de 0.5 ($\lambda=600$).

Quando a DO desejada foi atingida a cultura foi esfriada em banho de água e gelo e centrifugada por 5 minutos a 5000rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 30mL de solução de CaCl₂ 100mM gelada. Após incubação por 30 minutos no gelo a solução foi centrifugada por 7 minutos a 5500rpm. O *pellet* foi ressuspensionado em 10mL de CaCl₂ 100mM, com 15% v/v de glicerol gelado. Foram feitas alíquotas de 100μL que foram congeladas em nitrogênio líquido e depois armazenadas a -80°C.

3.7 – Transformação de células competentes de *Escherichia coli DH5-α*

Três μL de cada sistema de ligação foram colocados em alíquotas de 100μL de células termocompetentes de *Escherichia coli DH5-α* e ficaram incubadas no gelo por aproximadamente 45 minutos. Em seguida, foi dado o choque térmico à 42°C, por exatamente um minuto, seguindo a reação imediatamente para o gelo. As células foram colocadas em 300μL de meio de cultura líquido LB e levadas para o agitador à 37°C, por uma hora. Depois de uma hora, as culturas foram plaqueadas em meio de cultura sólido LB contendo IPTG na concentração final de 0,1 mM, 100mg/mL de ampicilina e 20mg/mL de X-Gal. As placas ficaram 16 horas na estufa à 37°C.

Cada clone obtido foi colocado em 100μL de meio LB e levado ao agitador, à 37°C, por uma hora. Depois, 1μL de cada cultura foi utilizado para amplificação do DNA, por PCR. Os produtos da PCR de colônia obtidos foram analisados em gel de agarose 1% para verificar se realmente continham o inserto e purificados utilizando-se o “GFX purification kit” (GE Healthcare).

3.8 – Sequenciamento das amostras e comparação com a sequência do banco de dados

Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados no Laboratório de Biologia Molecular – UFG, no equipamento MEGABACE 500. Para isso utilizamos os mesmos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR.

O resultado do seqüenciamento foi comparado com o banco de dados de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/) usando o algoritmo *BlastX*. Este algoritmo compara a sequência de nucleotídeos traduzida em todos os quadros de leitura com as proteínas presentes em um banco de dados.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Desenho dos oligonucleotídeos

Foram desenhados oligonucleotídeos para amplificação dos cDNAs que codificam as subunidades catalíticas da PKA (tabela 1). As sequências destacadas no início de cada oligonucleotídeo correspondem aos sítios para enzimas de restrição EcoRI e SalI. O tamanho esperado de cada fragmento é de aproximadamente 900pb (964pb para Pb01PKAc1 e 885pb para Pb01PKAc2).

Tabela 1: Primers para amplificação dos cDNAs das subunidades catalíticas da PKA

Primer	Sequência 5´- 3´
Pb01PKAc1_s	GAATTCTCTGTCCCGTCAGTTTCGCG
Pb01PKAc1_as	GTCGACGATCATCCCCACTGCCCC
Pb01PKAc2_s	GAATTCAGCGGCTGGACCAGTACAC
Pb01PKAc2_as	GTCGACAGCAATGGTTCGTCCTGGCGC

4.2- Teste da Taq Polimerase produzida no LBM-UFG

Inicialmente, foi feita uma PCR para testar a Taq polimerase produzida em nosso laboratório. O teste foi realizado com o cDNA de Pb01PKAc1, e seus respectivos oligonucleotídeos (figura 1).

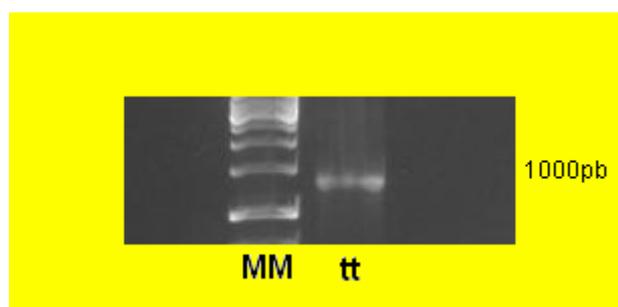


Figura 1: Amplificação de Pb01PKAc1 para testar a Taq polimerase.

4.3- Amplificação, purificação e clonagem dos cDNAs

Os cDNAs que codificam as subunidades catalíticas de PKA de *P. brasiliensis* foram amplificados através de PCR. Como mostrado na figura 2, o tamanho das bandas correspondentes à cada subunidade amplificada é o esperado (aproximadamente 900pb). A

banda de tamanho maior, presente nas amostras de Pb01KAc1 é correspondente ao DNA genômico.

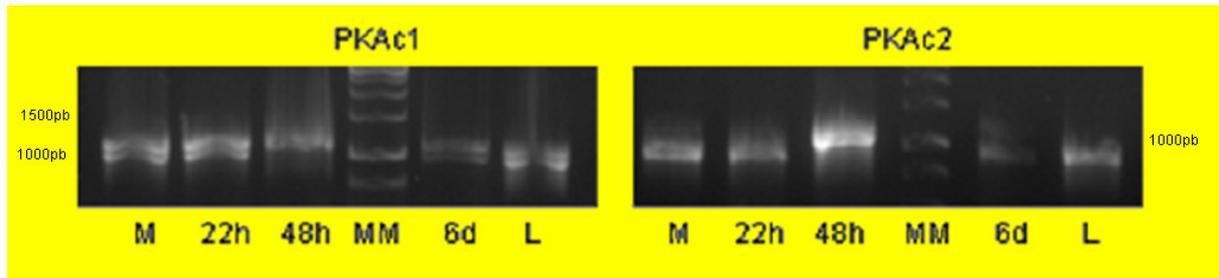


Figura 2: Amplificação de Pb01PKAc1 e Pb01PKAc2, nos diferentes tempos de diferenciação de micélio para levedura.

Para os passos de clonagem utilizamos somente a amostra M(micélio) e L(levedura) correspondentes às subunidades catalíticas de PKA, Pb01PKAc1 e Pb01PKAc2, respectivamente. As duas bandas presentes nas amostras de Pb01PKAc1 foram separadas e somente a banda menor foi purificada, pois corresponde ao cDNA. Assim como a banda de aproximadamente 900pb de Pb01PKAc2, que também foi purificada.

As amostras purificadas foram ligadas em vetor de expressão pGEX 4T-1 (GE Healthcare) e utilizadas para transformar células competentes de *Escherichia coli DH5-α*. Os clones obtidos foram amplificados por PCR para verificar se realmente continham os insertos desejados. Conforme mostrado na figura 3, os clones de Pb01PKAc1 são positivos e o clone obtido de Pb01PKAc2 é negativo, o que indica que a transformação em vetor de expressão funcionou somente para uma subunidade catalítica da PKA. As amostras denominadas c1 são dos clones de Pb01PKAc1, e a banda que apresentaram mostra que foram transformadas. A amostra denominada c2 corresponde ao clone de Pb01PKAc2 e não apresentou banda, evidenciando que não é um clone positivo.

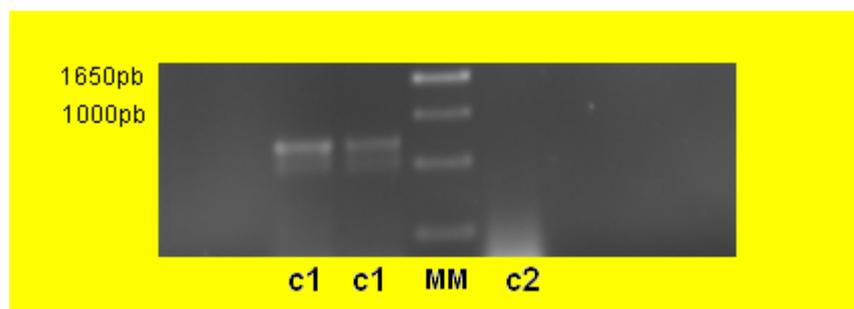


Figura 3: Amostras da clonagem em vetor de expressão, pGEX 4T-1.

Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados e o resultado do seqüenciamento confirmou a identidade de Pb01PKAc1. O resultado obtido no seqüenciamento foi comparado com o banco de dados de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/) através de *Blastx* (figura 4).

Target	Score (Bits)	Expect	Alignment Length	Identities	Positives
P. brasiliensis Pb01: PAAG_00108.1: cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit pkaC	223.787	0.0	157	113	121

Figura 4: Comparação entre a sequência clonada em pGEX e o banco de dados de proteínas de *P. brasiliensis*.

A comparação com o banco de dados confirmou o resultado do seqüenciamento, pois a amostra de Pb01PKAc1 seqüenciada apresentou alta similaridade com a sequência existente no banco de dados.

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para Pb01PKAc1, é possível prosseguir com os experimentos para expressar o gene que a codifica. Como os experimentos com Pb01PKAc2 não tiveram bons resultados, eles serão repetidos.

Os resultados obtidos são de fundamental importância para o desenvolvimento do projeto "Identificação dos alvos da proteína quinase dependente de cAMP durante a diferenciação do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis*", que está em andamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Borges-Walmsley, M. I. e Walmsley, A. R. (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends In Microbiology*: 133-141.

Brummer, E.; Castaneda, E. e Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6(2): 89-117.

Chen, D.; Janganan, T. K.; Chen, G.; Marques, E. R.; Kress, M. R.; Goldman, G. H.; Walmsley, A. R.; Borges-Walmsley, M. I. (2007). The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol.* Aug; 65(3): 761-79.

Felipe, M. S. S.; Andrade, R. V.; Petrofeza, S. S.; et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* 2003; 20: 263–271.

Fernandes, L.; Araújo, M. A.; Amaral, A.; Reis, V. C.; Martins, N. F.; Felipe, M. S. (2005). Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis* - inferred from comparisons with other fungi. *Genet Mol Res.* Jun 30; 4(2): 216-31.

Restrepo, A.; Gonzalez, A. e Agudelo, C. A. (2011). Paracoccidioidomycosis. In: Kuffman, C. A.; et al. (eds), *Essentials of Clinical Mycology*, New York, pp. 367-385.

Rooney, P. J. e Klein, B. S. (2002). Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol* 4(3): 127-137.

Yu, S.; Mei, F. C. J.; Lee C.; Cheng, X. (2004). In: Silva, B. V.; Horta, B. A. C.; Alencastro, R. B. e Pinto, A. C., *Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos*, Rio de Janeiro, pp. 553-554.