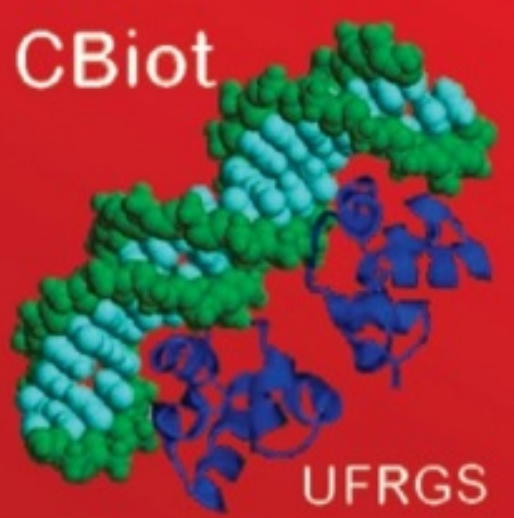


Expressão heteróloga de uma manoproteína de *Cryptococcus gattii* com potencial imunoterapêutico para o tratamento da criptococose.



Carolina Bettker Vasconcelos¹, Lívia Kmetzsch Rosa e Silva¹

¹ Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INTRODUÇÃO

Cryptococcus gattii é uma levedura encapsulada que atua como um dos principais agentes etiológicos da criptococose, podendo infectar indivíduos imunocomprometidos e também imunocompetentes. Esta infecção é caracterizada por atingir os pulmões e se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningite. Considerando que os atuais antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose são altamente tóxicos, estudos que visam gerar inovações na área de estratégias imunoterapêuticas para o tratamento desta infecção são de grande relevância. As manoproteínas, que correspondem cerca de 1% da composição da cápsula de *Cryptococcus*, têm capacidade imunogênica, podendo induzir resposta imune mediada por células T durante a infecção em modelo murino, o que as torna um interessante alvo de estudo. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial imunoterapêutico de uma manoproteína de *C. gattii* recombinante em ensaios de infecção experimental.

RESULTADOS

O gene CNBG_4278 de *C. gattii* possui 1427 nucleotídeos e codifica uma proteína de 411 aminoácidos com massa molecular predita de 43 kDa, a qual apresenta todas as características essenciais de uma manoproteína: (i) uma região rica nos aminoácidos serina e treonina, na qual manoses são adicionadas; (ii) um domínio C-terminal de ancoramento à GPI e (iii) um peptídeo sinal da região N-terminal.

A fim de expressar o produto gênico de CNBG_4278 em *Pichia pastoris*, modelo de expressão de proteínas eucarióticas que sofrem glicosilação, primers foram projetados com o intuito de excluir as regiões codificantes do peptídeo sinal e do sítio de ancoramento à GPI. O vetor escolhido para expressão da manoproteína recombinante foi o pPICZαC, o qual possui um peptídeo sinal na região N-terminal para secreção da proteína, um promotor induzível a metanol, uma cauda de histidina na região C-terminal e marca de seleção para Zeocina (Figura 1A). A clonagem ocorreu através da clivagem da ORF modificada amplificada por PCR e do vetor com as enzimas de restrição EcoRI e KpnI, seguido de ligação e posterior transformação em células de *Escherichia coli* linhagem TOP10F. A confirmação da clonagem foi realizada por clivagem com as enzimas de restrição KpnI, Sall, BglII e NcoI (Figura 1B) e posterior sequenciamento.

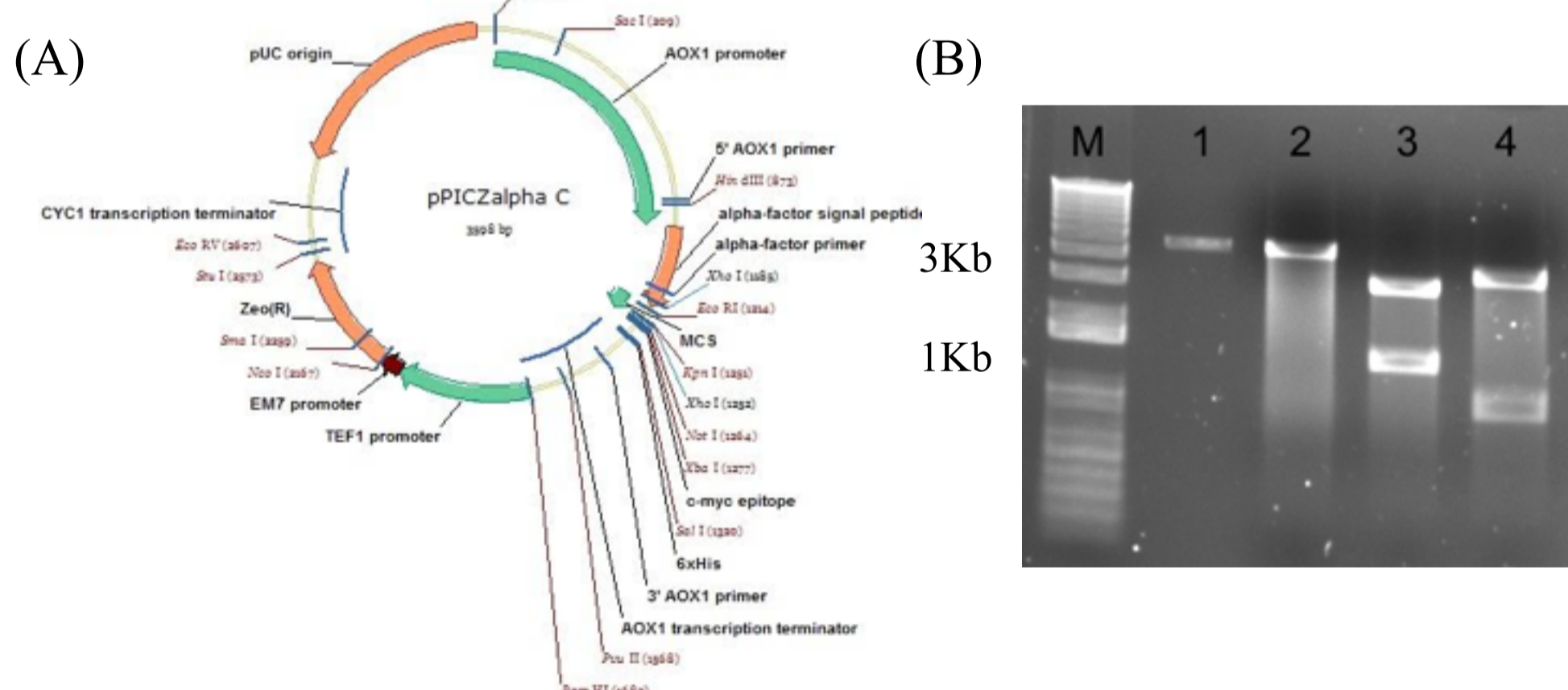


Figura 1. Mapa do vetor de expressão pPICZαC e confirmação da clonagem. A. Vetor pPICZαC utilizado para a expressão de CNBG_4278 em *P. pastoris*. B. Clivagem do vetor recombinante com as enzimas de restrição KpnI, Sall, BglII e NcoI. M, marcador de tamanho molecular 1Kb plus DNA ladder, indicado em pares de base. 1, pPICZαC_CNBG_4278 clivado com a enzima KpnI, a qual lineariza o vetor; 2, clivagem com Sall, a qual lineariza o vetor; 3, clivagem com a enzima BglII. Tamanho predito dos fragmentos: 3166 pb e 1494 pb. 4, clivagem com NcoI. Tamanho predito dos fragmentos: 3662 pb e 998pb.

Após a confirmação da construção do vetor, o mesmo foi linearizado com a enzima de restrição PmeI e transformado em células eletrocompetentes de *P. pastoris* X-33. Foram obtidos 38 transformantes resistentes à Zeocina, os quais foram confirmados por PCR de colônia. Posteriormente, 16 transformantes foram submetidos a um teste de indução com metanol em volume de 50 mL. A análise da expressão ocorreu pela coleta do sobrenadante, precipitação das proteínas com TCA 20% e visualização por eletroforese em gel SDS-PAGE. Os resultados demonstraram que não ocorreu a expressão da manoproteína recombinante.

Em decorrência dos resultados obtidos, optou-se por induzir a expressão heteróloga de CNBG_4278 em *E. coli*, com a finalidade de produzir anticorpo contra a mesma. A clonagem no vetor pET23D ocorreu no mesmo molde descrito anteriormente e foi intermediada pela clivagem

do produto de PCR e do vetor com as enzimas de restrição BamHI e HindIII (Figura 2A). A confirmação da construção foi realizada por PCR e por clivagem com as enzimas BamHI (Figura 2B) e NcoI (Figura 2C).

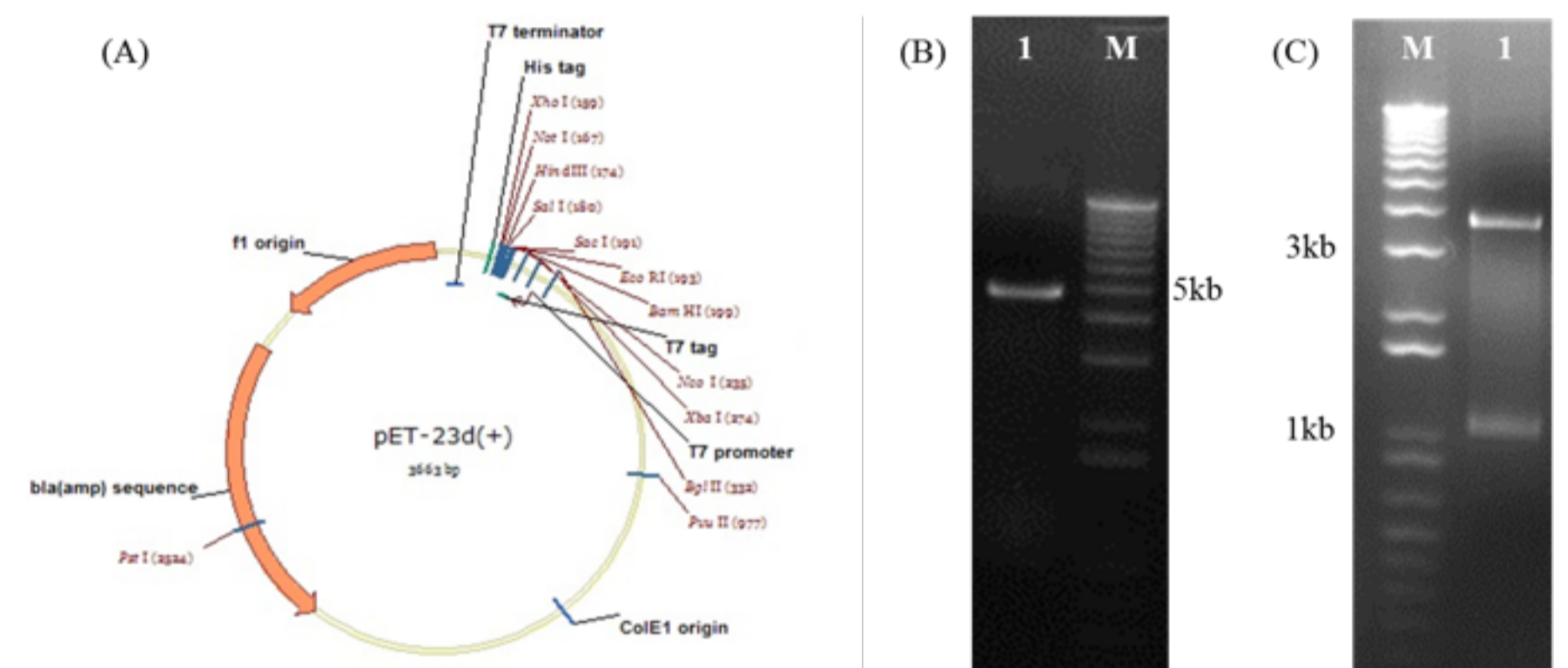


Figura 2. Mapa do vetor de expressão pET23D+ e confirmação da clonagem. A. Vetor pET23D+ utilizado para a expressão de CNBG_4278 em *E. coli*. B. Clivagem do vetor recombinante pET23D+_CNBG_4278 com BamHI, que lineariza o vetor. C. Clivagem de pET23D+_CNBG_4278 com NcoI. Tamanho predito dos fragmentos: 1054 pb e 3678 pb. M, marcador de tamanho molecular de 1Kb plus DNA ladder, indicado em pares de base.

Seguido da confirmação, o vetor recombinante pET23D_CNB6_4278 foi transformado via choque térmico em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e Rosetta. Então, foi realizado um teste de indução com 1mM de IPTG por 3 horas. A proteína recombinante não foi expressa na linhagem Rosetta, mas encontra-se na fração solúvel do lisado da linhagem pLysS.

Posteriormente, foi conduzido um teste de purificação em uma coluna de afinidade a níquel. No entanto, a proteína recombinante foi eluída nos tampões de lavagem (Figura 3A). A fim de confirmar se a mesma possui cauda de histidina, foi realizado um Western Blot com anticorpo monoclonal contra His-Tag (Figura 3B). O resultado confirmou que a proteína recombinante está sendo expressa em fase com a cauda de histidina do vetor pET23D.

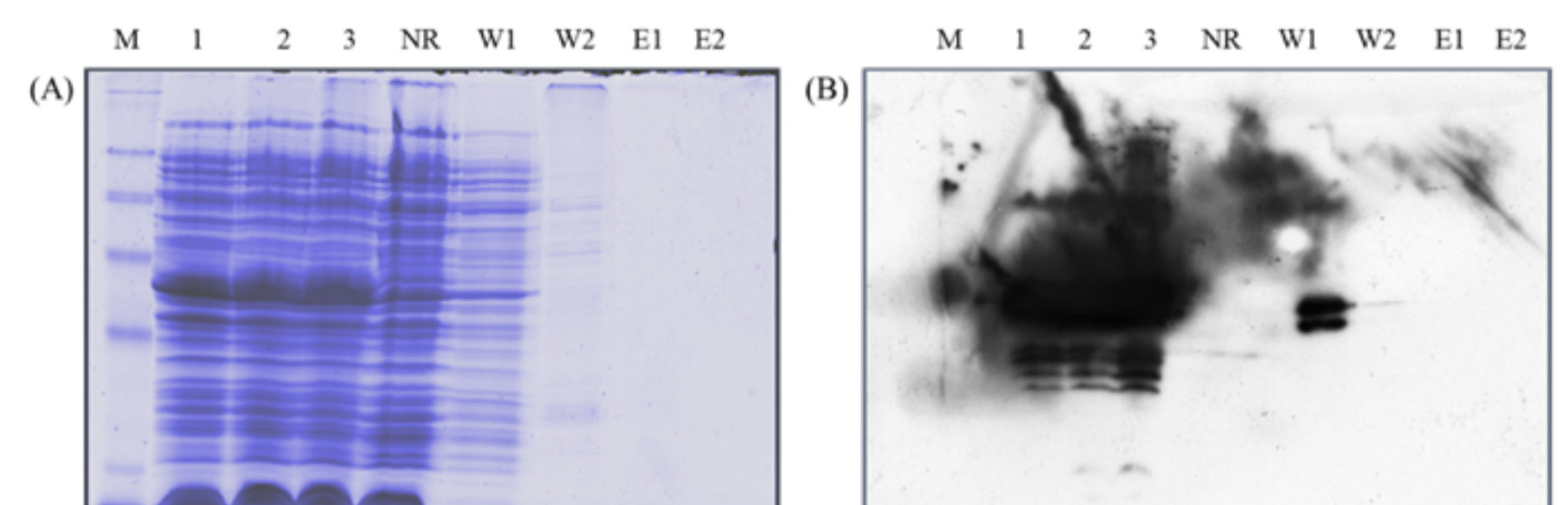


Figura 3. Purificação e Western Blot da manoproteína recombinante. Após 3 horas de indução com 1mM de IPTG em *E. coli* pLysS, a fração solúvel do lisado foi purificada em coluna de afinidade a níquel e suas frações foram analisadas por eletroforese em GEL SDS-PAGE e Western Blot com anticorpo anti-His-Tag. (A) SDS-PAGE. (B) Western Blot. Canaleta M: marcador de massa molecular ColorBurst (Sigma-Aldrich); Canaleta 1: fração solúvel após 1 hora de indução; Canaleta 2: fração solúvel após 2 horas de indução; Canaleta 3: fração solúvel após 3 horas de indução; Canaleta NR: fração não retida na coluna de afinidade a níquel; Canaleta W1: fração da primeira lavagem; Canaleta W2: fração da segunda lavagem; Canaleta E1: fração da primeira eluição; Canaleta E2: fração da segunda eluição.

PERSPECTIVAS

- Otimizar o processo de purificação da manoproteína recombinante;
- Produção de anticorpo anti-manoproteína recombinante;
- Testes do potencial imunoterapêutico da proteína recombinante e do anticorpo em ensaio murino da criptococose.