

Expressão heteróloga de manoproteína recombinante de *Cryptococcus gattii* em *Escherichia coli*.

Heryk Motta de Souza^{1*}, Charley Christian Staats¹

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



Introdução

A criptococose é uma infecção fúngica de alta importância clínica, frequentemente manifestada como pneumonia, podendo ou não ser associada à meningoencefalite. Dentre os agentes etiológicos causadores desta doença, pode-se destacar a levedura *Cryptococcus gattii* por possuir maior incidência de infecção em pacientes imunocompetentes quando comparada à *Cryptococcus neoformans*. Dentre os fatores de virulência que levam ao sucesso na infecção, há expressão de uma cápsula polissacarídica capaz de modular o sistema imunológico do hospedeiro. Cerca de 1% da composição desta cápsula é constituída por manoproteínas, as quais possuem a capacidade de induzir resposta imune mediada por células T em modelo murino de infecção. Considerando o exposto, este trabalho tem como objetivo a produção de uma manoproteína de *C. gattii* através da expressão heteróloga em *E. coli*, purificação e posterior avaliação de seu potencial terapêutico em modelo murino de criptococose.

Resultados

Através de análise *in silico* do genoma de *C. gattii*, evidenciou-se a presença de uma proteína hipotética conservada, com massa molecular predita de 43 kDa, codificada pelo gene CNBG4278. Essa proteína possui todas as características essenciais de uma manoproteína: uma região rica nos aminoácidos serina e treonina, em que as manoses são adicionadas; um domínio C terminal de ancoramento à GPI e uma região na porção N terminal onde se localiza um peptídeo sinal para secreção.

Com finalidade de expressar CNBG4278 em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, a região codificante da manoproteína foi amplificada por PCR e clonada no vetor de expressão pET23D(+) (Figura 1A). A confirmação da clonagem foi realizada a partir da clivagem do vetor recombinante pET23D_CNBG4278 com as enzimas de restrição BamHI (Figura 1B) e NcoI (Figura 1C).

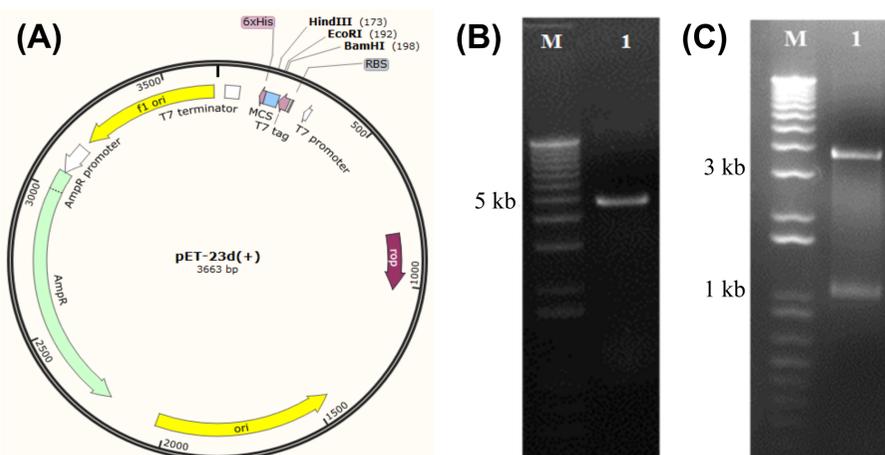


Figura 1. Mapa do vetor de expressão pET23D+ e confirmação da clonagem. (A) Vetor pET23D+ utilizado para a expressão de CNBG4278 em *E. coli*. (B) Clivagem do vetor recombinante pET23D+_CNBG4278 com BamHI, que lineariza o vetor. (C) Clivagem de pET23D+_CNBG4278 com NcoI. Tamanho predito dos fragmentos: 1054 pb e 3678 pb. M, marcador de tamanho molecular de 1 kb plus DNA ladder, indicado em pares de base.

A indução da expressão é realizada com a adição de 20 g/L de lactose ao meio de cultivo. A manoproteína recombinante se encontra tanto na porção de proteínas solúvel quanto insolúvel (Figura 2)

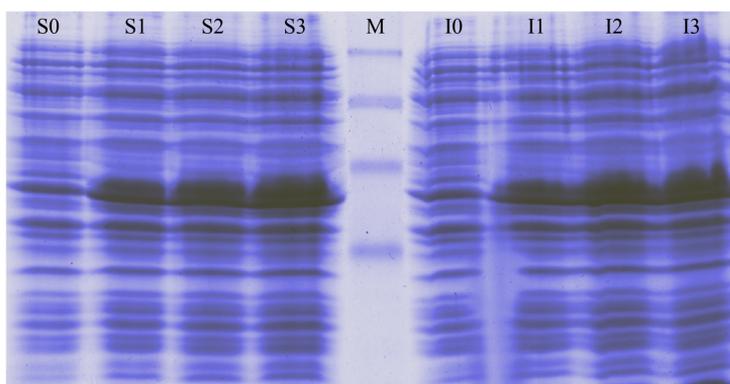


Figura 2. SDS-PAGE das frações solúveis e insolúveis do lisado celular após indução da expressão com 20 g/L de lactose. S0-S3: frações solúveis de 0 h a 3 h de indução; M: marcador de massa molecular de proteínas (BenchMark – Invitrogen); I0-I3: frações insolúveis de 0 h a 3 h de indução;

A purificação da manoproteína recombinante é realizada em uma coluna de afinidade à cobalto (IMAC) (Figura 3).

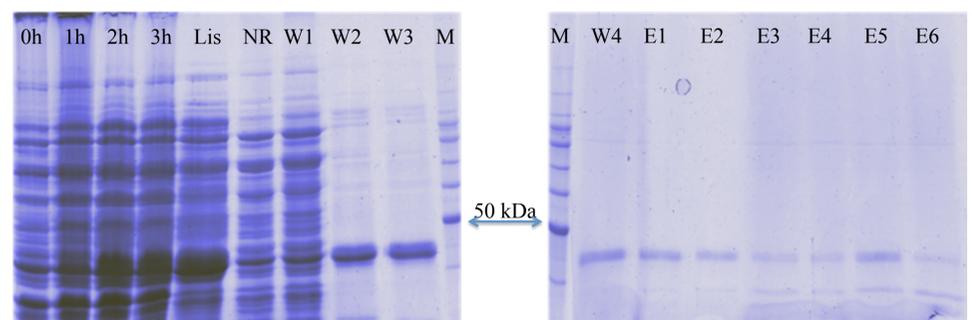


Figura 3. SDS-PAGE de aliquotas da fração solúvel do lisado celular purificadas por coluna de afinidade à cobalto. 0h-3h: frações solúveis de 0 h a 3 h de indução; Lis: lisado celular; NR: fração não retida pela coluna; W1-W4: frações do tampão de lavagem da coluna; E1-E3: frações do tampão de eluição com concentração de imidazol 250 mM; E4-E6: frações do tampão de eluição com concentração de imidazol 500 mM. M: marcador de massa molecular de proteínas (BenchMark – Invitrogen);

Para testar a imunogenicidade da manoproteína recombinante, foi realizado um Western blot utilizando pool de soros de pacientes infectados com *Cryptococcus* sp. (Figura 4).

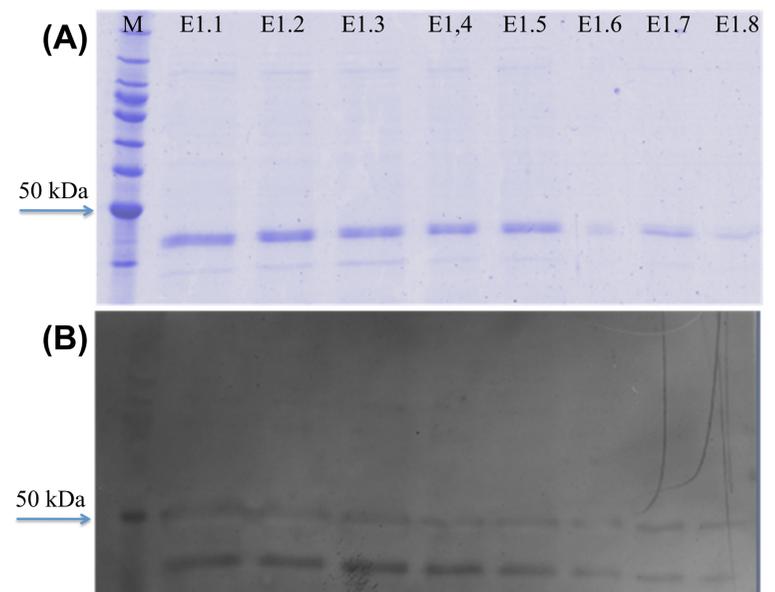


Figura 4. SDS-PAGE espelho e Western blot utilizando pool de soros de pacientes infectados com *Cryptococcus* sp. (A) SDS-PAGE do E1.1-E1.8: E1 em diluição seriada de 1,88µg à 0,24 µg; M: marcador de massa molecular de proteínas (BenchMark – Invitrogen); (B) Western blot utilizando pool de soro de pacientes infectados com *Cryptococcus* sp.

Perspectivas

- Gel filtração da fração semi-purificada em coluna High Load 16/60 Superdex 200 Prep grade;
- Produção de anticorpos policlonais em coelho;
- Testes de imunização passiva e curativa em modelo murino de criptococose.