

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 4-HIDROXIFENILPIRUVATO DIOXIGENASE (4-HPPD) DE *PARACOCIDIROIDES BRASILIENSIS*

Juliana de Fátima dos Santos Silva¹; Daniela Leite Jabes²; Valquíria Campos Alencar³; Luiz R. Nunes⁴.

Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail julianafssilva@outlook.com¹
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br²
Pós-doutorando da Universidade Mogi das Cruzes; valquiriacalencar@gmail.com³
Orientador do Programa de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com⁵

Área do Conhecimento: Genética Molecular, Microbiologia, Bioquímica.

Palavras-Chave: *Paracoccidioides*; 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase; Clonagem gênica.

INTRODUÇÃO

O fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente causador da micose sistêmica paracoccidioidomicose, endêmica da América Latina (MARQUES, 2013). Seu dimorfismo é associado a variação de temperatura onde, a 24°C, possui a morfologia conidial com propágulos infectantes e em 37°C, a forma leveduriforme com brotamentos (LACAZ *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2005). Estudos realizados sobre a modulação gênica de *P. brasiliensis* durante a transição micélio-levedura demonstraram a superexpressão de alguns genes, com destaque o gene que codifica a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD), cuja inibição na presença de uma substância conhecida como Nitisinona, foi capaz de bloquear a transição dimórfica (NUNES *et al.*, 2005). Esta enzima, 4-HPPD, se encontra envolvida na via catalítica da tirosina e da fenilalanina, conhecidas como vias formadoras de precursores para a síntese de melaninas (eumelaninas e piemelaninas) (KEON, J., HARGREAVES, J., 1998; MORAN, G. R., 2004). A atividade da 4-HPPD leva ao acúmulo de ácido hogentísico, substância que possui o potencial de atuar como bloqueador de ataques oxidativos, notadamente mediadores liberados por macrófagos de hospedeiros infectados e cuja ação parece ser decisiva para garantir o sucesso da infecção por *P. brasiliensis*. Diversos fungos também apresentaram a superexpressão do gene que codifica a enzima 4-HPPD durante a transição termodimórfica: *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides spp.*, *Blastomyces dermatitidis*, e *Talaromyces marneffeii*. Portanto, a 4-HPPD pode estar relacionado, além da transição dimórfica, como um grande fator de virulência e sobrevivência dentro do hospedeiro (KIRKLAND, 2016). Sendo assim, é de extrema relevância o estudo mais aprofundado deste gene, uma vez que parece ter papel fundamental na patogenicidade dos fungos dimórficos.

OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo clonar, expressar e purificar a proteína 4-HPPD (4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase) de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado 18.

METODOLOGIA

Primers foram desenhados utilizando as sequências dos sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *BamHI*. Então, foi realizada a extração de RNA com TRizol® (Life Technologies). O cDNA foi sintetizado a partir de 3 µg de RNA total, 2 µL de *primer* oligo dT (Invitrogen) e água RNase *free* (qsp 19 µL), com purificação em Microcon YM-30 (Millipore) e a quantificado em NanoDrop ND-1000. Em seguida, o material sintetizado foi amplificado utilizando 200 ng do cDNA, 1 µL dos iniciadores *forward* e *reverse* (10 mM), 1 µL de mix de dNTPs (10 mM), 5 µL de Buffer MgCl₂ 10X, 1 µL de Taq DNA Polimerase (500 U/µL – Invitrogen) e água Milli-Q. O plasmídeo e o cDNA amplificado foram digeridos utilizando 3 µg de DNA, 5 µL de *buffer* 3.1 10X, 1 µL de cada enzima e água Milli-Q para um volume final de 50 µL. A reação foi a 37°C por 2h, sendo adicionado 1 µL de EDTA 0,5M em cada uma das amostras. As reações foram mantidas a 65°C por 30 min, purificadas em kit GE-Healthcare e avaliadas em gel de agarose 0,8%. Bactérias das linhagens de *E.coli* DH5α e BL21 (D3) foram crescidas em meio LB (10% Triptona, 5% extrato de levedura, 10% NaCl e 1,5% de ágar) e mantidas em *shaker* por 250 rpm a 37°C até que atingissem a densidade ótica 600_{nm}=0,5. Posteriormente, as culturas foram transferidas para tubos de centrifuga com MgCl₂ 1M e, após, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados ao *pellet* a solução RFI (KCl 1M, MgCl₂ 1M, KAc pH 6.9, 0,5M, CaCl₂ 1M, pH 5.8) e novamente centrifugadas e descartado o sobrenadante, com adição da solução RFII (NaMOPS 0,5M pH 7.0, KCl 0,5M, CaCl₂ 1M, glicerol 100%, pH 6.8). O volume final foi congelado em nitrogênio líquido, sendo estocado a -70°C. As reações de ligação foram feitas na presença de T4 DNA Ligase (3U/µL - Invitrogen) nas quantidades indicadas pelo fabricante. As reações foram incubadas em temperatura ambiente por 1h e mantidas a 4°C durante 24 h. O material resultante da ligação foi adicionado em uma reação contendo 20 µL de bactérias competentes DH5α e incubada por 30 min no gelo, aquecidas por 2 min a 42°C e resfriadas por 5 min no gelo com posterior adição de meio LB e mantidas por 1h30 em *shaker* (250 rpm, 37°C) com posterior plaqueamento em LB sólido com kanamicina (50 µg/mL) para crescimento *overnight*. Colônias foram selecionadas para amplificação e posterior avaliação em gel de agarose 0,8% onde, sendo confirmado o sucesso da ligação, crescidas em 5 mL de meio LB com kanamicina (50 µg/mL) para extração do DNA plasmidial. Em seguida, o material extraído foi encaminhado para sequenciamento (3500xl Genetic Analyzer-Applied Biosystems). Foi realizada novamente a transformação, mas utilizando bactérias BL21 (D3). Após, foi preparada a reação para expressão da proteína, utilizando meio LB contendo kanamicina (50 µg/mL) e o indutor IPTG (0,1 M) separando alíquotas sem induzir, com indução, após 4 h e 20 h, para análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Em seguida, as amostras induzidas e solubilizadas seguiram para a purificação por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna His-Trap 1 mL (GE, EUA) acoplada a um cromatógrafo de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) AKTA (GE, EUA). As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Por fim, as frações contendo a proteína recombinante foram dialisadas para remoção do imidazol e concentradas em Centricon®30 (Amicon Division).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade das amostras obtidas da extração de RNA de leveduras de *P. brasiliensis* foi avaliada pela presença bandas de RNA ribossomal 18S e 28S, onde observou-se a integridade do material extraído. Posteriormente, as amostras seguiram para a reação de síntese de cDNA e digestão juntamente com o vetor de clonagem, pET-28a(+), sendo que a qualidade do material foi verificada em gel de agarose 0,8%. Em seguida, foi realizada a etapa de ligação do gene ao vetor e transformação em linhagens de *E.coli* DH5α onde,

para verificar a eficiência e sucesso da ligação, realizou-se uma PCR de colônia com confirmação de colônias que obtiveram a inserção do plasmídeo recombinante. Posteriormente, o material foi extraído e preparado para Sequenciamento de Sanger que confirmou a presença da cauda N-terminal, importante para a purificação por cromatografia de afinidade, assim como o início e final do gene em fase de leitura. Em seguida, nova transformação foi realizada mas utilizando de bactérias da linhagem de *E.coli* BL21 (D3) e, como indutor, IPTG (Invitrogen) com confirmação do sucesso desta etapa em 20 horas de indução em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Subsequentemente, foram realizados testes de solubilidade as frações solúvel e insolúvel onde houve a análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Surpreendentemente, os resultados indicaram que a proteína recombinante mostrou uma tendência a acumular-se na fração insolúvel, formando corpos de inclusão. Portanto, a proteína recombinante só pode ser purificada a partir de extratos celulares obtidos sob condições desnaturantes, na presença de 8M de ureia, 0,5% SDS e 5mM DTT. Após a desnaturação, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade, sendo obtida na fração com 100% de imidazol. Após a purificação, a proteína foi renaturada e concentrada. Apresentando uma série restrita de genes, *Paracoccidioides brasiliensis* e outros fungos dimórficos demonstraram a superexpressão do gene que codifica a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD) durante a transição dimórfica (NUNES *et al.*, 2005). O estudo de vias metabólicas diferentes das usuais para o uso de novos fármacos é de extrema importância, uma vez que já há descrição de fungos resistentes a antifúngicos clássicos, incluindo alguns isolados de *P. brasiliensis* (HAHN *et al.*, 2003, DA SILVA NETO *et al.*, 2014). A via metabólica de tirosina pode ser definida como a principal produtora de melanina. Esta é a via de geração dos pigmentos eumelanina e piemelanina, produzidas por *P. brasiliensis* (TABORDA *et al.*, 2009), na qual se utiliza como substrato para formação da tirosina, a enzima 4-HPPD. Além disso, a 4-HPPD também está associada a detoxificação de espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, é de extrema relevância o estudo mais aprofundado deste gene, uma vez que parece ter papel fundamental na patogenicidade dos fungos dimórficos. Os resultados apresentados demonstram a eficiente produção *in vitro* da proteína recombinante 4-HPPD de *P. brasiliensis* que futuramente, será utilizada em experimentos de atividade enzimática. Além disso, ensaios de inibição enzimática durante a caracterização funcional e durante a transição micélio-levedura *in vitro* de *P. brasiliensis* isolado 18, utilizando compostos como Mesotriona, Trembotriona, Topramezona e Isoxaflutole, análogos a Nitisinona.

CONCLUSÕES

O gene que codifica a enzima 4-HPPD foi devidamente extraído, amplificado e clonado no vetor de clonagem pET-28a(+) assim como foram produzidas bactérias competentes das linhagens de *E.coli* DH5 α e BL21 (D3) que foram utilizadas na transformação da ligação e expressão da proteína recombinante, respectivamente. Após extensos tratamentos com a proteína, que descobriu-se ser insolúvel, esta foi purificada utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de afinidade FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA (GE, EUA), no qual foi concentrada posteriormente, obtendo-se uma massa total final de 1,3324 mg. Desde modo, estudos futuros serão conduzidos por meio de ensaios enzimáticos para confirmar a função bioquímica da proteína recombinante 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD). Adicionalmente, serão realizados ensaios de inibição enzimática durante a caracterização funcional e durante a transição micélio-levedura *in vitro* de *P. brasiliensis* isolado 18, utilizando compostos análogos a Nitisinona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidioidomicose. Tratado de Micologia Médica, 9º edição, São Paulo, Sarvier, 2002.

KEON, J.; HARGREAVES, J. Isolation and heterologous expression of a gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the wheat leaf-spot pathogen *Mycophaerella graminicola*. **FEMS Microbiology Letters**, 161, 337-343, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidioidomicose. Tratado de Micologia Médica, 9º edição, São Paulo, Sarvier, 2002.

KIRKILAND, T. N. A few shared up-regulated genes may influence conidia to yeast transformation in dimorphic fungal pathogens. University of California San Diego, School of Medicine. Março, 2016.

MARQUES, A. S. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. *An Bras Dermatol.* v. 88, n. 5, p. 700-711, 2013.

MORAN, G. R. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Arch. Biochem. Biophys.** 433:117-128. Janeiro, 2005.

NUNES, L. R.; COSTA DE OLIVEIRA, R. L. B.; LEITE, D. B.; DA SILVA, V. S.; MARQUES, E. R.; FERREIRA, M.E. S.; RIBEIRO, D. C. D.; BERNADES, L. A. S.; GOLDMAN, M. H. S.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; BATISTA, W. L.; NÓBREGA, M. P.; NÓBREGA, F. G.; YANG, D. Y.; PEREIRA, C. A. B.; GOLDMAN, G. H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing the Mycellium-to-Yeast transition. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 12, p. 2115-2128, dezembro 2004.

AGRADECIMENTOS

A UMC PELA BOLSA DE ESTUDO, A FAEP PELA OPORTUNIDADE DE REALIZAÇÃO DESTE PROJETO E A UFABC PELO COLABORAÇÃO EM ALGUNS EXPERIMENTOS. E AOS AMIGOS DE LABORATÓRIO E PROFESSORES POR TODA AJUDA E CONHECIMENTO COMPARTILHADO.