

Expressão heteróloga da manoproteína MP43 de *Cryptococcus gattii* com potencial imunoterapêutico para o tratamento da criptococose

Júlia Reuwsaat¹, Marilene Vainstein¹.

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.



INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras encapsuladas e os principais agentes etiológicos da criptococose em humanos. Essa doença é caracterizada por atingir os pulmões e disseminar-se para o sistema nervoso central, causando o estado mais grave da doença, a meningoencefalite. *C. neoformans* infecta preferencialmente pacientes com o sistema imune comprometido, enquanto *C. gattii* possui a habilidade de infectar pacientes imunocompetentes. *C. gattii* passou a ser grande alvo de estudo principalmente por sua capacidade de infectar pacientes saudáveis, fazendo com que novas estratégias imunoterapêuticas sejam desenvolvidas para o combate da infecção. As manoproteínas, que correspondem a aproximadamente 1% da composição da cápsula de *Cryptococcus*, são altamente imunogênicas e induzem resposta imune mediada por linfócitos T durante a infecção em modelo murino. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial imunoterapêutico da manoproteína MP43 recombinante de *C. gattii* em ensaios de infecção experimental.

RESULTADOS

Análises *in silico* do genoma de *C. gattii* R265 revelaram a presença de gene codificador de uma manoproteína com massa molecular predita de 43 kDa (sem a massa predita da glicosilação), anotada como proteína hipotética conservada, a qual nomeamos de MP43. Seu ortólogo em *C. neoformans* é diferencialmente expresso em condições de privação de micronutrientes e a proteína codificada pelo mesmo foi encontrada no sobrenadante de cultivo da levedura. Análises *in silico* sugerem que a proteína de *C. gattii* possui todas as características essenciais de uma manoproteína: uma região rica em serinas e treoninas, um sítio de ancoramento à GPI na região C-terminal e um peptídeo sinal na região N-terminal da proteína para secreção. A predição de O-glicosilação pelo algoritmo GlycoEP mostrou um sítio intenso de glicosilação de serinas e treoninas entre os aminoácidos 340 e 384 da manoproteína (Tabela 1). Para expressão heteróloga da MP43 em *Pichia pastoris*, modificações na região codificante do gene foram realizadas para o aumento da eficiência no processo de purificação da proteína recombinante, como a adição de uma cauda de histidinas em sua região N-terminal e a deleção do sítio de ancoramento à GPI e peptídeo sinal endógenos (Figura 1).

Manoproteína MP43 (CNBG_4278)

MLAAAALA^SLLATIAVNAVTCVQFDSSWNLYAFGGDQDVKIGDNNTW^{SSPSTIP}
L^{STI}GRPPW^IGNNTQCILSQTNNAMYVIGADSDDLSSIVYDFAGNSW^{IQNI}
S^RTIPSDLGNSR^{SSSVLDHDI}NVFFTLTDSGLYQLDLSSI^{INSASSDILRWEAVE}
NPSFSDVGYFVTAQAANHIFVYFGAPGAASG^SAYIFVVHYAYFQPKAQAFNG^{IA}
FPDASGQAISIPSAANNV^{PYS}MVFIPHDFSDTYIVTHWTDLS^{DYSV}ISDAPFDVN
LINS^{IQTL}PAP^ISQDKAAAYAASPYAIVQIDAAGDIY^{MSSPVQSDY}IVSSASW
EKLGYSLT^{LSKSKD}^{TSSSSITTS}^{GSITTT}GAT^{HGS}AS^{GTAS}SRPGSTDNAS^{SAS}
N^{SSSGARRMAT}RGDVLGLFV^{GALAVAAGILM}

Tabela 1. Predição da O-glicosilação pelo algoritmo GlycoEP. Os aminoácidos serina e treonina em vermelho são os possíveis sítios de O-glicosilação (score entre 0 e 0.99)



Figura 1. Arquitetura modular da manoproteína MP43 de *C. gattii*. Essa manoproteína possui um peptídeo sinal (SP) em sua região N-terminal, uma região rica nos aminoácidos serina e treonina com potencial sítio de O-glicosilação (SerThr e hastes cinzas) e um sítio de ancoramento à GPI na região N-terminal (haste vermelha). Para expressão heteróloga em *P. pastoris*, a sequência nucleotídica correspondente aos primeiros 20 e aos últimos 30 aminoácidos foi excluída para a clonagem no vetor de expressão.

Foi realizada pelo nosso grupo de pesquisa uma análise transcricional por RNAseq de *C. gattii* R265 durante a interação com hospedeiro murino e na privação de micronutrientes como zinco e cobre *in vitro*. Foi detectado um aumento relativo nos níveis de transcritos do gene CNBG_4278 na condição de interação com o hospedeiro em relação às condições de depleção de micronutrientes (Figura 2).

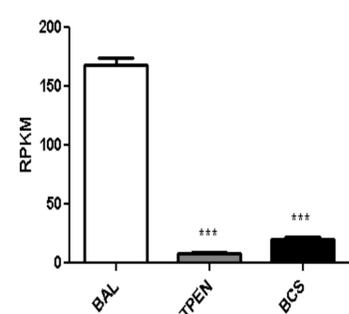


Figura 2. Níveis relativos dos transcritos codificadores da MP43 nas condições de interação com o hospedeiro e depleção de micronutrientes. Para a análise da interação *C. gattii* - hospedeiro, foi extraído RNA total do lavado brônquio-alveolar de camundongos após 24h de infecção. RPKM, número de reads codificadores de MP43 dividido pelo tamanho do transcrito e normalizado pelo número total de reads. BAL, lavado brônquio alveolar. TPEN, quelante de zinco. BCS, quelante de cobre. *** p<0.0001

A clonagem da sequência nucleotídica codificadora da manoproteína foi realizada no vetor pHIL-S1. A amplificação da região codificante de MP43 foi realizada a partir de cDNA de *C. gattii* R265. O vetor pHIL-S1 possui um peptídeo sinal para secreção da manoproteína recombinante para o sobrenadante de cultivo, um promotor induzível à metanol e marca auxotrófica para histidina (Figura 3A). A confirmação da clonagem foi realizada por sequenciamento e clivagem com a enzima BglIII (Figura 3B).

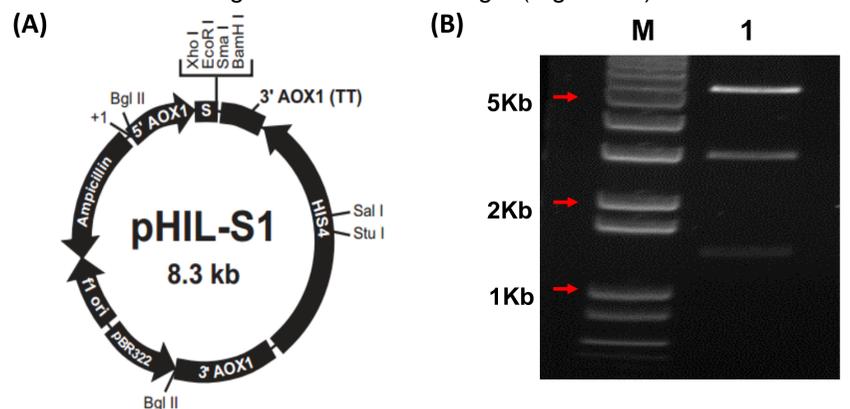


Figura 3. Mapa do vetor de expressão e confirmação da clonagem. A. Vetor pHIL-S1 utilizado para a expressão em *P. pastoris*. B. Clivagem do vetor de expressão com a enzima BglIII. M, marcador de massa molecular 1kb plus DNA ladder indicado em pares de base. 1, vetor pHIL-S1_MP43 clivado com a enzima BglIII. Tamanho predito dos fragmentos: 5183pb, 2868pb e 1291pb.

Para expressão heteróloga em *P. pastoris*, duas linhagens foram testadas: KM71 e GS115. Ambas possuem o gene *his4* mutado, sendo auxotróficas para a síntese de histidina. A linhagem GS115 possui o gene *AOX1* codificador da enzima álcool oxidase funcional, sendo considerada Mut+, enquanto a linhagem KM71 possui o mesmo gene mutado, sendo considerada MutS. Para a inserção do vetor de expressão pHIL-S1_MP43 no genoma da levedura, o mesmo foi linearizado com a enzima Sall. Células eletrocompetentes das duas linhagens foram transformadas com o vetor e 164 colônias foram recuperadas em meio sem histidina. Foi possível identificar dois transformantes da linhagem GS115 expressando uma proteína de massa molecular de aproximadamente 100 kDa associada à parede celular de *P. pastoris* (Figura 4A). Análise de proteínas glicosiladas confirmou que a proteína de aproximadamente 100 kDa expressa é glicosilada (Figura 4B).

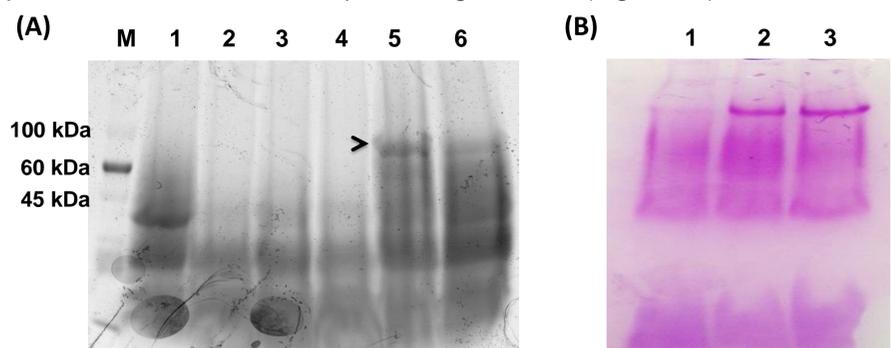


Figura 4. Análise de proteínas associadas à parede celular e glicosiladas dos transformantes de *P. pastoris*. A. Proteínas covalentemente ligadas à parede celular. Canaleta M: marcador de massa molecular ColorBurst (Sigma-Aldrich); Canaleta 1: GS115-Albumina; Canaleta 2: KM71-2; Canaleta 3: KM71-4; Canaleta 4: KM71-5; Canaleta 5: GS115-4; Canaleta 6: GS115-6. A flecha indica a proteína de aproximadamente 100 kDa identificada no extrato das linhagens transformantes. B. Após a eletroforese, o gel de SDS-PAGE foi corado com soluções do kit *Glycoprotein Detection kit* (Sigma-Aldrich). Canaleta 1: controle GS115-Albumina; Canaleta 2: GS115-4; Canaleta 3: GS115-6.

PERSPECTIVAS

1. Clonagem do gene codificador da MP43 nos vetores pPIC3.5 e pHIL-D2 para expressão intracelular em *P. pastoris*;
2. Purificação e avaliação do potencial imunoterapêutico da manoproteína recombinante em modelo murino de criptococose.