



Evento	Salão UFRGS 2014: SIC - XXVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2014
Local	Porto Alegre
Título	Expressão heteróloga da manoproteína MP43 de <i>Cryptococcus gattii</i> com potencial imunoterapêutico para o tratamento da criptococose
Autor	JÚLIA CATARINA VIEIRA REUWSAAT
Orientador	MARILENE HENNING VAINSTEIN

Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* são leveduras encapsuladas e os principais agentes causadores da criptococose. Essa infecção é caracterizada por atingir os pulmões e se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningite. *C. neoformans* infecta principalmente pacientes imunocomprometidos, embora já existam relatos de infecção em pacientes saudáveis. Já *C. gattii* infecta indivíduos imunocompetentes. Acreditava-se que a ocorrência de *C. gattii* era limitada às regiões tropicais e subtropicais, como Austrália, Nova Zelândia e sudeste da Ásia. Porém, após o surto de infecção por *C. gattii* na ilha de Vancouver, Canadá, admitiu-se também a ocorrência do fungo em regiões de clima temperado. As manoproteínas, que correspondem a aproximadamente 1% da composição da cápsula de *Cryptococcus* spp, são altamente imunogênicas e induzem resposta imune mediada por células T durante a infecção em modelo murino. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial imunoterapêutico de uma manoproteína recombinante de *C. gattii* em ensaios de infecção experimental. Análises *in silico* do genoma de *C. gattii* evidenciaram a presença de uma manoproteína com massa predita de 43kDa, anotada como proteína hipotética conservada, a qual denominamos MP43. Essas análises sugerem que MP43 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 o intuito de expressar MP43 em *Pichia pastoris* para posterior purificação e utilização em ensaios de avaliação do potencial imunoterapêutico na terapia da criptococose, primers foram projetados eliminando as regiões do peptídeo sinal e da âncora de GPI, para maior eficiência durante a purificação da proteína. O fragmento foi amplificado e clonado no plasmídeo pHIL-S1, amplamente utilizado em sistemas de expressão em *P. pastoris*. Esse vetor possui uma sequência que codifica um peptídeo sinal e um promotor induzido por metanol. A confirmação da construção foi realizada por clivagem com as enzimas PstI e BglII e posterior sequenciamento. Foi realizada a clivagem do vetor pHIL-S1_MP43 com a enzima SalI para linearização. A transformação de *P. pastoris* com o vetor foi realizada através de eletroporação de células competentes de duas linhagens diferentes da levedura: KM71, que possui o gene AOX1 que codifica a enzima álcool oxidase deletado e GS115, que possui o gene AOX1 intacto. Ambas as linhagens possuem o gene HIS4 não funcional. A inserção do vetor no genoma da levedura ocorreu por recombinação homóloga entre as porções do gene de HIS4, levando à reconstituição do gene. Inicialmente foram obtidas 4 colônias recombinantes, duas da linhagem KM71 e duas da linhagem GS115. A expressão heteróloga da MP43 nessas quatro linhagens não foi bem sucedida e estamos realizando outro processo de transformação para avaliação de novos transformantes. Após a expressão e purificação da manoproteína MP43 de *C. gattii* recombinante serão realizados testes para avaliar o potencial imunoterapêutico da mesma em modelo murino de criptococose.