

## INTRODUÇÃO

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura patogênica que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. O principal fator de virulência deste patógeno é a produção de uma cápsula polissacarídica que possui propriedades imunomodulatórias. O principal componente da cápsula é a glucuronoxilomanana (GXM), a qual é secretada para o meio extracelular através de vesículas e reincorporada a superfície da célula. Vias de secreção não convencional de GXM dependem da ação da proteína GRASP (*golgi reassembly and stacking protein*) em *C. neoformans*. Trabalhos recentes do nosso grupo demonstram que mutantes nulos de *C. neoformans* para o gene que codifica GRASP apresentam virulência atenuada e cápsula reduzida (Kmetzsch *et al.*, Mol. Micro 81:206-218, 2011).

## OBJETIVOS

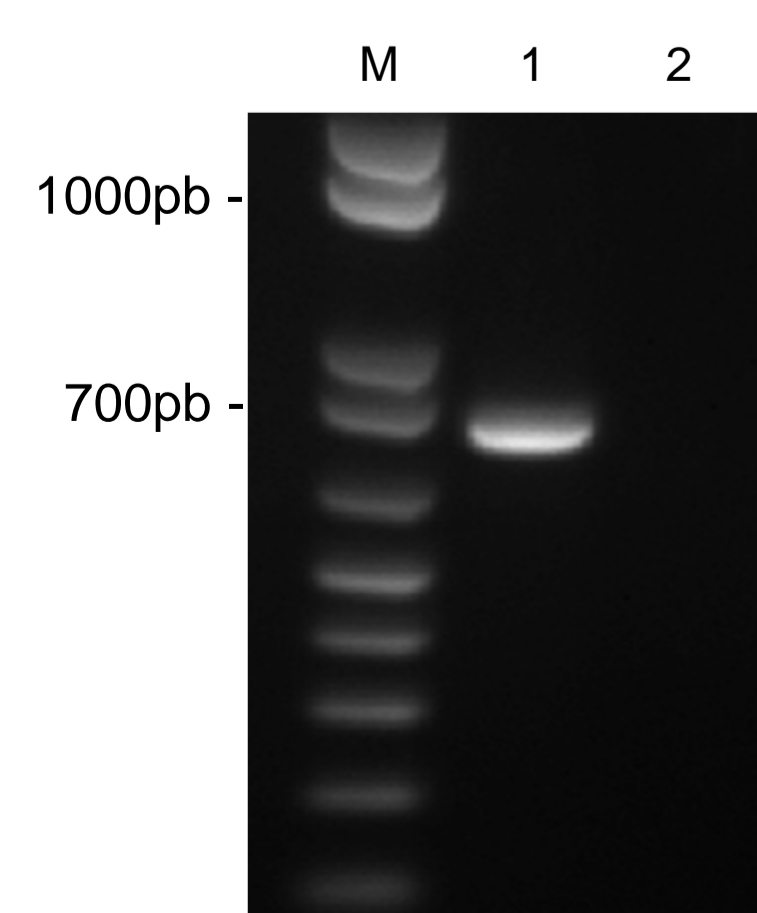
- Clonagem e expressão heteróloga de GRASP em *E. coli*.
- Purificação de GRASP recombinante.
- Produção de anticorpos anti-GRASP em camundongos.
- Avaliação da localização subcelular de GRASP em *C. neoformans*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

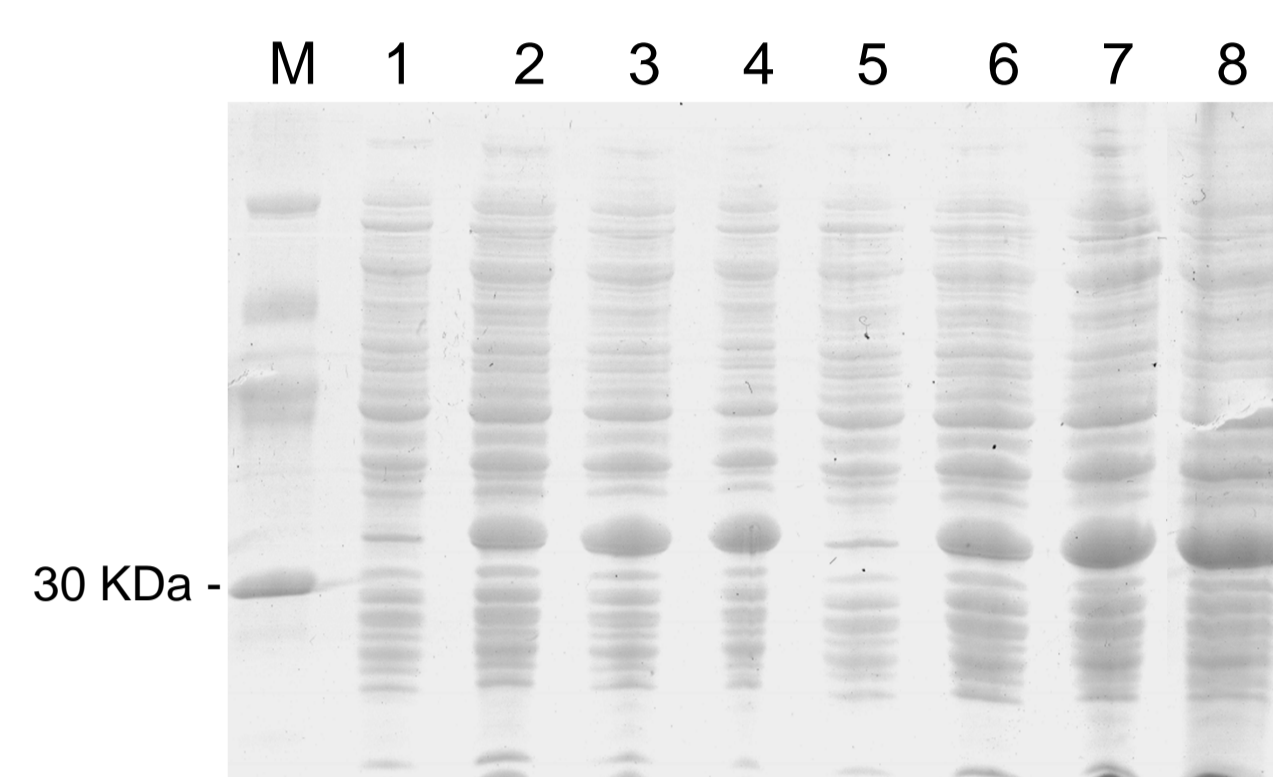
A extração de RNA total de *C. neoformans* (H99) e síntese de cDNA foram realizados com Trizol (Invitrogen) e transcriptase reversa MML-V (Invitrogen), respectivamente. cDNA obtido após transcrição reversa foi utilizado como molde para amplificação de GRASP utilizando oligonucleotídeos específicos. Posteriormente, este produto de amplificação foi clonado em vetor pCR2.1-TOPO e transformado em *E. coli*. Procedeu-se a extração de DNA plasmidial de *E. coli* e clivagem do plasmídeo para confirmação da inserção. Após realizou-se a subclonagem do fragmento em vetor de expressão procariótico pET23d e transformação da ligação pET23d::GRASP em células de *E. coli* BL21(DE3)*pLysS*. A indução da expressão de GRASP recombinante foi realizada pela adição de IPTG (1mM) ao cultivo de *E. coli*. O resultado analisado por SDS-PAGE 12%. Realizou-se a purificação da proteína GRASP fusionada a uma cauda de histidinas por cromatografia de afinidade ao níquel (resina Ni-NTA agarose – Qiagen) segundo recomendações do fabricante.

## RESULTADOS

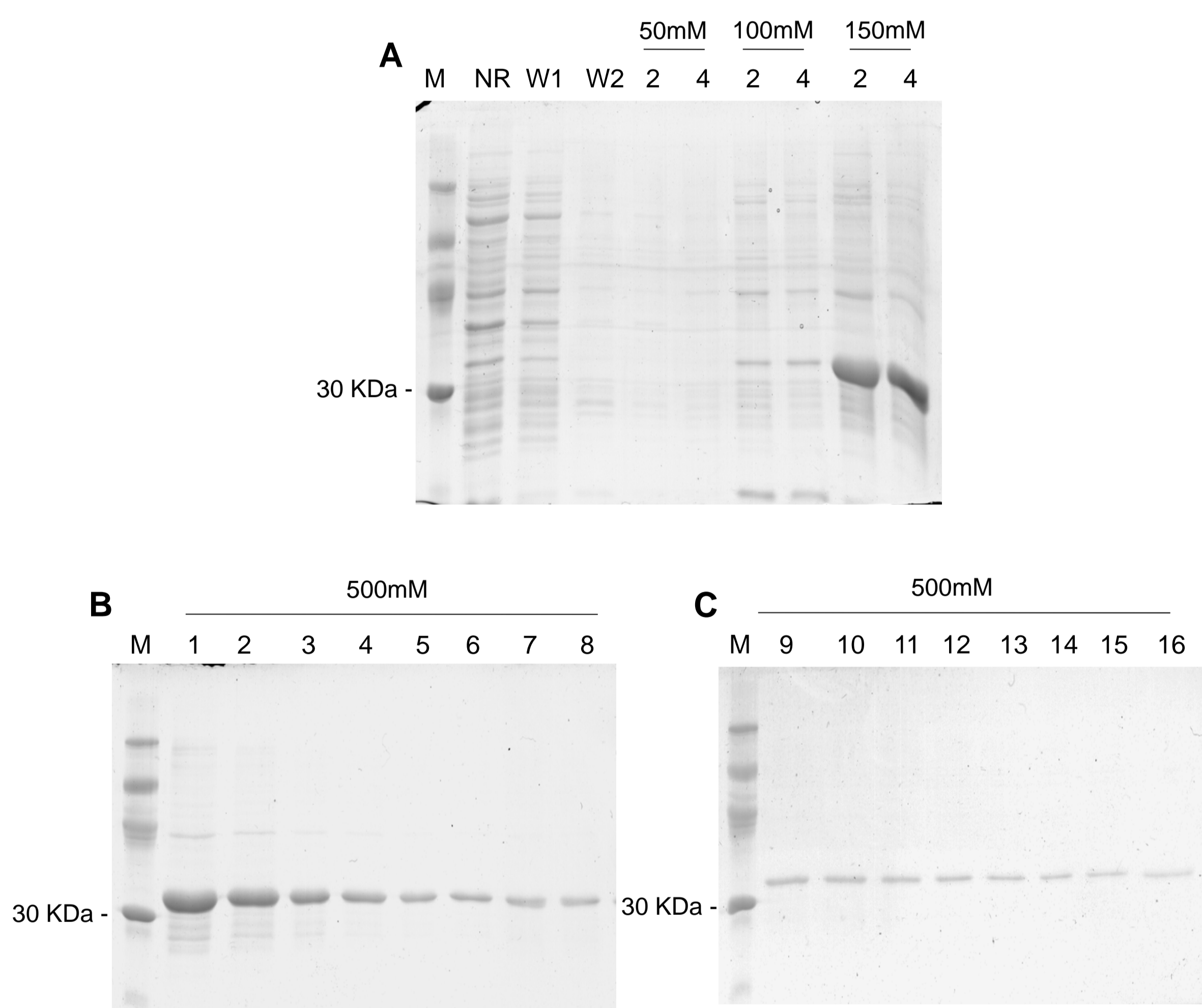
Utilizou-se cDNA total como molde para amplificação da região codificante do gene GRASP de *C. neoformans* (Figura 1). Após purificação deste produto, procedemos a clonagem em vetor pCR2.1-TOPO e subclonagem em vetor de expressão pET23d. Após transformação do vetor pET23d::GRASP em células de *E. coli* BL21(DE3)*pLysS*, ensaios de indução da expressão da proteína recombinante foram realizados. A Figura 2 evidencia o padrão de proteínas expressas em *E. coli* após 1, 2 e 3 horas de indução da expressão pela adição de 1mM de IPTG. Após lise bacteriana por fervura, foram avaliadas as frações solúvel e insolúvel, obtidas após centrifugação do lisado. O período de indução selecionado para a purificação da proteína GRASP recombinante foi de 3 horas após adição de IPTG. O *pellet* de células provenientes de 50ml de cultivo de *E. coli* em tais condições de indução foi previamente tratado com lisozima e submetido a 15 pulsos de sonicação (10-100W) por 30 segundos. A fração solúvel de proteínas foi utilizada no procedimento de purificação.



**Figura 1. Amplificação da região codificante do gene GRASP de *C. neoformans* utilizando cDNA como molde.** M, marcador de tamanho molecular indicado em pares de base. 1, amplificação do transcrito que codifica GRASP de *C. neoformans*. 2, controle negativo da reação de PCR.



**Figura 2. Ensaios de indução da expressão de GRASP recombinante.** M, marcador de massa molecular indicado em KDa. 1, fração solúvel sem indução; 2, fração solúvel após 1 h de indução; 3, fração solúvel após 2 h de indução; 4, fração solúvel após 3 h de indução; 5, fração insolúvel sem indução; 6, fração insolúvel após 1 h de indução; 7, fração insolúvel após 2 h de indução; 8, fração insolúvel após 3 h de indução.



**Figura 3. Purificação de GRASP recombinante em cromatografia de afinidade ao níquel.** A. Análise em gel SDS-PAGE de frações iniciais obtidas durante a purificação. NR, fração não retida na coluna. W1 e W2, frações obtidas após primeira e segunda lavagem da coluna. 2 e 4, segunda e quarta frações após lavagens com tampão contendo 50mM, 100mM e 150mM de imidazol. B e C. Análise em gel SDS-PAGE de frações (1 a 16) obtidas após lavagem da coluna com tampão contendo 500mM de imidazol. M, marcador de massa molecular indicado em KDa.

A massa predita de GRASP recombinante é de 31 KDa, corroborando os resultados obtidos nos ensaios de indução e purificação, obtendo assim a proteína com alto grau de pureza.

## PERSPECTIVAS

- Imunização de camundongos para produção de anticorpos.
- Avaliação da localização subcelular de GRASP em *C. neoformans*.