

## CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA CHAP1 DE *Trypanosoma cruzi*.

Natália M. Gutierrez<sup>1\*</sup>, Patrícia H. Stoco<sup>2</sup>

1. Estudante do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
2. Professora da UFSC – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

### Resumo

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, utiliza um sistema antioxidante, baseado no tiol tripanotiona, para lidar com o estresse oxidativo durante a infecção. Este tiol é sintetizado enzimaticamente em duas etapas pela enzima tripanotiona sintetase (TryS). No genoma dos tripanossomatídeos é possível identificar outras duas sequências também denominadas TryS, que por não apresentarem o domínio de síntese, mas apenas o domínio CHAP, foram renomeadas como TcCHAP1 e 2. Uma vez que a funcionalidade da proteína é incerta, o objetivo deste trabalho é caracterizar funcionalmente a proteína TcCHAP1. O gene foi previamente clonado e subclonado com intuito da expressão da proteína recombinante para a produção de soro anti-TcCHAP1, porém o soro não se mostrou reativo e então foi adotada uma nova estratégia, utilizando um fragmento do gene, que foi clonado no vetor pQE32 para que a respectiva proteína seja utilizada na imunização dos animais e produção do soro.

**Autorização legal:** CEUA 9923170516. CQB 101/99 (DOU 32-E, 14/02/2001 Secção 3, página 37)

**Palavras-chave:** Tripanotiona sintetase; Tripanotiona; Sistema antioxidante

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, UFSC.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UFSC

### Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário agente etiológico da doença de Chagas, doença considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública nas Américas (WHO, 2018). Seu ciclo biológico envolve a passagem pelo hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e no hospedeiro mamífero (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Ao infectar seus hospedeiros, o *T. cruzi* enfrenta diferentes respostas imunes, dentre elas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) por parte dos hospedeiros (JIMENEZ, 2014; TURRENS, 2004). Além disso, o próprio *T. cruzi* é naturalmente responsável pela produção de ERO e ERN intrínseco, devido a respiração aeróbica. Esses radicais em grandes quantidades podem interagir com moléculas biológicas, podendo causar a morte celular do parasito (TOMÁS; CASTRO, 2013). A presença de níveis elevados de EROs e ERNs geram um fenômeno denominado de estresse oxidativo e estresse nitrosativo, que devem ser neutralizados pelo parasito (SIES, 2014).

O *T. cruzi* possui o seu sistema antioxidante baseado no tiol tripanotiona, presente somente em tripanossomatídeos e algumas bactérias (IRIGOÍN et al., 2008). Este tiol age como doador de elétrons em diferentes processos celulares e sua síntese se dá por uma reação de duas etapas: A primeira etapa pode ser catalisada tanto pela glutatiónilperoxidase (GspS) quanto pela tripanotiona sintetase (TryS) e a segunda etapa da síntese é catalisada exclusivamente pela TryS (KRAUTH-SIEGEL; LEROUX, 2012; MANTA et al., 2013).

A TryS possui dois domínios catalíticos, o domínio Grasp e o domínio CHAP, responsáveis pela síntese da tripanotiona e pela sua decomposição respectivamente. Em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa foi observado que há outras duas cópias gênicas anotadas como TryS nos bancos de dados do genoma de tripanossomatídeos, mas foi observado que não haviam as características de uma TryS típica. Essas sequências apresentam apenas conservado o domínio CHAP e, portanto, foram renomeadas de TcCHAP1 e 2. A TcCHAP1 difere da TryS por possivelmente possuir um endereçamento para a mitocôndria, e ainda por ser muito menor (STOCO et al., 2016). Uma vez que a funcionalidade da TcCHAP1 é incerta, o objetivo deste trabalho é caracterizar funcionalmente essa proteína.

### Metodologia

A expressão heteróloga da proteína TcCHAP1 foi inicialmente realizada em *E. coli* BL21 (DE3) utilizando a ORF da TcCHAP1 clonada inicialmente em vetor pGEM-T Easy (pGEM-TcCHAP1), sendo subclonada em vetor pET47b (pET47b-TcCHAP1). Além da expressão a 37°C (6h) e a 27°C (12h) com 1mM de IPTG, outras abordagens experimentais foram testadas como a indução na presença de álcool benzílico (10mM); crescimento a 4°C (3 dias); expressão em *E. coli* Rosetta-gami<sup>TM</sup> (DE3) pLysS, testando diferentes tempos e temperaturas. Após a obtenção das frações solúvel e insolúvel de cada cultivo, os extratos foram resolvidos em SDS-PAGE 10% revelado com azul de comassie R-250. A expressão da rTcCHAP1 por *E. coli* foi verificada através de *Western blot* utilizando um anticorpo primário anti-HisTag e um conjugado anti-IgG

ligado à peroxidase, sendo revelada em filmes radiográficos.

**A proteína rTcCHAP1 foi utilizada para a produção de um antissoro policlonal em camundongos Balb/C** através de um protocolo padrão de imunização. A titulação do antissoro foi realizada por ELISA utilizando placas sensibilizadas com a proteína rTcCHAP1 bloqueadas com BSA 3% e diluições seriadas do soro anti-TcCHAP1, sendo e posteriormente incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase. A revelação com substrato-cromógeno OPD foi lida a 492 nm.

**Um fragmento do gene TcCHAP1** foi excisado da construção pGEM-TcCHAP1 utilizando enzimas de restrição (*Bam*HI e *Sma*I) e subclonado no vetor pQE32. Após transformação de bactérias *E. coli* DH5α com o plasmídeo pQE32-TcCHAP1Frag, a confirmação de colônias positivas foi realizada através de PCR, sendo os produtos de amplificação resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1%. Após o sequenciamento do inserto, a qualidade das sequências foi verificada pelo pacote *Phred/Phrap/Consed*, sendo consideradas somente as sequências com qualidade Phred>20 e na correta fase de leitura.

**Buscando a superexpressão da TcCHAP1 por *Trypanosoma cruzi***, o gene TcCHAP1 foi subclonado nos vetores pROCK\_Flag\_mNeonGreen e pTREX\_mRFP. Após amplificação do gene TcCHAP1 a partir do vetor pET47b-TcCHAP1 por PCR, o produto de PCR foi primeiramente clonado no vetor pGEM-T easy (pGEM-TcCHAP1SE) e, posteriormente, excisado utilizando-se as enzimas de restrição *Xba*I/*Hind*III e *Xba*I/*Eco*RI e sub-clonado nos vetores pROCK\_Flag\_mNeonGreen e pTREX\_mRFP, respectivamente.

## Resultados e Discussão

Para avaliar a atividade enzimática da proteína CHAP1 de *T. cruzi*, foi realizada a expressão heteróloga da proteína utilizando bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) e feita a purificação da fração solúvel, para que a proteína tivesse a capacidade de desempenhar sua função catalítica se verdadeira. Embora a proteína tenha sido produzida (~27 kDa) nas diferentes condições de expressão, a purificação apresentou rendimento muito baixo, sendo impossível o seu uso para os ensaios de atividade. Levando em consideração que foi observado a expressão de grandes quantidades da proteína na fração insolúvel bacteriana, pode-se inferir que o fracasso da sua purificação foi devido a ineficiência da bactéria no correto dobramento da proteína. Quando se induz a expressão heteróloga, a superexpressão da proteína ocorre em condições distintas daquelas existentes no parasito, sendo que as diferentes condições de pH, osmolaridade e até a intensa produção da proteína favorece as interações de regiões hidrofóbicas, desencadeando a formação de corpos de inclusão, onde é acumulado a proteína na sua forma desnaturada (CARRIÓ; VILLAVERDE, 2002).

Devido ao insucesso das tentativas de expressão utilizando as linhagens BL21 (DE3), outra alternativa para a produção da forma nativa da proteína foi a utilização da linhagem Rosetta-gami<sup>TM</sup> (DE3) pLysS (Novagen), linhagem que possui modificações genéticas que permitem a expressão de códons usados raramente em bactérias *E. coli* e possui também mutações nos genes da tiorredoxina redutase e glutatona redutase permitindo a melhor formação de ligações dissulfeto no citoplasma e assim permitindo um melhor dobramento de proteínas. Após os testes de expressão foi verificado que novamente não houve sucesso na tentativa de expressar a proteína TcCHAP1. Sendo assim, a expressão heteróloga da proteína solúvel será realizada utilizando um sistema eucarioto, na levedura *Pichia pastoris*, utilizando o vetor de expressão pPICZ (Invitrogen).

Durante as tentativas de expressão e purificação da proteína nativa, foi realizada a purificação da TcCHAP1 desnaturada, a qual foi utilizada na produção do soro policlonal. A avaliação da resposta imune humoral específica para a proteína, por meio do ensaio de ELISA, apresentou titulação inferior ao limite de detecção da técnica. Além disso, não foi observada reatividade do soro utilizando ensaio de *Western blot*.

Dessa maneira foi adotada uma nova estratégia de imunização para a produção de antissoro, que consiste em imunizações com um fragmento da TcCHAP1 de 276pb, correspondendo, *in silico*, a uma proteína de 10,7 kDa (92 aminoácidos). Para isso, a construção pGEM-TcCHAP1 foi submetida a digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Sma*I, gerando três fragmentos visíveis em gel de eletroforese. Então o fragmento de 276 pares de base foi excisado do gel e ligado ao vetor de expressão pQE32. O produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* linhagem DH5α. As colônias foram verificadas por PCR, sendo que as amostras positivas apresentaram aproximadamente 430 pares de base, relativos a presença do inserto (276 pb) mais uma região amplificada do vetor (157 pb), enquanto as negativas apresentaram apenas os 157 pb. A identidade da sequência e a correta fase de leitura foi verificada por sequenciamento utilizando iniciadores direcionados ao vetor.

Com o intuito de observar os efeitos da superexpressão do gene, foi feita a clonagem nos vetores pROCK\_Flag\_mNeonGreen e pTREX\_mRFP, vetores direcionados a expressão de proteína em tripanossomatídeos. Foram utilizados os pares de enzimas *Xba*I e *Hind*III, *Xba*I e *Eco*RI para excisar o inserto de 711 pares de base da construção pGEM-TcCHAP1SE e para linealizar os respectivos vetores. Foi feita a ligação do inserto aos vetores e a transformação em bactérias *E. coli*. Todas as colônias testadas para as construções TcCHAP1pROCK\_Flag\_mNeonGreen e TcCHAP1pTREX\_mRFP se mostraram positivas, e o sequenciamento das amostras mostrou a correta inserção e fase de leitura do inserto nos vetores.

## Conclusões

Apesar das diferentes estratégias adotadas não foi possível produzir a proteína TcCHAP1 recombinante na sua forma solúvel, sendo então impossível o ensaio enzimático da proteína. Assim é preciso adotar novas estratégias para a sua produção, sendo o próximo passo a expressão em um sistema eucarioto. O soro produzido previamente não mostrou reatividade e, portanto, foi adotada outra estratégia de imunização que consiste na expressão de um fragmento da proteína de interesse. Este fragmento foi excisado de uma construção prévia e corretamente inserido no vetor de expressão pQE32. Os próximos passos serão testar a expressão da forma nativa da proteína em sistema eucarioto e a expressão do fragmento da proteína para posterior imunização e produção do soro anti-TcCHAP1 para prosseguir com a avaliação funcional da proteína.

## Referências bibliográficas

1. CARRIÓ, M. ; VILLAVARDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **Journal of Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 3–12, jun. 2002.
2. DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.
3. IRIGOÍN, F. et al. Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 6, p. 733–42, 15 set. 2008.
4. JIMENEZ, V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in Trypanosoma cruzi. 2014.
5. KRAUTH-SIEGEL, R. L.; LEROUX, A. E. Low-molecular-mass antioxidants in parasites. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 4, p. 583–607, 15 ago. 2012.
6. MANTA, B. et al. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3199–216, maio 2013.
7. SIES, H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 13, p. 8735–41, 28 mar. 2014.
8. STOCO, P. et al. A Comparative In Silico Study of the Antioxidant Defense Gene Repertoire of Distinct Lifestyle Trypanosomatid Species. **Evolutionary Bioinformatics**, p. 263, nov. 2016.
9. TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 7, p. 696–707, 1 set. 2013.
10. TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, set. 1979.
11. TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular aspects of medicine**, v. 25, n. 1–2, p. 211–20, 2004.