

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

FERNANDA ZILLI FERMINO

**PADRONIZAÇÃO DA CLONAGEM DA SUBUNIDADE AgB8/1 DO ANTÍGENO B
DE *Echinococcus granulosus* EM VETOR PARA EXPRESSÃO NA LEVEDURA
*Pichia pastoris***

Porto Alegre

2015

FERNANDA ZILLI FERMINO

**PADRONIZAÇÃO DA CLONAGEM DA SUBUNIDADE AgB8/1 DO ANTÍGENO B
DE *Echinococcus granulosus* EM VETOR PARA EXPRESSÃO NA LEVEDURA
*Pichia pastoris***

Trabalho de Conclusão de Curso da graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha

Coorientadora: Ma. Edileuza Danieli da Silva

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Fermino, Fernanda Zilli
PADRONIZAÇÃO DA CLONAGEM DA SUBUNIDADE AgB8/1 DO
ANTÍGENO B DE *Echinococcus granulosus* EM VETOR PARA
EXPRESSÃO NA LEVEDURA *Pichia pastoris* / Fernanda
Zilli Fermino. -- 2015.
28 f.

Orientador: Arnaldo Zaha.
Coorientadora: Edileuza Danieli da Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Expressão de proteínas. 2. Padronização de
expressão. 3. *Pichia pastoris*. 4. Proteína
recombinante. 5. levedura. I. Zaha, Arnaldo, orient.
II. Silva, Edileuza Danieli da, coorient. III. Título.

FERNANDA ZILLI FERMINO

**PADRONIZAÇÃO DA CLONAGEM DA SUBUNIDADE AgB8/1 DO ANTÍGENO B
DE *Echinococcus granulosus* EM VETOR PARA EXPRESSÃO NA LEVEDURA
*Pichia pastoris***

Trabalho de Conclusão de Curso da
graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha

Coorientadora: Ma. Edileuza Danieli da Silva

Aprovada em: ____ de _____ de 2015.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Karina Mariante Monteiro (UFRGS)

Dr. Martin Cancela (UFRGS)

Prof. Dr. Arnaldo Zaha (Orientador)

Porto Alegre

2015

Aos meus pais, Sonia e Antonio

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio, incentivo, pelo suporte em todos os momentos e por sempre acreditarem em mim. Principalmente aos meus pais, meu irmão Anderson e minha cunhada Ara, que sempre estiveram presentes e são essenciais na minha vida.

Ao meu orientador Dr. Arnaldo Zaha, pela oportunidade, sugestão e orientação deste trabalho e pelos ensinamentos ao longo da minha iniciação científica.

À Edileuza Danieli da Silva, pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto, pelas sugestões, orientações e amizade.

Aos colegas dos laboratórios 204, 206 e 210 Guilherme Santos, Tati, Cibele, Filipe, Duda, Jeferson, Helier, Bárbara, Sérgio, Bruna, João, Guilherme Barros, Cris, Nina, Aline, Karina Monteiro, Karina Lorenzatto, Fernanda Leal, Gabi, Veri, Jéssica, Alemão, Lauren por todo carinho, amizade, sugestões. Ao Martin pelas valiosas sugestões e opiniões sempre relevantes ao longo do desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca, Dra. Karina Mariante Monteiro e Dr. Martin Cancela, por aceitarem o convite e pela avaliação deste trabalho.

Às minhas amigas especiais, presentes que recebi da biologia, Aline, Melina, Marina, Tamara, Carol, Ju, Meire e Lyssa pela compreensão, apoio, conselhos, companheirismo nos momentos bons e também nos ruins! E aos demais amigos e colegas da faculdade pela amizade e carinho ao longo desses quatro anos.

À todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS E TABELA	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Echinococcus granulosus</i> e a hidatidose cística	12
1.2 Antígeno B (AgB) de <i>Echinococcus granulosus</i>	14
1.3 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão de proteínas heterólogas	16
1.4 Vetor pra expressão pPICZαC	17
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores	19
4.2 Amplificação da sequência codificadora	19
4.3 Preparação do vetor pPICZαC para clonagem	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores	20
5.2 Amplificação da sequência codificadora	20
5.3 Linearização do vetor pPICZαC	24
6 PERSPECTIVAS	26
REFERÊNCIAS	27

RESUMO

O *Echinococcus granulosus* é um helminto parasita pertencente à Classe Cestoda. O desenvolvimento da fase larval (cisto hidático) de *E. granulosus* nas vísceras dos hospedeiros intermediários é responsável pela doença hidatidose cística. O cisto consiste em uma estrutura unilocular preenchida pelo líquido hidático, o qual contém os produtos de secreção/excreção do parasito, sendo o antígeno B (AgB) a principal proteína secretada. O AgB é uma lipoproteína oligomérica formada por subunidades de 8 kDa codificadas por uma família multigênica com pelo menos cinco genes identificados (*EgAgB8/1-EgAgB8/5*). O antígeno B (AgB) tem sido descrito como envolvido em diversos mecanismos da interação parasito-hospedeiro que promovem o estabelecimento e a sobrevivência do parasito no hospedeiro intermediário. A presença de grandes quantidades de AgB no líquido hidático sugere um importante papel na biologia do parasito. A levedura *Pichia pastoris* constitui um dos sistemas mais utilizados e bem sucedidos para a expressão heteróloga de proteínas, seja para emprego em pesquisa, seja para produção industrial. Uma grande vantagem de *P. pastoris* sobre sistemas de expressão bacterianos é que a levedura tem potencial para realizar muitas das modificações pós-traducionais tipicamente associadas com eucariotos superiores. Neste trabalho, foi realizada a padronização da amplificação da sequência codificadora da subunidade AgB8/1 por PCR e a preparação do vetor de expressão pPICZαC, de *P. pastoris*, para a clonagem. A sequência codificante de AgB8/1 foi amplificada por uma PCR primária e o produto dessa reação foi utilizado como molde para uma PCR secundária, a partir da qual se obteve um fragmento de 292 pb que, posteriormente, será utilizado para a clonagem por recombinação homóloga *in vivo*. A partir da obtenção do clone, serão padronizadas a expressão na levedura *P. pastoris* e a purificação da proteína recombinante para utilização em estudos estruturais e funcionais.

Palavras chave: *Echinococcus granulosus*, antígeno B, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

Echinococcus granulosus is a helminth parasite belonging to the class Cestoda. The development of the larval stage (hydatid cyst) of *E. granulosus* in the viscera of the intermediate hosts is responsible for cystic hydatid disease. The cyst consists in a unilocular structure, filled by hydatid fluid which contains the parasite excretory/secretory products, antigen B (AgB) being the main secreted protein. The AgB is an oligomeric lipoprotein formed by 8 kDa subunits, encoded by a multigene family with at least five genes identified (*EgAgB8/1-EgAgB8/5*). Antigen B has been described as involved in various mechanisms of host-parasite interactions that promote the establishment and survival of the parasite in the intermediate host. The presence of large amounts of AgB in hydatid fluid suggests an important role in the parasite's biology. The yeast *Pichia pastoris* is one of the most widely and successfully used systems for heterologous protein expression, either in research or in industrial production. A major advantage of *P. pastoris* over bacterial expression systems is that the yeast has the potential to perform many of the post-translational modifications typically associated with higher eukaryotes. In this work, the procedures for the AgB8/ 1 subunit coding sequence amplification by PCR and preparation of pPICZαC expression vector, from *P. pastoris*, for cloning were standardized. The AgB8/1 coding sequence was amplified by primary PCR and the product of this reaction was used as template for secondary PCR, from which it was obtained a 292 bp fragment, that subsequently will be used for cloning by *in vivo* homologous recombination. The obtained clone will be used to standardize the expression and purification of the recombinant protein in yeast *P. pastoris* for use in structural and functional studies.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, antígeno B, *Pichia pastoris*

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Ciclo vital de <i>Echinococcus granulosus</i>	13
Figura 2: Estrutura esquemática do cisto hidático de <i>Echinococcus granulosus</i>	14
Figura 3: Mapa do vetor pPICZαC	17
Figura 4: Produto da amplificação de PCR primária	21
Figura 5: Produto da amplificação a partir de PCR primária utilizando-se novas alíquotas de reagentes	21
Figura 6: Produto da amplificação a partir de PCR primária utilizando-se diferentes concentrações de MgCl ₂ e Temperatura: 65,4°C	22
Figura 7: Produto da amplificação a partir de reação com molde e iniciadores diluídos	23
Figura 8: Produtos de amplificação das PCRs primária e secundária	24
Figura 9: Linearização do vetor pPICZαC	25
Figura 10: Esquema da clonagem por recombinação homóloga	25
Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados	20

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AgB	antígeno B
AgB8	subunidade(s) de 8 kDa do antígeno B
AgB8/1	subunidade 1 do antígeno B
DNA	ácido desoxirribonucleico
LB	Luria Bertani
LB <i>low-salt</i>	Luria Bertani com baixa concentração de sal
PCR	reação em cadeia da polimerase
SAP	fosfatase alcalina de camarão
kDa	quilodalton(s)
pb	par(es) de bases

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Echinococcus granulosus* e a hidatidose cística

O gênero *Echinococcus* (Rudolphi, 1801) pertencente à classe Cestoda (Ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae), inclui várias espécies, mas considerando a importância médica e veterinária as duas principais são *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis* que causam, respectivamente, a hidatidose cística e a hidatidose alveolar (MCMANUS *et al.*, 2003).

O desenvolvimento da fase larval (cisto hidático) de *E. granulosus* nas vísceras dos hospedeiros intermediários é responsável pela doença hidatidose cística.

Na América do Sul, a hidatidose tem caráter endêmico ou hiperendêmico no Cone Sul (incluindo o sul do Brasil) e na região andina (GAVIDIA *et al.*, 2008; MORO; SCHANTZ, 2009). O Rio Grande do Sul é considerado endêmico para a hidatidose, especialmente em área de fronteiras com Uruguai e Argentina.

Para completar seu ciclo vital (Figura 1), o *E. granulosus* necessita de dois hospedeiros, sendo um o hospedeiro definitivo que é um canídeo, no qual se desenvolve o verme adulto, e o hospedeiro intermediário, normalmente herbívoro, como mamíferos ungulados. O ser humano pode ser um hospedeiro intermediário acidental.

O verme adulto de *E. granulosus* é uma pequena tênia com 2 a 7 mm de comprimento, constituída por um escólex anterior (órgão especializado para fixação no hospedeiro) e um estróbilo posterior, o qual é formado por dois a cinco segmentos denominados proglótides (THOMPSON, 1995).

O último segmento do estróbilo é a proglótide grávida, que possui o útero repleto de ovos. Esta proglótide destaca-se do restante do estróbilo e se desintegra no intestino grosso, liberando os ovos, que são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo. Quando ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os ovos liberam a oncosfera. Esta penetra a mucosa intestinal e é transportada através das vias linfáticas ou venosas até as vísceras, principalmente fígado e pulmão, e então se diferencia na forma larval ou cisto hidático (ZHANG; MCMANUS, 2006).

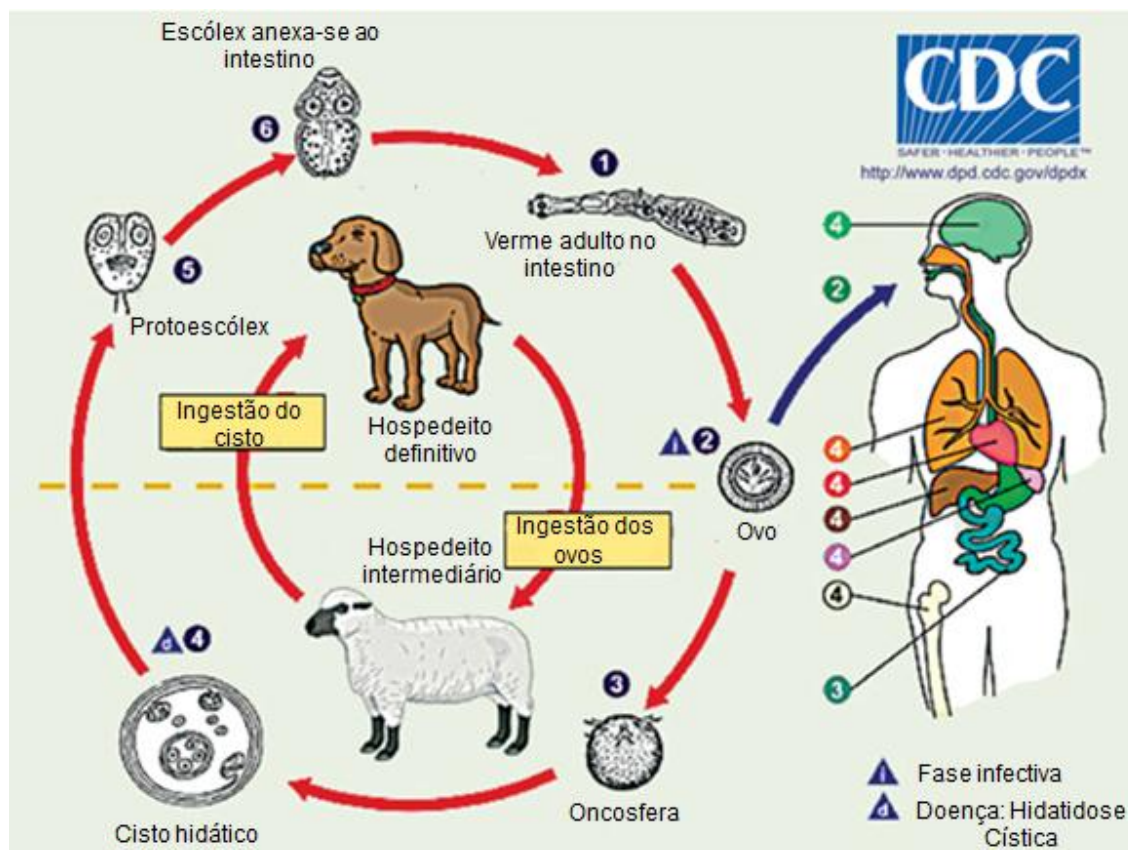


Figura 1: Ciclo vital de *Echinococcus granulosus*. (1) O verme adulto vive no intestino delgado dos hospedeiros definitivos, cães ou outros canídeos. As proglótides grávidas liberam os ovos (2) os quais são eliminados nas fezes do hospedeiro. Após a ingestão por um hospedeiro intermediário adequado (bovinos, ovinos, suínos, etc.), os ovos eclodem no intestino delgado e liberam a oncosfera, (3) que penetra na parede do intestino e, através do sistema circulatório, é transportada para diversos órgãos, especialmente fígado e pulmões. Nestes órgãos, a oncosfera se diferencia em um cisto hidático (4) que aumenta gradualmente de tamanho, produzindo protoescólices (5) em seu interior. O hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de cistos existentes em órgãos dos hospedeiros intermediários. Após a ingestão, os protoescólices (6) evaginam, fixam-se à mucosa intestinal e se transformam em vermes adultos. Os seres humanos são infectados pela ingestão de ovos, com a liberação de oncosferas no intestino delgado e o desenvolvimento de cistos (4) em vários órgãos. (Modificado de Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2012).

O cisto hidático (Figura 2) se desenvolve nas vísceras do hospedeiro intermediário e consiste em uma estrutura unilocular, preenchida pelo líquido hidático, contendo em seu interior os protoescólices, formas pré-adultas infectivas para o hospedeiro definitivo (CAMERON; WEBSTER, 1969).

A parede do cisto é composta por duas camadas, sendo a mais externa laminar, acelular e rica em carboidratos. A camada que reveste o cisto internamente, denominada germinativa, é formada por células que proliferam e se diferenciam para dar origem às cápsulas prolíferas e aos protoescólices (MCMANUS *et al.*, 2003).

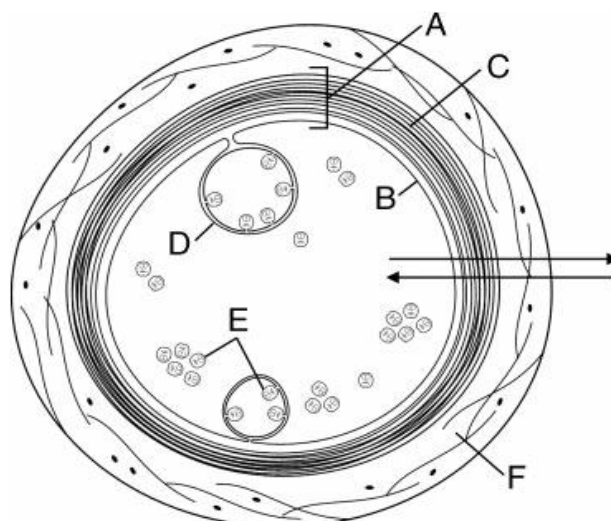


Figura 2: Estrutura esquemática do cisto hidático de *Echinococcus granulosus*. (A) parede do cisto, composta por B e C. (B) Camada germinativa: tecido proliferativo do cisto, origina C, D e E. (C) Camada laminar: camada acelular que protege externamente o cisto. (D) cápsula prolífera: vesícula que brota da camada germinativa e origina E em seu interior. (E) Protoescolices: Forma pré-adulta. (F) Capa adventícia: tecido do hospedeiro, resultado da resposta inflamatória. Adaptado de MONTEIRO *et al.* (2010).

1.2 Antígeno B (AgB) de *Echinococcus granulosus*

A cavidade interna do cisto hidático é preenchida com um líquido estéril, denominado líquido hidático, o qual é uma mistura complexa de moléculas derivadas do parasito e componentes do soro do hospedeiro (HOLCMAN; HEATH, 1997). O líquido hidático contém os produtos de excreção/secreção (ES) da camada germinativa e dos protoescolices, juntamente com proteínas do hospedeiro que penetram no metacestódeo (THOMPSON, 1995).

Os componentes do líquido hidático entram em contato com o sistema imune do hospedeiro sendo capazes de ativar seus mecanismos de defesa (ZHANG *et al.*, 2003). Paradoxalmente, os componentes do líquido hidático também promovem a evasão da resposta imune (JANSSEN *et al.*, 1997).

Uma das principais moléculas produzidas em grande quantidade pelo cisto é uma lipoproteína altamente imunogênica denominada antígeno B (EgAgB) (ORIOLO; ORIOLO, 1975; ORIOLO, 1971), que representa um importante antígeno para o diagnóstico da infecção humana (GONZÁLEZ-SAPIENZA, 2000; LIGHTOWLERS *et al.*, 1989). Foi primeiramente descrito como uma lipoproteína termoestável de 120-160 kDa, no entanto, a presença de agregados indica que o AgB existe como distintas formas em equilíbrio (MONTEIRO *et al.*, 2012; ORIOLO; ORIOLO, 1975;

ORIOU, 1971). Sob condições redutoras dissocia-se em componentes de 8, 16, 24 e 32 kDa onde se observa uma diminuição da abundância relativa proporcional ao aumento da massa molecular (LIGHTOWLERS *et al.*, 1989).

Trata-se, portanto, de uma proteína polimérica formada por subunidades de 8 kDa, sendo que já foram identificados os genes que codificam cinco subunidades diferentes: AgB8/1 (FROSCH *et al.*, 1994), AgB8/2 (FERNÁNDEZ *et al.*, 1996), AgB8/3 (CHEMALE *et al.*, 2001), AgB8/4 (AREND *et al.*, 2004) e AgB8/5 (MAMUTI *et al.*, 2007). Os genes que codificam as subunidades do AgB fazem parte de uma família multigênica (CHEMALE *et al.*, 2001).

SHEPHERD *et al.* (1991) demonstraram, através de estudos *in vitro*, que o AgB é capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos. Em pacientes com a doença ativa, o AgB induz a apoptose de células do sistema imune (RIGANÒ *et al.*, 2002). VIRGINIO *et al.* (2007) mostraram que AgB provoca uma redução na produção de peróxido de hidrogênio em neutrófilos e sugerem um mecanismo de evasão importante em caso de ruptura do cisto, onde o protoescólex poderia originar um novo cisto.

O antígeno B (AgB) tem sido descrito como envolvido em diversos mecanismos da interação parasito-hospedeiro que promovem o estabelecimento e a sobrevivência do parasito no hospedeiro intermediário, como a inibição de proteases (SHEPHERD *et al.*, 1991), ligação de lipídios (CHEMALE *et al.*, 2005) e imunomodulação (RIGANÒ *et al.*, 2001, 2007).

O AgB faz parte da família das HLBP (hydrophobic ligand binding proteins) específica de cestódeos (ALVITE; ESTEVES, 2012; LEE *et al.*, 2007). Como integrante dessa família de proteínas, o AgB pode ter importante papel como carreador de lipídios do hospedeiro para o parasito. Foi demonstrado, *in vitro*, que o AgB é capaz de ligar análogos fluorescentes de ácido palmítico, mostrando a alta afinidade dessa proteína por ácidos graxos (CHEMALE *et al.*, 2005). OBAL *et al.* (2012) analisaram a composição lipídica nativa do AgB purificado de cistos bovinos e humanos e identificaram diferentes classes de lipídios, sendo que triacilglicerídios, fosfolipídios (principalmente fosfatidilcolina) e colesterol foram os mais abundantes.

A presença de grandes quantidades de AgB no líquido hidático sugere um importante papel na biologia do parasito (AZIZ *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2010; MUSIANI *et al.*, 1978).

1.3 *Pichia pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas

As bactérias são os organismos mais utilizados para a expressão de proteínas recombinantes, no entanto, não possuem características importantes para a expressão de proteínas de eucariotos, como sistema de endomembranas e as modificações pós-traducionais, o que pode impedir a correta expressão das mesmas (CEREGHINO; CREGG, 1999).

Uma grande vantagem de *Pichia pastoris* sobre sistemas de expressão bacterianos é que a levedura tem potencial para realizar muitas das modificações pós-traducionais tipicamente associadas com eucariotos superiores, tais como processamento de sequências sinal, dobramentos, formação de pontes dissulfeto, certos tipos de adição de lipídios e O- e N-glicosilação (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Proteínas exógenas expressas em *P. pastoris* podem ser produzidas tanto intracelularmente como extracelularmente. Uma vez que esta levedura secreta apenas baixos níveis de proteínas endógenas, a proteína heteróloga secretada constitui a grande maioria de proteína total no meio. Portanto, direcionar uma proteína heteróloga para o meio de cultura pode servir como um importante passo inicial na purificação. No entanto, devido à estabilidade das proteínas e necessidade de dobramentos, a possibilidade de secreção é geralmente reservada para proteínas exógenas que são normalmente secretadas pelos seus hospedeiros nativos (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Muitas proteínas que acabam como corpos de inclusão inativos em sistemas bacterianos são produzidas como moléculas biologicamente ativas em *P. pastoris* (CREGG, 2000).

Para a superexpressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, o método mais comumente utilizado é a integração de um vetor de expressão ao genoma de *P. pastoris*, por recombinação homóloga (RH) (GASSER *et al.*, 2013).

O número de cópias integradas dos vetores de expressão afeta a produtividade da proteína, podendo ser um dos pontos determinantes da produção. Um alto número de cópias do gene heterólogo pode levar a um aumento na produção da proteína heteróloga, o que desperta o interesse na geração de transformantes com multicópias integradas no genoma da levedura (ROMANOS, 1995).

Outra importante vantagem é a capacidade desse sistema de produzir proteínas heterólogas em grande escala.

1.4 Vetor para expressão pPICZ α C

Este vetor, cujo mapa está representado na figura 3, permite alto nível de expressão da proteína de interesse através da indução do gene AOX1 por metanol. O vetor pPICZ α C contém o gene de resistência à zeocina (*Sh Ble*), para a seleção dos recombinantes tanto nas etapas de propagação em *E. coli*, quanto para expressão em *P. pastoris*, além de uma cauda de polihistidina C-terminal que permite a detecção e purificação da proteína de fusão (INVITROGEN, 2010).

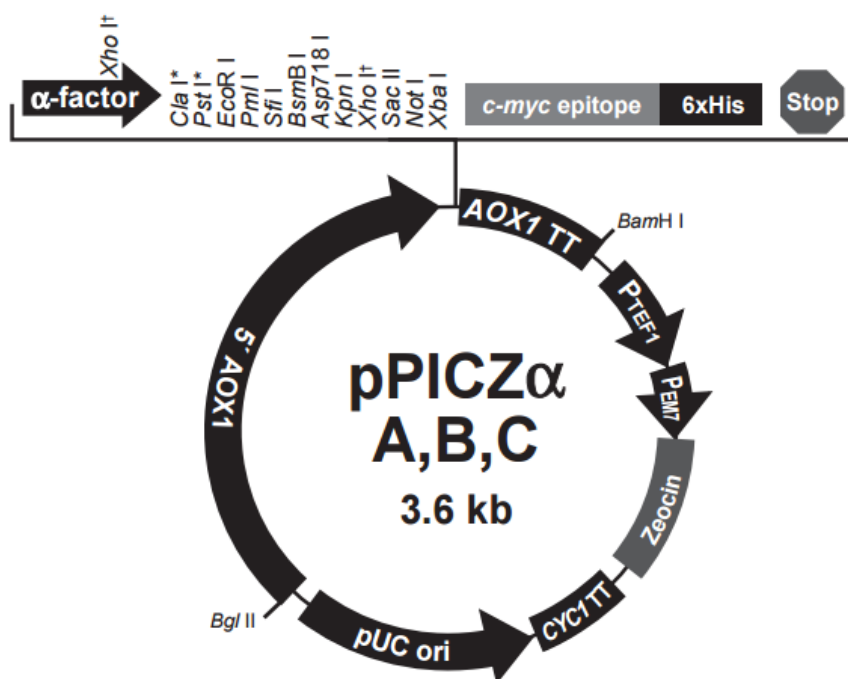


Figura 3: Mapa do vetor pPICZ α C (INVITROGEN, 2010).

Zeocina é um membro da família bleomicina de antibióticos isolados a partir de *Streptomyces spp.* São antibióticos de amplo espectro que apresentam elevada toxicidade contra bactérias, fungos (incluindo leveduras), plantas e células de mamíferos (BARON *et al.*, 1992; DROCOURT *et al.*, 1990).

A proteína de resistência à zeocina foi isolada e caracterizada (DROCOURT *et al.*, 1990). Essa proteína, produto do gene *Sh ble* (gene bleomicina *Streptoalloteichus hindustanus*), é uma proteína de 13 kDa que se liga à zeocina e

inibe sua atividade de clivagem da fita de DNA. A sua expressão em hospedeiros eucarióticos e procarióticos confere resistência à zeocina (INVITROGEN, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo já clonou e expressou em *Escherichia coli* genes que codificam subunidades do antígeno B. No entanto, a expressão de proteínas eucarióticas em sistema procariótico tem o inconveniente de não permitir, em princípio, o enovelamento e o processamento pós-traducional adequados da molécula.

A levedura *Pichia pastoris* constitui um dos sistemas mais utilizados e bem sucedidos para a expressão heteróloga de proteínas, seja para emprego em pesquisa, seja para produção industrial. Uma característica marcante é o fato de ela combinar a capacidade de crescer a altas densidades celulares em meio mínimo, com a capacidade de secretar proteínas heterólogas eficientemente, com pequena secreção de proteínas endógenas (RESINA *et al.*, 2005). Além disso, essa levedura é capaz de processar a maioria das modificações pós-traducionais incluindo processamento proteolítico e glicosilação, conservando características antigênicas das proteínas originais, o que facilita sua aplicação em ensaios diagnósticos e em vacinas de subunidade (CEREGHINO; CREGG, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer em nosso laboratório a expressão de proteínas recombinantes no sistema de expressão *Pichia pastoris*, utilizando a subunidade AgB8/1 do antígeno B de *Echinococcus granulosus* como modelo inicial.

3.2 Objetivos específicos

- i) Projetar oligonucleotídeos iniciadores para a sequência codificadora de AgB8/1.
- ii) Padronizar as reações de PCR para amplificação da sequência codificadora de AgB8/1.
- iii) Preparar o vetor pPICZαC para clonagem por recombinação homóloga.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores

Foram projetados oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação da sequência codificadora da subunidade AgB8/1 utilizando-se o software Vector NTI Advance 10 (Invitrogen).

4.2 Amplificação da sequência codificadora

A sequência codificadora da subunidade AgB8/1 foi amplificada por uma PCR primária com os oligonucleotídeos iniciadores B1-Pic_F e B1-Pic_R. O produto da PCR primária foi utilizado como molde para uma PCR secundária com os oligonucleotídeos iniciadores Sec-Pic_F e Sec-Pic_R.

As PCRs foram realizadas nas seguintes condições: uma desnaturação inicial por 3 min a 94°C, 35 ciclos sendo 1 min a 94°C, anelamento a 55°C por 45 seg e 1 min a 72°C para extensão, além de uma extensão final por 10 min a 72 °C, utilizando-se o *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Thermo), conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram analisados em gel de agarose corado com *GelRed*.

4.3 Preparação do vetor pPICZαC para clonagem

O vetor para expressão e secreção em *P. pastoris* pPICZαC (Life Technologies) foi linearizado por clivagem com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI e, após clivado, foi desfosforilado com a enzima *SAP* afim de remover grupamentos fosfato impedindo, dessa forma, a religação do DNA durante a clonagem.

Após a clivagem o vetor foi purificado utilizando-se o *kit* de purificação de DNA GFX (GE Healthcare).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Projeção de oligonucleotídeos iniciadores

As sequências obtidas dos oligonucleotídeos iniciadores projetados no software Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) se encontram na tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados. T: (temperaturas de anelamento utilizadas nos programas das PCRs).

Nome	Sequência	T (°C)
B1-Pic_F	5' CGAGAAGAGAGAGGGCTGAAGCAGATGATGGCCTCACCTCGAC 3'	54,1°
B1-Pic_R	5' AACTCAATGATGATGATGATGATGATGTTACCTTCAGCAATCAACC 3'	52,3°
Sec-Pic_F	5' CTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGGCTGAAGCA 3'	55,5°
Sec-Pic_R	5' AGGAACAGTCATGTCTAAGGCTACAACTCAATGATGATGATGATGATG 3'	56,1°

5.2 Amplificação da sequência codificadora

A sequência codificadora AgB8/1 foi amplificada por PCR primária a partir de DNA da sequência AgB8/1 previamente clonada no vetor pGEX, utilizando-se os iniciadores B1-Pic_F e B1-Pic_R (Tabela 1).

Foi realizada PCR primária em uma reação total de 25 μ L contendo 2,5 μ L de tampão de PCR 10x, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 μ M de dNTP's, 0,2 μ M de ambos os iniciadores, e 1U de enzima para 25 μ L de reação. Foram utilizados 30 ng de DNA molde para amplificação da sequência codificadora. Desta reação o fragmento esperado a ser obtido seria de 242 pb.

O resultado da reação está representado na figura 4, onde podem ser observadas bandas inespecíficas, além da presença de uma banda no controle negativo da reação, que poderia indicar uma possível contaminação.

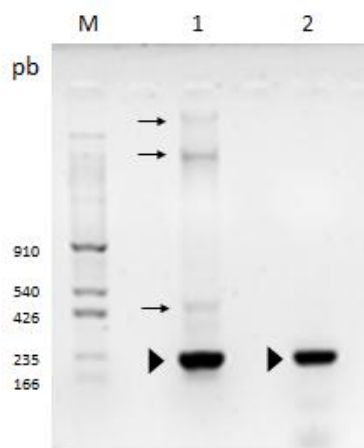


Figura 4: Produto da amplificação de PCR primária. **M** – Marcador de peso molecular (pb); **1** - PCR primária; (→) Bandas inespecíficas da reação de PCR; (►) Produto da PCR primária. **2** – Controle negativo da reação (sem adição de DNA); (►) Banda inespecífica no controle negativo, possível contaminação.

Devido à presença de amplificação no controle negativo, considerou-se a possibilidade de haver uma contaminação da reação com DNA desconhecido, que poderia ser proveniente do ambiente ou de reagentes contaminados. Com a finalidade de eliminar possíveis contaminações, além dos cuidados na manipulação do material, foram testadas novas alíquotas dos reagentes utilizados na reação da PCR primária.

No entanto, os resultados da nova reação apresentaram os mesmos padrões de bandas da PCR anterior, tanto em relação às bandas inespecíficas quanto em relação à possível contaminação (Figura 5).

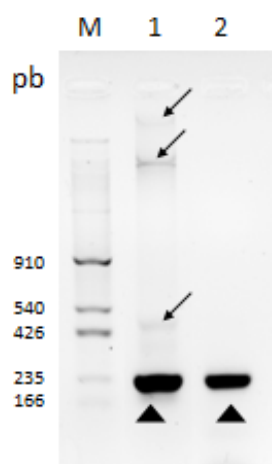


Figura 5: Produto da amplificação a partir de PCR primária utilizando-se novas alíquotas de reagentes. **M** – Marcador de peso molecular (pb); **1** - PCR primária; (↘) Bandas inespecíficas da reação de PCR; (▲) Produto da PCR primária. **2** – Controle negativo da reação (sem adição de DNA); (▲) Possível contaminação.

A concentração de magnésio pode afetar diversas características da reação, como o anelamento dos iniciadores, a temperatura de dissociação das fitas moldes e do produto de PCR, a especificidade do produto, formação de artefatos como "dímeros de primers" e atividade e especificidade da enzima (PCR protocols, 1990).

Como alternativa para um aumento da especificidade e fidelidade da reação, foram testadas diferentes concentrações de $MgCl_2$ (2,5 mM e 3 mM) e temperatura de anelamento de $65,4^\circ C$, conforme apresentado na figura 6. Não foram observadas diferenças nos padrões obtidos.

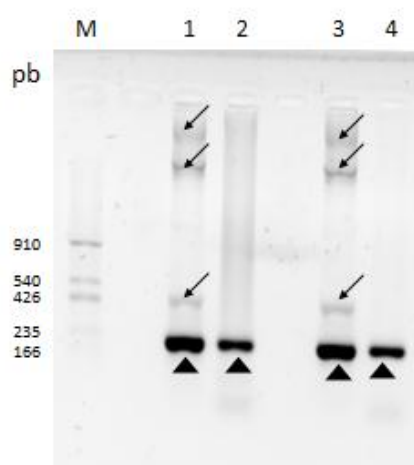


Figura 6: Produto da amplificação a partir de PCR primária utilizando-se diferentes concentrações de $MgCl_2$ e Temperatura de anelamento $65,4^\circ C$. M – Marcador de peso molecular (pb); 1 - PCR primária com $MgCl_2$ 2,5 mM. 2 – Controle negativo da reação com 2,5 mM de $MgCl_2$ (sem adição de DNA). 3 - PCR primária com 3 mM de $MgCl_2$. 4 – Controle negativo da reação com 3 mM de $MgCl_2$ (sem DNA).

Foram realizados testes para analisar a influência do excesso de molde e de iniciadores nos resultados da PCR, nos quais se utilizaram 3 ng de DNA molde (Figura 7A) e $0,1 \mu M$ de cada iniciador (Figura 7B), respectivamente.

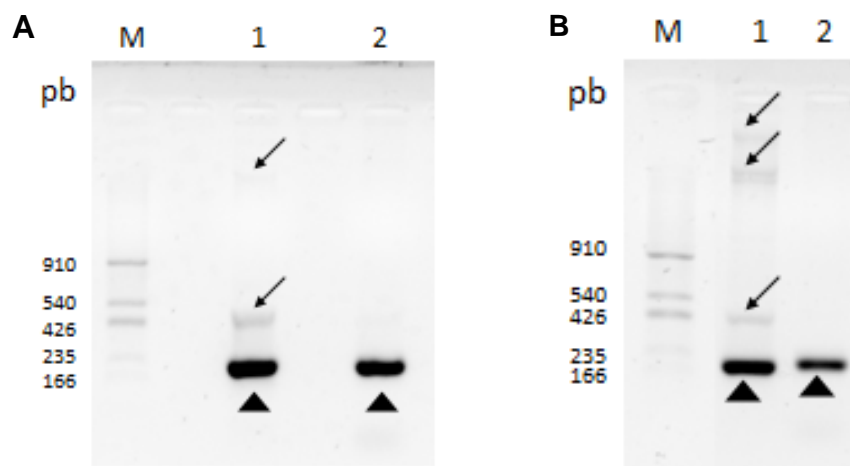


Figura 7: Produto da amplificação a partir de reação com molde e iniciadores diluídos. Em **A**, produto da PCR primária com 3 ng/ μ L, M – Marcador de peso molecular (pb), **1** – Reação com molde diluído, **2** – controle negativo (sem adição de DNA). Em **B**, produto da PCR primária com 0,1 μ M de iniciadores, **1** – Reação com iniciadores diluídos, **2** – controle negativo (sem DNA).

Observou-se uma redução das bandas inespecíficas de maior tamanho na reação com o molde diluído (3 ng), sendo assim, as reações posteriores foram realizadas com essa condição.

Realizou-se uma reação na qual foram utilizadas diferentes concentrações de iniciadores na mesma reação, sendo 0,02 μ M para B1-Pic_F e 0,2 μ M para B1-Pic_R. Desta reação obteve-se o melhor resultado e rendimento da PCR primária, na qual se observou a presença de amplificação da banda específica, gerando um produto de PCR de 242 pb (Figura 8A), apesar de uma banda inespecífica.

Uma vez que a concentração de iniciadores foi reduzida e, após essa redução, foram obtidos melhores resultados na amplificação além da diminuição significativa de bandas inespecíficas, acredita-se que estaria havendo formação de “dímeros de primer” nas reações, o que atrapalhou a amplificação do produto esperado. Com a diminuição da concentração de iniciadores, a formação desses dímeros também diminuiu, possibilitando a amplificação.

O produto da PCR primária foi purificado da banda do gel de agarose, utilizando-se *kit* de purificação de DNA GFX (GE Healthcare). A purificação foi eficiente e o produto pôde ser utilizado como molde para a PCR secundária com os oligonucleotídeos iniciadores Sec-Pic_F e Sec-Pic_R, ambos a 0,2 μ M. A partir da qual se obteve o fragmento desejado (292 pb) conforme figura 8B que,

posteriormente, será utilizado para a clonagem por recombinação homóloga *in vivo*.

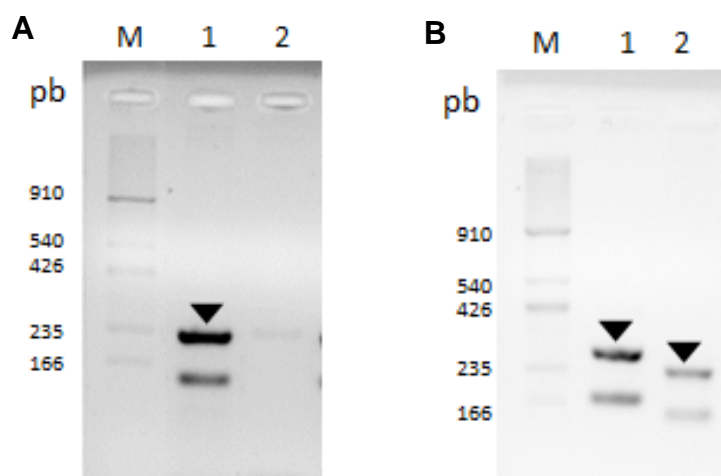


Figura 8: Produtos de amplificação das PCR's primária e secundária. Em **A**, PCR primária; **M** – marcador de peso molecular (pb); **1** – PCR primária, fragmento obtido de 242 pb; **2** – Controle negativo (sem adição de DNA). Em **B**, PCR secundária; **M** – marcador de peso molecular (pb); **1** – PCR secundária, fragmento obtido de 292 pb; **2** – PCR primária para comparação de bandas (fragmento de 242 pb).

5.3 Linearização do vetor pPICZ α C

Foi realizada uma extração de DNA plasmidial do vetor para expressão em *P. pastoris* pPICZ α C, da qual se obteve um rendimento de 98,5 μ g em 50 mL de cultura. Posteriormente, o vetor foi linearizado por clivagem com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI e defosforilado com a enzima SAP (Figura 9).

O vetor será utilizado na clonagem por recombinação homóloga, onde células competentes de *E. coli* DH5 α serão transformadas por choque térmico com um plasmídeo linearizado e o fragmento de DNA linearizado (AgB8/1) que contenha extremidades homólogas ao vetor, resultando na inserção do fragmento de DNA no plasmídeo por recombinação (Figura 10).



Figura 9: Linearização do vetor pPICZαC. Vetor após linearização por clivagem com enzimas de restrição EcoRI e XhoI. **1** – Vetor íntegro. **2** – Vetor clivado.

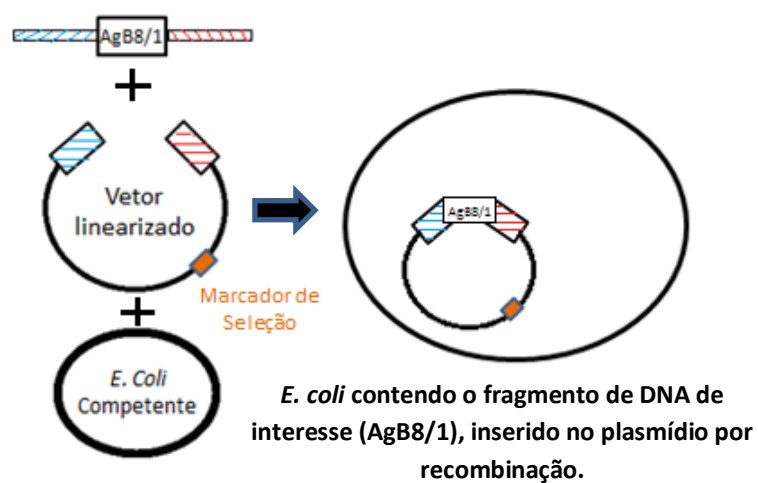


Figura 10: Esquema da clonagem por recombinação homóloga. Adaptado de PARRISH *et al.* (2004).

6 PERSPECTIVAS

Como perspectiva desse trabalho, está a clonagem da subunidade AgB8/1 no vetor pPICZ α C por recombinação homóloga *in vivo* segundo PARRISH *et al.* (2004). Seguindo esta metodologia, células da linhagem DH5 α de *E. coli* serão transformadas com o vetor linearizado e o inserto a ser clonado por choque térmico e após, os transformantes serão selecionados em meio LB *low-salt* contendo o antibiótico zeocina.

A partir da obtenção da construção pPICZ α C-AgB8/1 será realizada a transformação da levedura e os clones recombinantes serão utilizados na padronização da expressão em *P. pastoris*, seguindo-se a padronização da purificação da proteína recombinante. Posteriormente, serão realizados estudos estruturais e funcionais, principalmente em comparação às proteínas produzidas em *E. coli*.

REFERÊNCIAS

ALVITE, G.; ESTEVES, A. Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. **Frontiers in Physiology**, v. 3 SEP, n. September, p. 1–7, 2012.

AREND, A. C. et al. The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. **Experimental Parasitology**, v. 108, n. 1-2, p. 76–80, 2004.

AZIZ, A. et al. Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1560–1572, 2011.

BARON, M. et al. A selectable bifunctional beta-galactosidase:phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. **Gene**, v. 114, n. 2, p. 239–243, 1992.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 422–427, 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.

CHEMALE, G. et al. *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, n. 2, p. 233–237, 2001.

CHEMALE, G. et al. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1747, n. 2, p. 189–194, 2005.

DROCOURT, D. et al. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 13, p. 4009, 1990.

FERNÁNDEZ, V. et al. Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 247–250, 1996.

FROSCH, P. et al. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 64, n. 1, p. 171–175, 1994.

GASSER, B. et al. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. **Future Microbiol**, p. 191–208, 2013.

GAVIDIA, C. M. et al. Diagnosis of cystic echinococcosis, central peruvian highlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 260–266, 2008.

GONZÁLEZ-SAPIENZA, G.; LORENZO, C.; NIETO, A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, Echinococcus granulosus antigen B. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 3979–3983, 2000.

HOLCMAN, B.; HEATH, D. D. The early stages of Echinococcus granulosus development. **Acta Tropica**, v. 64, n. 1-2, p. 5–17, 1997.

INVITROGEN. pPICZ α A , B , and C Pichia expression vectors for selection on ii. **Manual**, n. 25, 2010.

JANSSEN, D. et al. Immunomodulation by hydatid cyst fluid toxin (Echinococcus granulosus). **Parasite immunology**, v. 19, n. 4, p. 149–160, 1997.

LEE, E. G. et al. A hydrophobic ligand-binding protein of the Taenia solium metacestode mediates uptake of the host lipid: Implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis. **Proteomics**, v. 7, n. 21, p. 4016–4030, 2007.

LIGHTOWLERS, M. W. et al. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of Echinococcus granulosus. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 37, n. 2, p. 171–182, 1989.

MAMUTI, W. et al. Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from Echinococcus granulosus genotypes 1 and 6. **Parasitology International**, v. 56, n. 4, p. 313–316, 2007.

MCMANUS, D. P. et al. Echinococcosis. **The Lancet**, v. 362, n. 9392, p. 1295–1304, 2003.

MONTEIRO, K. M. et al. Proteomic analysis of the Echinococcus granulosus metacestode during infection of its intermediate host. **Proteomics**, v. 10, n. 10, p. 1985–1999, 2010.

MONTEIRO, K. M. et al. Echinococcus granulosus Antigen B structure: Subunit composition and oligomeric states. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, 2012.

MORO, P.; SCHANTZ, P. M. Echinococcosis: a review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 125–133, 2009.

MUSIANI, P. et al. Echinococcus granulosus: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. **Journal of clinical pathology**, v. 31, n. 5, p. 475–478, 1978.

OBAL, G. et al. Characterisation of the native lipid moiety of echinococcus granulosus antigen B. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

ORIOLO, C.; ORIOLO, R. **Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of Echinococcus granulosus** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1975.

ORIOL, R. ET AL. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. v. 20, n. n. 4, p. 569–74, 1971.

PARRISH, J. R. et al. High-Throughput Cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in Vivo Recombination in *Escherichia coli* research articles. p. 582–586, 2004.

RESINA, D. et al. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, n. 6, p. 760–767, 2005.

RIGANÒ, R. et al. Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses. v. 69, n. 1, p. 288–296, 2001.

RIGANÒ, R. et al. Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 129, n. 3, p. 485–492, 2002.

RIGANÒ, R. et al. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1667–1678, 2007.

ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. p. 1–7, 1995.

SHEPHERD, J. C.; AITKEN, A.; MCMANUS, D. P. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 81–90, 1991.

THOMPSON, R. C. A. Biology and systematics of *Echinococcus*. In: THOMPSON, R. C. A.; LAMBERY, A. (Eds.). **Echinococcus and hydatid disease**, p. p. 1–50, 1995.

(1991), PCR Protocols: A guide to methods and applications, edited by Michael A. Innis et al., Academic Press, 482 pp, **Mol. Reprod. Dev.**, 28: 419. 1990.

VIRGINIO, V. G. et al. Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: Possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. **Parasitology Research**, v. 100, n. 5, p. 935–942, 2007.

ZHANG, W.; LI, J.; MCMANUS, D. P. **Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease** **Clinical Microbiology Reviews**, 2003.

ZHANG, W.; MCMANUS, D. P. **Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis** **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2006.