

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

**Clonagem de um domínio desestabilizante em  
*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 para verificar o  
funcionamento de um método de regulação induzida de  
proteínas em micobactérias.**

**Carolina Rodrigues Felix**

Pelotas, 2010

**CAROLINA RODRIGUES FELIX**

**Clonagem de um domínio desestabilizante em *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>  
155 para verificar o funcionamento de um método de regulação induzida de  
proteínas em micobactérias**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Ciências  
Biológicas – Bacharelado da  
Universidade Federal de Pelotas, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Pedro Eduardo Almeida da Silva  
Co-Orientador: Prof. Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2010

**Banca Examinadora:**

Prof Andrea von Groll

Prof Sibebe Borsuk

Suplente Samuel R. Felix

Dedico esse trabalho ao meu amor, Augusto Schneider.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer aos meus pais Neusa e Luiz Felix e irmãos, Luisa, Samuel, Anelize e Fernando pelo amor incondicional,

Ao meu marido Augusto, te amo!

À família Schneider pelo carinho.

Ao meu orientador Prof Pedro Eduardo Almeida da Silva e Co-Orientadores Prof Odir Dellagostin e Prof David Russell por acreditarem no meu trabalho.

Aos Professores da Comissão de estágio, além da Coordenadora e secretário do Curso de Ciências Biológicas pelo apoio.

Às amigas Mari's e Mê que tanto me ajudaram e me ouviram na faculdade...

À Feramos, pelos ensinamentos, paciência, amizade....

E finalmente a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação,

Muito Obrigada!

## Resumo

FELIX, Carolina Rodrigues. **Clonagem de um domínio desestabilizante em *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 para verificar o funcionamento de um método de regulação induzida de proteínas em micobactérias.** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas

A tuberculose é uma importante doença infecciosa, causada, principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Ferramentas moleculares têm gerado uma grande quantidade de informação a respeito da patogenicidade, resistência aos antimicrobianos e *fitness* relacionado a estes patógenos. O objetivo desse trabalho foi avaliar um método de regulação induzida de proteínas através da clonagem de um domínio desestabilizante (DD), fusionado à proteína fluorescente amarela YFP (*yellow fluorescent protein*) e à proteína fluorescente verde GFP (*green fluorescent protein*). Realizou-se a clonagem do domínio desestabilizante fusionado as proteínas GFP e YFP e transformação em *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Realizaram-se medições de fluorescência para as cepas com as construções de YFP e GFP fusionados ao domínio desestabilizante. Todas as construções foram também sequenciadas e a expressão das proteínas foi verificada por *Western blotting*. Observou-se que as construções contendo YFP e GFP foram expressas em *M. smegmatis*, no entanto não se observou fluorescência da proteína YFP. Observou-se também, através de *Western Blotting* e microscopia, a não degradação das proteínas YFP e GFP fusionadas ao DD por *M. smegmatis*. Estes resultados indicam que a estratégia de regulação induzida de proteínas nas condições avaliadas nesse trabalho não é adequada para aplicação no estudo em micobactérias.

Palavras-chave: Tuberculose, Clonagem, YFP, GFP, domínio desestabilizante.

## Abstract

FELIX, Carolina Rodrigues. **Clonagem de um domínio desestabilizante em *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 para verificar o funcionamento de um método de regulação induzida de proteínas em micobactérias.** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas

Tuberculosis is an important infectious disease caused, mainly by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular tools have provided a great amount of information regarding pathogenicity, resistance to antimicrobials and fitness of these pathogens. The goal of this study was to evaluate a method of induced regulation of proteins by cloning a destabilization domain (DD) fused to a yellow fluorescent protein (YFP) and a green fluorescent protein (GFP). The destabilizing domain was fused to GFP as well as YFP, cloned and transformed into *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155. The fluorescence of the strains containing the constructs was measured. All the constructs were also sequenced and the expression of the proteins was verified by Western Blotting. All the recombinant proteins were expressed in *M. smegmatis*, however we were not able to observe fluorescence of YFP in this bacteria. We also observed, through Western Blotting and microscopy, that the proteins fused to the DD were not degraded in any culture condition. In conclusion, the results obtained in this study showed that this method of induced protein regulation is not functional in mycobacteria, and therefore cannot be applied to its study.

Palavras-chave: Tuberculosis, Cloning, YFP, GFP, destabilizing domain.

## Lista de Figuras

Figura 1	Mapa do plasmídeo de expressão em <i>Leishmania</i> , contendo a construção YFPdd2.....	16
Figura 2	Mapa do vetor <i>shuttle</i> escolhido para a clonagem das construções,.....	17
Figura 3	Fluorescência média dos cultivos em unidades relativas de fluorescência.....	23
Figura 4	Imagem obtida a partir da revelação do <i>Western blot</i> das cepas contendo as construções de YFP.....	23
Figura 5	Imagem obtida a partir da revelação do <i>Western blot</i> contendo as construções de GFP.....	24
Figura 6	Imagens obtidas a partir da microscopia de fluorescência utilizando o filtro FITC e o aumento de 400 vezes.....	26

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequências dos primers utilizados para o experimento.....	16
----------	---	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>YFP</b>	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>DD</b>	Domínio desestabilizante

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Metodologia.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Descrição e amplificação dos genes .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Ligação do vetor com o inserto.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. Preparo de células competentes e transformação.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4. Extração e digestão plasmidial.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. Cultivos.....</b>	<b>18</b>
<b>2.6. Sequenciamento.....</b>	<b>19</b>
<b>2.7. Bioensaios para verificar expressão e degradação proteica.....</b>	<b>19</b>
<b>2.7.1. <i>Western blot</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>2.7.2. Medidas de fluorescência.....</b>	<b>20</b>
<b>2.7.3. Microscopia de fluorescência.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>21</b>
<b>4. Conclusão.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma importante doença infecciosa que tem como o principal agente etiológico o bacilo álcool-ácido resistente, *Mycobacterium tuberculosis*. Essa enfermidade ocorre predominantemente nos países em desenvolvimento onde os índices de fragilidade social são elevados. A tuberculose é prevalente em indivíduos aparentemente saudáveis e é extremamente grave em indivíduos imunocomprometidos, particularmente notório em pacientes portadores de AIDS. Estima-se que aproximadamente 9,3 milhões de novos casos ocorram anualmente no mundo (WHO 2010).

O sequenciamento do genoma da cepa *M. tuberculosis* H37Rv possibilitou diversas novas abordagens no estudo desse patógeno (COLE *et al.*, 1998). O uso de *microarray* vem permitindo traçar perfis transcritômicos dessa bactéria em infecções *in vivo* e *in vitro*, facilitando a busca por genes de relevância na patogenicidade e virulência (KENDALL *et al.*, 2004; BUTCHER *et al.*, 2004; MURRY *et al.*, 2005). Ainda assim, o emprego de técnicas que produzam informações mais específicas continua importante para estudar a funcionalidade desses genes.

A utilização de promotores reguláveis em *M. tuberculosis*, por exemplo, tem elucidado questões a respeito de diversos genes relacionados com virulência e patogenicidade, além de genes essenciais. (MURRY *et al.*, 2005; BLOCKPOEL *et al.* 2005). Porém, nesse sistema, mesmo depois de inativado o promotor, a proteína que já foi expressa persiste na célula e, portanto, o fenótipo pode continuar por várias horas dependendo da meia vida da proteína em estudo.

Utilizando moléculas sintéticas permeáveis, BANASZYNSKI *et al.* (2006) desenvolveram um método rápido e reversível de regular a estabilidade de determinadas proteínas em células de mamíferos. O método é baseado na degradação regulada de proteínas quando fusionadas a um domínio da

proteína ligante de FK506/rapamicina, FKBP (*FK506/rapamycin-binding-protein*), denominado domínio desestabilizante (DD). Além disso, o sistema depende de um conjunto de proteases compartimentalizadas denominado proteassoma. O proteassoma é encontrado em todos os eucariotos e alguns procariotos, sendo responsável pela degradação de proteínas marcadas com ubiquitina. Essa é uma proteína pequena, ubíqua em eucariotos, porém não detectada em procariotos, a qual marca proteínas a serem degradadas pelo proteassoma. Além disso, a ubiquitina está envolvida na regulação de diversas outras funções celulares como transcrição gênica, reparo de DNA e divisão celular. (CERDA-MAIRA et al., 2009; DARWIN, 2009).

Em procariotos a via proteolítica da ubiquitina-proteassoma está presente apenas nas bactérias da ordem Actinomycetales. Nas micobactérias ela é semelhante à encontrada em eucariotos e está supostamente envolvida com mecanismos de patogenicidade (CERDA-MAIRA et al., 2009). Apesar dessas bactérias não possuírem ubiquitina, sabe-se que a proteína procariótica semelhante a ubiquitina (*Pup, prokariotic ubiquitin-like protein*), presente em micobactérias, possui uma função análoga a da ubiquitina, e se encontra ligada covalentemente a diversas proteínas destinadas a degradação. Além disso, vários substratos já foram identificados para essa proteína em *M. tuberculosis* (BURNS et al., 2009; PEARCE et al., 2008; 2006; STRIEBEL et al., 2010).

Em células eucarióticas foi provado que proteínas fusionadas ao DD são instáveis e sujeitas à degradação pelo proteassoma. No entanto na presença de rapamicina a proteína fusionada ao DD não é degradada pelo proteassoma (BANASZYNSKI et al. 2006). A rapamicina é um antibiótico hidrofóbico, o qual foi descoberto como um antifúngico, e hoje vem sendo amplamente utilizado no combate ao câncer (HARTFORD et al. 2007). Esse composto se liga ao DD e permite o correto dobramento da proteína, tornando-a estável. Essa metodologia de regulação induzida de proteínas foi testada em *Leishmania major* e *L. braziliensis* utilizando o DD fusionado a proteína fluorescente amarela (YFP), onde mostrou-se funcional. Além disso, essa abordagem permitiu demonstrar a função de proteínas envolvidas na síntese do lipofosfoglicano, um fator de virulência em *L. major* vinculado a sobrevivência do parasita dentro do mosquito (SILVA et al., 2009). Esse

sistema também demonstrou eficácia em promover a regulação induzida de proteínas de *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* e, mais recentemente, permitiu caracterizar uma proteína essencial para o ciclo de vida do *P. falciparum* no hospedeiro (ARMSTRONG et al., 2007; HERM-GÖTZ et al., 2007;; DVORIN et al., 2010).

Estudos recentes sugerem que o proteassoma é importante para a sobrevivência do *M. tuberculosis* no macrófago. DARWIN et al. (2009), demonstrou que a inibição do proteassoma torna o *M. tuberculosis* mais sensível ao óxido nítrico utilizando o inibidor proteassômico MLN-273. Este composto é um derivado do ácido borônico, o qual vem sendo estudado como anti-tumoral. A eficácia do MLN-273 em inibir o proteassoma micobacteriano foi comprovada no trabalho de DARWIN et al. (2009), além disso, esse composto não é tóxico à bactéria quando na ausência de óxido nítrico.

Ferramentas genômicas podem gerar grande quantidade de informação, apesar disso, percebe-se que a quantidade de técnicas disponíveis atualmente para o estudo do *M. tuberculosis* não é proporcional a importância deste patógeno. Em vista disso, é necessário buscar novas ferramentas que venham elucidar questões a respeito de mecanismos de patogenicidade e virulência deste bacilo. A utilização da metodologia descrita por BANASZYNSKI et al. (2006) pode fornecer informações a respeito de muitos aspectos da fisiologia bacteriana, como regulação e função de determinados genes nos diferentes estágios de infecção de macrófagos. Além disso, poderá ser uma boa alternativa ao *knockout*, para confirmar a função de supostos genes essenciais. Em vista disso, o objetivo desse trabalho é verificar o funcionamento desse sistema de regulação induzida de proteínas utilizando um DD em micobactérias.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1. Descrição e Amplificação dos genes

Os experimentos desse estudo foram todos realizados no Laboratório do Professor David Russell, no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Cornell –Estados Unidos da América.

Para as reações de amplificação utilizou-se como *template* o plasmídeo de pIRPHLEOYFPdd2 contendo a construção YFP com DD2 fusionada a porção C-terminal (YFPdd2). A construção (Fig. 1) foi cedida pelo Prof. Stephen Beverley (Departamento de Microbiologia, Escola de Medicina da Universidade de Washington) e foi descrita por SILVA et al. (2009) e BANASZYNSKI et al. (2006)

Além de YFP usou-se também uma proteína fluorescente verde otimizada para expressão em micobactérias (GFP). Para fusionar a GFP ao DD, utilizou-se os *primers* descritos na Tab. 1, e realizou-se um *overlap extension* PCR. Essa técnica consistiu em desenhar o *forward primer* para amplificação do DD com uma cauda complementar a porção terminal do gene *mut2GFP*, a qual possibilita o anelamento das duas fitas de DNA pelas pontas. Após dez ciclos de PCR (anelamento à 47°C) para produzir um *template* dos genes fusionados, adicionou-se os *primers* externos para amplificação da região inteira.

Utilizou-se a enzima Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Keilaranta, Finland) para todas as reações. O genes amplificados foram visualizados em gel de agarose 0.8%.

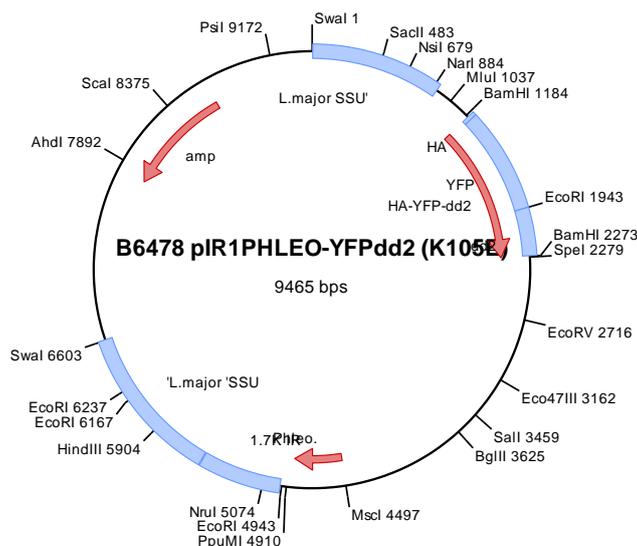


Figura 1- Mapa do plasmídeo de expressão em Leishmania, contendo a construção YFPdd2

**Tabela1** – Sequências dos *primers* utilizados para o experimento

Gene	Sequências de Primers	Sítios de Restrição*	TA
YFPdd2	F CATATGATGTATCCGTACGACGTACCG	Nde I	59° C
	R AAGCTTTCATTCCAGTTCTAGAAGCTCCA	Hind III	
YFP	F CTGCAGAGTAAAGGAGAAGAACT	Nde I	49° C
	R AAGCTTCTATTTTGTATAGTCCATCC	Hind III	
GFPdd2 overlap	F GATGAACTATACAAAGGAGTGCAGGTGGAAACCAT	Hind III	62° C
	R AAGCTTTCATTCCAGTTCTAGAAGCTCCA		
GFPdd2	F CTGCAGAGTAAAGGAGAAGAACT	PstI	59° C
	R AAGCTTTCATTCCAGTTCTAGAAGCTCCA	HindIII	
ddGFP overlap	F CGGGATCCATGGGAGTGCAGGTGGAA	HindIII	60 ° C
	R TTCTCCTTTACTCATTTCCGGTTTTAGAAGCTCCAC		
ddGFP	F CGGGATCCATGGGAGTGCAGGTGGAA	PstI	60 ° C
	R CTGCAGAAGCTTCTATTTGTATAGTTTCATCC	Hind	

\*Os sítios de restrição estão adicionados nas sequências dos *primers*.

TA – Temperatura de anelamento

Todos os primers são descritos no sentido 5' – 3'

<sup>F</sup> *Forward primer*

<sup>R</sup> *Reverse primer*

## 2.2. Ligação do vetor com o inserto

As construções GFP, ddGFP, GFPdd2, YFP e YFPdd2 foram subclonadas em pCR<sup>®</sup>4 Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e

posteriormente realizou-se a digestão com as enzimas de restrição *PstI* e *HindIII* para as construções contendo GFP, e *NdeI* e *HindIII* para as construções contendo YFP. Posteriormente as construções foram clonadas em pV16. Para transformação em *M. smegmatis* escolheu-se o vetor *shuttle* pVV16 (Fig. 2), o qual permite utilizar canamicina como marcador de seleção, além disso esse vetor possui um promotor HSP6. Utilizou-se o kit de ligação Fast-Link™ DNA Ligation Kit (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, EUA) para todas as ligações realizadas com pVV16.

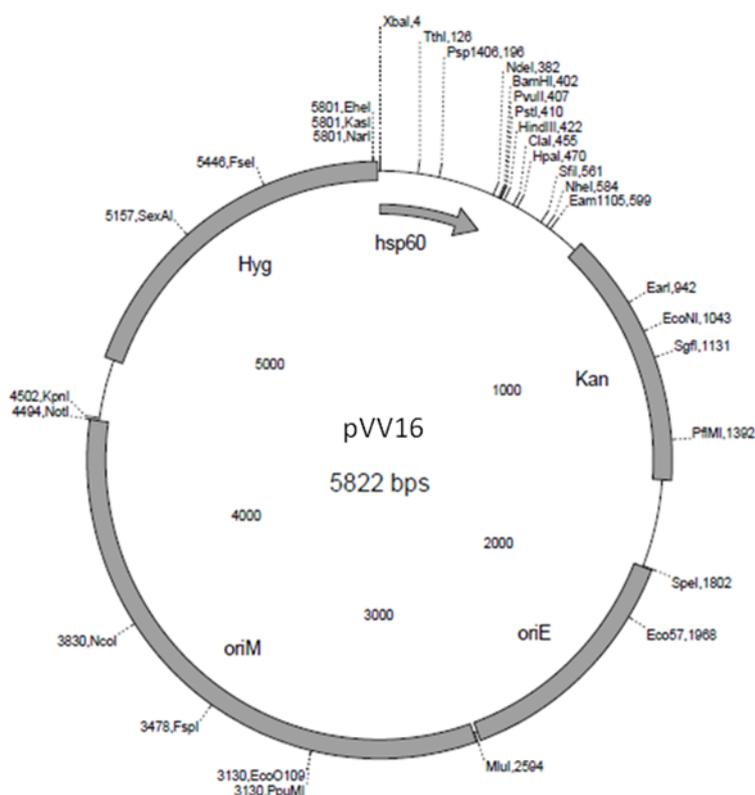


Figura 2 - Mapa do vetor *shuttle* escolhido para clonagem das construções, esse vetor promove a expressão das proteínas em micobactérias.

### 2.3. Preparo de Células Competentes e Transformação

As transformações em *E. coli* foram realizadas com células quimicamente competentes usando o kit One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

Para transformação do *M. smegmatis* foram preparadas células competentes. *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 foi cultivada em meio líquido Difco™

Middlebrook 7H9 Broth (BD, Franklin Lakes, EUA) no *shaker* à 37°C até a obtenção de uma densidade óptica de 0,6 em 620nm. Quatro tubos de cultivo contendo 50ml cada um foram centrifugados por 10 minutos à 4°C e 4500rpm. O *pellet* foi lavado com água destilada estéril e novamente centrifugado. Realizou-se uma lavagem com glicerol 10%. Após a centrifugação o sobrenadado foi desprezado e o *pellet* ressuscitado com o restante do glicerol 10%. A transformação foi realizada por eletroporação. Transferiu-se cerca de 100µl da suspensão para uma cubeta de eletroporação e adicionou-se 2µl da ligação (inserto e vetor). Com o eletroporador, e os seguintes parâmetros: 25µFD de capacitância, 2,5 kV de voltagem e 200 ohmios de resistência se realizou a transformação. As células transformadas foram semeadas em meio de cultura sólido Difco™ Luria-Bertani Agar, Miller (BD, Franklin Lakes, EUA) contendo o antibiótico de seleção (canamicina a 50µg/ml) (MEDEIROS et al., 1999).

#### 2.4. Extração e digestão plasmidial

Para verificar se a transformação ocorreu adequadamente em *E. coli* TOP10 foi extraído o DNA plasmidial. A extração foi realizada utilizando o QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, EUA). Para verificar se o plasmídeo extraído das células transformadas continham o inserto, realizou-se a digestão do vetor com as enzimas adequadas para cada gene (Tab. 1).

#### 2.5. Cultivos

*M. smegmatis* contendo as construções pVVGFP, pVVGFPdd2, pVVddGFP, pVVFYFP e pVVFYFPdd2 foram cultivadas em meio líquido Difco™ Middlebrook 7H9 Broth (BD, Franklin Lakes, EUA) contendo, ou não, 10µM de rapamicina. As cepas foram também cultivadas na presença, ou não, do inibidor proteossômico MLN-273 (10µM).

## 2.6. Sequenciamento

Todas as construções (pVVGFP, pVVGFPdd2, pVVddGFP, pVVFYFP e pVVFYFPdd2) foram enviadas para sequenciamento pela *Life Sciences Core Laboratories Center* da Universidade de Cornell e as sequências analisadas utilizando o programa Lasergene 8.1 (2009)

## 2.7. Bioensaios para verificar expressão e degradação proteica

Os cultivos foram realizados em duplicata, e posteriormente repetidos. Utilizou-se 2mL de meio, contendo o antibiótico de seleção, e incubados por 24h a 37°C. Posteriormente adicionou-se a rapamicina ou MLN-273 e os cultivos foram reincubados por mais 24h. Após esse tempo, realizou-se *Western blot*, microscopia de fluorescência e obteve-se medidas de fluorescência para cada um dos cultivos.

### 2.7.1. *Western blot*

Após o tempo de incubação realizou-se centrifugação a 3500rpm por dez minutos e os *pellets* obtidos foram sonicados em 2mL de tampão de lise (20mM KPO<sub>4</sub>; pH 7,4; 0,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5mM CaCl<sub>2</sub>; 1X Inibidor de Protease). As células lisadas foram centrifugadas por dez minutos a 14000rpm. Aplicou-se 25µL de cada amostra em um gel de poliacrilamida 10%. Após a transferência para membrana de nitrocelulose (45µm) (Biorad<sup>®</sup>, Hercules, CA, EUA) adicionou-se o anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-hemaglutinina (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Inc., Santa Cruz, CA, EUA). Para revelação utilizou-se o anticorpo de cabra anti-camundongo IgG conjugado a Fosfatase Alcalina (Jackson Immuno Research<sup>®</sup>, West Grove, PA, EUA) e, posteriormente, o substrato para fosfatase BCIP/NBT em solução pronta para o uso (Amresco<sup>®</sup>, Solon, OH, EUA). Utilizou-se o anticorpo anti-HA pois todas as construções contendo YFP possuem também um epítipo de hemaglutinina na porção N- terminal. Utilizou-se também o anticorpo monoclonal anti-GFP o qual reage para GFP e suas variantes, YFP sendo um deles.

### 2.7.2. Medidas de fluorescência

As medidas de fluorescência foram obtidas em triplicata, além disso o experimento foi repetido com amostras de cultivos diferentes. Utilizou-se o espectrofluorômetro Gemini EM (Molecular Devices Inc., USA). As leituras de fluorescência foram obtidas nos comprimentos de onda 512/527 (excitação/emissão) e 481/507 para cepas expressando YFP e GFP, respectivamente

### 2.7.3. Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o microscópio Axioskop 2 *plus* (Carl Zeiss MicroImagin Inc., Thornwood, EUA). Lâminas foram preparadas utilizando 10 $\mu$ L de cultivo e observadas sob aumento de 400 vezes e com o filtro verde FITC o qual permite observar fluorescência nos comprimentos de onda 480/535 (excitação/emissão).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O genes YFP e YFPdd2 foram amplificados com sucesso a partir do vetor pIR1PHLEO-YFPdd2. Após a amplificação, fragmentos de DNA de aproximadamente 1kb foram observadas em gel de agarose 0.8%. Os genes foram primeiramente clonados em pCR<sup>®</sup>4 Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbard, EUA). Após seleção de clones positivos e digestão com as enzimas *NdeI*, *HindIII* e/ou *PstI*, foi possível resgatar os fragmentos de 1Kb obtidos no PCR. As construções foram subsequentemente clonadas em pVV16 e transformadas em *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. A confirmação de clones positivos foi realizada por PCR e sequenciamento. Para as reações de PCR obteve-se o mesmo fragmento de 1kb visto anteriormente. As sequências obtidas para os genes YFP e YFPdd2 foram analisadas utilizando o BLAST e se observou 100% de identidade com as dos plasmídeos YFPdd-pIR1PHLEO e pIR1PHLEO-YFPdd2, respectivamente.

Através de *overlap extention* PCR foi possível fusionar o DD ao gene mut2GFP, para obter duas contruções ddGFP e GFPdd2. As fusões foram identificadas em gel de agarose 0.8% como fragmentos de DNA de aproximadamente 1kb. As construções e o gene mut2GFP foram subclonados em pCR<sup>®</sup>4 Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbard, EUA). Após a digestão dos plasmídeos com as enzimas *PstI* e *HindIII* obteveram-se fragmentos de DNA de aproximadamente 1Kb para os plasmídeos contendo as fusões, e 700pb para aqueles contendo apenas o gene mut2GFP. Os três diferentes fragmentos foram clonados usando os sítios *PstI* e *HindIII* no vetor pVV16. As sequências obtidas para as três construções foram analisadas por BLAST, encontrando-se 100% de identidade com a sequência do gene mut2GFP. Para aquelas contendo o DD fusionado, observou-se 100% de identidade do DD com as sequências presentes no plasmídeo pIR1PHLEO-YFPdd2. A partir

da análise das sequências realizada no programa Lasergene<sup>®</sup> observou-se que o gene mut2GFP estava em fase com o DD em ambas as construções.

Através desse estudo verificou-se que a proteína YFP é expressa em *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Detectou-se expressão dessa proteína também quando fusionada ao DD. A proteína GFP fusionada, ou não, ao DD e expressa em *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 determinou fluorescência em todas as cepas. Quando as cepas expressando YFP ou GFP fusionadas ao DD foram cultivadas na presença ou ausência de 10µM do inibidor proteassômico MLN-273 e/ou 10µM de rapamicina não se observou diferenças significativas na expressão das proteínas recombinantes com ou sem os tratamentos. Além disso, não foi possível detectar degradação das proteínas fusionadas ao DD em nenhum dos cultivos.

A fluorescência das cepas expressando YFP foi comparável ao que se obteve no controle negativo (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155), ou seja, não se detectou fluorescência da YFP através de medições fluorimétricas (Fig. 3). Além disso, não foi possível visualizar fluorescência dessa proteína através de microscopia. Esses resultados indicam que a proteína YFP não emitiu fluorescência em *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Isso pode estar relacionado a problemas no dobramento da proteína pelo *M. smegmatis*, impedindo que ela se tornasse ativa. Autofluorescência das proteínas bacterianas pode ter contribuído para o resultado obtido, por dificultar a detecção da fluorescência da YFP. Ainda assim, a expressão das proteínas recombinantes foi confirmada por *Western blotting* (Fig. 4). A partir dos resultados obtidos por *Western blots*, observou-se que quando se utilizou o anticorpo específico para o YFP se ocorria uma banda de maior massa molecular, a qual poderia indicar a formação de corpos de inclusão, não detectados pelo anticorpo para a cauda de hemaglutinina. Isso também pode ter causado os baixos níveis de fluorescência encontrados, já que a formação de agregados proteicos insolúveis torna a proteína inativa.

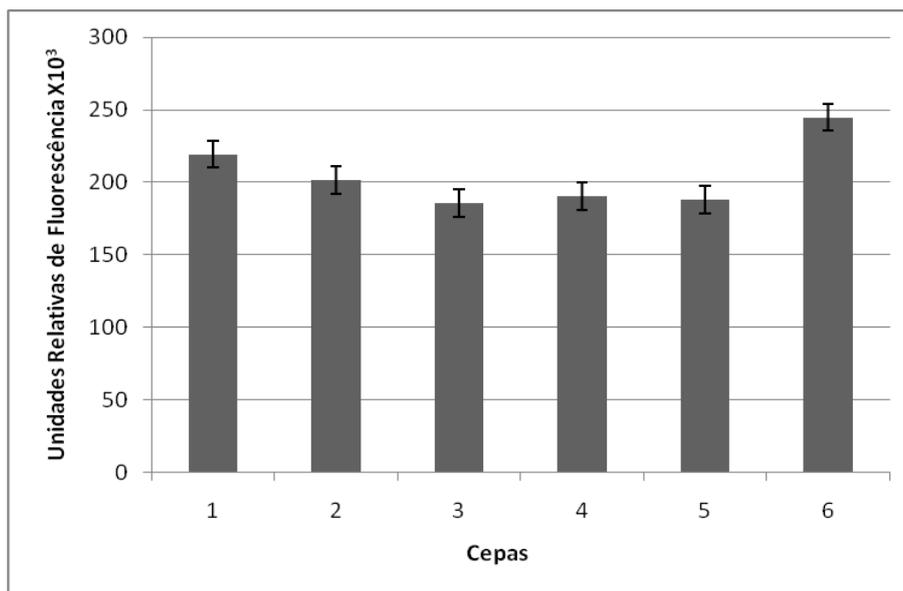


Figura 3 - Fluorescência média dos cultivos em unidades relativas de fluorescência. (1) *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; (2) *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 cultivado em 10 $\mu$ M de rapamicina; (3) *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 contendo a YFP; (4) clone cultivado em 10 $\mu$ M de rapamicina; (5) *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 contendo a YFPdd2; (6) clone cultivado em 10 $\mu$ M de rapamicina.

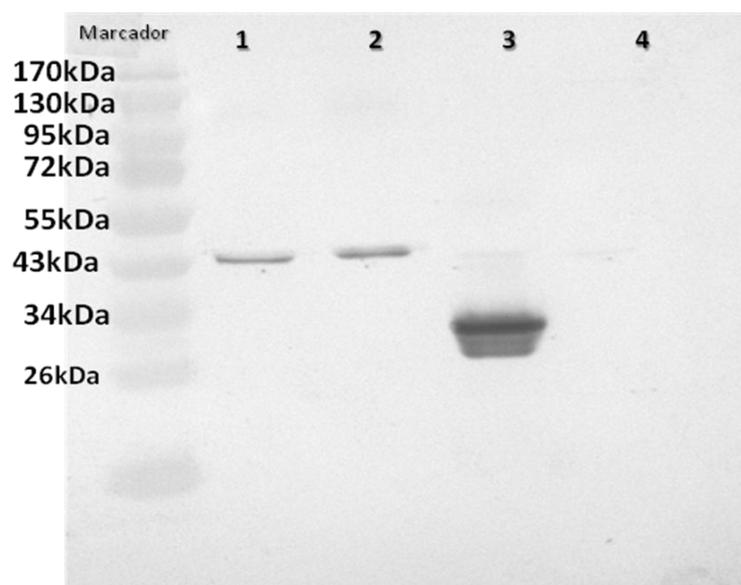


Figura 4 – Imagem obtida a partir da revelação do Western Blot. (1) clone contendo pVV16 com o inserto YFPdd2 em cultura com 5 $\mu$ M de MLN-273; (2) clone contendo pVV16 com o inserto YFPdd2 em cultura sem o inibidor; (3) clone contendo pVV16 com o inserto YFP; (4) *M. smegmatis* mc2155 não transformado (controle negativo).

Nas cepas expressando GFP não se detectou diferenças em relação aos controles em intensidade de fluorescência através de medições no espectrofluorômetro. No entanto, foi possível visualizar fluorescência verde através de microscopia apenas nas cepas expressando essas proteínas recombinantes. Além disso, a expressão dessa proteína foi confirmada por *Western Blotting* (Fig. 5).

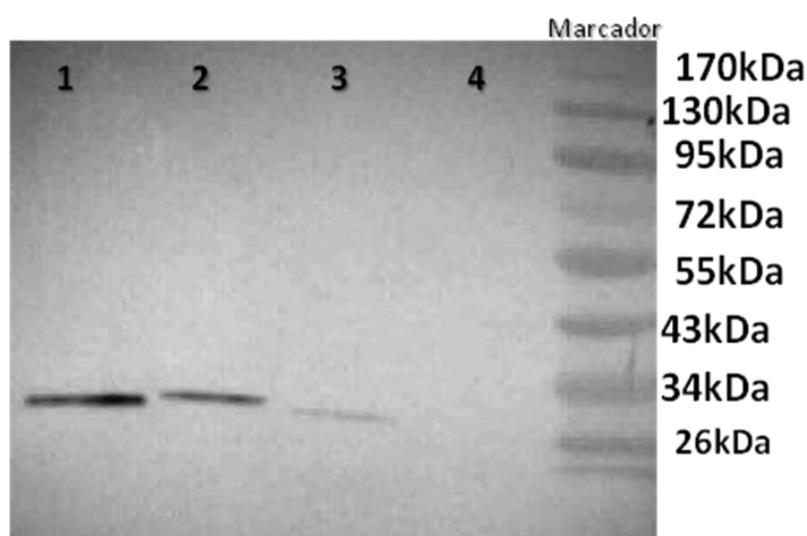


Figura 5 – Imagem obtida a partir da revelação do Western Blot. (1) clone contendo pVV16 com o inserto mut2GFP; (2) clone contendo pVV16 com o inserto GFPdd2; (3) clone contendo pVV16 com o inserto ddGFP; (4) *M. smegmatis* mc2155 contendo pVV16 (controle negativo).

Através de medições de fluorescência, microscopia ou ainda *Western Blot* não foi possível observar diferença significativa de expressão proteica entre os cultivos recebendo rapamicina e os controles. Sabe-se que as micobactérias possuem uma parede celular com uma estrutura lipídica complexa o que determina baixa permeabilidade (TAM et al., 2009; GUENIN-MACÉ et al., 2009). Apesar de a rapamicina também possuir uma estrutura hidrofóbica (HARTFORD et al. 2007), a impermeabilidade da parede micobacteriana pode ter contribuído para o resultado obtido. Além disso, WANG et al. (2000) demonstrou que *M. smegmatis* com uma parede defeituosa, se torna mais permeável a compostos hidrofóbicos. Sendo assim, é possível inferir que as propriedades, tanto da parede micobacteriana, quanto da rapamicina, tenha dificultado o acesso da droga ao interior das

células bacterianas. Sabe-se também que as micobactérias possuem bombas de efluxo, as quais são proteínas de transporte. Essas proteínas são consideradas um dos mecanismos de resistência intrínseca aos antimicrobianos (LI, 2004). Em vista disso, outra hipótese é de que a rapamicina tenha sido alvo para uma bomba de efluxo. Dessa forma, contribuindo para o resultado obtido. Sendo assim, o restante dos experimentos foi realizado com o inibidor proteasômico MLN-273. Esse composto não é ideal já que ele tem como alvo o proteassoma bacteriano e não apenas as proteínas marcadas com o DD, e assim, produz efeitos menos específicos. No entanto, a sua eficácia em inibir o proteassoma do *M. tuberculosis* já foi demonstrada em outro estudo (DARWIN et al., 2003), e por isso o uso desse composto foi proveitoso para demonstrar a funcionalidade do sistema sendo testado. DARWIN et al. (2003) também verificou maior inibição dessa via proteolítica (entre 80 e 100% de inibição) nas culturas com concentrações do inibidor entre 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M.

Observou-se que o composto MLN-273 retardou o crescimento bacteriano em relação aos controles sem inibidor. Além disso, não houve diferenças significativas na expressão das proteínas recombinantes com ou sem o inibidor proteasômico. Outra observação importante foi que as proteínas marcadas com o DD não foram degradadas, seja na presença, ou na ausência do MLN-273 a 10 $\mu$ M (Fig. 6). Esses resultados indicam que o método de regulação induzida de proteínas utilizando o DD pode não ser funcional em micobactérias, sugerindo que o proteassoma micobacteriano não é capaz de reconhecer proteínas fusionadas ao DD como alvos para degradação. O proteassoma eucarioto e o de micobactérias possuem algumas diferenças no que diz respeito ao modo como as proteínas são marcadas para degradação, as quais podem ter contribuído para o não funcionamento da metodologia abordada no presente estudo.

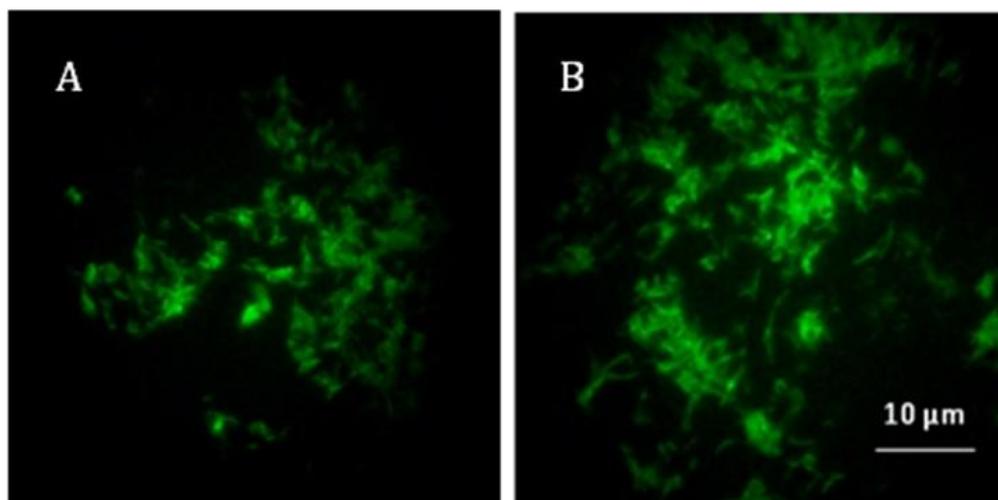


Figura 6 – Imagens obtidas a partir da microscopia de fluorescência utilizando o filtro FITC e o aumento de 400 vezes. (A) clone contendo pVV16 com o inserto GFPdd2 em cultura sem o inibidor; (B) clone contendo pVV16 com o inserto GFPdd2 em cultura com 5 $\mu$ M de MLN-273.

Proteínas eucarióticas são marcadas com ubiquitina para degradação pelo proteassoma. As micobactérias possuem a proteína Pup, a qual desempenha uma função semelhante a da ubiquitina, conjugando-se a lisina da proteína alvo pela sua porção C-terminal. Além disso, a conjugação ocorre através do resíduo glicina-glicina-glutamina da proteína Pup. BURNS et al. (2009) realizou o *knockout* desse *motif* em *M. smegmatis*, provocando acumulação de substratos proteassômicos nessa micobactéria. Recentemente, IMKAMP et al. (2010) demonstrou que antes de a proteína Pup se ligar ao substrato ela deve ser deamidada na sua porção C-terminal. Essa reação é catalizada pela enzima Dop, a qual converte glutamina em glutamato, permitindo assim que ocorra uma ligação isopeptídica entre esse resíduo e a lisina da proteína alvo. Em eucariotos essa mesma ligação ocorre, porém entre a glicina da ubiquitina e a lisina da proteína alvo, já que o resíduo proteoliticamente ativo da ubiquitina é glicina-glicina.

A partir dos resultados, é possível inferir que o proteassoma micobacteriano, apesar de possuir semelhanças estruturais com o eucarioto, apresenta divergências, provavelmente funcionais, as quais impediram que essa metodologia de regulação induzida de proteínas se comportasse da maneira esperada nesse organismo. Além disso, resultados obtidos em

estudos anteriores sugerem que o *M. smegmatis* apresenta um proteassoma funcional e semelhante ao de *M. tuberculosis*.

Ainda que não se tenha obtido o resultado esperado utilizando o DD, a padronização de alguns métodos utilizados para esse estudo será importante para futuros estudos. O uso da proteína GFP, por exemplo, poderá ser empregado tanto em estudos de expressão e regulação gênica no *M. tuberculosis*, quanto em experimentos que visem entender melhor o ciclo de vida do bacilo dentro do macrófago, por exemplo.

## **4 CONCLUSÃO**

Observou-se que a proteína GFP é mais adequada que YFP para utilização como proteína repórter em micobactérias. Além disso, a presença ou ausência das drogas rapamicina e MLN-273 não afetou a expressão ou degradação das proteínas recombinantes. Em suma, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o método de regulação induzida de proteínas, proposto por Banaszynski et al. (2006) para eucariotos, não possui uma funcionalidade satisfatória em micobactérias para ser aplicado ao seu estudo.

## 5 REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, C.M.; GOLDB, D. An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. **Nature Methods**, v. 4, p. 1007-1009, 2007.

BANASZYNSKI, L.A.; CHEN, L.; MAYNARD-SMITH, L.A.; OOI, A.G.L.; WANDLESS, T.J. A rapid, reversible and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. **Cell**, Maryland Heights, v.126, p.995-1004, 2006.

BLOKPOEL, M.C.J; MURPHY, H.N.; O'TOOLE, R.; WILES, S.; RUNN, E.S.C.; STEWART, G.R.; YOUNG, D.B.; ROBERTSON, B.D. Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.33, e22, 2005.

BURNS, K.E.; LIU, W.T.; BOSHOFF, .H.I.M.; DORRESTEIN, P.C.; BARRY, C.E. Proteasomal Protein Degradation in Mycobacteria is Dependent upon a Prokaryotic Ubiquitin-like Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 84, p. 3069-3075, 2009.

BUTCHER, P.D. Microarrays for *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 84, p. 131-137, 2004.

CERDA-MAIRA, F.; DARWIN, H. The Mycobacterium tuberculosis proteasome: more than just a barrel-shaped protease. **Microbes and Infection**, Paris, v.11, p.1150-1155, 2009.

MURRY, J.P.; RUBIN, E.J. New genetic approaches shed light on tb virulence. **Trends in Microbiology**, Maryland Heights, v.14, p.366-372, 2005.

COLE, S.T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

DARWIN, K.H. Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), proteasomes and pathogenesis. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 7, p. 485-491, 2009.

DVORIN, J.D.; MARTYN, D.C.; PATEL, S.D.; GRIMLEY, J.S.; COLLINS, C.R.; HOPP, C.H.; BRIGHT, A.T.; WESTENBERGER, S.; WINZELER, E.; BLACKMAN, M.J.; BAKER, D.A.; WANDLESS, T.J.; DURAISINGH, M.T. A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. **Science**, Washington, v. 328, p. 910-912, 2010.

GUENIN-MACÉ, L.; SIMEONE, R., DAMANGEL, C. Lipids of Pathogenic Mycobacteria: Contributions to Virulence and Host Immune Suppression. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 56, p. 255-268, 2009.

HARTFORD, C.M.; RATAIN, M.J. Rapamycin: Something Old, Something New, Sometimes Borrowed and Now Renewed. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, p.381-388, 2007.

HER-GÖTS, A.; AGOP-NERSESIAN, C.; MÜNTER, S.; GRIMLEY, J.S.; WANDLESS, T.J.; FRICKNECHT, F.; MEISSNER, M. Rapid control of protein level in apicomplexan *Toxoplasma gondii*. **Nature Methods**, v. 4, p. 1003-1005, 2007.

IMKAMP, F.; ROSENBERGER, T.; STRIEBEL, F.; KELLER, P.M.; AMSTULZ, B.; SANDER, P.; WEBER-BAN, E. Deletion of *dop* in *Mycobacterium smegmatis* abolishes pupylation of protein substrates *in vivo*. **Molecular Microbiology**, Boston, v. 75, p. 744-754, 2010.

KENDALL, S.L.; RISON, S.C.G.; MOVAHEDZADEH, F.; FRITA, R.; STOKER, N.G.. What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, Maryland Heights, v. 12, p. 537-544, 2004.

LI, X.Z.; ZHANG, L.; NIKAIDO, H. Efflux Pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2415-2423, 2004.

LASERGENE. Getting started with DNASTAR<sup>®</sup> Lasergene<sup>®</sup> version 8.1 for Macintosh<sup>®</sup> and Windows<sup>®</sup>. 2009.

MEDEIROS, M.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; ARMO, G.R.G.; DEGRAVE, W.M.; MENDONÇA-LIMA, L.; LOPES, M.Q.; COSTA, J.F.; MCFADDENN, J.; MCINTOSH, D. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. **Microbiology**, Spencers Wood, v.148, p. 1999-2009, 1999.

PEARCE, M.; MINTSERIS, J.; FERREYRA, J.; GYGI, S.P.; DARWIN, K.H. Ubiquitin-Like Protein Involved in Proteasome Pathway of *M. tuberculosis*. **Science**, Washington, v. 322, p. 1104-1107, 2008.

SILVA, L.M.; OWENS, K.L.; MURTA, S.M.F.; BEVERLEY, S.M. Regulated expression of the Leishmania major surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. **Proceeding of the National Academy of Science**, Palo Alto, v.106, p.7583-7588, 2009.

STRIEBEL, F.; HUNKELER, M.; SUMMER, H.; WEBER-BAN, E. The mycobacterial Mpa-proteasome unfolds and degrades pupylated substrates by engaging Pup's N-terminus. **The European Molecular Biology Organization Journal**, New York, v. 29, p. 1262-1271, 2010.

TAM, T.H.; LOWARY, T.L. Recent advances in mycobacterial cell wall glycan biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, p. 618-625, 2009.

WANG, L.; SLAYDEN, R.A.; BARRY III, C.E.; LIU, J. Cell wall structure of a mutant of *M. smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 7224-7229, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Fact sheet N°104 March 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>> Acesso em 4 nov 2010.