

Caracterização e clonagem do gene *uvrA* de *Corynebacterium Pseudotuberculosis*, agente infeccioso da Linfadenite Caseosa

CASTRO, B.C.T¹; FARIA, R.C.¹; RESENDE, B.C.¹; MACHADO, C.R.²; AZEVEDO, V.A.C.²; MIYOSHI, A.²; SANTOS, L. L.¹; LOPES, D.O.¹

RESUMO

A Linfadenite caseosa é uma doença causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* que afeta ovinos e caprinos. O Reparo de DNA é vital para qualquer organismo, pois evita possíveis efeitos deletérios. O objetivo deste estudo foi caracterizar o gene *uvrA* de *C.pseudotuberculosis* para futuros ensaios de complementação funcional. Análises *in silico* foram feitas para verificar os parâmetros físicos e químicos, busca por domínios conservados e modelagem da estrutura 3D. As análises mostram que a proteína tem um peso molecular de cerca de 104,3 kDa e um domínio conservado de exonuclease. A amplificação do gene *uvrA* foi realizada utilizando um kit de PCR Long Range e o inserto foi clonado no vetor pCR 2.1 TOPO. Linhagens de *E. coli* DH5a foram eletroporadas com o plasmídeo recombinante e depois estes foram digeridos com enzimas de restrição BamH1 e Xho1 para subsequente clonagem num vetor de expressão pProEX HTB. As construções serão confirmadas por sequenciamento.

Palavras-chave: *uvrA*, REN, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Reparo de DNA.

INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC), uma doença infecto-contagiosa que acomete pequenos ruminantes, é causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis* e caracterizada clinicamente por abscessos caseosos que acometem os

linfonodos, pele e vísceras. Mundialmente distribuída a LC é causadora de grandes prejuízos econômicos na atividade de ovinocaprinocultura¹. O sequenciamento do genoma da *C. pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais propiciou estudos de caracterização genética deste microorganismo e incentivou a busca de alvos moleculares para intervenções terapêuticas. O mecanismo de reparo do DNA por excisão de nucleotídeos (NER), alvo deste trabalho, é o um sistema de Reparo conservado encontrado em organismos procarióticos e eucarióticos, sendo portanto, uma importante ferramenta na busca de alvos moleculares, uma vez que a instabilidade do mesmo pode levar o organismo à morte². O objetivo geral do presente estudo é isolar e caracterizar o gene *uvrA* de *C. pseudotuberculosis* através de análises *in silico* e cloná-lo para a realização de futuros ensaios funcionais.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises *in silico* foram realizadas através de programas de bioinformática disponíveis na plataforma ExpASY Tools. A amplificação do gene *uvrA* foi realizada usando o Kit de PCR Longe Range devido ao grande número de pares de bases do gene, e este foi amplificado a partir do DNA genômico de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. O amplicon foi clonado no vetor pCR2.1 TOPO que possui 3,9 kb, sítios múltiplos de clonagem e utiliza o promotor T7 e marcador de resistência á kanamicina e ampicilina. Linhagens de *Escherichia coli* DH5α foram eletroporadas com o plasmídeo recombinante e em seguida foi feito a purificação para posterior digestão com as enzimas de restrição. A digestão para liberar o inserto do vetor de propagação foi realizada utilizando as enzimas de restrição BamHI e XhoI para subclonagem deste gene no vetor de expressão pProEX Htb. As amostras foram submetidas á análises de sequenciamento gênico. Em seguida foi realizada a expressão da proteína UvrA em *Escherichia coli* AB2474, linhagem mutante para o gene *uvrA* e a expressão foi induzida com 1mM de IPTG. Foram retiradas alíquotas de 1 mL após 2, 4, 6, 8, e 24

¹ Universidade Federal de São João Del Rei – Departamento de Bioquímica - Divinópolis – Minas Gerais

² Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Bioquímica e Imunologia – Belo Horizonte – Minas Gerais

Email: fael.faria09@hotmail.com

horas de indução. Para confirmação das clonagens foram realizados ensaios de PCR de colônia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ONER é a via de reparo mais conservada, que permite o reconhecimento de lesões que levam a distorções na fita, como foto produtos induzidos por radiação UV e produtos químicos. A conservação, juntamente com a possibilidade de interação com outras enzimas de reparo sugere que esta pode ser a via primária de manutenção da estabilidade genômica. Os genes *uvrabc* foram identificados em todas *Corynebacterium* analisadas (Tabela 1) e as sequências mostraram um alto nível de conservação o que qualifica os genes da via NER candidatos a construção de modelos filogenéticos. Essa via parece ser um método mais generalizado de reparo e deve ser um mecanismo reserva para vias mais específicas de reparo de DNA.

As análises in silico utilizando o programa ProtParam revelaram que

a proteína UvrA, apresenta peso molecular 104,43 KDa, ponto isoelétrico teórico de 6,29 que é o pH em que a proteína apresenta carga elétrica igual a zero, ou seja o pH em que há o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas, e uma média de hidropaticidade de - 0,228. Com base nas características hidrofóbicas e hidrofílicas de uma sequência de aminoácidos é possível determinar a provável posição das proteínas dentro do organismo³. Esses dados são de extrema importância para a realização de procedimentos, como por exemplo, a expressão da proteína, uma vez que a proteína é solúvel sua obtenção e purificação torna-se mais fácil. Na busca por domínios conservados da proteína UvrA (Figura1) foram encontrados em sua estrutura, o domínio típico de uma exonuclease o qual é capaz de promover a excisão de fragmentos de nucleotídeos durante o reparo de DNA. Esse domínio de exonuclease retira o fragmento hidrolisando duas ligações fosfodiéster de cada lado da lesão do DNA. Como este é o domínio funcional da enzima, este torna-se o maior domínio da proteína³.

Tabela1- Genes envolvidos na via NER

Gene	Descrição	*Cacc	Camm	Caur	Cdip	Ceff	Cgen	Cglc	Cglu	Cjei	Ckro	Clip	Cmat	Cpse	Cstr	Cure
<i>uvrA</i>	Excinuclease ABC Subunidade A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>uvrB</i>	Excinuclease ABC Subunidade B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>uvrC</i>	Excinuclease ABC Subunidade C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>uvrD</i>	DNA Helicase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Cacc: *C. accolens*; Camm: *C. ammoniagenes*; Caur: *C. aurimucosum*; Cdip: *C. diptheriae*; Ceff: *C. efficiens*; Cgen: *C. genitalium*; Cglc: *C. glucuronolyticum*; Cglu: *C. glutamicum*; Cjei: *C. jeikeium*; Ckro: *C. kroppenstedtii*; Clip: *C. lipophiloflavum*; Cmat: *C. matruchotii*; Cpse: *C. pseudotuberculosis*; Cstr: *C. striatum*; Cure: *C. urealyticum*.

Figura 1. Apresentação esquemática dos domínios conservados da proteína UvrA. (InterPro Scan - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

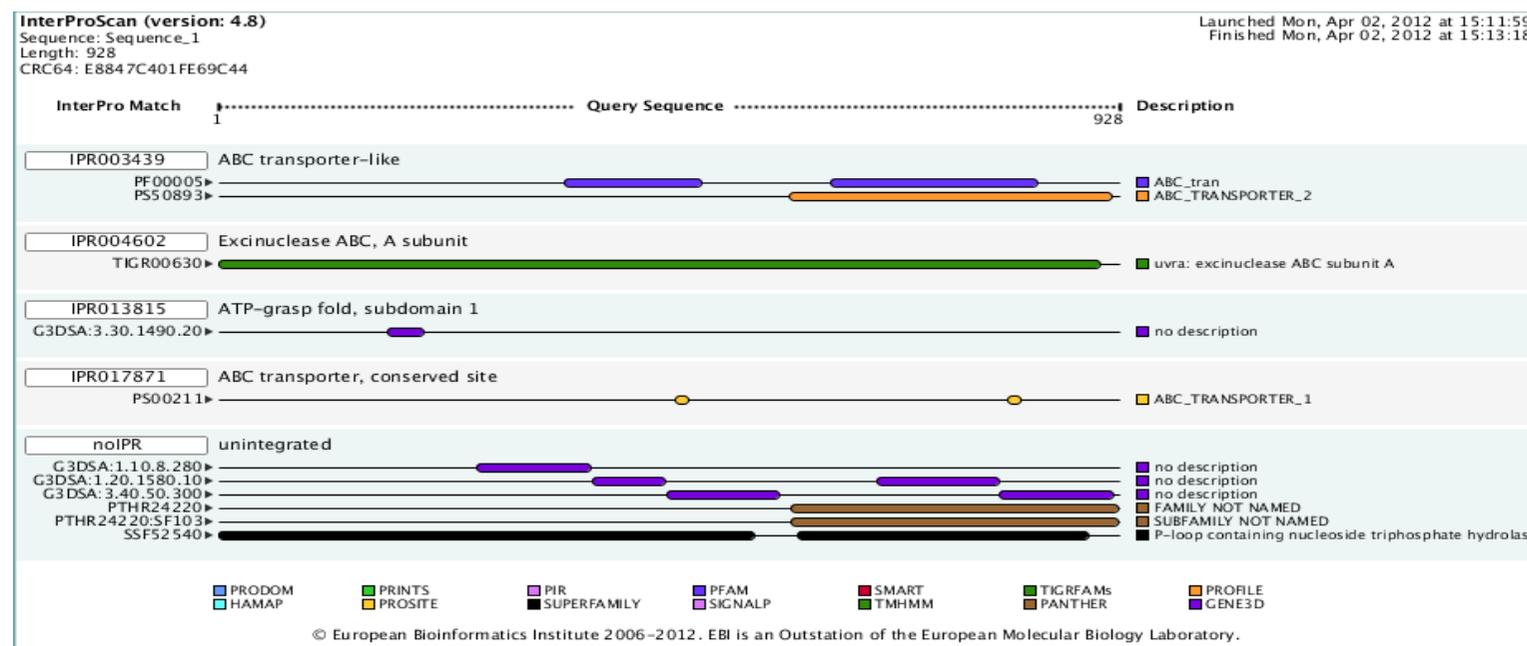
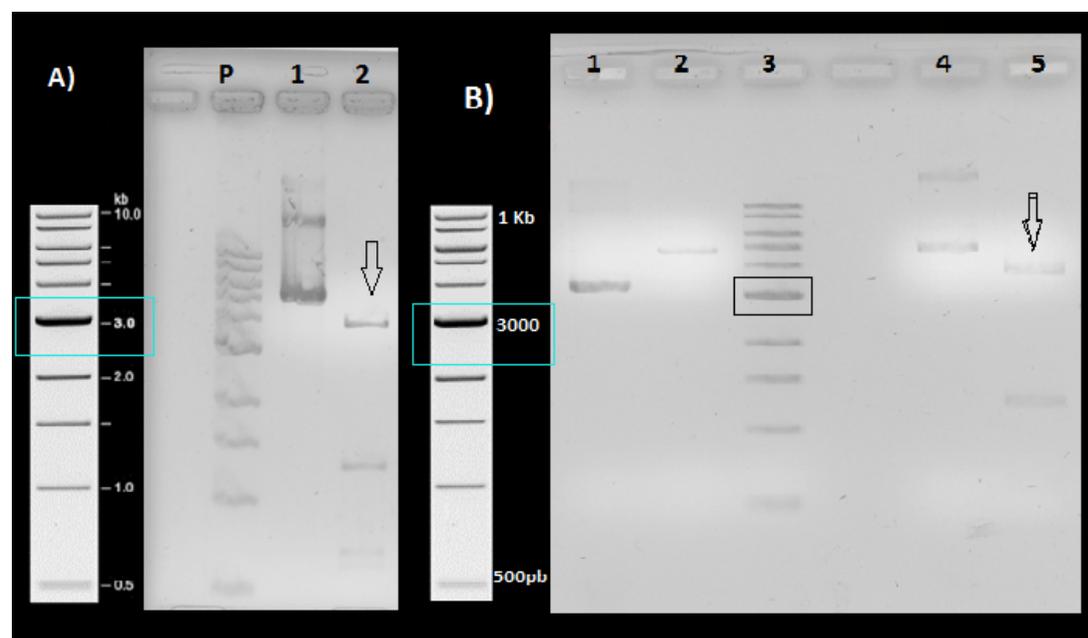


Figura 2. Produtos de digestão (A) Digestão do vetor recombinante pCR2.1 TOPO-*uvrA* com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I. Legenda: P padrão de peso molecular de 1 Kb, 1 pCR2.1 TOPO-*uvrA* e 2 digestão do vetor recombinante para liberação do inserto. A seta indica a banda de aproximadamente 3000 pb uma vez que o fragmento gênico esperado apresenta 2865 pb. (B) Digestão do vetor pProEx Htb fechado e do gene *uvrA*. Legenda: 1 vetor pProEx Htb fechado, 2 vetor digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, 3 padrão de peso molecular de 1kb, 4 vetor pCR2.1-TOPO ligado com o gene *uvrA* e 5 *uvrA* digerido com *Bam*HI e *Xho*I.



Após a amplificação do fragmento gênico de interesse, foi realizada a clonagem em pCR2.1TOPO e a construção obtida passou por transformação bacteriana induzida por eletroporação. As colônias crescidas após o processo de eletroporação foram selecionadas para a confirmação da presença do inserto gênico através do teste de PCR de colônia, que apresentaram resultados positivos. As colônias que apresentaram resultados positivos foram submetidas a extração plasmidial e foi realizado um gel com os produtos de extração plasmidial para confirmar a ligação das construções, entre os vetores e o gene *uvrA* como pode ser visto na figura 2. Após a clonagem em vetor de propagação, o próximo passo foi a subclonagem do inserto no vetor pProEx Htb, um vetor de expressão, que apresenta características importantes para que ocorra a expressão da proteína. O ensaio de expressão da proteína ainda está em processo de otimização.

CONCLUSÃO

Os resultados das análises *in silico* mostraram se tratar de um gene que apresenta domínio funcional condizente com a função da proteína UvrA. A confirmação da clonagem do gene *uvrA* no vetor pProEX HTB foi realizada por PCR de colônia com os iniciadores internos do gene, entretanto, será também confirmada após o seqüenciamento de clones. Após a otimização da expressão serão realizados ensaios de complementação funcional para confirmar o envolvimento deste gene com o Reparo por excisão de nucleotídeos.

REFERÊNCIAS

- (1) ALVES F.S.F.; SANTIAGO, L.B.; PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Documentos, Embrapa Caprinos**, 2007.
- (2) RESENDE, B.C.; REBELATO, A.B.; D'AFONSECA, V.; SANTOS, A.R.; STUTZMAN, T.; AZEVEDO, V.A.; SANTOS, L.L.; MIYOSHI, A.; LOPES, D.O.. DNA repair in *Corynebacterium* model. **Gene**, **2011**, 482, 1–7.
- (3) LEHNINGER A.L. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: NELSON D.L., COX M.M. Lehningerger AL, **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier. p. 74 a 113. 2011.