

O uso do reparo de DNA na identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos contra a Linfadenite caseosa

ALVES, L. F¹; RODRIGUES, F¹; ARANTES, L.S¹; VILA NOVA, L.G¹; SANTOS L.L¹; MYOSHI A²; AZEVEDO, V.A.C²; LOPES, D.O¹

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis causa uma infecção crônica, denominada Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos causando grandes perdas econômicas. A caracterização das vias e genes de Reparo presentes neste parasito pode contribuir para o conhecimento genético deste, revelando alvos potenciais para intervenção terapêutica. A hidrolase MutT, componente do Sistema GO de reparo, hidrolisa 8-oxodGTP, que pode gerar mutações, impedindo sua incorporação no DNA. Foram realizadas análises *in silico*, mostrando que a proteína MutT tem um domínio conservado Nudix hidrolase. O gene foi amplificado por PCR e clonado no vetor pProEX HTb. Células competentes de *E. coli* BH600 *mutT* mutantes foram transformadas com o plasmídeo. A expressão da proteína está sendo padronizada. Posteriormente, serão feitos testes de complementação funcional após tratamento com agentes oxidantes a fim de revelar seu papel no sistema GO de *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-chave: Reparo de DNA; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; *mutT*.

INTRODUÇÃO

A Linfadenite caseosa (LC), causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é uma doença infecto-contagiosa, que acomete caprinos e ovinos, caracterizada pela formação de abscessos em gânglios

linfáticos. Trata-se de uma doença de distribuição mundial e de grande importância na caprinocultura no Brasil¹. Não existe um tratamento efetivo para a doença, pois o uso de antibióticos não é eficaz, e as vacinas disponibilizadas até o momento apresentam apenas proteção parcial².

A bactéria *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo e está exposta a um ambiente de grande estresse oxidativo no interior de macrófagos e, portanto, o reparo de DNA deve ter um papel importante na sobrevivência e virulência dessa bactéria. GTPs são alvo de oxidação, transformando-se em 8-oxodGTPs. O Sistema GO, em *Escherichia coli*, é constituído por três diferentes enzimas, que cooperam simultaneamente para prevenir a mutagênese espontânea causada pela 8-oxoG: Fpg, MutY e MutT^{3,4}.

8-oxo-dGTP é erroneamente incorporado frente à adenina no molde de DNA, gerando mutações⁵. Dessa forma, é importante que nucleotídeos oxidados, principalmente 8-oxo-dGTPs, sejam eliminados do *pool* de nucleotídeos. Essa função é realizada pela terceira proteína do sistema GO, a hidrolase MutT, que previne a incorporação de 8-oxodGTP no DNA, hidrolisando o trifosfato oxidado a monofosfato (8-oxo-dGMP)⁶. A importância do sistema GO pode ser evidenciada pelo elevado fenótipo mutador apresentado por *E. coli* deficientes no gene *mutT*. As frequências de transversões GC→TA e AT→GC são até 1000 vezes maiores em mutantes *mutT*-, quando comparadas às células selvagens⁷.

O objetivo do presente trabalho é caracterizar, através de ferramentas de bioinformática, a proteína MutT de *C. pseudotuberculosis*, além de clonar e expressar o gene para a realização de futuros testes de complementação funcional em *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

As sequências nucleotídica e protéica de *mutT* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foram obtidas no banco de dados do CoryneRegNet (<http://www.coryneregnet.de/>). A partir dessa sequência, foram realizadas

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: luanaalves1213@hotmail.com

as análises *in silico* utilizando os programas de bioinformática disponíveis em (<http://expasy.org/tools/>).

O gene foi amplificado a partir do DNA genômico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através de PCR. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo quanto a presença de bandas correspondentes ao tamanho do gene (477pb). O produto foi purificado utilizando o kit Quiaquick PCR Purification Microcentrifuge (Quiagen) e digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I. Da mesma forma o vetor de expressão pProEX HTb foi digerido.

Para a clonagem, inserto e vetor de expressão pProEX HTb foram incubados com enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) obedecendo à razão molar vetor/fragmento igual a 2:1. Foi realizada eletroporação da construção ProEX HTb/*mutT* em bactérias *Escherichia coli* da linhagem BH600 eletrocompetentes, uma linhagem mutante para o gene *mutT*. A seleção dos clones que foram transformados com o plasmídeo foi feita através do plaqueamento das células em meio 2x YT-ágar com o uso de Ampicilina. Para a confirmação da presença do gene *mutT* nas colônias selecionadas, utilizou-se a técnica de PCR de colônia. O DNA, exigido para a PCR, é a própria colônia bacteriana retirada do meio de cultura e repicada no microtubo que foi levado ao termociclador. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% e as colônias que apresentaram bandas correspondentes ao tamanho do gene (477pb) foram selecionadas para extração plasmidial com o kit Quiaprep Spin-Miniprep (Quiagen). Esse produto será usado para os testes de complementação funcional.

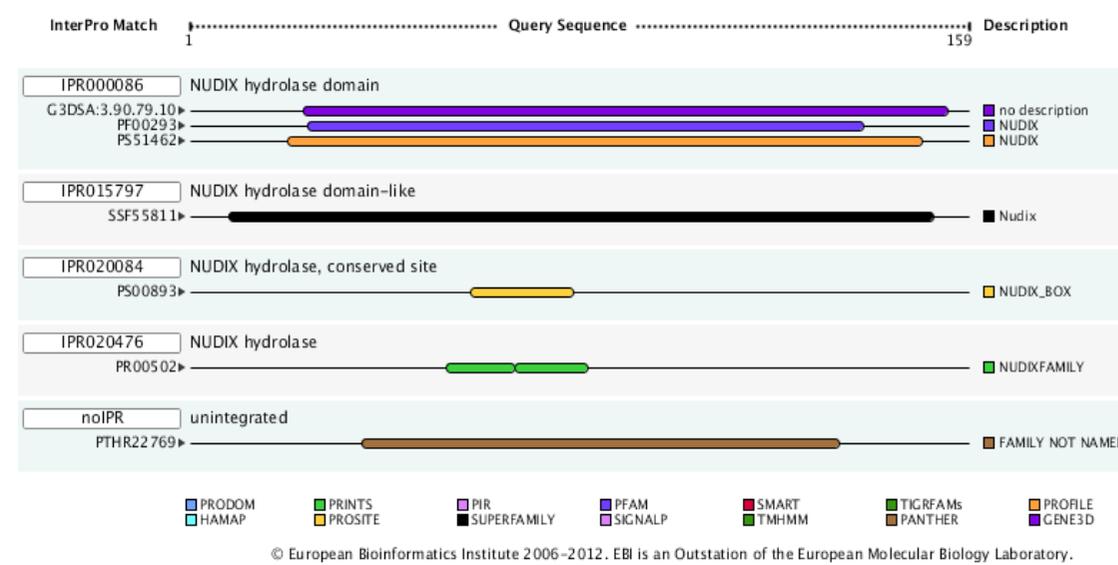
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência do gene *mutT* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, obtida no banco de dados do Coryne RegNet apresentou 477 pares de bases e 159 aminoácidos. A análise de hidrofobicidade através do programa ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) revelou que essa proteína possui um caráter hidrofílico com média de hidropaticidade igual a -0,260.

O conhecimento da relação hidrofobicidade/hidrofilicidade torna-se essencial na escolha do método de isolamento e purificação da proteína recombinante produzida.

A identificação dos domínios conservados da proteína MutT foi realizada usando o programa InterPro Scan. Observou-se o domínio conservado de NUDIX hidrolase (Figura 1). A família Nudix é uma família de proteínas que contêm esse domínio. São fosfohidrolases que usam água para mediar a catálise da quebra de uma ligação fosfato em seu substrato. O gene *mutT* é representante dessa família^{8,9}. Esta análise demonstrou que a proteína MutT apresenta o domínio correspondente a sua função no Reparo de DNA, que é a de prevenir a incorporação de 8-oxodGTP no DNA, hidrolisando o trifosfato oxidado a monofosfato (8-oxo-dGMP)⁶.

Figura 1- Domínios conservados da proteína MutT (InterPro Scan - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>).

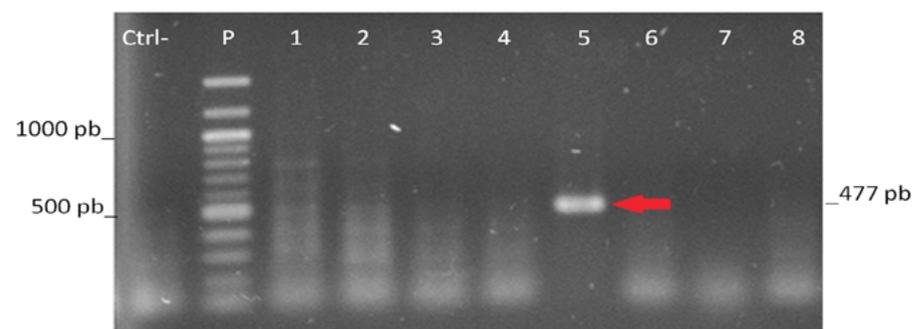


A partir da PCR pôde-se visualizar a amplificação de um fragmento de 477 pares de bases, que corresponde ao tamanho esperado do gene *mutT*. Esse inserto, clonado no vetor pProEXHTb foi usado para transformar

bactérias *E. coli* BH600, e o sucesso da eletroporação foi confirmado pelo crescimento de colônias isoladas em placas de Petri (não mostrado).

A PCR de colônia foi realizada para selecionar clones que continham o gene de interesse. Podemos visualizar na figura 2 que houve amplificação de uma colônia daquelas que foram selecionadas para a PCR. Esta colônia teve o seu DNA plasmidial purificado para utilização nos futuros testes funcionais.

Figura 2. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, mostrando a amplificação do gene *mutT* (477 pb) a partir da PCR de colônia de *E. coli* BH600 transformadas com o produto da clonagem pProEX HTb/*mutT*. P: Padrão de peso molecular de 100pb. Ctrl-: Controle Negativo da PCR de colônia. Canaleta 5: Fragmento do gene amplificado (477pb) para as colônias transformadas com os produtos da clonagem.



CONCLUSÕES

Os resultados das análises *in silico* são consistentes com a função da hidrolase MutT já conhecida e descrita em outras espécies, podendo assim, prever seu envolvimento em um sistema de reparo de DNA. A clonagem se mostra correta até o momento, devido a bandas correspondentes ao tamanho do gene *mutT* nos géis de agarose.

REFERÊNCIAS

- (1) ALVES, F.S.F.; SANTIAGO, L.B.; PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Documentos, Embrapa Caprinos**, 2007.
- (2) EGGLETON, D.G.; DOIDGE, C.V.; MIDDLETON, H.D.; MINTY, D.W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines.

Aust Vet J, v.68, p.320-321, 1991.

- (3) MICHAELS, M.L.; MILLER, J.H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol*, v. 174, p. 6321–6325, 1992.
- (4) SANDERS, L.H.; SUDHAKARAN, J.; SUTTON, M.D. The GO system prevents ROS-induced mutagenesis and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol*, v. 294, p. 89–96, 2009.
- (5) TAJIRI, T.; MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat Res*, v. 336, p. 257-67, 1995.
- (6) MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*, v.355, p.273–275, 1992.
- (7) AKIYAMA, M.; HORIUCHI, T.; SEKIGUCHI, M. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *mutT* mutator of *Escherichia coli* that causes A:T to C:G transversion. *Mol. Gen. Genet*; v.206, p.9-16, 1987.
- (8) BESSMAN, M.J.; FRICK, D.N.; O'HANDLEY, S.F. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *J. Biol. Chem.*; v.271, 1996.
- (9) MCLENNAN, A.G. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* v.63, p.123–43, 2006.