

AValiação DE DIFERENTES MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS rLigA E rLipL32 DE *Leptospira interrogans* EXPRESSAS EM UM SISTEMA EUCARIOTO

OLIVEIRA, Thaís Larré¹; HARTWIG, Daiane Drawanz¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling²; HARTLEBEN, Cláudia Fernandes¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – CDTec - UFPel

²Laboratório de Genômica funcional – Centro de Biotecnologia – CDTec - UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

thais.larreoliveira@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose, doença causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, é uma zoonose mundialmente distribuída. Esta doença representa um grande problema do ponto de vista veterinário e de saúde pública, causando perdas produtivas e reprodutivas nos animais e complicações multissistêmicas em humanos, tais como: icterícia, falência renal e hemorragia pulmonar (Adler e de la Pena Moctezuma, 2010). A infecção é contraída por contato direto ou indireto com a urina de animais portadores, em geral roedores, via solo, água ou alimentos contaminados. A vacinação é a medida profilática recomendada contra leptospirose, porém, as bacterinas atualmente disponíveis induzem imunidade de curta duração e sorovar-específica, justificando os esforços para o desenvolvimento de uma vacina multivalente, composta por antígenos conservados entre os mais de 250 sorovares de *Leptospira* (Adler e de la Pena Moctezuma, 2010; Ko, 2009).

A proteína LigAni, que corresponde a seis domínios repetidos na região carboxi-terminal da proteína LigA, e a lipoproteína LipL32 são potenciais antígenos vacinais. Ambas estão presentes na membrana externa de leptospiros patogênicas e ausentes nas espécies saprófitas, são reconhecidas pelo soro de pacientes convalescentes diagnosticados com a doença e capazes de ligar componentes da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e laminina (Haake, 2000; Paaniappan 2002; Adler e de la Pena Moctezuma, 2010).

A levedura *Pichia pastoris* oferece vantagens para expressão de proteínas heterólogas quando comparada a sistemas de expressão em procariotos: alto crescimento em meios de cultivo simples, capacidade de realizar modificações pós-traducionais e de secretar as proteínas de forma solúvel no meio e presença de um forte promotor induzível por metanol (Daly, 2005; Hartwig, 2010). O objetivo deste trabalho foi avaliar o rendimento de três diferentes métodos de purificação e concentração das proteínas rLigAni e rLipL32 bem como determinar a antigenicidade das mesmas.

2 METODOLOGIA

As proteínas LigAni e LipL32 de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foram expressas em *P. pastoris* cepa KM71H. A expressão foi induzida a cada 24 h com metanol 0,5%, durante 196 h. Amostras do *pellet* e do sobrenadante foram coletadas para verificar o nível de expressão através da técnica de *Western blot* (WB), utilizando anticorpo policlonal anti-LigAni e monoclonal anti-LipL32. As proteínas recombinantes foram submetidas a três diferentes métodos de

concentração e purificação. O primeiro método consistiu na precipitação das proteínas com sulfato de amônio. Brevemente, uma solução de sulfato de amônio a 85% foi adicionada ao sobrenadante do cultivo à 4 °C, ajustando a concentração do sal para 25, 35, 45, 60, 70 e 80%, a fim de determinar a melhor condição de saturação para precipitar as proteínas recombinantes. A amostra precipitada foi centrifugada a 10000 x g por 15 min à 4 °C, e as proteínas precipitadas, eluídas em 10 mL de PBS, seguido de diálise contra o mesmo tampão por 48 h. O sobrenadante resultante de cada centrifugação foi submetido à próxima etapa de precipitação, com uma concentração mais elevada de sal. No segundo método, colunas Microcon YM-30 Amicon Bioseparations (Millipore) com *cutoff* de 30 kDa foram utilizadas para purificar e concentrar as proteínas recombinantes, segundo recomendações do fabricante. O processo de liofilização foi a terceira estratégia adotada para concentrar as proteínas, no qual alíquotas do sobrenadante foram liofilizadas no equipamento Micro Modulyo Edwards®, por 28 h e depois solubilizadas em PBS, concentrando 10 vezes as proteínas. Os resultados obtidos foram analisados através de SDS-PAGE 12% e WB, e o rendimento desses três métodos foi determinado através da quantificação das proteínas pelo kit BCA® Protein Assay (PIERCE), conforme recomendações do fabricante.

A fim de confirmar a glicosilação das proteínas expressas em *P. pastoris*, 20 µg de rLigAni e rLipL32 purificadas foram submetidas às reações de deglicosilação utilizando as enzimas EndoH e PNGase F (New England BioLabs). As proteínas foram incubadas com 1 x *Glycoprotein Reaction Buffer* à 100 °C por 10 min, para desnaturação e, posteriormente, à 37 °C por 1 h, com 1 µl de Endo H ou PNGaseF. O produto das reações foi visualizado através de SDS-PAGE 12% e WB.

A caracterização antigênica das proteínas nas formas glicosilada e deglicosilada foi realizada por WB utilizando soro humano convalescente, obtido de pacientes com leptospirose confirmada. O soro humano foi utilizado em uma diluição 1:300 em PBS e o anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase, em uma diluição de 1:2000. Além disso, as proteínas também foram confrontadas com soro hiperimune produzido em coelho contra *L. interrogans* sorovar Canicola cepa Tande. O soro foi utilizado numa diluição em PBS de 1:500 e o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase foi utilizado na diluição de 1:3000.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambas as proteínas foram expressas com sucesso na levedura *P. pastoris* na forma secretada, o que facilita as etapas de purificação e reduz os custos de produção destes antígenos em escala industrial.

Frente aos três diferentes métodos de obtenção das proteínas recombinantes do sobrenadante do cultivo, o maior rendimento obtido foi através da técnica de liofilização, tanto para rLigAni quanto para rLipL32 (Tab. 1). Porém, acredita-se que as amostras liofilizadas apresentem uma pureza inferior àquelas submetidas ao método de ultrafiltração. O método de fracionamento com sulfato de amônio, com o qual se obteve o menor rendimento, mostrou que a proteína rLigAni precipitou em concentrações de 70% e 80% de sal, enquanto que a proteína rLipL32 precipitou igualmente em todas as concentrações testadas (Fig. 1 A e B). Diante disso, o método eleito como mais vantajoso foi o de ultrafiltração (Fig. 1C), mesmo com o decréscimo no rendimento da proteína rLipL32, já que a perda desta proteína provavelmente ocorreu pelo fato do *cutoff* de 30 kDa das colunas utilizadas ser muito próximo do peso molecular de LipL32 (32 kDa).

Trabalhos anteriores reportam um rendimento de 6-10 mg.L⁻¹ para rLigAni (Silva *et al*, 2007) e de 40 mg.L⁻¹ para LipL32 (Seixas *et al*, 2007), quando estas proteínas são expressas em *E. coli*. Neste estudo, utilizando a levedura *P. pastoris* como sistema de expressão, foi obtido um rendimento que ultrapassa 250 mg.L⁻¹ para ambas as proteínas.

Tabela 1: Purificação e concentração das proteínas rLigAni e rLipL32 produzidas por *Pichia pastoris* por três diferentes métodos.

		Sobrenadante	Sulfato de amônio	Ultrafiltração	Liofilização
rLigAni	Total de Proteína (mg.L ⁻¹)	276,2	67,7	183,2	289,5
	Rendimento (%)	100	24,5	66,3	86,7
rLipL32	Total de Proteína (mg.L ⁻¹)	285,2	70,2	106,3	224,5
	Rendimento (%)	100	27,6	37,3	70,7

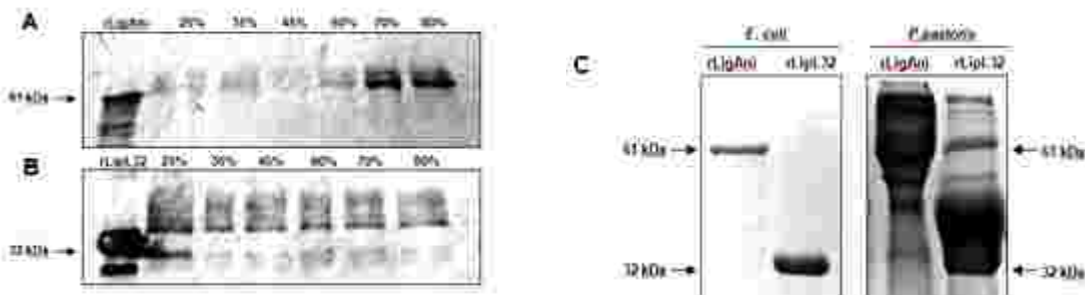


Figura 1: WB das proteínas rLigAni (A) e rLipL32 (B) precipitadas com diferentes concentrações de sulfato de amônio. rLigAni e rLipL32: proteínas expressas em *E. coli* utilizadas como controle positivo da reação. (C) SDS-PAGE 12% com volume equivalente (10 µL) de rLigAni e rLipL32 expressas em *E. coli* (purificadas por cromatografia de afinidade em colunas Ni Sepharose HisTrap™) e *P. pastoris* (sobrenadante concentrado por ultrafiltração).

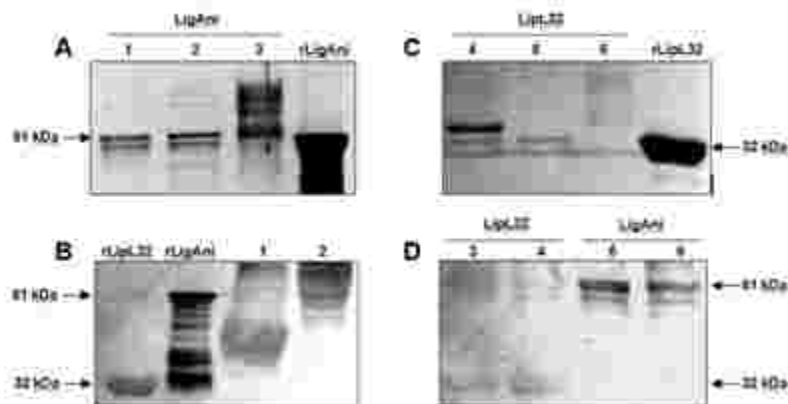


Figura 2: Antigenicidade de rLigAni e rLipL32 em suas formas glicosiladas e não-glicosiladas. A e C: Soro hiperimune contra *L. interrogans* sorovar Canicola cepa Tande. Colunas 1-3: LigAni tratada com PNGaseF, EndoH e não tratada. Colunas 4-6: LipL32 tratada com PNGaseF, EndoH e não tratada. B e D: Pool de soros de pacientes com diagnóstico de leptospirose. Colunas 1 e 2: LipL32 e LigAni secretadas por *P. pastoris* não tratadas com enzimas, respectivamente. Colunas 3-6: LipL32 e LigAni tratadas com PNGaseF e EndoH, respectivamente. rLipL32 e rLigAni: proteínas recombinantes expressas em *E. coli* utilizadas como controle positivo.

As reações de deglicosilação realizadas com as enzimas EndoH e PNGaseF tiveram como resultado um decréscimo no peso molecular das proteínas quando comparado com as proteínas não tratadas (Fig. 2). Dessa forma, foi confirmada a adição de resíduos de manose por *P. pastoris*, o que ocorreu em função de LigAni apresentar 7 sítios e LipL32, 1 sítio preferencial para N-glicosilação. As proteínas

rLipL32 e rLigAni expressas em *P. pastoris* foram reconhecidas por ambos os soros testados, tanto na forma glicosilada quanto na não glicosilada (Fig. 2), confirmando a antigenicidade das mesmas.

4 CONCLUSÕES

As estratégias utilizadas para a expressão de rLigAni e rLipL32 em *P. pastoris* foram eficientes e o padrão de expressão observado indica a glicosilação das proteínas, o que foi confirmado através de ensaios com as enzimas EndoH e PNGaseF. Mesmo após essas reações, ambas as proteínas foram reconhecidas pelo soro humano e pelo soro animal testados, indicando a conservação de epítomos antigênicos e demonstrando sua potencial aplicação vacinal.

Os métodos de ultrafiltração e liofilização destacaram-se em relação à precipitação com sulfato de amônio. Além disso, o rendimento das proteínas rLigAni e rLipL32 expressas em *P. pastoris*, foi superior a expressão em *E. coli*.

Como perspectiva futura pretende-se avaliar o potencial imunoprotetor das proteínas produzidas em *P. pastoris*, através de ensaio desafio homólogo e heterólogo, com cepas patogênicas de *Leptospira* em modelo animal.

5 REFERÊNCIAS

1. ADLER B, DE LA PENA MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 140(3-4), p.287-296, 2010.
2. DALY R, HEARN MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, 18(2), p.119-138, 2005.
3. HAAKE DA, CHAO G, ZUERNER RL, BARNETT JK, Barnett D, MAZEL M, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 68, p.2276-2285, 2000.
4. HARTWIG DD, OLIVEIRA TL, SEIXAS FK, FORSTER KM, RIZZI C, HARTLEBEN CP, MCBRIDE AJ, DELLAGOSTIN OA. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, 9: 98, 2010.
5. KO AI, GOARANT C, PICARDEAU M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 7, p.736-747, 2009.
6. PALANIAPPAN RU, CHANG YF, JUSUF SS, ARTIUSHIN S, TIMONEY JF, MCDONOUGH SP, et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, 70, p.5924-5930, 2002.
7. SEIXAS FK, FERNANDES CH, HARTWIG DD, CONCEIÇÃO FR, ALEIXO JA, DELLAGOSTIN OA. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, 53(4), p.472-479, 2007.
8. SILVA EF, MEDEIROS MA, MCBRIDE AJ, MATSUNAGA J, ESTEVES GS, RAMOS JG, SANTOS CS, CRODA J, HOMMA A, DELLAGOSTIN OA. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, 25(33), p.6277-6286, 2007.