

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA LipL32 DE *Leptospira interrogans* NA LEVEDURA *Pichia pastoris*

OLIVEIRA, Thaís Larré; HARTWIG, Daiane Drawanz; SEIXAS, Fabiana Kömmling; DELLAGOSTIN, Odir Antônio

Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância global causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (Vijayachari et al. 2008; Bharti et al. 2003). A infecção é contraída por contato direto ou indireto com urina de animais portadores (principalmente roedores) e, em 5 a 15% dos casos, pode evoluir para quadros graves, caracterizados por falência renal e hemorragia pulmonar (Adler et al. 2009; Levett 2001).

As vacinas disponíveis para prevenção da leptospirose são bacterinas, que consistem na célula inteira inativada, ou preparados da membrana de leptospiros patogênicas, as quais induzem imunidade sorovar específica e pouco duradoura (Faine et al. 1999). Diante disso, busca-se o desenvolvimento de uma vacina multi-sorovar que gere proteção cruzada (Adler et al. 2009; McBRIDE et al. 2005).

Proteínas de membrana externa são apontadas como vacinógenos potenciais, devido a sua localização na superfície da célula e a sua participação na interação com o hospedeiro (Sonrier et al. 2000). A proteína LipL32 é a mais abundante na membrana externa de leptospiros e é encontrada exclusivamente em cepas patogênicas, apresentando potencial como antígeno vacinal (Cullen et al. 2005). Essa proteína é altamente antigênica (Haake et al. 2000) e mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos contra LipL32 durante a infecção (Guerreiro et al. 2001).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido amplamente empregada na expressão de proteínas heterólogas, pois combina características procarióticas, como fácil manipulação genética e crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, com propriedades eucarióticas, como modificações pós-traducionais (glicosilação) e secreção das proteínas de interesse no meio de cultura, facilitando a purificação. Além disso, mantém os pré-requisitos necessários à produção de proteínas recombinantes em escala industrial (Cereghino et al. 2000; Daly et al. 2005).

O objetivo deste trabalho foi, portanto, clonar e expressar a lipoproteína de membrana externa LipL32 na levedura *P. pastoris*, visando o desenvolvimento da vacina contra a leptospirose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O gene *lipL32* foi amplificado por PCR e ligado no vetor de expressão em *P. pastoris*, pPICZ α B. Este vetor possui gene de resistência à zeocina, sítio de múltipla clonagem, origem de replicação em *Escherichia coli*, promotor AOX (induzível por metanol) e, além disso, fusiona à proteína recombinante um peptídeo sinal que permite a secreção da proteína.

O produto da ligação foi utilizado para transformar *E. coli* TOP10 através de eletroporação e os clones recombinantes foram selecionados através de uma triagem rápida com fenol-clorofórmio e confirmados por digestão com enzimas de restrição. Sendo assim, foi selecionado um plasmídeo recombinante e denominado pPICZ α B/*lipL32*. Este foi propagado em *E. coli*, extraído e linearizado com a enzima *PmeI*, para transformação em *Pichia pastoris* cepa KM71H por eletroporação. A linearização do plasmídeo é importante, pois o DNA plasmidial se insere de forma randômica no genoma da levedura.

Os clones recombinantes obtidos foram checados quanto à presença do gene de interesse através de PCR de colônia e a expressão da proteína LipL32 na levedura confirmada através de *Colony blotting*, no qual as colônias recombinantes de *P. pastoris* foram crescidas à 28°C em ágar BMMY e induzidas com metanol 0,5%. Um clone de *P. pastoris* que demonstrou expressão no teste em placa foi cultivado em caldo BMMY à 28°C, sob agitação de 150 rpm. A cultura foi induzida a cada 24 h com metanol 0,5% e uma alíquota do *pellet* e uma do sobrenadante foram coletadas para verificar o nível de expressão. A expressão foi monitorada durante 144 h e confirmada através de *Western blotting* (WB) com anticorpo monoclonal anti-LipL32.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *lipL32* foi eficientemente amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão pPICZ α B. O plasmídeo pPICZ α B/*lipL32* foi extraído, linearizado, quantificado. Foram utilizados 10 μ g de DNA para transformar *P. pastoris*. A presença do gene de interesse foi confirmada através de PCR de colônia (Figura 1).

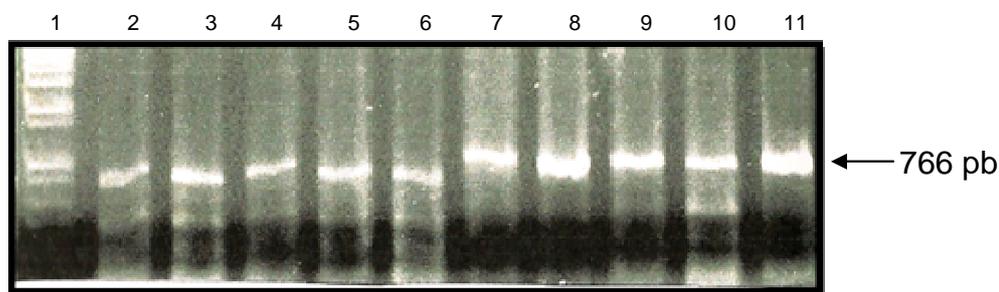


Figura 1: PCR a partir das colônias de *P. pastoris* transformadas com o plasmídeo pPICZ α B/*lipL32*. Coluna 1, Marcador de Massa Molecular 1 Kb DNA Ladder; coluna 2 a 11, amplificação do gene *lipL32* (766 pb) de diferentes colônias.

A confirmação da expressão da proteína LipL32 em *P. pastoris* foi realizada através de *Colony blotting*, sendo selecionado para os testes subsequentes um clone, ou seja, aquele que apresentou uma maior intensidade de reação, demonstrando uma suposta maior expressão (Figura 2).

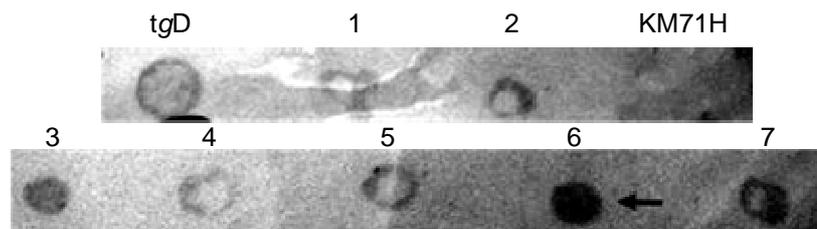


Figura 2: Colony blotting dos clones recombinantes de *P. pastoris* KM71H utilizando MAb Anti-6xHIS. A proteína recombinante tgD expressa em *P. pastoris* KM71H foi usada como controle positivo e a cepa *P. pastoris* KM71H não transformada foi usada como controle negativo. 1 – 7: colônias dos clones testados quanto a expressão da proteína recombinante LipL32. Seta indica a colônia selecionada para testes de expressão subsequentes.

O nível de expressão da proteína recombinante em meio líquido foi monitorado durante 144 h. A cada 24 h uma alíquota do cultivo era coletada, sendo o *pellet* e o sobrenadante avaliados individualmente quanto à expressão através de WB (Figura 3). Através desta avaliação, confirmou-se que a expressão da proteína LipL32 deu-se tanto internamente na célula da levedura (*pellet*), quanto na forma secretada (sobrenadante do cultivo). A expressão na forma secretada é muito importante, pois evita etapas mais complexas de purificação da proteína, diminuindo o custo na produção deste antígeno em escalas industriais. O padrão de expressão observado indica uma possível modificação pós-traducional da proteína recombinante, pois um sítio de glicosilação (Asn-Glu-Thr) está presente no gene *lipL32*. No entanto, isto será confirmado posteriormente.

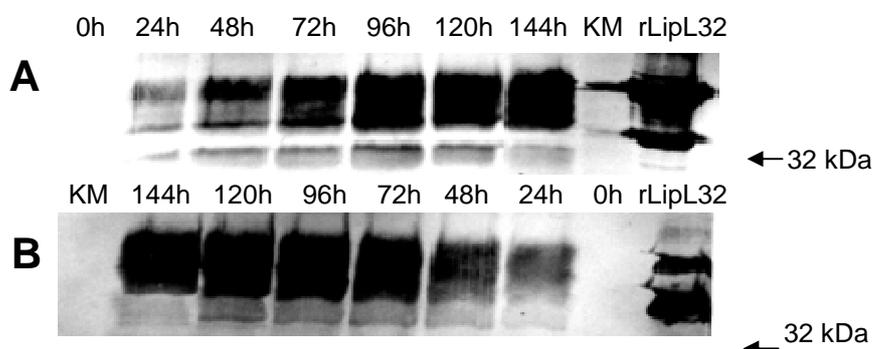


Figura 3: Avaliação da expressão da proteína LipL32 no *pellet* e no sobrenadante de *P. pastoris* KM71H. Amostras foram coletadas com intervalos de 24 h após indução com metanol e detectadas através de WB com Mab anti-LipL32. A e B: expressão intracelular e secretada da proteína LipL32 por *P. pastoris*, respectivamente. KM: *P. pastoris* KM71H não transformada utilizada como controle negativo. rLipL32: proteína recombinante purificada de *E. coli* utilizadas como controle positivo.

4. CONCLUSÕES

As estratégias utilizadas para a expressão de LipL32 na levedura em *P. pastoris* foram eficientes. A proteína recombinante foi produzida na forma secretada e com a massa molecular próxima à esperada. Além disso, a proteína conservou epítomos antigênicos, pois a proteína foi reconhecida pelo Mab anti-LipL32. As perspectivas futuras envolvem a obtenção de maior quantidade de LipL32 recombinante a partir do sistema de expressão demonstrado no presente estudo e a avaliação de seu caráter imunoprotetor em hamsters, através de desafios homólogo e heterólogo com cepas patogênicas de *Leptospira*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vijayachari P., Sugunan A. P., Shriram A. N., 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **J. Biosci.** 33(4). 557–569.
- Bharti, A. R.; Nally, J. E.; Ricaldi, J. N.; Matthias, M. A.; Diaz, M. M.; Lovett, M. A.; Levett, P. N.; Gilman, R. H.; Willig, M. R.; Gotuzzo, E.; Vinetz, J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.** 3, 757-771.
- Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2009. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.** xxx.xxx.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 296-326.
- Faine, S.B., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. **Leptospira and leptospirosis.** 2nd ed. Melbourne, Australia: MediSci.
- McBRIDE, A. J.; Athanazio, D. A.; Reis, M. G.; Ko, A.I. Leptospirosis. 2005. **Current Opinion Infectious Disease.** 18, 376-386.
- Sonnier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, et al. 2000 Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine** 19: 86–94.
- Cullen, P.A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A.I., Haake, D.A., and Adler, B. 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infect. Immun.** 73: 4853-4863.
- Haake, D. A.; Chao, G.; Zuerner, R. L.; Barnett, J. K.; Barnett, D.; Mazel, M.; Matsunaga, J.; Levett, P. N.; Bolin, C. A. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 68, 2276-2285.
- Guerreiro, H.; Croda, J.; Flannery, B.; Mazel, M.; Matsunaga, J.; Galvao, R. M.; Levett, P. N.; KO, A.I.; Haake, D. A. 2001. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, 69, 4958-4968.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the 10 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol. Rev.** 24, 45-66.
- Daly, R., Hearn, M.T., 2005. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a 8 useful experimental tool in protein engineering and production. **J. Mol. Recognit.** 18, 9 119-138.