

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**EXPRESSÃO DE SmNPP5a DE *Schistosoma mansoni* EM
*Pichia pastoris***

Bianca Balbino

Orientadora: Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Co-orientador: Henrique Krambeck Rofatto

Supervisor: Paulo Eduardo M. Ribolla

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências de
Botucatu – UNESP, como exigência parcial
para a obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

BOTUCATU - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Balbino, Bianca.

Expressão de SmNPP5a de *Schistosoma mansoni* em *Pichia pastoris* /
Bianca Balbino. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Co-orientador: Henrique Krambeck Rofatto

Capes: 20804008

1. Biologia molecular. 2. *Schistosoma mansoni*.

Palavras-chave: Expressão de proteínas; *Pichia pastoris*; pPICZαA;
Schistosoma mansoni.

Resumo

A esquistossomose é causada pelo *Schistosoma mansoni* e é considerada uma importante doença parasitária que afeta mais de 200 milhões de pessoas em países em desenvolvimento. Estima-se ainda que aproximadamente 600 milhões de pessoas vivam em áreas de risco e que o número de mortes por ano devido a esta parasitose chegue a 200.000. O tratamento existente hoje é eficiente, mas não previne contra re-infecção e contra as formas jovens dos parasitas. O desenvolvimento de uma vacina utilizando antígenos do parasita produzidos de modo recombinantes é o anseio para o controle da esquistossomose. A fosfodiesterase-5 (SmNPP-5a) é uma enzima presente na interface parasita-hospedeiro e acessível ao sistema imune, sendo portanto considerada um potencial candidato vacinal, sua avaliação se faz necessária. A obtenção de uma SmNPP-5a recombinante enzimaticamente ativa é um passo fundamental no processo de avaliação da sua capacidade protetora e determinação da sua função fisiológica para o parasita. Utilizando o sistema de expressão baseados em leveduras metilotróficas, *Pichia pastoris*, a proteína recombinante pode ser expressa com as modificações pós traducionais necessárias para ter sua estrutura original mantida, característica fundamental para se obter uma proteína enzimaticamente ativa. Para clonagem e expressão da proteína recombinante utilizamos o vetor pPICZ α A, pois este possui um sistema de expressão baseado no promotor álcool oxidase (AOX1 e AOX2). Ele possui ainda, a capacidade de adicionar um peptídeo sinal e uma cauda de histidina, com objetivo de secretar a proteína expressa e facilitar sua purificação, respectivamente. A triagem e confirmação dos clones positivos foram feitas por PCR. A análise das amostras de sobrenadantes coletadas com 24, 48 e 72h de estímulo com metanol foi feita por SDS-PAGE e Western blot para verificação da expressão da proteína recombinante, possuindo ela um peso esperado de ~45kDa. Apesar da identificação de clones positivos nas PCRs, não foi possível identificar a presença da proteína SmNPP-5a recombinante nas análises feitas por SDS-PAGE ou em Western blot com anticorpo anti-His ou específico anti-SmNPP5a. Podemos concluir, portanto, que a proteína não foi expressa no sobrenadante das culturas de *Pichia pastoris* induzidas com metanol, podendo esta estar presente nas frações intracelulares das amostras (dados não analisados).

Expressão da SmNPP-5a de *Schistosoma mansoni* em *Pichia pastoris*

Bianca Balbino^{1,2}, Henrique K. Rofatto¹, Luciana C.C. Leite¹

¹ Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo. Brasil

² Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Campus Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, s/n

Introdução

A esquistossomose é uma importante doença causada por parasitas hematófagos do gênero *Schistosoma*. É a verminose mais prevalente no mundo afetando mais de 200 milhões de pessoas na África, Oriente Médio, Sudeste da Ásia e América do Sul. Estima-se ainda que aproximadamente 600 milhões de pessoas vivam em áreas de risco e que o número de mortes por ano devido a esta parasitose chegue a 200.000 [1]. No Brasil a doença é causada exclusivamente pelo *S. mansoni*, sendo endêmica no Nordeste, principalmente no estado da Bahia e na região litorânea, e em partes do Sudeste, em especial Minas Gerais. Admite-se existirem mais de seis milhões de indivíduos afetados e estima-se que já foram tratados no país mais de 12 milhões de casos [2].

O *S. mansoni* é um trematódeo dióico e seu ciclo de vida apresenta uma fase de reprodução assexuada no caramujo hospedeiro e uma fase de reprodução sexuada no hospedeiro definitivo, o ser humano. Entre essas duas etapas, o ciclo de vida envolve também dois estágios larvais infectantes, a cercária e o miracídio, importantes na transferência bem-sucedida do parasita de um hospedeiro para o outro. A partir de ovos eliminados com as fezes do hospedeiro definitivo, eclodem os miracídios, que guiados pela luz e por estímulos químicos infectam o caramujo do gênero *Biomphalaria*. Os miracídios diferenciam-se em esporocistos que se multiplicam e originam as cercárias por pedogênese. As cercárias, cuja liberação na água é induzida pela luminosidade diurna, infectam o homem pela penetração na pele. Após a infecção elas se transformam em esquistossômulos e atingem a corrente sanguínea, migrando para o pulmão e em seguida para o fígado e vasos mesentéricos, onde os parasitas atingem a maturidade, formam casais e iniciam a oviposição. Uma parte dos ovos

atinge a luz do intestino e é excretada juntamente com as fezes e em contato com a água, cada ovo libera um miracídio, reiniciando o ciclo [3].

Os ovos que não são eliminados com as fezes são levados pela corrente sanguínea para outros órgãos do hospedeiro e são responsáveis pela patologia da esquistossomose. A patologia é causada pela resposta inflamatória granulomatosa altamente agressiva do próprio hospedeiro contra os ovos que ficam retidos principalmente no fígado e intestinos, podendo resultar em fibrose e calcificação de tecidos. Em casos mais severos, a associação de granulomas hepáticos e fibrose, a pressão portal elevada e a intensa resposta imunológica podem acarretar na dilatação anormal do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia). Esse quadro evolui em algumas pessoas para o acúmulo de líquido na cavidade peritoneal [4].

A estratégia atual para o controle da esquistossomose tem como objetivo a redução da morbidade através do tratamento com o praziquantel [5], um quimioterápico eficiente na eliminação do parasita adulto, porém ineficaz na reversão da patologia da doença, na prevenção da reinfecção e contra as formas jovens do parasita [6]. Há também evidências do desenvolvimento de resistência ou tolerância pelo parasita [7]. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas drogas efetivas contra o parasita e de novas abordagens para erradicar a doença, como a utilização de vacinas. Uma vacina eficaz preveniria a evolução de linhagens de parasitas resistentes ao tratamento com drogas e protegeria contra a patologia [8].

A identificação de antígenos do parasita que poderiam reduzir a patologia e limitar a transmissão do parasita é particularmente importante no processo de desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose. A fosfodiesterase-5 (SmNPP-5a) é uma enzima presente na interface parasita-hospedeiro e acessível ao sistema imune, cuja expressão aumenta significativamente após a infecção do hospedeiro definitivo [9]. Devido a essas características a SmNPP-5a é um potencial candidato vacinal, sendo necessário avaliar sua capacidade protetora e determinar sua função fisiológica para o parasita, de modo que a obtenção de uma SmNPP-5a recombinante enzimaticamente ativa é um passo fundamental desse processo.

Nas últimas três décadas, a *Escherichia coli* tem sido muito utilizada como um sistema de expressão de proteínas. No entanto, com a aplicação de proteínas derivadas de genomas eucariotos e que necessitavam de modificações pós-traducionais, estes microorganismos passaram a apresentar problemas, pois seu maquinário intracelular não está apto a realizar tais modificações [10]. Recentemente, dentre muitos sistemas de expressão, a levedura *Pichia pastoris* tem sido considerada como um excelente sistema utilizado tanto em pesquisa básica quanto para aplicações industriais, principalmente por apresentar características de fácil manipulação genética, além de secretar uma pequena quantidade de proteínas intrínsecas, facilitando sua purificação [11]. Essa levedura é capaz de realizar complexas modificações pós-traducionais nas proteínas expressas, aumentando a probabilidade de um dobramento correto e conseqüentemente a obtenção de uma proteína enzimaticamente ativa. Neste trabalho foi realizado a avaliação da produção de SmNPP-5a recombinante por *Pichia pastoris* a partir de um gene sintético que apresenta códon otimizado para essa seqüência (Figura 1).

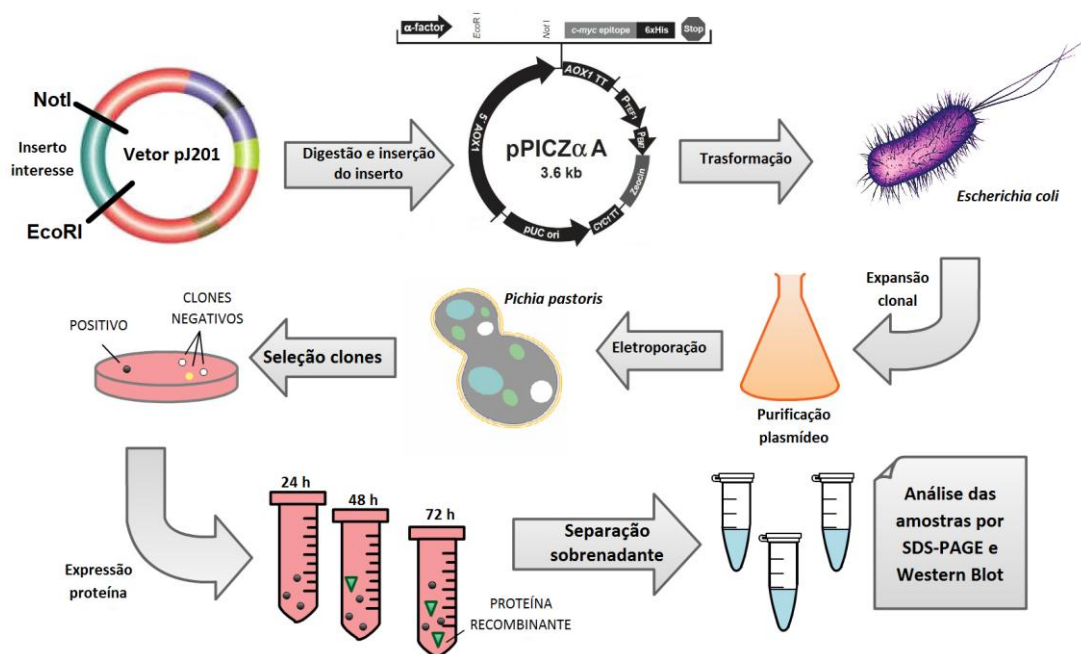


Figura 1. Representação esquemática do trabalho desenvolvido.

Materiais e Métodos

Construção do plasmídeo para expressão da SmNPP-5a

A empresa DNA 2.0 possui um algoritmo para otimizar os códons do gene de interesse para expressão da proteína recombinante em *P. pastoris*, alterando sua sequência de nucleotídeos sem alterar sua sequência de aminoácidos, aumentando assim a possibilidade e/ou o rendimento da expressão. Utilizando esse algoritmo o gene de interesse foi sintetizado pela DNA 2.0 (Anexo I) sendo entregue inserido no plasmídeo pJ201. O plasmídeo pJ201-SmNPP-5a foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para liberação do fragmento de interesse. Essas mesmas enzimas foram utilizadas para digerir o plasmídeo pPICZ α A (Invitrogen), gerando assim os sítios para inserção do fragmento gênico. O vetor pPICZ α A e o gene digeridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, sendo as bandas dos tamanhos esperados purificadas com o kit GFX PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare) e utilizadas na reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Promega). Bactérias DH5 α competentes foram transformadas com o plasmídeo pPICZ α A-SmNPP-5a e com pPICZ α A por choque térmico e cultivadas em placas de cultura em meio Low Salt LB + Ágar (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% de ágar e pH 7.0), contendo antibiótico Zeocina (50 μ g/ml) à 37°C por 16 horas para seleção dos clones transformados. Um clone isolado de cada placa de cultura foi selecionado e inoculado em um erlenmeyer de 500 ml contendo 75 ml de meio Low Salt LB com Zeocina nas mesmas concentrações acima citadas por 16 horas à 37°C no agitador para expansão do número dos clones. A purificação dos plasmídeos foi feita utilizando o MidiKit da QIAGEN, seguindo as instruções do fabricante. Estes plasmídeos purificados foram submetidos à análise de restrição e utilizados para a transformação de *P. pastoris* competentes.

Transformação de *Pichia pastoris* por eletroporação

Os plasmídeos pPICZ α A-SmNPP-5a e pPICZ α A foram linearizados com a enzima de restrição *SacI*. Para confirmação da linearização foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%. Os plasmídeos digeridos foram conservados a 20°C até o uso.

A partir de um estoque criogênico, foram isoladas colônias de *P. pastoris* cepa GS115 utilizando o meio YPDS + Ágar (Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Medium – 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, 1M de sorbitol e 2% de ágar). Após 2 dias a 30°C, foi realizada a seleção de uma colônia isolada para cultivo do pré-inoculo em 5 ml de meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium - 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose) com 250 rpm à 30 °C por 16 h. Após esse período o cultivo foi expandido nas mesmas condições para 175 ml de meio YPD até atingir a DO₆₀₀ de 2.2. As células foram centrifugadas a 1500 g por 5 min e lavadas com água gelada duas vezes. Após a segunda lavagem, as leveduras foram novamente centrifugadas e lavadas com sorbitol 1 M gelado, sendo então centrifugadas, ressuspendidas em 1,5 ml de sorbitol gelado e mantidas a 4°C.

A eletroporação da *P. pastoris* GS115 competentes (80 μ l) foi feita à 1,5kV, 25 μ F, 200 Ω por 4,3 ms com 5 μ g de plasmídeo linearizado. O vetor pPICZ α A não contendo nenhum inserto também foi linearizado, transformado em *P. pastoris* e utilizado como controle. As células transformadas foram imediatamente diluídas em 1 ml de sorbitol 1 M gelado e deixado incubando por 1 hora à 30°C sem agitação. Para a seleção dos clones que contém o plasmídeo foram colocados 10, 25, 50, 100 e 200 μ l das amostras em placas em meio YPDS contendo 100 μ g/ml do antibiótico Zeocina e incubados à 30°C por 6 dias até a formação das colônias.

Para avaliar as leveduras transformadas, utilizamos diferentes concentrações de Zeocina para selecionarmos a quantidade de clones que serão avaliados para a produção da proteína SmNPP-5a. Elegemos 200 clones das leveduras transformadas com pPICZ α A-SmNPP-5a e 50 clones transformados com pPICZ α A. As concentrações definidas de Zeocina foram 1000 μ g/ml, 200 μ g/ml e 100 μ g/ml em meio YPDS + Ágar.

Essas placas foram incubadas à 30°C por 2 dias, após o crescimento e seleção as placas foram mantidas à 4°C e se mantiveram viáveis por até 30 dias.

Avaliação da expressão da SmNPP-5a recombinante em *Pichia pastoris*

Para a triagem da produção da proteína recombinante de interesse, selecionamos 50 clones pPICZαA-SmNPP-5a e 5 clones de pPICZαA das placas que continham 200 µg/ml de Zeocina. Cada clone foi lançado individualmente em 10 ml de meio BMGY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1,34% de YNB, 1% de glicerol, 1,61 µM de biotina, 100 mM de fosfato de potássio, pH 6,0) e cultivados a 30°C sob agitação de 250 rpm até as colônias atingirem DO₆₀₀ entre 1.0 e 2.0, sendo uma alíquota de 1 ml coletada para confirmação da transformação por PCR (do inglês, reação em cadeia da polimerase). As células foram então centrifugadas a 3000 g por 15 minutos, o *pellet* foi ressuspendido em 10 ml de meio BMMY (idêntico ao BMGY, exceto que ao invés de 1% de glicerol, adicionamos 0,5% de metanol) para indução da produção da proteína recombinante. As leveduras foram cultivadas a 28°C por 3 dias sob agitação de 250 rpm, sendo que a cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 1 ml para análise e adicionamos metanol 100% até a concentração final de 0,5%. A análise da expressão da SmNPP-5a recombinante foi avaliada pelo monitoramento do sobrenadante do cultivo celular após 24, 48 e 72 horas da indução com metanol através de *SDS-PAGE* (do inglês, eletroforese de gel de poliacrilamida e sódio dodecil sulfato) e Western blot.

Purificação do DNA genômico de *Pichia pastoris* e confirmação da transformação por PCR

Uma alíquota de 1 ml das leveduras em meio BMGY foi retirada para a realização da análise por PCR do DNA genômico e confirmação dos clones que continham o vetor pPICZαA-SmNPP-5a ou pPICZαA. Para tal, as células foram centrifugadas a 10.000 g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 500 µl de

tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH7,2, 50 mM de EDTA, 3% de SDS e 1% de β -mercaptoetanol). Foi adicionado um volume igual de fenol saturado (50 mM Tris-HCl pH8,0): clorofórmio (1:1) aos tubos e vortexados por 20 segundos, em seguida, os tubos foram centrifugados à 10.000 g por 15 minutos. A fase aquosa contendo o DNA foi coletada, aproximadamente 500 μ l, e a fase orgânica descartada. Foi adicionado 50 μ l de acetato de sódio 3 M (pH5,2) e 300 μ l de isopropanol, misturado por 5 min, seguido de centrifugação nas mesmas condições citadas acima. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi lavado com álcool 70% e centrifugado novamente. O *pellet* secou à temperatura ambiente e então foi ressuscitado em 50 μ l de água [12]. Todas as amostras foram quantificadas no NanoDrop (Thermo) e suas concentrações acertadas para 1000 ng/ μ l.

Todas as amostras de DNA genômico foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') e 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). Cada reação continha 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de 5'AOX1, 0,5 μ M de 3'AOX1, 500 ng de DNA de *P. pastoris*, 1 U de enzima Taq Polimerase (Fermentas) e 1x de tampão de reação em um volume final de 25 μ l. A denaturação inicial foi realizada a 94°C por 10 minutos, seguida por 35 ciclos de denaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão de 1,5 minuto a 72 °C. A extensão final se deu a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%.

Análise da expressão de SmNPP-5a recombinante por SDS-PAGE

Os sobrenadantes coletados após 24, 48 e 72 horas da indução da expressão da SmNPP-5a foram precipitados com ácido tricloroacético em uma concentração final de 13% por 16 horas a 4°C. Após centrifugação a 10.000 g, os *pellets* foram lavados com acetona, centrifugados novamente e secos à temperatura ambiente. Os *pellets* foram então ressuscitados em 100 μ l de tampão para SDS-PAGE (10 mM de Tris-HCl pH 6,8, 0,2% de SDS, 0,1% de azul de bromofenol e 10 % de glicerol). As amostras foram denaturadas a 95°C por 10 minutos por 3 vezes. O gel de poliacrilamida era de 1,5 mm

de espessura e foi preparado com 12% de acrilamida, sendo submetido à eletroforese em 180V. O gel foi então corado com *Coomassie* (Sigma) para visualização das bandas protéicas.

Análise da expressão de SmNPP-5a recombinante por *Western blot*

As amostras foram submetidas a *SDS-PAGE* e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences), utilizando-se para tal fim o sistema de transferência *Trans-Blot SD Semi-DryTransferCell* (BioRad). A transferência foi feita a 10 V por 30 minutos para cada 2 géis de poliacrilamida em tampão (20 % de etanol, 0,1% de SDS, 156,5 mM de glicina e 15,6 mM de Tris-HCl pH 8,3). Para se averiguar o sucesso da transferência a membrana foi corada com Ponceau (Sigma). Após diversa lavagens com TBS-T (10 mM de Tris-HCl pH 7,4, 0,05% de Tween 20), a membrana foi incubada em tampão de bloqueio (5% de leite desnatado, 50mM de Tris-HCl 1M pH7.4, 150mM de NaCl 5 M e 0,1% de Tween20) a 4°C por 16 horas. Em seguida, ela foi incubada com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:1500, Sigma) ou anti-SmNPP-5a policlonal (1:1000, cedido pelo doutorando Henrique K. Rofatto [9]) por 4 horas no agitador em solução de incubação(idêntico ao tampão de bloqueio anterior, porém com 0,05% de Tween20). Apenas quando foi utilizado o anticorpo anti-SmNPP-5a policlonal, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T por 10 minutos cada e houve uma segunda incubação com anticorpo anti-IgG conjugado à peroxidase (1:2000, Pierce) por 2 horas nas mesmas condições acima citadas. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBS-T, incubadas por 5 minutos no reagente Immobilon Western(Millipore) e fotodocumentadas no ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Como controle positivo foi utilizada a SmNPP-5a recombinante expressa em *E. coli* [9].

Resultados

Construção do vetor pPICZ α A-SmNPP-5a

O gene sintético contendo a seqüência otimizada para expressão em *P. pastoris* estava inserido no plasmídeo pJ201 e para sua utilização foi necessária sua digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Estas mesmas enzimas foram utilizadas para clivar o vetor pPICZ α A para que fosse possível ligar os dois fragmentos originando o plasmídeo pPICZ α A-SmNPP-5a. Podemos observar na Figura 1^A, a análise de restrição dos plasmídeos utilizados para transformar as leveduras. O pPICZ α A apresenta uma única banda com ~3,6 kb correspondente ao próprio plasmídeo linearizado (colunas 1 e 2), enquanto o pPICZ α A-SmNPP5a quando digerido com as mesmas enzimas apresenta 2 bandas, uma com ~3,6 kb correspondente ao pPICZ α A linearizado e outra com 1,1 kb correspondente ao gene SmNPP-5a (colunas 3 e 4).

O vetor pPICZ α A é um vetor integrativo e foi escolhido pois ele possui um sistema de expressão eficiente baseado no promotor álcool oxidase (AOX1 e AOX2). Este vetor adiciona também um peptídeo sinal para secreção da proteína expressa (fator α de *Saccharomyces cerevisiae*), bem como uma cauda de Histidina, facilitando a purificação da proteína. Este plasmídeo apresenta ainda uma origem de replicação em *E. coli* (PUC ori), facilitando produzi-lo em grandes quantidades, além de um gene de resistência ao antibiótico Zeocina, que possibilita selecionar os clones transformados, e um sítio de policlonagem facilitando a inserção de genes exógenos (Figura 2B) [10].

A fim de obter uma quantidade adequada de plasmídeos para eletroporar as leveduras *P. pastoris*, fizemos a transformação de bactérias *E. coli* DH5 α com os mesmos. A seleção das bactérias transformadas foi realizada pela adição de Zeocina ao meio de cultura sólido das bactérias. Após a seleção de um clone isolado e o crescimento do mesmo em meio líquido, fizemos a purificação dos plasmídeos pPICZ α A e pPICZ α A-SmNPP-5a, os quais apresentaram as respectivas concentrações 284 μ g/ml e 246 μ g/ml.

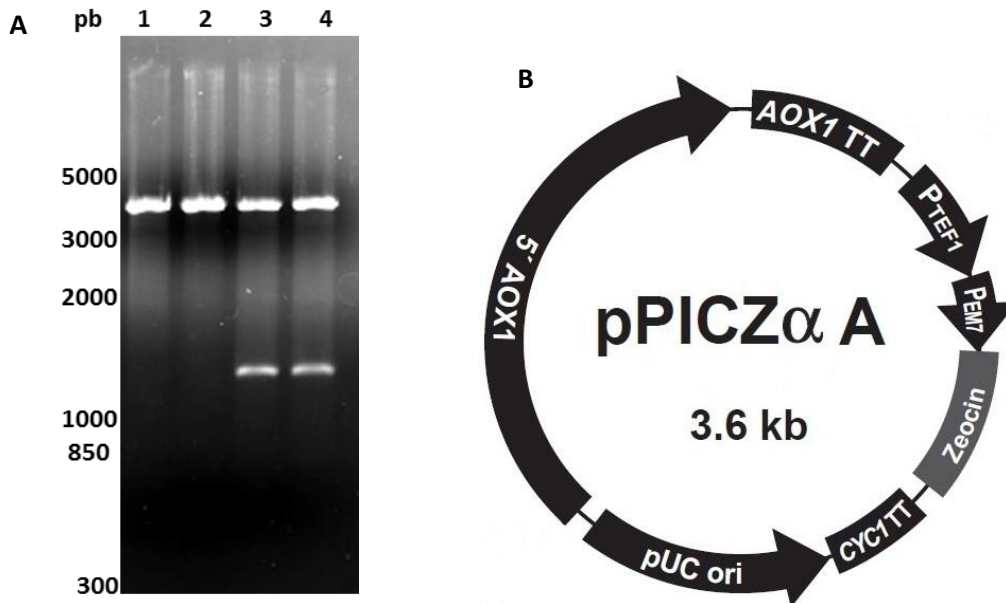


Figura 2. A – Gel de agarose para análise de restrição do vetor pPICZαA contendo SmNPP-5a. Pb: pares de base; 1 e 2, vetor pPICZαA vazio; 3 e 4, vetores pPICZαA-SmNPP-5a. B - Representação esquemática do vetor de expressão para a levedura *Pichia pastoris* pPICZαA.

Os plasmídeos foram linearizados com a enzima de restrição *SacI* para que os mesmos fossem integrados no genoma da levedura por eletroporação. Na seleção dos clones transformados utilizamos diferentes concentrações de Zeocina, pois segundo Vassileva e colaboradores [13], os transformantes resistentes a 100 µg/ml contém normalmente uma cópia, aqueles resistentes a 500 µg/ml possuem duas cópias e os que têm 3 cópias conseguem sobreviver na concentração de 1000 µg/ml. Para prosseguir com a expressão da proteína SmNPP-5a selecionamos 50 clones (Figura 2) de pPICZαA/SmNPP-5a da placa que continha concentração de 200 µg/ml, ou seja, os clones possuíam ao menos uma cópia do nosso gene exógeno.

As PCRs foram realizadas com a finalidade de obtermos a confirmação além da já citada anteriormente. As reações foram delineadas com os primers 5'AOX1e 3'AOX1 e foram realizadas em todos os 60 clones selecionados. Como podemos notar na Figura 2, o inserto de interesse possui por volta de 1650pb, sendo que o negativo por volta de 588pb, correspondente ao fragmento que o plasmídeo pPICZαA possui. A banda que aparece por volta de 2,2 kb corresponde ao gene AOX1 da própria *P. pastoris* que também possui um promotor AOX intrínseco. Observamos 45 clones positivos e 5

negativos, portanto o sucesso da transformação foi de 90%, para o vetor pPICZ α A-SmNPP-5a, enquanto para o vetor pPICZ α A verificamos que os 10 clones foram transformados de modo satisfatório, ou seja, uma eficiência de 100%. Como controles positivo e negativo utilizamos os plasmídeos pPICZ α A-SmNPP-5a e pPICZ α A vazio, respectivamente, purificados.

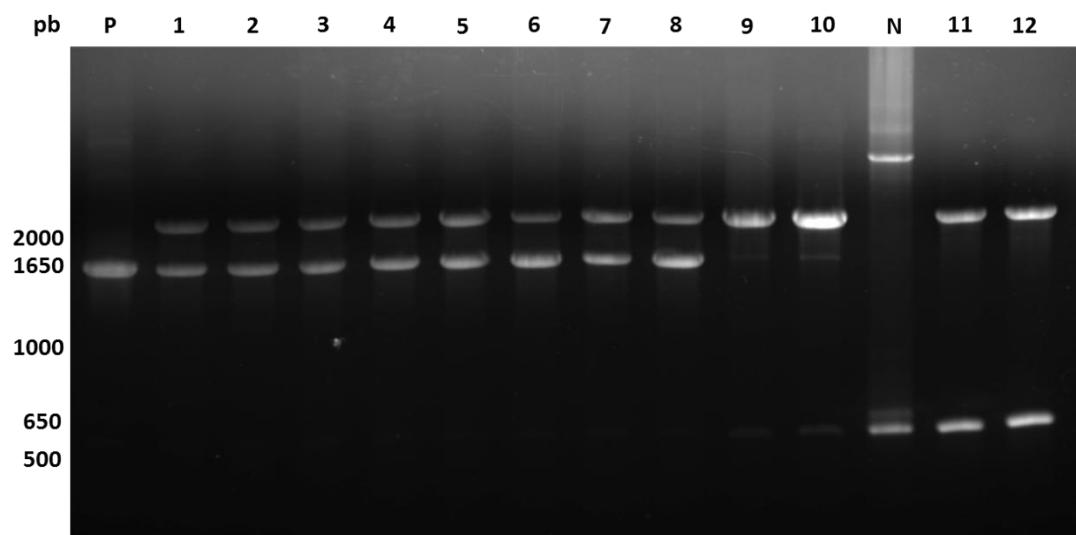


Figura 3. Gel de agarose dos produtos de PCR para confirmação da transformação de *Pichia pastoris* pb - pares de bases. P - vetor pPICZ α -SmNPP-5a. N - plasmídeo pPICZ α A. Amostras de 1 a 8 - *P. pastoris* transformadas com pPICZ α -SmNPP-5a com sucesso. Amostras 9 e 10: *P.pastoris* que passaram pelo processo de transformação com pPICZ α -SmNPP-5a, mas não tiveram o plasmídeo integrado em seu genoma. Amostras 11 e 12: *P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZ α A vazio.

Avaliação da expressão da SmNPP-5a recombinante

Após o cultivo das leveduras transformadas prosseguimos para a avaliação da produção da proteína recombinante após 24, 48 ou 72 horas da indução da expressão com metanol. Partindo da premissa que a sequência sinal da proteína permitiria que a mesma seja secretada para o meio, analisamos todos os sobrenadantes coletados, totalizando 165 analitos, por SDS-PAGE e Western blot.

Primeiramente as amostras foram analisadas por SDS-PAGE, uma vez que a levedura *P. pastoris* transformada com o vetor pPICZ α A apresenta uma baixa secreção de proteínas endógenas [11], permitindo diferenciar facilmente a proteína recombinante. A Figura 4 demonstra que não foi possível observar diferenças entre o padrão de

bandas das leveduras transformadas com pPICZ α A-SmNPP-5a do controle transformado com o vetor vazio. Apesar de visualizarmos uma banda com 45 kDa, tamanho predito da nossa proteína recombinante, esta poderia ser uma proteína endógena da levedura uma vez que também é detectada na levedura transformada com pPICZ α A apenas.

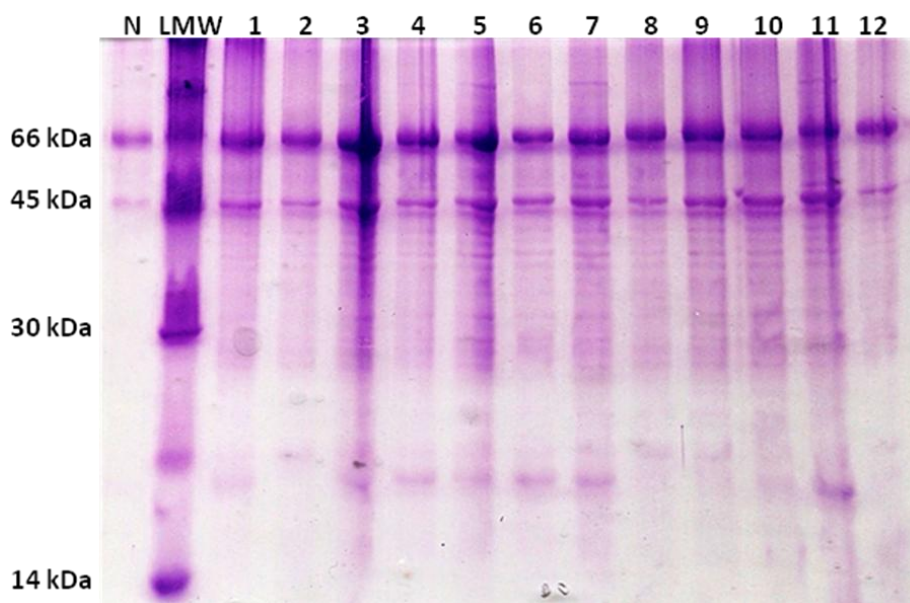


Figura 4 - Avaliação da expressão da SmNPP-5a recombinante por SDS-PAGE. N – *P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZ α A vazio; LMW – padrão de peso molecular; amostras de 1 a 12 - *P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZ α A-SmNPP5a.

Como a proteína poderia estar sendo expressa em pequenas quantidades não diferenciáveis pelo SDS-PAGE corado com Coomassie, foi realizada a avaliação da expressão por Western blot. Foram utilizados 2 anticorpos para detecção da proteína recombinante: anti-His e anti-SmNPP-5a. O primeiro apresenta afinidade pelos epítopos da cauda de Histidina que estaria presente na porção C-terminal da proteína expressa e o segundo seria específico para a proteína recombinante. Caso a proteína recombinante esteja sendo expressa, ela teria um tamanho esperado de ~45kDa e seria detectada tanto nas membranas incubadas com anticorpo anti-His quanto nas incubadas com anti-SmNPP-5a.

Entretanto, não foi possível identificar a presença da proteína SmNPP-5a recombinante nas análises feitas, sendo porém, perceptível na maioria das amostras nas quais utilizamos anti-His, a presença de duas bandas, uma apresentando um peso com pouco menos de 30kDa e outra por volta de 35kDa (Figura 5A), possivelmente resultado de ligações inespecíficas do anticorpo. Essas duas proteínas foram pouco detectadas nas amostras de 24 horas, enquanto após 48 e 72 h do cultivo celular sua quantidade aumentou significativamente (dado não mostrado), provavelmente devido ao seu acúmulo no meio de cultura ao longo do ensaio. Como estas bandas não foram detectadas nas análises utilizando o anticorpo anti-SmNPP-5a (Figura 5B), descartou-se a possibilidade da proteína recombinante estar degradando, o que justificaria seu tamanho menor que o esperado.

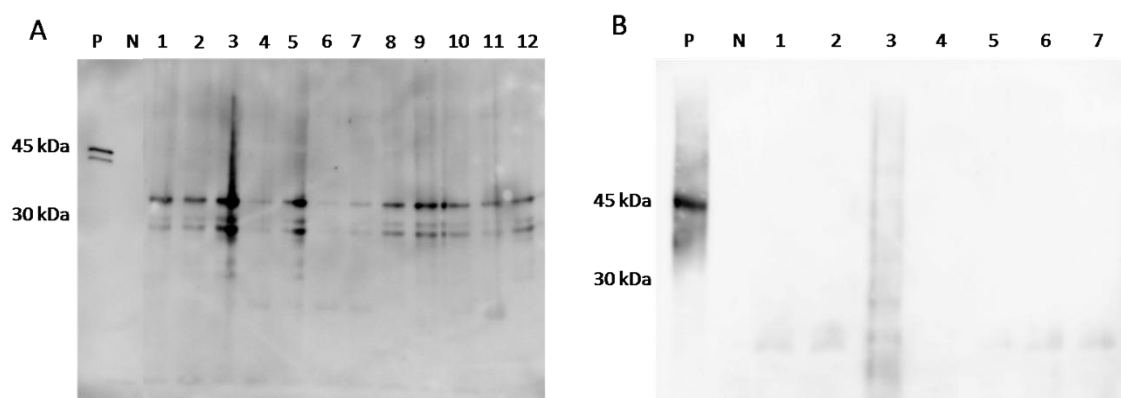


Figura 5 – A análise da expressão da SmNPP-5a recombinante em extratos de *P.pastoris* por Western blot. A - Western blot incubados com anti-His (P-SmNPP-5a recombinante expressa em *E. coli*; N-*P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZ α vazio; amostras de 1 a 12-*P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZ α -SmNPP5a). B – Western blot incubado com anti-SmNPP-5a (P-SmNPP-5a recombinante expressa em *E. coli*; N-*P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZ α A vazio; amostras de 1 a 7-*P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZ α A-SmNPP5a)

Discussão

O desenvolvimento de uma vacina utilizando antígenos do parasita produzidos de modo recombinantes é o anseio para o controle da esquistossomose . Para tal, além da escolha do antígeno pela sua imunogenicidade, a sua caracterização e avaliação como potencial candidato vacinal se faz necessária [8]. O antígeno por nós selecionado, SmNPP-5a, faz parte da família das pirofosfatases/fosfodiesterases nucleotídicas (NPPs). As NPPs são enzimas que hidrolisam ligações 5' fosfodiéster dos nucleotídeos e de seus derivados. A NPP-5 é uma proteína de membrana tipo I, apresentando um sítio catalítico na região extracelular e uma cauda citoplasmática muito curta. Dentre as funções preditas podemos citar a reciclagem de nucleotídeos e a regulação dos níveis extracelulares de pirofosfato. [14]. Como os nucleotídeos extracelulares, e em particular o ATP e adenosina, estão envolvidos em diversos processos biológicos como a neurotransmissão, neuroproteção em hipóxia e isquemia, regulação das funções cardiovasculares, agregação plaquetária, contração da musculatura lisa, secreção de hormônios, modulação da resposta imune, controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular, presume-se que as NPPs influenciem direta ou indiretamente esses mecanismos fisiológicos [14]. A SmNPP-5a recombinante pode ser então considerada um potencial candidato vacinal para a esquistossomose e para sua melhor caracterização, estudo da sua atividade enzimática e sua avaliação como antígeno vacinal, faz-se necessária sua produção de modo recombinante e enzimaticamente ativo.

A seleção do vetor e do sistema de expressão é um dos primeiros e mais importantes passos para expressão da proteína recombinante escolhida, sendo que uma grande variedade de sistemas já foi descrita e padronizada para este fim. A bactéria *E. coli* é extensivamente utilizada; mas devido a sua origem procariota, um número limitado de proteínas recombinantes pode ser expressa com suas características intrínsecas originais conservadas, principalmente se advindas de um organismo eucarioto. Normalmente, *E. coli* não é adequada para estudos com proteínas que necessitem modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, isomerização *cis/trans*, isomerização dissulfeto, sulfatação ou fosforilação [15]. Portanto, para uma grande

variedade de proteínas que não podem ser produzidas corretamente em organismos procariotos, buscou-se alternativas e o emprego de leveduras metilotróficas, como a *Pichia pastoris*, passou a ser uma opção [16]. O sistema de expressão em *P. pastoris* oferece muitas vantagens em relação a *E. coli* para a produção de proteínas de origem eucariota. Além de ser capaz de realizar modificações pós-traducionais e a obtenção de uma proteína recombinante com características semelhantes à original, por vezes, ainda é capaz de secretá-la para o meio em uma forma solúvel e em uma grande quantidade. A facilidade na qual ela pode ser manipulada geneticamente e a sua capacidade de inserção por recombinação homóloga eficiente de DNA linearizado produzem linhagens celulares estáveis, as quais podem apresentar múltiplas inserções do vetor [17]. Assim, como já foi demonstrado que a SmNPP-5a nativa é glicosilada e que a proteína recombinante produzida em *E. coli* não apresenta atividade enzimática, optamos pelo sistema de expressão em *P. pastoris* para produção de nossa proteína recombinante.

Apesar de respaldados pela literatura e da realização minuciosa das técnicas previamente descritas, não foi possível detectar a produção da proteína recombinante SmNPP-5a no sobrenadante das culturas analisadas. Esperávamos que a proteína fosse secretada para o meio de cultura, uma vez que o vetor de expressão utilizado apresenta uma sequência sinal secretória específica para levedura (fator sinal α). Entretanto, não foi possível detectá-la, havendo então a possibilidade de que a proteína recombinante esteja na fração intracelular dos clones. Nestes casos a purificação das proteínas expressas intracelularmente geralmente é mais difícil que daquelas secretadas para o meio de cultura, já que a proteína recombinante representa tipicamente menos de 1% do total das proteínas intracelulares [18]. É comum também que proteínas recombinantes expressas de maneira intracelular não apresentem sua conformação estrutural correta, sendo que esta apenas é obtida após sua purificação em um processo de renovelamento *in vitro*.

Apesar dessas desvantagens, muitas proteínas têm sido expressas com sucesso na fração intracelular, particularmente aquelas associadas à membrana, como por exemplo, antígenos de superfície do vírus da hepatite B [13]. Desse modo o próximo

passo será analisar as frações intracelulares das leveduras *Pichia pastoris* transformadas com pPICZ α A-SmNPP-5a para avaliar a expressão da proteína recombinante.

Referências Bibliográficas

1. WHO, *Report of the Scientific Working Group on Schistosomiasis*. World Health Organization, 2005.
2. Amaral, R.S., et al., *An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006. **101 Suppl 1**: p. 79-85.
3. Gryseels, B., et al., *Human schistosomiasis*. Lancet, 2006. **368**(9541): p. 1106-18.
4. Boros, D.L., *Immunopathology of Schistosoma mansoni infection*. Clin Microbiol Rev, 1989. **2**(3): p. 250-69.
5. Fenwick, A., et al., *Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis*. Trends Parasitol, 2003. **19**(11): p. 509-15.
6. Bergquist, N.R., L.R. Leonardo, and G.F. Mitchell, *Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach?* Trends Parasitol, 2005. **21**(3): p. 112-7.
7. Woelfle, M., et al., *Resolution of praziquantel*. PLoS Negl Trop Dis. **5**(9): p. e1260.
8. Rofatto, H.K., et al., *Vaccine antigens against schistosomiasis: past and presente*. Revista da Biologia, 2011. **6b**: p. 54-59.
9. Rofatto, H.K., et al., *Characterization of phosphodiesterase-5 as a surface protein in the tegument of Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, 2009. **166**(1): p. 32-41.
10. Daly, R. and M.T. Hearn, *Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production*. J Mol Recognit, 2005. **18**(2): p. 119-38.
11. Guo, J.P. and Y. Ma, *High-level expression, purification and characterization of recombinant Aspergillus oryzae alkaline protease in Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2008. **58**(2): p. 301-8.
12. Tomita, E.Y., et al., *Isolation of genomic DNA from Pichia pastoris without hydrolases*. Biotecnología Aplicada, 2002. **19**: p. 167-168.
13. Vassileva, A., et al., *Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris using the GAP promoter*. J Biotechnol, 2001. **88**(1): p. 21-35.
14. Goding, J.W., B. Grobber, and H. Slegers, *Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1638**(1): p. 1-19.
15. Lueking, A., et al., *A system for dual protein expression in Pichia pastoris and Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2000. **20**(3): p. 372-8.
16. Heim, J., et al., *Functional expression of a mammalian acetylcholinesterase in Pichia pastoris: comparison to acetylcholinesterase, expressed and reconstituted from Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1396**(3): p. 306-19.
17. Ramon, A. and M. Marin, *Advances in the production of membrane proteins in Pichia pastoris*. Biotechnol J, 2011. **6**(6): p. 700-6.
18. Rees, G.S., et al., *Rat tumour necrosis factor-alpha: expression in recombinant Pichia pastoris, purification, characterization and development of a novel ELISA*. Eur Cytokine Netw, 1999. **10**(3): p. 383-92.

ANEXO I – Alinhamento da sequência gênica da SmNPP-5 nativa e sintética com códon otimizado para expressão em *Pichia pastoris*

Otimizada : GACCAATTTTCTAAAGTGATCCTGATAACTCTAGACGGATTGAGATATGACTACTTCGAT : 60
 Nativa : GAAACAGTTTCTAAAGTAATACTTATTTCTCTGATGGATTTCGTTATGATTACTTTGAT : 60

Otimizada : ATGGCTAAACAGCGTAAACATCAATATGTCGCCGTTTGGACAAGATCATCAATCAAGGTGTC : 120
 Nativa : ATGGCTAAGCAAAGAAATATAAACATGTCAGCATTTGATAAGATTATAAATCAAGGAGTT : 120

Otimizada : TATATAGACGTATCGAAAACGAGTTCCTACGTTGACTTTCCCTAGCCATTTCTCCATT : 180
 Nativa : TATATAAGACGTATAGAAAATGAATTTCTTACCTTAACATTCCCATCACATTTTCAATT : 180

Otimizada : GTTACAGGACTGCATCCTGGAAGTCATGGTATGTTGATAATGTCTTTTACGATCCAATC : 240
 Nativa : GTTACAGGACTGCATCCTGGAAGTCATGGTATAGTAGATAATGTCTTTTATGATCCAATA : 240

Otimizada : ATTAATGCTACATTTTCATCCAGAAATCAATCAACGGCAACAGATTCTAGATTTTATGAT : 300
 Nativa : ATTAATGCAACATTTCTATCCAGAAATCAGTCTACAGCAACAGATTCTAGATTTTATGAT : 300

Otimizada : GTAGGTGCAGAACCATTGGGTACTAATCAATTTCAAGGTCATAAGTCTGGCGTTACT : 360
 Nativa : GTAGGTGCTGAACCGATTGGGTACCAATCAGTTTCAAGGTCATAAAGTGGAGTACT : 360

Otimizada : TTTTGGATCGGTAGTGAGGCTATATCAAGGGTGAAAGACCAACGCACTACTTAACTCCA : 420
 Nativa : TTCTGGATTGGAAGTGAGGCGATAATCAAAAGGTGAGAGACCAACTCATTATCTAACACCT : 420

Otimizada : TACAACGAATCAATTACCTTCAACCACGTTATCGATATATTGATGGACTGGTTTGAACAT : 480
 Nativa : TACAATGAAAGCATTACCTTCACTCAGAGAATTGATATTTGATGGATTGGTTTGAACAT : 480

Otimizada : GAGAACATTAATCTGGGTTTGTATGATATTACCACCAGCCAGATAGGGCTGGCCACATTCAC : 540
 Nativa : GAAAATATTAACCTTGGTCTTATGTATTTATCATCAACCTGATAGAGCAGGACATATTCAT : 540

Otimizada : GGAGCTGCCAGCGACGAAGTTTTCAAAGCCATGAGGAGATTAATCATGGATTAGAATAC : 600
 Nativa : GGAGCGGCAAGTGATGAGGTTTTCAAAGCTATCGAGGAGATAAATCATGGACTAGAATAC : 600

Otimizada : CTTTGGACTCAATTGAAATGCGTCCCTCCTTGCCTGTGTCTAAACCTGATCATCACA : 660
 Nativa : CTCTTGACATCGATTGAAATGCGACCATCACTTAGTTGCTGCCCAATCTGATATAACA : 660

Otimizada : TCCGATCACGGTATGACTAATATCTCTTCAGATAGAGTAATCTACTTGCACGACTATATC : 720
 Nativa : AGTGATCATGGAATGACGAACATCAGTTCAGACAGAGTTATATATCTTCATGATTACATA : 720

Otimizada : CATCCAAATGAGTACATAGCGCACCTAAAAGTCTGCCGAAATTTGGACACTGTGGCCA : 780
 Nativa : CATCCAAATGAGTATATATCTGCTCCTAAGAAGTCAGCAGAAATCTGGACACTTTGGCCA : 780

Otimizada : AAGCAAGGTTATACTGTACGTTCACTCTATAACAACTGAAGGATAGGCATTTCCGGATTG : 840
 Nativa : AAGCAAGGCTATACTGTGCGATCATTATACAACAAATGAAAGATCGACACTTCAGGTTA : 840

Otimizada : AATGTGTACTTGAAGAGGAATTA CCTACAAGATTTTCTACGGTTCAGCGATAGAGTC : 900
 Nativa : AATGTCTATTTGAAGGAGGAACGCCAACACGTTCTTTTATGGTTCAAGTGATCGAGTC : 900

Otimizada : GGTCCAGTGGTGGTTATGCTGACATCGGATGGACAATTATAGCAGATAGAACCTCTGGT : 960
 Nativa : GGTCCGTGTGTGTATATGCAGATATTGGATGGACGATTATTGCTGACAGAACCTCTGGG : 960

Otimizada : ATTTACTTTGAAAAACAAAGGTGCTCATGGTTACGACCCAGACTATAAGGAGATGTCGCC : 1020
 Nativa : ATTAACCTGAAAAATAAAGGTGCTCATGGTTATGATCCAGATTACAAAGAGATGTCGCC : 1020

Otimizada : TTTTTGATGGCTATGGGACCTCAATCGCAAGAGTCAAGCCACTGAGCTTAAGGAATCC : 1080
 Nativa : TTTTTAATGGCGATGGGACCTCAGATAGCTAAAAGTCAACCAACAGAATTAAGAATCA : 1080

Otimizada : ATTAACCTTATAGACATCTACTCGTTGATCTGCTTGATGCTTGACTTAGAA : 1131
 Nativa : ATCAAGCTGATTGATATTTACTCACTGATTTGTCTCATGCTTGATTTGGAA : 1131