

## PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EMA-2 DE *Theileria equi* EM *Pichia pastoris*

ANA MUÑOZ VIANNA<sup>1</sup>; RELBER AGUIAR GONÇALES<sup>2</sup>; ANA PAULA DE SOUZA STORI DE LARA<sup>3</sup>; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [a.munozvianna@gmail.com](mailto:a.munozvianna@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo – [relbergoncales@hotmail.com](mailto:relbergoncales@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [ana.paula.central@hotmail.com](mailto:ana.paula.central@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [Fabio@leivasleite.com.br](mailto:Fabio@leivasleite.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial (MAPA, 2014). Mesmo com as melhorias na sanidade certas enfermidades ainda causam enormes prejuízos à criação equina no Brasil. Entre estas enfermidades destacamos a theileriose, causada por *Theileria equi*, protozoário intracelular, que acomete os equinos de forma endêmica em países tropicais e subtropicais (SCHEIN, 1988). A theileriose provoca perdas associadas tanto a fatores clínicos como a restrição ao trânsito internacional de animais soropositivos (FRIEDHOFF, 1990).

A transmissão de *T. equi* ocorre no repasto do carrapato contendo suas formas infectantes (esporozoítos). No Brasil, devido à grande disseminação de ambos, *T. equi* e os diversos carrapatos vetores, o diagnóstico e prevenção desta enfermidade se fazem necessários (HUANG et al., 2003).

Os antígenos de superfície de merozoítos desempenham papel importante no reconhecimento do parasito e na penetração nos eritrócitos hospedeiros, tornando-se, alvos das respostas imunes dos hospedeiros (KUMAR et al., 2004; NIZOLI, et al., 2009). Animais infectados com *T. equi* respondem com altos títulos de anticorpos contra proteínas de superfície de merozoítos (KNOWLES et al., 1994). Em *T. equi* duas proteínas de superfície de merozoítos, equi merozoítos antígeno (EMAs): EMA-1 (34 kDa) e EMA-2 (30 kDa) foram identificadas como os antígenos imunodominantes. A proteína EMA-2 é liberada no citoplasma e na membrana deste eritrócito, sugerindo ser um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imune (KUMAR, et al., 2004).

Em testes de diagnóstico imunológicos a especificidade, sensibilidade e custo dependem principalmente do antígeno utilizado. Uma alternativa é a utilização de antígenos recombinantes para a detecção de *T. equi* (CEREGHINO & CREGG, 2000). A utilização da levedura *Pichia pastoris* tem sido utilizada para a produção de antígenos uma vez que concilia vantagens na manipulação genética associada ao crescimento em meios de cultivo simples, facilitando a sua utilização em escalas industriais (CEREGHINO & CREGG, 2000).

O objetivo deste trabalho foi expressar a proteína de superfície de *Theileria equi*, EMA-2, na levedura *Pichia pastoris*.

### 2. METODOLOGIA

**Linhagens, cultivo e extração de DNA.** O DNA de *T. equi* foi extraído conforme o protocolo de Extração de DNA, Método de Miller et al., (1988) modificado a partir de sangue de um equino infectado experimentalmente, cepa UFPEL E15 e

comprovados por Imunofluorescência (Laboratório de Doenças Parasitárias da UFPEL). (NIZOLI, et al., 2009).

**Amplificação e sequenciamento do gene que codifica EMA-2.** A sequência do gene *EMA-2* foi amplificado por PCR com Taq DNA polimerase (Invitrogen) Os *primers* para *EMA-2* foram desenhados utilizando-se o programa Vector NTI a partir das sequências depositadas no GenBank (*EMA-2* acesso AB013725). O produto de PCR foi purificado usando-se o *kit* Real Genomics da Bio America - Hiyield™ Gel/PCR DNA Minikit. O sequenciamento do gene foi realizado por ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS), utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100*.

**Clonagem do gene *EMA-2* no vetor de expressão.** Foi feita a digestão do vetor pPICZαB e do gene *EMA-2* com as enzimas *SacII* (Biolabs 20.000U mL<sup>-1</sup>) e *XbaI* (Invitrogen 20.000U mL<sup>-1</sup>). Para a ligação do gene *EMA-2* com o vetor pPICZαB, procedeu-se segundo o protocolo EasySelect™ *Pichia* Expression Kit-Catalog K1740-01 (Invitrogen).

**Expressão e purificação da *EMA-2*.** Após a clonagem do inserto *EMA-2* no vetor de expressão pPICZαB, o plasmídeo pPICZαB-*EMA-2* foi transformado em *P. pastoris* por eletroporação. Para confirmar a transformação da levedura *P. pastoris* foi feito um PCR de colônia seguindo o protocolo mencionado acima. As células transformantes foram selecionadas e transferidas para o meio BMMY. As amostras foram induzidas com 450μL metanol para a produção da proteína por 120h. Ao final da indução, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10min<sup>-1</sup>. No sobrenadante do cultivo, foi adicionado sulfato de amônio suficiente para atingir 80% de saturação e mantido a 4 °C por 18h. Após, foi centrifugado a 6.000 x g 15min<sup>-1</sup> 4°C e o precipitado suspenso em 2mL de água destilada.

**Purificação e quantificação da proteína.** A purificação da proteína recombinante foi realizada por diálise (membrana semipermeável, ponto de corte 12KDa - Viskase corporation Dry 21mm). Para a quantificação da proteína, seguiu-se o protocolo proposto por BRADFORD (1976). O método foi padronizado usando-se uma curva de diluição de Albumina Sérica Bovina 10% (BSA). A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro TP-READER – Thermo Plate.

**Western Blot.** Realizou-se um *Western Blot* segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001). Após eletroforese no gel de poliácridamida 12% (SDS-PAGE), a proteína foi transferida para membrana de nitrocelulose (Amershan™ Hybond™- ECL GE Healthcare). Foi utilizado o marcador de proteínas BenchMark™ Prestained Protein Ladder 250μL (Invitrogen). Após bloqueio, a membrana foi incubada com Anti-His C-terminal-HRP AB (Invitrogen), diluída 1:5000 (v/v) em PBS-T. Foi realizado também um *Western blot* com soro equino positivo para theileriose (IFAT) na concentração de 1:100 (v/v) em PBS -T e, como anticorpo secundário, utilizou-se soro anti-equino conjugado com peroxidase (Sigma) 1:3000. O marcador utilizado foi *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio Rad).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

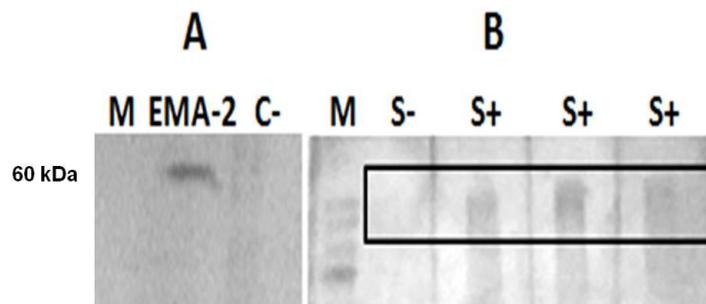
Segundo a OIE (2008) o método oficial desde 2005 para que se obtenha permissão para o transporte internacional de equinos para países livres da theileriose é o teste ELISA.

Diferentes antígenos recombinantes têm sido utilizados em ELISAs no diagnóstico da theileriose, tais como: EMA-1 (BALDANI et al., 2011), EMA-2 (TANAKA et al., 1999) expressos em *E. coli* e baculovírus, o que demonstra que estas proteínas recombinantes podem ser úteis para identificação de theileriose em equinos (OIE, 2008).

O gene da proteína EMA-2 foi amplificado por PCR e o sequenciamento do gene mostrou 99% de homologia com a sequência depositada no GenBank AB013725. O gene *EMA-2* foi clonado inicialmente em *E. coli* através do vetor pPICZαB para sua propagação antes da clonagem em *P. pastoris*. A clonagem em *P. pastoris* e a construção do vetor de expressão pPICZαB/*EMA-2* que utiliza o peptídeo sinal (α – Factor) de *Saccharomyces cerevisiae* para promover a secreção desta proteína recombinante facilitou sua obtenção e purificação (CEREGHINO & CREGG, 1999).

Para confirmação das colônias de *P. pastoris* transformadas realizou-se PCR com os *primers* usados para a amplificação do gene *EMA-2* (dados não mostrados).

A confirmação da expressão da proteína rEMA-2 foi feita através de *Western Blotting* utilizando anticorpo anti-histidina, uma vez que vetor pPICZαB possui sítio para a adição de cauda de seis histidinas (6xHis) na porção carboxi-terminal da proteína (Invitrogen) (Figura 1A) e a proteína rEMA-2 também foi reconhecida por soro de equino naturalmente infectado (Figura 1B).



**Figura 1 Western Blot.** *Western blot* da proteína rEMA com anticorpo anti-histidina C-terminal (HRP Ab) – Invitrogen - (M) Marcador de proteínas – Bench Mark™ - (EMA-2) Proteína rEMA-2. (C-) Controle negativo, BSA 10%. **B-** *Western Blot* da proteína rEMA com soro equino (+). (M) Marcador de proteínas Precision Plus Protein Dual Color Standards – Bio-Rad, (S-) Controle negativo- soro equino (-), (S+) Soros positivos.

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que a proteína EMA-2 de *Theileria equi* pode ser expressa em *Pichia pastoris*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, C.D.; HILARIO, E.; NAKAGHI, A.C.; BERTOLINI, M.C.; MACHADO, R.Z. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.20, n.1, p.54-60, 2011.

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 248-254, 1976.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n.1, p. 45-66, 2000.

FRIEDHOFF, K.T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal for Parasitology**, Australia, v. 20, n.4, p. 525-535, 1990.

HUANG, X.; XUAN, X.; XU, L.; ZHANG, S.; YOKOYAMA, N.; SUZUKI, N.; IGARASHI, I. Development of Immunochromatographic test with Recombinant EMA-2 for the Rapid Detection of Antibodies against *Babesia equi* in Horses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 359-361, 2003.

INVITROGEN, MANUAL. *Pichia* Expression Kit for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris* Cat. n°. K1740-01.Rev. Date 18 June 2010.

KNOWLES, D. P., JR.; KAPPEMEYER, L. S.; PERRYMAN, L. E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, p. 1909-1913, 1994.

KUMAR, S. et al. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Texas, USA, v.133, p.221-227, 2004.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Acessado em 23 jun. 2014. Online. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 6, p. 1215, 1988.

NIZOLI, L. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; DUMMER, L. A.; SANTOS JR, A. G.; LEITE, F. P. L. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Brazil. **Journal Veterinary Parasitology**, v.18, 2009.

OIE, (Office International des Epizooties) 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, (mammals, birds and bees) (6 ed). Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/>. Acessado em: 23 de jul. 2014.

SAMBROOCK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning. **A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 9.16-9.17, 2001.

SCHEIN E., Equine babesiosis *In Ristic, M., Babesiosis of Domestic Animals and Man* CRC Press, Boca Raton, FL. p. 197-208, 1988.

TANAKA, T., XUAN, X., IKADAI, H., IGARASHI, I., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., MIKAMI, T., SUZUKI, N. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. **International journal for Parasitology**, Austrália, v.29, p. 1803-1808, 1999.