

Obtenção de metaloproteases recombinantes funcionais de *Leptospira* a partir de corpos de inclusão (CI) aplicando a tecnologia de alta pressão (TAP)

Matheus Martins Di Lela, Lígia Ely Morganti Ferreira Dias e Rosa Maria Chura Chambi
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

Pouco se conhece sobre a identidade das proteases secretadas por cepas patogênicas de *Leptospira*. Há indicações de que essas proteases representem um potencial alvo para o desenvolvimento de novas terapias para tratar a leptospirose [1]. Contudo, limitações na obtenção proteases nativas a partir de cepas patogênicas de *Leptospira* [2]. O estabelecimento de um processo de enovelamento adequado é uma alternativa importante para sua obtenção. É neste contexto que a tecnologia de alta pressão (TAP) é uma alternativa para superar a dificuldade de obtenção das metaloproteases bioativas. Esta tecnologia utiliza a alta pressão para solubilizar proteínas na forma de corpos de inclusão (CI) em condições brandas (não desnaturantes), elevando o rendimento de obtenção de proteínas corretamente enoveladas em relação aos métodos tradicionais de renaturação [3, 4].

OBJETIVO

Otimizar um processo eficiente de renaturação de proteases de *leptospira* a partir de CI produzidos em *E. Coli*, aplicando a técnica de alta pressão (TAP).

METODOLOGIA

A expressão e isolamento da protease termolisina na forma de CI foi realizada seguindo o protocolo estabelecido pelo grupo [3]. Suspensões de CI-TL preparadas em tampões com diferentes pHs (7,0 - 12,0) foram submetidas a 2,4 kbar por 90 minutos. Após descompressão as amostras

foram centrifugadas e dialisadas contra tampão apropriado. Para a avaliação do tempo mínimo de incubação em alta pressão, suspensões de CI-TL foram incubadas em três intervalos de tempo: 30, 60 e 90 minutos e logo tratadas como descrito acima. A análise dos resultados foi realizada por SDS-PAGE e a obtenção de micrografias dos CI-TL antes e após a aplicação de 2,4 kbar de pressão foram obtidas por MEV (CCTM).

RESULTADOS

Na figura 1 podemos observar que quanto mais alcalino o pH a solubilização dos CI-TL é alcançada, sendo os pHs 10,0 e 11,0 os que tiveram o melhor resultado.

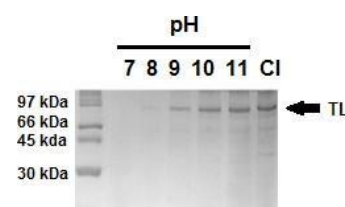


Figura 1. Análise por SDS-PAGE das amostras de TL em diferentes valores de pH submetidos a 2,4 kbar por 90 min.

Um ensaio comparativo entre CI-TL submetidos à alta pressão (2,4 kbar) e CI-TL mantidos em pressão atmosférica (1 bar) são mostrados na figura 2A, os resultados confirmam que a solubilização de CI-TL só pode ser obtida em alta pressão é o mesmo não acontece em pressão atmosférica. Também foi confirmado que o tempo de incubação em alta pressão é relevante para a solubilização dos CI-TL, sendo 30 minutos o tempo mínimo para obter uma solubilização eficiente (Fig.2B).

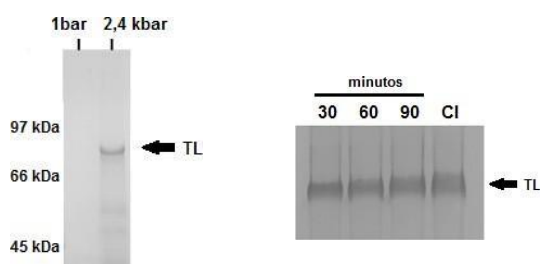


Figura 2. A: Comparação das frações solúveis de CI-TL submetidos a 1bar e 2,4 kbar. **B:** Comparação das frações solúveis de TL em 30,60 e 90 minutos e Controle (CI).

[2]

A análise dos CI-TL por MEV pode ser conferida na figura 3. CI-TL mantidos em pressão atmosférica (1bar) não apresentam grande quantidade de proteínas agregadas, no entanto CI-TL submetidos a alta pressão (2,4 kbar) tem uma ausência quase total de agregados proteicos o que demonstra a solubilização quase completa dos CI-TL pela ação da pressão.

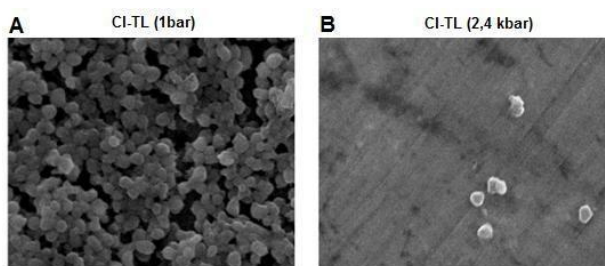


Figura 3. A. CI-TL não solubilizados (1 bar); **B.** CI-TL solubilizados após tratamento com 2,4 kbar.

CONCLUSÕES

Fomos capazes de estabelecer um processo de renaturação em alta pressão da protease de *Leptospira* TL. Verificamos que pHs alcalinos (10,0-11,0) associados à alta pressão favorecem sua solubilização. Também, verificamos que o tempo de incubação em alta pressão mostrou ser um fator relevante para a solubilização, sendo 30 minutos o tempo mínimo necessário para a solubilização dos CI-TL em alta pressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] da Silva, L. B., M. C. Menezes, et al., *Leptospira interrogans* Secreted Proteases Degrade Extracellular Matrix and Plasma Proteins From the Host., *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 92,2018.

[2] Fraga, T. R., L. Isaac, et al, *Complement Evasion by Pathogenic Leptospira.*,*Front Immunol*, 7: 623, 2016

[3] Chura-Chambi, R. M., Cordeiro, Y., Malavasi, N. V., Lemke, L. S., Rodrigues, D. and Morganti, L., *An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure*, *Process Biochemistry*, 48, 250-259, 2013.

[4] Malavasi, N. V., Foguel, D., Bonafe, C. F. S., Braga, C. A. C. A., Chura-Chambi, R. M., Vieira, J. M. and Morganti, L., *Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model*, *Process Biochemistry* 46, 512-518, 2011

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPQ e FAPESP