

PRODUÇÃO DO ANTÍGENO LIPL32 DE *Leptospira* PATOGÊNICA EM SUA FORMA RECOMBINANTE PARA USO EM IMUNODIAGNÓSTICO

BRUNO MOISÉS DE MATOS¹; FRANCINE ALVES SINNOTT²; THAÍS FARIAS COLLARES²; GIZELE LIMA DE SÁ²; LEONARDO GARCIA MONTE²; CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN³

¹ *Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico – brunomoisesdematos@gmail.com*

² *Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico – fran_sinnott@hotmail.com; collares.thais@gmail.com; gezelha@hotmail.com; leonardogmonte@gmail.com.*

³ *Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico – hartlebenclaudia@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. O ciclo de vida da *Leptospira* envolve a transmissão pela água contaminada e a colonização dos túbulos renais de seus hospedeiros. A infecção de hospedeiros casuais, incluindo humanos, pode causar sequelas fatais (PINNE et al., 2013). Em humanos os sintomas clínicos da fase inicial da doença são inespecíficos, podendo ser confundidos com outras patologias como a dengue, a malária, a febre tifóide, entre outros (BOONYOD et al., 2005). Por este motivo, o diagnóstico precoce e específico é fundamental para o tratamento da doença.

Dentre os antígenos conservados e específicos de leptospirosas patogênicas, destaca-se a proteína LipL32, sendo a mais abundante na membrana externa da bactéria (CULLEN et al., 2005). A LipL32 em sua forma recombinante (rLipL32) apresenta-se como uma potencial ferramenta de imunodiagnóstico, visto que mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos contra LipL32 durante a infecção (GUERREIRO et al., 2001). Ainda, anticorpos monoclonais e policlonais gerados contra rLipL32 mostraram-se sensíveis e específicos (FERNANDES et al., 2007) e estudos de proteção vacinal foram considerados promissores (SEIXAS et al., 2007).

A obtenção de lotes puros de rLipL32 é essencial, pois os resultados dos ensaios de diagnóstico ou imunização são dependentes da qualidade do insumo produzido. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a otimização dos processos de expressão e purificação da rLipL32, buscando maior rentabilidade e qualidade nas produções da proteína, visando sua posterior aplicação em ensaios imunológicos.

2. METODOLOGIA

Para a produção de rLipL32 foi utilizado o plasmídeo pAE/LipL32, previamente construído por SEIXAS et al. (2007). O pAE/LipL32 foi utilizado para a transformação, por choque térmico, de bactérias *Escherichia coli* cepa BL21 Star™ (DE3). O produto da transformação foi semeado em meio Luria-Bertani (LB) sólido contendo antibiótico ampicilina, como agente de seleção de clones

recombinantes. As colônias recombinantes obtidas foram então inoculadas em 25 mL de meio LB líquido (pré-inóculo) e este, após incubação *overnight* a 37 °C sob agitação a 180 rpm, foi transferido para 500 mL de meio LB líquido (inóculo). Ambos, pré-inóculo e inóculo, continham 1% de ampicilina. O inóculo foi incubado a 37° C sob agitação (180 rpm) por 4 h. Decorrido este período, ao cultivo foi adicionado 2% de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e novamente incubado, sob mesmas condições, para indução da expressão das proteínas plasmidiais. A avaliação da indução da expressão de rLipL32 foi realizada por SDS-PAGE. Para tal, foram coletadas alíquotas do inóculo de transformantes antes e após a adição de IPTG. Ao final do período de expressão, o cultivo foi centrifugado (7.000 rpm 15 min) e os resíduos sólidos acumulados (*pellet*) estocados a – 20 °C por 18 h. Após descongelamento, o *pellet* foi ressuscitado, agitado por 72 h a 4 °C e então sonicado (3 x 15 s a 60 Hz). A amostra contendo a proteína de interesse foi então centrifugada a 10.000 rpm por 1h, filtrada (0,8 μ m) e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (GE Healthcare). Para otimização do processo de purificação, as colunas de níquel utilizadas foram submetidas a um protocolo de regeneração. Resumidamente, a regeneração da coluna consiste na retirada de resíduos e carregamento utilizando sulfato de níquel (NiSO₄). Para a purificação da rLipL32 foram utilizadas diferentes concentrações de Imidazol, sendo coletadas alíquotas para análise por SDS-PAGE. A rLipL32 purificada foi então dializada em PBS (0,01 M pH 7,2), concentrada utilizando-se polietilenoglicol (PEG), analisada por SDS-PAGE e *Western blot*, utilizando anticorpo anti-histidina, e então quantificada pelo método de Bradford (1976). Para avaliar a funcionalidade da proteína, esta foi utilizada em *Western blot* e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireto utilizando um anticorpo monoclonal (mAb anti-LipL32) previamente produzido (FERNANDES et al., 2007) como anticorpo primário.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema procarioto de expressão *E. coli* tem sido amplamente utilizado para produção recombinante de diversas proteínas, visto que se trata de um sistema de fácil manipulação e características bem elucidadas. Várias cepas diferentes dessa bactéria apresentam boa aplicabilidade para a produção de proteínas recombinantes (UKKONEN et al., 2013). Neste estudo a rLipL32 foi expressa com eficiência (Figura 1, painel A) e a regeneração da coluna de níquel aumentou a quantidade de proteína recuperada. Assim, foi possível obter amostras com concentrações de mais de 1 mg/mL. O protocolo de regeneração é um método simples e rentável, otimizando o processo de purificação com Imidazol (Figura 1, painel B).

A rLipL32 produzida neste estudo foi aplicada em ELISA indireto sendo reconhecida pelo mAb anti-LipL32 confirmando a funcionalidade da proteína obtida (dados não mostrados). Ainda, a rLipL32 aqui descrita foi reconhecida por anticorpos anti-histidina e anti-LipL32 no *Western blot* (Figura 2), confirmando a natureza recombinante da proteína e a estrutura esperada da molécula, concordando com os resultados anteriormente obtidos por SEIXAS et al. (2007). A presença de uma região poliadenilada no gene da LipL32 inserido no plasmídeo pAE leva à expressão de uma cauda de aminoácidos histidina na proteína recombinante, o que permitiu tanto o processo de purificação por cromatografia de afinidade, como também a identificação da proteína através de *Western blot* utilizando um anticorpo anti-histidina como anticorpo primário.

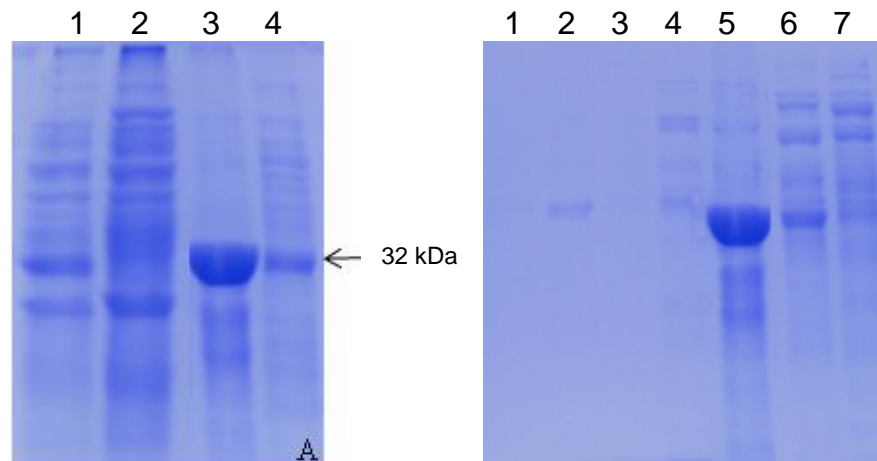


Figura 1: Avaliação da expressão e purificação de rLipL32 por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE 12%). Painel A: expressão de rLipL32. Coluna 1: *E. coli* cepa BL21 Star induzida com IPTG; Coluna 2: *E. coli* BL21 Star não induzida com IPTG; Coluna 3: rLipL32 purificada em coluna de níquel; Coluna 4: rLipL32 previamente purificada. Painel B: amostras proteicas recuperadas com diferentes concentrações de Imidazol. Coluna 1: 10mM; Coluna 2: 20mM; Coluna 3: 50mM; Coluna 4: 100mM; Coluna 5: 250mM (onde há presença da proteína desejada); Coluna 6: 500mM; Coluna 7: 1M.

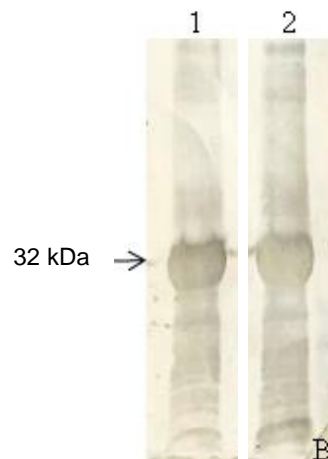


Figura 2: *Western blot* para a detecção de rLipL32. Coluna 1: detecção de rLipL32 utilizando anticorpos anti-histidina; Coluna 2: detecção de rLipL32 utilizando anticorpo monoclonal anti-LipL32.

4. CONCLUSÕES

A produção de rLipL32 no sistema procariótico *E. coli* se mostrou satisfatória bem como a funcionalidade da proteína. O protocolo de regeneração das colunas de níquel utilizadas mostrou-se diferencial quantitativamente na recuperação de proteína a cada processo de purificação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PINNE, M.; HAAKE, D. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. **PLoS One**, v.8, p.1, 2013.
- BOONYOD, D.; POOVORAWAN, Y.; BHATTARAKOSOL, P.; CHIRATHAWORN, C. LipL32, an Outer Membrane Protein of *Leptospira*, as an Antigen in a Dipstick Assay for Diagnosis of Leptospirosis. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 23, p. 133-141, 2005.
- CULLEN, P.A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D.A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4853-4863, 2005.
- GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A.I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4958-4968, 2001.
- FERNANDES, C.P.; SEIXAS, F.K.; COUTINHO, M.L.; VASCONCELLOS, F.A.; SEYFFERT, N.; CRODA, J.; MCBRIDE, A.J.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A. Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*: production, characterization, and testing in diagnostic applications. **Hybridoma**, v. 26, p. 35-41, 2007.
- CAO, X.; DAI, J.; XU, H.; NIE, S.; CHANG, X.; HU, B.; SHENG, Q.; WANG, L.; NING, Z.; LI, Y.; GUO, X.; ZHAO, G.; ZENG, R. High-coverage proteome analysis reveals the first insight of protein modification systems in the pathogenic spirochete *Leptospira interrogans*. **Cell Research**, v. 20, p. 197-210, 2010.
- SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. 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**, v.53, p. 472-479, 2007.
- BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- UKKONEN K., VEIJOLA J., VASALA A., NEUBAUER P. Effect of culture medium, host strain and oxygen transfer on recombinant Fab antibody fragment yield and leakage to medium in shaken *E. coli* cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 73-84, 2013.