

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LigAni DE *Leptospira interrogans* EM *Escherichia coli*

GIULIANA DE AVILA FERRONATO¹; MATHEUS COSTA DA ROSA²; CLÓVIS MOREIRA JÚNIOR³; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA⁴; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁵

¹ Centro de desenvolvimento tecnológico, UFPel – giulianaferronato@hotmail.com

² Centro de desenvolvimento tecnológico, UFPel – matheus.costa.rosa@gmail.com

³ Centro de desenvolvimento tecnológico, UFPel – clovismoreirajr@live.com

⁴ Centro de desenvolvimento tecnológico, UFPel – tony8.9@hotmail.com

⁵ Centro de desenvolvimento tecnológico, UFPel – odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade de caráter zoonótico e de grande importância global, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (COSTA et al., 2015). No setor agropecuário, a leptospirose causa perdas econômicas devido aos altos índices de abortos, natimortos, infertilidade e redução na produção de leite (ADLER; DE LA PENA, 2010). Tanto animais domésticos quanto de produção podem tornar-se carreadores renais da bactéria, perpetuando a patologia (LEVETT, 2001). Assim como em outras doenças, a forma mais racional e eficaz no controle da leptospirose é a imunoprevenção, através da vacinação. Com base nisso, o desenvolvimento de vacinas de uso veterinário torna-se de extrema importância.

As vacinas disponíveis comercialmente são compostas por bacterinas, porém apesar de sua eficácia, possuem algumas limitações, tais como gerar uma resposta imune por um curto período de tempo e proteção apenas para os sorovares presentes na sua composição (KOIZUMI; WATANABE, 2005). Para superar estas limitações, vacinas recombinantes têm sido desenvolvidas, com destaque para as vacinas de subunidade, que apresentam a vantagem de serem licenciadas pelos órgãos de regulamentação competentes (CLARK; CASSIDY-HANLEY, 2005) e de normalmente apresentarem pouco ou nenhum efeito colateral (KOIZUMI; WATANABE, 2005). Devido a estas características, vacinas recombinantes contra leptospirose estão sendo amplamente estudadas nos últimos anos (MONARIS et al., 2015).

A proteína Leptospiral immunoglobulin-like A (LigA) é um alvo para esse tipo de vacina, visto que está exposta na superfície de leptospires patogênicas, estando ausentes nas saprófitas (PALANIAPPAN et al., 2002). A LigA é capaz de mediar interações com proteínas que compõem a matriz extracelular das células do hospedeiro, como fibronectina, fibrinogênio, colágeno, laminina, elastina e tropoelastina (LIN et al., 2009). A LigAni é uma porção presente na proteína LigA, que tem demonstrado capacidade de promover resposta imune protetora contra leptospirose em estudos em hamsters (COUTINHO et al., 2011; HARTWIG et al., 2013), o que a torna forte candidata a antígeno vacinal. O presente trabalho teve como objetivo a otimização da expressão da proteína LigAni em *Escherichia coli*, visando maximizar o rendimento dessa através do ajuste nas condições de cultivo.

2. METODOLOGIA

Para o processo de otimização da proteína recombiante LigAni, foram avaliadas diferentes condições de cultivo sendo estas, temperatura (25, 30 e 37 °C), concentração de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mM), período de indução (1 a 16 h) e três diferentes cepas de expressão, *E. coli* BL21 (DE3) Star, *E. coli* BL21(DE3) PlysS e *E. coli* Rosetta. A proteína recombinante LigAni foi produzida conforme descrito por Hartwig et al. (2011). Brevemente, as cepas de expressão foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) [1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 2% ágar] a 37 °C com adição de 50 µg/mL de cloranfenicol para as cepas *E. coli* Rosetta e *E. coli* BL21(DE3) PlysS, transformadas por choque térmico com o plasmídeo vetor pAE contendo o gene *LigAni*, e cultivadas em placas com meio LB acrescidas de 100 µg/mL de ampicilina.

Para expressão da proteína recombiante, as cepas foram cultivadas em 50 mL de LB em erlenmeyers de 125 mL, utilizando um pré-inoculo de 1 mL. As diferentes condições de cultivo foram testadas alterando as condições padrão, que para este experimento foram: indução da expressão na fase logarítmica de crescimento (DO_{600} 0,6-0,8), concentração de IPTG de 1 mM, temperatura de cultivo de 37°C, agitação de 180 rpm, e tempo de cultivo após indução de 4 horas. A avaliação da expressão foi realizada através de um SDS-PAGE 12%, seguido de um *Western blot*, utilizando anticorpos monoclonais anti-6xHis e para quantificação o resultado do *Western blot* foi avaliado no programa TotalLab Quant. Os resultados quantitativos foram expressos como média ± erro médio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias. Comparações post hoc foram realizadas usando teste de Tukey. Os níveis de significância considerados foram de 95%. Análise de variância foi utilizada para determinar diferenças significativas entre os tratamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas diferentes temperaturas de cultivo (Figura 1. A), observa-se que em 25 °C, 30 °C e 37 °C o rendimento de proteína foi, respectivamente, de 4,5 µg/mL, 9,6 µg/mL e 513,5 µg/mL. Este resultado corrobora com o estudo feito por Larentis, et al. (2014), onde 37 °C se define como temperatura ótima para cultivo de *E. coli* durante o período de indução, e as demais temperaturas possuem menores rendimentos.

Em relação às cepas de cultivo avaliadas, a cepa *E. coli* BL21(DE3) PlysS não foi capaz de expressar a LigAni, no entanto a cepas *E. coli* BL21(DE3) Star expressou 278,8 µg/mL e a *E. coli* Rosetta, 229,7 µg/mL, ($p < 0,005$) (Figura 1B). Este resultado demonstra que apenas as duas últimas cepas podem ser utilizadas na expressão da proteína de interesse e confirma a importância da escolha adequada da cepa de expressão utilizada para obtenção de proteína, conforme descrito por García-Fraga et al. 2015, visto que certas cepas podem obter proporcionar melhores rendimentos do outras, ou até mesmo, não serem eficazes para o processo de expressão.

No que se refere ao tempo de indução, os rendimentos obtidos da proteína LigAni, foram os seguintes: 43,5 µg/mL (4 h), 46,8 µg/mL (8 h), 48,3 µg/mL (12 h) e 48,0 µg/mL (16 h) (Figura 1C). Este resultado demonstra que o tempo de indução não apresentou diferença estatística, apontando que não há necessidade de induzir o cultivo por mais do que 4 horas. Quanto às diferentes concentrações de IPTG, a 0,25 mM obteve-se um rendimento de 389,6 µg/mL, a 0,50, mM de 377,1 µg/mL, a 1,0 mM de 490,1 µg/mL e a 1,5 mM de 373,8 µg/mL (Figura 1D). Observa-se que esses resultados não apresentaram diferença estatística, o que possibilita a

utilização de menores concentrações de IPTG para indução da expressão. O IPTG é uma substância de custo elevado. Utilizá-la em menores concentrações diminui o custo do processo de expressão da proteína, e por consequência o preço do produto final.

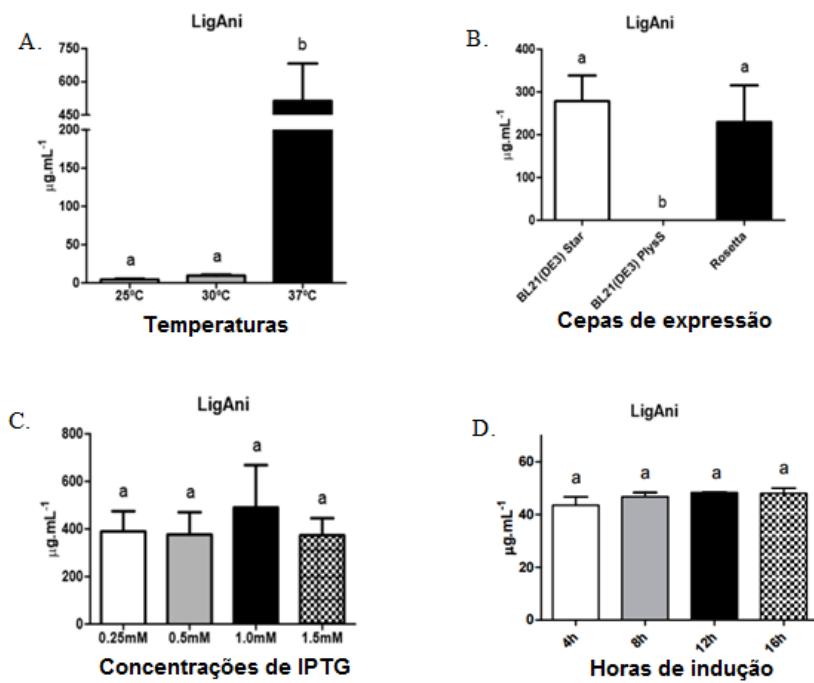


Figura 1. Variáveis do processo de otimização da proteína recombinante LigAni. A, temperaturas de cultivo; B, cepas de expressão; C, concentrações de IPTG; D, tempo de indução.

3. CONCLUSÕES

As condições ideais de cultivo para obtenção do máximo rendimento de LigAni são cepa *E. coli* BL21(DE3) Star ou *E. coli* Rosetta, com 0,25 mM de IPTG, cultivada à 37°C, e com tempo de indução de 4h. O estudo demonstrou a importância de otimizar o processo de expressão de proteínas recombinantes. Com isso, pode-se maximizar o rendimento das proteínas, minimizando o tempo e o custos do processo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; DE LA PENA, M. A. Leptospira and leptospirosis. *Vet.Microbiol.*, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.
- CLARK, T. G.; CASSIDY-HANLEY, D. Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints. *Dev.Biol.(Basel)*, v.121, p.153-163, 2005.
- COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 9(9), 2015.

COUTINHO, M. L.; CHOY, H. A.; KELLEY M. M.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J.T.; LEWIS, M. S.; ALEIXO, J. A.; HAAKE, D. A.; A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n.12, 2011.

FRAGA-GARCÍA, B.; da SILVA, A. F.; LÓPEZ-SEIJAS, J.; SIEIRO, C. Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, n. 12, p.2477-86, 2015.

HARTWIG, D. D.; BACELO, K. L.; de OLIVEIRA, P. D.; OLIVEIRA, T. L.; SIXAS, F. K.; AMARAL, M. G.; HARTLEBEN, C. P.; McBRIDE, A. J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Mannosylated LigANI produced in *Pichia pastoris* protects hamsters against leptospirosis. **Curr Microbiol**, n. 68, p. 524–530, 2013.

HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J.; DELLAGOSTIN, O. A. Characterization of the Immunogenic and Antigenic Potential of Putative Lipoproteins from *Leptospira interrogans*. **Curr.Microbiol.**, 2011

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **J.Postgrad.Med.**, v.51, n.3, p.210-214, 2005.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin.Microbiol.Rev.**, v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LARENTIS, A. L.; NICOLAU, J. F. M. Q.; ESTEVES, G. S.; VARESCHINI, D. T.; de ALMEIDA, F. V. R.; dos REIS, M. G.; MEDEIROS, M. A. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. Coli* using shaking flasks and microbioreactor. **BMC Research Notes**, v. 7, n . 671, 2014.

LIN, Y. P.; LEE, D. W.; McDONOUGH, S. P.; NICHOLSON, L. K.; SHARMA, Y.; CHANG, Y. F. Repeated domains of *leptospira immunoglobulin-like* proteins Interact with elastin and tropoelastin. **J.Biol.Chem.**, v. 284, no. 29, p. 19380-19391, 2009.

MONARIS, D; SBROGIO-ALMEIDA, M. E; DIB, C. C; CANHAMERO, T. A; SOUZA, G. O; VASCONCELLOS, S. A; FERREIRA, L. C. S; ABREUA, P. A. E. Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant *Leptospira interrogans* Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant. **Clin.Vaccine Immunol.** v. 22, n. 8, p. 965-973, 2015.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; JUSUF, S. S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; McDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSON, K. W.; McDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infect.Immun**, v.70, n.11, p.5924-5930, 2002.