

EXPRESSÃO DA PORÇÃO C-TERMINAL DA CADEIA PESADA DA NEUROTOXINA BOTULÍNICA RECOMBINANTE EM CULTIVO DE ALTA DENSIDADE CELULAR DE *Escherichia coli*

IGOR POLETTI¹; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA²; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA³; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁴

¹*Laboratório de Imunologia Aplicada; Centro de Desenvolvimento Tecnológico; Universidade Federal de Pelotas – igor.poletti@hotmail.com.br*

²*Laboratório de Imunologia Aplicada; Centro de Desenvolvimento Tecnológico; Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com*

³*Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos; Centro de Desenvolvimento Tecnológico; Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br*

⁴*Laboratório de Imunologia Aplicada; Centro de Desenvolvimento Tecnológico; Universidade Federal de Pelotas – fabrício.rochedo@ufpel.edu.br*

1. INTRODUÇÃO

Clostridium botulinum é uma bactéria patogênica, Gram-positiva, em forma de bastonetes e formadora de endósporos. Produtor de neurotoxinas botulínicas (BoNTs), é encontrada no solo, águas e pode estar presente em alimentos. Sua capacidade formadora de endósporos lhe assegura sobrevivência em situações adversas (WENTZ et al., 2018). As BoNTs, de acordo com YARI et al. (2012), sintetizada pela família dos sete toxinotipos (A-G), são responsáveis por intoxicação alimentar, ocasionando uma doença neuroparalítica conhecida como botulismo.

A utilização de proteínas recombinantes como antígenos vacinais contra as toxinas botulínicas tem sido demonstrada como método profilático eficaz (CUNHA et al., 2013; GIL et al., 2013; MOREIRA JR. et al., 2016). Para a produção de proteínas recombinantes, a *Escherichia coli* é um sistema eficaz, de genoma bem caracterizado, com capacidade de crescimento rápido, altos níveis de expressão e comumente utilizada como sistema hospedeiro ideal. A técnica de alta densidade celular (HCDC) oferece várias vantagens, como a redução do volume de cultura, dos efluentes da fermentação e do investimento em equipamentos, além de menores custos de produção. A fermentação em batelada aparece como um método eficaz na produção em maiores escalas, tendo como vantagem a manipulação da taxa de crescimento, mantendo-a constante ou variável (YARI et al., 2012).

Estudos anteriores do grupo de pesquisa mostraram a eficácia das proteínas recombinantes produzidas em agitador orbital. Portanto, o objetivo do presente estudo foi comparar a expressão da BoNT/D em cultivos em agitador orbital e em alta densidade celular em biorreator de bancada.

2. METODOLOGIA

A sequência codificadora (CDS) da BoNT D foi sintetizada e clonada em vetor pET28a (Epoch, Life Science) (MOREIRA JR. et al., 2016), e posteriormente expresso em *Escherichia coli* BL21 (DE3)TM, sendo transformadas através de choque térmico, inoculada em 10 mL de caldo LB suplementado com 100 µg/mL de canamicina e incubadas a 37 °C por 16 h em agitador orbital. Como preparação ao processo fermentativo, as células transformadas foram estriadas em ágar LB (16 h a 37 °C) e 10 clones foram selecionados para avaliação da

expressão. Resumidamente, uma colônia foi repicada em 10 mL de caldo LB suplementado com 100 µg/mL de canamicina (16 h, 37 °C a 180 rpm). Um mL desse cultivo foi utilizado para inocular 10 mL de caldo LB suplementado com o respectivo antibiótico e cultivado nas condições supracitadas até $DO_{600nm} = 0,6 - 0,8$, no qual, foi induzida a expressão da proteína recombinante utilizando IPTG, por 3 h. A análise da expressão dos clones recombinantes foi avaliada através de SDS-PAGE 12% e WB utilizando anticorpo monoclonal (mAb) anti-His6x. O melhor clone foi selecionado, as sementes preparadas ($DO_{600nm} = 2$) e estocadas a -70 °C em 1% (g/v) peptona e 30% (v/v) de glicerol.

Para cultivo em agitador orbital procedeu-se a expressão em 450 mL de LB contendo canamicina, incubado nas mesmas condições supracitadas e a expressão de proteína foi induzida com 1 mM de por 3 h.

Para cultivo em biorretor, o pré-inóculo foi preparado em 6 Erlenmeyer contendo 20 mL de meio M9 (15 g/L de glicose, 4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 30 g/L de K_2HPO_4 , 15 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de ácido cítrico, 0,5 g/L de NaCl e 1,5 mL/L de solução de elementos traços), e foram inoculados com as sementes (cultivadas 16 h, 37 °C a 180 rpm), posteriormente, centrifugado e ressuspensido em 50 mL.

O inóculo foi preparado em biorretor de bancada utilizando cuba com volume útil de 2 L contendo 450 mL de meio M9 e inoculado com 50 mL de pré-inóculo. As condições de fermentação foram 37 °C, 1 vvm e agitação controlada com oxigênio dissolvido a 40% de saturação. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 0 e 12 h (consumo total de glicose).

A batelada alimentada foi realizada utilizando cuba com volume útil de 4 L contendo 1,8 L de meio M9 o qual foi inoculado com 200 mL do cultivo anterior, sob as mesmas condições supracitadas. Após o consumo total da glicose (12 h), foi iniciada a alimentação exponencial com solução de glicose (500 g/L), até $DO_{600nm} = 100$, quando a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,5 mM IPTG por 3 h. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 12 h (início da batelada alimentada), 18 h (6 h após início da batelada alimentada) e 21 h (3 h após início da indução).

As alíquotas foram analisadas quanto a concentração de glicose, crescimento microbiano (UFC/mL) e análise da expressão por SDS-PAGE 12% e WB.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fermentação, a DO_{600nm} inicial do inóculo foi de 1,0 atingindo após 12 h de cultivo $DO_{600nm} = 20$, no momento da inoculação da batelada alimentada a $DO_{600nm} = 2$, até atingir a DO_{600nm} final de 100, em 21 h (Tabela 1). As concentrações de células viáveis ao longo do cultivo estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 1 - DO_{600nm} em relação ao tempo de cultivo.

TEMPO (h)	0	12	0	12	18	21
DO_{600nm}	1	20	1	20	100	100

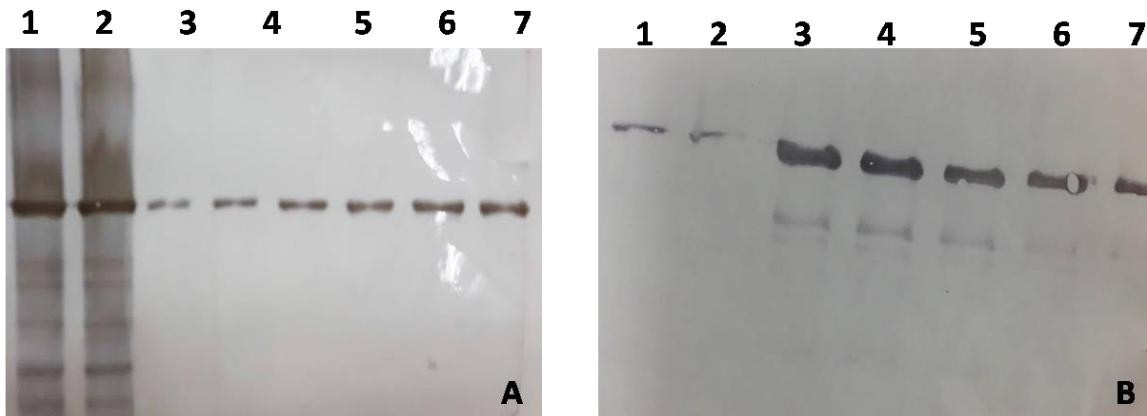
Tabela 2 – Concentração de células viáveis e estabilidade do vetor pET28a ao longo do cultivo (UFC/mL)

	TEMPO (h)	Estabilidade	UFC/mL
Agitador orbital	Pós-indução	SP ¹	2×10^7
		CP ²	4×10^7
Inóculo	0	SP	3×10^8
		CP	12×10^8
	12	SP	3×10^9
		CP	9×10^9
Fermentação	0	SP	$0,9 \times 10^9$
		CP	$1,3 \times 10^9$
	12	SP	$0,4 \times 10^9$
		CP	$1,7 \times 10^9$
Expressão	21	SP	$1,4 \times 10^{10}$
		CP	$1,1 \times 10^{10}$

¹SP – Células sem plasmídeo; ²CP – Células com plasmídeo

Neste experimento a estratégia de alimentação com solução de glicose foi utilizada para obter uma alta biomassa e, portanto, uma alta concentração de BoNTD recombinante após indução com IPTG. Como a maioria das proteínas é acumulada intracelularmente em *E. coli*, a produtividade da proteína recombinante é proporcional à densidade celular final e a alta biomassa pode ser alcançada pelo método HCDC. A avaliação realizada através da técnica de WB indicou a expressão da proteína recombinante de interesse, com uma massa molecular de 50 kDa (Figura 1).

Figura 1. *Western blotting* quantificação da (A) e em biorreator de bancada (B).



A - Expressão de rBoNT/D em agitador orbital; 1 - 5 µL do extrato de *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET28abontD após 3 h de expressão; 2 - 10 µL do extrato de *E. coli* BL21 (DE3)/pET28abontD após 3 h de expressão; 3 - 400 ng rBoNTD purificada; 4 - 800 ng rBoNTD; 5 - 1200 ng rBoNTD; 6 - 1600 ng rBoNTD; 7 - 2000 ng rBoNTD; 8 - 2400 ng rBontD.

B - Expressão de rBoNT/D em biorreator de bancada. 1 - 10 µL do extrato de *E. coli* BL21 (DE3)/pET28abontD após 3 h de expressão; 2 - 10 µL do extrato de *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET28abontD não induzido; 3 - 4000 ng rBoNTD purificada; 4 - 3200 ng rBoNTD; 5 - 2400 ng rBoNTD; 6 - 1600 ng rBoNTD; 7 - 800 ng rBoNTD.

Na batelada alimentada, a concentração de rBoNT/D foi de 20 µg/mL, após 3 h de indução com 0,5 mM de IPTG, enquanto que, em agitador orbital o rendimento foi

de aproximadamente 100 µg de rBoNTD/mL de cultivo com a mesma concentração de indutor. De acordo com os dados do artigo e com o nosso experimento, acreditamos que a concentração de rBoNT/D tenha sido menor em biorreator devido ao tempo de indução, que, talvez, precise ser maior ou o IPTG em maior concentração. Maiores estudos deverão ser realizados, a fim de refinar a técnica e chegar ao resultado desejado.

4. CONCLUSÕES

Concluímos que, este experimento apresenta um importante relato da expressão da neurotoxina botulínica D em *E. coli* recombinante através da técnica em evidencia. Os resultados são aplicáveis e extremamente uteis na expressão de BoNTs recombinantes em biorreator de bancada, como uma vacina mais eficaz e segura contra o botulismo, sendo mais atrativa e comercialmente mais rentável, visando a produção mais simples. Este estudo também pode evidenciar e fornecer condições adequadas para a produção de outras proteínas recombinantes em biorreator.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GIL, L. A. F. et al. Production and Evaluation of a Recombinant Chimeric Vaccine against *Clostridium botulinum* Neurotoxin Types C and D. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

MOREIRA-Jr, C. et al. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. **Anaerobe** v. 40, p. 58-62, 2016.

WENTZ, T. G. et al. Closed Genome Sequence of *Clostridium botulinum* Strain CFSAN064329 (62A). **American Society for Microbiology**, v. 6, n. 26, p. 1-2, 2018.

YARI, K.; FATEMI, S. S-A.; TAVALLAEI, M. High level expression of recombinant BoNT/A-Hc by high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Bioprocess Biosyst Eng**, n. 35, p. 407-414, 2012.

MOREIRA JR, C.; CUNHA, C. E. P. ; MOREIRA, G. M. S. ; MENDONCA, M. ; CONCEICAO, F. R. . Expressão do fragmento C-terminal da cadeia pesada das neurotoxinas botulínicas sorotipos C e D em *E. coli*. In: **XXVII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2013, Natal. Resumos XXVII CBM, 2013.