

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA OMPL76 DE *Leptospira* spp. EM DIFERENTES CEPAS DE *Escherichia coli*

BEATRIZ CAMPOS DA MOTTA SANTOS¹; GABRIEL SAN MARTINS KUNDE²,
ANAEL DA LUZ MOREIRA³, NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA⁴, MARA
ANDRADE COLARES MAIA⁵; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – bcdms2009@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – sanmartinskundegabriel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – anaeldaluz@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – maraacmaia@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – odirad@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa negligenciada, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp., que afeta tanto humanos quanto animais (HAAKE; LEVETT, 2015). A transmissão para humanos ocorre principalmente pelo contato direto com a urina de animais infectados, especialmente roedores, ou de forma indireta, por meio de água ou solo contaminados (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Diferentes fatores, como regiões de clima tropical, ocorrência de enchentes e instalações sanitárias precárias, aumentam os índices de ocorrência da doença.

Devido à sua relação com a disponibilidade de saneamento básico, a doença gera grandes impactos na saúde pública em países em desenvolvimento (MCBRIDE et al., 2005). Além da necessidade de combater essa problemática social, a prevenção através da vacinação se apresenta como uma importante alternativa profilática para controlar a leptospirose. Atualmente, as vacinas comerciais são compostas por células inteiras inativadas (bacterinas) e, devido a limitações associadas à sua administração, são utilizadas prioritariamente para imunização veterinária (TEIXEIRA et al., 2019).

A vacinação em humanos com essas formulações ocorre apenas em alguns países, muitas vezes restrita a populações de alto risco, e apresenta limitações por induzir proteção apenas contra sorovares específicos, além de estimular uma imunidade de curto prazo (MCBRIDE et al., 2005; DELLAGOSTIN et al., 2011). Com o objetivo de superar essas limitações, surge a necessidade de desenvolver novas estratégias para uma melhor imunoprevenção dessa doença.

Nesse contexto, o estudo e desenvolvimento de vacinas recombinantes tornou-se um foco importante de pesquisa, devido à falta de outras medidas de controle eficazes (GRASSMANN et al., 2017). Recentemente, proteínas de membrana externa (OMPs) foram identificadas como antígenos vacinais promissores em *Leptospira*, pois são mais acessíveis ao sistema imunológico e representam alvos potenciais para a ativação de uma resposta imune protetora (HAAKE; ZÜCKERT, 2015; GRASSMANN et al., 2017).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão da proteína recombinante OMPL76 em um sistema de expressão heterólogo de *Escherichia coli*, utilizando três diferentes cepas: BL21 Star (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3). Essa proteína pertence à família de TBDRs (receptores dependentes de TonB), proteínas de membrana externa que promovem a absorção de nutrientes importantes. O ferro, por exemplo, é um nutriente essencial para o crescimento de *Leptospira* spp. in vitro,

e é internalizado através de sistemas de transporte que envolvem as TBDRs (NOINAJ et al., 2010). Dessa forma, a caracterização do melhor sistema de expressão dessa proteína permitirá sua produção em boa qualidade e rendimento, para posterior uso como antígeno vacinal contra a leptospirose.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão heteróloga: O gene codificante para a proteína OMPL76 foi previamente clonado no vetor pAE pelo nosso grupo de pesquisa. O plasmídeo pAE/ompL76 foi utilizado para a transformação de três diferentes cepas de *E. coli* através do protocolo de choque térmico. Posteriormente, as cepas foram cultivadas em pré-inóculo contendo 10 mL de caldo Luria-Bertani (LB) com acréscimo de ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e glicose 1 mM, mantidas a 37 °C, 180 RPM, overnight. Após esse período, os pré-inóculos foram transferidos para erlenmeyers contendo 25 mL de meio LB com ampicilina e glicose, sendo incubados nas mesmas condições anteriormente citadas. Ao atingir a fase logarítmica de crescimento ($\text{DO}_{600\text{nm}}$: 0,6-0,8), a expressão da proteína foi induzida com a adição de 0,5 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As culturas foram mantidas em incubação a 28 °C, 180 RPM, overnight. Alíquotas das culturas foram coletadas antes e depois da indução. Após o período de indução, as alíquotas foram centrifugadas a $14.000 \times g$ por 2 min, os sobrenadantes foram descartados, e os pellets reconstituídos em 200 μL de tampão fosfato-salino (PBS) 1x.

2.2 Análise da expressão por SDS-PAGE e Dot-blot: Para a análise da expressão da proteína nas diferentes cepas de *E. coli*, foi realizada uma eletroforese em gel de poliácridamida a 12%, utilizando amostras dos períodos pré e pós-indução. Em paralelo, foi realizado também um ensaio de Dot-Blot utilizando um anticorpo monoclonal anti-histidina conjugado com peroxidase, com o objetivo de caracterizar a proteína recombinante OMPL76 nas amostras analisadas. A revelação foi realizada com 6 mg de DAB e 0,5% de peróxido de hidrogênio diluídos em tampão Tris-HCl 50 mM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese em gel de poliácridamida mostrou que a expressão da proteína rOMPL76 foi obtida nas amostras pós-indução apenas nas cepas de *E. coli* C43 e C41, apresentando o tamanho esperado de 63,5 kDa. Na cepa de *E. coli* Star, não foi identificada nenhuma banda correspondente à proteína de interesse (Fig. 1).

Já a caracterização da expressão por Dot-Blot utilizando o anticorpo anti-histidina, corroborou parcialmente com os resultados obtidos na técnica de SDS-PAGE. A revelação mostra que a proteína rOMPL76 foi expressa de forma mais marcante na cepa de *E. coli* C43 (Fig. 2).

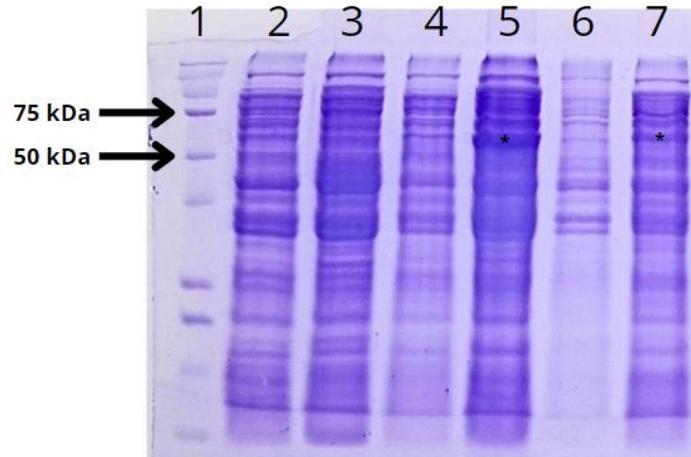


Figura 1. Confirmação da expressão da proteína rOMPL76 através de SDS-PAGE 12%. 1. Marcador de peso molecular; 2. *E. coli* Star transformada com vetor pAE/*ompL76* pré-indução; 3. *E. coli* Star transformada com vetor pAE/*ompL76* pós-indução; 4. *E. coli* C43 transformada com vetor pAE/*ompL76* pré-indução; 5. *E. coli* C43 transformada com vetor pAE/*ompL76* pós-indução; 6. *E. coli* C41 transformada com vetor pAE/*ompL76* pré-indução; 7. *E. coli* C41 transformada com vetor pAE/*ompL76* pós-indução.

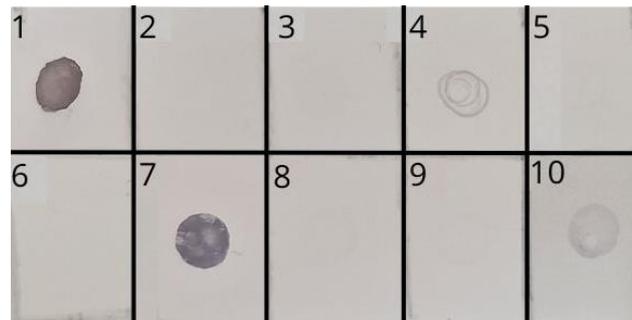


Figura 2. Confirmação da expressão da proteína rOMPL76 através de Dot-Blot. 1 rLigBrep (controle positivo); 2. *E. coli* Star (controle negativo) 3. *E. coli* Star transformada com vetor pAE/*ompL76* pré-indução; 4. *E. coli* Star transformada com vetor pAE/*ompL76* pós-indução; 5. *E. coli* C43 (controle negativo); 6. *E. coli* C43 transformada com vetor pAE/*ompL76* pré-indução; 7. *E. coli* C43 transformada com vetor pAE/*ompL76* pós-indução; 8. *E. coli* C41 (controle negativo); 9. *E. coli* C41 transformada com vetor pAE/*ompL76* pré-indução; 10. *E. coli* C41 transformada com vetor pAE/*ompL76* pós-indução.

Com base nos testes de expressão realizados, foi possível observar uma diferença na sensibilidade dos resultados obtidos. A análise por SDS-PAGE 12% permite identificar a expressão de diversas proteínas, destacando as recombinantes de forma mais visível quando expressas em alta quantidade. Por outro lado, o teste de Dot-Blot demonstra maior sensibilidade, pois utiliza um anticorpo conjugado específico para detectar a presença da proteína recombinante, que reage mesmo em baixos níveis de expressão.

Além disso, foi possível observar diferentes níveis de expressão da proteína recombinante entre as cepas de *E. coli* utilizadas. Isso se deve às diferenças em suas características, sendo que as cepas C41 (DE3) e C43 (DE3) são mais eficazes para expressar proteínas tóxicas e de membrana. Tais resultados estão em concordância com estudos anteriores, que demonstram que essas cepas são superiores para transformação e expressão de algumas proteínas em comparação à BL21 Star (DE3) (DUMON-SEIGNOVERT et al., 2004; INDA, 2015).

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, conclui-se que a expressão da proteína recombinante OMPL76 foi mais satisfatória na cepa de *E. coli* C43. Esse sistema de expressão será utilizado posteriormente para a obtenção da proteína em maior escala e sua purificação por cromatografia de afinidade. A proteína obtida será então utilizada como antígeno em formulações vacinais recombinantes contra a leptospirose, com o objetivo de avaliar seu potencial imunoprotetor em modelo experimental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HAAKE, A.; LEVETT, P. Leptospirosis in humans. *Leptospira and leptospirosis*, p. 65-97, 2015.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, p. 287–296, 2010.

DE OLIVEIRA, N. R. et al. Challenges and Strategies for Developing Recombinant Vaccines against Leptospirosis: Role of Expression Platforms and Adjuvants in Achieving Protective Efficacy. **Pathogens**, v. 12, n. 6, p. 787, 31 maio 2023.

TEIXEIRA, A. F. et al. Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. **Vaccine**, v. 37, n. 30, p. 3961–3973, jul. 2019.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–1224, 27 nov. 2011.

GRASSMANN, A. A. et al. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 27 abr. 2017.

HAAKE, D. A.; ZÜCKERT, W. R. The Leptospiral Outer Membrane. In: [s.l.: s.n.]. p. 187–221.

MCBRIDE, A. J. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376–386, out. 2005.

NOINAJ, N. et al. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 43–60, 13 out. 2010.

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: A comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 37, n. 1, p. 203–206, 2004.

INDA, Guilherme Roig Pureza. **Avaliação da estabilidade em *Escherichia coli* de plasmídeos contendo genes que codificam para seis diferentes proteínas de *Leptospira interrogans*** 2015. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015