

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE COMPOSTA POR PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Leptospira interrogans* PARA A FORMULAÇÃO DE VACINAS CONTRA LEPTOSPIROSE

RAFAEL CARRACENA DE SOUZA TAPAJÓZ¹; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS²; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA³; MARA ANDRADE COLARES MAIA⁴; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA⁵; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁶

¹Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – rafaeltapajoz@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – denis.santos195@gmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

⁴Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – maraacmaia@hotmail.com

⁵Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

⁶Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odirad@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose provocada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (GUPTA; MAHMOOD; ADEOLU, 2013), grupo de bactérias helicoidais (THIBEAUX et al., 2018). Têm uma distribuição geográfica significativa, apontando uma prevalência em especial nos países tropicais e subtropicais (CASTRO et al., 2008). Para a prevenção da enfermidade, contenção do risco de infecção e consequentemente das perdas sociais e econômicas, é de grande importância o controle e a prevenção da doença (CASTRO et al., 2008) e, no campo veterinário, isto se fundamenta na vacinação sistemática do rebanho (CASTRO et al., 2008).

As vacinas constituem o método de intervenção para prevenção de doenças infecciosas com a relação custo-benefício mais profícua já utilizada em saúde pública e a medida profilática mais indicada contra a leptospirose (McBRIDE et al., 2005). As vacinas à serviço no mercado contra a leptospirose, bacterinas, são suspensões celulares mono ou polivalentes (VERMA; KHANNA; CHAWLA, 2013) de células inteiras inativadas quimicamente ou por calor, que acarretam em uma resposta imune principalmente contra o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular da bactéria (ADLER, 2014). As vacinas de subunidades proteicas fundamentadas em antígenos recombinantes reproduzem um método atrativo para solucionar as restrições das vacinas tradicionais, demonstrando mais proteção e com a capacidade de uma indução de proteção cruzada prolongada (DELLAGOSTIN et al., 2011; 2017).

As proteínas LIC12287, LIC11711 e LIC13259 pertencem ao grupo de lipoproteínas que se localizam na extremidade da membrana da célula de *Leptospira interrogans*, indicando seu potencial para contribuição nos processos de invasão e evasão imune no hospedeiro, apresentando deste modo a possibilidade de papel na virulência (CAVENAGUE et al., 2019; FIGUEREDO et al., 2017; KOCHI et al., 2019).

Desta forma, é preciso buscar estratégias para a elaboração de formulações vacinais contra a leptospirose e que induzam uma proteção com maior eficiência e a longo prazo (CONRAD et al., 2017; DELLAGOSTIN et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2020). Com isto, o objetivo deste estudo foi o de expressar e purificar uma quimera composta pelas proteínas LIC12287, LIC11711 e LIC13259 (QLIC), assim como quantificar e caracterizar a quimera recombinante por *Western blot*.

2. METODOLOGIA

A expressão da proteína foi realizada conforme previamente descrito por CUNHA et al. (2019). O vetor pET28a foi utilizado para transformar *Escherichia coli* BL21 (DE3) STAR através de transformação bacteriana por choque térmico com cloreto de cálcio (CaCl_2). As células transformadas com o vetor pET28a/quimera foram cultivadas em 20 mL de meio Luria-Bertani (LB) caldo suplementado com canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e glicose 1 M em *Erlenmeyer* de 100 mL por 16-18 h (37° C; 180 rpm). A cultura *overnight* foi inoculada em 500 mL de meio LB caldo suplementado com canamicina e glicose 1 M em *Erlenmeyer* de 2 L e incubada sobre as mesmas condições até que atingisse a densidade óptica de 0.6-0.8 a 600 nanômetros (DO600 nm), quando foi induzida com 0.5 mM de Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) e novamente incubada sobre as mesmas condições, desta vez por 3 h. Após este período a cultura foi centrifugada (*pellet* sobre *pellet*) em tubos tipo *Falcon* de 50 mL com 40 mL da cultura, a 7000 $\times g$ e 4° C por 10 min. As culturas foram lavadas uma vez em 40 mL de solução salina estéril (pH 7,4) (PBS), através de centrifugações a 7000 $\times g$ e 4° C por 10 min, e por fim foram suspensas novamente em 40 mL de PBS.

Após a expressão da quimera recombinante, a proteína foi submetida ao teste de solubilidade. Nesta avaliação as culturas foram submetidas a sonicação com 7 pulsos de 30 segundos com intervalos de 45 segundos, com os tubos incubados no gelo, e foram centrifugadas a 10000 $\times g$ e 4° C por 40 min. Desta forma, os sobrenadantes (fração solúvel) foram transferidos para novo tubo tipo *Falcon* e os *pellets* foram suspensos em PBS. Estas alíquotas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% para verificar se a proteína estava sendo expressa na forma solúvel ou insolúvel, ou seja, se a proteína estivesse presente no *pellet*, seria considerada insolúvel e se estivesse presente no sobrenadante, solúvel. O gel de SDS-PAGE foi corado com solução de Azul de Coomassie. Desta forma, os sobrenadantes (fração solúvel) do extrato lisado por sonicação foram descartados e os *pellets* deste extrato foram suspensos em 40 mL de Wash Buffer 8M com ureia (fração insolúvel), sendo incubados em rolamento suave por 16-18 h, em temperatura ambiente.

Os tubos tipo *Falcon* com a proteína expressa foram centrifugados novamente a 10000 $\times g$ e 4° C por 40 min, os *pellets* foram descartados e os sobrenadantes filtrados em filtros de membrana MF-Millipore™, com tamanho de poro de 0,8 μm , antes da purificação. A purificação da proteína foi realizada conforme previamente descrito por CUNHA et al. (2019), utilizando cromatografia de afinidade ao níquel (Ni^{2+}) em coluna de sepharose através do sistema de cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTA™ Start.

Por conta da utilização de ureia no tampão dos processos de purificação, a proteína foi submetida a diálise da ureia em membranas de diálise imersas em tampão PBS com Triton X-100 e ureia 6 M, com trocas por tampão PBS com Triton X-100 sem ureia com intervalos de 1 h entre as trocas, até que fosse atingida a molaridade de 3 M. Por fim, a proteína foi concentrada através de centrifugações em filtro centrífuga Amicon® Ultra-15 30,000 MWCO. A pureza e concentração da proteína foi determinada através de SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie, *Western blot* e quantificação pelo Kit Pierce™ BCA Protein Assay.

Alíquotas dos processos de expressão e purificação da QLIC foram submetidas a SDS-PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A QLIC teve sua caracterização avaliada por *Western blot* usando anticorpo anti-poli histidi-

na conjugado com peroxidase (diluição 1:5000). As reações foram reveladas com 3,3' diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a expressão da quimera recombinante, a proteína foi submetida ao teste de solubilidade. SDS-PAGE 12% resultou em uma banda da proteína próxima ao seu peso molecular de 47,38 kDa, como pode ser observado na Figura 1, também se observou sua presença no *pellet* celular, onde se encontram proteínas hidrofóbicas. Portanto, adotou-se o protocolo de purificação para proteínas insolúveis, que utiliza ureia para auxiliar no rompimento das células e solubilização das proteínas expressas na forma de corpúsculos de inclusão.

A purificação da proteína foi eficiente e a mesma teve sua concentração e identidade determinadas através de SDS-PAGE (Figura 1A), *Western blot* usando anticorpo anti-poli histidina conjugado com peroxidase (Figura 1B) e quantificação, resultando em 1,955 mg/mL.

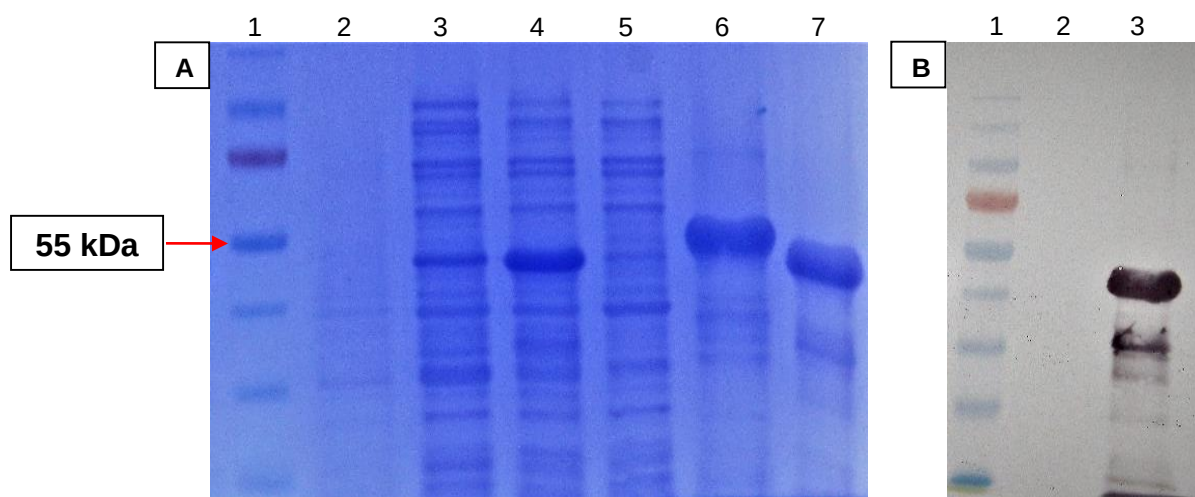


Figura 1. Caracterização dos processos de expressão e purificação da QLIC. (A) Análise em SDS-PAGE 12%. 1, Marcador de Peso Molecular; 2, Controle negativo (*E. coli* STAR); 3, QLIC pré-indução; 4, QLIC pós-indução; 5, QLIC fração solúvel; 6, QLIC fração insolúvel; 7, QLIC purificada. (B) Análise em *Western blot*. As diferentes alíquotas foram carregadas em SDS-PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, homogeneizada com anticorpo anti-poli histidina conjugado com peroxidase. 1, Marcador de Peso Molecular; 2, Controle negativo (*E. coli* STAR); 3, QLIC purificada.

4. CONCLUSÕES

Considerando a eficácia da expressão e purificação da QLIC composta pelas proteínas de membrana externa de *L. interrogans* LIC12287, LIC11711 e LIC13259, será avaliado o potencial imunoprotetor e esterilizante de formulações vacinais em hamsters, buscando estratégias contra a leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Germany: Springer, 2014. 2015. ed.

CASTRO, V. et al. Soroprevalência da Leptospirose em Fêmeas Bovinas em Idade Reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 3-11, Mar., 2008.

CAVENAGUE, M. F. et al. Characterization of a Novel Protein of *Leptospira interrogans* Exhibitin Plasminogen, Vitronectin and Complement Binding Properties. **International Journal of Medical Microbiology**, São Paulo, v. 309, n. 2, p. 116-129, Mar., 2019.

CONRAD, N. L. et al. LigB Subunit Vaccine Confers Sterile Immunity Against Challenge in the Hamster Model of Leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. e0003898, Mar., 2017.

CUNHA, C. E. P. et al. Evaluation of Different Strategies to Promote a Protective Immune Response Against Leptospirosis Using a Recombinant LigA and LigB Chimera. **Vaccine**, Pelotas, v. 37, n. 13, p. 1844-1852, Mar., 2019.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. **International Journal of Molecular Science**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 1-16, Jan., 2017.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant Vaccines Against Leptospirosis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Pelotas, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, Nov., 2011.

FIGUEREDO, J. M. et al. Characterization of Two New Putative Adhesins of *Leptospira interrogans*. **Microbiology**, São Paulo, v. 163, n. 1, p. 37-51, Jan., 2017.

GUPTA, R. S.; MAHMOOD, S.; ADEOLU, M. A Phylogenomic and Molecular Signature Based Approach for Characterization of the Phylum Spirochaetes and its Major Clades: Proposal for a Taxonomic Revision of the Phylum. **Frontiers in Microbiology**, Canada, v. 4, n. 217, p. 1-18, Jul., 2013.

KOCHI, L. T. et al. The Interaction of Two Novel Putative Proteins of *Leptospira interrogans* with E-cadherin, Plasminogen and Complement Components with Potential Role in Bacterial Infection. **Virulence**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 734-753, Dec., 2019.

McBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Salvador, v. 18, n. 5, p. 376-386, Oct., 2005.

TEIXEIRA, A. F. et al. Immunoprotective Activity Induced by Leptospiral Outer Membrane Proteins in Hamster Model of Acute Leptospirosis. **Frontiers in Immunology**, São Paulo, v. 11, n. 568694, p. 1-11, Oct., 2020.

THIBEAUX, R. et al. Deciphering the Unexplored *Leptospira* Diversity from Soils Uncovers Genomic Evolution to Virulence. **Microbial Genomics**, France, v. 4, n. 1, p. e000144, Jan., 2018.

VERMA, R.; KHANNA, P.; CHAWLA, S. Whole-Cell Inactivated Leptospirosis Vaccine: Future Prospects. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, India, v. 9, n. 4, p. 763-765, Jan., 2013.