



PRODUÇÃO DA PROTEÍNA InIA DE *Listeria monocytogenes* EM *Escherichia coli* VISANDO A OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

MENDONÇA, Marcelo^{1,2}; CONRAD, Neida Lucia¹; FRANÇA, Rodrigo Correa²; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo¹; MOREIRA, Ângela Nunes^{1,3}; SILVA, Wladimir Padilha da²; ALEIXO, José Antonio Guimarães^{1,3}.

¹Centro de Biotecnologia – UFPel; ²Lab. Microbiologia de Alimentos, DCTA/FAEM – UFPel;

³Faculdade de Nutrição – UFPel

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, marcelomend@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O patógeno alimentar *Listeria monocytogenes* é um microrganismo ubíquo, intracelular facultativo e o agente causador da listeriose, uma doença severa que cursa com baixas taxas de morbidade, mas com altas taxas de mortalidade (WHO/FAO, 2004). Os métodos convencionais empregados para detecção desta bactéria são laboriosos e onerosos, requerendo vários dias para sua identificação final (GASANOV *et al.*, 2005).

Imunoensaios usados para detecção rápida desta bactéria que utilizem anticorpos monoclonais (MAbs) têm como vantagem a alta especificidade, especialmente quando os MAbs são dirigidos contra fatores de virulência conservados nas cepas patogênicas. Entre os diversos fatores de virulência de *L. monocytogenes*, a proteína de membrana internalina A (InIA) é um dos mais bem caracterizados (BIERNE *et al.*, 2007). Esta proteína está covalentemente ancorada na parede celular da bactéria e é necessária para a aderência e internalização em células não fagocíticas do hospedeiro (SCHUBERT *et al.*, 2002). O presente trabalho relata a produção de duas versões recombinantes da proteína InIA (rInIA), visando a obtenção de MAbs para utilização em métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

A seqüência do gene *inIA*, obtida do GenBank (accession number DQ132795), foi usada para o desenho dos *primers*. Visando a clonagem direcional dos amplicons no plasmídeo de expressão em *Escherichia coli* pAE, sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Kpn*l foram introduzidos nos *primers forward* e *reverse*, respectivamente. Duas regiões da seqüência codificadora do gene *inIA* foram selecionadas: 1- região com 2313 pb (nucleotídeos 67 ao 2379) e; 2- região com 1611 pb (nucleotídeos 769 ao 2379). As duas regiões do *inIA* foram amplificadas por PCR a partir do DNA cromossomal de *L. monocytogenes*

(ATCC 19114) e purificadas conforme as instruções do kit PureGene (GE Healthcare).

Após digestão com enzimas de restrição, os amplicons foram clonados no vetor pAE mediante ligação com a enzima T4 DNA Ligase. O produto da ligação foi introduzido por eletroporação na cepa TOP 10F de *E. coli* e os clones recombinantes selecionados em ágar LB contendo $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina. Dois clones de cada construção foram seqüenciados e caracterizados através de digestão com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem.

Os plasmídeos recombinantes caracterizados foram utilizados para transformar por eletroporação células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS visando a expressão das proteínas recombinantes. Inicialmente, foi realizado um ensaio em pequena escala para verificar a expressão das versões de rlnA. Colônias de *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram cultivadas em 5 mL de caldo LB suplementado com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina e $34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol, *overnight*, a 37°C e sob agitação de 200 rpm. Após, 1 mL deste cultivo foi utilizado como inóculo em 9 mL de LB suplementado com ampicilina e cloranfenicol, e incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até alcançar densidade ótica (DO_{600}) entre 0,5-0,7. Neste momento, o cultivo foi dividido em duas alíquotas, das quais, uma foi suplementada com 0,2 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) para induzir a expressão das rlnA, sendo mantida por 3 h nas mesmas condições iniciais, e a outra não foi induzida para posterior utilização como controle negativo. Após 3 h de indução, uma alíquota de 1 mL foi coletada de cada amostra e centrifugada a 13.000 rpm por 1 min. O *pellet* foi ressuscitado em tampão de carga 1X, fervido por 10 min e, então, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) e *Western blot* com MAb anti-histidina (Sigma) para confirmação da expressão das rlnA.

A purificação das rlnA foi realizada em coluna Hi-Trap HP (GE Healthcare) carregada com níquel (Ni^{+2} -Sepharose) utilizando o sistema de cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTAPrime (GE Healthcare), conforme instrução do fabricante. O vetor pAE fusiona seis resíduos de histidina (6XHis) à proteína de interesse, possibilitando a sua detecção por *Western blot* com MAb anti-6XHis e purificação por cromatografia de afinidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amplificadas por PCR duas regiões do gene *inIA*, uma com 2313 pb (região 1) e outra com 1611 pb (região 2) (Fig. 1). Após a purificação e digestão, os amplicons foram clonados ao vetor pAE através da ação da enzima T4 DNA ligase, transformados em *E. coli* TOP 10F e as colônias recombinantes selecionadas. Na caracterização dos clones por digestão enzimática, foi demonstrado em eletroforese a liberação de dois fragmentos, um correspondente ao vetor pAE (2831 pb) e outro referente aos produtos do gene *inIA* clonados.

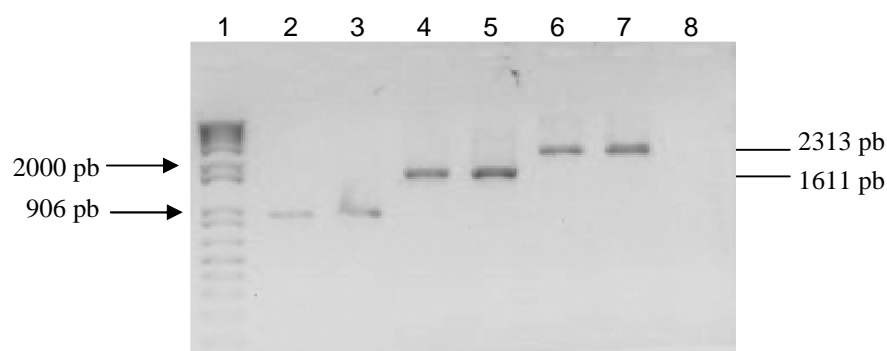


Figura 1. Amplificação de duas regiões do gene *inIA* por PCR. 1- 1Kb DNA Ladder; 2 e 3- controle positivo; 4 e 5- região 2 do *inIA*; 6 e 7- região 1 do *inIA*; 8- controle negativo.

O seqüenciamento dos quatro clones recombinantes possibilitou confirmar a presença da seqüência do gene *inIA*, demonstrando 99% de similaridade com as seqüências do gene *inIA* de *L. monocytogenes* depositadas no GenBank.

Na Fig. 2 observa-se que as duas versões da rInIA produzidas em *E. coli*, uma com massa molecular aparente de 60kDa, e outra com 83kDa, foram reconhecidas pelo MAb anti-6XHis no *Western blot*, demonstrando a viabilidade da estratégia adotada.

As duas versões da rInIA produzidas em *E. coli* mostraram-se solúveis. Este fato possibilitou a purificação em condição nativa, preservando a conformação tridimensional das versões de rInIA. Isso é relevante na produção de MABs, pois fornece uma maior garantia de que estes reconhecerão a proteína nativa de *L. monocytogenes*.

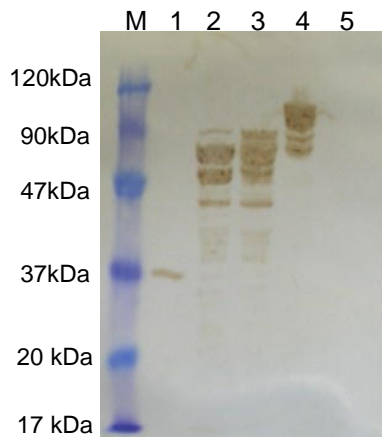


Figura 2. *Western blot* com MAb anti-6XHis para confirmação da expressão das versões de rInIA. M- Marcador pré-corado; 1- proteína rLipL32 (controle); 2- clone 7 *inIA* 2; 3- clone 11 *inIA* 2; 4- clone 25 *inIA* 1; 5- clone 30 *inIA* 1 (não expressou).

No *Western blot* realizado com MAb anti-6XHis notou-se várias bandas marcadas (Fig. 2). O fato de não ter sido usado inibidor de protease durante a purificação pode ter favorecido a degradação da rInIA. Esse resultado não atrapalha na imunização dos camundongos, visto que a maior parte da proteína não estava degradada, o que possibilitará a geração de anticorpos contra vários epítotos da proteína íntegra.

Após a análise das proteínas recombinantes, a construção com maior massa molecular (Fig. 2, Coluna 4) foi escolhida para a imunização dos camundongos, visando a produção dos MABs anti-InIA de *L. monocytogenes*.

Recentemente, um grupo da Universidade de Dublin, Irlanda (HEARTY *et al.*, 2006), produziu um MAb anti-intervalina A, cuja estratégia adotada foi utilizar como imunógeno células inteiras de *L. monocytogenes* inativadas por formalina.

No processo de seleção dos MAbS os autores observaram que um dos MAbS produzidos reagia, por *Western blot*, com uma proteína de massa molecular aproximado da internalina A, o que foi posteriormente confirmado com a produção de uma proteína InIA recombinante. O reconhecimento de todos os sorotipos de *L. monocytogenes* por esse MAb anti-InIA reforça a utilização da proteína InIA como um bom alvo para identificação específica de *L. monocytogenes* através de imunoensaios.

CONCLUSÃO

Foram produzidas duas proteínas recombinantes InIA que possuem potencial para serem empregadas na produção de MAbS contra *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIERNE, H.; SABET, C.; PERSONNIC, N., COSSART, P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection** v. 9, p.1156-1166, 2007.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microb. Reviews**. 29 (5): 851-875, 2005.

HEARTY, S.; LEONARD, P.; QUINN, J.; O'KENNEDY, R. Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiology Methods**, v. 66, n. 2, p.294-312, 2006.

SCHUBERT, W.D.; URBANKE, C.; ZIEHM, T.; BEIER, V., MACHNER, M.P; DOMANN, E.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, J.; HEINZ, D.W. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with Its Human Receptor E-Cadherin. **Cell**, v. 111, n. 13, p.825-836, dec. 2002.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. technical report. <http://www.who.int/foodsafety>, 2004.