

## SELEÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A ANTÍGENOS DE *Ralstonia solanacearum* A PARTIR DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

Bruno Duarte Bertuloso<sup>1</sup>, Andréia Barcelos Passos Lima<sup>1</sup>, Patrícia Tieme Fujimura<sup>2</sup>, Carlos Ueira Vieira<sup>2</sup>, Guilherme Rocha Lino de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal, CCA-UFES.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Uberlândia/Instituto de Genética e Bioquímica, INGEB-UFU.

brunoduartebio@hotmail.com

**Resumo-** A murcha bacteriana causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* é considerada uma das principais doenças do eucalipto devido aos danos causados a planta, a característica sistêmica da infecção, o vasto número de hospedeiro e aos ineficientes métodos de controle atualmente utilizados. O uso de anticorpos recombinantes reativos às proteínas do patógeno é uma alternativa inovadora aos métodos atualmente utilizados. Nesse projeto foi utilizada uma biblioteca de fragmentos anticorpos Fab expressos em bacteriófagos filamentosos para seleção de anticorpos reativos a antígenos totais de *R. solanacearum*. Três ciclos de seleção foram feitos para captura dos clones Fab com afinidade aos antígenos bacterianos. O enriquecimento dos clones foi observado pela titulação dos fagos recombinantes sob um aumento da estringência das reações durante os ciclos de seleção. Uma quantidade de  $2,9 \times 10^7$  ufc/ $\mu$ L foi atingida, demonstrando uma crescente especificidade dos anticorpos recombinantes expressos no bacteriófago contra a bactéria alvo. Os fragmentos gênicos referentes aos fragmentos Fab dos clones reativos serão seqüenciados e as seqüências submetidas à bancos de dados para caracterização dos clones.

**Palavras-chave:** Anticorpos recombinantes, eucalipto, murcha bacteriana.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

As imunoglobulinas são amplamente utilizadas como proteínas de fusão a fagos filamentosos, mas a utilização da molécula inteira é praticamente impossível pelo tamanho de seu arcabouço. Moléculas menores como os fragmentos ligantes de antígenos (Fab) são perfeitamente aceitas como proteínas de fusão a fagos filamentosos. Nós optamos neste trabalho por utilizar Fab pela maior estabilidade da molécula durante os processos de seleção (BARBAS *et al.*, 2001).

Os anticorpos obtidos *in vivo* por processos de imunização podem agora pela técnica do *phage display*, utilizando bibliotecas de anticorpos, serem selecionados *in vitro* pela afinidade ao ligante. Vários trabalhos já foram relatados, demonstrando a eficiência de expressão de anticorpos e controle de doenças em plantas (ORECCHIA *et al.*, 2008; SALDARELLI *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2007).

A necessidade de descobertas de novas metodologias para controle da bactéria *Ralstonia solanacearum*, patógeno responsável pela doença da murcha bacteriana do eucalipto e a importância econômica dessa cultura foi a motivação para a realização desse trabalho, uma tentativa de auxiliar os métodos não muito eficientes hoje utilizados (HAYWARD, 2000; GENIN & BOUCHER, 2002).

Este trabalho tem como objetivo a seleção de anticorpos recombinantes reativos à antígenos totais de superfície da bactéria *Ralstonia*

*solanacearum* causadora da murcha bacteriana do eucalipto, a partir de uma biblioteca de anticorpos (Fab) apresentados na superfície de fagos filamentosos

### Metodologia

Foi utilizada uma biblioteca de anticorpos Fab, construída a partir da amplificação de fragmentos gênicos das cadeias leve (VLCL) e pesada (VHCH1) de anticorpos humanos construída por afinidade a proteínas de tecidos tumorais (câncer de mama) e fusionadas a proteína III da capa protéica de bacteriófagos filamentosos, utilizando o vetor pComb3XSS (BARBAS *et al.*, 2001).

O cassete de expressão possui também um epítipo de hemaglutinina (HA), o que favorece a avaliação da expressão da proteína recombinante em solução observada por imunoenaios utilizando um anticorpo monoclonal anti-HÁ. Para facilitar a purificação do fragmento Fab em solução, este vetor possui uma seqüência de seis histidinas (*HIS Tag*) fusionada ao anticorpo recombinante, possibilitando sua purificação por meio de coluna de Níquel (BARBOSA, 2004) (Figura 1). A biblioteca foi amplificada e sua complexidade estimada, por titulação dos fagos.

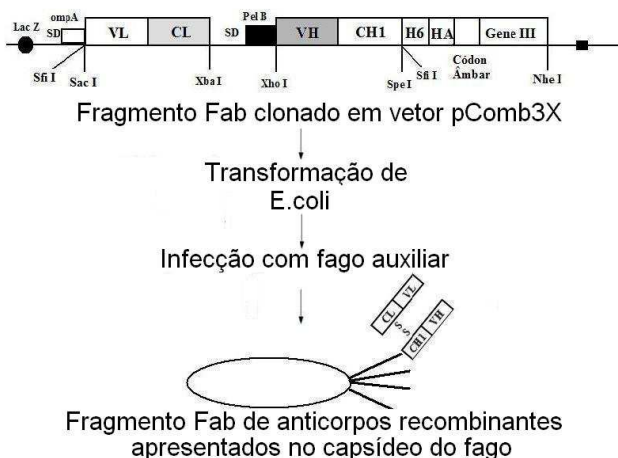


Figura 1- Mapa do cassete de expressão do plasmídeo pComb3x após a clonagem do Fab. O vetor possui internamente após o gene do anticorpo, região com seis histidinas (H6) para purificação em coluna de níquel ou para a detecção com Ab monoclonal anti-His Tag e uma região contendo resíduos de hemaglobina (HA) que possibilitam a detecção do Fab com a utilização de um anticorpo anti-hemaglutinina e o códon âmbar (TAG) que permite a produção do anticorpo livre da proteína III do bacteriófago, na forma solúvel em algumas linhagem bacterianas não supressoras.

A bactéria foi cultivada em meio de cultivo de Kado & Heskett (1970) e mantida à 28°C, no escuro até a identificação de colônias de aspecto liso, fluido características de *Ralstonia solanacearum*.

Foi preparada uma suspensão bacteriana em solução de cloreto de sódio 0.85% ajustada ao espectrofotômetro para uma OD<sub>550nm</sub> igual a 1,0. A suspensão de bactérias foi inativada a 58°C durante 1h.

A biblioteca de anticorpos foi incubada com 100µL da suspensão de bactérias em solução a 4°C sob leve agitação para seleção, por afinidade dos anticorpos imunoreativos.

Lavagens sucessivas do material com TBS 1X Tween 20 0,05% seguido de centrifugação em centrífuga refrigerada (4°C) a 3000g por 5 min foram feitas para eliminação dos fagos não ligantes. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (complexo bactéria-anticorpo recombinante) recuperado e ressuscitado em 100µL de PBS/BSA 1%. Os fagos eluídos foram amplificados pela infecção em *E. coli* cepa XL1-Blue.

**Amplificação:** Os fagos reativos foram amplificados pela infecção de uma cultura de XL1-Blue crescida em 50 mL de meio SB (extrato de levedura 2%, triptona 3% e NaCl 1%) suplementado com glicose 2% e 25 µL de tetraciclina (20 mg/mL). Após 30 min foram adicionados 10 µL de carbenicilina (100mg/mL) e

a cultura incubada por 1h, 37°C a 250rpm. Posteriormente 150 mL de meio SB suplementado com 25 µL carbenicilina (100mg/mL), 75 µL de tetraciclina (20 mg/mL) e uma solução contendo aproximadamente 10<sup>10</sup> ufc/mL de fago auxiliar VCSM13 (Stratagene).

O objetivo da infecção por um fago auxiliar é o fornecimento de todas as proteínas para a montagem da partícula viral inteira, o que não é conseguido apenas pelo plasmídeo pComb3X presente na biblioteca Fab recombinante. Após 2h de incubação com fago auxiliar, foram adicionados 280 µL de Kanamicina (50 mg/mL) e a solução foi incubada a 37°C durante toda a noite a 250rpm.

Os fagos recombinantes foram precipitados com PEG/NaCl e recuperados por centrifugação a 15000g 15min 4°C. Os fagos foram ressuscitados em 2mL de PBS/BSA 1%.

Três ciclos de lavagens, eluição e infecção dos bacteriófagos recombinantes garantem um enriquecimento de clones específicos (fagos com anticorpos recombinantes, avaliados por titulação dos fagos eluídos (Figura 2).

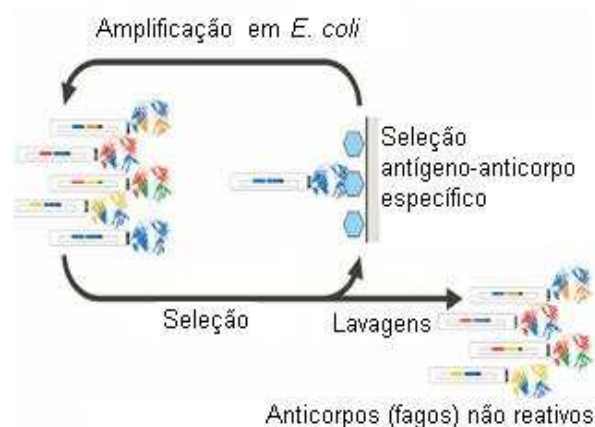


Figura 2- Seleção de fagos expressando Fab. A triagem dos fagos foi realizada em três ciclos de seleção contra antígenos em solução. A cada ciclo os ligantes específicos foram selecionados e re-amplificados.

**Titulação:** para cada ciclo foram feitas duas titulações. Uma com fagos eluídos não amplificados reativos ao alvo e outra com fagos reativos amplificados usados como entrada no começo de cada ciclo. Foi feita uma diluição serial de 10 vezes com os fagos diluídos em meio LB líquido. Aos tubos com a diluição foram adicionados 200 µL de *E. coli* XL1-Blue (OD<sub>550nm</sub> igual a 1,0) e inoculados em meio LB Ágar suplementado com 25 µL de carbenicilina (100mg/mL) a 37°C durante 20h. O título foi calculado pela multiplicação do número de colônias observadas pelo fator de diluição em cada placa.

## Resultados

A amplificação da biblioteca de anticorpos Fab humana foi eficiente com um rendimento de aproximadamente  $3,5 \times 10^{11}$  ufc/ $\mu$ L. Esse resultado garantiu uma quantidade ideal para a seleção de clones específicos reativos aos antígenos totais de *Ralstonia solanacearum* (Figura 3)

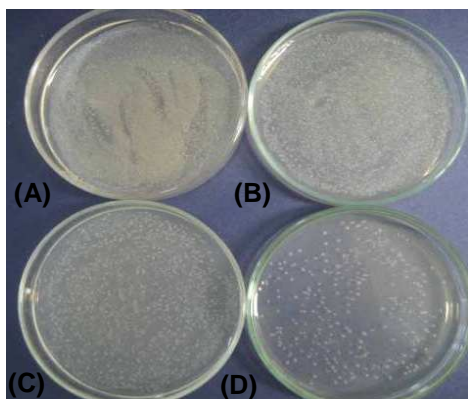


Figura 3- Titulação dos fagos da biblioteca Fab amplificada com os respectivos fatores de diluição (A) $10^6$ , (B) $10^7$ , (C) $10^8$ , (D) $10^9$ . Colônias brancas representam a infecção de *E. coli* F' com fagos em meio seletivo com carbenicilina.

A afinidade e enriquecimento dos clones imunoreativos foram feitos por meio de três ciclos de seleção sobre uma suspensão de bactérias *Ralstonia solanacearum* inativada. Isto permitiu o reconhecimento dos antígenos pelos anticorpos imunoreativos e sua posterior amplificação pela infecção em *E. coli*. Foi observado durante os ciclos de seleção um aumento da quantidade e especificidade dos clones às proteínas alvo, pois mesmo aumentando a estringência e a quantidade de lavagens em cada ciclo, ocorreu um enriquecimento dos clones, observados pela titulação dos fagos eluídos após a incubação com a bactéria (Tabela 1).

Tabela 1- Seleção por três ciclos, de fragmentos Fab contra antígenos totais *R. solanacearum* demonstrando títulos de entrada e saída e as condições de estringência e quantidades de lavagens em cada ciclo.

Ciclos (Rounds)	Entrada ufc/ $\mu$ L	Saídas ufc/ $\mu$ L	TBS Tween 20 0,05%
1º	$3,5 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^4$	4X
2º	$4,6 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^4$	7X
3º	$2,3 \times 10^{10}$	$2,9 \times 10^7$	10X

A Figura 4 mostra a titulação dos fagos eluídos é não amplificados do 3º ciclo de seleção. Observa-se uma diminuição da quantidade de fagos quando se titula o eluato após a incubação com a bactéria fitopatogênica. Isso se dá pela eliminação dos clones não reativos da biblioteca original amplificada. Este procedimento garante o aumento da afinidade e especificidade dos anticorpos recombinantes contra os antígenos alvo a cada ciclo de seleção.

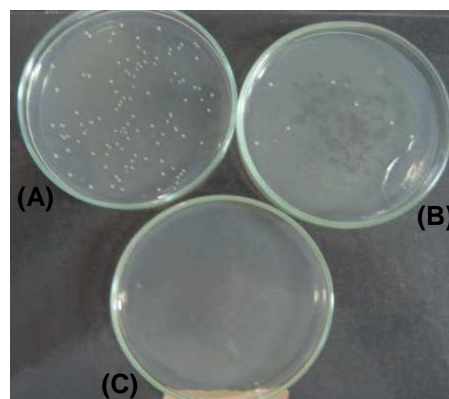


Figura 4- Titulação dos fagos do 3º ciclo de seleção com os respectivos fatores de diluição (A) $10^4$ , (B) $10^5$ , (C) $10^6$ . Colônias brancas representam a infecção de *E. coli* F' com fagos em meio seletivo com carbenicilina.

## Discussão

Um título alto conseguido pela amplificação de uma biblioteca de anticorpos Fab reflete, na maioria das vezes, em uma maior diversidade de clones sugerindo uma grande variabilidade das regiões determinantes de complementaridade (CDR) responsáveis pelo reconhecimento do antígeno pelo anticorpo.

A utilização de condições de estringência crescentes com a utilização do detergente Tween 20 e o aumento das quantidades de lavagens favorece a eliminação de clones (fagos expressando anticorpos recombinantes) com baixa afinidade ao alvo.

Os clones com alta afinidade permanecem ligados ao alvo e são eluídos pela presença da bactéria *E.coli*, pois bacteriófagos são parasitas obrigatórios de bactérias e conseqüentemente preferem estas células ao alvo inativado.

O aumento do título dos clones não amplificado (título de saída) durante e no final dos três ciclos de seleção sugere uma seleção dos anticorpos direcionada aos antígenos de superfície da bactéria *Ralstonia solanacearum*, pois a incubação dos clones foi realizada com o patógeno em solução salina, o que favorece a manutenção das características da célula.

O objetivo e a metodologia adotada neste trabalho visa aplicações futura dos anticorpos recombinantes selecionados e caracterizados, podendo ser utilizados em imunoenaios para diagnósticos de cepas específicas do patógeno e sua utilização para transformação e expressão em tecidos vegetais auxiliando o controle da doença.

### Conclusão

A metodologia utilizada neste trabalho revelou ser eficiente no reconhecimento e seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes reativos a *Ralstonia solanacearum*.

Os títulos de saída do eluato não amplificado comparados ao título de entrada em cada ciclo demonstraram uma seleção por afinidade ao alvo em solução.

### Agradecimento

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

### Referências

BARBAS III, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. Phage Display: A Laboratory Manual. **Plain view**, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

BARBOSA, C.D. Obtenção de anticorpos anti-osteossarcoma por meio de bibliotecas de Fab apresentadas na superfície de fagos filamentosos 2004. 166f. **Tese** – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília.

CHEN, G., YIN, Y.P., YUAN, Q., XIA, Y.X., WANG, Z.K. High efficient expression and bio-activity assay of recombinant antibody for citrus bacterial canker disease. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 47(6):1066-1069. 2007

GENIN, S., BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. **Molecular Plant Pathology**. 3: 111-118. 2002.

HAYWARD, A.C. *Ralstonia solanacearum*. In: **Encyclopedia of Microbiology**. vol. 4. San Diego: Academic Press. 32-40. 2000.

KADO, E.I., HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xantomonas*. **Phytopathology**. 60:969-976. 1970.

ORECCHIA, M., NO"LKE, G., SALDARELLI, P., DELL'ORCO, M., UHDE-HOLZEM, K., SACK, M.,

MARTELLI, G., FISCHER, R., SCHILLBERG S. Generation and characterization of a recombinant antibody fragment that binds to the coat protein of grapevine leafroll-associated virus 3. **Arch Virol**. 2008.

SALDARELLI, P., KELLER, H., DELL'ORCO, M., SCHOTS, A., ELICIO, V., MINAFRA, A. Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B. **J. Virol. Methods**. 124(1-2): 191-195. 2005.