

CLONAGEM DOS GENES *lipL32*, *ligAni* E *lemA* DE *Leptospira interrogans* UTILIZANDO O PADRÃO BIOBRICKS®

JESSICA DORNELES¹; THAÍS OLIVEIRA¹; CARLOS EDUARDO CUNHA¹;
CAROLINE RIZZI¹; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN¹

¹Laboratório de Vacinologia - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
jeehdorneles@hotmail.com; odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A infecção é contraída pelo contato com ambiente contaminado com a urina de animais carreadores da bactéria (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O controle da leptospirose animal se dá através da vacinação com bacterinas (bactérias inativadas), porém elas apresentam limitações, pois conferem proteção de curta duração, e apenas contra um limitado número de sorovares (DELLAGOSTIN et al., 2011).

As proteínas LigA, LipL32 e LemA são conservadas, e encontram-se ancoradas na membrana externa de leptospiros patogênicos. Estas proteínas são promissoras alvos vacinais, uma vez que têm demonstrado capacidade de conferir proteção contra leptospirose em hamsters (SEIXAS et al., 2007, SILVA et al., 2007, HARTWIG et al., 2013). Entretanto, a ação de cada proteína isolada não impede a colonização renal do animal infectado, mantendo-o como um disseminador da bactéria. A combinação de antígenos na forma quimérica poderia melhorar a eficácia vacinal quando comparada à utilização dos antígenos individualmente (LOURDAULT et al., 2014).

Mycobacterium bovis BCG é uma vacina viva atenuada muito promissora para utilização como vetor vacinal, pois apresenta fatores vantajosos, como estabilidade, segurança, baixo custo de produção, capacidade adjuvante e indução de imunidade humoral e celular a longo prazo (MATSUO; YASUTOMI, 2011). Diversos antígenos heterólogos, incluindo leptospirais, já foram expressos em BCG com sucesso. (BASTOS et al., 2009).

Métodos tradicionais de clonagem apresentam como principal limitação a falta de padronização. O padrão BioBricks® consiste em uma estratégia que permite a construção de partes biológicas compatíveis, cujos sítios de clonagem são mantidos mesmo após a combinação de diferentes partes. Isso ocorre pela utilização de sequências prefixo e sufixo, que flanqueiam o fragmento alvo, contendo sítios para diferentes enzimas de restrição, os quais geram extremidades compatíveis quando clivados (SHETTY et al., 2008). O emprego desse padrão na construção de proteínas quiméricas leptospirais é inovador e torna o processo de clonagem mais prático e econômico.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a clonagem dos genes *lipL32*, *lemA* e *ligAni* de *Leptospira* spp. em um plasmídeo base, utilizando o padrão BioBricks®. Com esta estratégia de clonagem pretendemos construir quimeras recombinantes a serem utilizadas como candidatas vacinais contra leptospirose empregando BCG como vetor vacinal.

2. METODOLOGIA

Fragmentos contendo a sequência codificadora dos genes *lipL32*, *lemA* e *ligAni* foram amplificados através da técnica de PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, utilizando oligonucleotídeos contendo sítios para as enzimas de restrição *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* e *PstI*. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Os produtos de PCR e o plasmídeo pSB1C3 foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*. As reações de digestão foram purificadas com o mesmo kit citado acima. Os genes amplificados foram ligados individualmente ao plasmídeo utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Os produtos das ligações foram utilizados para transformar *Escherichia coli* DH5α através de eletroporação.

Os clones recombinantes foram cultivados em meio Luria-Bertani líquido e submetidos à extração de plasmídeo com o kit *GFX™ Micro Plasmid Prep*. A presença dos insertos foi confirmada por PCR e digestão conforme descrito anteriormente, bem como por sequenciamento de DNA pela técnica de Sanger, utilizando sequenciador de capilar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências codificadoras *lemA*, *lipL32* e *ligAni* foram eficientemente amplificadas por PCR no tamanho esperado de aproximadamente 414, 747 e 846 pb, respectivamente (Figura 1).

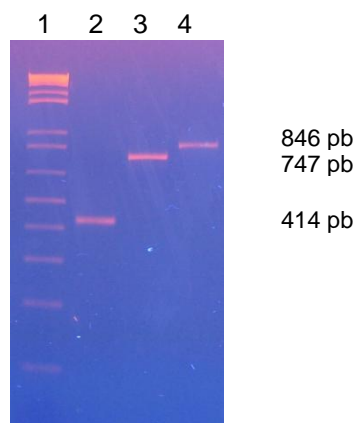


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos *lemA*, *lipL32* e *ligAni* amplificados por PCR. 1, Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); 2, *lemA*; 3, *lipL32*; 4, *ligAni*.

Após purificação e digestão, os fragmentos foram ligados no vetor pSB1C3. Após a transformação da ligação por eletroporação em *E. coli*, foram selecionados três clones recombinantes, um para cada gene alvo, denominados pSB1C3/*lipL32*, pSB1C3/*lemA* e pSB1C3/*ligAni*. Através da técnica de PCR, utilizando os plasmídeos recombinantes extraídos como DNA molde, foi possível verificar a presença dos insertos. Da mesma forma, após a digestão, houve a liberação dos fragmentos *lemA*, *lipL32* e *ligAni* no tamanho esperado, como pode ser visualizado na figura 2. Através do sequenciamento de DNA, também foi confirmada a identidade das sequências clonadas no vetor pSB1C3.

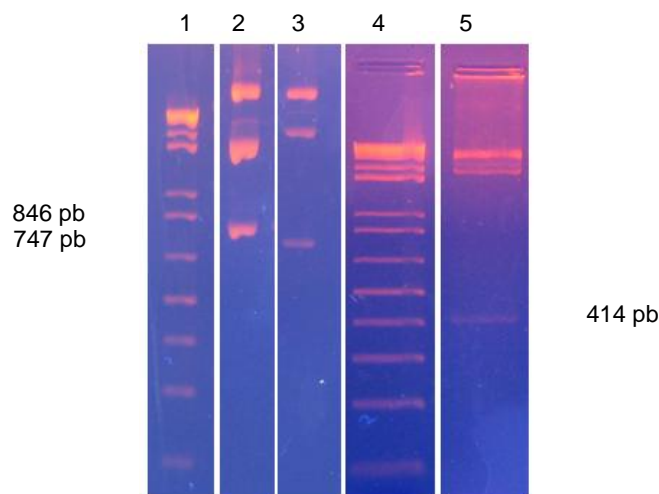


Figura 2: Confirmação da clonagem dos genes alvo no vetor pSB1C3. Digestão com *EcoRI* e *PstI* dos plasmídeos recombinantes pSB1C3/*ligAni*, pSB1C3/*lipL32* e pSB1C3/*lemA*. 1, Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); 2, pSB1C3/*ligAni*; 3, pSB1C3/*lipL32*; 4, Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); 5, pSB1C3/*lemA*.

4. CONCLUSÕES

As técnicas utilizadas mostraram-se eficazes para clonagem dos insertos, os quais passam a conter extremidades compatíveis com o padrão BioBricks®. Essa é uma estratégia inovadora para a construção de proteínas quiméricas leptospirais. Os próximos passos envolvem a clonagem de promotores micobacterianos no padrão BioBricks®, seguido da montagem de diversas combinações de proteínas quiméricas com estes promotores. Posteriormente, pretendemos avaliar as quimeras construídas como vacina contra leptospirose utilizando *M. bovis* BCG como vetor vacinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B., DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.

DELLAGOSTIN, O.A.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FELIX, S.R.; DA SILVA, E.F.; MCBRIDE, A.J.A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, p. 1215-1224, 2011.

SEIXAS, F.K.; DA SILVA, E.F.; HARTWIG, D.D.; CERQUEIRA, G.M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M.Q.; DOSSA, R.G.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, p.88-95, 2007.

SILVA, E.F.; MEDEIROS, M.A.; MCBRIDE, A.J.A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G.S.; RAMOS, J.G.; SANTOS, C.S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O.A.; HAAKE, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, p. 6277-6286, 2007.

HARTWIG, D.D.; FORSTER, K.M.; OLIVEIRA, T.L.; AMARAL, M.; MCBRIDE, A.J.A.; DELLAGOSTIN, O.A. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p.747-752, 2013.

LOURDAULT, K.; WANG, L.C.; VIEIRA, A.; MATSUNAGA, J.; MELO, R.; LEWIS, M.S.; HAAKE, D.A.; GOMES-SOLECKI, M. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Infection and immunity**, v. 82, p. 893-902, 2014.

MATSUO, K.; YASUTOMI, Y. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2011, p. 9, 2011.

BASTOS, R.G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, p. 6495-6503, 2009.

SHETTY, R.P.; ENDY, D.; KNIGHT, T.F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **Journal of Biological Engineering**, v. 2, p. 1-12, 2008.