

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE *Leptospira interrogans* ENVOLVIDAS NA CAPTAÇÃO DE FATORES DE REGULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

AISHA BAKRI¹; ÉVERTON BETTIN²; CARLOS EDUARDO POUEY DA CUNHA²;
ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN³

¹Universidade Federal de Pelotas – aishefarid@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tombettin@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – cpouey@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por infecção por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Em humanos, a leptospirose pode variar de uma infecção assintomática até uma grave doença, resultando em falência múltipla dos órgãos e morte (MURRAY et al., 2013). Estima-se atualmente mais de um milhão de casos de leptospirose em todo o mundo, levando a aproximadamente 59.000 mortes, tornando esta, uma das principais zoonoses em termos de morbidade e mortalidade no mundo (COSTA et al., 2015).

A utilização de vacinas contra a leptospirose humana ocorre em alguns países como China, Cuba, Japão e França. Entretanto, estas vacinas são bacterinas, apresentam efeitos adversos locais e sistêmicos e conferem proteção apenas contra os sorovares que compõem a vacina, não sendo capaz de fornecer uma proteção de amplo espectro nem de longa duração (KOIZUMI e WATANABE, 2005). Buscando sanar as deficiências apresentadas pelas bacterinas, vários抗ígenos recombinantes têm sido avaliados em vacinas contra essa zoonose, focando principalmente em fatores de virulência presentes na membrana externa. (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Diferentes autores têm destacado a convergência no desenvolvimento de vacinas de nova geração, contra diversos patógenos, quanto a utilização de moléculas envolvidas no mecanismo de evasão do sistema complemento como抗ígenos vacinais (MERI; JÖRDENS; JARVA, 2006; SERRUTO et al., 2010; JONGERIUS et al., 2015). Em leptospiros, já foi relatado um possível papel de sinergia entre as proteínas *Leptospiral complement-regulator acquiring protein A* (LcpA) e *Leptospiral endostatin-Like A* (LenA), juntamente com as proteínas Lig, na inibição das vias clássica e alternativa do complemento, permitindo a sobrevivência das leptospiros no soro.

Uma possível neutralização de moléculas de evasão do sistema complemento, promovida por imunização, permitiria uma ativação mais eficiente deste sistema frente a uma infecção por leptospiros patogênicas, resultando em uma maior suscetibilidade do patógeno e uma melhor ativação da imunidade adaptativa (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Assim, a associação desses抗ígenos em uma formulação vacinal apresenta-se como uma estratégia para o desenvolvimento de uma vacina recombinante de subunidade contra a leptospirose, buscando alcançar uma capacidade imunoprotetora e imunoesterilizante. Sendo assim, este trabalho objetivou

a expressão das proteínas LigBni, LenA e LcpA de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni em sistema heterólogo.

2. METODOLOGIA

O genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi utilizado como molde para as amplificações. Para extração de DNA genômico, foi utilizado um kit comercial. Foram desenhados *primers* a partir de sequências depositadas no GenBank (NCBI) com o auxílio do software VectorNTI11 (Invitrogen), visando amplificação e a clonagem dos genes *ligBni*, *lenA* e *lcpA* no vetor pAE. As sequências codificadoras dos genes foram amplificadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), onde os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e purificados utilizando kit comercial.

Os produtos da PCR e o vetor de expressão pAE, foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI* e *KpnI* (Invitrogen) por 2 h à 37 °C, logo em seguida purificados através de kit comercial. A ligação dos insertos ao vetor pAE, foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) a 4 °C *overnight*.

A transformação foi feita através de eletroporação, onde foram utilizados 80 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α e 2 µL dos produtos de ligação. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido suplementado com ampicilina, e as placas foram incubadas a 37 °C por 16-18 h. As colônias isoladas que cresceram no meio com o antibiótico, foram submetidas ao processo de triagem por extração rápida de DNA por fenol-clorofórmio. Os clones, caracterizados como possíveis recombinantes através de eletroforese, foram cultivados em meio LB acrescido de ampicilina. Os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão com as mesmas enzimas de restrição (*BamHI* e *KpnI*) para confirmação da presença do inserto, podendo ser visualizado em gel de agarose 1%.

Para expressão das proteínas recombinantes, a *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) Star foi transformada com os vetores pAE/LigBni, pAE/LenA e pAE/LcpA através de choque térmico. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 mM de IPTG por 3 h. Os pellets foram suspensos em 30 mL de tampão (100 mM de Tris-base; 300 mM de NaCl - pH 8,0) e as células rompidas por sonicação. Os lisados bacterianos, contendo as proteínas recombinantes, foram filtrados e purificados através de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-Sepharose (GE HealthCare). A caracterização das proteínas recombinantes foi realizada através de SDS-PAGE 12% seguido de *Western blot* (WB) com anticorpo monoclonal anti-6xHIS (Sigma).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, todos os genes foram eficientemente amplificados por PCR. Foi feita a identificação da presença dos clones recombinantes em colônias resistentes à ampicilina. Foi possível obter com êxito as proteínas recombinantes através de um sistema de expressão heteróloga, utilizando a *E. coli* cepa BL21 (DE3) Star e o vetor de expressão pAE. Todas as proteínas foram expressas na forma insolúvel. A purificação permitiu obter corretamente uma banda única, aparentemente livre de contaminantes, para cada proteína recombinante.

Todas as proteínas recombinantes foram reconhecidas pelo anticorpo monoclonal (mAB) anti-6xHIS nos tamanhos esperados, através da técnica de *Western blot* (Figura 1).

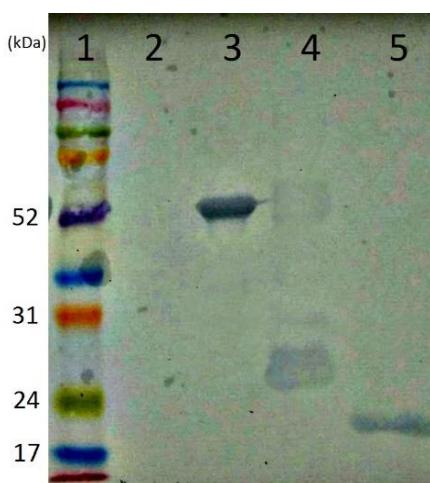


Figura 1. Caracterização das proteínas recombinantes através de Western blot.(1) Marcador de massa molecular Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare); (2) *E. coli* não transformada; (3) rLigBni (52kDa); (4) rLenA (25kDa); (5) rLcpA (22 kDa)

4. CONCLUSÕES

- A construção dos primers para a amplificação dos genes de interesse foi realizada com sucesso, permitindo a amplificação correta dos fragmentos por PCR;
- Os processos de digestão e ligação dos fragmentos em vetor pAE utilizados permitiram a obtenção dos vetores funcionais pAE/ligBni, pAE/lenA e pAE/lcpA;
- A expressão das proteínas recombinantes rLigBni, rLenA e rLcpA em sistema de expressão procarioto utilizando a *E. coli* cepa BL21 (DE3) Star foi eficiente;
- O processo de purificação através de cromatografia de afinidade ao níquel permitiu a obtenção das proteínas de interesse aparentemente livres de contaminantes;
- Ensaios futuros serão realizados com o objetivo de avaliar a capacidade destas proteínas, quando combinadas, de promoverem a suscetibilidade do patógeno ao sistema complemento e/ou induzirem uma resposta imune protetora contra a leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A.; STROBEL, S.; JOZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **Journal of Infectious Diseases**, v.205, n.6, p. 995–1004, 2012.
- COSTA, F; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TOGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.3, p.1–19, 2015.
- DELLAGOSTIN ,O. A.; GRASSMAN, A. A.; HARTWIG, D.; FÉLIX, S.; SILVA, É. F.; MCBRIDE, A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, v.11, n.7, p.1215-1224, 2011.
- JONGERIUS, I.; SCHUIJT, T.; MOOI, F. Complement evasion by *Bordetella* pertussis: implications for improving current vaccines. **Journal of molecular medicine**, v.93, n.4, p.395–402, 2015.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. **Symposium**, v.51, n.3, p210-214, 2005.
- MERI, S.; JORDENS, M.; JARVA, H. Microbial complement inhibitors as vaccines. **Vaccine**, v.26, n.8, p.113–117, 2008.
- MURRAY, G.; LO, M.; BULACH, D.M.; SRIKRAM, A.; SEEMANN, T.; QUINSEY, N. S.; SERMSWAN, R. W.; ALLEN, A.; ADLER, B. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. **Vaccine**, v.31, n.3, p.495–499, 2013.
- SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; SCARSELLI, M.; GROS, P.; VAN STRIJP, J. A. G. Molecular mechanisms of complement evasion: Learning from staphylococci. **Nature Reviews: Microbiology**. v.8, 2010.