

CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA LIGBREP DE *Leptospira interrogans* SOROVAR COPENHAGENI CEPA FIOCRUZ L1-130

¹RICARDO SALVI GONÇALVES; ²LIANA NUNES BARBOSA, ² ANDRÉ ALEXGRASSMANN, ²GABRIANA TIMM; ³ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE

¹LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel- ric-s-g@hotmail.com

²LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel- liana.tlo@gmail.com;

grassmann.aa@gmail.com; gabi.timm@hotmail.com

³LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel- alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma importante zoonose de distribuição mundial, presente em todos os continentes, com exceção da antártica. Ocorre em países desenvolvidos, bem como em desenvolvimento tanto em áreas urbanas como rurais (ADLER, 2015). No Brasil entre os anos 2000 e 2017 ocorreram aproximadamente 65 mil casos confirmados de leptospirose, resultando em um total superior a 3200 óbitos em humanos (SAUDE, 2017).

Bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* são os agentes etiológicos da doença, tendo atualmente com 10 espécies descritas (BOURHY, COLLET et al., 2014). Dentre todas as espécies patogênicas, saprófitas e intermediárias do gênero, são caracterizados cerca de 300 sorovares antigenicamente distintos (LEVETT, 2015). Os principais sorovares responsáveis por infecções em humanos são Icterohaemorrhagiae, Hardjo e Bratislava, porém humanos são considerados hospedeiros acidentais (LEVETT, 2001; BHARTI, NALLY et al. 2003, ADLER 2015). A vacinação é a medida profilática ideal para o controle da leptospirose, sendo administrada corriqueiramente em animais, porém disponíveis para humanos apenas em alguns poucos países em períodos de enchentes (DELLAGOSTIN, GRASSMANN et al. 2011). As vacinas disponíveis são compostas por bacterinas e possuem algumas limitações como efeitos adversos, imunidade de curto prazo e serem sorovar específicas (LEVETT 2001, DELLAGOSTIN, GRASSMANN et al. 2011), tornando-se necessário o desenvolvimento de vacinas que superem tais limitações.

Entre os possíveis alvos vacinais estão as proteínas Ligs(*Leptospiral immunoglobulin-like*), que impactam na virulência das leptospires e possivelmente tem papel na colonização do hospedeiro (CHOY, KELLEY et al. 2007). São conhecidos 3 tipos de proteínas Lig: a LigA, LigB e LigC, tendo os 6 primeiros domínios dessas proteínas sequências quase idênticas, chamados de LigBrep (MCBRIDE, CERQUEIRA et al. 2009). Ambas as proteínas LigA e LigB são capaz de gerar resposta imune protetora, sendo que para a LigA as combinações domínios que conferem proteção são os 10,11 e 12 ou 11, 12 e 13 (COUTINHO, CHOY et al. 2011). É descrito na literatura a capacidade de gerar resposta imune protetora da LigBrep (YAN, FAISAL et al. 2009), mas não são conhecidos os domínios responsáveis por conferir tal proteção.

2. METODOLOGIA

A sequência base utilizada para determinar os domínios da proteína LigBrep foi de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (GenBankID: AE016823.1, lócus tag: LIC_10464). Os domínios foram determinados utilizando a ferramenta *Blast* e o banco de dados da plataforma *Uniprot*. Os primers para clonagem dos genes correspondentes aos domínios da LigBrep foram desenhados utilizando a ferramenta *Vector (Invitrogen)* e estão apresentados na Tabela 1. Foram produzidas sequências para diferentes combinações de domínios e a clonagem desses fragmentos da proteína LigBrep foi realizada por PCR. Células competentes de *E.coli* foram transformadas com vetores previamente ligados utilizando o método de transformação por choque térmico e incubadas *overnight* em meio LB com ampicilina 1% para selecionar as colônias recombinantes. Foram obtidas colônias recombinantes para 4 dos 9 domínios selecionados da proteína. As colônias recombinantes foram expandidas *overnight* em meio LB semissólido com ampicilina 1% e a triagem foi realizada por meio de PCR das colônias. A expressão das proteínas foi verificada pela técnica *Western Blot*.

Tabela 1 – Primers e enzimas de restrição utilizadas para PCR dos domínios da LigB

Primer	Sequência	Enzima de restrição
LigB – D2 For	AGCAGGTACCTTATTCTTAACCAATTCAAG	<i>Kpn I</i>
LigB – D3 Ver	AATAAGCTTTAGATTAGTTTACGGATCCGA	<i>HindIII</i>
LigB – D3 For	ATTAGGTACCAAGGAGATGCTGTTCTCTC	<i>Kpn I</i>
LigB – D4 Ver	TATAAGCTTTATTTAAAATCAGTGGATCCTTG	<i>HindIII</i>
LigB – D4 For	ATATTCACTGTGCCTTAGTTCTATTCCTG	<i>Pvu II</i>
LigB – D5 Ver	CATAAGCTTTAAGTAAACCAAGTGTACCTG	<i>HindIII</i>
LigB – D5 For	ATCTGCAGAGCATTGACTTCCATCG	<i>Pst I</i>
LigB – D6 Ver	ATGGTACCTTATAACGTAGAAACCGGACTAC	<i>Kpn I</i>

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de PCR foi sucedida na clonagem das combinações dos domínios A, B, C, D, E, F, G, H e I da proteína LigBrep, conforme mostrado na Figura 1. A clonagem das sequências codificantes no vetor pAE e a transformação das bactérias *E. coli* foi obtida em quatro combinações de domínios: D, E, F e I.

Obtendo-se um resultado inicial compatível com trabalhos anteriores envolvendo a clonagem de domínios de proteínas Lig e possibilitando a progressão dos projetos para fase de expressão e purificação das proteínas (COUTINHO, CHOY et al. 2011, CONRAD, CRUZ, MCVBRIDE et al. 2017).

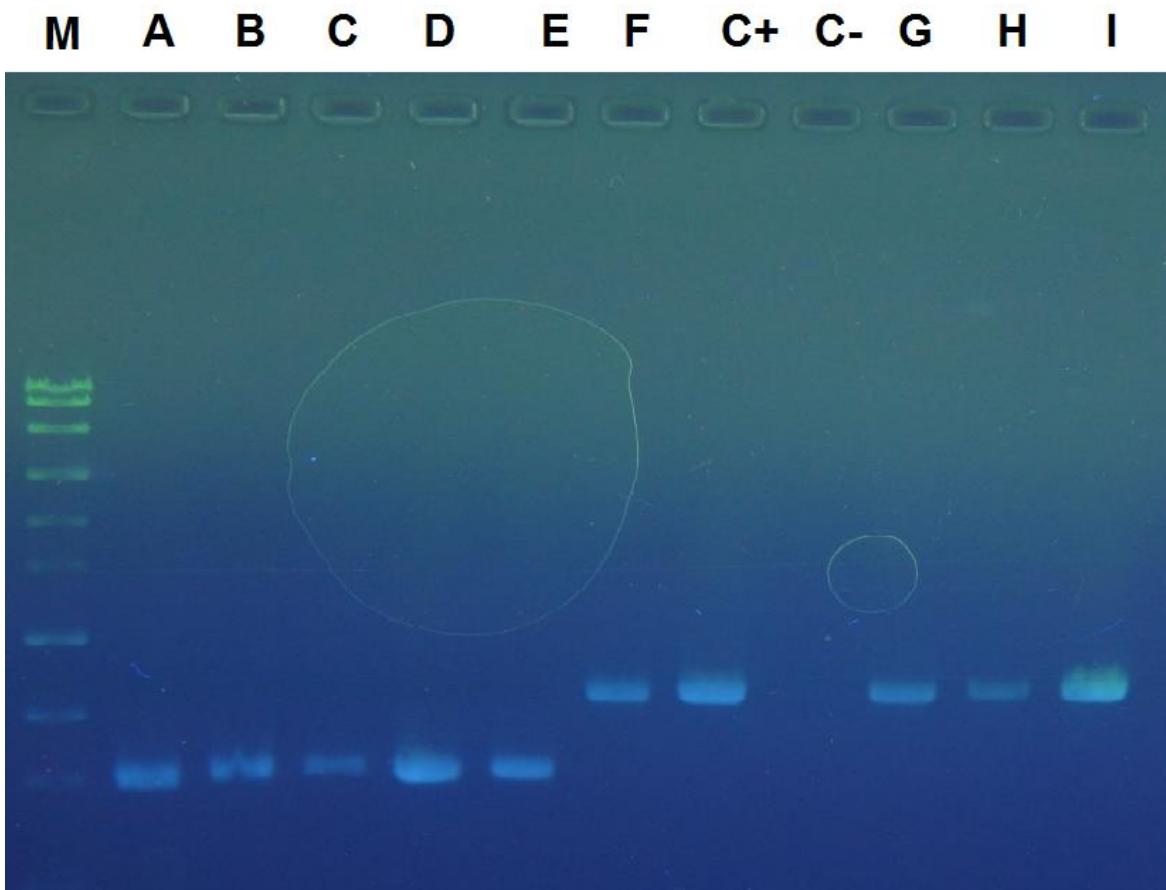


Figura 1 –Gel da PCR com combinações de domínios da proteína LigBrep

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos até o presente momento pode-se aferir que os primers desenhados e utilizados para este projeto foram eficazes na síntese dos fragmentos de DNA correspondentes aos domínios da LigB necessários para este estudo e que os fragmentos puderam ser utilizados juntamente com o vetor pAE para transformar cepas de *E. coli* competentes de formas que essas sejam capazes de expressar os domínios da LigBrep.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, B. (2015). **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin: Springer-Verlag, 2015.

Bharti, A. R., et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **THE Lancet Infectious Diseases**, Londres ,v3, n12: p757-771, 2003.

Bourhy, P., et al. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Londres, v64, n12: 4061-4067, 2014.

Choy, H. A., et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira* interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, Washington DC,v75, n5: p2441-2450 2007.

Conrad, N. L., et al. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v11, n3: p1-20, 2017.

Coutinho, M. L., et al. A LigA three-domainregionprotects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v5, n12: p1-10, 2011.

Dellagostin, O. A., et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines & Immuno therapeutics**, Oxfordshire, v7, n11: p1215-1224, 2011.

Levett, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v14, n2: p296-326, 2001.

Levett, P. N. "Systematics of leptospiraceae. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v387: p11-20, 2015.

McBride, A. J., et al. Geneticdiversityofthe Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdã, v9, n2: p196-205, 2009.

Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da Leptospirose no Brasil entre 2000 e 2017**". Portal da Saúde. Acessado em 25 setembro 2017,disponível em:<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>

Yan, W., et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challengemodel. **Microbes and Infection**, Amsterdã, v11, n2: p230-237, 2009.