

EXPRESSÃO DE DUAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE MEMBRANA EXTERNA DE *Leptospira* SPP. IDENTIFICADAS PELA VACINOLOGIA REVERSA E ESTRUTURAL E IMUNOPROTEÔMICA

ELIAS EDUARDO BARBOSA DA ROSA¹; LIANA NUNES BARBOSA²;
CAROLINA RODRIGUES FÉLIX³; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁴

¹Laboratório de Pesquisas em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – eliaseduardobarbosa@gmail.com;

²Laboratório de Pesquisas em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – liana.tlo@gmail.com;

³Laboratório de Pesquisas em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – carolinarodriguesfelix@gmail.com;

⁴Laboratório de Pesquisas em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma relevante zoonose difundida por todo globo terrestre com exceção da Antártida (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Estima-se um número superior a 1 milhão de novos casos da doença em humanos ao ano e aproximadamente 59.000 mortes. É considerada uma doença negligenciada e um grave problema de saúde pública em nações subdesenvolvidas devido à falta de efetivas medidas profiláticas (COSTA et al., 2015). De acordo com o Ministério da Saúde, em 2018, houve 3.069 casos confirmados no Brasil, sendo 279 óbitos. Desde o início deste ano até julho foram registradas 2.027 confirmações da doença e 158 óbitos no país (SAÚDE, 2019).

Os agentes etiológicos da leptospirose são bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* que possuem a capacidade de infectar diversas espécies de mamíferos. Os números alarmantes da doença estão relacionados à ineficácia do controle de transmissão do patógeno em centros urbanos e zonas rurais. Além disso, as vacinas clássicas contendo a bactéria inativada induzem proteção de curta duração e são sorovares-específicas, desencadeando resposta imune somente contra os sorovares presentes na composição vacinal (ADLER, 2015; HAAKE & LEVETT, 2015; ZUERNER, 2015). Dos mecanismos de patogenicidade, a membrana externa é a principal estrutura de interação com o ambiente e o hospedeiro. Tendo em vista essas problemáticas com as vacinas clássicas, uma alternativa promissora é o desenvolvimento de vacinas recombinantes que utilizem como antígeno proteínas da membrana externa da bactéria. Abordagens atuais como a vacinologia reversa e estrutural e a imunoproteômica já foram aplicadas na identificação de novos antígenos expostos à superfície de *Leptospira interrogans* e *Neisseria meningitidis*, e se mostraram eficazes na seleção desses potenciais alvos vacinais (NEWCOMBE et al., 2014; GRASSMANN et al., 2017).

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo clonar e expressar de forma recombinante, duas proteínas da membrana externa de leptospiros. Ambas as proteínas, nomeadas como CSIP06+CSPI08 e CSIP13, foram identificadas pelas ferramentas de vacinologia reversa e estrutural e imunoproteômica.

2. METODOLOGIA

A expressão dos antígenos alvos foi realizada utilizando sistema de expressão padrão em *Escherichia coli*. Os plasmídeos sintéticos foram construídos através de ferramentas de bioinformática com as sequências para cada proteína com gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Os plasmídeos foram inseridos através de transformação por choque térmico em células competentes de *E. coli* cepas BL21 (DE3) Star. Posteriormente, inóculos bacterianos foram realizados a partir de colônias transformadas crescidas em meio Luria Bertani (LB) acrescido do antibiótico seletivo ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C. A expressão em larga escala foi realizada em meio LB acrescido de ampicilina até atingir densidade óptica de 0.4-0.8 e então, as expressões das pro

As proteínas expressas obtidas foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade ao níquel em sistema ÄKTA. Em seguida, foram realizadas diálises em tampão PBS ou Tris 50 mM 1x das proteínas a fim de reduzir a concentração de ureia nas amostras, bem como, a quantificação das proteínas por kit de BCA (Pierce, Thermo Scientific).

Da mesma forma, será realizado *Western blot* das proteínas expressas para avaliar se as proteínas são recombinantes. Para isso, a membrana será incubada a 4°C *overnight* com solução BSA 1% em PBS-T 1x. Após isso, a membrana será incubada por 1h com anticorpo anti-polyhistidina conjugado com peroxidase diluído 1:5000 (Sigma-Aldrich). Por fim, a reação será revelada por substrato ECL (Pierce, Thermo Scientific) no equipamento C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a expressão das proteínas recombinantes, obteve-se sucesso nas transformações por choque térmico. As colônias bacterianas cresceram no meio seletivo com ampicilina, evidenciando que elas continham o plasmídeo com gene de resistência ao antibiótico. A partir dessas colônias, a expressão em larga escala das proteínas CSIP06+CSIP08 e CSIP13 foi realizada. Para a proteína CSIP06+CSIP08 foram expressos 2 litros de cultura, uma vez que o objetivo final de uso para essa proteína será experimentos de vacinologia em modelo hamster. Diferente disso, a proteína CSIP13 foi expressa em um volume final de 24 litros de cultura. A expressão dessa proteína em alta escala foi realizada com o propósito de sua utilização na imunização de bovinos em período reprodutivo contra leptospirose bovina, em experimentos posteriores com grupos de pesquisa parceiros. A expressão proteica foi analisada por SDS-PAGE demonstrando que as culturas bacterianas induzidas apresentaram a expressão de cada proteína adequadamente, Figura 1. Dessa forma, as bandas para cada proteína apresentaram as massas moleculares de 29,6 kDa e 22,4 kDa para as proteínas CSIP06+CSIP08 e CSIP13, respectivamente.

Posteriormente ao processo de purificação das proteínas, foi feita a corrida de um gel de poliacrilamida para verificar se as duas proteínas pós-purificação apresentavam a massa molecular adequada, Figura 2. Ambas proteínas pós-purificação apresentaram o tamanho esperado de banda no gel (Figuras 1 e 2).

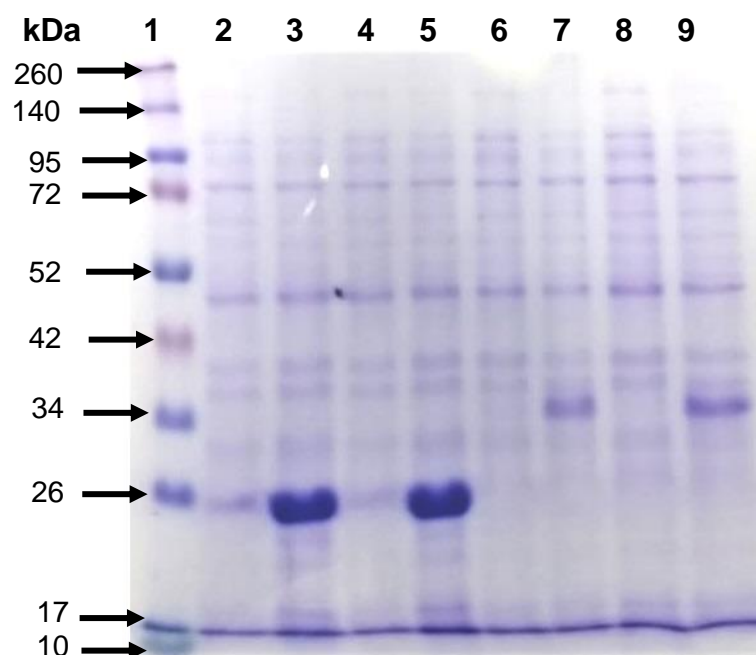


Figura 1 – Gel de poliacrilamida 15% para a avaliação da indução da expressão das proteínas. Poços: 1) Marcador de massa molecular. 2) e 4) Expressão não induzida de CSIP13; 3) e 5) Expressão de CSIP13 induzida – 22,4 kDa; 6) e 8) Expressão não induzida de CSIP06+CSIP08; 7) e 9) Expressão de CSIP06+CSIP08 induzida – 29,6 kDa

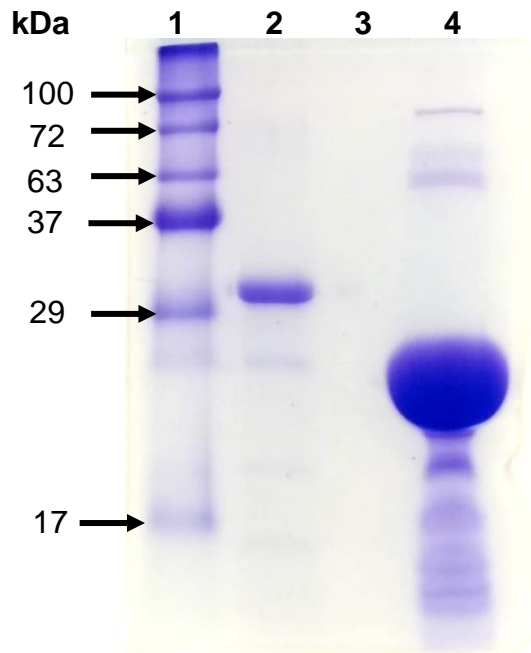


Figura 2 – Gel de poliacrilamida 15% para avaliação da massa molecular das proteínas expressas. Poços: 1) Marcador de massa molecular. 2) Proteína CSIP06+CSIP08 – 29,6 kDa; 3) Ausência de amostra; 4) Proteína CSIP13 – 22,4 kDa;

A quantificação das amostras determinada por BCA mostrou que as proteínas expressas apresentaram um bom rendimento a partir do protocolo de expressão utilizado. A proteína CSIP13 apresentou 2,24 mg/ml, evidenciando a alta concentração e ótimo rendimento resultante da expressão em larga escala, o que pode ser confirmado com base no tamanho da banda na Figura 2. Já a proteína CSIP06+CSIP08 possuía 0,38 mg/ml, rendimento menor quando comparado a proteína CSIP13, mas ainda assim satisfatório para a finalidade proposta para essa proteína.

4. CONCLUSÕES

Deste trabalho, conclui-se que houve sucesso no protocolo utilizado para a transformação e expressão das proteínas recombinantes. A proteína CSIP13 apresentou um rendimento final excelente, dada a grandeza da expressão, e a proteína CSIP06+CSIP08 obteve uma concentração final de proteína satisfatória. Ademais, após ser realizado o *Western blot* para confirmar que as proteínas são recombinantes, estas serão utilizadas em experimentos de vacinologia, com a finalidade de avaliar o seu potencial na proteção contra leptospirose letal aguda.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. & DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, Netherlands. v.140, n.3-4, p.287-296. 2010.

ADLER, B. ***Leptospira* and Leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg, 2015

COSTA, F., et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, University of Tennessee, United States, v.9, n.9, p. 1-19. 2015.

GRASSMANN, A.A., SOUZA, J.D. & MCBRIDE, A.J.A. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? **Frontiers in Immunology**, Lausanne, Switzerland. v.8, p.1-8, 2017

HAAKE, D. A. & LEVETT, P. N.. Leptospirosis in humans. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. Berlin/Heidelberg, Germany, v.387, p.65-97, 2015.

NEWCOMBE, J. et al. Identification of immunoproteome of the meningococcus by cell surface immunoprecipitation and MS. **Microbiology Society**, London, United Kingdom, v.160, p.429-438, 2014.

PORTAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica da Leptospirose**, Brasil, 04 de set. 2019. Acessado em 04 de set. de 2019. Online. Disponível em:
<https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/19/Casos-Lepto-18-07-2019.pdf>

ZUERNER, R. L. (2015). Host response to leptospira infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin/Heidelberg, Germany, v.387, p.223-250, 2015.