

PRODUÇÃO DA PORÇÃO N-TERMINAL DA LIPOPROTEÍNA DE MEMBRANA LigB DE *Leptospira* EM *Escherichia coli*

RODRIGO A. SCHUCH¹; KÁTIA L. BACELO¹; THAÍS L. OLIVEIRA¹; DAIANE D.
HARTWIG¹; KARINE M. FORSTER¹; ODIR A. DELLAGOSTIN^{1,2}

¹Laboratório de Vacinologia – CDTec/UFPel – rschuch.biotec@ufpel.edu.br
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

²Email orientador: odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose com ampla distribuição mundial causada por bactérias espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, sendo transmitida aos humanos através do contato direto ou indireto com a urina de animais reservatórios, os quais possuem a bactéria presente em seus túbulos renais (TUNCUNDUVA *et al*, 2008). Considerada um problema de saúde pública, possui maior incidência nas populações residentes em regiões tropicais com condições de saneamento básico precárias. Estima-se uma incidência de 350 a 500 mil casos anuais da doença, dos quais 10% evoluem para sua forma grave, denominada Síndrome de Weil, podendo causar icterícia, falência renal e hemorragia pulmonar (GOLVEIA *et al*, 2008; Ko *et al*, 2009).

A vacinação é um dos métodos mais eficazes na prevenção e erradicação de doenças infecciosas. As atuais vacinas disponíveis contra leptospirose são compostas por bactérias inteiras inativadas, as quais induzem uma resposta imunológica sorovar-específica, não conferindo proteção contra sorovares que não compõem a vacina (McBRIDE *et al*, 2005). Contudo, proteínas presentes na membrana vêm sendo produzidas de forma recombinante e demonstrando serem antígenos vacinais protetores (BRANGER *et al*, 2005; SILVA *et al*, 2007, COUTINHO *et al*, 2011). Dentre essas proteínas, destacam-se as chamadas adesinas, em especial, a LigB, com tamanho de 212 kDa, pertencente a superfamília *Leptospiral Immunoglobulin-Like* (Lig), sendo caracterizada por apresentar repetições de 12 a 13 domínios de afinidade por imunoglobulina, possuindo ainda alta identidade em sua região dita conservada, na porção N-terminal (LigBrep) em relação a outras proteínas da mesma família (MATSUNAGA *et al*, 2003). Seu papel na patogênese durante a infecção está relacionado com sua ligação a componentes da matriz extracelular, como fibrinogênio, colágeno e laminina, favorecendo a invasão e ligação as células do hospedeiro (Ko *et al*, 2009).

Devido a sua importância na imunobiologia do patógeno, o presente trabalho visou a produção da proteína recombinante LigBrep a partir de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, que possui elevada prevalência em cães (ANDRE-FONTAINE, 2006), para posterior avaliação como antígeno vacinal contra leptospirose.

2. METODOLOGIA

2.1. Amplificação e clonagem da sequência gênica

A sequência do gene *ligBrep* foi obtida a partir do DNA genômico extraído da cepa Honda Utrecht (HU) de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. Os primers utilizados na amplificação do gene foram desenhados com o auxílio do programa Vector NTI 10 (Invitrogen) (Tab. 1). A sequência foi amplificada através

da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto da reação purificado com o kit *GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O fragmento obtido foi submetido à clonagem no vetor pAE (RAMOS et al., 2004) através de reações de digestão com endonucleases *XhoI* e *PstI* e ligação ao vetor pela enzima T4 DNA Ligase. O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar *Escherichia coli* TOP10. As colônias recombinantes originadas foram submetidas a uma triagem rápida com fenol-clorofórmio, seguida por digestão com as endonucleases citadas acima. O clone considerado recombinante foi então cultivado em meio Luria Bertani (LB) para expansão do plasmídeo, o qual foi extraído com o kit *GFX™ Micro Plasmid Prep* (GE Healthcare).

Tabela 1 - *Primers* utilizados para amplificação da *ligBrep*.

Fragmento	Primer	Enzima de Restrição
<i>ligBrep</i>	F 5' CCGCTCGAGATTACCGTTACACCAGCC 3'	<i>XhoI</i>
	R 5' CCGCTGCAGCGTATTAGAGGAAT 3'	<i>PstI</i>

2.2. Produção e purificação da proteína

O vetor plasmidial produzido foi utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) Star para expressão da proteína recombinante. As células transformadas foram cultivadas sob agitação (200 rpm) a 37 °C em 500 mL de Yeast Tryptone Medium (2YT), contendo ampicilina, até atingirem a fase log de crescimento ($DO_{600} = 0.6 - 0.8$). O cultivo foi então induzido com 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e mantido sob as mesmas condições de cultivo durante mais 3 horas.

A proteína recombinante com cauda de histidina (6xHis) foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™). A expressão proteica do fragmento foi avaliada em SDS-PAGE 12% e por *Western blot* utilizando-se anticorpo anti-histidina. A quantificação da proteína foi realizada utilizando o kit Pierce® BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fragmento *ligBrep* foi amplificado e ligados de forma eficiente ao vetor de clonagem pAE (Fig. 1), resultando no plasmídeo recombinante denominado pAE/*ligBrep*, conforme representação (Fig. 2).

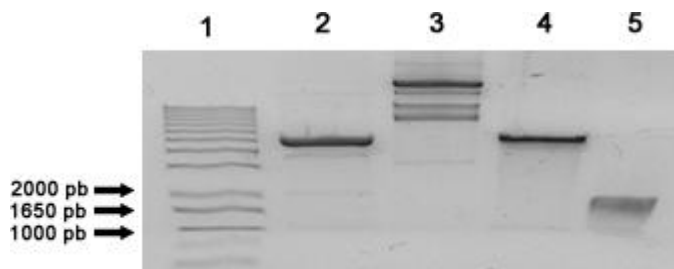


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. (1) Padrão de peso molecular 1Kb Plus; (2) Vetor pAE (2831 pb); (3) Vetor pAE/*ligBrep* (4335 pb); (4) Vetor pAE/*ligBrep* após digestão com endonucleases *XhoI* e *PstI*; (5) Fragmento *ligBrep* amplificado por PCR (1504 pb).

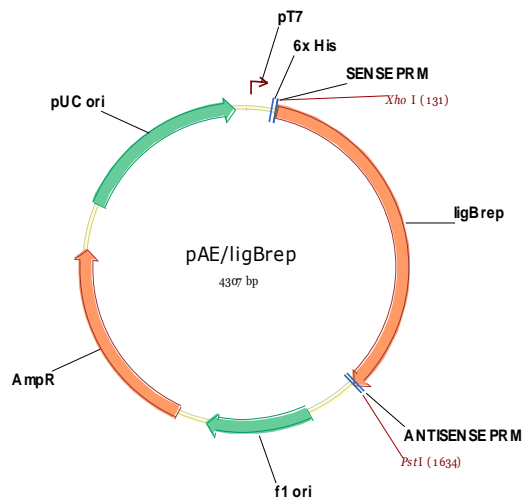


Figura 2. Representação gráfica do vetor recombinante pAE/ligBrep, obtido por análise *in silico* através do programa Vector NTI 10.

Após cultivo do clone recombinante, a proteína expressa foi purificada por cromatografia de afinidade e visualizadas em gel SDS-PAGE 12% e em um *Western blot* com conjugado anti-histidina (Fig. 3). A quantificação da proteína recombinante demonstrou rendimento de 4,05 mg/L, sendo compatível com outras proteínas expressas anteriormente utilizando a mesma metodologia (SCHUCH, 2011).

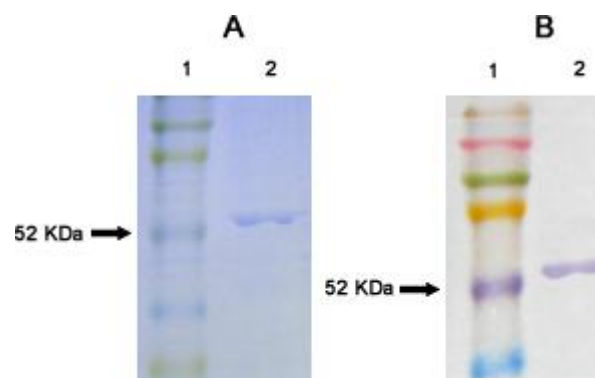


Figura 3. Gel SDS PAGE 12% (A) e *Western blot* (B), demonstrando a pureza da proteína recombinante LigBrep após processo de purificação. (1) Marcador Full-Range Rainbow Molecular Weight Maker; (2) LigBrep (54 kDa).

4. CONCLUSÕES

A estratégia adotada para construção do vetor de expressão foi eficaz. O gene alvo de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola foi amplificado, clonado e posteriormente expresso com sucesso em *E. coli*, possibilitando a purificação da proteína de interesse, sendo obtida em quantidade suficiente para os estudos posteriores de avaliação da resposta imune e potencial imunoprotetor induzidos por este antígeno, contribuindo para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRE-FONTAINE, G., Canine leptospirosis - Do we have a problem?. **Vet Microbiol.**, v. 117, nº. 1, p. 19-24, 2006.

BRANGER, C., CHATRENET, B., GAUVRIT, A., Protection against *Leptospira interrogans sensu lato* challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect Immun**, v. 73, p. 4062-4069, 2005.

COUTINHO, M.L., CHOY, H.A., KELLEY, M.M., MATSUNAGA, J., BABBITT, J. T. A LigA Three-Domain Region Protects Hamsters from Lethal Infection by *Leptospira interrogans*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, nº 12, p. 1422-1434, 2011.

GOLVEIA, E.L., METCALFE, J., de CARVALHO, A.L. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome. **Emerg. Infect. Dis.** v. 14, p. 505-508, 2008.

Ko, A. I., GOARANT, C., MICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, nº. 10, p. 736-747, 2009.

MATSUNAGA, J. Barocchi M. A., Croda, J., Young T. A., Sanchez Y., Siqueira, I., Bolin, C. A., Reis, M. G., Riley, L. W., Haake, D. A., Ko, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, nº. 4, p. 929-945, 2003.

McBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G, Ko, A.I. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, nº. 5, p. 376-386, 2005.

RAMOS, C. R., ABREU, P.A., NASCIMENTO, A.L., HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide: **Braz. J Med.Biol. Res.**, v. 37, nº. 8, p. 1103-1109, 2004.

SILVA, E.F., MEDEIROS, M.A., McBride, A.J. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 24, p. 6277-6286, 2007.

SCHUCH, R.A., BACELO, K.L., HARTWIG, D.D., FORSTER, K.M., DELLAGOSTIN, O.A. Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes da superfície da membrana de *Leptospira* em *Escherichia coli*. **XX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – UFPEL**. Pelotas, 2011. Anais: Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes da superfície da membrana de *Leptospira* em *Escherichia coli*. Pelotas: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PRPPG), 2011, vol.x. p. xxx.

TUCUNDUVA, M., CALDERWOOD, M.S., ATHANAZIO, D.A., McBride, A.J., HARTSKEERL, R.A. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Trop**, v. 108, p. 1-5, 2008.