

## EXPRESSÃO DA PROTEÍNA rLigBrep NA FORMA SOLÚVEL E CARACTERIZAÇÃO COM SORO HUMANO

NEIDA CONRAD<sup>1</sup>; MAURÍCIO TAMBORINDEGUY<sup>2</sup>; CAROLINE GONÇALVES<sup>3</sup>;  
WALLACE PEREIRA<sup>4</sup>; MATHEUS FABRES<sup>5</sup>; ALAN JOHN ALEXANDER  
MCBRIDE<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – CDTec – Núcleo de Biotecnologia – Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas - neidaconrad@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – CDTec – Núcleo de Biotecnologia – Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – mauriciotamborindeguy@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – CDTec – Núcleo de Biotecnologia – Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – carolamurim@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – CDTec – Núcleo de Biotecnologia – Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – wallpereira@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – CDTec – Núcleo de Biotecnologia – Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – matheusfabres@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – CDTec – Núcleo de Biotecnologia – Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas - alan.mcbride@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global, reconhecida hoje como uma doença infecciosa emergente e negligenciada (ADLER; DE LA PENA MOCTEUMA, 2010). A doença é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, o qual também inclui espécies saprófitas (LEVETT, 2001). Estima-se que anualmente ocorram de 350 a 500 mil casos graves de leptospirose em humanos sendo esta considerada um importante problema de saúde pública (FORSTER et al., 2013). No Brasil, mais de 10.000 casos de leptospirose são confirmados anualmente, com surtos surgindo durante os períodos de enchentes (MCBRIDE et al., 2005).

As vacinas contra leptospirose disponíveis atualmente são bacterinas compostas por um painel limitado de sorovares locais, as quais conferem uma proteção de curta duração e sorovar-específica, além de haver efeitos colaterais (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra leptospirose, com imunoproteção cruzada contra diferentes sorovares, permanece um desafio, e por isso, os esforços para o desenvolvimento de vacinas recombinantes.

As proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*), têm sido apontadas como candidatas promissoras para o desenvolvimento de uma vacina, pois localizam-se na membrana externa das leptospiros e são fortemente reconhecidas pelo soro de pacientes diagnosticados com a doença (MATSUNAGA et al., 2003; CRODA et al., 2007). LigA e LigB possuem repetições em tandem de aproximadamente 90 resíduos de aminoácidos. Essas proteínas apresentam 100% de identidade nos domínios repetitivos de suas porções N-terminal (polipeptídeo LigBrep). O gene *ligA* está presente somente nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*, enquanto que o gene *ligB* é conservado em todas as espécies de leptospiros patogênicas (MCBRIDE et al., 2009).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi expressar rLigBrep para posterior avaliação do seu potencial para o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose.

### 2. METODOLOGIA

A construção do vetor recombinante topo/LigBrep foi realizada previamente no Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas do Núcleo de Biotecnologia (SILVA et al., 2007).

O vetor recombinante topo/LigBrep foi usado para transformar a cepa de expressão *E. coli* BL21Star(DE3) por choque térmico. Após a transformação, as células recombinantes foram cultivadas em placa contendo o meio ágar Luria Bertani (LB) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina.

Um clone recombinante foi selecionado para inocular 25 mL de LB contendo 100 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. O cultivo foi incubado a 37°C para ~16 h. Esta cultura foi utilizada para inocular 500 mL de LB contendo 100 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. O inóculo foi incubado em agitador orbital a 200 rpm a 37°C até atingir densidade ótica a 600 nm (D.O<sub>600</sub>) entre 0,6 – 0,8. Neste momento, a expressão de rLigBrep foi induzida com 1mM de IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) e os cultivos incubados novamente. Foram realizados dois cultivos de 500 mL os quais nesta etapa foram submetidos a distintas condições de indução: a) indução a 28°C por 18 horas; b) indução a 37°C por 3 horas. Após o período de incubação a cultura foi centrifugada a 8000 g por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em um tampão de solubilização acrescido de 8 M de uréia e submetido a agitador orbital a 60 rpm por 18 horas a temperatura ambiente. As células foram então lisadas por cinco sucessivos ciclos de sonicação (15 s, 20 kHz) e centrifugadas a 10000 g por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 4°C. Foram coletadas amostras do sobrenadante e *pellet* para avaliação da expressão através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12 %.

A expressão foi confirmada através de *Western blot*. Neste teste, uma das membranas foi incubada com o anticorpo monoclonal anti-histidina e a outra com soro humano positivo para leptospirose. Após o período de incubação e lavagem foram adicionados a estas membranas anticorpos polivalentes de cabra anti-camundongo e anticorpos polivalentes anti-humano, respectivamente. Todas as reações dos anticorpos foram realizadas em temperatura ambiente sob agitação orbital por 1 hora, e entre cada etapa a membrana foi lavada por 3 vezes com PBS-T. Para a visualização das bandas a membrana foi colocada em solução cromógena contendo DAB (tetrahydrocloro de 3,3'-diaminobenzedina).

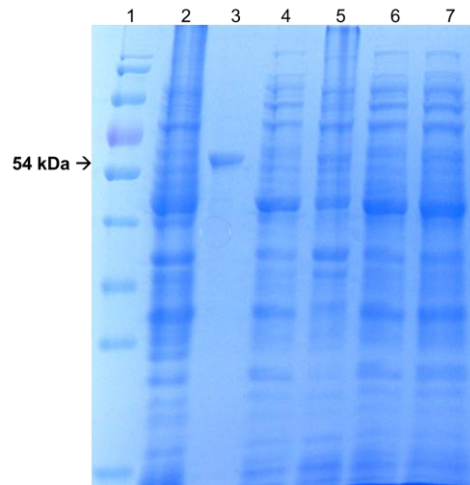
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão da proteína rLigBrep foi eficiente nas diferentes condições de indução: a) indução a 28°C por 18 horas b) indução a 37°C por 3 horas (Figura 1). Diversos pesquisadores estão trabalhando no desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico para leptospirose utilizando rLigBrep. Estes trabalhos relatam sua expressão nas condições de indução a 37°C por 3-4 horas (FORSTER et al., 2013; MONTE et al., 2011).

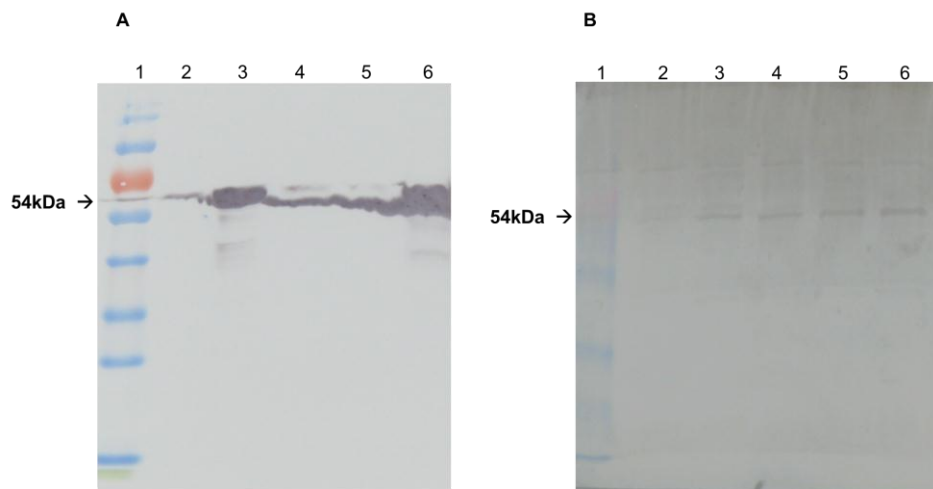
Proteínas heterólogas na sua forma insolúvel formam agregados intracelulares decorrentes de seu incorreto dobramento quando polimerizadas, e isto dificulta sua purificação (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Através da eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS 12% sugere-se que a rLigBrep está sendo expressa nas duas formas: solúvel e insolúvel (Figura 1). A obtenção de rLigBrep na sua forma solúvel é inédita e facilita os processos de purificação e diálise.

A confirmação da expressão e caracterização de rLigBrep foi realizada através da técnica de imunoblot. Foi observada a reação da proteína recombinante com o anticorpo monoclonal anti-histidina, apresentando bandas de

aproximadamente 54 kDa, massa correspondente a rLigBrep (Fig. 2A). O imunoblot feito com o soro coletado de pacientes com leptospirose também reconheceu a rLigBrep (Fig. 2B).



**Figura 1.** Análise da expressão através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. 1. Marcador de massa molecular; 2. Sem indução; 3. Controle positivo (rLigBrep); 4. Sobrenadante induzido a 28°C por 18 horas; 5. Pellet induzido a 28°C por 18 horas; 6. Sobrenadante induzido a 37°C por 3 horas; 7. Pellet induzido a 37°C por 3 horas.



**Figura 2.** Confirmação da expressão de rLigBrep através de imunoblot. A) reação com o anticorpo monoclonal anti-histidina; B) reação com soro humano positivo para leptospirose. 1. Marcador de massa molecular; 2. Controle positivo (rLigBrep); 3. Sobrenadante induzido a 28°C por 18 horas; 4. Pellet induzido a 28°C por 18 horas; 5. Sobrenadante induzido a 37°C por 3 horas; 6. Pellet induzido a 37°C por 3 horas.

A partir da análise do imunoblot notou-se que rLigBrep foi reconhecida por anticorpos produzidos contra *Leptospira* spp. presentes em soro humano. Desta forma, acredita-se que esta proteína possui grande potencial para ser utilizada em testes de diagnóstico ou como alvo para a produção de uma vacina de subunidade contra leptospirose.

#### 4. CONCLUSÕES

A expressão de rLigBrep foi obtida com sucesso nas diferentes condições de indução testadas: a) indução a 28°C por 18 horas; b) indução a 37°C por 3 horas.

A expressão de rLigBrep foi obtida na duas formas insolúvel e solúvel. A forma solúvel proporciona diversos benefícios, dentre eles facilita o processo de purificação.

A proteína rLigBrep foi reconhecida por soro humano positivo para leptospirose. Dessa forma, acredita-se que rLigBrep é um excelente alvo para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra leptospirose.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis **Vet Microbiol.** 140(3-4) p.287-96, 2010.

CRODA, J.; RAMOS, J. G. R.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Leptospira* Immunoglobulin-Like Proteins as a Serodiagnostic Marker for Acute Leptospirosis. **J. Clin Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 1528-1534, 2007.

FORSTER, K. M.; HARTWIG, D. D.; SEIXAS F. K.; BACELO, K. L.; AMARAL, M.; HARTLEBEN C. P.; DELLAGOSTIN, O. A. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. **Clinical Vaccine Immunology.** 20(5):725-31, 2013.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p. 296-326. 2001.

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. **Molecular Microbiology** 49(4): 929–945. 2003.

MCBRIDE, A. J. A., CERQUEIRA, G. M., SUCHARD, M. A., MOREIRA, A. N., ZUERNER, R. L., REIS, M. G., HAAKE, D. A., KO, A. I. & DELLAGOSTIN, O. A. Genetic diversity of the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.196–205, 2009.

MCBRIDE, A.J.A., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., KO, A.I. **Leptospirosis. Current opinion in infectious diseases**, v.18, p. 376-386, 2005.

MONTE, L. G.; CONCEIÇÃO, F. R.; COUTINHO, M. L.; SEIXAS, F. K.; SILVA, E. F.; VASCONCELLOS, F. A.; CASTRO, L. A. S.; HARTLEBEND C. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Monoclonal antibodies against the leptospiral immunoglobulin-like proteins A and B conserved regions. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.** v. 34, n. 5, p.441–446, 2011.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. *Molecular cloning – A Laboratory Manual.* 3ª edição, CSHL PRESS, 2001.

SILVA, É. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; 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.