

## CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA LEPTOSPIROSE ANIMAL

IVÂNIA DELIBERALLI<sup>1</sup>; ÉVERTON BETTIN<sup>2</sup>; NAJARA BITTENCOURT<sup>2</sup>; AMILTON SEIXAS NETO<sup>2</sup>; KARINA COLONETTI<sup>2</sup>; EVERTON FAGONDE DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, CDTec, Laboratório de Vacinologia – [iv.deliberalli@gmail.com](mailto:iv.deliberalli@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, CDTec, Laboratório de Vacinologia – [tombettin@outlook.com](mailto:tombettin@outlook.com); [najaracb@gmail.com](mailto:najaracb@gmail.com); [amiltonseixas@gmail.com](mailto:amiltonseixas@gmail.com); [kcolonetti@gmail.com](mailto:kcolonetti@gmail.com);

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária – [fagondee@gmail.com](mailto:fagondee@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Atualmente, estão descritas 13 espécies patogênicas de leptospiros e mais de 260 sorovares. Os sorovares antigenicamente relacionados são classificados em sorogrupos, compreendendo 29 sorogrupos distintos (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). A variedade sorológica é consequência da diversidade antigênica causada, principalmente, pelo lipopolissacarídeo (LPS), o qual é estruturalmente distinto do encontrado em bactérias Gram-negativas. As leptospiros possuem estrutura de dupla membrana, com grande quantidade de proteínas expostas na superfície da bactéria (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O seqüenciamento de genomas de leptospiros proporcionou o conhecimento de centenas de genes, que apesar de as proteínas correspondentes não possuírem função conhecida ou comprovada, estão anotadas como prováveis proteínas de membrana externa ou lipoproteínas (NASCIMENTO et al., 2004).

A leptospirose animal é caracterizada por altos índices de abortos, natimortos, infertilidade e redução na produção de leite. Desta forma, a indústria agropecuária sofre grande impacto econômico, com prejuízos para os produtores e, conseqüentemente, para a economia dos países acometidos (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Ainda são escassos os dados oficiais referentes à ocorrência da enfermidade em animais no Brasil. A prevalência sorológica em animais é estimada em torno de 35%, com mais de 80% das propriedades rurais apresentando casos da doença (LILENBAUM; DOS SANTOS, 1995; MARTINS et al., 2011). Além do importante impacto econômico, a doença nos bovinos é considerada como um fator de risco ocupacional para veterinários, magarefes e produtores rurais (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

A vacinação contra leptospirose bovina é realizada com bacterinas dos sorovares endêmicos na região (DELLAGOSTIN et al., 2011). Esta vacinação apresenta uma série de limitações, onde destacam-se: (i) reações adversas à vacina; (ii) proteção apenas contra os sorovares incluídos na vacinação; (iii) necessidade de estudos epidemiológicos continuados para conhecer todos os sorovares endêmicos e incluí-los na vacinação; (iv) resposta imune de curta duração, necessitando de múltiplas doses para manutenção da imunidade (DELLAGOSTIN et al., 2011). Além disso, a resposta imune protetora é pouco compreendida. Na maioria das espécies a vacinação parece induzir resposta humoral com predomínio de anticorpos protetores anti-LPS. Em bovinos, bacterinas que induzem altos títulos de anticorpos anti-LPS não são protetoras, enquanto bacterinas que induzem potentes respostas celulares apresentam maior proteção (ZUERNER et al., 2011).

Frente a esses problemas, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de uma vacina protetora contra a leptospirose bovina, de amplo espectro e com imunidade de longa duração. Nas últimas décadas, o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas de Imunologia e Biologia Molecular, lançou bases para avanços na tecnologia de produção de vacinas. Isto permitiu a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram desenvolvidos novos protocolos de administração e apresentação desses antígenos para as células do sistema imune. Nesse contexto, este estudo tem por objetivo realizar a clonagem, expressão, purificação e caracterização de três lipoproteínas de membrana de *Leptospira borgpetersenii* sorovar Ballum 4E: lic10260, lic10365 e lic11360, as quais serão utilizadas no desenvolvimento de vacinas recombinantes para o controle da leptospirose.

## 2. METODOLOGIA

- **Cepas, cultivo e extração de DNA:** A cepa de leptospiros virulentas que utilizadas neste estudo foi *Leptospira borgpetersenii* sorovar Ballum 4E. As leptospiros foram cultivadas em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) e mantidas a 29°C. Foram realizados repiques semanais da cultura, acompanhados de contagem de células bacterianas em câmara de Petroff-Hausser. 10<sup>8</sup> células foram centrifugadas e utilizadas para extração de DNA genômico utilizando o kit comercial illustra<sup>TM</sup> bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare).

- **Escolha de LICs e desenho dos primers:** A partir da sequência genômica, disponível no banco de dados GenBank (NCBI) foram selecionadas 3 sequências codificadoras. As sequências foram escolhidas a partir de informações sobre as proteínas correspondentes, obtidas em análises no banco de dados UniProt Knowledgebase (UniProtKB). Os requisitos desejáveis para inclusão de uma sequência codificadora no trabalho foram: proteínas de membrana externa expostas na superfície, prováveis lipoproteínas, cuja função esteja relacionada a algum processo patogênico e que ainda não foram avaliadas quanto à imunoproteção. Uma vez escolhida a sequência, foram desenhados primers com o auxílio do software Vector NTI 11 (Invitrogen). Cada primer adicionou a uma extremidade da sequência alvo um sítio para enzima de restrição que permitiu a clonagem no vetor pAE de expressão em *Escherichia coli*. Quando presente a sequência para o peptídeo sinal não será incluída na porção do gene amplificada.

- **Clonagem e caracterização de recombinantes:** A amplificação das sequências alvo foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando como DNA molde o DNA de *Leptospira borgpetersenii* sorovar Ballum 4E, conforme as características da sequência em questão. O produto da reação foi purificado com kit comercial (illustra<sup>TM</sup> GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification kit - GE) e visualizado por eletroforese em gel de agarose. Em seguida vetor e inserto foram digeridos com as mesmas enzimas de digestão *Bam*HI e *Hind*III e ligados. O produto da reação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 por eletroporação. Após a transformação as células foram cultivadas em meio LB sólido suplementado com ampicilina. As colônias transformantes foram submetidas à extração rápida de DNA por fenol-clorofórmio, e o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose para análise do tamanho aparente do plasmídeo presente. As colônias que apresentaram prováveis vetores recombinantes foram selecionadas e expandidas em LB líquido suplementado com ampicilina. O plasmídeo foi purificado

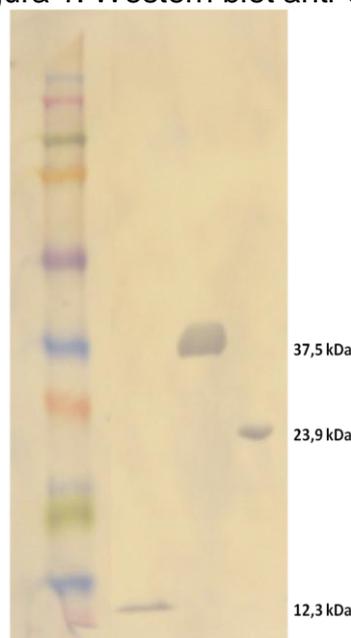
pelo kit comercial *illustra™ plasmidPrep Mini Spin kit* e em seguida submetido a confirmação de presença de inserto por PCR com os mesmos primers utilizados na primeira amplificação e digestão com enzimas de restrição.

- **Expressão, purificação e antigenicidade das proteínas recombinantes:** Os vetores recombinantes foram utilizados para transformar *E. coli* BL21 Star™ por choque térmico. Após transformadas, as células foram cultivadas em 25 mL de LB líquido com ampicilina *overnight* e utilizadas como inoculo em 500 mL do mesmo meio. Quando a densidade óptica a 600 nm atingiu 0,6-0,8 a expressão da proteína recombinante foi induzida por 1 mM de IPTG. Após 3 horas de expressão as células foram centrifugadas e lisadas para purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade ao níquel. As alíquotas de proteína foram analisadas quanto à pureza por eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram quantificadas utilizando o kit comercial *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific Pierce). Em seguida as proteínas purificadas foram submetidas a *western blot* com anticorpo monoclonal anti-6xHis para caracterização da antigenicidade das proteínas obtidas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três genes foram identificados e selecionados para expressão de proteínas recombinantes, as lic10260, lic10365 e lic11360. O processo de clonagem resultou nos vetores recombinantes pAE/lic10260, pAE/lic10365 e pAE/lic11360. A caracterização dos vetores pela digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III resultou em um padrão de fragmentação condizente ao esperado: 2080pb e 350pb para pAE/lic10260, 2080pb e 1080pb para pAE/lic10365 e 1080pb e 596pb para pAE/lic11360. As proteínas foram eficientemente expressas em *E. coli* cepa Star e purificadas. O WB realizado com anticorpo anti-6xHis identificou as proteínas recombinantes purificadas no tamanho esperado, 12,3 kDa para rLIC10260, 37,5 kDa para rLIC10365 e 23,9 kDa para rLIC11360 (Figura1).

Figura 1: Western blot anti-6xHis



#### 4. CONCLUSÕES

As proteínas rLIC10260, rLIC10365 e rLIC11360 são antígenos potenciais para a produção de uma vacina multi-sorovar contra leptospirose. A expressão em sistema *E. coli* de expressão heteróloga e a purificação por cromatografia de afinidade são eficientes para a obtenção destas proteínas. Futuros experimentos envolvem a avaliação do caráter imunoprotetor dessas proteínas no modelo animal *Mesocricetus auratus*, através de desafios homólogo e heterólogo.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ADLER, B., DE LA PENA MOCTEZUMA, A.. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v. 3-4, n. 140, p. 287-296, 2010.
- CHAGAS-JUNIOR, A. D.; MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; FIGUEIRA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. e MCBRIDE, F. W. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **J Med Microbiol**, v.58, n.12, p. 1632-7, 2009.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FÉLIX, S.R.; DA SILVA, É. F.; MCBRIDE, A.J.. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Hum Vaccin**, v. 7, n. 11, p. 1215-24, 2011.
- ELLIS, W. A.; O'BRIEN, J. J.; BRYSON, D. G.; MACKIE, D. P.. Bovine leptospirosis: infection by the Hebdomadis serogroup and mastitis. **Vet Rec**, v. 99, n. 19, p. 368-370, 1976.
- FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C. e PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne, Australia: MediSci. 1999.
- HIGGINS, R.; CAYOUILLE, P.; HOQUET, F.; DE LASALLE, F.. Serological studies on leptospirosis in domestic animals in Quebec. **Can J Comp Med**, v. 44, n. 2, p. 229-231, 1980.
- LEVETT, P. N.. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n. 2, p. 296-326, 2001.
- LILENBAUM, W.; DOS SANTOS, R.. Leptospirosis in animal reproduction: Role of the hardjo serovar in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 37, n. 2, p. 87-92, 1995.
- MARTINS, G.; PENNA, B.; LILENBAUM, W.. Differences between seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de Janeiro, Brazil. **trop anim health prod**, v. 44, n. 3, p. 377-8, 2012.
- NASCIMENTO, A. L. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, v.186, n.7, p. 2164-72. 2004.
- SILVA, E. 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. e 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, n.33, p. 6277-86. 2007.
- VERNEL-PAUILLAC, F.; MERIEN, F... Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. **Infect Immun**, v. 74, n. 7, p. 4172-4179, 2006.
- ZUERNER, R. L.; ALT, D. P.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; OLSEN, S. C.. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 4, p. 684-69, 2011.