



## **PRODUÇÃO DE LfhA recombinante, UMA PROTEÍNA ENVOLVIDA NA PATOGENIA DE LEPTOSPIRAS**

**KUNKEL, Jessiane Prestes<sup>1</sup>; COUTINHO, Mariana Loner<sup>2</sup>; DINIZ, Juliana Alcoforado<sup>3</sup>; MONTE, Leonardo Garcia<sup>2</sup>; MENDONÇA, Marcelo<sup>2</sup>; SILVA, Éverton Fagonde<sup>2</sup>; CERQUEIRA, Gustavo<sup>2</sup>; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo<sup>2</sup>; DELLAGOSTIN, Odir Antônio<sup>2</sup>; ALEIXO, José Antonio Guimarães<sup>2</sup>.**

*1 Faculdade de Medicina - UFPel*

*2 Centro de Biotecnologia – CenBiot/UFPEL*

*3 Instituto de Biologia - UFPel*

*Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.*

*jessianekunkel@hotmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

Leptospirose é uma zoonose de distribuição global causada pela infecção por um dos mais de 230 sorovares pertencentes às espécies patogênicas de *Leptospira* (MATSUNAGA et al, 2005). Leptospiras patogênicas são organismos muito móveis e invasivos que rapidamente se disseminam nos órgãos alvo após penetrar no hospedeiro, usualmente através de abrasões na pele ou nas membranas mucosas (MATSUNAGA et al, 2003). O espectro da doença humana causada pelas leptospiras é extremamente amplo, variando de uma infecção subclínica a uma síndrome de infecção multissistêmica com alta mortalidade (LEVETT, 2001).

Os mecanismos pelos quais as leptospiras causam doença ainda não são bem compreendidos. Vários fatores de virulência têm sido sugeridos, mas com poucas exceções, seu papel na patogênese permanece obscuro. Alguns desses mecanismos são: a produção de toxinas, adesão ao epitélio renal, proteínas de superfície e mecanismos imunes (Levett, 2001).

Durante a fase leptospirêmica, a bactéria é exposta à componentes da via alternativa do complemento. Entretanto, as bactérias virulentas, ao contrário das avirulentas, são capazes de evadir este mecanismo de defesa inato e continuar a se reproduzir na corrente sanguínea (JOHNSON & HARRIS, 1967).

LfhA (*Leptospira factor H-binding protein A*) é uma proteína de 26 kDa, alvo de recentes estudos. Ela está envolvida na virulência das leptospiras, pois permite a captura do fator H, uma proteína plasmática que faz a regulação do sistema

complemento. O fator H, por sua vez, liga-se ao complexo C3b, removendo o complexo Bb do complexo C3 convertase. Além disso, ele também age como um cofator do fator I, que cliva C3b na sua forma inativa, iC3b, e impede que este complexo se ligue à superfície do patógeno e desencadeie uma cascata de reações que resultam na formação do complexo de ataque à membrana, opsonização do patógeno e recrutamento fagocitário (Verma et al, 2006). Desse modo, as leptospiros se protegem dos efeitos destrutivos da ativação do complemento em sua superfície, semelhante ao que ocorre com outros patógenos que desenvolveram mecanismos de ligação ao fator H como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia Hermsii*, *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae* (Verma et al, 2006).

O objetivo deste trabalho foi produzir LfhA recombinante (rLfhA) para ser utilizada posteriormente na produção e caracterização de anticorpos monoclonais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Um fragmento do gene *lfhA* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *Leptospira interrogans* L1 130 gentilmente cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com as orientações do fabricante.

Após digerir o vetor de expressão em *Escherichia coli* pAE e o produto da PCR com as enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI*, realizou-se a ligação do fragmento do gene com o vetor através da enzima T4 DNA ligase.

Um microlitro do produto da ligação foi utilizado para transformar, por eletroporação, 50µL de células de *E.coli* Top10F' competentes, as quais foram preparadas segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). As bactérias transformadas foram cultivadas em placa contendo meio LB suplementado com 100 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. As colônias recombinantes foram selecionadas através de um processo de triagem denominado microprep (JOUGLARD et al., 2005) e cultivadas em 5 mL de caldo LB suplementado com 100 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Um volume de 1,5mL desse cultivo foi utilizado para extração de DNA plasmidial a partir da técnica de lise alcalina, seguindo o protocolo de FlexiPrep™ Kit (GE Helthcare).

Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar por eletroporação células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS visando a expressão da proteína recombinante. Primeiramente foi realizada a expressão em pequena escala para verificação da expressão na cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada com o clone pAE/*lfhA*. Posteriormente, realizou-se a expressão em larga escala.

A seguir, foi realizado o teste da solubilidade e a purificação da (rLfhA) por cromatografia de afinidade em coluna Hi-Trap (GE Healthcare) carregada com níquel (Ni+2-Sepharose, Invitrogen) conforme instruções do fabricante. A presença da proteína recombinante foi visualizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. A rLfhA purificada foi dializada contra PBS, concentrada em polietilenoglicol e a sua concentração determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Clonagem do gene

O gene *lfha* (660pb) foi clonado no vetor pAE entre os sítios para enzimas *Hind*III e *Bam*HI e a construção *lfha/pAE* foi utilizada na transformação. Para a realização da microprep, foram utilizadas 20 colônias da placa transformada sendo que 15 colônias apresentaram plasmídeos com massa molecular maior que a do vetor pAE. (Figura 1). Destes, 5 colônias foram utilizadas para transformação por eletroporação de *E. coli* BL21(DE3) pLysS visando a expressão em pequena escala.

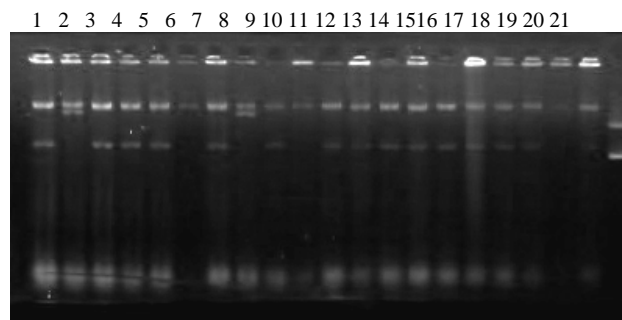


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose(0.8%). Colunas 1-20: DNA das colônias testadas em microprep; 21: DNA da colônia com o plasmídeo pAE sem o inserto.

### 3.2. Teste de solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado com o *pellet* obtido na expressão em larga escala. Foi possível observar no *pellet* uma banda de aproximadamente 25-27 KDa, massa molecular compatível com a rLfhA, sugerindo que a *E. coli* formou corpos de inclusão (agregado insolúvel de proteína recombinante) (Fig. 2).

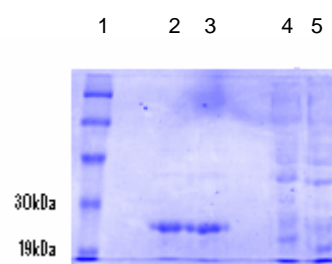


Figura 2. Gel SDS-PAGE (12%) teste de solubilidade. 1- marcador de massa molecular; 2 e 3 – fração insolúvel; 4 e 5 – fração solúvel.

### 3.3.Purificação

Conforme se observa na fig. 3 a proteína foi purificada e as frações de 1 – 4 foram dialisadas e concentradas. A purificação foi realizada com 0,2% de sarcosil e posteriormente serão testados outros métodos de solubilização da proteína.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

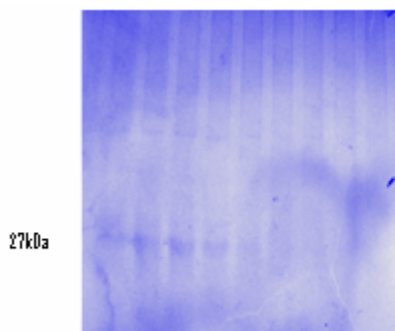


Figura 3. SDS-PAGE (12%) das alíquotas de rLfhA purificadas mediante cromatografia de afinidade. Colunas 1-5 - frações que apresentam a rLfhA; colunas 6-10- frações sem proteína.

A potencialidade do emprego de anticorpos monoclonais de especificidade definida em ensaios diagnósticos de leptospirose é enorme. Para isto, é necessário que sejam dirigidos contra estruturas imunogênicas que sejam conservadas apenas em sorovares patogênicos (RIBEIRO, 2003). A proteína LfhA é expressa durante a infecção e é encontrada somente em espécies patogênicas (Verma et al, 2006), tornando-se um alvo potencial para produção de anticorpos monoclonais com potencial em imunodiagnóstico. Além disso, proteínas de membrana de leptospirosas, como LfhA, são alvos potenciais na indução de respostas imunes no hospedeiro, e aquelas que também são conservadas entre os sorovares patogênicos são candidatas à produção de vacinas (WANG et al, 2007).

Após a quantificação, esta proteína recombinante foi utilizada com sucesso para produzir anticorpos monoclonais, resultando em um anticorpo monoclonal que deverá ser caracterizado e avaliado quanto à sua potencialidade para uso em métodos diagnósticos.

#### 4. CONCLUSÕES

A proteína foi produzida com sucesso para ser utilizada na produção e caracterização de anticorpos monoclonais.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.
- JOUGLARD, S.D.D. **Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de Leptospira spp. por seqüenciamento do 16S rDNA e análise de VNTR**. Tese (Doutorado) – 71f. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.
- LEVETT P.N. Leptospirosis. **Clinical microbiology reviews**, v.14,n.2, p. 296–326, 2001.
- MATSUNAGA J.; BAROCCHI M.A.; CRODA J.; YOUNG T.A.; SANCHEZ Y.; SIQUEIRA I.; CAROLE A.B.; REIS M.G.; RILEY L.W.; HAAKE D.A.; KO I.A. Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v.49,n.4, p. 929–945, 2003.
- MATSUNAGA J.; CULLEN P.A.; XU X.; SANCHEZ Y.; KO A.I.; HAAKE D.A.; ADLEN B. Surfaceome of Leptospira spp. **Infection and immunity**, v. 73,n.5, p. 4853–4863, 2005.
- RIBEIRO, MARICY. **Contribuição ao imunodiagnóstico da leptospirose humana: ênfase ao uso de anticorpos monoclonais**. 2003. Tese (Doutorado em Análises Clínicas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SAMBROOK J and RUSSELL D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York. ,2001.

JOHNSON, R. C., and V. G. HARRIS. Antileptospiral activity of serum II: leptospiral virulence factor. **Journal of Bacteriology**, V.93, n.S, p.513–519, 1967.

WANG Z.; JIN L.; WEGRZYN A. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, v.6, 2007.