

CLONAGEM DE GENES DE *Leptospira interrogans* EM VETORES DE EXPRESSÃO EM *Mycobacterium bovis* BCG Δ leuD

OLIVEIRA, Thaís Larré¹; HARTWIG, Daiane Drawanz¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling²; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – CDTec - UFPel

²Laboratório de Genômica funcional – Centro de Biotecnologia – CDTec - UFPel

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

thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de caráter global, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que tem reemergido como importante causa de mortalidade quando em sua forma severa, a qual é caracterizada por icterícia, falência renal e hemorragia pulmonar (Ko, 2009). As vacinas disponíveis, baseadas no microrganismo inativado, geram uma imunidade de curta duração e sorovar-específica já que direcionam a resposta imune para o lipopolissacarídeo (Barthi, 2003; Adler, 2009). Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de uma vacina que gere proteção cruzada contra os diferentes sorovares de *Leptospira* (McBRIDE, 2005).

As proteínas LigA e LigB tem sido apontadas como candidatas promissoras para o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose, pois localizam-se na membrana externa das leptospiros e são fortemente reconhecidas pelo soro de pacientes diagnosticados com a doença (Matsunaga, 2003; Koizumi, 2004; Croda, 2007). As proteínas do grupo Lig estão presentes apenas nas espécies patogênicas e possuem a propriedade de se ligarem em componentes da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e laminina (Palaniappan, 2002; Choy, 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 (fragmento LigBrep). Os domínios repetitivos das porções C-terminal, entretanto, apresentam grande diversidade (fragmentos LigAni e LigBni). LigB ainda possui um longo domínio C-terminal não repetitivo que está ausente em LigA (fragmento LigBCT) (Palaniappan, 2002; Matsunaga, 2003).

Mycobacterium bovis BCG oferece uma série de vantagens quando utilizado como vetor vacinal, como por exemplo: estabilidade, segurança, baixo custo de produção, capacidade adjuvante e indução de imunidade humoral e celular (Ohara and Yamada, 2001). Diversos antígenos heterólogos já foram expressos em BCG com sucesso (Bastos, 2009). Entretanto, a presença de genes de resistência a antibióticos nos vetores empregados para transformação de BCG compromete sua utilização como vacina vetorizada. BCG Δ leuD é uma cepa cujo gene para síntese de leucina foi nocauteado. O sistema de complementação auxotrófica de leucina funciona como marcador de seleção mais eficiente do que genes de resistência a antibiótico, pois mantém a seleção *in vivo* (Borsuk, 2007).

Este trabalho teve como objetivo clonar os fragmentos dos genes *ligA* e *ligB* no vetor pUP410 de forma a construir os vetores recombinantes para posterior expressão das proteínas em *M. bovis* BCG Δ leuD.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os fragmentos *ligAni*, *ligBni*, *ligBrep* e *ligBCT* foram amplificados por PCR com *primers* específicos contendo sítio de restrição para enzima *KpnI*, a partir de cassetes de expressão em *M. bovis* BCG Pasteur previamente construídos com a sequência do promotor de 18 kDa de *M. leprae*. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

O vetor de expressão em micobactéria pUP410, que carrega o gene $\Delta leuD$ para complementação auxotrófica da cepa BCG $\Delta leuD$ e possui origem de replicação em *E. coli* e em micobactéria, foi digerido com a enzima de restrição *KpnI*, assim como os fragmentos amplificados, e submetido ao tratamento com a enzima fosfatase alcalina (CIP). Os alvos amplificados foram ligados ao vetor pUP410 com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e o produto das ligações foi inserido em *E. coli* TOP10 através de eletroporação.

Os clones recombinantes gerados foram selecionados através de uma extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio. Esses clones foram propagados em meio líquido e submetidos à extração de plasmídeos com o kit *GFX™ Micro Plasmid Prep* (GE Healthcare). A extração de plasmídeo foi checada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e a presença do inserto foi confirmada por reação de PCR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências codificadoras *ligAni*, *ligBni*, *ligBrep* e *ligBCT* foram eficientemente amplificadas por PCR a partir dos cassetes de expressão em *M. bovis* BCG Pasteur, gerando fragmentos de 2078, 1747, 2029 e 1822 pb, respectivamente (Figura 1), o que equivale ao tamanho do gene somado à sequência do promotor de 18 kDa. Após purificação e digestão com a enzima *KpnI*, os produtos de PCR foram clonados com sucesso no vetor pUP410.

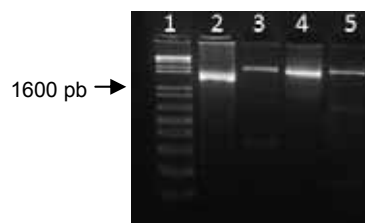


Figura 1: PCR dos fragmentos dos genes *ligA* e *ligB*. Coluna 1: Marcador de massa molecular 1kb Plus DNA ladder. Colunas 2-5: genes *ligBni*, *ligAni*, *ligBCT* e *ligBrep*, respectivamente.

Após a transformação por eletroporação em *E. coli*, foram selecionados quatro clones recombinantes, um para cada fragmento, os quais foram denominados pUP410/*ligAni*, pUP410/*ligBni*, pUP410/*ligBrep* e pUP410/*ligBCT* (Figura 2).

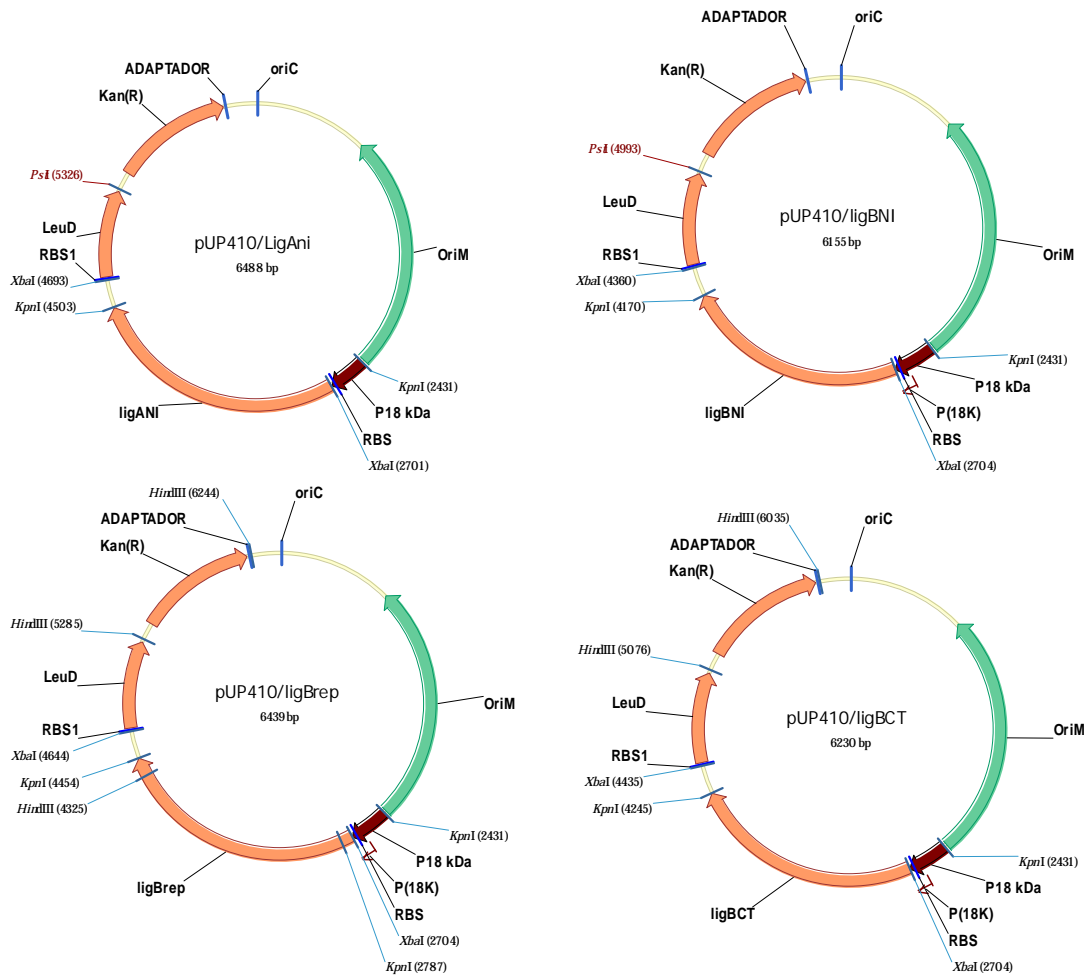


Figura 2: Mapa dos vetores de expressão em *M. bovis* BCG $\Delta leuD$ construídos.

Esses clones foram cultivados para extração dos plasmídeos, cujo resultado foi observado em gel de agarose (Figura 3). A presença do inserto foi confirmada através de reação de PCR, onde foi possível amplificar com sucesso as sequências alvo no tamanho esperado (dados não mostrados).

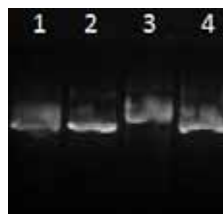


Figura 3: Extração dos plasmídeos utilizando o kit *GFXTM Micro Plasmid Prep*. Coluna 1-4: *pUP410/ligAni*, *pUP410/ligBni*, *pUP410/liBrep* e *pUP410/ligBCT*, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

As estratégias adotadas para construção dos vetores recombinantes foram bem sucedidas, em função da obtenção de clones recombinantes. As perspectivas futuras envolvem a avaliação da expressão das proteínas recombinantes em *M. bovis* BCG Δ leuD, para posteriores ensaios em hamsters com as vacinas vetorizadas construídas. Com isso, pretende-se analisar a resposta imune humoral e celular induzida pelas vacinas, bem como determinar o potencial imunoprotetor das mesmas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, B.; Peña Moctezuma, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* **140** (3-4), 287-296 (2009).
- Barthi, A. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 757-771 (2003).
- Bastos, R. G. *et al.* Recombinant Mycobacterium bovis BCG. *Vaccine.* **27**, 6495–6503 (2009).
- Borsuk, S. *et al.* Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in Mycobacterium bovis BCG. *Tuberculosis.* **87**(6), 474–80 (2007).
- Choy, H. A. *et al.* Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect. Immun.* **75**, 2441–2450 (2007).
- Croda, J. *et al.* *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1528–1534 (2007).
- Ko, A. *et al.* *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature.* **7**, 736-747 (2009).
- Koizumi, N. & Watanabe, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* **22**, 1545–1552 (2004).
- Matsunaga, J. *et al.* Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol. Microbiol.* **49**, 929–945 (2003).
- McBRIDE, A. *et al.* Leptospirosis. *Current Opinion Infectious Disease.* **18**, 376-386 (2005).
- Ohara, N.; Yamada, T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine.* **19**, 4089-4098 (2001).
- Palaniappan, R. U. *et al.* Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* **70**, 5924–5930 (2002).