

## CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA QUIMERA RECOMBINANTE LTB/NcSRS2 (ADJUVANTE/PROTEÍNA DE MEMBRANA DE *Neospora caninum*) EM *Escherichia coli*

**LORENZON, Lucas Bigolin<sup>1,2</sup>; GRASSMAN, André Alex<sup>2</sup>; GONÇALES, Relber Aguiar<sup>1</sup>; LEITE, Fábio Pereira Leivas<sup>2</sup>; BERNE, Maria Elizabeth<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas/Departamento de Microbiologia e Parasitologia.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas/Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc.  
[lucas\\_lorenzon@hotmail.com](mailto:lucas_lorenzon@hotmail.com).

### 1 INTRODUÇÃO

A neosporose é considerada uma doença parasitária emergente no mundo, sendo a principal causa de abortos na espécie bovina e responsável por alto percentual de mortalidade neonatal nestes animais, causando grandes perdas econômicas na pecuária de corte e de leite de vários países do mundo (BARR et al., 1997). Tal enfermidade é causada pelo parasito coccídeo intracelular obrigatório *Neospora caninum*, cujo ciclo de vida é composto por três estágios infecciosos: taquizoítos, cistos e oocistos (Dubey, 2003). Os hospedeiros definitivos de *N. caninum*, até o momento identificados, são o cão (*Canis familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998) e o coiote (*Canis latrans*). Em bovinos, a transmissão congênita, resultando em bezerros normais, mas infectados, é o principal meio de perpetuação da infecção dentro de um determinado rebanho (Dubey, 2003). O desenvolvimento de vacinas efetivas para prevenir a transmissão congênita traria benefícios para o controle da neosporose em rebanhos bovinos (HALDORSON et al., 2005). NcSRS2 (GenBank: AAX38605.1), uma proteína de membrana do estágio taquizoíta, é imunodominante e tem papel na ligação e invasão do parasito à célula hospedeira (NISHIKAWA et al., 2000) e tem potencial para ser utilizada como antígeno na produção de vacina contra neosporose (HEMPHILL et al., 1997).

Vacinas recombinantes têm seu potencial aumentado caso sejam administradas juntamente com adjuvantes. A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) é um potente adjuvante de mucosa e estimula uma ampla e duradoura resposta sistêmica com secreção de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados (WILLIAMS, 2000).

O objetivo deste trabalho foi construir uma fusão gênica utilizando LTB e a seqüência que codifica para o domínio imunogênico de NcSRS2, e expressá-la em *E. coli*, visando sua futura utilização em testes de imunogenicidade.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

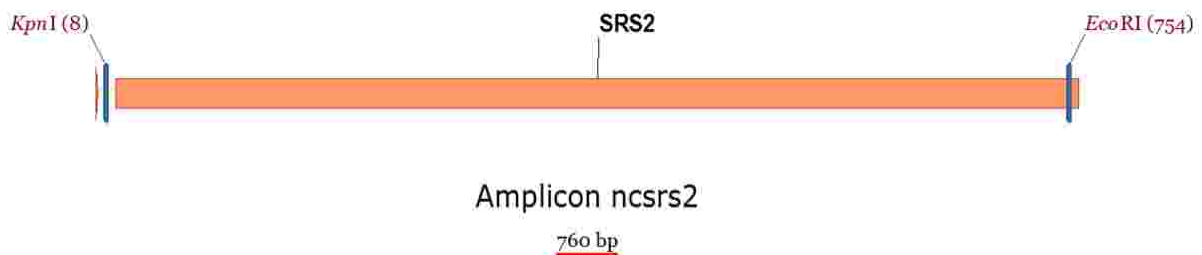
O desenho dos primers para amplificar o gene *ncsrs2*, bem como análises *in silico* pré-expressão, foi feito no programa Vector NTI v.11 (Invitrogen). Uma vez construídos os primers, amplificou-se o gene a partir do vetor recombinante pET201D-TOPO-*ncsrs2*, por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR). O produto da reação foi purificado por precipitação com isopropanol e digerido com enzimas de restrição, juntamente com o vetor pAE/LTB (FISHER et al., 2010). Após a digestão, foi feita nova purificação com isopropanol, e o inserto foi ligado ao vetor utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen). O produto dessa ligação foi usado para

transformar, por método de choque térmico, células de *E. coli* Top10. As células transformadas foram selecionadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido, contendo ampicilina a 100 µg/mL. As colônias que passaram pela seleção foram triadas por extração de plasmídeos para verificar quais portavam de fato o plasmídeo recombinante. O DNA plasmídeo de uma das colônias recombinantes foi utilizado para transformar quatro cepas de *E. coli* BL21 DE3: Artic Express, pLyss, Star e Rill.

As quatro cepas transformadas com pAE/LTB+*ncsrs2*, juntamente com Artic Express e Star transformadas com pAE/LTB e todas as cepas não transformadas (controle negativo), foram induzidas a expressar a proteína recombinante com IPTG 0,5 mM por três horas a 37°C, em meio LB líquido. Ao final da indução, 1 mL de cada cultivo foi centrifugado e teve seu *pellet* recuperado, para posterior avaliação da expressão da proteína de interesse, realizada por *Western Blotting* com anticorpos anti-histidina e anti-mouse conjugado à peroxidase.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises *in silico* realizadas no programa Vector NTI v.11 demonstraram que o tamanho do amplicon gerado seria de 760 pb (Fig. 1), e a químera LTB+NcSRS2 teria 363 aminoácidos, com um peso molecular de cerca de 39 kDa (Fig. 2).

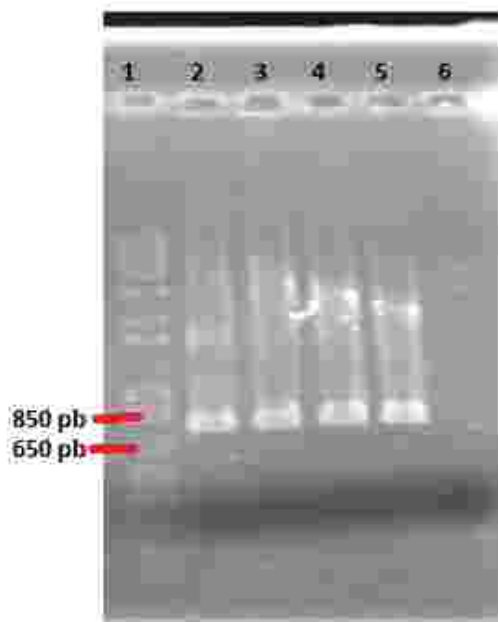


**Figura 1:** Análise *in silico* do tamanho em pares de base do amplicon.

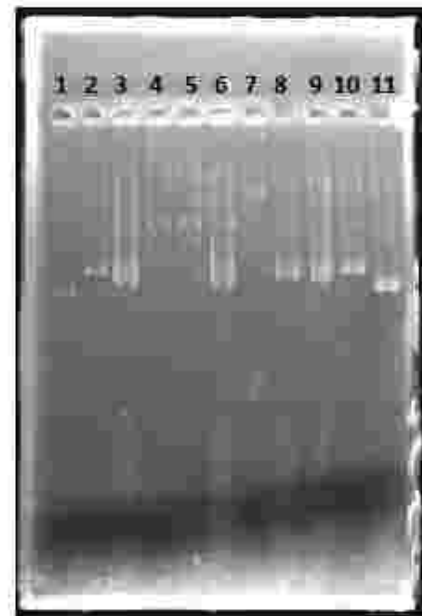
Analysis	Entire Protein
Length	363 aa
Molecular Weight	39026.10
1 microgram =	25.624 pMoles
Molar Extinction coefficient	31190
1 A[280] corr. to	1.25 mg/ml

**Figura 2:** Análise *in silico* do peso molecular da químera LTB+NcSRS2.

A amplificação de *ncsrs2* a partir de pET201D-TOPO-*ncsrs2* resultou em fragmentos condizentes com o tamanho esperado (Fig. 3). Das colônias triadas por extração de DNA plasmídico, 60% foram recombinantes (Fig. 4).

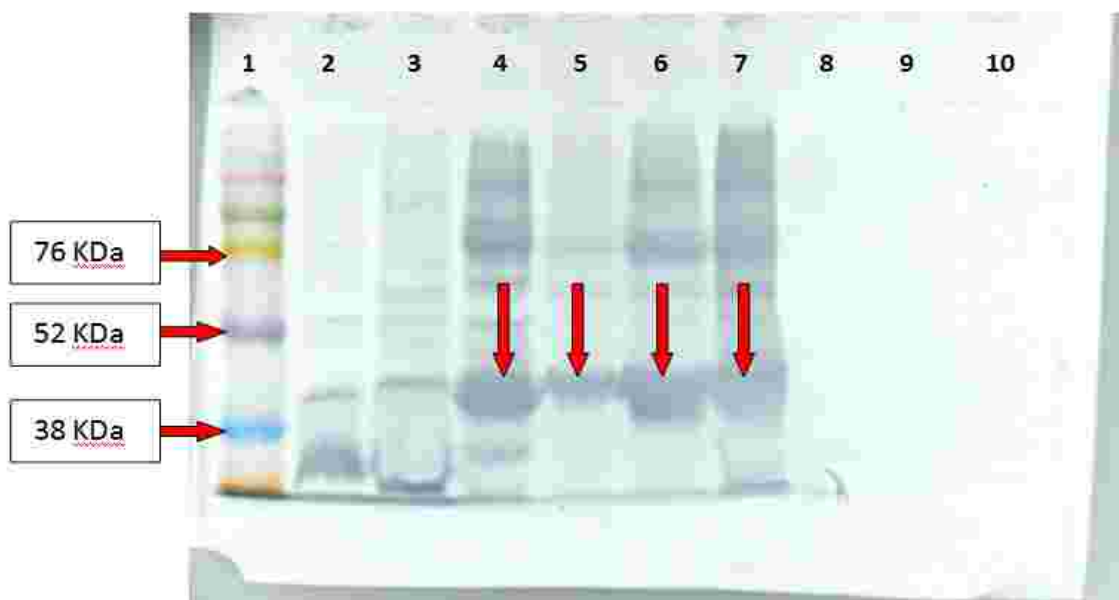


**Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose do PCR de *ncsrs2*, corado em brometo de etídeo. Coluna 1: Marcador 1kb plus (Invitrogen); 2, 3, 4 e 5: PCR utilizando 100 ng de pET201D-TOPO-*ncsrs2* como *template*; 6: PCR usando água milli-Q como *template* (controle negativo).



**Figura 4:** Triagem de colônia recombinante por extração de DNA plasmidial e subsequente eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Coluna 1: pAE/LTB (marcador); 2, 3, 6, 8, 9 e 10: Colônias recombinantes; 4, 5, 7 e 11: Colônias não recombinantes.

A revelação do *Western Blotting* (Fig. 5) demonstrou que as quatro cepas transformadas produziram proteínas reconhecidas pelos anticorpos utilizados, e que possuem seus pesos moleculares de acordo com a análise da figura 2.



**Figura 5:** *Western Blotting* da expressão da quimera LTB+*ncsrs2*. Coluna 1: Rainbow full-range marker (Amershan); 2: Artic Express pAE/LTB; 3: Star pAE/LTB; 4: Artic pAE/LTB + *ncsrs2*; 5: pLyss pAE/LTB + *ncsrs2*; 6: Star pAE/LTB + *ncsrs2*; 7: Rill pAE/LTB + *ncsrs2*; 8: Artic ; 9: pLyss; 10: Star.

## 4 CONCLUSÃO

A clonagem de *ncsrs2* em pAE/LTB, bem como a expressão da quimera resultante em quatro cepas de *Escherichia coli*, foram obtidas com sucesso. As cepas Artic Express, Star e Rill produziram um montante da quimera LTB+NcSRS2 relativamente maior do que a cepa pLyss, por conseqüência, serão escolhidas para dar prosseguimento ao estudo. Os próximos passos do trabalho serão aumentar a escala de produção, purificar as proteínas e fazer testes de imunogenicidade, comparando os resultados com aqueles obtidos pela NcSRS2 não fusionada à LTB (também produzida pelo grupo de pesquisa). Agradecimentos: CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.

## 5 REFERÊNCIAS

BARR, B.C.; BJERKAS, I.; BUXTON, D.; CONRAD, P.A. Neosporosis – report of the International *Neospora* Workshop. **Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian**, v.19, p.120-144, 1997.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Veterinary Parasitology**, v.67, n.1, p. 1-59, 2003.

FISHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; MORAES, C. M.; FERREIRA, L. N.; VILELA, C. O.; CAETANO, C. F.; VARGAS, G. D.; HUBNER, S. O.; VIDOR, T.; ROEHE, P. M. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. **World J Microbiol Biotechnol**, v.26, p.489-495, 2010.

HALDORSON, G. J.; MATHISON, B. A.; WENBERG, K.; CONRAD, P.A.; DUBEY, J. P.; TREES, A. J.; YAMANE, I.; BASZLER, T. V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1407-1415, 2005.

HEMPHILL, A; FELLEISEN, R; FELLEISEN, R; CONNOLLY, B; GOTTSTEIN, B; HENTRICH, B e MULLER, N. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. **Parasitology** 115 ( Pt 6), p. 581-590, 1997.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28,p.1473-1478, 1998.

NISHIKAWA, Y; XUAN, X; NAGASAWA, H; IGARASHI, I; FUJISAKI, K; OTSUKA, H; MIKAMI, T. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells, **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 51–58, 2000.

WILLIAMS, N. A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. **Int J Med Microbiol**; v. 290(4–5), p. 447-53, 2000.