

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *Escherichia coli* VISANDO PRODUÇÃO DE VACINA CONTRA NEOSPOROSE

LORENZON, Lucas Bigolin^{1,2}; GRASSMAN, André Alex¹; GONÇALES, Relber Aguiar³; LEITE, Fábio Pereira Leivas¹; BERNE, Maria Elisabeth².

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico – UFPel, ²Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFPel, ³Departamento de Biologia Celular e Molecular – USP.

1 INTRODUÇÃO

Neosporose é a doença causada pela infecção do parasito *Neospora caninum*. Tal parasito é responsável por complicações neurológicas em cães e abortos em bovinos, acarretando uma perda de milhões de dólares à produção de carne e leite anualmente. A vacina comercialmente disponível contra neosporose é produzida com taquizoítos atenuados, tendo alto custo de produção e efetividade moderada. O objetivo deste trabalho foi produzir, de forma recombinante, uma vacina alternativa à convencional, expressando em *Escherichia coli* as proteínas LTB, NcSRS2 e LTB/NcSRS2.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O gene *srs2* foi amplificado por PCR (Fig. 1), a partir do vetor recombinante pET201D-TOPO-*ncsrs2*. O plasmídeo pAE foi utilizado tanto para clonagem quanto para expressão das construções. O vetor recombinante pAE/LTB foi gentilmente cedido pelo laboratório de vacinologia do CDTec. Foram feitas duas construções: pAE/*ncsrs2* e pAE/LTB+*ncsrs2*. Uma vez obtidos, os vetores recombinantes foram utilizados para transformar, por meio de choque térmico, *Escherichia coli* BL21 Ril. A expressão foi induzida com IPTG 0,3 mM por 3 horas, a 37°C. As proteínas recombinantes (rLTB, rNcSRS2 e rLTB+NcSRS2) foram purificadas por cromatografia de afinidade. *Western blot* foi utilizado para confirmar a expressão, bem como para avaliar a integridade dos epítomos tanto de rNcSRS2 quanto de rLTB+NcSRS2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As subclonagens foram confirmadas por análises de eletroforese em gel de agarose (Fig. 2). A expressão das três construções gênicas foi confirmada por *Western blot* utilizando anti-histidina (Fig. 3), uma vez que todas as proteínas recombinantes produzidas recebem uma cauda de histidina como característica intrínseca do vetor pAE. A integridade dos epítomos de rNcSRS2 e rLBT+NcSRS2 foi confirmada por *Western blot* utilizando soro bovino positivo para neosporose (Fig. 4). Uma vez confirmado o reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos de animais soro positivos, pode-se aferir que tais proteínas não perderam suas características imunogênicas e podem ser utilizadas na vacinação. A produção das três proteínas recombinantes permite futuros testes que avaliem se a presença do adjuvante LTB fusionado ou não a NcSRS2 pode melhorar a resposta imune induzida pelo antígeno de *N. caninum*.

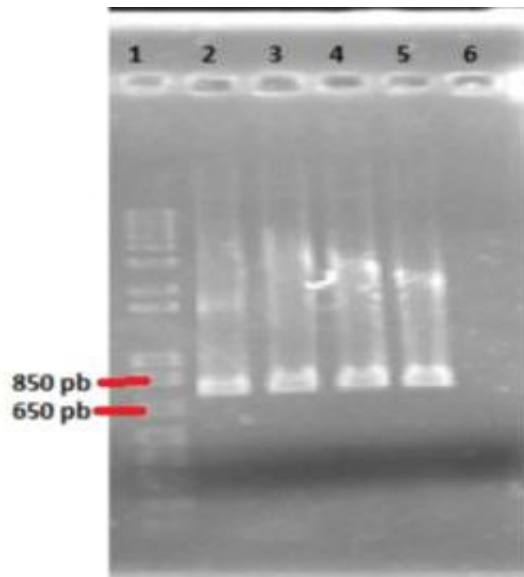


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose do PCR de *ncsrs2*, corado em brometo de etídeo. Coluna 1: Marcador 1kb plus (Invitrogen); 2, 3, 4 e 5: PCR utilizando 100 ng de pET201D-TOPO-*ncsrs2* como *template*; 6: PCR usando água milli-Q como *template* (controle negativo).

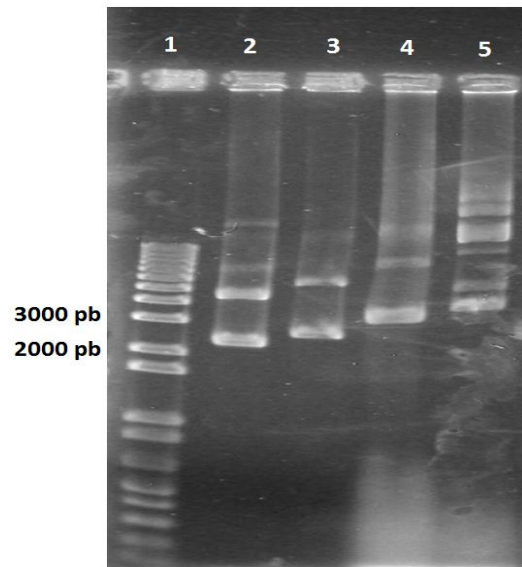


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose de extração de plasmídeos, corado em brometo de etídeo. Coluna 1: Marcador 1kb plus (Invitrogen); 2: pAE; 3: pAE/LTB; 4: pAE/*ncsrs2*; 5: pAE/LTB+*ncsrs2*.

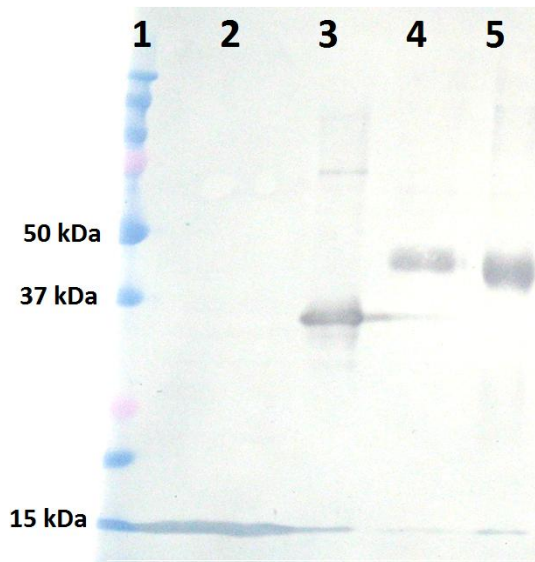


Figura 3: *Western blot* utilizando anti-histidina. Coluna 1: Precision Plus Protein (BIO-RAD); 2: LTB; 3: NcSRS2; 4 e 5: LTB/NcSRS2.

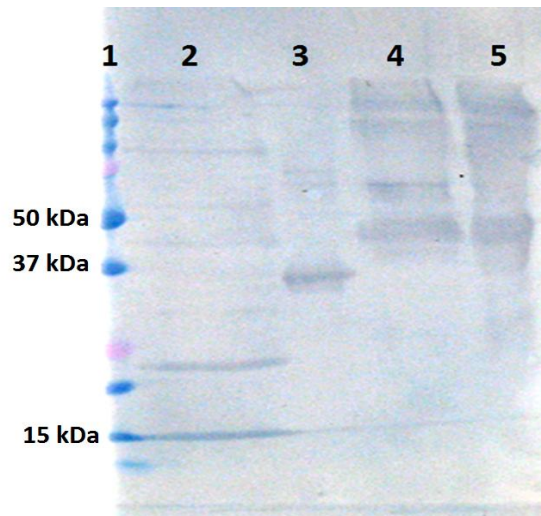


Figura 4: Western blot utilizando soro bovino positivo para neosporose. Coluna 1: Precision Plus Protein (BIO-RAD); 2: LTB; 3: NcSRS2; 4 e 5: LTB/NcSRS2.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que as subclonagens foram bem sucedidas originando vetores recombinantes com valor agregado para futuros passos nessa pesquisa. A utilização de *Escherichia coli* BL21 Ril foi de fundamental importância e demonstrou a viabilidade de produção de tal vacina em plataforma procariota de expressão. As proteínas recombinantes foram produzidas e purificadas com sucesso e serão utilizadas para imunizar camundongos, visando avaliar a proteção conferida pela vacina frente a um desafio.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro.

6 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.