

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES DE DNA E DE SUBUNIDADE CONTRA LEPTOSPIROSE UTILIZANDO O ANTÍGENO OmpL37

OLIVEIRA, Thaís Larré¹; GRASSMANN, André Alex¹; MENDONÇA, Marcelo²; HARTWIG, Daiane Drawanz¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹

¹Laboratório de Vacinologia - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

²Laboratório de Imunologia Aplicada - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

thais.larreoliveira@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose mundialmente distribuída, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* contraída através do contato com solo e água contaminados com a urina de animais carreadores desta bactéria. Os sinais clínicos da doença variam desde uma forma leve, semelhante à gripe, até uma forma grave, com falência de múltiplos órgãos (Ko *et al.* 2009). O estudo para desenvolvimento de novas vacinas contra a leptospirose se justifica pelo fato de que as bacterinas existentes são sorovares-específicas, induzem uma imunidade de curta duração e são altamente reatogênicas (Dellagostin *et al.* 2011).

Vacinas recombinantes de subunidade e de DNA são possíveis alternativas para o controle da leptospirose. As vacinas de subunidade tem o potencial de conferir proteção sem o risco de causar a doença, enquanto que vacinas de DNA, além de também possuírem essa vantagem, são de fácil obtenção e manuseio, baixo custo e podem induzir tanto resposta imune humoral quanto celular, uma vez que o antígeno recombinante é expresso na própria célula eucariótica (Wang *et al.* 2007).

A proteína OmpL37 é conservada entre diversos sorovares patogênicos de *Leptospira*, é reconhecida pelo soro de pacientes na fase convalescente da doença e possui propriedades de ligação a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, como fibronectina, fibrinogênio, laminina e elastina (Pinne *et al.* 2010). Além disso, recentemente foi demonstrado que a expressão de OmpL37 é maior *in vivo* do que *in vitro*, tanto em modelo de hamster quanto de camundongo (Matsui *et al.* 2012). Estas observações sugerem a participação de OmpL37 na patogênese da *Leptospira*, especialmente no que se refere à adesão aos tecidos do hospedeiro.

O objetivo deste trabalho foi clonar o gene *ompL37* em dois vetores, sendo um para expressão em procarioto (pAE) e outro para expressão em eucarioto (pTARGET), bem como caracterizar ambas as construções. Dessa forma, pretendemos obter uma vacina de subunidade e uma vacina de DNA utilizando OmpL37 como antígeno, as quais serão avaliadas posteriormente quanto ao seu potencial uso no controle da leptospirose.

2 METODOLOGIA

A região codificadora do gene *ompL37* foi amplificada através da técnica de PCR, a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa

Fiocruz L1-130, e inserida nos vetores de expressão pAE e pTARGET, de modo a gerar os plasmídeos recombinantes pAE/*ompL37* e pTARGET/*ompL37*. Estes foram utilizados para transformar *E. coli* TOP10 através de eletroporação e os clones recombinantes foram selecionados através de uma triagem por extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio. A presença do inserto nestes clones foi confirmada por digestão com enzimas de restrição e PCR. Dois clones, um para cada construção, foram propagados em meio Luria-Bertani (LB) e os vetores recombinantes foram extraídos utilizando os kits GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare) para pAE/*ompL37* e GenElute™ HP Plasmid Maxiprep (Sigma) para pTARGET/*ompL37*.

A cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3) foi transformada por choque térmico com o vetor pAE/*ompL37*, cultivada em meio LB e a expressão da proteína foi induzida com 1mM IPTG. A proteína rOmpL37 foi purificada em condições desnaturantes através de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sefarose e dialisada contra tampão contendo concentrações decrescentes de ureia. Posteriormente, a proteína foi quantificada pelo kit BCA™ Protein Assay (Pierce), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Através de *Western blot* (WB), rOmpL37 foi caracterizada com anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis (Sigma) (1:6000) e com soro humano convalescente obtido de pacientes com leptospirose (1:200). Os anticorpos secundários utilizados foram o anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) (1:6000) e anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:1000), respectivamente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

A funcionalidade do plasmídeo pTARGET/*ompL37* foi avaliada em cultivo *in vitro* de células de origem mamífera. A linhagem celular CHO-K1 foi cultivada sobre lamínulas de vidro inseridas em placas de cultivo de seis cavidades. Após atingir confluência de 80%, as células foram transfectadas com 2 µg de pTARGET/*ompL37* complexado ao reagente Nanofect (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Após 24 h de cultivo, as lamínulas foram submetidas à imunofluorescência indireta para visualização da expressão da proteína. Para isso, as células foram tratadas com metanol por 5 min e incubadas por 1 h à 37 °C com soro hiperimune anti-OmpL37 (1:100), seguidos por reação com anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200) por mais 1 h à 37 °C. O DNA das células foi corado com Hoechst 33258. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência em aumento de 400 vezes. Células tratadas apenas com o vetor pTARGET foram utilizadas como controle negativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *ompL37* foi amplificado por PCR, gerando um fragmento de aproximadamente 957 pb (Fig. 1A), e clonado nos vetores de expressão pAE e pTARGET, gerando os vetores recombinantes pAE/*ompL37* e pTARGET/*ompL37*. A caracterização dos plasmídeos por PCR resultou na amplificação de um fragmento no tamanho esperado para *ompL37*. Além disso, a digestão enzimática também confirmou a presença do inserto, bem como caracterizou a orientação de inserção do gene *ompL37* no vetor pTARGET. A digestão de pAE/*ompL37* com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*II resultou na liberação do inserto de tamanho esperado (957 pb) (Fig. 1B). Dos possíveis clones recombinantes obtidos para pTARGET/*ompL37*, três tiveram o DNA plasmideal digerido com a enzima *Pst*I. Destes, dois apresentaram o padrão de bandas indicando a presença do inserto no sentido horário, segundo o

software Vector NTI 11, o que é necessário para a funcionalidade do vetor, ou seja, para a expressão da proteína nas células eucarióticas (Fig. 1C).

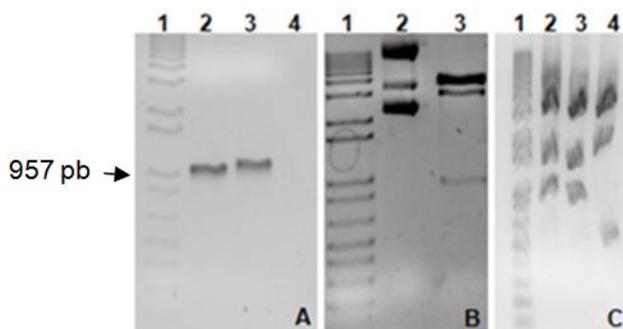


Figura 1 – Clonagem de *ompL37* nos vetores pAE e pTARGET. A: Amplificação de *ompL37* por PCR (957 pb). (1) Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder; (2) Amplificação de *ompL37* para clonagem no vetor pTARGET; (3) Amplificação de *ompL37* para clonagem no vetor pAE; (4) Controle negativo da PCR. B: Digestão enzimática do vetor pAE/*ompL37*. (1) Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder; (2) Vetor pAE não digerido; (3) Vetor pAE/*ompL37* digerido com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I. C: Digestão enzimática do vetor pTARGET/*ompL37* obtido de três diferentes clones. (1) Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder; (2) Clone 1 com inserto no sentido horário; (3) Clone 2 com inserto no sentido horário; (4) Clone 3 com inserto no sentido anti-horário.

A proteína rOmpL37 foi expressa na forma insolúvel por *E. coli* BL21 Star™ (DE3) e apresentou o tamanho esperado, de 37 kDa. O protocolo de solubilização da proteína em ureia foi eficiente e o rendimento obtido foi de 10,4 mg.L⁻¹. A caracterização da proteína por WB resultou no reconhecimento de rOmpL37 no tamanho esperado de 37 kDa por ambos os anticorpos porém, com algum indício de degradação, facilmente visualizado no WB com o anticorpo anti-6xHis (Fig. 2). A proteína rLipL32 utilizada como controle positivo foi reconhecida nas duas reações, enquanto que o controle negativo (BSA) não foi reconhecido por nenhum anticorpo. A reação de rOmpL37 com soro humano demonstra que esta proteína manteve epítopos antigênicos presentes em sua forma nativa, indicando que o processo de expressão e purificação não alterou significativamente sua conformação.

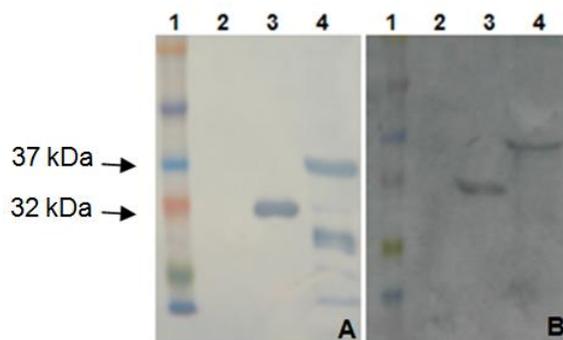


Figura 2 – Caracterização de rOmpL37 através de *Western blot* (WB). A: WB com anticorpo anti-6xHis. (1) Marcador de massa molecular BenchMark™ Pre-stained (Invitrogen); (2) BSA usada como controle negativo; (3) rLipL32 usada como controle positivo; (4) rOmpL37. B: WB com soro humano convalescente. (1) Marcador de massa molecular BenchMark™ Pre-stained (Invitrogen); (2) BSA usada como controle negativo; (3) rLipL32 usada como controle positivo; (4) rOmpL37.

Os procedimentos para a transfecção da linhagem celular CHO-K1 com pTARGET/*ompL37* foram realizados com sucesso e através de imunofluorescência

foi possível confirmar a expressão da proteína (Fig. 3), indicando a funcionalidade desta construção e possibilitando seu uso como vacina de DNA contra leptospirose.

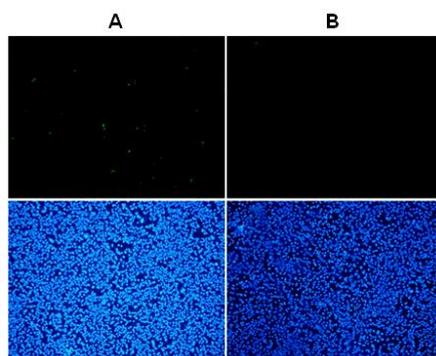


Figura 3 - Imunofluorescência indireta em células CHO-K1 transfetadas com pTARGET/*ompL37*. A: Células transfetadas com pTARGET/*ompL37*. B: Células transfetadas apenas com o vetor pTARGET. As imagens superiores representam a fluorescência de FITC, enquanto as imagens inferiores representam a fluorescência do Hoechst 33258.

4 CONCLUSÃO

A clonagem de *ompL37* nos vetores pAE e pTARGET foi eficiente e gerou construções funcionais capazes de expressar a proteína em células procarióticas e eucarióticas, respectivamente. A proteína rOmpL37 foi reconhecida por soro humano convalescente evidenciando sua antigenicidade e a sua expressão durante a infecção do hospedeiro. O vetor pTARGET/*ompL37* pode ser utilizado como vacina de DNA, com a segurança de que OmpL37 será expressa em células mamíferas. Estudos subsequentes serão executados com o objetivo de avaliar o potencial imunoprotetor de OmpL37 como vacina de DNA e de subunidade contra leptospirose, através de teste desafio em modelo animal suscetível.

5 REFERÊNCIAS

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Hum Vaccin** 7(11): 1215-1224. 2011.

KO, A. I. et al. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol** 7(10): 736-747. 2009.

MATSUI, M. et al. Differential in vivo gene expression of major Leptospira proteins in resistant or susceptible animal models. **Appl Environ Microbiol.** (in press) 2012.

PINNE, M. et al. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic Leptospira during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Negl Trop Dis** 4(9): e815. 2010.

WANG, Z. et al. Leptospirosis vaccines. **Microb Cell Fact** 6: 39. 2007.