

## CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE LipL32 DE *Leptospira interrogans* FUSIONADO À LTB, POR GM1-ELISA

**XIMENDES, Carolina<sup>1\*</sup>; GRASSMANN, André Alex<sup>1</sup>; DINIZ, Juliana Alcoforado<sup>1</sup>; SILVA, Everton Fagonde<sup>1,2</sup>; DELLAGOSTIN, Odir Antônio<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – Cenbiot – UFPel

<sup>2</sup>Faculdade de Veterinária – UFPel

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

\*carolinaximendes@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial causada por mais de 260 sorovares patogênicos pertencentes ao gênero *Leptospira*. A infecção é contraída por contato direto ou indireto com urina de animais portadores (principalmente roedores) e, em 5 a 15% dos casos, pode evoluir para quadros graves, caracterizados por falência renal, icterícia e hemorragia pulmonar (Gouveia et al., 2008). As perdas econômicas causadas pela doença e os prejuízos em termos de saúde pública justificam o uso de vacinas em humanos e animais. Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção da leptospirose se faz necessário. As vacinas disponíveis atualmente, constituídas de células inteiras inativadas (bacterinas), não proporcionam proteção cruzada contra os diferentes sorovares que podem causar a leptospirose. Diante disso, o desenvolvimento de uma vacina multisorovar, que gere proteção cruzada contra os diferentes sorovares de *Leptospira*, ainda representa um grande desafio (Adler & Moctezuma, 2009; Levett, 2001; McBride et al., 2005).

Proteínas de membrana externa são apontadas como vacinógenos potenciais, devido a sua localização na superfície da célula e a sua participação na interação com o hospedeiro (Sonrier et al., 2000). LipL32 é a proteína mais abundante na membrana externa de leptospiros e encontrada exclusivamente em cepas patogênicas, apresentando potencial como antígeno vacinal (Cullen et al., 2005). Essa proteína altamente antigênica (Haake et al., 2000) é expressa durante a infecção, induz resposta humoral (Flannery, 2001), liga-se à matriz extracelular de mamíferos (Hauk, 2008; Hoke, 2008) e mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos contra LipL32 durante a infecção (Guerreiro, 2001).

As vacinas recombinantes, apesar de serem mais seguras do que as convencionais são menos imunogênicas. Adjuvantes são componentes essenciais capazes de aperfeiçoar a eficiência destas vacinas (Dzierzbicka & Kołodziejczyk, 2006). A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) demonstrou em diversos estudos ter atividade imuno-adjuvante, com produção de resposta imune humoral e celular, tanto co-administrada quanto fusionada ao antígeno (Millar, 2001; Lebens, 2003; da Silva Ramos Rocha, 2008; Chen, 2009). A função adjuvante da LTB está diretamente relacionada com a capacidade dela se ligar no gangliosídeo GM1, presente na superfície de células eucarióticas (De Haan et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi produzir rLTBLipL32, rLipL32 e rLTB e caracterizar estas proteínas recombinantes através de GM1-ELISA.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**Expressão e purificação das proteínas recombinantes:** Os vetores recombinantes pAE//*ltb*, pAE//*lipL32* e pAE//*ltb-LipL32* (Grassmann et al., 2008) foram inseridos por eletroporação na cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star. As bactérias foram crescidas em meio LB, para produção em larga escala. As culturas foram monitoradas até atingir uma densidade óptica (DO<sub>600</sub>) de 0,6 a 0,8, quando foi induzida a expressão das proteínas recombinantes através da adição de 1 mM de IPTG. As culturas foram centrifugadas para produzir o precipitado de massa bacteriana, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* tratados com tampão para purificação de proteínas no caso de rLipL32, ou o mesmo tampão acrescido de 0,2% do agente desnaturante *N-Lauroylsarcosine*, para rLTB ou rLTB-LipL32. A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™), carregada com níquel. A identidade das proteínas foi checada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e por Western blot (WB) com soro anti-LTB e anti-LipL32.

**GM1-ELISA:** Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng por cavidade de gangliosídeo GM1 bovino (Sigma Aldrich Co.) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6) (100 µL/cavidade) e incubadas *overnight* a 4 °C. A placa foi lavada três vezes com 200 µL de PBS-T por cavidade e bloqueada com 1% de leite em pó diluído em PBS-T. Em seguida foram adicionados 100 ng por cavidade de rLTB, rLTBLipL32, rLipL32 ou toxina colérica (CT) (Sigma Aldrich Co.) em triplicata e a placa foi incubada por 1 h a 37 °C. Após três novas lavagens com PBS-T foi adicionado anticorpo de coelho anti-CT na diluição 1:6000 ou Mab anti-LipL32 1:6000 e incubado 1 h a 37 °C. Após três lavagens com PBS-T a reação foi incubada 1 h a 37 °C com 100 uL de anticorpo anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com peroxidase 1:6000 ou anticorpo anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado com peroxidase 1:6000. Após a última lavagem, a reação foi revelada utilizando 100 uL por cavidade de solução contendo ortofenilenodiamina (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e incubada ao abrigo da luz por 15 min, quando a reação foi parada com adição de 25 uL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas com filtro de 492 nm. Como controle da ligação entre as proteínas e o gangliosídeo utilizou-se poços sem GM1 e poços com GM1 sem proteínas.

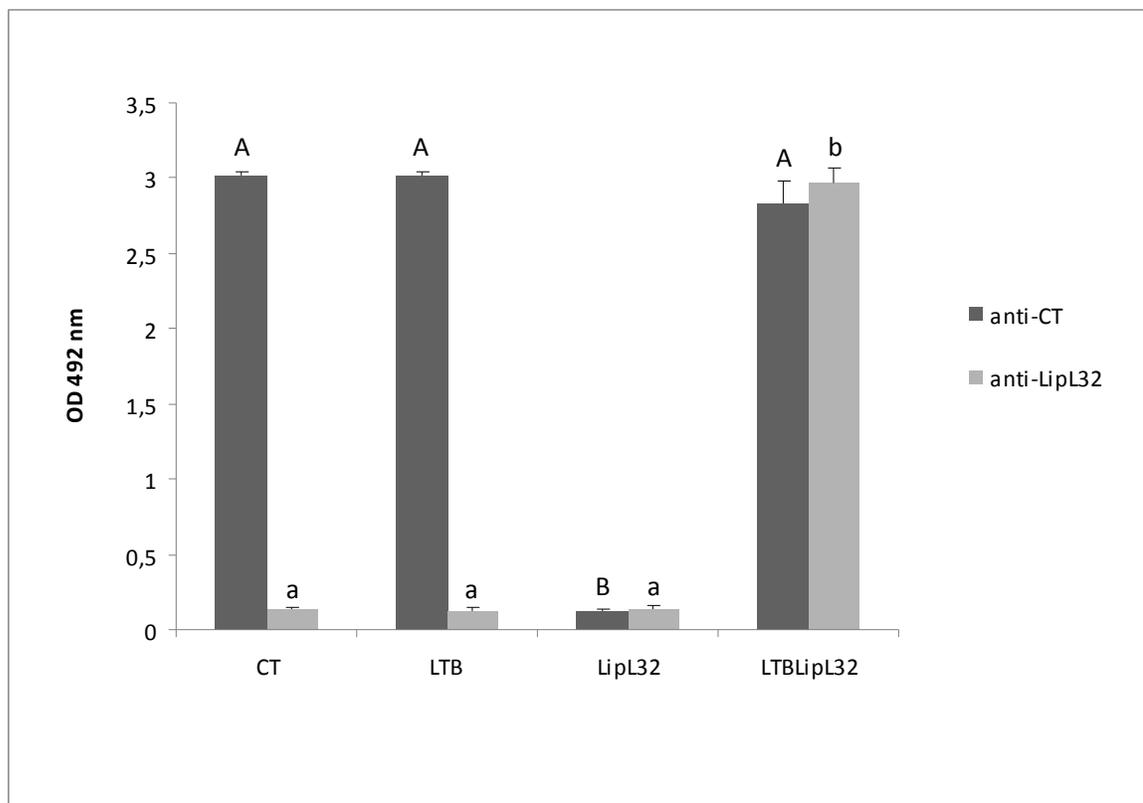
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas rLTB, rLipL32 e rLTBLipL32 foram produzidas e purificadas com sucesso. A caracterização por SDS-PAGE e Western blot demonstrou a identidade e antigenicidade das proteínas recombinantes.

rLTB e rLTBLipL32 foram avaliadas *in vitro* quanto à habilidade de ligação ao gangliosídeo GM1 em ensaio de ELISA. A rLTB e a quimera rLTBLip32 produzidas

demonstraram capacidade de ligação ao GM1 (Figura 1). Quando utilizado anticorpo anti-CT, tanto a rLTB como a rLTBLipL32 apresentaram capacidade de ligação ao GM1 semelhante à toxina colérica comercial e significativamente maior do que a observada pelo controle rLipL32 ( $p < 0,01$ ). Na reação utilizando anticorpo anti-LipL32 apenas a quimera rLTBLipL32 apresentou resposta positiva ( $p < 0,01$ ), já que o anticorpo não reconhece CT e rLTB e a rLipL32 não possui afinidade pelo GM1. Não houve reação nos controles negativos sem GM1 ou apenas GM1.

Estes resultados sugerem que a rLTB produzida manteve conformação estrutural semelhante à molécula nativa. Da mesma forma, a fusão de LTB à LipL32 aparentemente não comprometeu sua estrutura. Estudos anteriores demonstraram que a atividade biológica de LTB é dependente da ligação desta subunidade ao gangliosídeo GM1 (Haake, 1998). Neste trabalho, demonstramos que tanto a rLTB como a fusão rLTBLipL32 produzidas detêm capacidade de ligação ao gangliosídeo GM1, fornecendo indícios da manutenção da atividade adjuvante esperada de LTB.



**Figura 1.** Ligação das proteínas produzidas ao gangliosídeo GM1 determinado por GM1-ELISA. Os dados foram obtidos através da média das absorvâncias em triplicatas e desvio padrão, utilizando o Teste T de Student. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ).

#### 4. CONCLUSÃO

As proteínas rLTBLipL32 e rLTB produzidas aparentemente mantiveram a conformação e atividade biológica da molécula LTB nativa. Estudos subsequentes

serão realizados com a intenção de determinar a atividade adjuvante de LTB em vacinação contra a leptospirose utilizando LipL32 como antígeno vacinal.

## 5. REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary and Microbiology**, 2009.
- CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, 2005, v. 73, p. 4853-4863.
- FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MediSci: Melbourne**, 1999, 272p.
- GRASSMANN, A. A.; FELIX, S. R.; SEIXAS, F. K.; SILVA, E. F.; HARTMANN, D. M.; FAGUNDES, M. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Antigenicidade de uma quimera recombinante composta pelo adjuvante LTB e o antígeno LipL32 de *Leptospira interrogans*. In: XVII Congresso de Iniciação Científica, UFPel, Pelotas, 2008.
- HAAKE, D.A.; CHAO, G.; ZUERNER, R.L.; BARNETT, J.K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P.N.; BOLIN, C.A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 2000, v. 68, p. 2276-2285.
- McBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, 2005, v.18, p. 376-386.
- NALLY, J.E.; WHITELEGGE, J.P.; BASSILIAN, S.; BLANCO, D.R.; LOVETT, M.A. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, 2007 v. 75, n.2, p.766-773.
- SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, 2007, 53: 472-479.
- VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, 2008, 33(4): 557-569.