

CONIC·SEMESP

13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

TÍTULO: TERMOLISINAS: PROTEASES SECRETADAS POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS PARA EVASÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO

CATEGORIA: EM ANDAMENTO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: BIOMEDICINA

INSTITUIÇÃO: CENTRO UNIVERSITÁRIO DAS FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS

AUTOR(ES): DANIELLA DOS SANTOS COURROL

ORIENTADOR(ES): LOURDES ISAAC

Realização:



Apoio:



Resumo

A leptospirose é uma zoonose de relevância mundial causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. Através de análise dos genomas de *Leptospira interrogans* por bioinformática, identificamos uma família de proteínas, as termolisinas, que podem ser as proteases das leptospiras responsáveis por clivar componentes do sistema complemento humano, aumentando assim a sobrevivência da bactéria. A identificação e caracterização de proteases com capacidade de inativar moléculas do sistema imune inato é de grande importância, e poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas na leptospirose.

Introdução

A leptospirose constitui um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, com resultados que vão desde infecções subclínicas a hemorragia pulmonar fatal. Vários microorganismos patogênicos desenvolveram múltiplas estratégias de escape ao sistema imune do hospedeiro, dentre os quais mecanismos de evasão à ativação e/ou ao ataque do sistema complemento. Pela análise dos genomas de *Leptospira* identificamos as termolisinas, que possuem alta similaridade com proteases que clivam componentes do sistema complemento. O objetivo deste projeto é a produção das termolisinas de *Leptospira* em sistema heterólogo (*E. coli*) para avaliação da atividade proteolítica destas proteínas frente a componentes do sistema complemento.

Objetivos

Identificação, produção e caracterização de proteases de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni e avaliação da atividade proteolítica destas proteínas frente a componentes do sistema complemento.

Metodologia

A termolisina NprT de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, que é codificada pelo gene LIC13322, foi selecionada para ser produzida como proteína recombinante em *E. coli*. Com objetivo de aumentar as chances de obter uma proteína com atividade, desenhamos três diferentes estratégias para a clonagem do gene LIC13322.

Os insertos gênicos que codificam para os três diferentes fragmentos das termolisinas foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os insertos foram clonados no vetor pGEM-T Easy e transferidos para o vetor de expressão pAE. Este vetor possui códon de iniciação seguido de região codificadora para 6 histidinas na posição N-terminal, que permite a purificação por cromatografia de afinidade a metal.

As bactérias *E. coli* BL21 (SI) e *E. coli* BL21(DE3)C43 foram utilizadas para expressar as termolisinas recombinantes. Após a indução, as frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação e analisadas por SDS-PAGE. Os clones que melhor expressaram as proteínas recombinantes foram selecionados para produção de maior quantidade de proteína para purificação.

As termolisinas foram expressas na fração insolúvel dos lisados bacterianos, necessitando a realização de uma etapa de renaturação das proteínas por diluição pulsada antes da purificação. Para tanto, as proteínas foram solubilizadas com uréia 8 M e gotejadas em 2 L de PBS 1 X pH 7,4 (renaturação por diluição pulsada).

Após a renaturação, as proteínas recombinantes, expressas em fusão com seis resíduos de histidina, foram purificadas por cromatografia de afinidade metálica, com colunas HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare) previamente carregada com Ni²⁺.

A purificação foi feita com tampão contendo diferentes concentrações de imidazol. As proteínas purificadas foram analisadas por SDS-PAGE. As frações que continham proteína purificada foram reunidas e dialisadas contra Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Em seguida, efetuamos ensaios proteolíticos para analisar a capacidade das termolisinas recombinantes em clivar os componentes do complemento. Para tanto, as termolisinas foram incubadas com o componente C3 do sistema complemento, por períodos de 1 h a 16 h a 37 °C. A detecção dos produtos de clivagem foi efetuada por Western blot com anticorpo policlonal anti-C3.

Desenvolvimento

A termolisina NprT de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, que é codificada pelo gene LIC13322, possui uma seqüência sinal para secreção, os domínios FTP e PepSY e os domínios catalíticos Peptidase_M4 e Peptidase_M4_C.

Em nosso trabalho, desenhamos três diferentes estratégias para a clonagem do gene LIC13322. O fragmento 1 corresponde à proteína inteira. O fragmento 2

corresponde aos domínios PepSY e aos domínios catalíticos. Já o fragmento 3 corresponde somente aos domínios catalíticos.

Resultados preliminares

Conseguimos obter as termolisinas recombinantes correspondentes aos fragmentos 2 e 3, e estas proteínas foram expressas com sucesso em *E. coli*. Conseguimos obter grande quantidade de proteínas purificadas, e estas foram testadas quanto à atividade proteolítica frente ao componente C3 do complemento. Verificamos que o fragmento 3 da termolisina, que contém apenas os domínios catalíticos, não apresentou atividade proteolítica. Já o fragmento 2, que contém o pró-domínio PepSY além dos domínios catalíticos, foi capaz de clivar a molécula de C3. Deste modo, podemos inferir que o pró-domínio PepSY parece atuar na termolisina como uma chaperona intramolecular, promovendo correto dobramento dos domínios catalíticos, e favorecendo portanto a atividade enzimática.

Neste trabalho conseguimos caracterizar as termolisinas como uma das proteases secretadas pelas leptospiros que clivam componentes do sistema complemento. As próximas etapas serão a identificação mais detalhada das termolisinas da *L. interrogans*, a imunização de camundongos para a produção de anticorpos anti-termolisina e a análise destes anticorpos frente à clivagem dos componentes do complemento pelas termolisinas.

Fontes consultadas

- Jin F, Matsushita O, Katayama S, et al. Infect Immun. 1996; 64(1):230-7.
- Alitalo A, Meri T, Rämö L, Jokiranta TS, Heikkilä T, Seppälä IJ, et al. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. Infect Immun. 2001; 69(6):3685-91.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215(3):403-10.
- Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. Infect Immun. 2006; 74(11):6356-64.