

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE- SES -SP COORDENADORIA
DE RECURSOS HUMANOS-CRH GRUPO DE DESENVOLVIMENTO
DE RECURSOS HUMANOS-GDRH CENTRO DE FORMAÇÃO DE
RECURSOS HUMANOS PARA O SUS “Dr. Antonio Guilherme de
Souza” SECRETARIA DE ESTADO DA GESTÃO PÚBLICA
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP**

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL - PAP

IURI REINO MARIANO

**ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA
ANTITOXINA RECOMBINANTE VapC DE *Leptospira interrogans*.**

São Paulo

2015

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE- SES -SP COORDENADORIA
DE RECURSOS HUMANOS-CRH GRUPO DE DESENVOLVIMENTO
DE RECURSOS HUMANOS-GDRH CENTRO DE FORMAÇÃO DE
RECURSOS HUMANOS PARA O SUS “Dr. Antonio Guilherme de
Souza” SECRETARIA DE ESTADO DA GESTÃO PÚBLICA
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP**

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL - PAP

IURI REINO MARIANO

**ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA
ANTITOXINA RECOMBINANTE VapC DE *Leptospira interrogans*.**

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional - SES-SP, elaborado no Instituto Butantan, como conclusão do programa em biotecnologia, sob a orientação do Dr. Alexandre Paulo Yague Lopes.

São Paulo

2015

RESUMO

A leptospirose é uma patologia infecciosa febril de início repentino que presenta distribuição mundial, sendo endêmica predominantemente em países de clima tropical e em países com saneamento básico. Seu agente etiológico a bactéria helicoidal (espiroqueta) aeróbica obrigatória do gênero *Leptospira*, sendo a mais importante a *Leptospira interrogans* sorovar Copenagueni. Na *L. interrogans* são encontrados os genes LIC12650 e LIC12660 que codificam proteínas potencialmente relacionadas com virulência. Tais genes formam um operon, denominado VapBC, sendo este um sistema toxina-antitoxina (TA). Os sistemas TA operons codificam uma toxina estável e uma antitoxina instável. A hipótese fisiológica mais aceita da função do sistema de TA é a inibição reversível de crescimento celular sob condições de estresse. Os módulos VapBC são classificados com base na presença de um domínio PIN com atividade ribonucleásica na toxina VapC.

Neste trabalho testamos formas diferentes para uma melhor expressão recombinante da proteína VapC, a toxina do sistema toxina-antitoxina, assim como teste de sua atividade ribonuclease. Avaliamos o rendimento de expressões com dois vetores diferentes, pAEsox e pAE. Testamos purificações da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal e testamos renaturação em três diferentes formas: na própria coluna, diálise e por pressurização. Buscamos a otimização da pressurização, testamos condições diversas na tentativa de um "refolding" com maior rendimento da VapC na forma solúvel.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 03 |
| 2. OBJETIVOS | 06 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 07 |
| 3.1 MATERIAIS | 07 |
| 3.1.1 Bactérias e vetores | 07 |
| 3.1.2 Meios de cultura e antibiótico | 07 |
| 3.1.3 Soluções | 08 |
| 3.2 MÉTODOS | 09 |
| 3.2.1 Preparo de bactérias competentes | 09 |
| 3.2.2 Transformação de bactérias competentes | 09 |
| 3.2.3 Expressão da proteína VapC recombinante em <i>E. coli</i> | 10 |
| 3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida | 10 |
| 3.2.5 Análise da expressão de proteínas por SDS-PAGE | 11 |
| 3.2.6 Purificação e renaturação da proteína VapC em coluna e diálise | 12 |
| 3.2.6.1 Purificação da proteína recombinante e insolúvel (VapC) | 12 |
| 3.2.6.2 Renaturação da proteína recombinante por diálise | 13 |
| 3.2.7 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford | 13 |
| 3.2.8 Renaturação da proteína VapC por pressurização | 14 |
| 3.2.9 Teste de atividade ribonuclease da proteína VapC | 15 |
| 3.2.10 Eletroforese em gel de agarose | 15 |
| 4. RESULTADOS | 16 |
| 4.1 Seleção de clones para melhor expressão da VapC | 16 |
| 4.1.1 <i>E. coli</i> BL21 com vetor pAEsox, induzido com paraquat | 16 |
| 4.1.2 <i>E. coli</i> BL21 com vetor pAE, induzido com IPTG | 17 |
| 4.2 Purificação e renaturação na coluna | 18 |
| 4.2.1 Purificação com prolina | 19 |
| 4.2.2 Purificação sem prolina | 20 |
| 4.3 Teste de atividade ribonuclease em UREA-PAGE | 21 |
| 4.4 Pressurização | 22 |
| 4.5 Dosagem de proteínas | 24 |
| 5. CONCLUSÃO | 25 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 26 |

1- INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma patologia infecciosa febril de início repentino, que pode variar desde um processo inaparente, confundido com outras doenças, até formas graves com alta letalidade. Apresenta distribuição mundial, sendo endêmica predominantemente em países de clima tropical e em países com saneamento básico negligenciado e ocorre associada à aglomeração populacional elevada e normalmente com baixa renda. No Brasil tais condições são encontradas, fazendo com que o país revele-se epidêmico em períodos propícios, como os chuvosos, principalmente em áreas metropolitanas passíveis de enchentes. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No estado de São Paulo, entre os anos de 2010 e 2014, houveram 4.342 casos confirmados de leptospirose, segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) - Divisão de Zoonoses do estado. Nos dois primeiros meses de 2015 já foram confirmados 13 casos.

Descrita em 1886 por Adolf Weil, razão dos sinônimos da leptospirose serem Doença ou Síndrome de Weil. A leptospirose tem como seu agente etiológico a bactéria helicoidal (espiroqueta) aeróbica obrigatória do gênero *Leptospira*, do qual se conhecem atualmente 14 espécies patogênicas, sendo a mais importante a *L. interrogans*. Medem de 6 a 20 µm de comprimento por 0,1 µm de diâmetro, possuem extremidades dobradas ou em forma de ganchos (conformação que sugere a forma de uma interrogação e consequente batismo para a espécie) e são constituídas por um corpo citoplasmático e um axóstilo ou filamento axial enrolados em espiral, sendo ambos envolvidos por uma membrana denominada envelope ou membrana envolvente. O citoplasma é envolvido por uma membrana citoplasmática e uma camada de peptidoglicano formando um complexo. O complexo basal destes

flagelos é semelhante ao de uma bactéria Gram-negativa, contudo com baixa atividade endotóxica. Possui como unidade taxonômica básica o sorovar (sorotipo), onde mais de duas centenas já foram identificados, e cada um promove seu ciclo em um animal preferencial, ainda que uma espécie animal possa albergar um ou mais sorovares. Os sorovares podem diversificar as formas de apresentação da doença no homem. Os sorovares que se revelam mais graves em casos clínicos e mais incidentes no Brasil são Icterohaemorragiae e Copenagueni (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; VERONESI, 2004; COURAS, 2005).

Bovinos, suínos, cães e principalmente roedores são portadores naturais. Os roedores, com alta disseminação geográfica e afinidade a ambientes urbanos, revelam-se os vetores mais importantes na transmissão da leptospirose. Nos portadores naturais a infecção é crônica, não manifestando processos patológicos, mesmo com contaminação de órgãos e tecidos, os portadores naturais podem viver por anos. A bactéria, que também coloniza os túbulos renais, faz sua consequente transmissão via urina. Além desta contaminação indireta pela urina, os humanos também podem ser infectados com o contato direto com os órgãos e tecidos contaminados dos portadores naturais. A *Leptospira* disseminta-se rapidamente pela circulação sanguínea e assim atinge todos os tecidos, incluindo o sistema nervoso central e os olhos, contudo há a contaminação em especial de fígado, rins, coração e músculo esquelético. A bactéria multiplica-se rapidamente e assim provoca lesões no endotélio vascular, sendo este processo o principal responsável pelas manifestações clínicas da doença: intensa vasculite (MURRAY, 2000; PLANK & DEAN, 2000; BROD, 2005).

Sistema toxina-antitoxina (locus vapBC)

Na *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni são encontrados os genes que codificam proteínas potencialmente relacionadas com virulência e com a interação patógeno-hospedeiro, como mecanismos de invasão e adesão. Tais genes formam um operon com homólogos presentes em diversas bactérias, muitas vezes em múltiplas cópias e organizadas em um operon (denominadas na literatura VapBC), onde a primeira uma antitoxina, instável, que neutraliza a segunda, uma toxina, estável. Este sistema é denominado toxina-antitoxina (TA). O gene LIC12659 apresenta 231 nucleotídeos, codificando uma proteína de 77 aminoácidos. Utilizando o programa “BLAST”, foi identificada como codificadora da proteína homóloga a VapB – “virulence associated protein B” – enquanto que o gene LIC12660 apresenta 399 nucleotídeos, codificando uma proteína de 132 aminoácidos, a VapC, “virulence associated protein C”. Nos sistemas TAs a toxina é bloqueada pela antitoxina, a menos que alguma condição ambiental determine uma diminuição na concentração da antitoxina, resultando na exposição da célula aos efeitos tóxicos. A alta expressão de toxinas pode causar inibição do crescimento e morte da bactéria (LOPES, 2014).

Estudos revelaram a atividade ribonuclease da proteína VapC, fato corroborado com notável inibição do crescimento de cultivos com *E. coli* expressando a VapC recombinante (LOPES, 2014). No presente trabalho visamos o desenvolvimento de novas estratégias para maior produção da proteína VapC em sua forma solúvel para futuros estudos estruturais, assim como o aprimoramento da técnica de pressurização.

2. OBJETIVOS

1. Obtenção de VapC em concentrações apropriadas para futura cristalização;
 - 1.1 Escolha do vetor e seleção de clones com alta expressão de VapC recombinante.
2. Pesquisar estratégias de "refolding" e otimização da pressurização.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Bactérias e vetores

Foram utilizadas as linhagens de *Escherichia coli*: DH5 α , para amplificação de plasmídeos; E BL21 (DE3) Star pLysS, para expressão de proteínas recombinantes. Assim como os vetores pAE, vetor de expressão derivado do vetor pRSET (Invitrogen) (RAMOS, 2004), possui pUC ori , amp^R, sítio RBS, promotor do fago T7, código de iniciação seguido de código para 6 histidinas na posição N terminal e sítio de múltiplas clonagens; E pAE-sox, vetor de expressão obtido por modificação do vetor pAE por inserção do sistema controlador do regulon soxRS. O primeiro induzido com paraquat e o segundo com IPTG

3.1.2 Meios de cultura e antibiótico

- 2YT - Triptona 16g/L, extrato de levedura 10g/L, cloreto de sódio 5g/L;
- 2YT com ágar - Triptona 16g/L, extrato de levedura 10g/L, cloreto de sódio 5g/L e ágar 15g/L;
- LB - Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, cloreto de sódio 10g/L.

Com antibiótico Ampicilina 100 µg/µl.

3.1.3 Soluções

1. PBS – Cloreto de potássio 1,68,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fostato dibásico de sódio 8,1 mM, fosfato monobásico de potássio 1,5 mM.
2. Solução de acrilamida 30% - acrilamida 29%, N,N' –metilenobisacrilamida 1% em água deionizada.
3. Tampão de amostra 10x para gel de agarose – azul de bromofenol 0,25%, Ficol (tipo 400) 15%, xileno cianol FF 0,25% em água deionizada.
4. Tampão de amostra 5x para SDS-PAGE – azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris HCl 50 mM, pH 6,8.
5. Tampão de corrida para SDS-PAGE – glicina 192 mM, SDS 0,1%, Tris 25 mM.
6. Solução RF I - KCl 10mM, MnCl₄ 50 mM, acetato de potássio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8, esterilizar em membrana de 0,22 μ.
7. Solução RF II - KCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, MgCl₂ 20 mM, Na-MOPS 10 mM, glicerol 15 %, pH 5,8, esterilizar em membrana de 0,22 μ.
8. Tampão de lise bacteriana e tampão de equilíbrio nas cromatografias de afinidade a metal- Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0.
9. Tampão TBE - Tris, borato, EDTA. TBE 10x.
10. Tampão TAE - Tris-acetato 40 mM e EDTA 1mM (pH 8,0) em água destilada.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo de bactérias competentes

As bactéria foram estriadas em placa 2YT-ágar, incubadas por 16 horas a 37°C, 1 colônia foi inoculada em ~5 ml de meio LB, e este mantido por 16 horas a 37°C. O inóculo foi transferido para 100 ml de meio LB pré-aquecido a 37°C, e a suspensão incubada por 3 horas à 37°C sob agitação. Ao atingir densidade ótica entre OD₅₀₀ e OD₆₀₀ = 0,5 e 0,6, lido em espectrofotômetro o cultivo foi transferido para gelo para estacionar a divisão celular. O inóculo foi dividido em 2 tubos de 50 ml, aos quais foram adicionados 2 ml MgCl₂ 1M, mantidos em gelo por 15 minutos e centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os precipitados foram ressuspensos em 5 ml de solução RF I, centrifugados por 15 minutos a 4.000 rpm a 4°C, o sobrenadante descartado e a operação repetida. Então o precipitado foi ressuspensos em 1 ml de solução RF II, e distribuído em alíquotas de 50 µl em microtubos de 1,5ml, os quais foram imediatamente congelados e estocados a -80°C.

3.2.2 Transformação de bactérias competentes

Alíquotas de células quimicamente competentes (50 µl) foram descongeladas em gelo, e a elas adicionados 2 µl de solução de plasmídeos oriundos de mini-preparações. As misturas foram mantidas em gelo por 30 minutos e então submetidas a choque térmico a 42º C por 2 minutos, voltando ao banho de gelo por mais 5 minutos. Em seguida foram adicionados 450 µl de meio de cultura LB ou 2YT às suspensões de células, e as mesmas foram incubadas por 90 minutos a 37°C.

Após este período, 100 µl a 250 µl das suspensões foram plaqueadas em meio 2YT-ágar contendo ampicilina (100 µg/µl).

3.2.3 Expressão da proteína VapC recombinante em *E. coli*

Para expressão da proteína recombinante VapC, clones de *E. coli* BL21star(DE3)pLysS com vetores pAE e pAEsox foram realizados pré-inóculos em 50 mL de meio 2YT com ampicilina 2µl/mL, mantidos sob agitação (~170 rpm) a 37º C por 16 horas. Foram inoculados ~60 ml deste pré-inóculo em 1L de meio 2YT com ampicilina 2µl/mL para D.O._{600 nm} 0,2 nm. As culturas foram mantidas a 37º C sob agitação até atingir D.O. entre 0,5 e 0,6. Foram separadas frações de 20mL para gerar controles, não induzido, e frações para indução de expressão de proteína por exposição a 2µl/mL de IPTG (clones com vetor pAE), ou exposição a 1,5µl/mL de paraquat (clones com vetor pAEsox). Após adição dos indutores de expressão as culturas foram mantidas sob agitação a 37ºC por 16 horas (clones com vetor pAE), ou por 12 horas (clones com vetor pAEsox).

3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise das proteínas foi realizada por eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis) segundo protocolos descritos por (LAEMMLI, 1970; SAMBROOK, 1989). Utilizou-se concentração 5% de acrilamida no gel de empilhamento e 12 a15% no gel de separação.

As amostras foram aplicadas diretamente no gel sob condições desnaturantes e redutoras. As amostras foram preparadas por mistura com o tampão de amostra 5x concentrado, o qual contém SDS e β-mercaptoetanol, aquecidas por 5 minutos a 95°C, em tampão de corrida tris/glicina/SDS, submetidas a tensão constante de 140 V, temperatura ambiente, por cerca de 3 horas. Para coloração, o gel foi imerso em solução corante de azul de Comassie por ~16 horas e descorado com água destilada até a visualização nítida das bandas de proteínas.

3.2.5 Análise da expressão de proteínas por SDS-PAGE

Após o período de indução, cada cultura foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes descartados, os precipitados ressuspensos em 1 mL de PBS e transferidos para microtubos de 1,5 mL. As suspensões foram centrifugadas novamente por 3 minutos a 14.000 rpm, os sobrenadantes desprezados e ressuspensos em 1 mL de tampão Tris 50 mM e NaCl 150 mM, e as amostras foram submetidas a lise celular por sonicação a 60 Hz em banho de gelo (Sonifier 450, Branson3 pulsos de 10 segundos com intervalos de 10 segundos com 40 unidades de potência). Os lisados foram centrifugados, separando-se o precipitado e sobrenadante. As amostras foram aplicadas em condições desnaturantes para avaliação dos níveis de expressão das proteínas e a forma, solúvel ou não de expressão. Após essa análise um dos clones foi escolhido para cultivo preparativo.

3.2.6 Purificação e renaturação da proteína VapC em coluna e diálise

3.2.6.1 Purificação da proteína recombinante insolúveis VapC

Os precipitados contendo as proteínas recombinantes foram lavados com tampão de lise somados, nas duas primeiras lavagens, a EDTA 5mM e deoxicolato de sódio 0,1%. Em uma terceira lavagem utilizado apenas um tampão com tris 100 mM, centrifugadas a cada lavagem e guardado o sobrenadante para futura análise em SDS-PAGE sobre perda nas mesmas. A solubilização das proteínas foi feita com o tampão de lise contendo 8M de uréia ou 4M de guanidina e β-mercaptoetanol (14µL em 20ml), durante 16 horas.

A partir dos extratos bacterianos as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal. Foram utilizadas as colunas de 1ml HisTrap HP (GE). Lavadas com 15 ml de água destilada, carregada com 15 ml de solução 0,1 M de sulfato de níquel (NiSO_4) e equilibrada com 15 ml de tampão Tris 50 mM, NaCl 150mM, pH 8,0. A retenção das proteínas recombinantes na coluna ocorre pela complexação da série de 6 histidinas N-terminais ao níquel imobilizado na resina. As cromatografias foram realizadas com fluxo de 1 mL por minuto. As colunas foram equilibradas com 5 volumes de tampão Tris 50 mM, NaCl 150 Mm, pH 8,0, as soluções protéicas aplicadas, as colunas lavadas com o mesmo tampão e as proteínas eluidas a 0,5 M de imidazol no tampão. As lavagens na coluna procederam de diferentes formas em busca de uma melhor estratégia para otimizar o rendimento final da VapC. Lavagem com gradativa remoção da uréia de 8M a 0,5M, de 8M a 2M e sem a remoção da uréia na coluna, eluindo com 8M de uréia e submetendo a processo de diálise; Lavagem com gradativa remoção da

guanidina de 4M a 0,5M e de 4M a 2M, e submentendo ao final à diálise. Todas as frações foram recolhidas e analisadas em SDS-PAGE.

3.2.6.2 Renaturação das proteínas recombinantes por diálise

As frações recuperadas das cromatografias contendo as proteínas recombinantes desnaturadas foram dialisadas para redução gradativa da concentração de uréia ou guanidina, supracitadas, contra 1 L de tampão de lise, sob agitação por ~16 horas.

Ao final desta etapa, a proteína dialisada foi dosada e a solução congelada a – 20º C.

3.2.7 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Foi elaborada uma curva de calibração com diluição de BSA 2 mg/mL, contendo seis pontos entre 0,1 e 0,01 mg/mL. Em uma microplaca de fundo chato com 96 poços foram aplicados 200 µl de reagente de Bradford mais 50 µl da amostra, a qual poderia estar ou não diluída em função de não escapar dos pontos predeterminados da curva de calibração. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectra Max 340PC, Molecular Devices) e avaliada no software SoftMax Pro6, cálculos e balanço de massas foram elaborados em planilhas pelo Microsoft Office Excel.

3.2.8 Renaturação da proteína VapC por pressurização

Após a indução, a partir de cultura em 1L de *E. coli* (BL21) com vetor pAE, induzidas com IPTG, foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas em 50 ml de tampão de lise contendo 50 µg/mL de lisozima. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente as células foram rompidas por French Press (Thermo Spectronic) e a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fração insolúvel (corpos de inclusão) foi lavada sequencialmente com 30 ml de tampão A (Tris-HCl a 100mM, pH 7,5, EDTA 5 mM, contendo 0,1% de desoxicolato de sódio; E tampão B (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, EDTA 1 mM). O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de tampão B e lidos em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) a 350 nm.

Com base na concentração avaliada por espectrofotometria, as amostras em suspensão foram alíquotadas sendo o volume final 1mL, considerando a diluição com as seguintes condições:

- a. Alíquotas com D.O. 1 - Tris/tampão B (controle), L-arginina 0,5M pH8,0, L-arginina 0,5M pH11,0, cloridrato de guanidina 0,5M e cloridrato de guanidina 1M;
- b. Alíquotas com D.O. 10 - Tris/tampão B (controle), L-arginina 0,5M pH8,0, L-arginina 0,5M pH11,0 e cloridrato de guanidina 0,5M.

As suspensões foram colocados em sacos de plástico que foram selados e colocado em outro saco de plástico maior, que foi então selado a vácuo. Os sacos foram colocados num recipiente de pressão (modelo R4-6-40, High Pressure Equipment Company) com uma mistura de água e óleo como fluídios de transmissão de pressão e de alta pressão (200 MPa, 2000 bar, ou 29.000 psi) foi aplicada durante 16 horas. Após a libertação da pressão, as amostras foram centrifugadas a

14.000 rpm durante 10 min. Os sobrenadantes foram dialisados contra tampão de Tris-HCl a 50mM, pH 7,5 e centrifugados (14.000 rpm durante 10 minutos) para remover agregados insolúveis eventualmente formados.

3.2.9 Teste de atividade ribonuclease da proteína VapC e eletroforese em gel de uréia

Ensaio de tRNA^{fMe}, iniciador adquirido da Sigma-Aldrich. Alíquotas de VapC purificado (3 µl) foram incubadas com 2 µl de substrato rRNA em tampão de reação (10 mM de Hepes pH 7,5, KCl 15 mM, MgCl 10 mM e glicerol a 10%) a 37°C durante 5 minutos. As reações foram paradas por adição de 3 µl de formamida a 80% e analisadas por eletroforese em gel desnaturante de acrilamida 30% e uréia 6 M, corado com brometo de etídeo.

3.2.10 Eletroforese em gel de agarose

Os tamanhos do DNA plasmidial e de fragmentos de DNA foram analisados por migração em gél de agarose 1%. Para a preparação de géis, a agarose foi adicionado ao tampão TAE e a mistura aquecida em forno microondas até formar solução homogênea. A solução foi resfriada até aproximadamente 60°C e antes de ser adicionada ao suporte para solidificação recebeu solução de brometo de etídio para concentração 1µg/ml, para permitir a visualização das bandas de DNA sob luz UV. O tampão de corrida utilizado foi TAE e a separação eletroforética feita sob tensão de 60 V, por ~2 horas. O tamanho do DNA foi determinado por comparação de sua mobilidade com a dos marcadores de massa molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific) introduzido em uma das canaletas do gel no momento da corrida.

4. RESULTADOS

4.1 Seleção de clones para melhor expressão da VapC

Os clones foram selecionados de colônias únicas previamente estriadas em 2YT-ágar e incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias selecionadas foram inoculadas em 2YT, após o crescimento sob agitação ~170 rpm a 37°C por ~16 horas, foi feita a diluição para D.O. 0,2, também em meio 2YT, e novamente incubado sob agitação de ~170 rpm a 37°C entre 2 e 4 horas, dependendo do vator utilizado (pAE se mostrou mais lento em relação ao pAEsox), até atingir D.O. ideal para indução, entre 0,5 e 0,6. Quando alcançado foram aplicados os indutores, IPTG para pAE e paraquat para pAEsox, e incubados novamente por ~14 horas.

4.1.1 *E. coli* BL21 com vetor pAEsox, induzido com paraquat

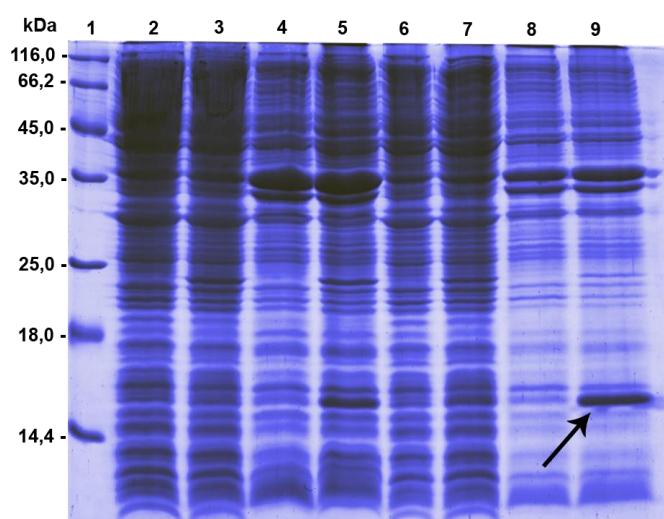


FIGURA 01 - Análise da expressão de VapC (15,1 kDa) em *E. coli* BL21 com o vetor pAEsox por SDS-PAGE 15%. 1) Marcador ("Unstained Protein Molecular Weight Marker", de 14,1 a 116 kDa); 2 e 3) frações solúveis do primeiro clone, sendo a primeira o controle negativo (sem indutor) e a segunda o induzido (com paraquat); 4 e 5) frações insolúveis do primeiro clone, primeiro controle e depois induzido; 6 e 7) frações solúveis do segundo clone, sendo a primeira o controle negativo (sem indutor) e a segunda o induzido (com paraquat); 8 e 9) frações insolúveis do segundo clone, primeiro controle e depois induzido. A seta indica a banda correspondente a VapC.

Foi selecionado para posterior purificação da VapC o segundo clone (seta na FIGURA 01), o qual, em sua fração insolúvel, apresentou uma boa expressão da VapC ao mesmo tempo que moderadas outras proteínas e ou contaminantes.

4.1.2 *E. coli* BL21 com vetor pAE, induzido com IPTG

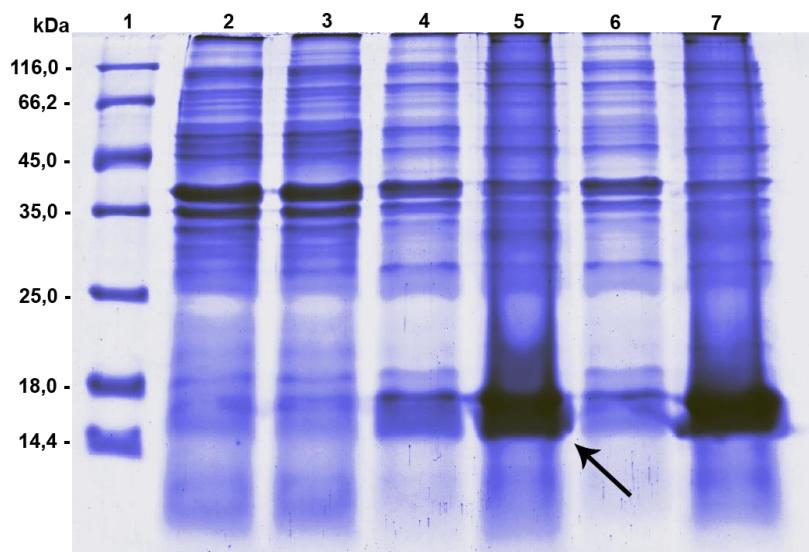


FIGURA 02 - Análise da expressão de VapC (15,1 kDa) em *E. coli* BL21 com o vetor pAE por SDS-PAGE 15%. 1) Marcador ("Unstained Protein Molecular Weight Marker", de 14,1 a 116 kDa); 2 e 3) frações insolúveis de um clone transformado com um vetor "vazio" para não expressar a VapC recombinante e servir de controle negativo nesta expressão, sendo o primeiro sem indutor e o segundo com; 4 e 5) frações insolúveis do primeiro clone, sendo a primeira sem indutor e a segunda com; ; 6 e 7) frações insolúveis do segundo clone, sendo a primeira sem indutor e a segunda com.

Foi selecionado para cultivo em maior escala, em 1L (e consequente testes de purificação, "refolding" e otimização da pressurização da VapC), o primeiro clone (seta na FIGURA 02), o qual, em sua fração insolúvel, apresentou uma boa expressão da VapC. A figura 03 apresenta a análise, por eletroforese em gel de poliacrilamida, do cultivo em 1 L.

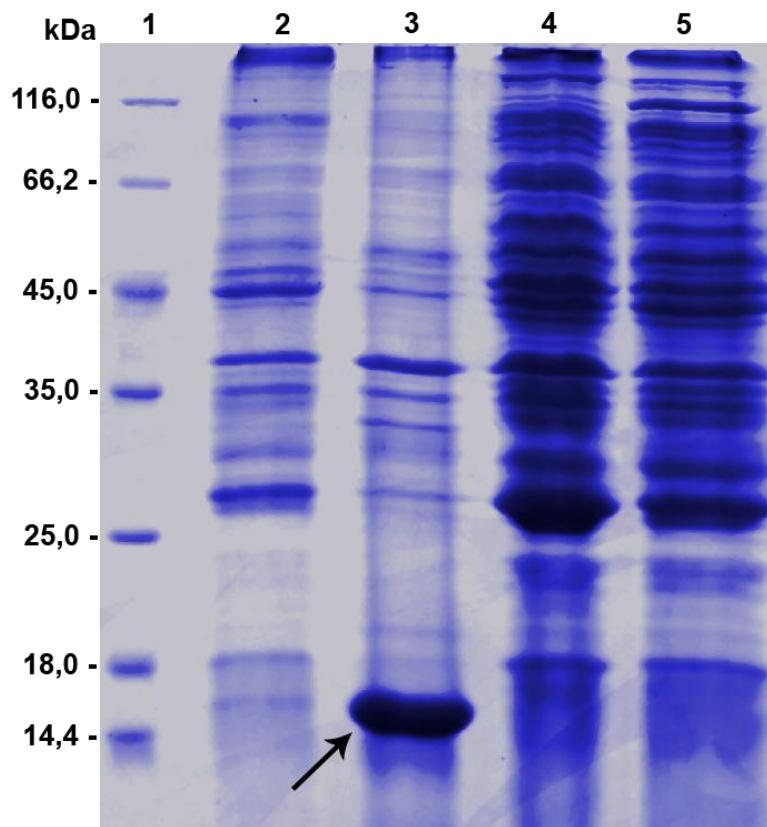


FIGURA 03 - Análise da expressão de VapC (15,1 kDa) em *E. coli* BL21 com o vetor pAE por SDS-PAGE 15%. Expressão realizada em um cultivo de 1 L. 1) Marcador ("Unstained Protein Molecular Weight Marker", de 14,1 a 116 kDa); 2 e 3) frações insolúveis do clone selecionado da FIGURA 02, controle (sem indutor) e induzido (com IPTG); 4 e 5) frações solúveis do mesmo clone, controle e induzido.

4.2 Purificação e renaturação na coluna

Foram utilizadas colunas de 1ml HisTrap HP (GE), carregadas com 15 ml de solução 0,1 M de sulfato de níquel (NiSO₄). Os corpos de inclusão foram previamente lavados em etapas com EDTA 5mM, 1mM, deoxicolato de sódio 0,1% e apenas com tris 100 mM ao final.

4.2.1 Purificação com prolina

Os corpos de inclusão foram solubilizados em 10 mL tampão tris 50 mM, NaCl 150 mM, imidazol 2 mM, uréia 8 M e 20 µl de β-mercaptoetanol em temperatura ambiente, sob agitação por ~14 horas. A coluna foi equilibrada com o tampão mais 8 M de uréia e após a passagem da amostra foram feitas lavagens para gradativa remoção da uréia, sete lavagens, de 8M até removê-la totalmente. Da quinta lavagem até a eluição foi acrescentado ao tampão prolina 0,5 M, a eluição foi feita com imidazol 0,5 M. Todas as frações foram recolhidas e analisadas em SDS-PAGE (Fig.4).

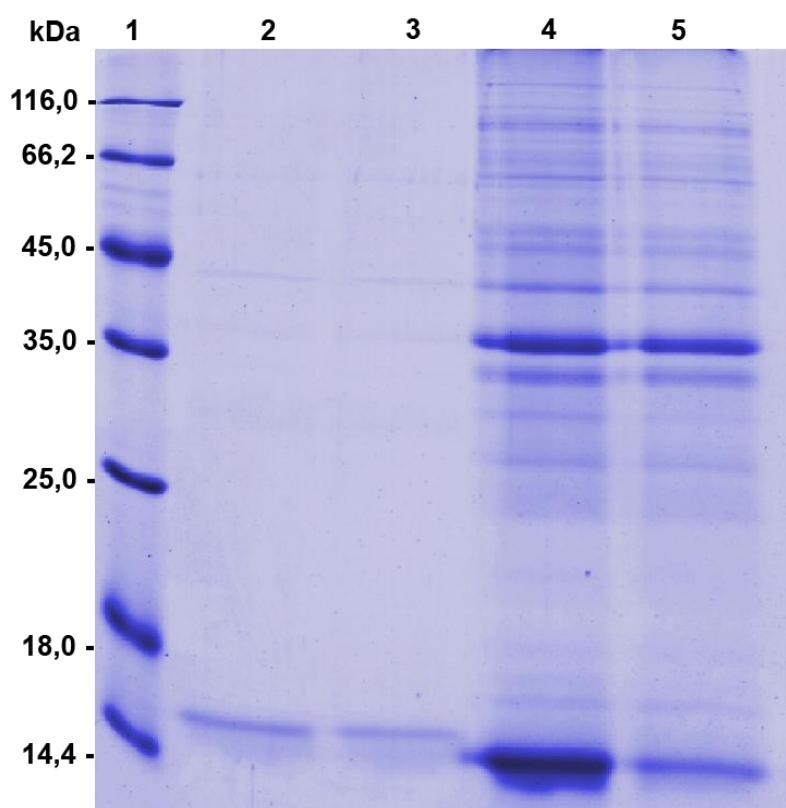


FIGURA 04 - Análise de purificação da VapC (15,1 kDa) por cromatografia de afinidade a metal, em SDS-PAGE 15%. 1) Marcador ("Unstained Protein Molecular Weight Marker", de 14,1 a 116 kDa); 2) fração eluída; 3) fração eluída e dialisada; 4) amostra inicial, antes da cromotagrofia; 5) "flow through".

4.2.2 Purificação sem prolina

Os corpos de inclusão foram solubilizados em 10 mL tampão tris 50 mM, NaCl 150 mM, imidazol 2 mM, uréia 8 M e 20 µl de β-mercaptoetanol em temperatura ambiente, sob agitação por ~14 horas. A coluna foi equilibrada com o tampão mais 8 M de uréia e após a passagem da amostra foram feitas lavagens para gradativa remoção da uréia, quatro lavagens, de 8M até 1 M. A eluição foi feita com imidazol 0,5 M. Todas as frações foram recolhidas e analisadas em SDS-PAGE.

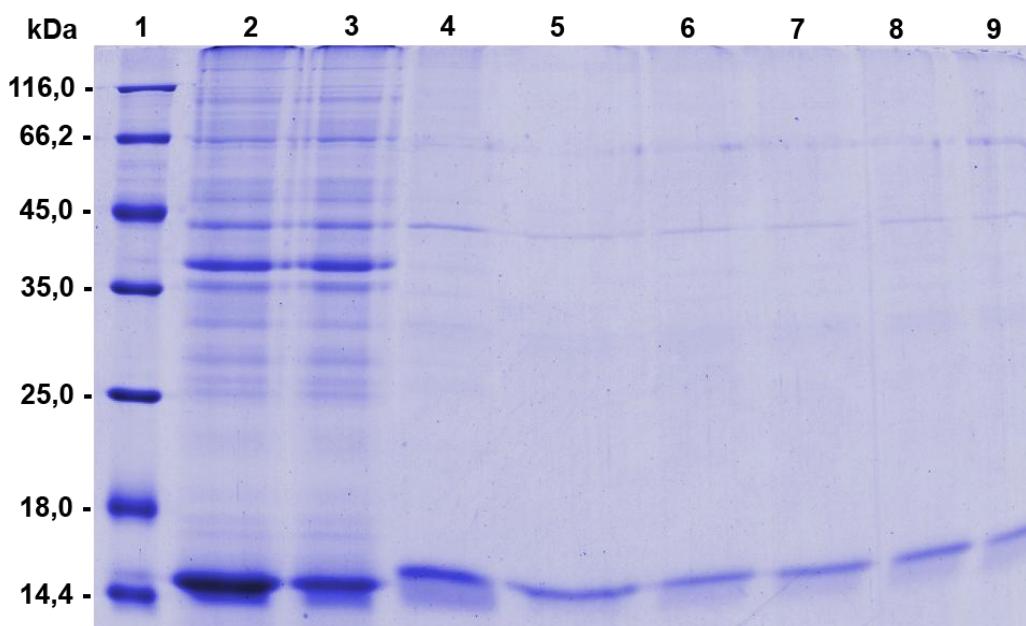


FIGURA 05 - Análise de purificação da VapC (15,1 kDa) por cromatografia de afinidade a metal, em SDS-PAGE 15%. 1) Marcador ("Unstained Protein Molecular Weight Marker", de 14,1 a 116 kDa); 2) amostra inicial; 3) "flow through"; 4) fração eluída; 5) fração eluída e com acréscimo de arginina 0,5 M; 6) fração eluída e dialisada com presença de arginina 0,1 mM, conservada a 4°C; 7) fração eluída e dialisada com presença de arginina 0,1 mM, conservada a -20°C; 8) fração eluída e dialisada, conservada a 4°C; 9) fração eluída e dialisada, conservada a -20°C.

4.3 Teste de atividade ribonuclease em UREA-PAGE

A determinação da atividade ribonuclease foi medida nas amostras de VapCs purificadas em coluna e que passaram por processo de "refolding" em parte na coluna e em diálise. As frações são visíveis nas figuras 04 e 05. Foram testadas as frações eluídas e as frações dialisadas das purificações com e sem prolina, da purificação sem prolina foram utilizadas as amostras dialisadas sem arginina. Como controle positivo foram utilizadas frações de VapC anteriormente pressurizadas e purificadas em nosso laboratório.

As amostras foram incubadas com substrato de em tampão de reação (método previamente detalhado). A reação foi analisada por eletroforese em gel de acrilamida 30% com 6 M de uréia.

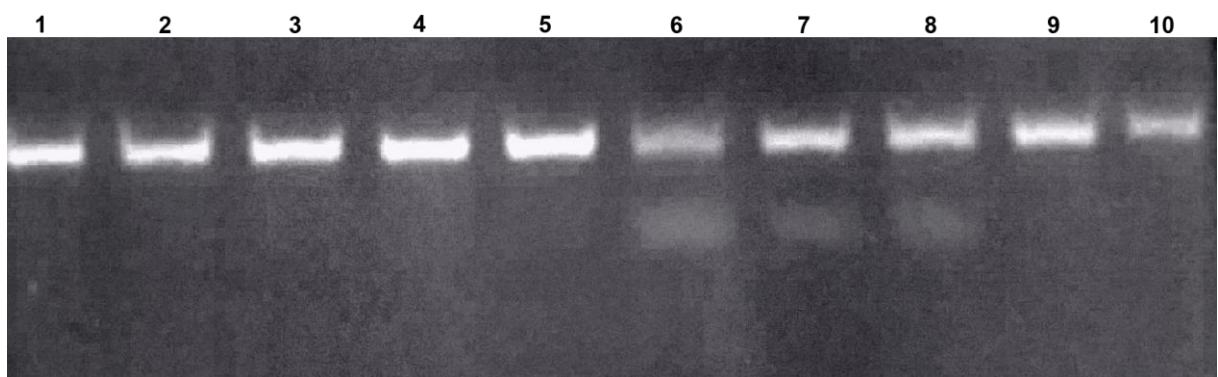


FIGURA 06 - Análise de atividade ribonuclease da proteína recombinante VapC. Gel de acrilamida 30% e uréia 6 M. 1) controle negativo; 2) fração dialisada sem arginina da purificação sem prolina; 3) fração eluída da purificação sem prolina; 4) fração dialisada da purificação com prolina; 5) fração eluída da purificação com prolina; 6) controle positivo, VapC pressurizada, dialisada e concentrada; 7) controle positivo, VapC pressurizada, dialisada B; 8) controle positivo, VapC pressurizada, dialisada A; 9) controle positivo, VapC pressurizada, dialisada sem concentrar; 10) controle negativo.

Não foi visível atividade ribonuclease nas amostras das purificações citadas no item 4.2, purificação e renaturação na coluna.

4.4 Pressurização

Após o cultivo em escala maior (1L) de *E. coli* BL21, com vetor pAE, para expressão da VapC, as células foram lisadas, lavadas e submetidas ao processo de pressurização em diferentes condições:

- a. Alíquotas com D.O. 1 - Tris/tampão B (controle), L-arginina 0,5M pH8,0, L-arginina 0,5M pH11,0, cloridrato de guanidina 0,5M e cloridrato de guanidina 1M;
- b. Alíquotas com D.O. 10 - Tris/tampão B (controle), L-arginina 0,5M pH8,0, L-arginina 0,5M pH11,0 e cloridrato de guanidina 0,5M.

Todas as condições foram analisadas em SDS-PAGE a 15%.

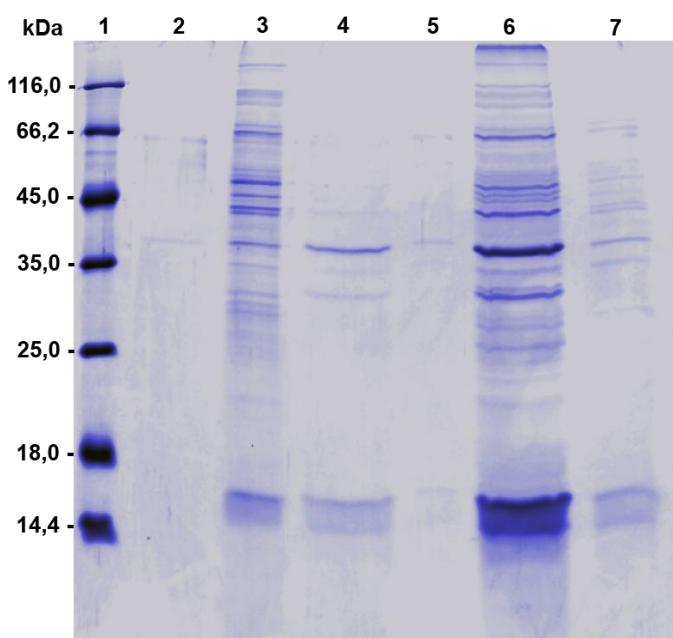


FIGURA 07 - Análise de pressurização e diálise com diferentes condições para a proteína recombinante VapC (15,1 kDa) em SDS-PAGE 15%. 1) Marcador ("Unstained Protein Molecular Weight Marker", de 14,1 a 116 kDa); 2) condição com D.O. 1 e tris 50 mM; 3) condição com D.O. 10 e tris 50 mM; 4) condição com D.O. 1 e arginina 0,5 M, pH8; 5) condição com D.O. 1 e arginina 0,5 M, pH8 dialisada para tris 50 mM; 6) condição com D.O. 10 e arginina 0,5 M, pH8; 7) condição com D.O. 10 e arginina 0,5 M, pH8 dialisada para tris 50 mM.

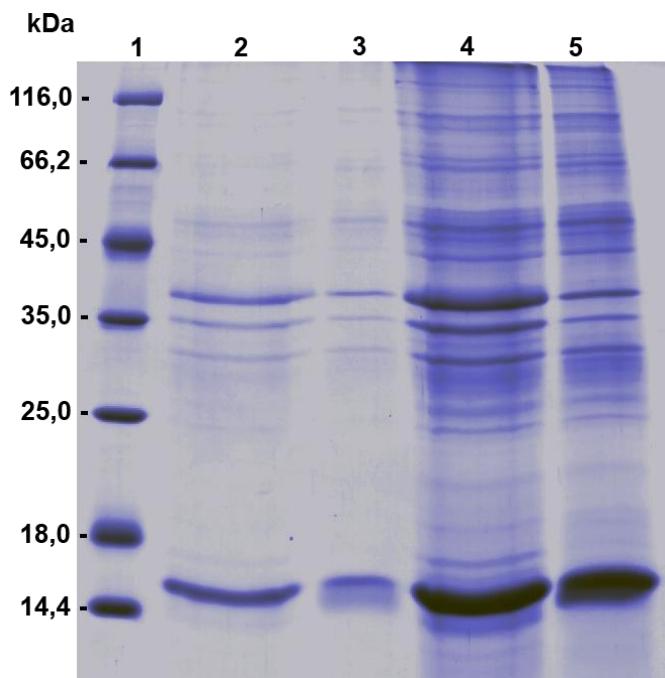


FIGURA 08 - Análise de pressurização e diálise com diferentes condições para a proteína recombinante VapC (15,1 kDa) em SDS-PAGE 15%. 1) Marcador ("Unstained Protein Molecular Weight Marker", de 14,1 a 116 kDa); 2) condição com D.O. 1 e arginina 0,5 M, pH11; 3) condição com D.O. 1 arginina 0,5 M, pH11 dialisada para tris 50 mM; 4) condição com D.O. 10 e arginina 0,5 M, pH11; 5) condição com D.O. 10 arginina 0,5 M, pH11 dialisada para tris 50 mM.

4.5 Dosagem de proteínas

As proteínas foram dosadas segundo o método de Bradford previamente descrito.

| | | Concentração de proteína (mg/mL) |
|------------------------------------|--|----------------------------------|
| Purificação com prolina | | |
| Fração inicial (pré-cromatografia) | | 0,387 |
| Flow through | | 0,451 |
| Eluído | | 0,045 |
| Dialisado | | 0,025 |

| Purificação sem prolina | | |
|------------------------------------|--|-------|
| Fração inicial (pré-cromatografia) | | 0,454 |
| Flow through | | 0,310 |
| Eluído | | 0,102 |
| Dialisado com arginina | | 0,033 |
| Dialisado | | 0,021 |

TABELA 01 - Dosagem de proteínas: concentração em mg/mL de cada etapa das purificações e renaturação em coluna.

| Condição de pressurização | D.O. 1 | | | | | | | | |
|----------------------------------|---------------|-------------------|-------------|--------------------|-------------|----------------|-------------|--------------|-------------|
| | Tris Controle | Arginina 0,5M pH8 | | Arginina 0,5M pH11 | | Guanidina 0,5M | | Guanidina 1M | |
| | | pré-Diálise | pós-Diálise | pré-Diálise | pós-Diálise | pré-Diálise | pós-Diálise | pré-Diálise | pós-Diálise |
| Concentração de proteína (mg/mL) | 0,01 | 0,055 | - | 0,190 | 0,062 | 0,019 | - | 0,127 | 0,034 |

| Condição de pressurização | D.O. 10 | | | | | | |
|----------------------------------|---------------|-------------------|-------------|--------------------|-------------|----------------|-------------|
| | Tris Controle | Arginina 0,5M pH8 | | Arginina 0,5M pH11 | | Guanidina 0,5M | |
| | | pré-Diálise | pós-Diálise | pré-Diálise | pós-Diálise | pré-Diálise | pós-Diálise |
| Concentração de proteína (mg/mL) | 0,085 | 0,237 | 0,019 | 0,828 | 0,434 | 0,087 | 0,036 |

TABELA 02 - Dosagem de proteína de cada condição testada nas amostras de corpos de inclusão submetidas ao processo de pressurização.

5. CONCLUSÃO

Avaliamos dois diferentes clones de *E. coli* linhagem BL21 com dois vetores diferentes para expressão da proteína VapC. O primeiro, pAEsox, induzido com paraquat, revelou um crescimento mais rápido na cultura, porém a quantidade de VapC expressada foi menor em relação ao segundo vetor testado, o pAE, induzido com IPTG. Este por sua vez, apesar de ter se desenvolvido mais lentamente no cultivo, expressou mais e com menos interferentes.

Para o cultivo em escala maior, em 1 L, selecionamos o clone com vetor pAE. O rendimento de VapC sugere um bom aprimoramento para um futuro cultivo em escala maior com fins à cristalização da proteína.

Com as purificações e renaturação em coluna da VapC não observamos um bom rendimento (fato corroborado pela dosagem de proteínas), além da inatividade ribonuclease das mesmas (observado na eletroforese em gel de acrilamida 30% com uréia 6 M). Por outro lado houve um bom rendimento no processo de pressurização, principalmente na condição com D.O. 10 e com L-arginina 0,5 M com pH11, revelando, inclusive, uma boa recuperação após diálise para tris 50 mM (observado na tabela 02).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLAR, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidências do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 4, p. 294-300, 2005.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. 2006. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOPES, A. P. Y.; LOPES, L. M.; FRAGA, T. R.; CHURA-CHAMBI, R. M.; SANSON, A. L.; CHENG, E.; NAKAJIMA, E.; MORGANTI, L.; MARTINS, E. A. L. VapC from the leptospiral VapBC toxin-antitoxin module displays ribonuclease activity on the initiator tRNA. **Plos One**, v. 9, n. 7, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de bolso - doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. Brasília / DF, Editora MS, 2010.

MURRAY, P. M.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Treponema, Borrelia e Leptospira*. In: MURRAY, Patrick R. **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 285-288.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* ssp. in humans. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1265-1276, 2000. Review.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L.; A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

VERONESI R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.