

Clonamiento y expresión de la proteína LipL21 desde *Leptospira interrogans* serovar canicola aislado en Chile

(Cloning and expression of the LipL21 protein from *Leptospira interrogans* serovar canicola isolated in Chile)

✉ Daniel A. Soto¹, Pabla Palma^{1,2}, Patricia González^{1,3+}, Jesús F. Badilla^{1,4}, Guillermo Muñoz¹, Diego A. Diaz-Dinamarca¹, Ricardo A. Manzo¹, Daniel F. Escobar¹, Liliana Maier² y Abel E. Vasquez^{1*}.

✉ 1 Sección de Biotecnología, Subdepartamento de Metrología y Desarrollo Tecnológico, Departamento de Salud Ambiental. Instituto de Salud Pública de Chile.
2 Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Santo Tomás. Santiago, Chile.
3+ Unidad de Pruebas Biológicas. Departamento de ANAMED. Instituto de Salud Pública de Chile
4 Escuela de Biotecnología. Universidad Santo Tomás. Santiago, Chile.
+: Filiación actual

✉ *Autor para la correspondencia: Abel E. Vasquez. avasquez@ispch.cl

RESUMEN

Leptospira es el agente etiológico de la leptospirosis, que es una zoonosis bacteriana distribuida en todo el mundo. Las infecciones zoonóticas en humanos con *Leptospiras* son un importante problema de salud pública en los países en desarrollo. Se están desarrollando vacunas y metodologías de detección de *Leptospira* sp, donde proteínas con un alto nivel de conservación en su secuencia de aminoácidos se están utilizando y representan una buena alternativa. La proteína LipL21 se ha descrito como un buen blanco para estos objetivos. Aquí se describe la purificación de la proteína LipL21 recombinante. Purificamos el ADN cromosómico de *Leptospira interrogans* serovar Canicola aislado en Santiago de Chile. Utilizamos una reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen lipL21 y se clonó en el plásmido pET21a y la proteína recombinante se expresó en cultivo bacteriano *E. coli* BL21 (DE3). La proteína LipL21 recombinante se purificó en un alto grado de pureza. Nuestra proteína LipL21 recombinante podría usarse en el desarrollo de pruebas inmunológicas para la detección de IgM e IgG en sueros humanos, considerando que es una enfermedad zoonótica, que además tiene diagnóstico diferencial con Hanta virus.



Palabras Claves:

Leptospira; LipL21; Proteína recombinante; Clonamiento; Purificación de proteínas

Keywords:

Leptospira; LipL21; Recombinant protein; Cloning; Protein purification

ABSTRACT

Leptospira is the etiologic agent of leptospirosis, a bacterial zoonosis distributed worldwide. It is known that zoonotic infections of humans with *Leptospira* sp are a significant public health problem in developing countries. Vaccines and detection methodologies against *Leptospira* are under development and protein with a conserved amino acid sequence proteins has been used. The LipL21 protein has described as a good target by these aims.

Here we described the recombinant LipL21 protein purification. We purify Chromosomal DNA from *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated in Santiago of Chile. We used a Polymerase Chain Reaction for lipL21 gene amplification and it was cloned into pET21a plasmid and the recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) bacterial culture. The recombinant LipL21 protein was purified in high purity grade.

Our recombinant LipL21 protein could be used in the development of immunological tests for the detection of both IgM and IgG in human sera, considering that it is a zoonotic disease, which also has a differential detection with Hantavirus.



Copyright © 2020. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de la Creative Commons Attribution License (CC BY). El uso, distribución o reproducción en otros foros esta permitido, siempre que el/los Autor/es y el/los dueño/s de los derechos de autor sean acreditados y que la publicación original sea citada, en concordancia con la práctica académica aceptada. No usar, distribuir o reproducir si no se cumplen con estos términos.

Conflicto de Interés. Los autores declaran no tener conflicto de interés

Financiamiento. Este trabajo fue financiado por el Instituto de Salud Pública de Chile.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es causada por espiroquetas infecciosas gram-negativas del género *Leptospira*, familia *Leptospiraceae* (1). La clasificación inicial de este género solo comprendía dos especies, *Leptospira interrogans* (cepas patógenas) y *Leptospira biflexa* (cepas saprófitas). En la actualidad el género *Leptospira* se divide actualmente en 35 especies clasificadas en tres grupos filogenéticos, que supuestamente se correlacionan con la virulencia de la bacteria (2,3). La leptospirosis es reconocida mundialmente como la zoonosis reemergente más extendida (4) y es un importante problema de salud pública en los países en desarrollo (5). Tiene una incidencia estimada de 1.03 millones de casos en humanos cada año, con aproximadamente 59,000 muertes (6). La leptospirosis también está causando problemas de salud importantes en muchas especies animales, incluidos: perros, vacas, cerdos, caballos, ovejas, entre otros. Mientras tanto, en los animales, la enfermedad es esencialmente diferente de la leptospirosis humana y se caracteriza por características clínicas agudas, con presencia de aborto y/o lesiones de múltiples órganos como signos clínicos principales, pero también pueden ocurrir infecciones crónicas, lo que resulta en pérdidas económicas significativas (5).

En humanos, la leptospirosis presenta una variedad de manifestaciones clínicas, desde infección subclínica asintomática hasta enfermedad grave como meningitis, neumonitis, hepatitis, nefritis, y pancreatitis (7-11), y puede causar la muerte (12-13). Los roedores son los principales reservorios de espiroquetas, y diferentes especies pueden funcionar como anfitriones de mantenimiento. Los humanos generalmente se infectan a través del agua contaminada o el contacto directo con la orina infectada o los fluidos abortivos de roedores y animales de producción ganado (14-16). Existe también la transmisión por contacto indirecto, siendo la de mayor frecuencia e importancia en humanos. Se produce por contacto indirecto con *Leptospiras* patógenas presentes en ambiente (aguas, fango y tierra contaminada), siendo considerada una enfermedad ocupacional (2).

En el entorno clínico, la prueba de aglutinación microscópica (MAT) es el método serológico utilizado para el diagnóstico de leptospirosis. Sin embargo, debido a que esta técnica es difícil, laboriosa y de alto riesgo para el operador debido a que utiliza *Leptospira* en cultivo. Nuevos enfoques moleculares (17) e inmunológicos (18) se está utilizando para mejorar la clasificación de los aislados de especies de *Leptospira* en muestras de rutina. En la búsqueda de nuevas alternativas para el desarrollo de vacunas y nuevas metodologías de detección, diferentes proteínas se están evaluando, entre ellas la LipL21, que tiene la particularidad de ser inmunogénica y se encuentra presente en cepas patógenas de *Leptospira* (19, 20). En este trabajo, reportamos la metodología que nos permitió obtener la proteína LipL21 a partir de un aislado chileno de *Leptospira interrogans* serovar canicola.

METODOLOGÍA

Amplificación del gen de la proteína LipL21

Los cultivos bacterianos de *L. interrogans* serovar Canicola utilizados en este trabajo fueron donados por la Dra. Jennifer Style del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), quien aisló esta bacterias de ratas capturadas en una vivienda de Santiago, en donde falleció su morador por infección con *Leptospira* en el 2004. El DNA genómico fue purificado mediante el kit comercial E.Z.N.A Biotech® y utilizado para la amplificación del gen de lipl21 mediante PCR, utilizando partidores de DNA obtenidos en base a la secuencia de DNA de este gen disponible en GenBank®. La reacción de PCR se desarrolló utilizando la enzima Pfu DNA Polymerase (Thermo Scientific™) y el producto de amplificación fue analizado mediante geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

Los partidores de DNA para la reacción de PCR fueron los siguientes:

FLIP-1: 5'- CATATGATCAATAGACTTATCGCTCTATCTGTAGC -3'
NdeI

RLIP-1: 5'- ctcgagttgtttgttgaaactcttctgtccttcg -3'
XhoI

Clonamiento del gen de la proteína LipL21 en el plasmidio pET21a

El producto de PCR fue purificado desde gel de agarosa al 1% utilizando kit de purificación comercial E.Z.N.A Biotech®, el cual fue ligado al plásmido p-GEMT Easy Promega® y se transformó en *E. coli* DH5α, las que fueron diseminadas en placas de agar LB, suplementada con 1 mg/ml de Ampicilina, 50 mg/ml X-Gal y 0,5 mM IPTG. Los plasmidios recombinantes fueron analizados mediante digestión con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, cuyas secuencias de DNA fueron incluidas en los partidores de DNA utilizados en la reacción de PCR. El fragmento de DNA del gen lipl21 liberado del plásmido p-GEMT Easy Promega® fue subclonado en el plasmido de expresión procarionte pET21a, el cual fue previamente digerido con las enzimas NdeI y XhoI y transformado en *E. coli* DH5α.

Expresión y purificación de la proteína LipL21 recombinante

El plásmido pET21a-lipL21 fue purificado desde cultivos bacterianos de *E. coli* y transformados en *E. coli* BL21 (DE3). Colonias bacterianas aisladas fueron incubadas en medio LB suplementado con glucosa (4 g/L) e incubadas hasta OD600 0,5-0,6. Posteriormente la expresión de la proteína fue inducida por 2 horas con IPTG 0,5 M. El sedimento bacteriano se utilizó para la purificación de la proteína LipL21 recombinante (rLipL21).

La purificación de rLipL21 fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante de la resina Ni-NTA de Novagen® (21). La purificación de la proteína recombinante fue analizada mediante geles de SDS-PAGE y la identidad de la proteína se verificó mediante *Western Blot*, utilizando un anticuerpo monoclonal que detecta el residuo de seis histidinas incorporadas a la proteína recombinante en su extremo carboxilo terminal al ser clonado su gen en el plásmido pET21a.

RESULTADOS

Obtención del plásmido pET21a-lipl21 recombinante

El gen de la proteína LipL21 fue amplificado mediante PCR, utilizando los partidores descritos en metodología. El programa de la PCR fue para la etapa de denaturación a 94°C por 1 minuto, hibridación a 50°C por 30 segundos y la extensión a 72°C por 30 segundos. La reacción de

PCR se realizó en 25 ciclos, utilizando la enzima Pfu Taq DNA polimerasa. La PCR permitió obtener un amplicón de aproximadamente 560 pares de bases (pb) (Figura 1).

El amplicón de DNA fue purificado desde el gel de agarosa de acuerdo con lo descrito en metodología y fue clonado en el plásmido p-GEMT Easy Promega®, siguiendo las indicaciones del fabricante. El clonamiento fue analizado mediante digestión del plásmido pGEMTeasy-lipl21 con las enzimas de restricción Nhe I y Xho I, cuyas secuencias de DNA que son reconocidas por estas enzimas fueron incorporadas en los partidores que permitieron amplificar el gen de lipl21 (Figura 2).

El gen de la proteína LipL21 posteriormente fue subclonado en el plásmido pET21a, para lo cual el plásmido pGEMTeasy-lipl21 fue digerido con las enzimas de restricción Nhe I y Xho I, liberándose un fragmento de DNA de aproximadamente 560 pb, el cual fue ligado al plásmido pET21a, el que previamente fue digerido con las mismas enzimas de restricción.

El plásmido pET21a-lipl21 fue analizado mediante digestión con enzimas de restricción (Figura 3), lo cual permitió verificar el subclonamiento.

Figura 1

Análisis de amplificación del gen de lipl21. El resultado de la reacción de PCR se analizó en gel de agarosa al 1% en Buffer TAE 1x. Los fragmentos de DNA fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio. Carril 1: Estándar de peso molecular DNA λ /Hind III. Carril 2: Amplicón del gen lipl21.

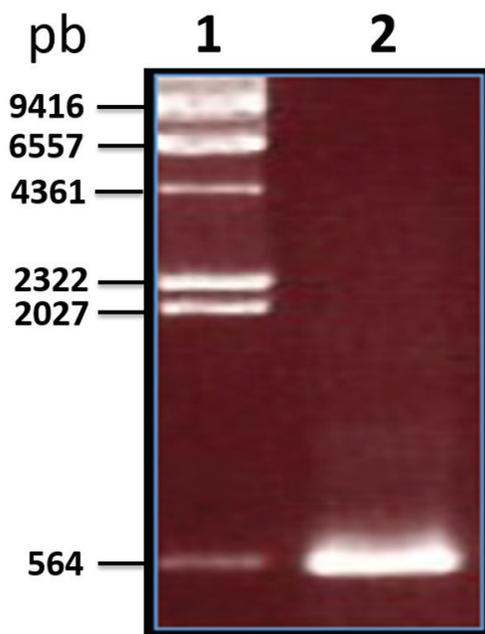


Figura 2

Análisis de clonamiento del gen lipl21 en plásmido pGEM®-T easy. Los plásmidos fueron analizados en gel de agarosa al 1% en Buffer TAE 1x, teñidos con bromuro de etidio. Carril 1: Estándar de peso molecular DNA λ /Hind III. Carril 2: pGEM®-T easy-lipl21. Carril 3: pGEM®-T easy-lipl21 digerido con la enzima de restricción *Eco*RI.

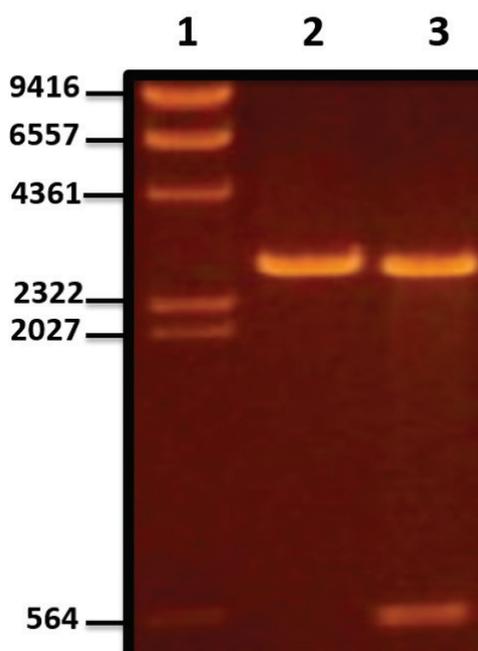


Figura 3

Análisis de amplificación del gen de *lipL21*. El resultado de la reacción de PCR se analizó en gel de agarosa al 1% en Buffer TAE 1x. Los fragmentos de DNA fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio. Carril 1: Estándar de peso molecular DNA λ /Hind III. Carril 2. Amplicón del gen *lipL21*. Carril 3: pET21a *lipL21* digerido con las enzimas de restricción NheI y HinfI.

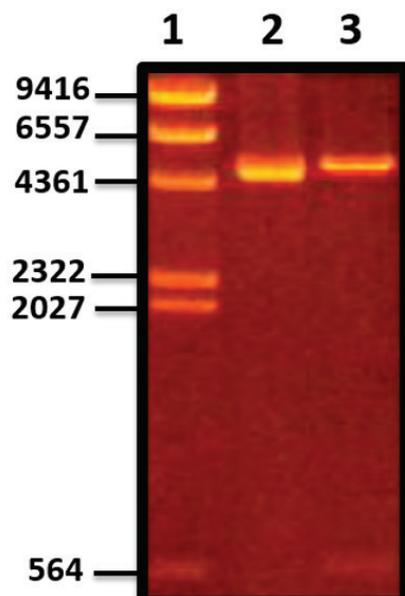
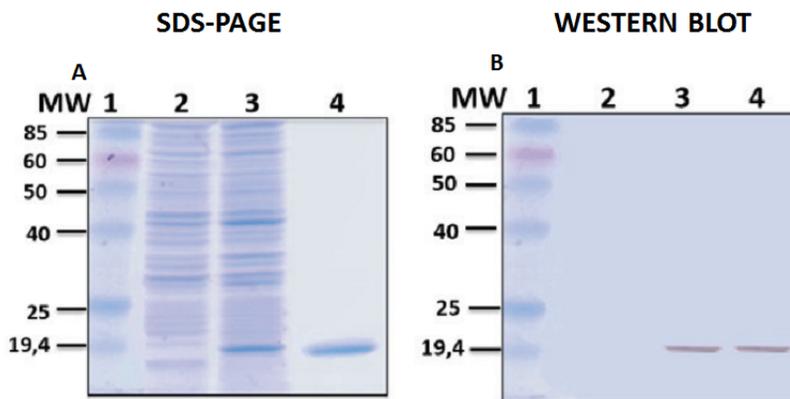


Figura 4

Análisis de la obtención de la proteína recombinante LipL21 (rLipL21). A. Análisis de la pureza de rLipL21 mediante SDS-PAGE 10%: Carril 1: Estándar de peso molecular BenchMark Pre-Stained Protein Ladder; Carril 2: Extracto total de *E. coli*/BL21 (DE3) sin inducir con IPTG; Carril 3: Extracto total de *E. coli*/BL21 (DE3) inducido con IPTG; Carril 4: rLipL21 purificada. B. Análisis de identidad de rLipL21 mediante *Western Blot*, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente los seis de residuos de histidina de rLipL21. El gel de poliacrilamida descrito en A, sin teñir, fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa.



La identidad del gen *lipL21* clonado en el plásmido fue analizado mediante secuenciación de DNA, lo que nos permitió detectar un marco de lectura abierto de 564 pb que codifica para una proteína de 188 aminoácidos correspondientes al gen de la proteína LipL21. La secuencia de DNA del gen clonado reveló una identidad del 99% con las secuencias descritas para este gen (datos no mostrados).

El gen de la proteína LipL21 proveniente de un aislado nacional de *Leptospira interrogans* serovar canicola fue clonado en el vector de expresión procarionte pET21a, la secuencia de DNA del gen demostró que es conservado, por lo que tiene un potencial uso para ser utilizado en metodologías de detección de esta bacteria.

Expresión y purificación de la proteína rLipL21 desde extractos de *E. coli* BL21 (DE3)

Para expresar la proteína rLipL21, el plásmido pET21a-*lipL21* fue transformado en bacteria *E. coli*/BL21 (DE3) y de acuerdo a lo descrito en metodología, la proteína se expresó después de 2 horas de inducción con IPTG, del cultivo bacteriano a OD600 de 0,5. La proteína rLipL21 se expresó como una proteína soluble y fue purificada siguiendo el protocolo descrito en metodología. La proteína fue purificada con una pureza superior al 99%, lo cual fue analizado mediante análisis en geles de SDS-PAGE y la identidad de la proteína fue analizada en forma indirecta, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la secuencia de seis histidinas incorporadas a la proteína LipL21 en su extremo carboxilo terminal al ser clonado su gen en el plásmido pET21a (Figura 4).

La proteína rLIPL21 se expresó en forma soluble, lo que no altera su conformación proteica, lo cual es relevante si esta proteína es utilizada en la detección de anticuerpos el tipo IgM o IgG desde pacientes infectados por esta bacteria.



DISCUSIÓN

En este trabajo hemos reportado la obtención de la proteína rLipL21 desde un aislado chileno de *Leptospira interrogans* serovar Canicola, el cual resultó ser bastante conservado en su secuencia de DNA (99%) y aminoacídica (98%). Por sus características bioquímicas e inmunológicas es un antígeno atractivo para ser utilizado en la formulación de una vacuna (22, 23), y blanco para el desarrollo de métodos moleculares para la detección de *Leptospira* sp. (24, 25), lo cual es importante debido a que es una enfermedad zoonótica, que además tiene diagnóstico diferencial con Hanta virus, que toma relevancia en casos sospechosos de infección respiratoria aguda por Hantavirus, pero con serología negativa (26). Por lo tanto, nuestro trabajo abre la posibilidad de potencial desarrollo biotecnológico.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sra. Barbara Riveros y a la Sra. América Abarca por su apoyo técnico, que nos permitió finalizar este trabajo. Nuestros agradecimientos al Departamento de Asuntos Científicos por promover, apoyar e incentivar el desarrollo científico tecnológico en nuestra institución. Finalmente, agradecemos a la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Santo Tomás, que nos ha permitido desarrollar Tesis de pregrado con sus alumnos, que han sido un gran estímulo y motor del desarrollo de nuestro trabajo experimental. Finalmente, agradecemos al TM. Roberto Flores, encargado de Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos del Subdepto de Enfermedades infecciosas del Departamento Biomédico, por su retroalimentación a nuestro manuscrito.

Referencias bibliográficas

1. Levett PN, Picardeau M. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospiraceae*. Minutes of the closed meeting, 28 November 2017, Palmerston North, New Zealand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68(10):3362.
2. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:296–326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001
3. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; 13:5. e0007270. doi: 10.1371/journal.pntd.0007270
4. Adler B. History of leptospirosis and *leptospira*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:1-9.
5. Ellis WA. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:99-137.
6. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0004122.
7. de Souza AL, Sztajn bok J, Marques SR, Seguro AC. Leptospirosis-induced meningitis and acute renal failure in a 19-month-old male child. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 6):795-797.
8. Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CR. *Leptospiral pneumonias*. *Curr Opin Pulm Med*. 2007;13(3):230-235.
9. Adamus C, Buggin-Daubié M, Izembart A, et al. Chronic hepatitis associated with leptospiral infection in vaccinated beagles. *J Comp Pathol*. 1997;117(4):311-328.
10. Schreiber P, Martin V, Najbar W, Sanquer A, Gueguen S, Lebreux B. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. *Vet Microbiol*. 2005;108(1-2):113-118.
11. Spichler A, Spichler E, Moock M, Vinetz JM, Leake JA. Acute pancreatitis in fatal anicteric leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(5):886-887.
12. Christova I, Tasseva E, Manev H. Human leptospirosis in Bulgaria, 1989-2001: epidemiological, clinical, and serological features. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(11-12):869-872.
13. Vlcik C, Ty L, Wfl L, et al. Leptospirosis in human: Biomarkers in host immune responses. *Microbiol Res*. 2018;207:108-115.
14. Scolamacchia F, Handel IG, Fèvre EM, Morgan KL, Tanya VN, Bronsvoort BM. Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. *PLoS One*. 2010;5(1):e8623.
15. Bourhy P, Collet L, Clément S, et al. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(6):e724.
16. Boey K, Shiokawa K, Rajeev S. *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(8):e0007499. Published 2019 Aug 9.
17. Cosate MRV, Sakamoto T, de Oliveira Mendes TA, et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. *BMC Vet Res*. 2017;13(1):177.
18. Marquez, A., Djelouadji, Z., Lattard, V., and Kodjo, A. (2017). Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. *Int. Microbiol*. 20, 184–193.
19. Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun*. 2003;71(5):2414-2421.
20. Ratet G, Santecchia I, Fanton d'Andon M, et al. LipL21 lipoprotein binding to peptidoglycan enables *Leptospira interrogans* to escape NOD1 and NOD2 recognition. *PLoS Pathog*. 2017;13(12):e1006725.
21. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/SAJ/Brochure/2/TB054.pdf>. Revisado 21 de junio del 2020.
22. Diaz-Dinamarca DA, Hernandez C, Escobar DF, et al. Mucosal Vaccination with Lactococcus lactis-Secreting Surface Immunological Protein Induces Humoral and Cellular Immune Protection against Group B Streptococcus in a Murine Model. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(2):E146.
23. Diaz-Dinamarca DA, Soto DA, Leyton YY, et al. Oral vaccine based on a surface immunogenic protein mixed with alum promotes a decrease in Streptococcus agalactiae vaginal colonization in a mouse model. *Mol Immunol*. 2018;103:63-70.
24. Pérez LJ, Lanka S, DeShambo VJ, Fredrickson RL, Maddox CW. A Validated Multiplex Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Infectious *Leptospira* spp.: A Novel Assay for the Detection and Differentiation of Strains From Both Pathogenic Groups I and II. *Front Microbiol*. 2020;11:457.
25. Escobar DF, Diaz-Dinamarca DA, Hernández CF, et al. Development and analytical validation of real-time PCR for the detection of Streptococcus agalactiae in pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2020;20:352.
26. María Hinojosa P, Eliecer Villagra C, Judith Mora R, Liliana Maier. Identificación de otros agentes infecciosos en casos sospechosos de síndrome cardiopulmonar por hantavirus. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 332-338.