

## MODELAGEM ESTRUTURAL E PREDIÇÃO DE PORÇÕES IMUNOGÊNICAS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE LEPTOSPIRAS APLICADO AO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS RECOMBINANTES

Everton Bettin<sup>1</sup>; Aisha Bakri<sup>2</sup>; Jéssica Souza<sup>3</sup>; André Grassmann<sup>4</sup>; Alan McBride<sup>5</sup>; Odir Dellagostin<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Vacinologia – CDTec – UFPel – tombettin@outlook.com

<sup>2</sup>Laboratório de Vacinologia – CDTec – UFPel – aishefarid@gmail.com

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – CDTec – UFPel – gsk.souza@gmail.com

<sup>4</sup>Laboratório de Proteômica – CDTec – UFPel – grassmann.aa@gmail.com

<sup>5</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – CDTec – UFPel – alanmcb@gmail.com

<sup>6</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) – UFPel – odir@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das principais zoonoses em termos de morbidade e mortalidade no mundo, com uma estimativa de mais de 1 milhão de novos casos da doença anualmente em humanos, acarretando em aproximadamente 59.000 mortes (COSTA, 2015). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos principalmente nas capitais e áreas metropolitanas devido às enchentes associadas, à aglomeração populacional de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A vacinação humana contra a leptospirose é realizada através de bacterinas, sendo utilizadas em poucos países como, Japão, Cuba, França e China (DELLAGOSTIN *et al.*, 2011). Estas formulações conferem uma proteção apenas contra os sorovares que compõem a vacina. Efeitos adversos da administração de bacterinas, a indução de uma proteção de curta duração e a necessidade de reforços anuais são outros problemas enfrentados com esta abordagem vacinal (KOIZUMI e WATANABE, 2005; ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Considerando essas limitações, diversos estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose. Apesar dos avanços desta técnica nos últimos anos, nenhum antígeno investigado até o momento foi capaz de conferir proteção de amplo espectro contra a doença. Os antígenos mais promissores para composição de vacinas recombinantes são aqueles expostos na superfície da bactéria, permitindo o reconhecimento da mesma por componentes do sistema imune (RAPPUOLI e BAGNOLI, 2011). Proteínas integrais de membrana externa assumem a conformação de barril-beta transmembrana, uma estrutura bastante conservada, capaz de ser predita por ferramentas de bioinformática (BIGELOW *et al.*, 2004).

Dentre os mais recentes aprimoramentos no desenvolvimento de vacinas de nova geração está a chamada vacinologia estrutural. Esta abordagem leva em conta a estrutura tridimensional da proteína permitindo, dentre várias abordagens, a identificação de epítomos imunodominantes e a união destes em uma única molécula, promovendo a indução de uma resposta imune mais ampla. (DELANY *et al.*, 2013). Uma nova vacina protetora contra leptospirose deve conter epítomos expostos na superfície da bactéria, conservados em todas as espécies patogênicas e capaz de gerar uma resposta imune que neutralize a infecção. Este trabalho realizou a modelagem estrutural de proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* identificando os epítomos imunogênicos expostos nelas, assim como, a obtenção das proteínas recombinantes correspondentes, visando o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose.

## 2. METODOLOGIA

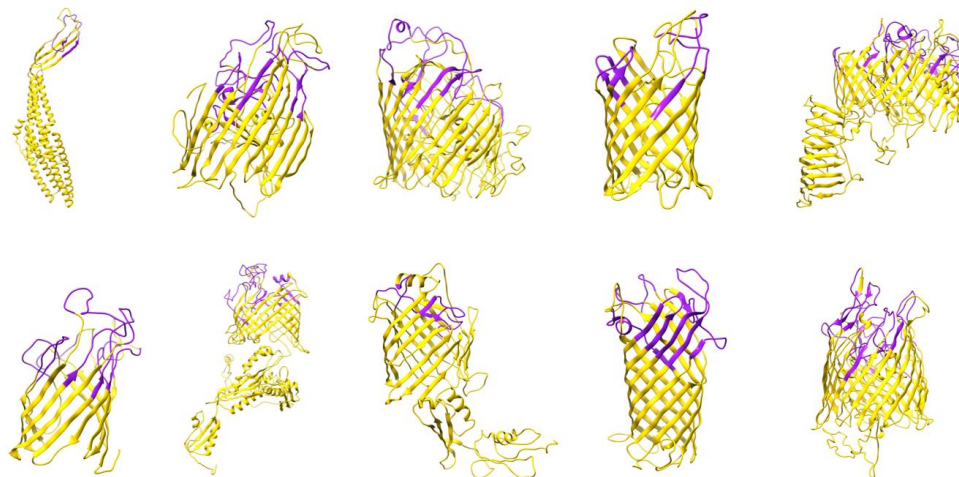
Para este trabalho foram selecionadas 10 proteínas de *Leptospira* spp. preditas por DOS SANTOS (2015) como sendo proteínas integrais de membrana externa (OMP) conservadas em todas as espécies patogênicas do gênero. As sequências das proteínas foram obtidas através do GenBank e a identificação do peptídeo sinal realizada por SignalP, SignalCF e Predisi. Após a retirada da sequência correspondente ao peptídeo sinal, as sequências foram submetidas para a modelagem de sua estrutura tridimensional (3D) por homologia utilizando a ferramenta I-TASSER. As estruturas foram visualizadas através do software UCSF Chimera 1.11. Para a predição de epítomos imunogênicos com alta afinidade aos 14 alelos HLA-DBR do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHCII) foi utilizado o programa NetMHCII 2.2. Todos os epítomos classificados como de forte ligação ( $IC_{50} < 50$  nM) ao complexo MHCII tiveram suas sequências confrontadas com as estruturas tridimensionais das moléculas afim de identificar aqueles expostos na superfície bacteriana.

Para obtenção das proteínas recombinantes foram desenhados *primers* visando a amplificação e clonagem das sequências codificadoras em vetor *pAE* de expressão em *E. coli*. Os vetores recombinantes foram caracterizados por sequenciamento de DNA. Para expressão das proteínas foi utilizada a cepa *E. coli* BL21(DE3) Star. As proteínas recombinantes foram purificadas através de cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando coluna His-Trap FF (GE), no sistema automatizado AKTA-Purifier (GE). As proteínas purificadas foram analisadas por SDS-PAGE e caracterizadas por Western blot utilizando anticorpos específicos contra a cauda de 6xHis.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

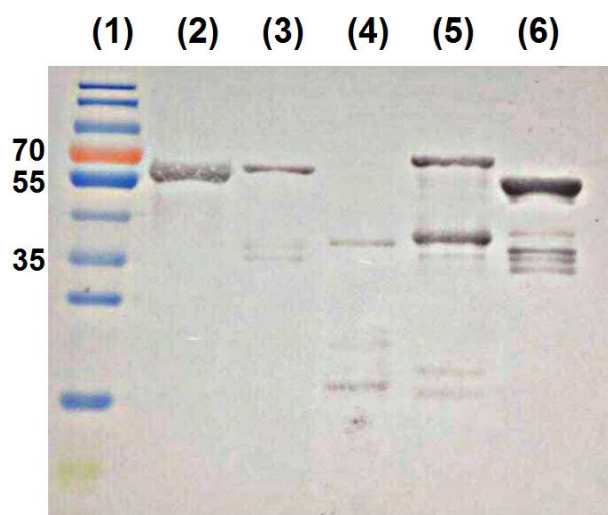
Todas as proteínas analisadas foram preditas, quanto a sua estrutura, como proteínas barril-beta, confirmando as análises *in silico* anteriores realizadas por DOS SANTOS (2015) quanto a disposição destas proteínas na membrana externa do patógeno (Figura 1), pré-requisito para a utilização destas moléculas em formulações vacinais. A modelagem estrutural permitiu também inferir o sentido de inserção de cada molécula na membrana, sugerindo as porções expostas de cada proteína. Esta informação é de interesse para a expressão heteróloga das proteínas, visto que muitas destas possuem um alto peso molecular, e a escolha de apenas uma porção se faz necessária para a expressão em um sistema bacteriano.

A avaliação das sequências proteicas quanto aos seus epítomos imunogênicos identificou segmentos propensos ao reconhecimento por MHCII humanos, e consequentemente importantes na promoção de uma resposta imunológica. Os 14 alelos humanos analisados compreendem 95% da população (OYARZUN *et. al.*, 2013), permitindo a identificação de epítomos capazes de uma cobertura majoritária da população humana em uma eventual vacinação. A identificação dos epítomos imunodominantes, expostos e conservados em todas as proteínas, permite a construção de uma proteína sintética de grande potencial como antígeno em uma formulação vacinal contra a leptospirose baseada na vacinologia estrutural.



**Figura 1.** Modelos estruturais tridimensionais de 10 proteínas de membrana externa de *Leptospira* spp. patogênicas preditas *in silico* por I-Tasser. As porções destacadas em roxo são as porções preditas por NetMHCII como capazes de ligação forte às moléculas de MCHII humano e possivelmente expostas na superfície da bactéria.

Das proteínas analisadas, quatro tiveram sua expressão heteróloga realizada até então. As proteínas selecionadas foram corretamente expressas utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star e o vetor de expressão pAE. Todas as proteínas recombinantes expressas foram reconhecidas pelo anticorpo monoclonal (mAB) anti-6xHIS nos tamanhos esperados, através da técnica de *western blot* (Figura 2) Estas proteínas servirão como antígenos vacinais em futuros ensaios de imunoproteção.



**Figura 2.** Caracterização das proteínas recombinantes através de *Western blot*:

- (1) Marcador de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen);  
(2) Controle Positivo; (3-6) Proteínas recombinantes.

#### 4. CONCLUSÕES

Todas as 10 proteínas selecionadas parecem ser OMPs com epítomos imunogênicos expostos na superfície da bactéria, sendo portanto fortes candidatos vacinais contra a leptospirose. A expressão destas proteínas em sistema heterólogo permitirá avalia-los como antígenos vacinais em modelo animal. Futuramente serão selecionados alguns dos epítomos imunodominantes expostos para comporem quimeras recombinantes, buscando-se alcançar uma resposta imunoprotetora de amplo espectro.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287–296, 2010.

RAPPUOLI, R.; BAGNOLI, F. **Vaccine Design: Innovative Approaches and Novel Strategies**. Norfolk: Caister, 2011.

BIGELOW, H. R.; PETREY, D. S.; LIU, J.; PRZYBLSKI, D.; ROST, B. **Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes**, v. 32, n.8, p.2566-2577, 2004.

COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TOGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.3, p.1–19, 2015.

DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; SEIB, K.L. Vaccines, Reverse Vaccinology, and Bacterial Pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**. May 1;3(5):a012476. 2013.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMAN, A. A.; HARTWIG, D.; FÉLIX, S.; SILVA, É. F.; MCBRIDE, A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, v.11, n.7, p.1215-1224, 2011.

DOS SANTOS, J. C. **Mineração genômica de *L. interrogans* para identificação de proteínas de superfície**. 2015. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. **Symposium**, v.51, n.3, p210-214, 2005

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde. **Leptospirose, Situação epidemiológica / Dados**. 2015. Acessado em: 01 nov. 2015. Online. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>.

OYARZÚN, P.; ELLIS, J. J.; BODÉN, M.; KOBE, B. PREDIVAC: CD4+ T-cell epitope prediction for vaccine design that covers 95% of HLA class II DR protein diversity. **BMC Bioinformatics**. v.52, n.14, 2013.