

DESENVOLVIMENTO DE QUIMERAS RECOMBINANTES CONTRA A LEPTOSPIROSE ATRAVÉS DE ABORDAGEM DE VACINOLOGIA REVERSA E ESTRUTURAL

EVERTON BETTIN¹; AMANDA HECKTHEUER²; ANDRÉ A. GRASSMANN³;
ALAN J. A. MCBRIDE⁴; ODIR A. DELLAGOSTIN⁵

¹Laboratório de Vacinologia – CDTec – UFPEL – tombbettin@gmail.com

²Laboratório de Vacinologia – CDTec – UFPEL – amandasheck@hotmail.com

³Department of Medicine - University of Connecticut Health Center - grassmann.aa@gmail.com

⁴Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – CDTec – UFPEL – alanmcb@gmail.com

⁵Laboratório de Vacinologia – CDTec – UFPEL – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das principais zoonoses em termos de morbidade e mortalidade no mundo, estimando-se atualmente mais de um milhão de casos da doença e aproximadamente 59.000 mortes a cada ano (COSTA et al., 2015). A vacinação humana contra a leptospirose é realizada através de bacterinas. Estas formulações conferem uma proteção apenas contra os sorovares que compõem a vacina. A existência de um alto número de sorovares de leptospirosas patogênicas e a variabilidade dos sorovares de acordo com a localidade dificultam a existência de uma vacina de utilização mundial. Efeitos adversos da administração de bacterinas e a indução de uma proteção de curta duração, são outros problemas enfrentados com esta abordagem vacinal (KOIZUMI e WATANABE, 2005; ADLER, DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Considerando essas limitações, diversos estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a doença. 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).

O mais recente aprimoramento no campo de desenvolvimento de vacinas de nova geração é a chamada vacinologia estrutural. Esta abordagem leva em conta a estrutura tridimensional da proteína, permitindo a identificação de epítomos de interesse e a união de múltiplos epítomos em uma única molécula, promovendo a indução de uma resposta imune mais ampla. (DELANY et al., 2013).

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de quimeras recombinantes contra a leptospirose através da utilização de uma abordagem reversa e estrutural, permitindo a identificação e utilização de epítomos imunogênicos presentes na superfície de *Leptospira* spp.

2. METODOLOGIA

Para este trabalho foram selecionadas 18 proteínas de *Leptospira* spp. preditas por DOS SANTOS (2015) como sendo proteínas integrais de membrana externa (OMP) e conservadas em todas as espécies patogênicas do gênero. As sequências das proteínas foram obtidas através do GenBank (NCBI) e

submetidas para modelagem de sua estrutura tridimensional (3D) por homologia no programa I-TASSER. As estruturas foram visualizadas através do software UCSF Chimera 1.11.

Com base na sequência de aminoácidos das proteínas foram preditos os epítomos de interesse para o desenvolvimento das vacinas. Para a predição de epítomos de células T com alta afinidade aos 14 alelos HLA-DBR do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHCII) humano foi utilizado o programa NetMHCII 2.2. A partir da sequência de aminoácidos também foi predita a existência de epítomos lineares de células B através da ferramenta BepiPred 1.0. Todos os epítomos classificados como de forte ligação ($IC_{50} < 50$ nM) ao complexo MHCII, assim como, aqueles que obtiveram um score superior a 0.35 na análise pelo BepiPred 1.0 tiveram suas sequências confrontadas com as estruturas tridimensionais das moléculas afim de identificar os expostos na superfície bacteriana.

As regiões externas a membrana das 17 proteínas avaliadas e que continham epítomos de células T e epítomos lineares de células B foram selecionadas para comporem as quimeras recombinantes. As moléculas foram construídas visando reunir epítomos de células T referentes a diferentes alelos humanos de MHC e de forma a possuírem um peso molecular apropriado para sua expressão heteróloga.

As sequências codificadoras para as construções quiméricas foram sintetizadas comercialmente em vetor de expressão pAE com otimização de códons para expressão em *E. coli*. As expressões foram realizadas utilizando a cepa *E.coli* BL21 (DE3) Star. As proteínas foram purificadas em colunas de afinidade ao níquel, His-Trap FF® (GE Healthcare), no sistema automatizado AKTA Purifier (GE Healthcare), sendo caracterizadas quanto a sua correta expressão e purificação através das técnicas de SDS-PAGE e *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHIS (1:5000).

Para a identificação da antigenicidade das construções quiméricas, assim como, da manutenção dos epítomos nativos, foi realizado um *Western blot* utilizando soro humano convalescente. Os soros foram diluídos na proporção de 1:100 e o resultado visualizado a partir da técnica de quimioluminescência.

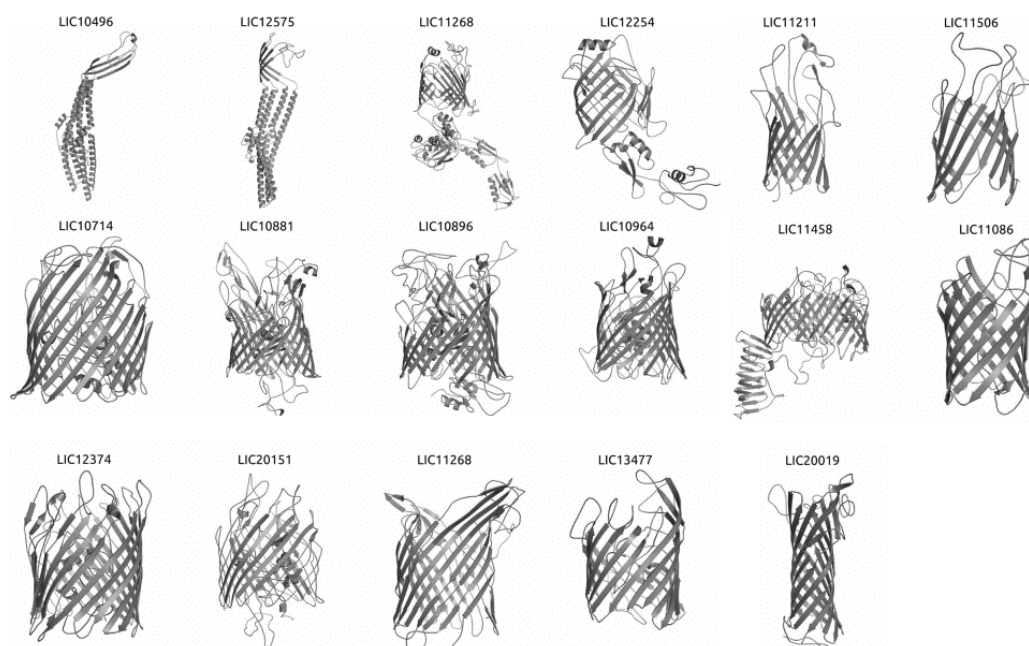
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dezessete 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 avaliação das sequências proteicas quanto aos seus epítomos imunogênicos identificou epítomos de células B e T presentes na região externa a membrana em todas as proteínas analisadas, demonstrando o potencial destas para a promoção de uma resposta imunológica.

Os 14 alelos humanos de MHCII 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.

Figura 1. Predição estrutural por homologia de proteínas de *Leptospira* spp.



Foi possível identificar epítomos imunodominantes, expostos e conservados em todas as proteínas analisadas, permitindo a construção de 5 moléculas sintéticas, compreendendo 44 regiões de interesse, com pesos moleculares variando de 41 a 30 kDa. A metodologia utilizada permitiu ainda a correta expressão das proteínas quiméricas em *E. coli* nos tamanhos esperados (Figura 2a), assim como, suas corretas solubilizações, visto a menor hidrofobicidade destas moléculas quando comparadas com suas proteínas nativas. Quatro das cinco moléculas recombinantes expressas demonstraram serem reconhecidas por anticorpos IgG de pacientes infectados com o patógeno (Figura 2b), demonstrando a manutenção dos epítomos de interesse, e o potencial imunogênico destes, o que comprova o sucesso da utilização desta abordagem para o desenvolvimento de antígenos vacinais.

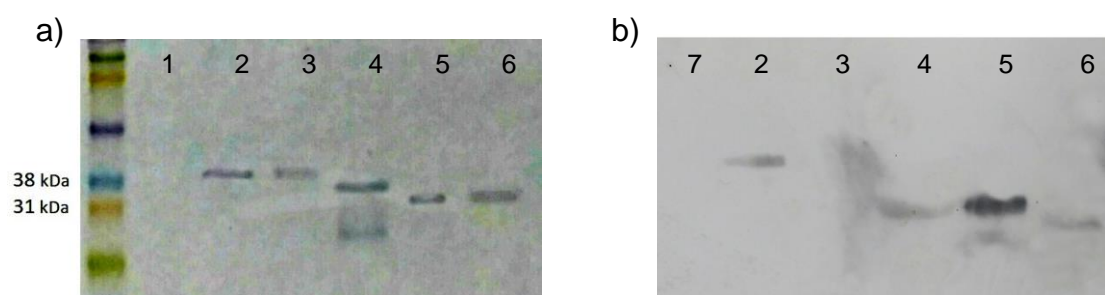


Figura 2. Western blot das proteínas quiméricas utilizando anticorpo monoclonal anti 6xHIS (a) e soro humano convalescente (b). (1) *E.coli* não transformada; (2-6) Quimeras recombinantes; (7) BSA.

4. CONCLUSÕES

As dezessete proteínas de *Leptospira* spp. preditas neste trabalho como sendo proteínas integrais de membrana externa e possuindo características imunogênicas são alvos vacinais em potencial. As cinco moléculas quiméricas construídas permitirão a promoção de uma resposta imune direcionada a 44 porções externas e altamente conservadas da bactéria, aumentando as chances de obtenção de uma vacina protetora e de amplo espectro. Futuros ensaios de proteção em modelo animal serão necessários para confirmar o potencial destes antígenos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

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

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.

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