

OBTENÇÃO DE QUIMERA RECOMBINANTE CONSTITUÍDA DE PROTEÍNAS TolC DE *Leptospira* spp. PARA DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA LEPTOSPIROSE

ANA C. K. PEDRA¹; MARA A. C. MAIA²; NATASHA R. DE OLIVEIRA²; TIFFANY T. BUNDE²; ALAN J. A. McBRIDE²; ODIR A. DELLAGOSTIN³

¹Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – caarolpedra@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - maraacmaia@gmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - oliveira_natasha@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - tiffany_bia@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - alan.mcbride@ufpel.edu.br

³Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A Leptospirose é uma enfermidade de caráter zoonótico causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Estima-se que anualmente a doença acometa em torno de 1 milhão de pessoas no mundo, acarretando cerca de 60 mil mortes (COSTA et al., 2015). Humanos e os animais domésticos são comumente infectados através do contato direto com a urina de animais portadores, ou através do contato com água ou solo contaminados (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A vacinação é um dos métodos mais eficazes na prevenção e erradicação de doenças infecciosas (DELLAGOSTIN et al., 2011). As atuais vacinas disponíveis contra leptospirose são compostas por bactérias inteiras inativadas, as quais induzem uma resposta imunológica sorovar-específica, não conferindo proteção contra sorovares que não compõem a vacina (McBRIDE et al, 2005). Uma das mais importantes abordagens no estudo de vacinas de nova geração é a vacinologia estrutural. Esta estratégia leva em consideração a estrutura tridimensional da proteína, permitindo a identificação de epítopos imunodominantes expostos na superfície bacteriana, promovendo a indução de uma resposta imune mais eficaz (DELANY et al., 2013).

Através de uma abordagem de bioinformática baseada em vacinologia reversa e estrutural, nosso grupo identificou proteínas preditas como barril-β transmembrana (β b-OMP) que estão presentes na membrana externa de *Leptospira* spp. e são consideradas potenciais alvos vacinais (GRASSMANN, et al., 2017). As proteínas barril-β transmembrana são encontradas exclusivamente na membrana externa de bactérias. Dentre tais proteínas, podemos destacar a família das TolC, o componente de bombas de efluxo presente na membrana externa de *Leptospira* (HAAKE; LEVETT, 2015). Sabendo- se que cada região da proteína TolC é um monômero, o barril-β transmembrana é devidamente caracterizado ao formar trímeros. O barril-β transmembrana, devidamente formado pelas interações entre os monômeros, ainda é constituído por uma região periplasmática composta por alfa hélices longas que interagem com os componentes periplasmáticos e da membrana interna, formando o canal de efluxo. Epítopos de cinco proteínas preditas como TolC foram selecionados para a construção de uma quimera.

O objetivo deste trabalho foi a análise *in silico*, expressão e caracterização da quimera constituída de fragmentos de proteínas da família TolC, para desenvolvimento de vacina contra leptospirose.

2. METODOLOGIA

2.1 Seleção dos alvos e modelagem estrutural

Para a análise estrutural e a identificação de epítopos imunogênicos das proteínas, as sequências codificadoras foram obtidas no banco de dados GenBank (NCBI). A sequência de aminoácidos correspondente às proteínas maduras foi submetida ao software I-TASSER para a geração de modelos para estrutura tridimensional (3D). Epítopos imunogênicos para o Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHCII) e epítopos para reconhecimento por receptores de células B, foram buscados na sequência primária das proteínas utilizando ProPredII e BepiPred 2.0, respectivamente. As estruturas foram visualizadas através do software UCSF Chimera 1.12.

2.2 Clonagem e expressão heteróloga

O gene adicionado de forma sintética foi克隆ado no vetor pAE de expressão em *E. coli*, que fusiona o gene de interesse a uma sequência que codifica uma cauda de seis histidinas. Este vetor recombinante foi utilizado para transformar a cepa *E. coli* BL21(DE3) por choque térmico, que em seguida a cepa foi cultivada em 25 mL de LB líquido com ampicilina (LB/AMP) por 16 h, a 37°C sob agitação. O cultivo foi utilizado para inocular 500 mL de LB/AMP e incubado nas mesmas condições e monitorado até atingir a fase exponencial, quando a expressão da proteína recombinante foi induzida com Isopropil β-D-1-tiogalatopiranosideo (IPTG) por 3 h. As células foram centrifugadas, solubilizadas em tampão e lisadas por sonicação. Posteriormente foi feito nova centrifugação e o pellet foi solubilizado em tampão contendo ureia como agente desnaturante. A quimera foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e posteriormente dialisada contra tampão fosfato-salino (PBS).

2.3 Caracterização

A proteína recombinante foi caracterizada pelas técnicas de SDS-PAGE e *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis para confirmação da sua correta expressão e identidade. Para avaliar sua antigenicidade, foi realizado *Western blot* utilizando soro humano convalescente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo 3D das 5 proteínas mostrou a conformação de monômero de ββ-OMP tipo TolC, além de demonstrar interações para constituição do trímero característico (Figura 1A). A construção químérica foi bem-sucedida, utilizando os epítopos lineares para MHCII e para reconhecimento de células B dispostos de forma sequencial, levando em conta a equimolaridade entre os fragmentos das proteínas (Figura 1B).

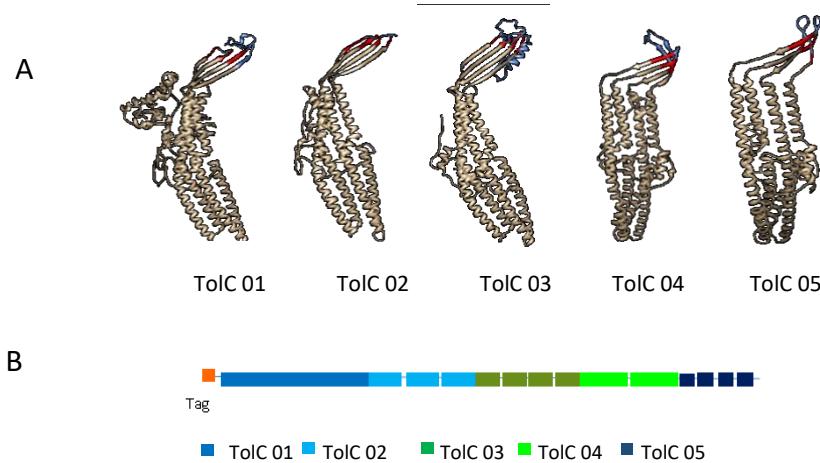


Figura 1. Construção da QuimeraTolC A: Modelo 3D das proteínas preditas como TolC presentes na membrana externa de *Leptospira* spp. Região marcada em vermelho demonstra a porção externa à membrana de cada proteína. Epítópos selecionados para a construção quimérica destacados em azul. B: Esquematização da sequência quimérica, em que cada cor representa uma proteína diferente.

A expressão heteróloga e purificação da quimera recombinante foi eficiente, como demonstrado através das técnicas SDS-PAGE 12% (Figura 2A) e *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis apresentando tamanho esperado de aproximadamente 44 kDa (Figura 2B). Além disso, demonstrou sua antigenicidade sendo reconhecida por soros humanos positivos para leptospirose (Figura 2C). Desta forma, significando que a *Leptospira* expressa pelo menos uma das proteínas presentes na quimera TolC durante a infecção. Assim, os anticorpos gerados contra a proteína nativa durante a infecção são capazes de reconhecer a quimeraTolC.

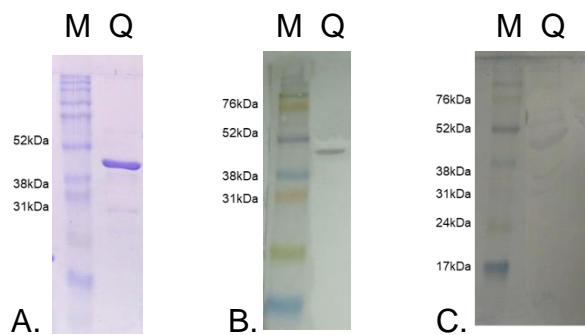


Figura 2. Caracterização da quimera, M. Marcador de peso molecular; Q. QuimeraTolC com aproximadamente 44 kDa. A: SDS-PAGE da expressão da proteína recombinante; B: *Western blot* confirmação a identidade recombinante da proteína; C: Reconhecimento da proteína por soros positivos para leptospirose.

4. CONCLUSÕES

A eficiente construção quimérica, através da seleção de epítópos, e sua expressão heteróloga, mostra que essa abordagem nos proporciona a obtenção da quimera constituída de proteínas TolC, possibilitando sua avaliação como um potencial alvo vacinal em uma promissora vacina contra leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Australia, v.140, n.3-4, p. 287-96, 2010.
- 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.; RAPPOLI, R.; SEIB, K.L. Vaccines, Reverse Vaccinology, and Bacterial Pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**. May 1;3(5):a012476. 2013.
- DELLAGOSTIN, O.A., GRASSMANN, A.A., HARTWIG, D.D., FÉLIX, S.R., DA SILVA, É.F., MCBRIDE, A.J.A., Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum. Vaccin.** v. 7, p. 1215–24, 2011.
- GRASSMANN, A.A., KREMER, F.S., DOS SANTOS, J.C., SOUZA, J.D., PINTO, L. DA S., MCBRIDE, A.J.A., Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Front. Immunol**, 2017.
- HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N., Leptospirosis in Humans. In: Adler, B. **Leptospira and Leptospirosis**, Berlin, **Springer**, p.65-99, 2015.
- MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376–386, 2005.
- SCHULZ, G. β -Barrel membrane proteins, In **Current Opinion in Structural Biology**, v.10, n.4, p.443-447, 2000.