

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PORÇÕES PROTEÍCAS VISANDO A CARACTERIZAÇÃO DE UM POTENCIAL ANTÍGENO VACINAL CONTRA A LEPTOSPIROSE

AMANDA S. HECKTHEUER¹, EVERTON BETTIN², ANDRÉ A. GRASSMANN³,
ALAN J. MCBRIDE⁴ E ODIR A. DELLAGOSTIN⁵

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

² Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – tombbettin@gmail.com

³ Department of Medicine and Department of Molecular Biology and Biophysics - University of Connecticut Health, EUA - grassmann.aa@gmail.com;

⁴ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – alanmcb@gmail.com

⁵ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada de distribuição mundial e um importante problema de saúde pública, com grande impacto na produção animal, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER, 2015). Roedores são os principais reservatórios desta espiroqueta, carregando-as nos rins e as liberando no ambiente através da urina. Estima-se atualmente a ocorrência de mais de um milhão de casos da doença no mundo por ano e aproximadamente 60.000 mortes (COSTA et al., 2015).

As vacinas disponíveis contra a leptospirose são compostas por bacterinas, apresentando diversas limitações como à indução de imunidade restrita aos sorovares presentes na formulação e efeitos indesejáveis que restringem seu uso em humanos. (ADLER, 2015). Uma vacina constituída de antígenos proteicos que contenham epítomos expostos na superfície da bactéria, conservados em todas as espécies patogênicas, poderá ser capaz de gerar uma resposta imune protetora mais ampla e que neutralize a infecção (RAPPUOLI e BAGNOLI, 2011).

Nosso grupo identificou recentemente, através de uma abordagem de vacinologia reversa e estrutural, potenciais novos alvos vacinais contra leptospirose. Foram preditas 18 proteínas barril- β transmembrana (β b-OMP) conservadas entre as leptospiplas patogênicas. A geração de modelos para as estruturas tridimensionais dessas proteínas permitiu a predição da função destas, entretanto, a caracterização *in vitro* ainda se faz necessária. Dentre estas proteínas, destaca-se uma possível proteína TolC de *Leptospira* spp. (LIC12575). As proteínas desta classe estão envolvidas na exportação de pequenas moléculas e toxinas através da membrana externa de bactérias Gram-negativas. A importância destas proteínas para espiroquetas já foi observada para *Borrelia burgdorferi*, onde o silenciamento do gene para uma proteína TolC tornou a espiroqueta incapaz de infectar camundongos. (BUNIKIS et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi utilizar uma abordagem estrutural para a identificação de porções periplasmáticas e integrais transmembrana da proteína LIC12575 de *Leptospira* spp., realizando a clonagem e expressão heteróloga destes segmentos, visando sua futura caracterização.

2. METODOLOGIA

2.1 Predição *in silico* das porções periplasmáticas e externas à membrana

Para este trabalho foi selecionada uma proteína descrita por GRASSMANN et al. (2016), através de abordagens *in silico*, como sendo uma possível proteína TolC de *Leptospira* spp. codificadas pelo gene *lic12575*.

A proteína foi submetida à predição *in silico* da sua estrutura tridimensional na ferramenta I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Para a visualização do modelo estrutural foi utilizado o software UCSF Chimera 1.12. A determinação das porções periplasmática e integral de membrana foi realizada através de alinhamento estrutural com estruturas ortólogas cristalizadas inseridas na membrana disponíveis no banco de dados RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>).

2.2 Clonagem e expressão das porções proteicas selecionadas

As sequências codificadoras para cada um dos segmentos selecionados da proteína de *L. interrogans* foram amplificadas através da técnica de PCR e clonados no vetor pAE, utilizando o kit In-Fusion Cloning (Clontech), seguindo as instruções do fabricante.

Os vetores recombinantes construídos foram caracterizados por sequenciamento de DNA e utilizados para a transformação da cepa de expressão *E. coli* C43(DE3). As células foram cultivadas a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB), com agitação a 180 rpm até a fase logarítmica de crescimento (absorbância a DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8), quando a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) por 3h.

Após a expressão, os cultivos foram centrifugados a 7.000 × *g* por 15 min a 4°C. Os pellets foram ressuspensos em 30 mL de tampão (100 mM de Tris-base; 300 mM de NaCl - pH 8,0) e as células rompidas por sonicação. As células lisadas foram centrifugadas a 13.000 × *g* por 40 min a 4°C. Após a coleta da fração solúvel, o pellet foi ressuspensado em 30 mL de tampão desnaturante (100 mM de Tris-base; 300 mM de NaCl; 8 M de Ureia - pH 8,0). A solubilidade das proteínas recombinantes foi verificada através da técnica de SDS-PAGE 12%. As frações que demonstraram conter as proteínas recombinantes foram filtradas e purificadas através de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-Sepharose (GE HealthCare) utilizando o sistema automatizado AKTA-Start (GE). As alíquotas que demonstraram a presença da proteína foram dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS) e armazenadas a 4°C para análises subsequentes.

2.3 Caracterização das proteínas recombinantes purificadas

A caracterização das proteínas recombinantes foi realizada através de SDS PAGE 12% seguido de *Western blot* (WB) com anticorpo monoclonal anti-6xHIS (Sigma). Membranas de nitrocelulose Hybond ECL (GE HealthCare) foram utilizadas para a eletrotransferência. Para o bloqueio utilizou-se leite em pó 5% por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo anti-6xHIS conjugado à peroxidase em uma diluição de 1:5000. Para a visualização das reações antígeno-anticorpo, foi utilizado solução contendo os substratos diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. Lavagens com PBS-T foram realizadas entre cada etapa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína selecionada foi caracterizada estruturalmente como sendo uma proteína barril- β transmembrana, confirmando a análise *in silico* anterior realizada por GRASSMANN et al. (2016). Em outras bactérias, TolC foi descrita como uma proteína trimérica com 12 folhas β transmembrana constituindo um barril- β , onde cada monômero corresponde a 4 folhas β transmembrana. A sequência da proteína LIC12575 demonstrou codificar para um destes monômeros com 4 folhas β transmembrana. A formação da estrutura em barril- β transmembrana foi observada através do alinhamento com a estrutura ortóloga de *Escherichia coli* (PDB:1TQQ). O alinhamento estrutural com sua proteína ortóloga permitiu identificar as porções integral de membrana, formada por doze folhas-beta, e periplasmática, formada por segmentos com estrutura alfa-hélices, características típicas proteínas da classe TolC (Figura 1).

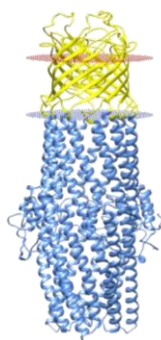


Figura 1. Predição estrutural da proteína LIC12575 de *Leptospira* spp. Em amarelo sua porção integral de membrana e em azul o segmento periplasmático.

A metodologia utilizada permitiu que as sequências referentes às porções periplasmática e integral de membrana da proteína fossem corretamente amplificadas e clonadas no vetor pAE de expressão em *E. coli*. Quanto à solubilidade das proteínas, foi observado que a porção integral foi expressa na fração insolúvel, enquanto a porção periplasmática demonstrou ser solúvel, fortalecendo os indícios da localização destes segmentos. As proteínas recombinantes foram reconhecidas, através da técnica de *Western blot*, pelo anticorpo monoclonal (mAB) anti-6xHis, nos tamanhos esperados de 20 e 18 kDa para os segmentos periplasmático e integral de membrana, respectivamente, confirmando assim a obtenção dos segmentos recombinantes da proteína LIC12575 (Figura 2).

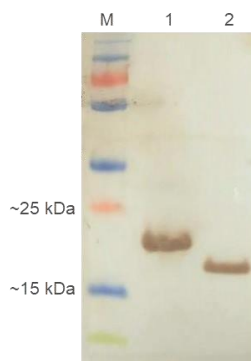


Figura 2. *Western blot* dos segmentos preteicos de LIC12575, utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHIS. M) Marcador de peso molecular. 1) Porção periplasmática. 2) Porção integral de membrana.

4. CONCLUSÕES

Foram identificadas porções transmembrana e periplasmáticas da proteína LIC12575, uma possível TolC, a partir de modelos estruturais preditos *in silico*.

Estas proteínas recombinantes serão utilizadas para obtenção de anticorpos específicos contra cada segmento, possibilitando a caracterização deste potencial antígeno vacinal, através da detecção da proteína nativa na superfície bacteriana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

SCHULZ, G Beta-Barrel membrane proteins. **In Current Opinion in Structural Biology**, v.10, n.4, p.443-447, 2000.

BIGELOW HR, PETREY DS, LIUJ, et al. Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes. **Nucleic Acids Research**. 32(8), p. 2566-2577, 2004.

GRASSMANN, KREMER, F. S., DOS SANTOS, J. C., SOUZA, J. D., PINTO, L. D. S. & MCBRIDE, A. J. A. 2017a. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Front Immunol**, 8, 463.

ADLER, B. 2015. Vaccines against leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387, 251-72.

HAAKE, DA; ZÜCKERT, WR. The Leptospiral Outer Membrane. **Current topics in microbiology and immunology**.v.387, p.187-221. 2015.

BUNIKIS I, DENKER K, ÖSTBERG Y, ANDERSEN C, BENZ R, BERGSTRÖM S. An RND-Type Efflux System in *Borrelia burgdorferi* Is Involved in Virulence and Resistance to Antimicrobial Compounds. Wessels MR, ed. **PLoS Pathogens**. 2008;4(2):e1000009..