

ANÁLISE ESTRUTURAL, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA rLIC10881 DE *Leptospira* spp., APLICADO AO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS RECOMBINANTES

AMANDA S. HECKTHEUER¹, ÉVERTON BETTIN², CARLOS EDUARDO POUEY
DA CUNHA³, ANDRÉ ALEX GRASSMANN⁴, ALAN JOHN ALEXANDER
MCBRIDE⁵, ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁶

¹Laboratório de Vacinologia – CDTec – UFPEL – amandasheck@hotmail.com

²Laboratório de Vacinologia – CDTec – UFPEL – tombettin@outlook.com

³Laboratório de Vacinologia – CDTec – UFPEL – cpouey@gmail.com

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

⁵Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – CDTec – UFPEL – alanmcb@gmail.com

⁶Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) – UFPEL – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* spp. (DELLAGOSTIN et al., 2011). Estima-se a ocorrência de 1 milhão de casos por ano no mundo, acarretando em cerca de 59 mil mortes (COSTA et al., 2015). As vacinas disponíveis contra a doença são compostas por bacterinas, sendo licenciadas para uso em um número reduzido de países. Estas formulações fornecem proteção apenas contra os sorovares presentes na sua composição, além de gerarem efeitos adversos e induzirem uma proteção de curta duração (KOIZUMI e WATANABE, 2005).

Diversos antígenos recombinantes vêm sendo avaliados em vacinas contra essa zoonose. 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). 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 epítomos imunodominantes expostos, promovendo a indução de uma resposta imune mais ampla (DELANY et al., 2013).

Nosso grupo descreveu recentemente uma abordagem de bioinformática para a descoberta de alvos vacinais contra leptospirose baseado em vacinologia reversa. Foram preditas 18 proteínas barril- β transmembrana (β b-OMP) conservadas entre as leptospirosas patogênicas, dentre elas a LIC10881.

As proteínas barril- β são encontradas exclusivamente nas membranas externas de bactérias. Dentre suas funções está o transporte iônico, ativo e passivo, como a entrada de nutrientes das mais diversas complexidades. (SCHULZ, 2000). Estas proteínas são altamente conservadas e capazes de serem preditas estruturalmente por ferramentas de bioinformática (BIGELOW et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi realizar a modelagem estrutural in silico da proteína β b-transmembrana LIC10881, identificando a presença de porções imunogênicas expostas, assim como, obtê-la de forma recombinante, visando o desenvolvimento de novas formulações vacinais contra a leptospirose.

2. METODOLOGIA

2.1 Modelagem estrutural

Para a análise estrutural e a identificação de epítomos imunogênicos da proteína LIC10881, a sua sequência codificadora foi obtida no banco de dados GenBank (NCBI), logo, a identificação da região correspondente ao peptídeo sinal foi identificada pelos programas SignalP, SignalCF e Predisi, sendo assim clivados. Posteriormente a sequência de aminoácidos da proteína madura foi submetida ao software I-TASSER para a obtenção por homologia da estrutura tridimensional (3D) da LIC10881.

Para a predição de epítomos imunogênicos com alta afinidade ($IC_{50} < 50$ nM) aos 14 alelos HLA-DBR do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHCII), foi utilizado o programa NetMHCII 2.2. A existência de epítomos lineares com alta afinidade para reconhecimento por receptores de células B foi verificada através do programa BepiPred 1.0., sendo selecionados os epítomos com score superior a 0.35.

As estruturas foram visualizadas através do *software* UCSF Chimera 1.11 e todos os epítomos identificados tiveram suas sequências confrontadas com a estrutura 3D da molécula, para a identificação daqueles expostos na superfície bacteriana.

2.2 Expressão heteróloga

Para obtenção da proteína recombinante foram desenhados *primers* a partir da sequência genômica de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 depositada no GenBank (NCBI) com o auxílio do *software* VectorNTI11 (Invitrogen), visando a amplificação e a clonagem da sequência codificadora da proteína LIC10881 em vetor pAE e consequentemente sua expressão heteróloga. A sequência codificadora foi amplificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo os resultados visualizados através de eletroforese em gel de agarose e o inserto purificado utilizando kit comercial.

Os produtos da PCR e o vetor de expressão pAE, foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII* (Invitrogen) por 1 h à 37 °C, logo em seguida purificados. A ligação dos insertos ao vetor pAE, foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) a 4 °C *overnight*.

O vetor recombinante pAE/lic10881 foi caracterizado por sequenciamento de DNA e, após a confirmação de sua sequência, utilizado para a transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 star (DE3) através do processo de choque térmico. Após a expressão, a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel no sistema automatizado AKTA-Purifier.

2.3 Caracterização

Posteriormente, a proteína rLIC10881 foi caracterizada por SDS-PAGE e *Western blot*, utilizando anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis para a confirmação de sua correta expressão e purificação.

Para a identificação da antigêncidade da proteína, e 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 anticorpo secundário, anti-IgG Humano conjugado com peroxidase (SigmaAldrich), utilizado

na diluição de 1:5000 em PBS-T. Os resultados foram visualizados através da técnica de quimioluminescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína LIC10881 foi caracterizada estruturalmente como sendo uma proteína barril β transmembrana, confirmando as análises *in silico* anteriores realizadas por DOS SANTOS (2015) e evidenciando a possível disposição destas na membrana externa do patógeno, atendendo este pré-requisito para a sua utilização com antígeno vacinal contra a doença. Foi identificada ainda, a presença de epítomos de células T e B altamente conservados na porção externa da proteína, (Figura 1.)

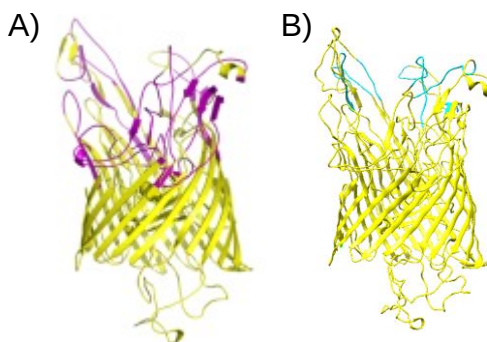


Figura 1. Modelo estrutural tridimensional da proteína integral de membrana externa LIC10881 de *Leptospira spp.* Predito *in silico* por I-TASSER. (A) Epítomos de alta afinidade ao MHCII destacados em roxo; (B) epítomos lineares de células B destacados em azul.

A rLIC10881 demonstrou ser corretamente expressa e purificada, como demonstrado por sua caracterização através da técnica de Western blot utilizando anticorpo monoclonal (mAB) anti-6xHis, apresentando o tamanho esperado de 62 kDa (Figura 2a). Além disto a proteína recombinante demonstrou manter os epítomos da proteína nativa, sendo estes reconhecidos por anticorpos IgG de pacientes infectados com o patógeno (Figura 2b).

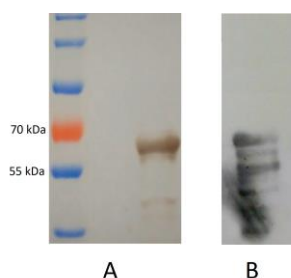


Figura 2. Western blot da expressão da rLIC10881 utilizando anticorpo anti-6xHIS (A) e Anti-IgG humano (B).

4. CONCLUSÕES

A predição da proteína LIC10881 como exposta na membrana externa de *Leptospira spp.*, assim como a identificação de epítomos com características imunogênicas e altamente conservados em sua parte externa, nos permite considerá-la um alvo vacinal em potencial contra doença. A correta expressão heteróloga da proteína, alcançada por este trabalho, permitirá futuras avaliações da sua capacidade imunoprotetora em modelo animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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.

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

SCHULZ, G Î²-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.