

# EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PORÇÕES EXTERNAS DE PROTEÍNAS BARRIL- $\beta$ TRANSMEMBRANA DE *Leptospira interrogans* PARA OBTENÇÃO DE POSSÍVEIS ANTÍGENOS VACINAIS CONTRA LEPTOSPIROSE

ILANA F. DA SILVA<sup>1</sup>; EVERTON B. BETTIN<sup>2</sup>; AMANDA S. HECKTHEUER<sup>2</sup>;  
ODIR A. DELLAGOSTIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas – [figueirailana@gmail.com](mailto:figueirailana@gmail.com)

<sup>2</sup> Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas – [tombbettin@gmail.com](mailto:tombbettin@gmail.com)

<sup>2</sup> Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas - [amandasheck@hotmail.com](mailto:amandasheck@hotmail.com)

<sup>3</sup> Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas – [odir@ufpel.edu.br](mailto:odir@ufpel.edu.br)

## 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa, causada por bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira* (ADLER, 2015). 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). Tendo em vista os meios de transmissão dessa zoonose, intrinsecamente relacionados à precariedade dos fatores de saneamento básico, sua ocorrência tem impacto importante sobre nações subdesenvolvidas. Além disso, é caracterizada de forma recorrente em uma vertente epidemiológica negligenciada, evidenciando a necessidade crescente do desenvolvimento de métodos mais eficientes para sua profilaxia.

A vacinação é um dos métodos mais eficazes na prevenção e erradicação de doenças infecciosas (DELLAGOSTIN et al., 2011). Atualmente, para leptospirose, são disponibilizadas vacinas do tipo bacterinas. Estas, geram uma resposta imunológica específica, apenas contra os sorovares presentes na preparação e induzem uma proteção de curta duração. Assim, o uso de ferramentas inovadoras em novas formulações vacinais para essa doença, torna-se essencial. Nesse quesito, a vacinologia estrutural tem sido amplamente discutida. Essa estratégia leva em consideração a estrutura tridimensional da proteína, permitindo a identificação de epítomos 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- $\beta$  transmembrana ( $\beta$ b-OMP) que estão presentes na membrana externa de *Leptospira* spp. e são consideradas potenciais alvos vacinais (GRASSMANN, et al., 2017). Proteínas barril- $\beta$  desempenham uma ampla variedade de funções (WIMLEY, 2003), muitas vezes relacionadas à patogênese do microrganismo. Dessa forma, o entendimento da dinâmica dessas proteínas e da sua relação com mecanismos de patogenicidade, apresenta-se como ferramenta essencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a doença, que consistam de porções isoladas externas dessas proteínas, altamente conservadas entre as espécies

patogênicas, e capazes de promover uma resposta imunológica protetora e de amplo espectro.

Este trabalho teve como objetivo a análise *in silico*, clonagem e expressão heteróloga de porções externas isoladas das proteínas anotadas como LIC10964, LIC10896 e LIC12374, proteínas barril- $\beta$  transmembrana de *Leptospira interrogans*, visando sua caracterização para posteriores testes de imunogenicidade.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 – Predição *in silico* das porções externas à membrana

Tendo em vista a conformação transmembrana das proteínas barril- $\beta$ , foram selecionadas, a partir de uma abordagem *in silico*, todas as sequências de aminoácidos externas à membrana de LIC10964, LIC10896 e LIC12374, três proteínas descritas por GRASSMANN et al. (2016), como possíveis alvos imunogênicos.

As proteínas foram submetidas à predição *in silico* da sua estrutura tridimensional no software I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Para a visualização do modelo estrutural foi utilizado o software UCSF Chimera 1.12.

### 2.2 – Clonagem e expressão heteróloga das porções selecionadas

As sequências codificadoras para as porções de interesse das proteínas, foram comercialmente sintetizadas em vetor pAE. Os vetores recombinantes foram utilizados para transformação da cepa de expressão *Escherichia coli* C43 (DE3), por choque térmico. Em seguida, a cepa transformada foi cultivada em meio Luria Bertani (LB), a 37 °C, com agitação a 200 rpm, até atingir sua fase exponencial de crescimento ( $DO_{600}$  entre 0,6 e 0,8). Nesse momento, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) durante 3 h. Após a expressão, o cultivo foi centrifugado a 7.000  $\times$  g por 15 min a 4 °C e o pellet, ressuspendido em um tampão específico, contendo 8 M de ureia, 0,1 M de Tris-base e 0,5 M de NaCl, visando a solubilização das proteínas recombinantes. A seguir, as células foram submetidas ao processo de sonicação, proporcionando a liberação desses polímeros. Após centrifugação, os sobrenadates foram coletados e as proteínas, purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando colunas de Niquel-Sepharose, HisTrap (GE HealthCare). As alíquotas que demonstraram a presença das proteínas foram dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS) e armazenadas a 4 °C.

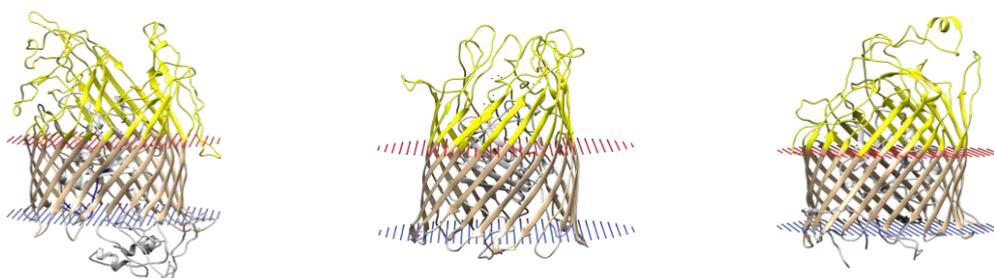
### 2.3 – Caracterização das proteínas recombinantes

Para a caracterização, as proteínas purificadas foram submetidas a um SDS-PAGE 12% e *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-6xHis. Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare), a 100 V por 40 min. Para o bloqueio, foi utilizado leite em pó, na concentração de 5%, por 1 h.

Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-6xHis conjugado a peroxidase, em uma diluição de 1:5000, por 1 h. Por fim, a revelação das reações antígeno-anticorpo foi feita com solução contendo diaminobenzidina (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

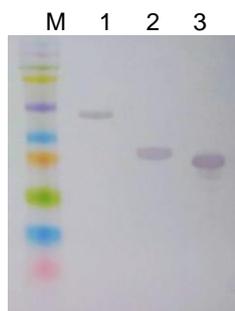
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas selecionadas tiveram sua estrutura transmembrana confirmada pelo software I-TASSER. A partir da visualização tridimensional da estrutura de LIC10964, LIC10896 e LIC12374 (Figura 1), foi possível isolar corretamente as sequências de aminoácidos externas à membrana, segmentos de interesse ao desenvolvimento desse estudo.



**Figura 1.** Predição estrutural das proteínas LIC10964, LIC10896, LIC12374, respectivamente. Em amarelo, as porções externas à membrana, selecionadas para a clonagem.

No que se refere à expressão heteróloga em *Escherichia coli* C43 (DE3) transformada, observou-se, a partir da técnica de *Western Blot* com anticorpo monoclonal anti-6xhis, o reconhecimento das proteínas recombinantes nos tamanhos esperados, de 31, 32 e 48 kDa, para LIC10964, LIC12374 e LIC10896, respectivamente, confirmando a obtenção das frações externas dessas proteínas e o sucesso das técnicas empregadas (Figura 2).



**Figura 2.** *Western blot* das porções proteicas expressas. (M) Marcador de peso molecular; (1) LIC10896 – 48 kDa; (2) LIC12374 – 32 kDa; (3) LIC10964 – 31 kDa.

### 4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, conclui-se que a abordagem estrutural utilizada proporciona o reconhecimento de regiões expostas e conservadas de diferentes proteínas de *Leptospira* spp. Dessa forma, através da expressão heteróloga, torna-se possível a obtenção e posterior

avaliação desses antígenos, visando sua caracterização e confirmação de seu potencial imunogênico. Assim, contribui-se com o desenvolvimento de formulações vacinais promissoras contra leptospirose, com amplo espectro de proteção e maior eficiência, uma vez que a utilização de moléculas formadas exclusivamente por porções expostas de proteínas de membrana externa como antígenos vacinais, permitirá um direcionamento da resposta imune humoral produzida à epítomos passíveis de reconhecimento por anticorpos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

COSTA F, HAGAN JE, CALCAGNO J, KANE M, TORGERSON P, MARTINEZSILVEIRA MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 9:e0003898; 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.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FELIX, S.R.; DA SILVA, E.F.; MCBRIDE, A.J.A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, p. 1215-1224, 2011.

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

WIMLEY, W. C. 2003. The versatile beta-barrel membrane protein. **Curr Opin Struct Biol**, 13, 404-11.