

2.11.99 - Imunologia

Aplicação biotecnológica de flagelinas oriundas de cepas de *Bacillus* como potencial adjuvante vacinal.

Alexia Mariana da S. Lopes¹, Aislane N. Costa², Renata S. Nascimento³, Andréia dos Santos⁴, Luciene Cristina G. Campos⁵, Wilson B. Luiz⁶

1. Discente do Curso de Biomedicina DCB/UESC
2. Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos PPGBBM/UESC
3. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos PPGBBM/UESC
4. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos PPGBBM/UESC
5. Docente do Curso de Biomedicina DCB/UESC
6. Docente do Curso de Biomedicina DCB/UESC/Orientador

Resumo

A flagelina é a proteína mais abundante do flagelo bacteriano. Ela funciona como um propulsor mecânico, conferindo mobilidade e um meio pelo qual a bactéria pode aderir às células do hospedeiro. Além de ser uma potente indutora de resposta imunológica.

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização *in vitro* de flagelinas oriundas de diferentes cepas de *Bacillus* com potencial adjuvante. Sua presença nas linhagens estudadas foi confirmada por avaliação da motilidade em meio semissólido. A obtenção e purificação de flagelina nativa de *Bacillus* foi realizada através da adaptação de protocolos preexistentes para obtenção de flagelina nativa de *Salmonella*.

Avaliando o grau de contaminação com endotoxina e esterilidade do material purificado, bem como através da estimulação de células HEK293 transfectadas ou não com diferentes concentrações de Hag e FliC, o trabalho sugere que linhagens do gênero *Bacillus* possuem características promissoras de purificação e atividade biológica.

Palavras-chave: Vacinas; Hag; FliC.

Apoio financeiro: FAPESB-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
UESC-Universidade Estadual de Santa Cruz.

Trabalho selecionado para a JNIC: UESC

Introdução

As flagelinas são proteínas que compõem o flagelo bacteriano, que por sua vez é responsável por conferir a bactéria uma das formas mais eficientes de locomoção.

A utilização de flagelina nativa ou recombinante purificada como adjuvante vem demonstrando a capacidade de estimular o sistema imune, atuando como um potente modulador da resposta vacinal. É notável que o sistema imunológico tenha elaborado dois distintos mecanismos para o reconhecimento do mesmo produto microbiano, o que sugere que a flagelina funciona como um potente sinal de alerta capaz de ativar respostas imunológicas complexas. Além disso, a detecção de porções distintas da molécula, mas essenciais para função flagelar, fornece um meio pelo qual o sistema imunológico limita o escape do patógeno.

A literatura apresenta muitos estudos sobre as flagelinas de bactérias Gram-negativas, sobretudo do gênero *Salmonella*, contrastando com a escassez de dados disponíveis sobre as propriedades imunes e biológicas das flagelinas de bactérias Gram-positivas.

Entre os modelos de estudo genético e fisiológico das bactérias Gram positivas, temos o *Bacillus subtilis* um bacilo de solo, não patogênico. Bactéria cuja expressão de flagelos já é bem conhecida; existindo contudo, carência em dados referentes a quantidade de produção bem como capacidade de estimulação imune por estas flagelinas.

Pensando em como a ausência de lipopolissacarídeo em Gram-positivas simplificaria o processo de purificação, representando uma vantagem biotecnológica em relação ao uso da flagelina de *Salmonella* (com a eliminação do risco de contaminação de preparações purificadas nativas e recombinantes), o presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização do potencial adjuvante *in vitro* de flagelinas oriundas de diferentes espécies de *Bacillus*, com padronização do processo de purificação das flagelinas e avaliação da atividade estimuladora *in vitro* do receptor TLR-5.

Metodologia

Linhagens celulares e bacterianas:

Linhagem	Características
<i>B. subtilis</i>	Linhagem derivada do prototrófico 168, obtida do Bacillus Genetic Stock Center
<i>S. thyphimurium</i>	Linhagem de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Thyphimurium utilizada para extração de flagelina nativa.
<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i> , linhagem reconhecida como probiótica obtida do produto GarminG30
<i>B. clausii</i>	<i>Bacillus clausii</i> , linhagem reconhecida como probiótica obtida do produto Enterogermina.
<i>B. var Natto</i>	<i>Bacillus subtilis</i> var Natto, linhagem isolada do alimento fermentado Natto.
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> , linhagem isolada de alimento probiótico, rotulado na embalagem como <i>B. subtilis</i> .
HEK 293	Células embrionárias de rim humano (TLR5-)
HEK 293/TLR5+	HEK 293 transfectada com plasmídeo TLR5 (Invitrogen)

As linhagens de referência de *B. subtilis*, foram cedidas pelo prof. Wolfgang Schumann. As linhagens de *Bacillus* utilizadas foram cultivadas sob agitação a 37°C em meio BHI e estocadas a 20°C/-80°C ou na forma de esporos liofilizados. As linhagens de *Salmonella Thyphimurium* LDV323, *B. coagulans*, *B. var natto*, *B. licheniformis*, foram cedidas gentilmente pelo prof. Luís Carlos de Souza Ferreira.

Para determinação da bioatividade da flagelina foram usadas células HEK293 e HEK293 transfectadas com plasmídeo que codifica o gene de TLR5 (In vivo). As células foram mantidas em meio Dulbecco Mem acrescido de 10% Soro Fetal bovino e blasticidina (10 µg/mL) durante duas semanas.

Caracterização da expressão e purificação de flagelina nativa:

As linhagens de *Bacillus* utilizadas para a extração do flagelo foram semeadas em 50 mL de meio LB e incubadas a 37 °C com agitação de 80 rpm durante 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 20 mL de PBS. A suspensão bacteriana foi agitada com “blender” em 3 ciclos de 2 min, com intervalos de 2 min no gelo. Após a remoção das células, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4 °C por 15 minutos para coletar o sobrenadante onde se encontra a proteína solúvel. A quantidade total de proteínas foi determinada usando-se o método BSA Pierce e confrontados em espectrofotômetro Epoch. A pureza foi determinada em gel de poliacrilamida (12,5%). Após a separação da proteína por eletroforese, essa foi transferida para um filtro de nitrocellulose. Os sítios onde não houve a ligação da proteína foram bloqueados por 2 h a 37°C com uma solução de bloqueio (leite desnatado 5% em PBS-T) e, em seguida, a membrana foi tratada com anticorpo anti-rFliC_i na diluição 1:2.000 por 2 h a 37°C. Após quatro lavagens com PBS-T foi adicionado imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase reativa contra IgG de camundongo na diluição 1:5.000 e deixado por 2 h a 37°C. Após novo ciclo de lavagens a membrana foi submetida à revelação por quimiluminescência.

Produção in vitro de interleucina 8 (IL-8):

Células HEK 293 e HEK 293 transfectadas com plasmídeo contendo o gene que codifica para o receptor TLR5 (Invivogen, San Diego, USA) foram cultivadas por duas semanas em meio DMEM adicionado de 10% de soro fetal bovino, na presença ou ausência de antibiótico blasticidina (1 µg/mL), respectivamente. Um dia antes do ensaio as células foram tratadas com tripsina, lavadas duas vezes com DMEM + 10% SFB, e ajustadas para aplicar 5x10⁴ células viáveis por poço. As células foram incubadas por 12 h em estufa de CO₂, 37°C, na presença ou ausência de blasticidina. No dia seguinte as células foram incubadas por cerca de 5 h com a flagelina e Hag nativa nas seguintes concentrações: 1, 10, 100, 1000 e 10000 ng/ml. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi coletado e armazenado a -80°C até o momento da quantificação de IL-8 por ELISA.

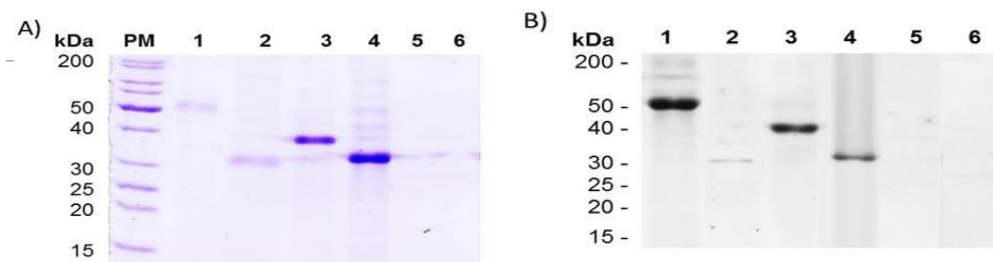
Resultados e Discussão

As flagelinas bacterianas são descritas na literatura como proteínas que ativam o sistema imune inato e promovem reações inflamatórias que resultam em efeitos adjuvantes para antígenos. Flagelinas, especialmente aquelas produzidas por *Salmonellas*, estão entre os agonistas de Toll mais frequentemente utilizados em formulações vacinais devido a suas propriedades imunoestimuladoras intrínsecas e seguras para uso em humanos, os quais recentemente foram confirmadas em nove ensaios clínicos (www.clinicaltrials.gov) (NEWTON; JACOB; STOCKER, 1989). Neste trabalho, foram caracterizadas a produção e purificação de flagelinas oriundas diferentes espécies de *Bacillus*, aliando as propriedades adjuvantes das flagelinas bacterianas às vantagens intrínsecas de segurança do gênero *Bacillus*.

Padronização e purificação da flagelina de *Bacillus subtilis*:

O processo de obtenção e purificação de flagelinas nativas de *Bacillus*, não é descrito na literatura. O grupo de pesquisa então adaptou protocolos para a obtenção de flagelina nativa de *Salmonella*. Nossos resultados demonstraram que possíveis interferências no processo de purificação influenciam na obtenção da proteína pura. A pureza do processo foi observada em SDS-Page e por densitometria com o software ImageLab. Nos permitindo inferir a obtenção de proteína com 99% de pureza.

Obtenção e purificação das flagelinas das diferentes espécies de *Bacillus*:



(1) *Salmonella*; (2) *B. subtilis*; (3) *B. coagulans*; (4) *B. clausii*; (5) *B. subtilis* var Natto; (6) *B. licheniformis*

Em gel SDS-PAGE observamos as flagelinas purificadas das linhagens *Salmonella*, *B. subtilis*, *B. coagulans* e *B. clausii*. Já ver *B. var natto* e *B. licheniformis* não apresentam o mesmo padrão de expressão. Na figura A, observamos que a expressão da flagelina de *Bacillus* em algumas espécies, assemelha-se ao peso molecular da linhagem de *Salmonella*, variando entre 30 a 45 kd por espécie.

A configuração da flagelina purificada foi realizada com anticorpo poli clonal anti-rFliC, obtido em coelho.

A imunodeteção (figura B) confirmou que o material purificado corresponde a flagelina, uma vez que os anticorpos foram reativos com diferentes flagelinas e com intensidade distinta. O sinal de flagelina oriundo da *Salmonella* foi mais intenso (como esperado) em relação as demais linhagens. Entretanto, isso pode não ser diretamente proporcional à quantidade expressa, e sim a presença de uma maior variedade de epítomos reconhecidos.

Concentração das flagelinas:

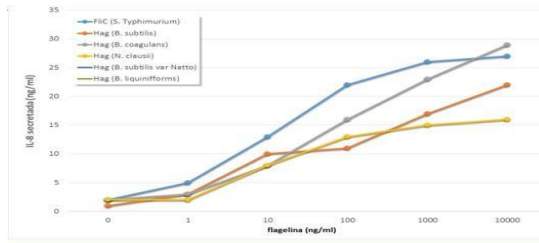
Linhagens	Concentração
S. Thyphimurium	1,728 µg/mL
B. subtilis	3,221 µg/mL
B. coagulans	37,2 µg/mL
B. clausii	44,965 µg/mL
B. subtilis var Natto	0,035 µg/mL
B. liqueniforms	0,015 µg/mL

Após a padronização da metodologia de extração e purificação das flagelinas realizamos a purificação de flagelinas de *Salmonella* e das espécies de *Bacillus* previamente descritas. Nesta tabela apresentamos dados relativos as concentrações de flagelinas purificadas obtidas de diferentes linhagens. Os resultados demonstram que a flagelina obtida de algumas espécies de *Bacillus* apresentou características biotecnológicas promissoras, como quantidade de monômeros 25x superior quando comparadas à flagelina obtida de *Salmonella*. Os valores obtidos das concentrações de flagelina de *B. liqueniform* e *B. ver nattos* são desconsideradas por provável contaminação.

Caracterização *in vitro* da atividade biológica das flagelinas:

A detecção de flagelina por células do sistema inato é realizada por membros de duas famílias de receptores, os "Toll-like receptors", no caso o TLR5; e os "Nod-like receptors". O receptor TLR5 é responsável pelo reconhecimento de flagelina extracelular.

De acordo com a literature, as propriedades biológicas das flagelinas estão associadas, pelo menos em parte, ao reconhecimento e ligação ao receptor TLR5, responsável por ativar uma cascata de sinalização via MyD88 resultando na ativação de NF-κB e conseqüentemente na produção de mediadores inflamatórios, como TNF-α, IL-6 e IL-8.



Produção de IL-8 em células HEK293/TLR5+ estimuladas com flagelinas de *Bacillus* (Hag) e de *S. Typhimurium* (FliC).

Para confirmar a funcionalidade de flagelinas recombinantes, células HEK293 transfetadas ou não para expressão do TLR5 foram estimuladas com diferentes concentrações de Hag (flagelina de *Bacillus*) e FliC (flagelina de *Salmonella*). Após 5 horas de estímulo, o sobrenadante da cultura foi dosado para a produção de IL-8 (citocina pró-inflamatória).

Os valores obtidos de IL-8 com a linhagem celular controle foram subtraídas dos valores obtidos de células transfetadas. As curvas dose resposta apresentadas mostram que não houve diferença significativa na produção de IL-8 no sobrenadante coletado de células transfetadas estimuladas com flagelinas de *B. subtilis*, *clausii*, e com flagelinas obtida de *Salmonella*, sugerindo que estas apresentam estruturas secundárias e atividade biológica in vitro similar à flagelina de *Salmonella*. A figura ilustra a produção de citocina IL-8 de forma dose dependente, mediada pela ligação da flagelina Hag ao receptor TLR5, sugerindo assim que não houve alterações conformacionais que incapacitassem a proteína de se ligar ao receptor.

Conclusões

Após a finalização deste trabalho, concluímos que flagelinas oriundas de diferentes espécies de bactérias do gênero *Bacillus* possuem potencial biotecnológico relacionado ao desenvolvimento de vacinas.

Referências bibliográficas

- APOSTÓLICO, JULIANA DE SOUZA et al. (2016): "Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing." Journal of Immunology Research :1459394. PMC. Web. 11 Oct., (2016).
- ARORA SK, NEELY AN, BLAIR B, LORY S, RAMPHAL R. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. Infect Immunol. Jul;73(7):4395-8, (2005)
- BATES, J. T.; GRAFF, A. H.; PHIPPS, J. P.; GRAYSON, J. M.; MIZEL, S. B. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. J. Immunol., v. 186, n. 11, p. 6255-6262, (2011).
- BERGARA F. IBARRA C. IWAMASA J. PATARROYO JC. AGUILERA R. MÁRQUEZ-MAGAÑA LM. CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol; 185 (10): 3118-26, (2003).
- BEUTLER B. Inferences. Questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. Nature. 430, 6996:257–63, (2004).
- BRAGA, C. J. M., RITTNER, G. M.; MUNOZ-HENAO, J. E.; TEIXEIRA, A. F.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; FERREIRA L. C. Paracoccidioides brasiliensis vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. Infect. Immun., v. 77, n. 4, p. 1700-1707, (2009).
- Farmacopeia Brasileira. 5 ed. Vol. 1 e 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm, (2010).
- FERREIRA, L. C. S., R. C. C. FERREIRA, et al. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, (2005).
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol., v. 21, p. 335-376, (2003).
- YU, L. H. AND S. M. CUTTING. The effect of anti-spore antibody responses on the use of spores for vaccine delivery. Vaccine, (2009).