

Universidade de São Paulo  
Programa de Pós Graduação Interunidades em  
Biotecnologia USP/ Inst. Butantan/ IPT

**MICHELLE DARRIEUX SAMPAIO**

**Expressão, Purificação e Avaliação Imunológica  
de Formas Truncadas e Híbridos da Proteína de  
Superfície de Pneumococo A (PspA)**

São Paulo

2007

**MICHELLE DARRIEUX SAMPAIO**

**Expressão, purificação e avaliação imunológica  
de formas truncadas e híbridos da Proteína de superfície  
de pneumococo A (PspA)**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra.

Luciana Cezar de Cerqueira Leite

São Paulo

2007

À minha pequena família, mãe, Mô e Jamil, pelo  
amor e apoio incondicionais, sempre.

## AGRADECIMENTOS

À Dra Luciana Cezar de Cerqueira Leite pela dedicação com que conduz o laboratório, pelo apoio incondicional durante a realização deste trabalho, e por estar sempre disponível para conversar.

À minha co-orientadora, “mentora espiritual” e grande amiga Eliane, pela ajuda inestimável em todos os momentos; pelo exemplo de caráter e profissionalismo; pelas muitas conversas filosóficas e, sobretudo, pela amizade que se fortaleceu nestes cinco ótimos anos de convivência. Eliane, eu te admiro muito, como pessoa e como profissional.

À Léo, pela ajuda em diversos momentos deste trabalho, pelo alto astral e serenidade, e por ser a melhor companheira de viagem que alguém pode ter.

À equipe do laboratório dos Drs David Briles e Susan Hollingshead, por terem me recebido de forma tão amável, e pelo aprendizado inestimável durante a realização do estágio. Em especial à Shaper, pela amizade e discussões intermináveis sobre lactoferrina.

À FAPESP e à Capes pelo apoio financeiro. À Pró-Reitoria de Pós-Graduação pelo auxílio financeiro para participação em um Congresso no Exterior.

Ao Dr Paulo Lee Ho, pelos conselhos e pela motivação constante.

Aos colegas de laboratório, pela convivência agradável e pelas muitas conversas, de casamento de famosos a alinhamento de seqüências.

Aos colegas Leonardo e Inácio, pelas dicas de trabalho.

Às amigas, Dani, Dri, Ana Paula e Luana, pelos momentos emocionantes na passarela do Anhembi. À Dani, pelos cinco anos de amizade, pelas dicas de beleza e por ser tão acelerada quanto eu.

À Beth Martins e à Fer, pelo alto astral e conversas agradáveis.

Às amigas que não estão mais neste laboratório, Paula, Soraia e Ana Paula, pela ajuda valiosa no início deste trabalho, e pela alegria com que me receberam.

Ao Boguitar, pelas aulas de espanhol no refeitório, que me tornaram “mui fluente”.

Aos amigos Cibele, Dri e Henrique, pela alegria que transmitem ao laboratório.

À minha aluninha, assistente, e acima de tudo, amiga do peito Luana, pela grande ajuda neste trabalho, e pela alegria contagiante com que encara seus desafios.

À Alessandra, Fá, Solange, Marisa, D Sebastiana e toda a equipe de profissionais que tornam o nosso trabalho possível. Obrigada, meninas!

À minha mãe, Sandra, pela fé que sempre teve em mim, pela alegria que contagia a todos e pelo exemplo de mulher. Te amo, e tenho muito orgulho de você.

À minha irmã, Monique, por compartilhar muitos momentos inesquecíveis da minha vida. MÔ, eu te amo muito.

À tia Solange, pelo apoio e torcida constantes; à minha prima Soraya, pela amizade, e aos meus priminhos JV e Duda, por trazerem felicidade à nossa família.

Aos meus queridos avós, Alfredo, Almerinda e Delfina, pelas lembranças felizes.

À D Ana Rita, por todo apoio e pelo exemplo de determinação.

Ao meu melhor amigo Jamil, pela força de seu caráter, pelo apoio e incentivo constantes, pelo exemplo de serenidade e perseverança, por compartilhar comigo cada etapa deste trabalho, e por me fazer tão imensamente feliz. Já, você hoje recebe este título junto comigo. Obrigada, meu amor.

A todos os que colaboraram de inúmeras formas para a realização deste trabalho.

## RESUMO

**DARRIEUX, M. Expressão, purificação e avaliação imunológica de formas truncadas e híbridos da Proteína de Superfície de Pneumococo A (PspA).** 2007 137f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

*Streptococcus pneumoniae* é um importante agente causador de pneumonia, meningite e septicemia. O alto custo e a cobertura limitada da vacina conjugada atual reforçam a necessidade de se desenvolver uma vacina mais abrangente e acessível. A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) é imunogênica e protetora em modelos animais; porém, devido à sua diversidade - há 6 clados e 3 famílias de PspA - uma vacina baseada em PspA deverá incluir fragmentos das duas famílias prevalentes (1 e 2). Neste estudo, foram produzidos fragmentos contendo a região N-terminal de PspA das famílias 1 e 2, e proteínas híbridas – contendo fusões destes fragmentos. Os anticorpos gerados contra os híbridos reconheceram PspAs nativas das duas famílias, foram capazes de se ligar a bactérias íntegras, e de aumentar a deposição de complemento em sua superfície. Finalmente, a imunização de camundongos com os híbridos foi capaz de proteger contra desafio com pneumococos contendo PspAs diversas, mostrando que estes seriam candidatos promissores na composição de uma vacina anti-pneumocócica.

Palavras chave: *Streptococcus pneumoniae*. Vacinas. Proteínas. Complemento.

## ABSTRACT

**DARRIEUX, M. Expression, purification and immunological evaluation of truncated forms and hybrids of Pneumococcal Surface Protein A (PspA).** 2007 134f. Thesis (Doctoral) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

*Streptococcus pneumoniae* is an important cause of pneumonia, meningitis and septicaemia. The high cost and limited coverage of the available conjugate vaccine reinforce the need for cost effective strategies, with broader coverage. Pneumococcal Surface Protein A (PspA) is immunogenic and protective in animal models; however, due to its diversity – there are six clades and three families of PspA – a PspA based vaccine should include fragments of each major family (1 and 2). In the present study, we have produced fragments of the N-terminal region of PspAs families 1 and 2, and hybrid proteins – containing fusions of these fragments. Sera made against the hybrids induced antibodies that recognized PspAs from both families; these sera were also able to bind pneumococcal strains bearing diverse PspAs, and to increase complement deposition on their surface. Finally, immunization of mice with PspA hybrids was protective against challenge with pneumococci bearing diverse PspAs, showing that these hybrids should constitute promising candidates in an anti-pneumococcal vaccine.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*. Vaccines. Proteins. Complement.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>aa</b>	aminoácido
<b>ALF</b>	Apolactoferrina
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>BSA</b>	Albumina bovina sérica
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>FITC</b>	Fluoresceína isotiocianato
<b>HLF</b>	(Holo)lactoferrina
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina G subclasse 1
<b>IgG2a</b>	Imunoglobulina G subclasse 2a
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAFr</b>	Receptor do fator ativador de plaquetas
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada
<b>PBS-T</b>	Solução salina tamponada acrescida de 5% de Tween 20
<b>PdB</b>	Pneumolisina mutante detoxificada
<b>Ply</b>	Pneumolisina
<b>PMNs</b>	Leucócitos Polimorfonucleares
<b>PS</b>	Polissacarídeo capsular
<b>PsaA</b>	Antígeno de superfície A de pneumococo
<b>PspA</b>	Proteína de superfície A de pneumococo
<b>PspC</b>	Proteína de superfície C de pneumococo
<b>THY</b>	Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura
<b>Th1</b>	Célula T auxiliar tipo 1
<b>Th2</b>	Célula T auxiliar tipo 2
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aspectos gerais da bactéria .....	2
1.1.2 Patogênese da infecção por <i>S. pneumoniae</i> .....	4
1.1.3 Profilaxia e tratamento .....	7
<b>1.2 PspA.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 PspA e Complemento.....	16
1.2.2 PspA e Lactoferrina .....	18
1.2.3 PspA e Miosina.....	21
<b>1.3 Outros fatores de virulência protéicos de <i>S. pneumoniae</i> .....</b>	<b>23</b>
1.3.1 PspC .....	23
1.3.2 PsaA .....	24
1.3.3 Pneumolisina .....	25
1.3.4 Neuraminidase .....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Objetivos gerais.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Clonagem dos fragmentos e montagem dos híbridos de <i>pspA</i> .....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Amplificação dos fragmentos de <i>pspA</i> por PCR.....	29
3.1.2 Transformação de <i>E. coli</i> quimiocompetente.....	31
3.1.3 Clonagem dos fragmentos truncados e formas híbridas no vetor de expressão em procariotos pAE-6xHis .....	31
3.1.4 Montagem do híbrido <i>pspA1ABp-3AB</i> .....	33
3.1.5 Montagem do híbrido MBpro.....	33
<b>3.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes .....</b>	<b>34</b>
3.2.1 Expressão dos fragmentos truncados e híbridos em <i>E. coli</i> BL21(DE3), BL21(AI) e BL21(Si).....	34
3.2.2 Purificação das proteínas recombinantes (rPspAs).....	34
3.2.3 Dosagem das proteínas recombinantes .....	36
<b>3.3 Extração de PspA de <i>S. pneumoniae</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Avaliação da resposta humoral induzida pelas proteínas recombinantes.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5 Avaliação funcional dos anticorpos gerados contra PspAs recombinantes .....</b>	<b>38</b>
3.5.1 Ligação dos anticorpos anti-PspA a <i>S. pneumoniae</i> intactos. ....	39
3.5.2 Deposição de complemento na superfície de <i>S. pneumoniae</i> .....	39
3.5.3 Avaliação do efeito bactericida da ALF sobre <i>S. pneumoniae</i> .....	40

<b>3.6 Avaliação da proteção induzida pelas proteínas recombinantes.....</b>	<b>40</b>
<b>3.7 Identificação de uma região de PspA indutora de anticorpos com reatividade anti-miosina.....</b>	<b>41</b>
3.7.1 Análise por Western blotting dos fragmentos provenientes da proteólise de PspA3ABp utilizando um anticorpo anti-PspA3 que reage com miosina humana.....	41
3.7.2 Clonagem e expressão de fragmentos com possível reatividade cruzada com miosina.....	42
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Fragmentos e proteínas híbridas propostos.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Clonagem dos fragmentos e híbridos de PspA.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Expressão e purificação dos antígenos .....</b>	<b>46</b>
4.3.1 Expressão dos fragmentos e híbridos de PspA em E. coli .....	46
4.3.2 Purificação das proteínas recombinantes .....	48
<b>4.4 Avaliação da resposta humoral induzida pelas proteínas recombinantes.....</b>	<b>52</b>
<b>4.5 Avaliação funcional dos anticorpos gerados contra os fragmentos e híbridos de PspA .....</b>	<b>55</b>
4.5.1 Ligação de anti-rPspAs a pneumococos intactos.....	55
4.5.2 Deposição de complemento na superfície de <i>S. pneumoniae</i> em presença de soro anti-PspA.....	58
4.5.3 Avaliação do efeito bactericida de ALF sobre <i>S. pneumoniae</i> .....	61
<b>4.6 Avaliação da proteção induzida pelas proteínas recombinantes.....</b>	<b>64</b>
<b>4.7 Identificação dos epitopos de PspA indutores de anticorpos com reatividade anti-miosina.....</b>	<b>68</b>
4.7.1 Análise por Western blotting dos fragmentos provenientes da proteólise limitada de PspA3ABp.....	69
4.7.2 Obtenção de fragmentos com possível reatividade cruzada com miosina.....	70
<b>4.8 Construção e análise de um híbrido de PspA contendo a sequência de ligação à lactoferrina e a região rica em prolinas (MBpro).....</b>	<b>72</b>
4.8.1 Clonagem, expressão e purificação de MBpro.....	73
4.8.2 Avaliação da resposta humoral contra MBpro .....	74
4.8.3 Avaliação funcional dos anticorpos anti-MBpro.....	77
4.8.4 Avaliação da proteção induzida pela imunização com MBpro.....	80
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>5.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....</b>	<b>83</b>
<b>5.2 Análise da reatividade cruzada induzida contra PspAs de diferentes clados e famílias .....</b>	<b>84</b>
<b>5.3 Contribuição das diferentes regiões de PspA para sua imunogenicidade.....</b>	<b>86</b>

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

