CLONAGEM DE EPÍTOPOS DE E5HPV16 PARA DESENVOLVIMENTO DE VACINAS TERAPÊUTICAS

A. C. da SILVA¹, G. H. A. CARDOZO¹, A. P. F. CAMPOS¹, A. J. D. SILVA¹, L. S. de MACÊDO¹, A. C. de FREITAS¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética

Email para contato: anacris1723@hotmail.com

RESUMO – O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de tamanho pequeno, capsídeo icosaédrico, não envelopado e com DNA circular de fita dupla que apresenta tropismo pelo epitélio humano. É reconhecido que a infecção persistente por HPVs de alto risco é a principal causa do câncer de colo uterino, além de outros carcinomas genitais, de esôfago e faringe. A proteína E5 do HPV 16 está associada ao desenvolvimento do câncer cervical, e contribui para a carcinogênese através de diferentes vias. Devido a expressão de E5 nos estágios iniciais da transformação celular, vacinas terapêuticas direcionadas a essa proteína podem prevenir lesões pré-malignas de progredirem para câncer cervical invasivo. Porém, nenhuma estratégia até então foi capaz de causar uma regressão total dos tumores associados ao HPV. O presente trabalho teve como objetivo a clonagem de epítopos da proteína E5 de HPV16 em uma construção denominada E5 multiepítopos (E5-M) como parte de uma estratégia vacinal terapêutica contra o câncer cervical. Uma vez que foi confirmada a clonagem, será realizada a indução da expressão do gene em cultura de células da linhagem Rosetta e avaliação da produção da proteína correspondente, utilizando SDS PAGE e Western-Blot. Posteriormente, as proteínas produzidas e purificadas serão testadas quanto à imunogenicidade em modelos pré-clínicos.

Palavras-chave: imunização, hpv, câncer cervical.

ABSTRACT – Human Papillomavirus (HPV) is a small virus, icosahedral, non-enveloped capsid and double-stranded circular DNA that has tropism by the human epithelium. It is recognized that persistent infection by high-risk HPVs is the leading cause of cervical cancer, as well as other genital, esophageal and pharyngeal carcinomas. The HPV 16 E5 protein is associated with the development of cervical cancer, and contributes to carcinogenesis through different pathways. Because of the expression of E5 in the early stages of cell transformation, therapeutic vaccines targeting this protein may prevent premalignant lesions from progressing to invasive cervical cancer. However, no strategy until then was able to cause a complete regression of HPV-associated tumors. The present work aimed to clone epitopes of HPV16 E5 protein in a construct called E5 multiepitope (E5-M) as part of a therapeutic vaccination

strategy against cervical cancer. Once the cloning has been confirmed, induction of gene expression in Rosetta lineage cell culture and evaluation of the corresponding protein production will be performed using SDS PAGE and Western Blot. Subsequently, the proteins produced and purified will be tested for immunogenicity in preclinical models.

Keywords: imunization, hpv, cervical cancer

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres no mundo. É reconhecido que a infecção persistente pelo HPV é a principal causa do câncer de colo uterino. Os HPVs de alto risco, destacando-se os tipos 16 e 18, são os agentes etiológicos do câncer cervical e de outros cânceres genitais, além de carcinomas de cabeça e pescoço (BRUNI et al., 2017).

Duas vacinas profiláticas estão atualmente licenciadas para uso, porém as mesmas não são eficazes para pessoas já infectadas. Portanto, faz-se necessário a implementação de estratégias voltadas também ao tratamento das infecções já existentes (CUTTS et al., 2007).

Vacinas terapêuticas estão sendo desenvolvidas e possuem como alvo as proteínas E5, E6 e E7. Algumas delas apresentam resultados promissores, entretanto, nenhuma delas até o momento se mostrou eficaz contra o câncer cervical. Especificamente, o oncogene E5 codifica proteínas que estão envolvidas com a progressão tumoral. Uma estratégia vacinal contra E5 visa, portanto, impedir a progressão do tumor de um estágio inicial para estágios mais avançados (CORDEIRO et al., 2015).

Nesse sentido, o presente trabalho propõe a clonagem de epítomos da proteína E5 de HPV16 em uma construção denominada E5 multiepítomos (E5-M) como parte de uma estratégia vacinal terapêutica contra o câncer cervical. Posteriormente, será induzida a expressão do gene clonado, e as proteínas produzidas serão testadas quanto à imunogenicidade em modelos pré-clínicos. A mesma proteína será aplicada também em testes para validação de vacinas de DNA baseadas no gene sintético E5-M.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Vetor

O vetor pAE (RAMOS et al., 2004) foi utilizado para clonar o gene de interesse. O tamanho pequeno e o alto número de cópias facilita a clonagem e expressão dos genes.

Métodos

Diante da análise dos sítios de restrição do vetor pAE e do gene sintético E5 multiepítomos, as enzimas de restrição mais adequadas para se trabalhar foram *BamHI* e *EcoRI* (Promega™). Ambos foram digeridos com essas enzimas, purificados e, posteriormente, ligados através de reações de ligação com a enzima T4 DNA ligase (Promega™). Os plasmídeos resultantes da reação foram transformados em *Escherichia coli* (Top10), conforme metodologia de clonagem molecular descrita por Sambrook et al. 2001.

Após a transformação, os repiques resultantes que apresentaram melhor crescimento foram selecionados para análise através de mini extração de DNA plasmidial,

descrita por Maniatis *et al* (1989). Foi realizado inóculo de 5mL em meio de cultura LB acrescido de ampicilina a partir dos repiques, permanecendo incubados a 37°C por 16h sob agitação. Após esse período, 1,5mL da cultura foi transferido para tubo de microcentrífuga, ao que se seguiu uma série de centrifugações, acompanhadas da adição de soluções para promover lise celular e precipitação de proteínas e DNA genômico. O DNA plasmidial obtido foi analisado quanto a sua composição por meio de reação de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, para verificar a liberação do fragmento clonado no vetor. O material resultante foi submetido a eletroforese em gel de agarose.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados

A figura 1 apresenta o resultado da reação de digestão da construção pAE_E5M. Na imagem pode-se observar duas bandas, uma correspondente ao vetor pAE, de cerca de 2,8 kb, e outra correspondente ao gene E5-M, com 374 pb.

Figura 1 – Clonagem molecular de E5-M de HPV16 em vetor pAE; Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE; 100V/cm² aplicados; M – Marcador Ladder GeneRuler 1Kb; 1 a 5- digestão com enzimas de restrição *Bam*HI/*Eco*RI, apresentando o vetor pAE vazio (2,8kb) e o gene E5-M (374pb) fragmento de 374pb

O vetor (pAE) utilizado possuía inicialmente um outro gene clonado nos mesmos sítios de restrição escolhidos para inserção do gene sintético E5-M. Isso facilitou a visualização da eficácia das digestões feitas com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, necessárias para a produção dos terminais coesivos necessários para a clonagem. Assim, tornou-se possível visualizar, após corrida eletroforética em gel de agarose, a linearização do vetor após a primeira reação de digestão, e a liberação do inserto após a segunda reação, apontando que o vetor se encontrava pronto para se ligar ao gene de interesse. Concluído esse procedimento, o gene E5-M, digerido com as mesmas enzimas, pôde ser ligado ao vetor pAE através de reações de ligação. Após transformação, a confirmação da composição plasmidial foi feita por análise de restrição, onde se observou o tamanho dos fragmentos liberados após digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. O resultado confirmou a clonagem do gene E5 multiepítomos no vetor de expressão pAE.

4. CONCLUSÃO

Vacinas terapêuticas baseadas em oncogenes de HPV vêm sendo testadas, com graus variados de sucesso. Até o presente momento, nenhuma estratégia vacinal foi totalmente eficaz contra o câncer cervical. A oncoproteína E5, envolvida na progressão tumoral, pode ser

utilizada para imunização, visando causar regressão de tumores associados ao HPV e impedir a progressão para estágios mais avançados de malignidade. A clonagem do gene sintético E5 multiepítotos em vetor de expressão cria novas perspectivas para a produção de uma vacina terapêutica eficaz contra o câncer cervical.

5. REFERÊNCIAS

BRUNI, L.; BARRIONUEVO-ROSAS, L.; ALBERO, G.; SERRANO, B.; MENA, M. **Human Pap. and Rel. Dis. in the Wor.**, Summary Report, 2017.

CORDEIRO, M.N.; PAOLINI, F.; MASSA, S.; CURZIO, G.; ILLIANO, E.; SILVA, A.J.D.; FRANCONI, R.; BISSA, M.; MORGHEN, C.M.; FREITAS, A.C.; VENUTI, A. Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. **Hum. Vac. & Imm.** 11:1–8, 2015.

CUTTS, F.T.; FRANCESCHI, S.; GOLDIE, S.; CASTELLSAGUE, X.; DE SANJOSE, S.; GARNETT G.; EDMUNDS, W.J.; CLAYES, P. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. **Bul. of the Wor. Hea. Org.**, 85:719-726, 2017.

RAMOS C.R.R.; ABREU, P.A.E. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz Jou of Med and Bio Res**, 37: 1103-1109. 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed., 800 p, 1989.

6. AGRADECIMENTOS

CAPES, FACEPE e CNPq.