

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA QUIMERA CONTENDO UM ANTÍGENO DE *C. botulinum* SOROTIPO C ASSOCIADO AO ADJUVANTE MOLECULAR LTB

ANA VITÓRIA COSTA¹; CLÓVIS MOREIRA JUNIOR²; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES³; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA⁴; MIGUEL ANDRADE BILHALVA⁵; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – costavitoria00@yahoo.com

²Universidade Federal de Pelotas – clovismoreirajr@live.com

³Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – miguel.bilhalva@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O botulismo é uma intoxicação neurológica, geralmente fatal, causada por toxinas botulínicas (BoNTs) produzidas por *Clostridium botulinum*, um bacilo gram positivo anaeróbico formador de esporos (MOREIRA et al., 2020). Em condições favoráveis, essa produz as neurotoxinas, que são classificadas em sete sorotipos (A-G), de acordo com sua antigenicidade. Os sorotipos C e D são os principais responsáveis por causar botulismo em animais (OTAKA, 2017).

O Brasil é o principal exportador mundial de carne bovina e possui o segundo maior rebanho bovino (IBGE, 2020), um cenário que implica em alta demanda de doses de vacinas anti-botulínicas, que anualmente são utilizadas para prevenir a morte desses ruminantes (MOREIRA et al., 2020). Entretanto, a produção de vacinas convencionais envolve a obtenção de toxóides que, embora eficazes, apresentam algumas desvantagens no processo, como tempo e riscos biológicos devido ao contato direto com o agente patogênico.

Uma alternativa a estes processos são as vacinas recombinantes, cujas ferramentas de desenvolvimento permitem a obtenção de antígenos atóxicos e altamente imunogênicos. As BoNTs apresentam uma cadeia leve (LC) contendo o domínio catalítico responsável pela ação enzimática da toxina ligado por uma ponte dissulfeto a uma cadeia pesada contendo os domínios de translocação N-terminal (Hn) e de ligação ao receptor neuronal C-terminal (Hc), ambos com 50 kDa (RAVICHANDRAN, et al. 2007; GIL, et al. 2013). Dentre essas regiões proteicas, o Hc é o principal alvo de pesquisa, uma vez que vacinas contra esse domínio são capazes de induzir anticorpos capazes de neutralizar a intoxicação (MOREIRA et al., 2016). Para BoNT, o truncamento do antígeno nativo permitiu altos níveis de expressão sem nenhuma toxicidade (MOREIRA et al., 2020).

O potencial adjuvante da subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) foi demonstrado por GIL et. al (2013) ao avaliar vacinas recombinantes quiméricas compostas pelo Hc das BoNTs C e D associados ou não a LTB, onde somente as formulações compostas com o adjuvante obtiveram altos níveis de anticorpos neutralizantes. A adição de adjuvantes moleculares tem se mostrado uma estratégia promissora por estimular e direcionar uma resposta imune mais efetiva (JEREMY et al., 2011).

A porção C-terminal do domínio de ligação da cadeia pesada (Hcc) de 25 kDa reconhece um receptor de superfície nos neurônios, levando à internalização da toxina em vesículas endocíticas, consequentemente, aumentando a afinidade e potencial da molécula (LEE et al., 2007).

Nesse contexto, à fim de se obter proteínas recombinantes com maior potencial imunogênico para emprego em vacinas, foi utilizado o fragmento Hcc da neurotoxina botulínica sorotipo C fusionada à LTB (Figura 1). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi a clonagem e expressão de um antígeno quimérico do sorotipo C de *C. botulinum* associados a um adjuvante molecular.

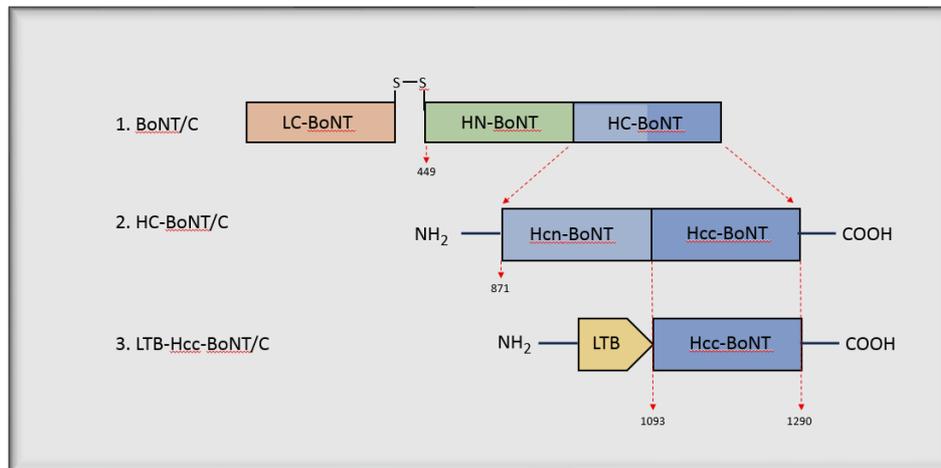


Figura 1. Representação esquemática da neurotoxina botulínica sorotipo C (1) e das construções recombinantes compostas pela cadeia pesada (HC) da BoNT/C (2) e da quimera composta pelo domínio C-terminal da cadeia pesada (Hcc) e da subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) (3).

2. METODOLOGIA

2.1. Clonagem do domínio C-terminal (Hcc) da BoNT/C no vetor pET28a/LTB

Iniciadores que flanqueiam a região Hcc foram sintetizados contendo sítios de enzimas de restrição nas extremidades para permitir a inserção no vetor pET28a/LTB. O produto da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e o vetor pET28a/LTB foram purificados, digeridos com enzimas de restrição específicas e ligados utilizando a enzima T4 DNA ligase (Thermo FisherScientific). Para a transformação em choque térmico, o produto da ligação foi inserido em *Escherichia coli* DH5 α e mantida em agitação no shaker à 37 °C por uma hora. As células de *E. coli* DH5 α resultantes da transformação foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB) sólido suplementado com 100 μ g/mL de canamicina e cultivadas à 37 °C, 180 rpm, *overnight*. As colônias obtidas foram inoculadas em 10 mL de meio LB com canamicina e cultivadas em agitação no shaker à 37 °C, 180 rpm, *overnight*. A extração de DNA plasmidial dos cultivos foi feita utilizando o protocolo descrito por GREEN E SAMBROOK (2012). A análise das amostras de DNA plasmidial foi feita em eletroforese em gel de agarose 0,8% e caracterizada através da amplificação do inserto LTB-Hcc por PCR.

2.2. Expressão e caracterização das proteínas recombinantes

O clone pET28a/LTB-HccC foi transformado por choque térmico utilizando a cepa BL21 (DE3) Star de *E. coli* e inoculado em 10 mL de meio LB com 100 μ g/mL de canamicina (37 °C, 180 rpm, *overnight*). Em seguida, foi coletado 1 mL do pré-inóculo de cada cultivo e transferido para 10 mL de meio LB (37 °C, 180 rpm, *overnight*), onde foram cultivados até atingir a densidade ótica (DO_{600nm}) entre 0,6 - 0,8 e induzidos com IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo) por 3 h nas

mesmas condições. Foram utilizados os vetores pET28a/LTB e pET28a/HccC como controle da expressão. A caracterização da expressão das proteínas recombinantes foi confirmada através da técnica de *Western Blot* (WB) com anticorpo monoclonal anti-poli-histidina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O antígeno quimérico contendo o sorotipo C associado ao adjuvante molecular foi amplificado e clonado em vetor pET28a/LTB com sucesso. A confirmação da inserção do gene de interesse foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e caracterizada por PCR, sendo a expressão da proteína recombinante avaliada através da técnica de *Western blot*, conforme observado na Figura 2.

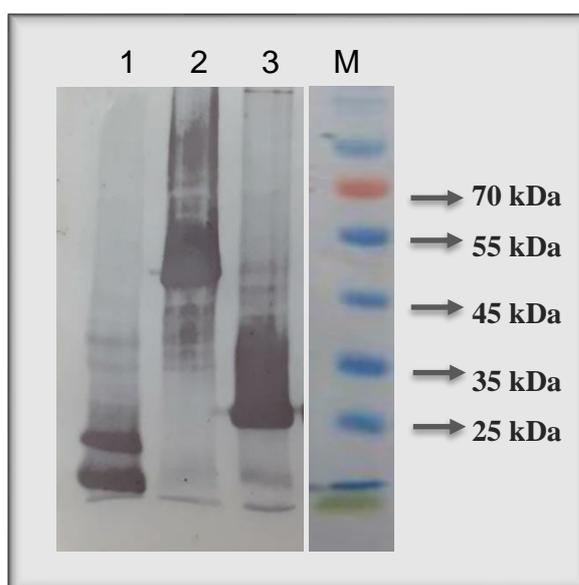


Figura 2. Caracterização da expressão das proteínas recombinantes por *Western blot* com anticorpo anti-poli-histidina revelado por DAB. 1- pET28a/LTB; 2- pET28a/LTB-HccC; 3- pET28a/HccC; 4- Marcador molecular.

Dessa forma, foi possível observar uma banda imunorreativa de aproximadamente 47 kDa referente a expressão do vetor pET28a/LTB-HccC em *E. coli* BL21 (DE3), conforme esperado. Anticorpos neutralizantes direcionados contra o fragmento Hcc são conhecidos por conferir proteção eficiente contra doses letais de BoNTs (WEBB et. al, 2007). As proteínas quiméricas contendo epítomos de diferentes agentes patogênicos, ligantes, ou sequências adjuvantes oferecem maior imunogenicidade aos antígenos recombinantes (GIL et al., 2013).

4. CONCLUSÕES

Pode se concluir que foi possível clonar e expressar um antígeno quimérico recombinante do sorotipo C de *C. botulinum* associado ao adjuvante molecular LTB, uma vez que o clone escolhido produziu uma banda imunorreativa com tamanho esperado em sua expressão. Com isso, novos estudos são necessários para avaliar o potencial imunoprotetor da proteína recombinante em experimentação animal contra botulismo, como também avaliar a antigenicidade

das proteínas por ensaios imunoenzimáticos utilizando anticorpos anti-BoNT, a fim de se obter uma vacina eficaz contra as infecções causadas pelo patógeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OTAKA, D.Y.; BARBOSA, J.D.; MOREIRA JR, C.; FERREIRA, M.R.A.; CUNHA, C.E.P.; BRITO, A.R.S.; DONASSOLO, R.A.; MOREIRA, A.N.; CONCEIÇÃO, F.R.; SALVARANI, F.M. Humoral Response of Buffaloes to a Recombinant Vaccine against Botulism Serotypes C and D. **Toxins**, Brasil, v.9, n.297, 2017.

LUKE, J. M.; CARNES, A. E.; SUN, P.; HODGSON, C. P.; WAUGH, D. S.; WILLIAMS, J. A. Thermostable tag (TST) protein expression system: Engineering thermotolerant recombinant proteins and vaccines. **Journal of Biotechnology**, v.151, n.3, p.242–250, 2011.

FERREIRA, M. R. A.; MOTTA, J. F.; AZEVEDO, M. L.; SANTOS, L. M.; MOREIRA JR., C.; RODRIGUES, R. R.; DONASSOLO, R. A.; REIS, A. S. B.; BARBOSA, J. D.; SALVARANI, F. M.; MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F. R. Inactivated recombinant Escherichia coli as a candidate vaccine Against Clostridium perfringens alpha toxin in sheep. **Anaerobe**, Brasil, v. 59, p. 163-166, 2019.

GIL, L.A.F.; DA CUNHA, C.E.P.; MOREIRA, G.M.S.G.; SALVARANI, F.M.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; MENDONÇA, M.; DELLAGOSTIN, O.A.; CONCEIÇÃO, F.R. Production and Evaluation of a Recombinant Chimeric Vaccine against Clostridium botulinum Neurotoxin Types C and D. **PLOS ONE**, v. 8, p. 696, 2013.

RAVICHANDRAN, E.; AL-SALEEM, F.H.; ANCHARSKI, D.M.; ELIAS, M.D.; SINGH, A.K.; SHAMIM, M.; GONG, Y.; SIMPSON, L. L. Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can be administered by the mucosal route. **Department of Medicine Faculty Papers**, v. 20, 2007.

WEBB, R. P.; SMITH, T. J.; WRIGHT, P. M.; MONTGOMERY, V. A.; MEAGHER, M. M.; SMITH, L. A. Protection with recombinant Clostridium botulinum C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. **Vaccine**, v. 25, p.21, 2007.

LEE, J. C.; HWANG, H. J.; SAKAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, Y.; ARIMITSU, H.; TSUJI, T.; WATANABE, T.; OHYAMA, T.; TSUCHIYA, T.; OGUMA, K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine, **Microbiol Immunol**, v. 51, p. 4, 2007.

MOREIRA, C.; DA CUNHA, C.E.P.; MOREIRA, G.M.S.G.; MENDONÇA, M.; SALVARANI, F.M.; MOREIRA, A.N.; CONCEIÇÃO, F.R. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 40, p. 58–62, 2016.

GREEN, M. and SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012. 2v.

IBGE. Indicadores IBGE. Inst Bras Geogr e Estatística - IBGE 2020.