

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE rETX Y196E-C

MIGUEL ANDRADE BILHALVA¹; MARCOS ROBERTO A. FERREIRA²;
FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³

¹Universidade Federal de Pelotas – miguel.bilhalva@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é um bastonete Gram-positivo e anaeróbico encontrado de forma onipresente no trato gastrointestinal de ruminantes saudáveis e no solo. Devido a sua capacidade de formar endósporos, é capaz de se manter latente por um longo período de tempo sem afetar a sua viabilidade (FERREIRA et al., 2016).

A ingestão de esporos ou alterações no trato gastrointestinal destes animais pode resultar na proliferação excessiva deste microrganismo e consequentemente suas toxinas, podendo causar diferentes patologias, estas variam de acordo com os diferentes toxinotipos de *C. perfringens* (A – E) que são agrupados de acordo com a produção de suas principais toxinas: Alfa (CPA), beta (CPB), épsilon (ETX) e iota (CPI). Dentre elas, ETX é relatada como uma toxina de grande relevância veterinária. Produzida pelos toxinotipos B e D, ETX é uma toxina formadora de poros, considerada a terceira toxina mais potente produzida por *Clostridium* spp., ETX é traduzida em uma prototoxina inativa de 32,98 kDa, ativada após clivagem enzimática, geralmente pela tripsina ou quimotripsina. Sua relevância veterinária se deve por ser o agente causador da enterotoxemia, que acomete rebanhos de produção causando impacto econômico ao setor pecuarista ao redor do mundo (FERREIRA et al., 2016).

A principal forma de controle e profilaxia desta enfermidade é a vacinação, levando em conta as características de rápida progressão e alta taxa de letalidade inerentes desta e das demais clostridioses. No entanto, as vacinas desenvolvidas nas últimas décadas se baseiam na utilização de toxoides inativados com formaldeído, o que agrega uma série de desvantagens de produção, como o alto risco de biossegurança e o laborioso processo de inativação (YAO et al., 2016).

Antígenos recombinantes ETX já foram relatados, porém apresentaram toxicidade similar a toxina nativa, sendo necessário a sua inativação, no entanto, estudos demonstraram que aminoácidos aromáticos acessíveis na superfície da proteína, localizados no domínio estrutural I, responsável pela interação da toxina com as células do hospedeiro, apresentam grande relevância nesta interação, e por tanto, são possíveis alvos de mutações com objetivo de afetar a capacidade de interação do antígeno recombinante com o receptor de ETX (IVIE e MACCLAIN, 2012).

Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo a expressão e caracterização de rETX Y196E-C, uma molécula mutante com a substituição da tirosina (Y) por ácido glutâmico (E) na posição 196 (Y196E) e mantido o peptídeo na posição C-terminal, anteriormente relatada na literatura como estável em *Escherichia coli* (IVIE e MACCLAIN, 2012). Cepas de *E. coli* são otimizadas para a expressão proteica, apresentam metabolismo relativamente simples e genoma amplamente caracterizado além de baixo risco biológico, minimizando as desvantagens do método tradicional de produção (MOREIRA et al., 2016).



2. METODOLOGIA

A expressão de rETX-Y196E-C foi realizada em cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star. Resumidamente, uma colônia da bactéria foi transformada por choque térmico (Sambrook & Russel, 2001) e cultivada em meio Luria Bertani (LB) líquido (37 °C, 180 rpm, 1 h), transferido para 10 ml de meio LB suplementado com canamicina (100 µg/mL) e incubado em agitação (37 °C, 180 rpm, 18 h). No dia seguinte este pré inoculo foi transferido para 500 ml de meio LB suplementado com Canamicina (100 µg/mL) e incubado (37 °C, 180 rpm) até atingir DO₆₀₀ de 0,3, onde teve a temperatura de incubação modificada (28 °C, 180 rpm, 18 h). A expressão foi induzida pela adição de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (1 µg/ml) ao cultivo em alta densidade, por 3 horas (37 °C, 180 rpm).

Após a expressão as células foram lavadas duas vezes com *wash buffer*, por centrifugação (10000 × *g*, 5 minutos). O cultivo foi concentrado 10x no mesmo tampão e inoculado com lisozima (50 µg/mL; 37 °C, 180 rpm, 1 h), mantido no gelo (20 minutos) e submetido a sonicação (60Hz), seis ciclos de 30 segundos com intervalos de 15 segundos. O lisado das células foi centrifugado (10000 × *g*, 10 minutos) e o sobrenadante da lise foi armazenado para análise posterior. O pellet (corpo de inclusão) foi tratado em *wash buffer* com ureia 8 M, sob agitação (4 °C, 48 h) e centrifugado (10000 rpm, 10 minutos).

Para caracterização de expressão e solubilidade da molécula, amostras do cultivo com 3 h de expressão, do sobrenadante da lise e do corpo de inclusão solubilizado foram analisadas em SDS-PAGE e *western blot*, antes da purificação. A purificação do antígeno foi realizada em coluna Ni-Sepharose.

Para análise de antigenicidade da molécula, uma amostra do antígeno purificado foi avaliada em *western blot* com soro de ovelha vacinada com bacterina (*E.coli* BL21 (DE3) Star) contendo rETX conforme descrito por Ferreira et al. (2019). Como controle positivo foram utilizadas rETX toxica e como controle negativo o extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada. Como controle, uma membrana contendo as mesmas amostras foi revelada com conjugado enzimático anti-His6x.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão de rETX Y196E-C em *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star em escala de 500 ml nos padrões estabelecidos foi eficiente, sendo demonstrado com uma banda de alta intensidade e com massa molecular esperada (34,06 kDa), de acordo com a análise por SDS-PAGE e *western blot*. O antígeno foi predominantemente expresso de forma insolúvel, apesar de se mostrar presente nas duas frações avaliadas (solúvel e insolúvel) (Figura 1 A e B).

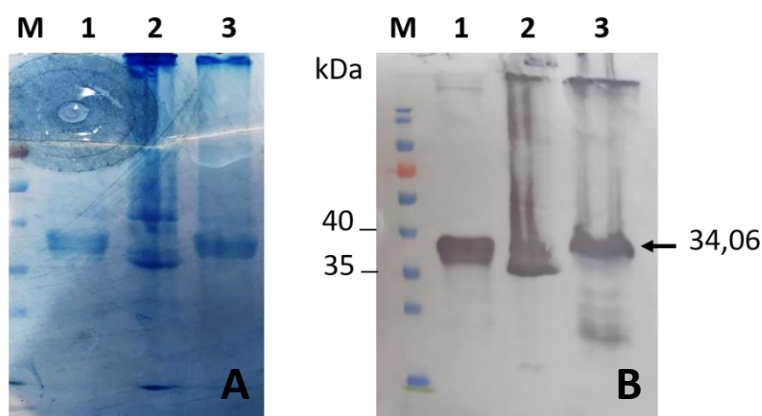


Figura 1 – Gel de poliacrilamida 12% corado por solução de coomassie blue (A) e *western blot* conjugado enzimático anti-His6x (B) M: marcador; 1: rETX Y196E corpo de inclusão; 2: rETX Y196E sobrenadante da lise; 3: rETX Y196E extrato da expressão.

De acordo com análise em SDS-PAGE a purificação em coluna Ni-Sepharose da fração insolúvel se mostrou eficiente, apresentando concentração proteica em apenas duas das seis eluição (5% e 10%), descartando a necessidade de eluições adicionais para obtenção da proteína purificada.

A avaliação de antigenicidade demonstrou rETX Y196E-C como uma molécula antigênica, quando reconhecido pelo soro ovino contendo anticorpos anti-rETX em análise por *western blot* (Figura 2 A), demonstrando que rETX Y196E-C é um antígeno promissor para a indução de resposta imune contra rETX toxica.

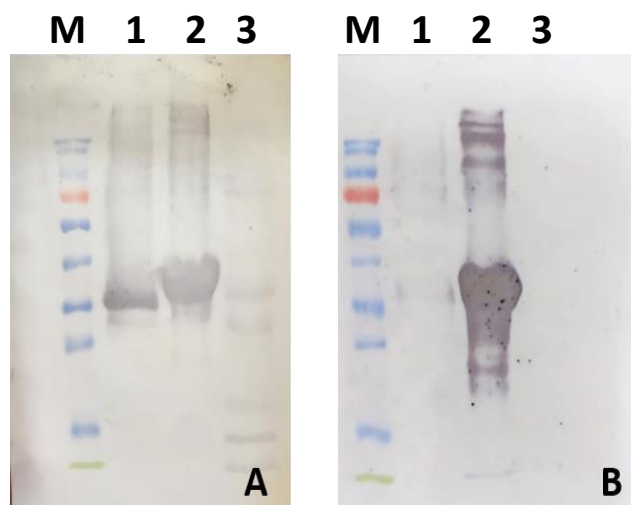


Figura 2 – *Western blot* com soro ovino anti-rETX (Ferreira et al. 2019) (A) e *Western blot* com conjugado enzimático anti-His6x (B): M: Marcador de peso molecular 1- rETX toxica (Ferreira et al. 2019); 2 - rETX Y196E-C; 3 - extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star.

Antígenos inativados já são utilizados comercialmente para a vacinação contra ETX e apresentam certa eficiência, porém, também contam com diversas desvantagens como já citado. Por este motivo, diversos estudos relatam a aplicação da tecnologia recombinante na utilização de rETX purificado como antígeno vacinal promissor, no entanto, o presente estudo tem como perspectiva futura a utilização de rETX Y196E-C em uma metodologia vacinal mais simples e eficiente, utilizando de bacterinas de *Escherichia coli* inativada contendo rETX Y196E-C. Este método é promissor por descartar as etapas inerentes a purificação do antígeno, sem perder a eficiência já obtida com a molécula purificada (FERREIRA et al., 2019).



4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que rETX Y196E-C é um antígeno promissor para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra toxina beta de *C. perfringens*, uma vez que, apresentou antigenicidade quando avaliado com soro ovino anti-rETX, indicando que a mutação pontual Y196F não afetou a expressão e antigênica. Porém a mutação influenciou a solubilidade do antígeno para insolúvel.

Em seguida, serão realizados testes para a avaliação de inocuidade em camundongos, para avaliar se a mutação é de fato eficiente para anular ou reduzir a toxicidade de ETX. Além da toxicidade, também será avaliada a capacidade do antígeno em estimular uma resposta imune protetora em modelos animais e na espécie-alvo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ferreira, M. R. A.; Moreira, G. M. S. G.; Cunha, C. E. P.; Mendonça, M.; Salvarani, F. M.; Moreira, A. N.; Conceição, F. R. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of *Clostridium perfringens*: Production Strategies and applications as Veterinary Vaccines. **Toxins**, v.8, n.340, 2016.

Ferreira, M. R. A.; Motta, J. F.; Azevedo, M. L.; dos 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**, V59, 163 - 166, 2019.

Ivie, S. E.; McClain, M. S. Identification of Amino Acids Important for Binding of *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin to Host Cells and to HAVCR1. **Biochemistry including biophysical chemistry and molecular biology**, Department of Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee 37232, United States, v51, 7588 – 7595, 2012.

Moreira, G. M. S. G.; Salvarani, F. M.; Cunha, C. E. P.; Mendonça, M.; Moreira, Â. N.; Gonçalves, L. A.; Pires, P. S.; Lobato, F. C. F.; Conceição, F. R. Immunogenicity of a Trivalent Recombinant Vaccine Against *Clostridium perfringens* Alpha, Beta, and Epsilon Toxins in Farm Ruminants. **Scientific Reports**, 2016.

Sambrook, J.; Russel, D. **Molecular cloning**: Cold Spring Harbor. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Yao, W.; Kang, J.; Kang, L.; Gao, S.; Yang, H.; Ji, B.; Li, P.; Liu, J.; Xin, W.; Wang, J. Immunization with a novel *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant rETXY196E-C confers strong protection in mice. **Scientific Reports**, 2016.