

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE QUATRO VERSÕES DA TOXINA BETA DE *Clostridium perfringens* EM DIFERENTES CEPAS DE *Escherichia coli*.

**RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES¹; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA;
RAFAEL AMARAL DONASSOLO; JAQUELINE FREITAS MOTTA; FABRICIO
ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵.**

¹Universidade Federal de Pelotas- rafelr458@gmail.com
Universidade Federal de Pelotas- marcosferreiravet@gmail.com
Universidade Federal de Pelotas- rafaeldonassolo@gmail.com
Universidade Federal de Pelotas- jfreitasmotta@gmail.com
⁵Universidade Federal de Pelotas- fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio e com capacidade de formação de esporos, classificados em cinco toxinotipos (A, B, C, D e E) conforme a produção de quatro toxinas (alfa, beta, épsilon e iota) (NILLO, 1980 e SONGER, 1996). O toxinotipo C é responsável por infecções que variam desde enterite necrótica hemorrágica até enterotoxemia em suínos, bovinos, ovinos e caprinos (SONGER, 1996). A toxina beta (CPB) é codificada pelo gene plasmidial *cpb*, e caracterizada pela formação de poros nas células susceptíveis (NAGAHAMA et al., 2003 e GURJAR et al., 2010). Além disso, produzida no intestino pode ser absorvida na circulação e causar lesão em órgãos internos (MCCLANE et al., 2006).

O sistema de expressão heteróloga de proteínas associados à engenharia genética utilizando *Escherichia coli* traz inúmeras vantagens na produção de vacinas recombinantes como produção simplificada e biossegurança, controle de todas as fases do processo de produção, e facilidade de manipulação genética. No entanto, apresenta variação na solubilidade de proteínas oriundas de outros organismos, na qual podem apresentar as seguintes características: solúvel; insolúvel; ou ambos (solúvel/insolúvel) (MOREIRA et al., 2014).

Proteínas clonadas e expressas fusionadas às caudas de solubilidade *small ubiquitin-related modified* (SUMO) e a proteína ligante de cálcio de *Fasciola hepatica* (FH8), foram utilizadas por Marblestone et al. (2006) e por Costa et al. (2012) obtendo resultados de solubilidade e expressão promissores. Paralelamente, o fragmento correspondente aos aminoácidos 143-311 de CPB, foi caracterizado recentemente como sendo imunogênico e suficiente em induzir títulos de anticorpos neutralizantes anti-CPB (SHREYA et al., 2016). A proteína beta recombinante (rCPB) expressa em sistema heterólogo mostrou ser insolúvel, necessitando de inúmeras etapas como a desnaturação, purificação e redobramento antes de ser utilizada como antígeno vacinal (dados não publicados). Diante disto, o objetivo do exposto foi avaliar a expressão de rCPB, rCPB-C, rSUMO-CPB-C e rFH8-CPB utilizando diferentes cepas de *Escherichia coli*.

2. METODOLOGIA

As regiões codificadoras (CDS) de CPB-C, CPB, FH8-CPB e SUMO-CPB foram clonadas, seguindo os parâmetros de clonagem descritos por Sambrook (2012) e utilizando os vetores pET28a e pAE. Já para expressão foi avaliado onze cepas de *E. coli* transformadas por choque térmico: *E. coli* BL21 (DE3) StarTM, *E.*

coli RIL, *E. coli* Roseta, *E. coli* C41, *E. coli* C43, *E. coli* pIlysS, *E. coli* pIlysE, *E. coli* Salt Induction (SI), *E. coli* PT-TRX, *E. coli* RP e *E. coli* BL21 (DE3). Após o processo de transformação, procedeu-se o cultivo com meios LB (Luria Bertani) e LB-Low Salt, suplementados com 100 µg/mL de canamicina para cepas transformadas em vetor pET e 100 µg/mL de ampicilina para cepas transformadas em vetor pAE. As condições de cultivo ocorreram, a 37 °C sob agitação de 200 rpm e no terço final da fase logarítmica de crescimento ($DO_{600} = 0,6$ a 0,8), a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 0,5 mM de isopropil β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). A avaliação da expressão ocorreu através de SDS-PAGE 12%.

Já para avaliação da solubilidade das proteínas, o restante do cultivo referente ao processo de expressão foi centrifugado ($7.000 \times g$; 4 °C; 10 min) e o *pellet* ressuspensionado em 5 mL de *wash buffer*, suplementado com 10 µL de lisozima. Após, incubado por 1 h a 37 °C para posterior lise celular por processo de sonicação e centrifugado ($10.000 \times g$; 4 °C; 10 min). O sobrenadante da lise resultante foi imediatamente avaliado através de SDS-PAGE para detecção de proteínas solúveis e o *pellet* ressuspensionado em 5 mL de PBS-T, centrifugado a ($10.000 \times g$; 4 °C; 5 min) e ressuspensionado novamente em *wash buffer*. As proteínas obtidas na forma de corpos de inclusão foram também avaliadas por SDS-PAGE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários esforços têm sido tomados para superar as limitações de expressão de antígenos recombinantes em *Escherichia coli*, incluindo o uso de caudas de solubilidade, expressão de domínios imunogênicos das toxinas e testes em diferentes cepas de *E. coli* (DAVIS et al. 1999). Dentre os fatores que influenciam as características de solubilidade estão: vetores e cepas de expressão, sequência codificadora (CDS), sequências de aminoácidos das proteínas, condições de cultivo e a concentração do indutor (LARENTIS et al. 2014). As características de solubilidade das quatro versões recombinantes de rCPB (rCPB, FH8-CPB, SUMO-CPB e rCPB-C) expressas nas 11 cepas de *E. coli* estão demonstradas nas figuras 1, 2 e 3.

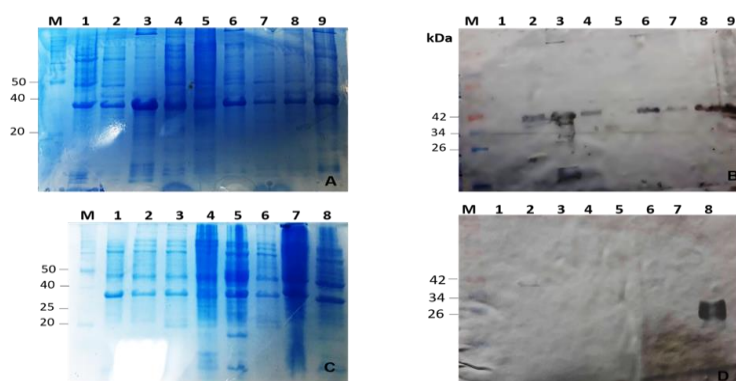


Figura 01. SDS-PAGE e Western blot (WB) CPB-N (37 kDa) – (A) SDS-PAGE das cepas de *E. coli* transformadas com pAEcpb; M – Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA); 1 – *E. coli* Star não transformada; 2 – *E. coli* BL21(DE3) star; 3 – *E. coli* Ril / pAEcpb; 4 – *E. coli* BL21 (DE3) /pAEcpb; 5 – *E. coli* Roseta /pAEcpb; 6 – *E. coli* C43 / pAEcpb; 7 – *E. coli* RP / pAEcpb; 8 – *E. coli* PT-TRX / pAEcpb; 9 – *E. coli* BL21 DE3 Salt induction / pAEcpb (B) WB das cepas de *E. coli* transformadas com pAEcpb; (C)) SDS-PAGE Sobrenadante da lise de CPB expressa nas diferentes cepas de *E. coli*. M – Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA); 1 – *E. coli* Star não transformada; 2 – *E. coli* BL21(DE3) star; 3 – *E. coli* Ril / pAEcpb; 4 – *E. coli* BL21 (DE3) /pAEcpb; 5 – *E. coli* C43 / pAEcpb; 6 – *E. coli* RP / pAEcpb; 7 – *E. coli* PT-TRX / pAEcpb; 8 – *E. coli* BL21 DE3 Salt induction / pAEcpb. (D) WB do Sobrenadante da lise de CPB expressa nas diferentes cepas de *E. coli*. M – Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA); 1 – *E.*

coli BL21(DE3) star; 2 - *E. coli* Ril / pAECpb; 3 - *E. coli* BL21 (DE3) / pAECpb; 4 - *E. coli* C43 / pAECpb; 5 - *E. coli* RP / pAECpb; 6 - *E. coli* PT-TRX / pAECpb; 7 - *E. coli* BL21 DE3 Salt induction / pAECpb. 8- rTes-30 (+).

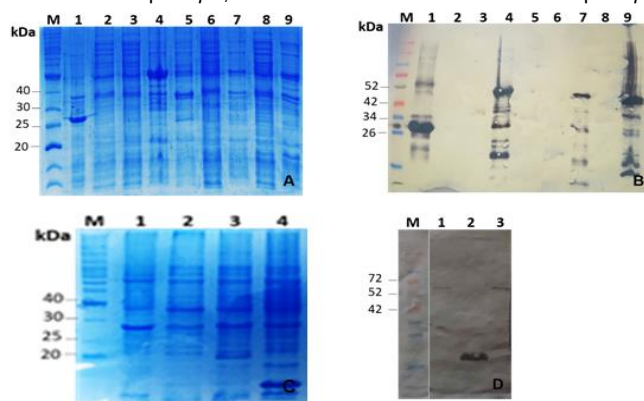


Figura 02 - SDS-PAGE e Western blot (WB) de SUMO-CPB (48,8 kDa) – (A) SDS-PAGE das cepas de *E. coli* transformadas com pET SUMOcpb; M – Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA); 1 – *E. coli* BL21(DE3) star / pET cpb-c (+); 2 - *E. coli* Star / pET SUMOcpb 3 - *E. coli* Ril / pET SUMOcpb; 4 - *E. coli* BL21 (DE3) / pET SUMOcpb; 5 - *E. coli* Roseta / pET SUMOcpb; 6 - *E. coli* C43 / pET SUMOcpb; 7 - *E. coli* RP / pET SUMOcpb; 8 - *E. coli* PT-TRX / pET SUMOcpb; 9 - *E. coli* Salt induction (SI) / pET SUMOcpb. (B) WB das cepas de *E. coli* transformadas com pET SUMOcpb. (C) SDS-PAGE Sobrenadante da lise (SL) de SUMO-CPB expressa nas diferentes cepas de *E. coli*; M – Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA); 1 - *E. coli* BL21 (DE3) star não transformada; 2 - *E. coli* BL21 (DE3) pET SUMOcpb; 3 - *E. coli* BL21 (DE3) RP pET SUMOcpb; 4 - *E. coli* SI pET SUMOcpb;. (D) SL de SUMO-CPB expressa nas diferentes cepas de *E. coli*. M - Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA); 1 - SL de *E. coli* BL21 (DE3) pET SUMOcpb; 2 - SL de *E. coli* RP pET SUMOcpb; 3 - SL de *E. coli* SI pET SUMOcpb.

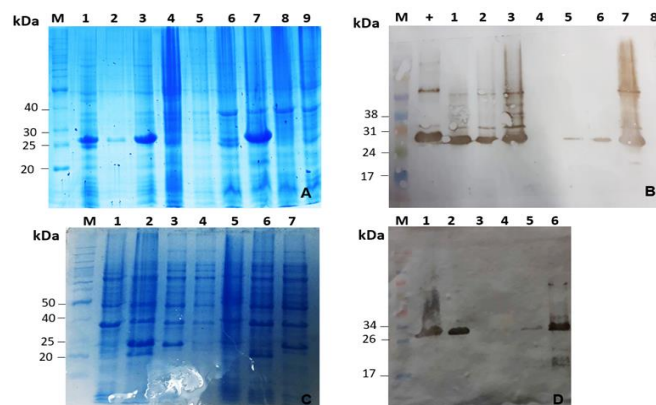


Figura 03 - SDS-PAGE e Western blot (WB) de CPB-C (22 kDa) – (A) SDS-PAGE das cepas de *E. coli* transformadas com pET28acpb-c; M – Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA) ; 1 - *E. coli* BL21 (DE3) star / pET28acpb-c; 2 - *E. coli* Ril / pET28acpb-c; 3 - *E. coli* BL21 (DE3) / pET28acpb-c; 4 - *E. coli* Roseta / pET28acpb-c; 5 - *E. coli* C43 / pET28acpb-c; 6 - *E. coli* RP / pET28acpb-c; 7 - *E. coli* PT-TRX / pET28acpb-c; 8 - *E. coli* Salt induction (SI) / pET28acpb-c. (B) WB das cepas de *E. coli* transformadas com pET28acpb-c. (C) SDS-PAGE do Sobrenadante da lise (SL) de CPB-C expressa nas diferentes cepas de *E. coli*. M – Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA); 1 - SL de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 2 - SL de *E. coli* Star; 3 - SL de *E. coli* Ril; 4 - *E. coli* BL21 (DE3); 5 - SL de *E. coli* C43; 6 - SL de *E. coli* RP; 7 - SL de *E. coli* PT-TRX. (D) WB do SL de CPB-C expressa nas diferentes cepas de *E. coli*. M – Marcador de peso molecular proteínas (Thermo Scientific, USA); 1 - SL de *E. coli* Star; 2 - SL de *E. coli* Ril; 3- SL de *E. coli* BL21 (DE3); 4 -SL de *E. coli* C43; 5 - SL de *E. coli* RP; 6 - SL de *E. coli* PT-TRX.

Com relação aos níveis de expressão, a proteína rCPB foi expressa na maioria das cepas avaliadas, exceto pela *E. coli* BL21 (DE3) Roseta, PlysS, PlysE e C41. Já a proteína rSUMO-CPB foi expressa pelas cepas *E. coli* BL21 (DE3), RP e SI. A proteína rCPB-C foi expressa em grande quantidade nas cepas *E. coli* BL21 (DE3), Star, Ril e PT-TRX, e em menor quantidade nas cepas RP e C43. Não foi detectada a expressão de FH8-CPB em nenhuma cepa de *E. coli* utilizada. Com relação às características de solubilidade, rCPB foi expressa solúvel em baixa quantidade na cepa *E. coli* Ril, assim como, a rSUMO-CPB nas cepas *E. coli* BL21 (DE3) e SI. Diferentemente das demais proteínas, a rCPB-C foi a proteína mais solúvel, sendo detectada em grandes quantidades no sobrenadante de *E. coli* Star, Ril e PT-TRX.

4. CONCLUSÕES

A avaliação da expressão de diferentes versões de CPB recombinante a partir da utilização de diferentes cepas de *E. coli*, permitiu constatar que das quatro versões de CPB avaliadas (FH8-CPB, SUMO-CPB, CPB e CPB-C) a molécula mais promissora em relação as características de expressão foi rCPB-C. Entretanto, novos ensaios devem ser realizados para avaliar a imunogenicidade de rCPB, rCPB-C e rSUMO-CPB.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, S.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DOMINGUES, L.; BESIR, H. The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.97, n.15, p 6779-6791.

DAVIS, G.D.; ELISEE, C.; NEWHAM, D.M.; HARRISON, R.G. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng**, v.65, p 382–388, 1999.

GURJAR, A.; LI, J.; MCCLANE, B.A. Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates. **Infect. Immun**, v.78, p 4860–4869, 2010.

LARENTIS, A.; NICOLAU, J. F. M. Q.; ESTEVES, G.; VARESCHINI, D.; DE ALMEIDA, F. V.; DOS REIS, M.; MEDEIROS, M. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. **BMC Research Notes**, v.7, p 671, 2014.

MARBLESTONES, J.; EDAVETTAL S.; LIM, Y.; EDAVETTAL, S.; LIM, P.; ZUO, X.; BUTT, T. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO. **Protein science**, v. 15, p 186-189, 2006

MCCLANE, B. A.; UZAL, F. A.; MIYAKAWA, M.; LIERLY, D.; WILKINS, T. D. The enterotoxigenic clostridia. In *The Prokaryotes*; Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.H.; Stackebrandt, E., Eds.; Springer: New York, USA, p 698–752, 2006.

MOREIRA, G. M. S. G.; CUNHA, C. E. P.; SALVARANI, F. M.; GONÇALVES, L. A.; PIRES, P. S.; CONCEIÇÃO, F. R.; & LOBATO, F. C. F. Production of recombinant botulism antigens: A review of expression systems. **Anaerobe**, v.28, p 130–136, 2014.

NAGAHAMA, M.; HAYASHI, S.; MORIMITSU, S.; SAKURAI, J. Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.38, p 36934–36941, 2003.

NILLO, L. *Clostridium perfringens* in Animal Disease: A Review of Current Knowledge. **The canadian veterinary journal**, v.21, n.5, p 141–148, 1980.

SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clin. Microbiol**, v.9, p 216–234, 1996.