

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO FRAGMENTO C-TERMINAL DA TOXINA ALFA DE *Clostridium perfringens*

MARINA DA SILVA MEDEIROS; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA;
CLOVIS MOREIRA JUNIOR; RAFAEL AMARAL DONASSOLO; MORGANA
LUDTKE AZEVEDO; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO.

Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas,
Pelotas/RS, Brasil

E-mails: medeirosmarina82@gmail.com (autor); fabricio.rochedo@ufpel.edu.br
(orientador)

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de micro-organismos anaeróbios, Gram-positivos, formadores de esporos e que estão presentes no solo e no trato digestivo dos animais e do homem (SONGER, 1996). *Clostridium perfringens* é uma bactéria patogênica e é classificada em cinco tipos toxigênicos (A-E) de acordo com as principais toxinas produzidas (alfa, beta, épsilon e iota) (Niilo, 1980). Dentre as principais toxinas, a toxina alfa (CPA) é uma fosfolipase C responsável pela hidrólise da fosfatidilcolina e, em menor proporção, da esfingomielina. Devido a sua origem cromossomal, está presente em todos os toxinotipos, sendo expressa em níveis mais elevados no *C. perfringens* toxinotipo A. A CPA é constituída por um domínio N-terminal (CPA-N) e outro C-terminal (CPA-C). O sítio catalítico da toxina está localizado no domínio CPA-N, sendo portanto, a porção tóxica. O domínio CPA-C, com cerca de 120 aminoácidos, é a porção atóxica que se liga a membrana da célula hospedeira.

A ação de CPA caracteriza-se pela hidrólise de fosfolípidos da membrana de eritrócitos, plaquetas, células endoteliais, musculares e enterócitos, sendo potencialmente letal.

Diante disso, se faz necessário medidas de profilaxia para o controle das enfermidades causadas por *C. perfringens* toxinotipo A. A vacinação ainda é a principal forma de prevenção, porém, as vacinas atualmente disponíveis são, na sua maioria, polivalentes e sua composição consiste de toxinas inativadas com formaldeído (toxóides), o que torna sua produção laboriosa e perigosa para os manipuladores e os animais.

Além disso, o formaldeído pode reduzir a imunogenicidade dos antígenos, assim como, os resíduos podem afetar a segurança das vacinas (Byrne & Smith, 2000). Dessa forma, as vacinas recombinantes surgem como uma nova geração de vacinas que podem apresentar resultados superiores aos processos empregados atualmente.

O domínio CPA-C^[247-370] desempenha um papel fundamental no mecanismo de patogenicidade e é o domínio antigênico mais importante. Já é descrita na literatura sua eficiência, apresentando um potencial imunogênico, visto que é capaz de produzir anticorpos neutralizantes, que impedem a ligação da toxina aos receptores celulares (Jiang et al., 2015)

Diante disso, o objetivo desse estudo foi clonar e expressar a porção CPA-C^[247-370] em sistema de expressão heteróloga *Escherichia coli*, visando o desenvolvimento de uma

vacina contendo apenas o fragmento potencialmente imunogênico e atóxico da toxina CPA.

2. METODOLOGIA

Para a clonagem e expressão da porção C-terminal de CPA, foi realizada a PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: CPA-C *forward* (5'-CTGGGATCCAATGATCCATCAGTT-3') e *reverse* (5'-CCCAAGCTTTTATTTTATATTATAAGTTGA-3'), que flanqueiam a sequência de interesse e apresentam sítios de restrição para enzimas de restrição.

O vetor pUC19cpa/cpb/etx (EpochBiolabs – EUA) contendo as sequências codificadoras para as três proteínas, foi utilizado como DNA-molde. O fragmento de DNA correspondente a CPA-C foi digerido com enzimas *Bam*HI e *Hind*III e subclonado em vetor pET28a. Para a reação de ligação, foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen™) e concentrações equimolares de inserto e vetor. A reação de ligação foi mantida a 22 °C por uma hora.

O produto da ligação foi utilizado para transformar por eletroporação células de *E. coli* DH5α. As células transformadas foram plaqueadas em ágar Luria-Bertani (LB) (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl) acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de canamicina e incubadas a 37 °C, por 12 – 14 h. As colônias que cresceram nas placas, oriundas do processo de transformação, foram semeadas em tubos contendo 10 mL de LB líquido acrescido de canamicina e incubadas a 37 °C por 18 h. Os possíveis clones recombinantes foram caracterizados com as respectivas enzimas utilizadas na clonagem e também por PCR, para avaliação da presença do gene de interesse.

Após a seleção, um clone recombinante foi utilizado para transformar por choque térmico cepas *E. coli* BL21 (DE3) Star™. Após isso, foi realizado um pré-inóculo em 50 ml de LB (37 °C, 18 h, 200 rpm). O pré-inóculo foi utilizado para inocular 500 ml de LB (37 °C, 200 rpm). A indução com IPTG foi realizada após atingir a densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,6-0,8. O cultivo foi centrifugado (7000 rpm, 10 min, 4 °C), descartado o sobrenadante e o *pellet* suspenso em 50 mL de tampão de lise.

Cada amostra foi incubada com lisozima a 37 °C por 1 h, sonificadas e centrifugadas novamente. A avaliação da solubilidade de CPA-C foi realizada através de SDS-PAGE do sobrenadante da lise e dos corpos de inclusão. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia em coluna His-trap e a antigenicidade foi avaliada através da técnica de *Western Blot* (WB).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porção CPA-C^[247-370] é responsável pelo reconhecimento e ligação à membrana da célula hospedeira, permitindo que a porção N-terminal (CPA-N^[1-246]) exerça sua atividade tóxica. (Flores-Díaz e Alape-Girón, 2003; Sakurai et al., 2004; Titball et al., 2006). Por isso, a utilização da porção CPA-C^[247-370] como antígeno vacinal, induz a geração de anticorpos neutralizantes que bloqueiam a ligação de CPA na célula, e consequentemente, impedem sua ação tóxica. O gene correspondente a CPA-C foi amplificado no tamanho esperado de 375 pb.

A subclonagem foi realizada no vetor pET28a e a caracterização dos clones foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%, onde o tamanho dos clones recombinantes foi comparado ao do vetor pET28a, todos na forma circular. Como o gene era pequeno, a diferença de tamanho entre os clones suspeitos e o vetor pET28a foi sutil (Fig. 1A).

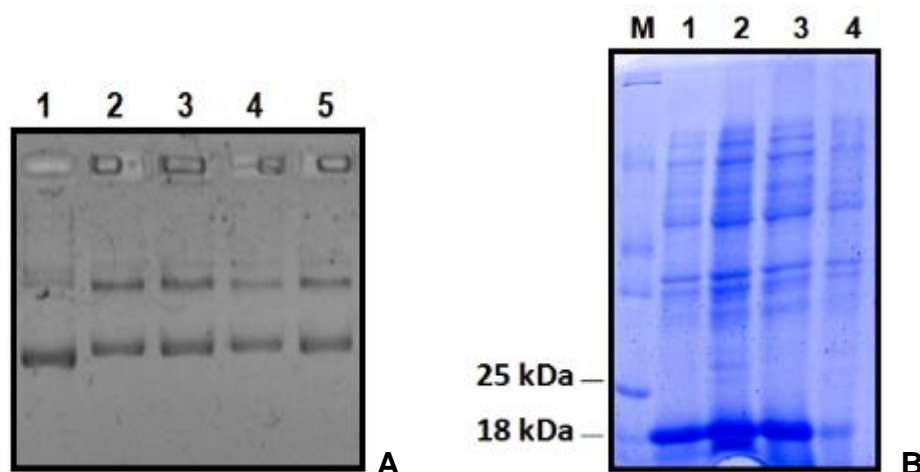


Figura 1 - A) 1- pET28a 2-5) clones suspeitos. **B)** M- marcador molecular; 1- *E. coli*/BL21 (DE3) Star/pET28acpa-c não induzido; 3- *E. coli*/BL21 (DE3) Star/pET28acpa-c induzido; 4- Sobrenadante da lise; 5- Corpos de inclusão.

O produto da expressão foi analisado por SDS-PAGE onde apresentou 19 kDa, correspondente a CPA-C^[247-370] (Fig. 1B). Além do potencial imunogênico, a produção de CPA-C^[247-370] apresenta vantagens em relação as vacinas produzidas atualmente que requerem o cultivo do *C. perfringens* tipo A para produção de CPA nativa e posteriormente inativada com formaldeído (toxóide), e também em relação a proteína CPA íntegra recombinante, que pode apresentar efeito dermonecrótico, por isso, também pode ser necessária a detoxificação (Goossens et al., 2016). A utilização da porção atóxica de CPA torna a produção mais segura em relação a CPA íntegra, não sendo necessária a inativação, etapa que demanda um longo período e oferece risco de hipersensibilidade devido ao formaldeído residual.

Através de SDS-PAGE do sobrenadante da lise e dos corpos de inclusão foi possível observar que a proteína foi expressa na forma solúvel. A obtenção na forma solúvel possibilita a purificação diretamente do sobrenadante da lise e diminui o tempo e custos de produção das vacinas, evitando etapas adicionais de solubilização e renaturação da proteína-alvo. Além disso, devido amplo conhecimento genético e fisiológico e ao curto tempo de geração, a expressão utilizando *E. coli* possibilita maior controle e rendimento de produção (Sahdev et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade de clonagem e expressão do domínio CPA-C^[247-370] de forma recombinante, apresentando vantagens superiores na produção, representando uma alternativa eficiente para imunização contra CPA de *C. perfringens*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Goossens, E., Verherstraeten, S., Valgaeren, B. R., Pardon, B., Timbermont, L., Schauvliege, S., ... Van Immerseel, F. (2016). The C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha toxin as a vaccine candidate against bovine necrohemorrhagic enteritis. **Veterinary Research**, 47(1), 52.

Sahdev, S., Khattar, Æ. S. K., Singh, Æ. K., & Glycosylation, Á. P. Á. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems : a review of the existing biotechnology strategies, 249–264.

Byrne MP, Smith LA (2000) Development of vaccines for prevention of botulism. **Biochimie** 82: 955–966. doi:10.1016/S0300-9084(00)01173-1. PubMed: 11086225.

Stevens et. al. (2004) Immunization with the C-Domain of a-Toxin Prevents Lethal Infection, Localizes Tissue Injury, and Promotes Host Response to Challenge with *Clostridium perfringens*. **Major Article**. The Journal of Infectious Diseases, v. 190, p 767–73.

Moreira et. al (2016) Immunogenicity of a Trivalent Recombinant Vaccine Against *Clostridium perfringens* Alpha, Beta, and Epsilon Toxins in Farm Ruminants. **Scientific Reports**, p 1-9. | 6:22816 | DOI: 10.1038/srep22816

Nagahama et. al (2013) A recombinant carboxy-terminal domain of alpha-toxin protects mice against *Clostridium perfringens*. **Microbiology and immunology** 57: 340–345 doi: 10.1111/1348-0421.12036.

Oda et. al. (2015) Characterisation of the Calcium-binding C-terminal Domain of *Clostridium perfringens* Alpha-toxin. **Toxins**. mpdi, p 5268-5275.

S.R. Uppalapati, J.J. Kingston, H.S. Murali and H.V. Batra (2012) Generation and characterization of an inter-generic bivalent alpha domain fusion protein aCS from *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* for concurrent diagnosis and therapeutic applications. **Journal of Applied Microbiology**. Journal of apla, v. 113, p 448-458.