

## **CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PORÇÃO C-TERMINAL DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DAS NEUROTOXINAS BOTULÍNICAS SOROTIPOS C E D**

**RAFAEL AMARAL DONASSOLO<sup>1</sup>; CLÓVIS MOREIRA JUNIOR;  
RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES; MORGANA LUDTKE AZEVEDO; EMILI  
GRIEP; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas- [rafaeldonassolo@hotmail.com](mailto:rafaeldonassolo@hotmail.com)*

*Universidade Federal de Pelotas- [clovismoreirajr@live.com](mailto:clovismoreirajr@live.com)*

*Universidade Federal de Pelotas- [rafaelr458@gmail.com](mailto:rafaelr458@gmail.com)*

*Universidade Federal de Pelotas- [morganaludtke@gmail.com](mailto:morganaludtke@gmail.com)*

*Universidade Federal de Pelotas- [emiliigriep@gmail.com](mailto:emiliigriep@gmail.com)*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas- [fabricio.rochedo@ufpel.edu.br](mailto:fabricio.rochedo@ufpel.edu.br)*

### **1. INTRODUÇÃO**

*Clostridium botulinum* é um bacilo Gram positivo anaeróbico formador de esporos, presente na natureza e no trato gastrointestinal de animais saudáveis (MOREIRA JR, 2016). Em condições favoráveis, produzem as neurotoxinas botulínicas (BoNTs), classificadas de acordo com sua antigenicidade em sete sorotipos (A-G), sendo os sorotipos C e D os principais responsáveis por causar botulismo em animais (OTAKA, 2017). 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 (HC) 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) .

A tecnologia do DNA recombinante tem proporcionado o desenvolvimento de vacinas recombinantes atóxicas como uma alternativa à produção dos toxóides atualmente disponíveis no mercado contra o botulismo, e produzidos através da inativação da toxina botulínica (BoNT) com formaldeído, através de um processo produtivo pouco atraente que apresenta: (1) risco de reversão da toxicidade, uma vez que as BoNTs são as proteínas mais potentes conhecidas na natureza; (2) baixa previsibilidade na expressão da toxina pelo microrganismo patogênico; (3) alto risco em relação a biossegurança dos manipuladores; e (4) necessidade de 15 a 21 dias para a inativação química.

O potencial imunoprotetor das vacinas recombinantes utilizando o domínio de ligação (HC) das BoNTs sorotipos C e D já foi demonstrado pelo nosso grupo em camundongos, cobaios, bovinos e búfalos (GIL, et al. 2013; CUNHA, et al. 2013; MOREIRA JR, et al. 2016; OTAKA et al. 2017). Dessa forma, o presente trabalho objetiva clonar e expressar a porção de C-terminal do domínio de ligação (HCc - 25 KDa) das BoNTs sorotipos C e D, onde encontram-se grande parte dos epítopos protetores, visando obter proteínas

recombinantes com maior potencial imunogênico a serem posteriormente avaliadas como antígenos vacinais.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Clonagem da porção C-terminal do domínio de ligação das BoNTs C e D no vetor pET28a

Para a clonagem foram desenhados iniciadores que flanqueiam a região de interesse. Sítios para enzimas de restrição foram inseridos nas extremidades de cada iniciador, possibilitando a clonagem em vetor pET28a. As regiões codificadoras das toxinas foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). O produto da PCR e o vetor pET28a foram purificados, digeridos com as respectivas enzimas de restrição e posteriormente foi realizado uma reação de ligação utilizando enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific). O produto da ligação foi utilizado para transformar por choque térmico células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes.

As células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes transformadas foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB) sólido suplementado com 100  $\mu$ g/mL de canamicina e cultivadas à 37 °C por 16 h. As colônias obtidas na placa foram inoculadas em 5 mL de meio LB com 100  $\mu$ g/mL de canamicina e cultivadas à 37 °C, 200 rpm, por 16 h. Os cultivos foram utilizados para extração de DNA plasmidial seguindo o protocolo descrito por Green e Sambrook (2012). O DNA plasmidial dos possíveis clones recombinantes foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e caracterizado por PCR.

### 2.2 Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

Após a seleção, os clones recombinantes foram utilizados para transformar por choque térmico cepas *E. coli* BL21 (DE3) Star<sup>TM</sup> e inoculado em 50 ml de LB com canamicina (37 °C, 18 h, 200 rpm), posteriormente transferido para 500 ml de LB com canamicina e mantido a 37 °C, 200 rpm até atingir a densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,6 - 0,8, quando a expressão foi induzida com IPTG por 3 h nas mesmas condições. Após, o cultivo foi centrifugado (7000 g 10 min, 4 °C), e a amostra coletada. A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada através da técnica de *Western Blot* (WB) com anticorpo monoclonal anti-polihistidina.

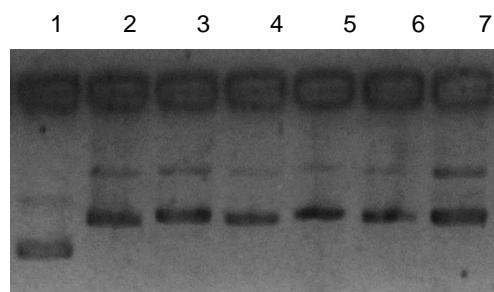
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região codificadora da porção C-terminal do domínio de ligação (HCc) das BoNTs sorotipos C e D foram amplificadas com sucesso e clonadas em vetor pET28a. A confirmação da inserção do gene de interesse deu-se por eletroforese em gel de agarose 0,8% através da comparação do tamanho das bandas referentes às construções recombinantes em relação ao controle

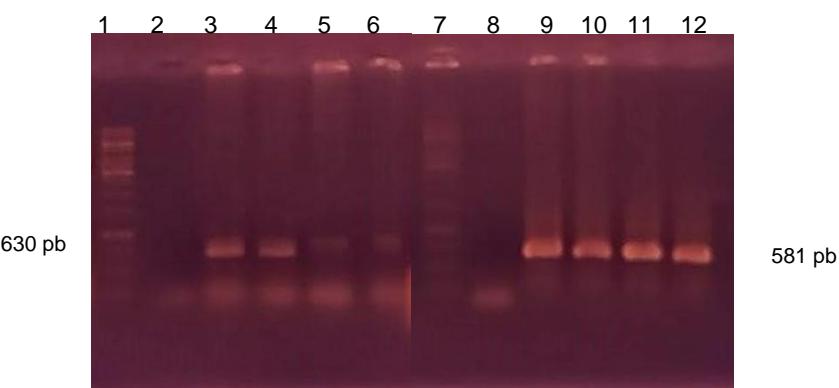


contendo apenas o vetor pET28a circular (Figura 1) e através da realização de PCR com iniciadores específicos para amplificação das regiões HCc das BoNTs C e D contendo 630 e 581 pares de base, respectivamente (Figura 2).

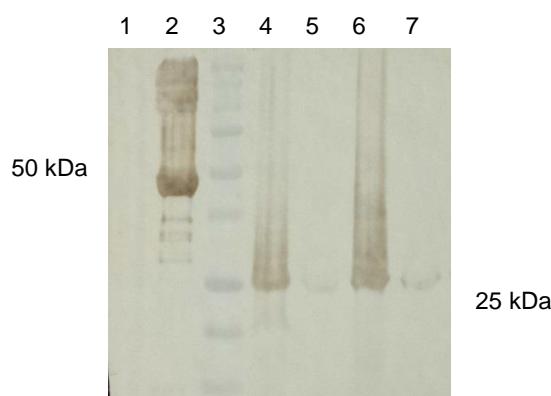
A caracterização da expressão das proteínas recombinantes foi realizada através da técnica de *Western blot*, conforme observado na Figura 3.



**Figura 1.** Gel de agarose 0,8% demonstrando screening das colônias transformantes quanto à presença do inserto recombinante. 1 - Controle negativo (pET28a); 2 – 4 pET28a/hcC; 5 – 7 pET28a/hcD.



**Figura 2.** Avaliação da clonagem através da amplificação dos insertos por PCR. 1 - Marcador 1 kb; 2 - Controle negativo (pET28a); 3 - 6 Amplificação do gene *hcc*; 7 - Marcador 1 kb; 8 - Controle negativo (pET28a); 9 - 12 Amplificação do gene *hcD*.



**Figura 3.** Caracterização da expressão proteínas recombinantes por *Western blot* com anti-histidina revelado por DAB. 1- Controle negativo (*E. coli* Star); 2- Controle positivo (50 kDa), 2- Marcador pré-corado; 3 – Expressão rD25 pós indução; 4 - Expressão rD25 não induzida, 5 – Expressão rC25 pós indução, 6 – Expressão rC25 não induzida.

#### 4. CONCLUSÃO

Foi possível clonar e expressar a porção de C-terminal do domínio de ligação (HCc) das BoNTs sorotipos C e D. Novos estudos serão conduzidos buscando otimizar a expressão das proteínas avaliadas, bem como avaliar o potencial imunoprotetor das proteínas como antígenos em experimento de vacinação em animais contra o botulismo, conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

#### 5. REFERÊNCIAS

Moreira, C.; da Cunha, C.E.P.; Moreira, G.M.S.G.; Mendonça, M.; Salvarani, F.M.; Moreira, Â.N.; Conceição, F.R. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. **Anaerobe**, Amsterdam, V.40, P.58–62 2016.

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** 8, e696 2013.

Cunha, C.E.P.; Moreira, G.M.S.G.; Salvarani, F.M.; Neves, M.S.; Lobato, F.C.F.; Dellagostin, O.A.; Conceição, F.R. Vaccination of cattle with a recombinant bivalent toxoid against botulism serotypes C and D. **Vaccine**, 32, 214–216, 2014.

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**, 9, 297, 2017.

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**. 20. 2007.