

PURIFICAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DA PROTEÍNA rCP40 DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* EXPRESSA EM *Escherichia coli*

GABRIEL BRENNER¹; BÁRBARA DA ROCHA FONSECA²; LUIZA DOMINGUES MORON²; NICOLE RAMOS SCHOLL²; RODRIGO BARROS DE PINHO²; SIBELE BORSUK³

¹Universidade Federal de Pelotas - gabrielbrenner123@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – barbfonseca@gmail.com; moronluiza@gmail.com; nicoleramosscholl@hotmail.com; rodrigobpinho@hotmail.com.

³Universidade Federal de Pelotas - sibeléborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria gram-positiva, intracelular facultativa e o agente etiológico da doença linfadenite caseosa (LC) (de SÁ GUIMARÃES et al., 2011).

A LC é uma doença infecciosa crônica, de ocorrência mundial, que afeta principalmente pequenos ruminantes como caprinos e ovinos (COSTA et al., 2011). Esta doença se apresenta de duas formas principais, sendo elas a linfadenite caseosa externa caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos externos e tecido subcutâneo e a linfadenite caseosa interna ou visceral, caracterizada pelos abscessos nos gânglios linfáticos internos e outros órgãos como pulmões, rins e até mesmo no cérebro (WINDSOR et al., 2011; VARELA-CASTRO et al., 2017; BAIRD et al., 2007). A importância desta doença se dá devido aos impactos econômicos gerados principalmente pela diminuição do ganho de peso e produção de leite do animal, além da condenação da carcaça devido as lesões provocadas pelos abscessos (D'AFONSECA et al., 2008).

Uma vez que os tratamentos disponíveis para LC são onerosos e ineficazes, a profilaxia por meio da vacinação torna-se a melhor alternativa de prevenção e controle da enfermidade (BAIRD et al., 2007). Além disso, não existe um diagnóstico comercialmente disponível que seja 100% sensível e específico para a doença (GUIMARÃES et al., 2011). Desta forma, a busca por novos alvos imunogênicos e antigênicos de *C. pseudotuberculosis* é de suma importância. Neste cenário, é destacada a proteína CP40, uma endoglicosidase de 40 kDa, conhecida por ser um dos antígenos predominantes no início da infecção por *C. pseudotuberculosis*, além de ser reconhecida em altos níveis pelo sistema imune durante a fase aguda da doença, mostrando-se claramente promissora para o desenvolvimento de vacinas de subunidade recombinantes e desenvolvimento de testes imunodiagnósticos (SHADNEZADH et al., 2016, SILVA et al., 2014).

Tendo em vista o exposto, este trabalho teve como objetivo expressar de forma heteróloga, purificar e liofilizar a proteína CP40 de *C. pseudotuberculosis* em *Escherichia coli* para sua utilização em estudos futuros.

2. METODOLOGIA

Para a expressão da proteína recombinante CP40 de *C. pseudotuberculosis* em *E. coli* foi utilizado o plasmídeo pAE/cp40 previamente construído (Droppa et al, 2016) para transformar células de *E. coli* DE3 BL21 Star através de protocolo de eletroporação. Após transformação, as células foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB) contendo ágar bacteriológico com adição de ampicilina (100ug/mL) e incubadas a 37 °C por 16 h. Em seguida, uma colônia isolada foi coletada e transferida para um pré-inóculo de 50 mL com adição do antibiótico

ampicilina (100ug/mL) e incubada em shaker a 37 °C por 16 h. Após este tempo, foi realizado um aumento de escala do cultivo para 500 mL e este foi novamente incubado até atingir DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8, sendo adicionados 1mM de IPTG para indução da expressão proteica durante 3 h.

Após a expressão proteica, foi realizada uma centrifugação a 7000 g por 15 minutos a 4°C e o pellet suspenso em PBS 1X (Tampão fosfato-salino) estéril com adição de lisozima, sendo sonificado para promover a lise celular. O produto da sonificação foi mantido sob agitação em câmara fria por 30 min. Em seguida foi realizada nova centrifugação a 7000 g por 15 minutos e o pellet suspenso em tampão Akta wash com uréia (50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 20mM Imidazole; 8M ureia) para solubilização da proteína, mantido sob agitação por 16 h em câmara fria a 4°C. Posteriormente foi realizada uma centrifugação de 40 minutos a 10000 g, o sobrenadante resultante foi filtrado e após realizada a purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de sepharose (HisTrap). Posteriormente foi realizada diálise para *refolding* da proteína e concentração da mesma utilizando PEG 7000. A confirmação da expressão e identidade da proteína rCP40 foram confirmadas por 12%SDS-PAGE e Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6xhis, respectivamente.

A fim de obter uma forma mais estável para o armazenamento e transporte da proteína recombinante, a mesma foi submetida a técnica de liofilização para remoção total do tampão através do congelamento seguido por aumento gradativo da temperatura e diminuição da pressão. Este processo foi realizado no equipamento liofilizador L101 (Liotop®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão da proteína rCP40 de *C. pseudotuberculosis* em *E. coli* foi eficiente, sendo confirmada através de SDS-Page. A proteína purificada foi dialisada e concentrada, e foi quantificada utilizando curva de BSA (albumina sérica bovina) variando de 200 µg/mL até 700 µg/mL (**Figura 1**). Baseado nesta curva, a proteína rCP40 foi observada em uma concentração de aproximadamente 400 µg/mL.

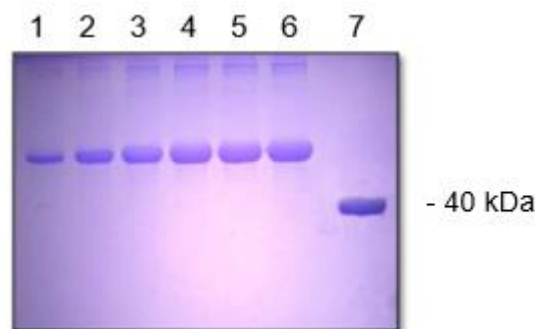


Figura 1: 12%SDS-PAGE demonstrando a avaliação da concentração da proteína recombinante após a liofilização, suspensa em 1 mL de H₂O Milli-Q estéril. Curva de BSA, 1) 200 µg/mL; 2) 300 µg/mL; 3) 400 µg/mL; 4) 500 µg/mL; 5) 600 µg/mL; 6) 700 µg/mL; 7) rCP40 (40 kDa).

Após ser quantificada, a proteína passou pelo processo de liofilização que ocorreu de forma esperada, obtendo-se um pó fino de coloração branca. Este

quando ressuspendido se encontrou na mesma concentração anteriormente descrita, demonstrando a efetividade da técnica. Em adição, a utilização deste processo atua para facilitar o futuro transporte e aumentar o tempo de vida útil e de armazenamento da proteína.

A fim de confirmar a identidade da proteína recombinante foi realizado *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6x histidina, sendo possível observar uma banda reativa no tamanho esperado de 40 kDa para a proteína recombinante CP40 (**Figura 2**).

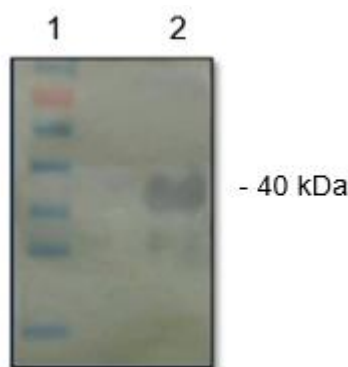


Figura 2: *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xhistidina. 1) Marcador pré-corado (Thermo Scientific); 2) rCP40.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível executar com sucesso a expressão, purificação e liofilização da proteína rCP40, obtendo uma proteína pura e estável, o que possibilita o seu uso futuro em estudos para o desenvolvimento de novas formulações vacinais ou para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos para a linfadenite caseosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIRD, G. J., & FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, (2007) 137(4), 179–210.

COSTA, M. P. et al. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC research notes**, v. 4, n. 1, p. 243, 2011.

D'AFONSECA, V. et al. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genet Mol Res**, v. 7, p. 252-260, 2008.

DROPPA, D. ; REZENDE, A. F. S. ; MEYER, ROBERTO ; VIVAS, W. L. ; OLIVEIRA, K. K. ; SIMIONATTO, S. ; DELAGOSTIN, O. A. ; BORSUK, S. ; LIMA VERDE, I. B. ; PADILHA, F. F. . Recombinant CP40 from *Corynebacterium*

pseudotuberculosis confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine (Guildford)**^{JCR}, v. 34, p. 1091-1096, 2016.

DE SÁ GUIMARÃES, A., DO CARMO, F.B., PAULETTI, R.B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A.P., HEINEMANN, M.B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. & GUIMARÃES GOUVEIA, A.M. (2011). Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. **IIOAB Journal**. 2(2). p. 33–43.

GUIMARÃES, A. D. S. et al. Caseous Lymphadenitis : **Epidemiology, Diagnosis, and Control. The IIOAB Journal**, v. 2, n. 2, p. 33–43, 2011.

SHADNEZHAD, Azadeh et al. (2016). CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. **BMC Microbiology**, 16 n. 261

SILVA, J. W. et al., (2014). *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis **BMC Vet Res**. 2014; 10: 965

VARELA-CASTRO, L et al., Endemic caseous lymphadenitis in a wild Caprinae population. **Veterinary Record**, (2017) 180(16), 405–405

WINDSOR, P. A.. Control of Caseous Lymphadenitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, (2011). 27(1).