

FUSÃO DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À MALTOSE COM UM DOMÍNIO DA TOXINA ALFA DE *Clostridium novyi*

CRISTIAN HENRIQUE SOTT¹; WELINGTON MATEUS PINTO DE MORAES²;
CLEIDEANNY CANCELA GALVÃO³; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES⁴;
FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵ e ANGELA NUNES MOREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – cristian.sott@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – welingtonmateuspdemoraes@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – annymedvet@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - rafaelr458@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* agrupa bactérias Gram-positivas, anaeróbias obrigatórias e formadoras de esporos, responsáveis por várias doenças, embora apenas algumas espécies afetem animais (LOBATO et al., 2013; UZAL et al., 2014). A resistência dos esporos favorece a persistência ambiental, e a produção de exotoxinas é o principal mecanismo de patogenicidade. A vacinação com toxoides inativados é a estratégia de controle mais utilizada, mas pode apresentar limitações, levando ao desenvolvimento de vacinas de subunidade mais seguras (LOBATO et al., 2013; ABDOLMOHAMMADI KHIAV; ZAHMATKESH, 2021). Entre os patógenos de maior impacto, destaca-se o *Clostridium novyi* tipo A, agente etiológico da gangrena gasosa. Sua virulência está associada à toxina alfa (TcnA), a qual, por meio de sua atividade glicosiltransferase, glicosila proteínas Rho do hospedeiro, o que desorganiza o citoesqueleto e compromete a integridade das células endoteliais, resultando em aumento da permeabilidade vascular, inflamação intensa, extenso dano vascular, edema e necrose (JUNIOR et al., 2020; ORREL; MELNYK, 2021; SCHWEITZER; GENTH; PICH, 2022).

Dada a gravidade da doença, a imunoprofilaxia por meio de vacinas recombinantes torna-se uma estratégia promissora. A plataforma de expressão em *Escherichia coli* é amplamente utilizada nesse contexto devido ao seu baixo custo e rápido crescimento. Contudo, a expressão de proteínas heterólogas neste sistema, em especial de toxinas bacterianas, apresenta desafios significativos, como a formação de corpos de inclusão insolúveis, onde a proteína se acumula de forma agregada e mal dobrada (ROSANO; CECCARELLI, 2014), o que pode comprometer a sua imunogenicidade. Além disso, as grandes toxinas clostridiais apresentam elevada massa molecular, o que pode reduzir sua expressão (diminuindo o rendimento) e, ainda, contribuir na formação de agregados insolúveis em sistemas recombinantes. Para superar essas limitações, recorre-se à seleção de domínios ou fragmentos da toxina como potenciais alvos vacinais (FÉLIX et al., 2025), bem como ao uso de estratégias de fusão com tags de solubilidade. Entre elas, a Proteína de Ligação à Maltose (MBP), de aproximadamente 42 kDa, destaca-se como uma das mais eficazes, atuando como chaperona molecular que auxilia no dobramento correto e na solubilidade da proteína de interesse (LEBENDIKER; DANIELI, 2011; WAUGH, 2005).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho é clonar e expressar uma proteína que consiste na fusão da MBP com um domínio da toxina alfa de *C. novyi* tipo A, visando a obtenção de um potencial antígeno vacinal solúvel para a profilaxia da gangrena gasosa.

2. METODOLOGIA

2.1. Construções, síntese dos vetores e linhagens

As sequências de DNA codificantes para um domínio de TcnA (denominado CND3) e para a proteína MBP foram otimizadas para expressão em *E. coli*, sintetizadas e clonadas comercialmente (*Epoch Life Science*, EUA) no vetor pET28a, gerando os plasmídeos *pET28a-CND3* e *pET28a-MBP*.

2.2. Propagação e purificação do DNA plasmidial

Para a propagação dos vetores, células de *E. coli* DH5- α foram transformadas com os plasmídeos *pET28a-MBP* e *pET28a-CND3* por choque térmico, de acordo com GREEN e SAMBROOK, 2012. A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando kit comercial *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (80V / 45min).

2.3. Subclonagem do inserto CND3 no vetor *pET28a-MBP*

Para a construção do plasmídeo de fusão, o fragmento *CND3* foi excisado do *pET28a-CND3* e o vetor *pET28a-MBP* foi linearizado por dupla digestão com *Nhel*-HF e *EcoRI*-HF (*New England Biolabs Inc.*), de acordo com o protocolo do fabricante. Após purificação dos fragmentos em gel de agarose, a ligação foi realizada com T4 DNA Ligase (*New England Biolabs Inc.*) e o produto transformado em *E. coli* DH5- α para propagação.

2.4 Triagem dos clones

Quatro colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em caldo LB suplementado com canamicina (50 μ g/mL) para propagação. A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando kit *comercial PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) e analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Um clone com o perfil esperado foi selecionado para expressão.

2.5 Expressão dos clones

O plasmídeo *pET28a-MBP-CND3* foi transformado na linhagem de expressão *E. coli* BL21(DE3). A cultura foi incubada a 37°C em caldo LB suplementado com canamicina (50 μ g/mL) até atingir densidade óptica ($DO_{600\text{nm}}$) entre 0,6 e 0,8. A expressão da proteína de fusão foi então induzida pela adição de 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 3 horas. Ao final do período, a biomassa foi coletada por centrifugação para as análises subsequentes de expressão e solubilidade proteica por SDS-PAGE 10% e *Western Blot*, usando o anticorpo *Anti-His-Tag* (*Sigma-Aldrich*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia de subclonagem foi validada pela digestão com *Nhel* e *EcoRI*, que liberou o inserto *CND3* do plasmídeo *pET28a-CND3* e linearizou o vetor *pET28a-MBP* (Figura 1 A), com a atividade das enzimas confirmada por controles (Figura 1 B).

Os clones recombinantes foram identificados por sua menor mobilidade eletroforética em comparação com os vetores originais, confirmando a inserção bem-sucedida do fragmento *CND3* (Figura 1 C). A triagem dos clones revelou que os plasmídeos recombinantes migraram mais lentamente que os vetores *pET28a-MBP* e *pET28a-CND3*, um perfil consistente com o aumento de tamanho do plasmídeo devido à inserção do *CND3* (Figura 1 C).

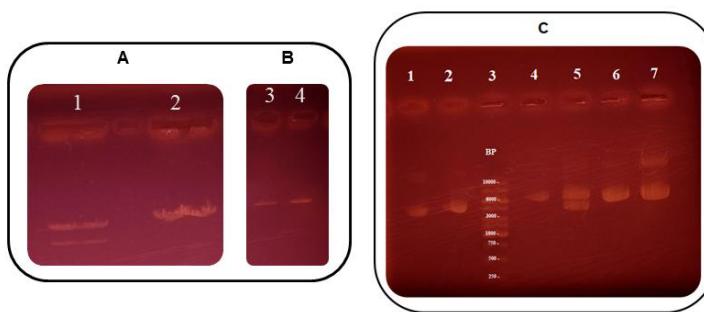


FIGURA 1 – Análise em gel de agarose 0,8% da clonagem do plasmídeo *pET28a-MBP-CND3*. (A) Digestão dos plasmídeos *pET28a-CND3* e *pET28a-MBP* com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NheI*. 1 – *pET28a-CND3*; 2 – *pET28a-MBP*. (B) Controles de digestão do plasmídeo *pET28a-CND3*. 3 – *pET28a-CND3* digerido com *EcoRI*; 4 – *pET28a-CND3* digerido com *NheI*. (C) Confirmação dos clones. 1 – plasmídeo *pET28a-MBP* (não digerido); 2 – plasmídeo *pET28a-CND3* (não digerido); 3 – Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific™); 4-7 – clones *pET28a-MBP-CND3* (1 a 4).

Os clones *pET28a-MBP-CND3* selecionados a partir da diferença de migração eletroforética no gel de agarose foram expressos na linhagem *E. coli* BL21(DE3). Dos 4 clones selecionados, três expressaram uma proteína compatível com o tamanho previsto para a fusão da MBP com CND3, aproximadamente 100 kDa, (Figura 2). Um dos clones (clone 2) apresentou tamanho relativo a MBP, indicando que a fusão nesse caso não foi bem-sucedida.

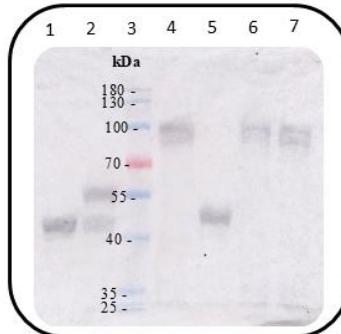


FIGURA 2 – Western blot da expressão dos clones *pET28a-MBP-CND3*. 1 - *pET28a-MBP*; 2 - *pET28a-CND3*; 3 – Marcador Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 4 - *pET28a-MBP-CND3* (clone 1); 5 - *pET28a-MBP-CND3* (clone 2); 6 - *pET28a-MBP-CND3* (clone 3); 7 - *pET28a-MBP-CND3* (clone 4).

Para análise da expressão e solubilidade, o clone 1 foi selecionado. Os resultados referentes aos lisados celulares totais foram analisados por SDS-PAGE, comparando amostras antes e após a indução com IPTG. Com isso, foi possível verificar o surgimento de uma banda proteica com massa molecular compatível com o tamanho previsto de ~100 kDa esperado para a proteína de fusão MBP-CND3 (Figura 3 A). Para a confirmação da identidade dessa proteína, uma análise por *Western Blot* utilizando um anticorpo específico *Anti-His-Tag* foi realizada (Figura 3 B).

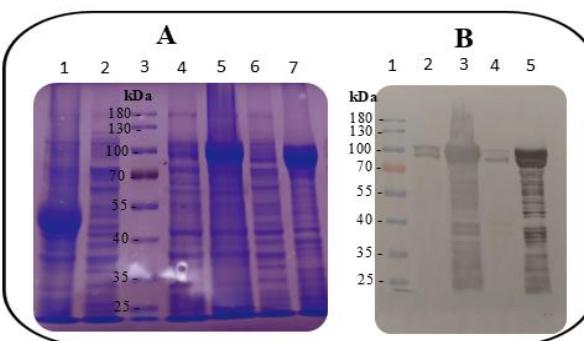


FIGURA 3. SDS-PAGE e Western blot da expressão do clone pET28a-MBP-CND3 (clone 1). **(A)**. Gel SDS-PAGE 10%. 1 - pET28a-MBP; 2 - extrato de *E. coli* BL21 DE3; 3- Marcador; 4 – pET28a-MBP-CND3 não induzido; 5 - pET28a-MBP-CND3 induzido; 6- pET28a-MBP-CND3 sobrenadante da lise; 7- pET28a-MBP-CND3 sobrenadante da ureia 8M. **(B) membrana western blot.** 1- Marcador; 2 - pET28a-MBP-CND3 não induzido; 3 - pET28a-MBP-CND3 induzido; 4- pET28a-MBP-CND3 sobrenadante da lise; 5 - pET28a-MBP-CND3 sobrenadante da ureia 8M.

Entretanto, os resultados das análises de solubilidade demonstraram que a maior parte da proteína foi recuperada na fração insolúvel, sugerindo formação de corpos de inclusão (Figura 3 B, coluna 5), sugerindo que a fusão com a MBP não foi suficiente para aumentar a solubilidade. Novas etapas de otimização das condições de cultivo são necessárias para obter quantidades maiores de proteínas solúveis.

4. CONCLUSÕES

A estratégia de subclonagem de CND3 no vetor pET28a-MBP foi bem-sucedida, gerando o plasmídeo de fusão pET28a-MBP-CND3. No entanto, a análise de solubilidade revelou que, sob as condições de cultivo padrão, a maior parte da proteína recombinante foi recuperada em corpos de inclusão. Esse resultado demonstra que, para o antígeno específico, a fusão com a MBP não foi suficiente para garantir sua solubilidade. Portanto, futuras otimizações de cultivo, como a redução da temperatura de indução e a variação da concentração do indutor, são necessárias visando aumentar o rendimento da proteína solúvel.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLMOHAMMADI KHIAV, Lida; ZAHMATKESH, Azadeh. Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. **Tropical animal health and production**, v. 53, n. 2, p. 284, 2021.
- FÉLIX, Mellanie K. C. et al. Optimization of the Production of Vaccine Epitopes from *Clostridium novyi* Alpha-Toxin Using Strains of Recombinant *Escherichia coli*. **Microorganisms**, v. 13, n. 7, 2025.
- GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Molecular cloning. **A Laboratory Manual 4th**, v. 448, 2012.
- JUNIOR, Carlos A. Oliveira et al. Gas gangrene in mammals: a review. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 32, n. 2, p. 175–183, 2020.
- LEBENDIKER, Mario; DANIELI, Tsafi. Purification of proteins fused to maltose-binding protein. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 681, p. 281–293, 2011.
- LOBATO, F. C. et al. CLOSTRIDIOSSES DOS ANIMAIS DE PRODUÇÃO. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 20, p. 29–48, 2013.
- ORRELL, Kathleen E.; MELNYK, Roman A. Large clostridial toxins: Mechanisms and roles in disease. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 85, n. 3, p. e0006421, 2021.
- ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.
- SCHWEITZER, Theresa; GENTH, Harald; PICH, Andreas. *Clostridium novyi*'s alpha-toxin changes proteome and phosphoproteome of HEp-2 cells. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 17, p. 9939, 2022.
- UZAL, Francisco A. et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. **Future microbiology**, v. 9, n. 3, p. 361–377, 2014.
- WAUGH, David S. Making the most of affinity tags. **Trends in biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 316–320, 2005.