

AValiação DA EXPRESSÃO DA FOSFOLIPASE D DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM *Mycobacterium bovis* BCG

FERNANDA KEGLES¹; KAREN SILVA LEAL²; FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE³; ANDREA DE FÁTIMA SILVA REZENDE⁴; SIBELE BORSUK⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – fkegles@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – karensleal@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – silvestrebrilhante@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – andreabiomedica@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença que acomete pequenos ruminantes e é causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, intracelular facultativa pleomórfica e anaeróbica facultativa (D'AFONSECA et al., 2010). É considerada uma doença crônica, infectocontagiosa, popularmente conhecida como “mal do caroço” ou “falsa tuberculose”, que causa sérias perdas econômicas na ovinocaprinocultura mundial em decorrência da alta prevalência e dos prejuízos econômicos nos rebanhos (D'AFONSECA et al., 2008). É caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais (WILLIAMSON, 2001; PATON et al., 2003). A melhor medida preventiva para o combate é a imunização, porém ainda não existe uma vacina eficiente e protetora contra essa doença.

Com a finalidade de obter uma vacina protetora e mais segura, diferentes estratégias vêm sendo testadas, como vacinas recombinantes de subunidade e vacinas de DNA. Ambas apresentam potencial protetor sem riscos de causar a doença. Além disso, as vacinas de DNA têm a vantagem de induzir ambos os tipos de imunidade, celular e humoral (BABIUK et al., 2000).

Outra abordagem que pode conferir níveis de proteção satisfatórios é a utilização de vacinas recombinantes vetorizadas. Dentre os diversos tipos destas vacinas pode-se citar o *Mycobacterium bovis* BCG, que já se mostrou eficiente em termos de proteção contra várias enfermidades (BASTOS et al., 2009; RIZZI et al., 2012; DENG et al., 2014). Vários alvos vacinais têm sido analisados para o controle da LC, dentre pode-se citar a fosfolipase D (PLD), um dos principais determinantes de virulência de *C. pseudotuberculosis*, acredita-se desempenhar um papel crítico na disseminação de bactérias a partir do local de infecção para os nódulos linfáticos (MCKEAN et al., 2007).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão da fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis* em *M. bovis* BCG Pasteur.

2. METODOLOGIA

O *M. bovis* BCG foi cultivado em meio 7H9 (líquido) ou 7H10 (sólido) com suplementação de OADC (*Oleic Albumin Dextrose Catalase*) além de suplementação com o antibiótico canamicina (50mg/mL) quando necessário. O cultivo foi realizado a 37 °C por 7 dias em meio 7H9 ou por 21 dias em meio 7H10. *Escherichia coli* foi cultivada em meio LB líquido ou LB-Agar a 37 °C por

16 h, com suplementação do antibiótico canamicina (50 mg/mL) quando necessário.

O gene *pld* foi amplificado por PCR utilizando primers específicos e ligados no vetor de expressão em *E. coli* pAE (RAMOS et al., 2004). Em seguida o produto da ligação foi transformado por eletroporação em *E. coli* TOP10. Os clones recombinantes foram caracterizados enzimaticamente. A expressão da proteína rPLD foi realizada na cepa de *E. coli* BL21 Star e a indução realizada com 1mM de IPTG. A confirmação da expressão foi feita através de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6X-His conjugado com peroxidase (Sigma). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de sepharose (HisTrap). A pureza das mesmas foi determinada através de SDS-PAGE e a concentração de proteínas pelo Kit BCA (Pierce).

A proteína purificada foi utilizada para imunização dos camundongos, para produção de um soro policlonal. Para isso, 50 ug da proteína rPLD, adicionada ao adjuvante hidróxido de alumínio (15%), foram inoculados em três camundongos, sendo três doses com 15 dias de intervalo. O soro foi coletado semanalmente e armazenado a -20 °C para as posteriores análises em *Western blot*.

Para construção dos vetores de expressão em *M. bovis* BCG, o gene *pld* foi amplificado por PCR utilizando primers específicos e ligado nos sítios *Xba*I e *Hind*III dos vetores de expressão (pUS2000 e pUS977) (DELLAGOSTIN et al., 1993). Em seguida o produto da ligação foi transformado por eletroporação em *E. coli* TOP10 para obtenção dos clones recombinantes. Após a caracterização enzimática os clones recombinantes foram utilizados para transformação de *M. bovis* BCG Pasteur por eletroporação. A avaliação de BCG recombinante expressando a proteína foi realizada por *Western blot* utilizando soro policlonal produzido pela imunização dos camundongos com a proteína rPLD.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um fragmento de 924 pb referente ao gene *pld* foi amplificado e pode ser observado na Figura 1. Em seguida o gene *pld* foi ligado aos vetores pUS2000 e pUS977, após uma triagem rápida por lise com fenol clorofórmio (v/v) e uma análise através de eletroforese em gel de agarose 1%, os possíveis clones recombinantes foram submetidos a extração do DNA plasmidial com o auxílio do kit *PlasmidMiniprep Spin* (GE) para posterior digestão com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III para caracterização dos clones recombinantes (Figura 2).

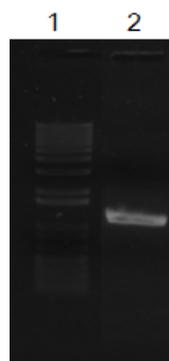


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR. (1): Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen). (2): Gene *pld*.



Figura 2: Caracterização dos clones recombinantes por digestão enzimática utilizando as enzimas *Xba*I e *Hind*III. (1): Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen). (2): pUS977/PLD. (3): pUS2000/PLD.

Após a caracterização enzimática, os clones recombinantes foram utilizados para transformação de células de *M. bovis* BCG por eletroporação. A avaliação do BCG recombinante expressando a proteína PLD foi realizada por *Western blot* utilizando o soro policlonal produzido pela imunização de camundongos com a proteína rPLD (Figura 3). Pode-se observar que obtivemos a expressão da proteína rPLD em *M. bovis* BCG *Pasteur*.

A fosfolipase D já foi utilizada como vacina recombinante de subunidade e em associação com vacinas atenuadas conferindo proteção (D'AFONSECA et al., 2008). Acreditamos que as vacinas vetorizadas, principalmente as que utilizam *M. bovis* BCG podem promover um nível de proteção maior.



Figura 3: *Western blotting* utilizando anticorpo policlonal anti-rPLD. (1): Proteína recombinante rPLD. (2): *M. bovis* BCG transformado com pUS977/PLD. (3): *M. bovis* BCG transformado com pUS2000/PLD.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstra que a proteína PLD foi expressa em *M. bovis* BCG. Assim, esse estudo se torna importante devido à complexidade regulatória da PLD de *C. pseudotuberculosis*, onde pode desempenhar um papel importante permitindo que o patógeno se adapte com sucesso a mudanças no ambiente do hospedeiro durante a infecção, migração, o estabelecimento e a progressão da

doença. Uma vacina contendo essa proteína pode se tornar efetiva no controle da LC.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABIUK, Lorne A. et al. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 76, n. 1, p. 1-23, 2000.

BASTOS, Reginaldo G. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495-6503, 2009.

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.

D'AFONSECA, Vivian et al. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microbiological research**, v. 165, n. 4, p. 312-320, 2010.

DELLAGOSTIN, Odir A. et al. Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. **Molecular microbiology**, v. 10, n. 5, p. 983-993, 1993.

DENG, Yi-Hao; HE, Hong-Yun; ZHANG, Ben-Si. Evaluation of protective efficacy conferred by a recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a fusion protein of Ag85A-ESAT-6. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 1, p. 48-56, 2014.

MCKEAN, Sandra C.; DAVIES, John K.; MOORE, Robert J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2203-2211, 2007.

RIZZI, Caroline et al. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51396, 2012.

WILLIAMSON, Lisa H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359-71, vii, 2001.

PATON, M. W. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian veterinary journal**, v. 81, n. 1-2, p. 91-95, 2003.