

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE *PAENICLOSTRÍDIUM SORDELLII* EM *ESCHERICHIA COLI*.

WELINGTON MATEUS PINTO DE MORAES¹; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES²; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA³; MARTINA ALVES LEAL⁴; RAFAEL ÂNGELA NUNES MOREIRA⁵; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – obiotecnologista@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – martinaalves0124@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – angelanmoreira@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O *Paeniclostridium sordellii*, bacilo gram-positivo anaeróbico formador de esporos (SASI JYOTHA et al., 2016), é notório por causar infecções graves e letais em animais (POPOFF, M. R. et al., 2018). Este patógeno é frequentemente associado à produção de duas exotoxinas, a toxina letal (TcsL) e a toxina hemorrágica (TcsH), membros da família das grandes citotoxinas clostridiais glicosilantes (LCGT, do inglês *large clostridial glucosylating toxin*) (VIDOR et al., 2015). Essas toxinas apresentam pelo menos quatro domínios funcionais para o desencadeamento de infecções (GTD - domínio glicosiltransferase; CPD - domínio autoprotease; DTL - domínio de translocação; CTD - domínio de ligação ao receptor) (JUST et al., 2000; JANK E AKTORIES, 2008). O CTD é composto por uma região de ligação ao receptor (B2) e pelos oligopeptídeos repetitivos combinados, conhecidos como CROPS (B1) (GENTH E JUST, 2015).

Para *P. sordellii*, a vacinação baseada na coadministração de TcsH e TcsL apresenta-se como a medida mais eficaz para prevenir infecções de cepas TcsH+/TcsL+ (AMIMOTO et al., 2001). No entanto, as vacinas atualmente produzidas enfrentam desafios, incluindo a sua baixa capacidade de estimular uma resposta imunológica robusta, os custos elevados associados à sua produção e as laboriosas etapas envolvidas no cultivo do patógeno e no processo de inativação (LOBATO et al., 2004, RILEY TV et al. 2019). Atualmente, vacinas recombinantes baseadas na expressão em *Escherichia coli* garantem produção segura de proteínas atóxicas recombinantes e com altos níveis de expressão (RODRIGUES et al., 2021). Ao considerar essa metodologia, o domínio CROPS e/ou fragmentos dessa região passaram a ser alvos de investigação entre as LCGTs devido à sua notável expressão em *E. coli* e ao potencial para a produção de imunizantes promissores (ARTIUSHIN, S. et al. 2013). No entanto, é importante destacar que esses componentes ainda não foram avaliados quanto à sua eficácia contra as toxinas de *P. sordellii*.

Neste contexto, o objetivo deste estudo se concentra na avaliação da expressão de protótipos de antígenos recombinantes oriundos das porções CROPS das toxinas letal e hemorrágica de *Paeniclostridium sordellii* em *Escherichia coli*. Essas proteínas recombinantes têm potencial aplicação biotecnológica como antígenos para futuras aplicações profiláticas.

2. METODOLOGIA

2.1 Clonagem e avaliação da expressão

Primeiramente, identificamos fragmentos do domínio CROPS de TcsH e TcsL com potencial para fins vacinais por meio de ferramentas de imunoinformática. A construção das moléculas recombinantes foi realizada utilizando o software Vector NTI 11 (Invitrogen), com a adição de enzimas de restrição flanqueando os genes de interesse para liberação e ligação no vetor pET28a.

As sequências de DNA codificantes (CDS) foram sintetizadas (Epoch, Life Science), clonadas e expressas conforme descrito por Rodrigues et al., (2021). Brevemente, para a obtenção dos genes codificantes de rTcsL, rTcsH e rQTcsHL, os clones alvos foram transformados por eletroporação em *E. coli* DH5 α e 100 μ l das células transformadas foram semeadas em meio Luria bertani (LB) ágar acrescido de 100 μ g/mL de canamicina (16 h, 37 °C).

A transformação por eletroporação foi realizada com 1 μ l (20-30 ng) de cada vetor recombinante. Uma única colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB com canamicina e incubada sob agitação orbital (16 h, 150 RPM, 37 °C) até atingir a densidade celular $DO_{600\text{ nm}} = 2,0$ para extração dos vetores transformados. O plasmídeo clonado foi extraído usando o kit IllustraplasmidPrep Mini Spin® da GE Healthcare e armazenado a -20 °C.

Para avaliação da expressão, os plasmídeos extraídos foram transformados em cepas de *E. coli* BL21 (DE3) por choque térmico. As culturas foram cultivadas por 1 h (37 °C, 150 rpm) em meio LB, seguido por transferência para 10 mL de LB suplementado com canamicina e cultivo *overnight*. No dia seguinte, 1 ml do volume foi novamente transferido para 10 mL de LB com antibiótico, cultivado (37 °C, 150 rpm) até atingir $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$ a 0,8 e a expressão das proteínas foi induzida com 0,5 mM de IPTG. Após 3 h de indução, a DO foi ajustada para 1. Uma alíquota do cultivo foi coletada, centrifugada e as amostras foram armazenadas sob refrigeração. O pellet foi suspenso em tampão de amostra 5x e submetido à fervura para análise de expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE e Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-His6x (Sigma, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao considerar a expressão de antígenos para vacinação, os genes de LCGTs podem ultrapassar mais de 9 quilobases e codificar produtos proteicos com mais de 300 kDa, como o caso de TcsH e a toxina A de *Clostridioides difficile* (TcdA) (ARTIUSHIN, S. et al. 2013). A construção de genes que codificam produtos proteicos desse tamanho pode ser desafiadora, resultando frequentemente em baixa expressão e fraca imunogenicidade quando usados em vacinas (GARDINER et al., 2009). Felizmente, os anticorpos neutralizantes estão mapeados para o domínio CROPS (ARTIUSHIN, S. et al. 2013), permitindo uma redução significativa no tamanho. No entanto, até o momento, essa abordagem ainda não tinha sido aplicada à avaliação e à construção de antígenos recombinantes de *P. sordellii* com o propósito de imunização. Neste estudo, os resultados obtidos culminaram na expressão de três construções com relevância imunológica.

As construções resultantes da expressão em *E. coli* são ilustradas nas Figuras 1-3. É notável que os níveis de expressão de proteína total foram detectáveis por SDS-

PAGE e Western blot para todas as construções avaliadas. Os níveis de proteína presentes após indução com IPTG foram elevados nas amostras de rTcsL (~ 26 kDa), rTcsH (~ 36 kDa) e rQTcsHL (~ 60 kDa) em comparação com o controle de *E. coli* BL21 (DE3) não transformada.

Em particular, o antígeno rQTcsHL, com sua alta expressão, destaca-se como uma abordagem prática e econômica para a formulação de vacinas. A fusão de antígenos pode resultar na geração de imunoproteção bivalente, reduzindo assim os custos e os processos demorados associados à produção de antígenos individuais (FERREIRA et al., 2016). Essa metodologia tem sido empregada na formulação de vacinas recombinantes contra toxinas de *C. difficile* (OLIVEIRA JUNIOR, 2015), fornecendo uma base sólida para futuras investigações voltadas para outros patógenos do mesmo gênero.

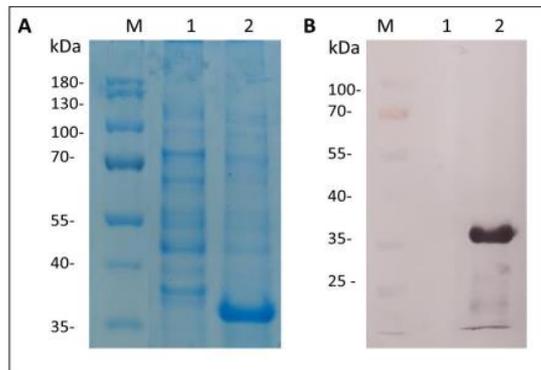


Figura 1: SDS-PAGE e Western blot da expressão de rTcsH. (A) SDS-PAGE e (B) Western blot do extrato total de células após expressão em *E. coli*. M - Marcador; 1 – *E. coli* BL21 (DE3) não transformada após indução com IPTG; 2 - *E. coli* BL21 (DE3) transformada após indução com IPTG. As bandas de aproximadamente 36 kDa correspondem ao antígeno rTcsH.

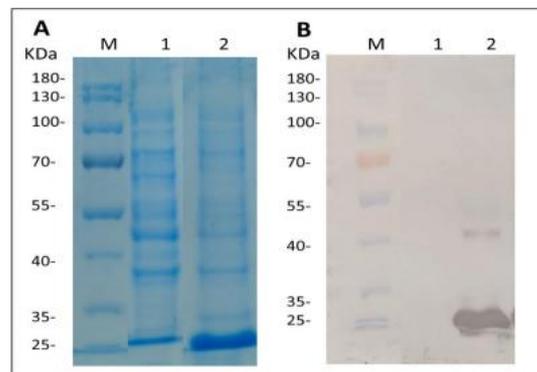


Figura 2: SDS-PAGE e Western blot da expressão de rTcsL. (A) SDS-PAGE e (B) Western blot do extrato total de células após expressão em *E. coli*. M - Marcador; 1 – *E. coli* BL21 (DE3) não transformada após indução com IPTG; 2 - *E. coli* BL21 (DE3) transformada após indução com IPTG. As bandas de aproximadamente 25 kDa correspondem ao antígeno rTcsL.

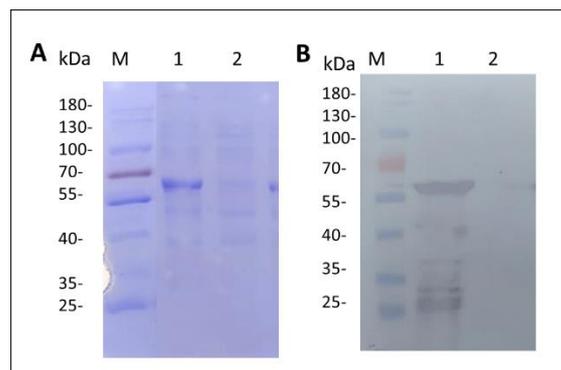


Figura 3: SDS-PAGE e *Western blot* da expressão de rQTcsHL. (A) SDS-PAGE e (B) *Western blot* do extrato total de células após expressão em *E. coli*. M - Marcador; 1 – *E. coli* BL21 (DE3) transformada após indução com IPTG; 2 - *E. coli* BL21 (DE3) não transformada após indução com IPTG. As bandas de aproximadamente 60 kDa correspondem ao antígeno rQTcsHL.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, desenvolvemos protótipos de antígenos vacinais baseados no CROPS de TcsH e TcsL. Estes apresentaram rendimento detectável pelas técnicas de caracterização aplicadas, demonstrando a eficácia de expressão em *E. coli*. Esses resultados fornecem informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias futuras na produção desses antígenos recombinantes como vacinas contra *P. sordellii*, potencialmente contribuindo para avanços na área de profilaxia e biotecnologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIMOTO, K. et al. Protective effects of *Clostridium sordellii* LT and HT toxoids against challenge with spores in guinea pigs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 8, p. 879-883, 2001.
- ARTIUSHIN, S. et al. Immunisation of mares with binding domains of toxins A and B of *Clostridium difficile* elicits serum and colostral antibodies that block toxin binding: Immunisation of mares with binding domains of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Equine veterinary journal**, v. 45, n. 4, p. 476–480, 2013.
- GENTH, Ha.; JUST, I.. Large clostridial glycosylating toxins modifying small GTPases. **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**, p. 441, 2015.
- JANK, T.; AKTORIES, K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 5, p. 222-229, 2008.
- JUST, I.; HOFMANN, F.; AKTORIES, K. Molecular mechanisms of action of the large Clostridial cytotoxins. In: Bacterial Protein Toxins. Springer, Berlin, **Heidelberg**. p. 307-331. 2000.
- LOBATO, F. C. F. et al. Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. **Ciência Rural**, v. 34, p. 439-442, 2004.
- POPOFF, M. R. *Clostridium difficile* and *Clostridium sordellii* toxins, proinflammatory versus anti-inflammatory response. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 149, p. 54–64, 2017.
- RILEY, T. V.; LYRAS, D.; DOUCE, G. R. Status of vaccine research and development for *Clostridium difficile*. **Vaccine**, v. 37, n. 50, p. 7300–7306, 2019.
- RODRIGUES, R. R. et al. Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant *Clostridium perfringens* beta toxin designed by bioinformatics tools. **Anaerobe**, v. 69, n. 102326, p. 102326, 2021.
- SASI JYOTHSA, T. S.; TUSHAR, L.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V. *Paraclostridium benzoelyticum* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment and reclassification of *Clostridium bifermentans* as *Paraclostridium bifermentans* comb. nov. Proposal of a new genus *Paeniclostridium* gen. nov. to accommodate *Clostridium sordellii* and *Clostridium ghonii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 1268–1274, 2016.
- VIDOR, C.; AWAD, M.; LYRAS, D. Antibiotic resistance, virulence factors and genetics of *Clostridium sordellii*. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 4, p. 368–374, 2015.

Tese/Dissertação/Monografia

OLIVEIRA JUNIOR, C.A. **Prevenção da infecção por *clostridium difficile* em hamsters utilizando uma estirpe não toxigênica**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.