

## AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE *PAENICLOSTRIDIUM SORDELLII* EM *ESCHERICHIA COLI*.

WELINGTON MATEUS PINTO DE MORAES<sup>1</sup>; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES<sup>2</sup>; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA<sup>3</sup>; MARTINA ALVES LEAL<sup>4</sup>; RAFAEL ÂNGELA NUNES MOREIRA<sup>5</sup>; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [obiotecnologista@hotmail.com](mailto:obiotecnologista@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rafaelr458@gmail.com](mailto:rafaelr458@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marcosferreiravet@gmail.com](mailto:marcosferreiravet@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [martinaalves0124@gmail.com](mailto:martinaalves0124@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [angelanmoreira@yahoo.com.br](mailto:angelanmoreira@yahoo.com.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fabricio.rochedo@ufpel.edu.br](mailto: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 $\alpha$  e 100  $\mu$ l das células transformadas foram semeadas em meio Luria bertani (LB) ágar acrescido de 100  $\mu$ g/mL de canamicina (16 h, 37 °C).

A transformação por eletroporação foi realizada com 1  $\mu$ 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).

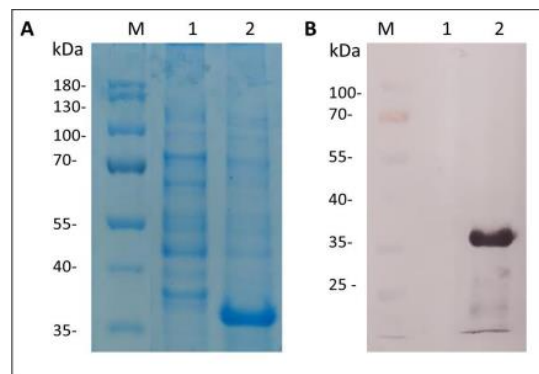
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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.

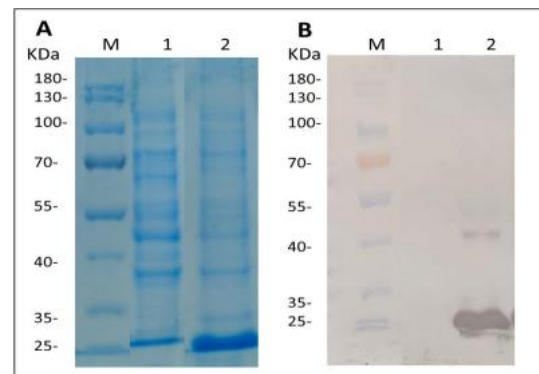
As construções resultantes da expressão em *E. coli* são ilustradas nas Figuras 1-3. É notável que os níveis de expressão de proteína total foram detectáveis por SDS-

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.

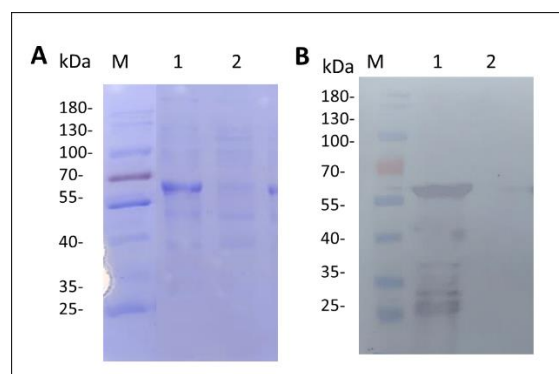
Em particular, o antígeno rQTcsHL, com sua alta expressão, destaca-se como uma abordagem prática e econômica para a formulação de vacinas. A fusão de antígenos pode resultar na geração de imunoproteção bivalente, reduzindo assim os custos e os processos demorados associados à produção de antígenos individuais (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.