

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

ALEX PEREIRA RODRIGUES¹; FERNANDA KEGLES²; ANDREA SILVA REZENDE; ALEXANDRE BRUM; SIBELE BORSUK³

¹Universidade Federal de Pelotas – alexbiotecnologia@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fkegles@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – andreabiomedica@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – alex.brum@bol.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – sibleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva, pleomórfica, intracelular e anaeróbica facultativa (D'AFONSECA et al., 2010), agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), uma doença que acomete ovinos e caprinos e eventualmente pode afetar animais de grande porte (como equinos e bovinos) e mais raramente os humanos. Devido as perdas econômicas acarretadas pela LC faz-se necessário o controle dessa doença através do desenvolvimento de vacinas eficazes, bem como de kits para diagnóstico (PINTO et al., 2014).

Vários estudos têm sido realizados em busca de alvos imunogênicos que possam ser utilizados para o desenvolvimento destes tipos de insumos. Várias proteínas foram identificadas a partir de uma análise *in silico* de secretoma e exoproteoma, em diferentes cepas, com o objetivo de avaliar as melhores candidatas para o desenvolvimento de vacinas contra a LC (SANTOS et al., 2012) como também, para testes de ELISA diagnóstico. A partir deste estudo, foram selecionadas as exoproteínas que apresentaram maior potencial de imunogenicidade.

Assim, este trabalho visa expressar e purificar proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* em *Escherichia coli*, para que posteriormente, as mesmas sejam utilizadas no desenvolvimento de testes diagnósticos e como vacinas de subunidade recombinantes.

2. METODOLOGIA

Para a expressão das proteínas se utilizou vetores previamente construídos (cedidos pelo professor Dr. Vasco Azevedo, da Universidade Federal de Minas Gerais) e transformados em cepa de expressão *E. coli* BL21 Star. O resultado da transformação foi crescido em 500 mL de meio LB/ampicilina em Herlenmeyer de 2 Litros por 6/8 horas, induzido com 500 µL de IPTG 1M ao final de 3 horas.

A purificação das proteínas foi realizada a partir da centrifugação do cultivo e ressuspensão em 50mL de PBS. As amostras foram lisadas quando agitadas com 50 µL lisozima por 30 min. e sonicadas 4 vezes por 15 s com intervalo de 5 s, repetidos por 3 vezes. Após centrifugação houve a ressuspensão do pellet em tampão contendo 8 M de uréia e solubilizadas sob agitação a 4 °C *overnight*. As amostras foram centrifugadas por 2 h a 11.000 rpm. em seguida o sobrenadante contendo as proteínas foi filtrado em filtro de

0,22 μM . Posteriormente, os filtrados foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™), carregada com níquel. A cromatografia se deu conforme os passos a seguir: 5 mL de água, 5 mL de tampão wash com uréia e a amostra. A partir de então foram realizadas eluições e coletados 3 mL de cada eluição, compostas de wash com ureia, eluente 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 100%, a fim de liberar a proteína pela competição com Imidazol contida nos tampões. As amostras contendo quantidades significativas de proteínas foram dialisadas em tampão tris-NaCl por 48 horas.

A detecção da expressão e pureza, das proteínas, foram observadas através de SDS-PAGE e por *Western Blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-6Xhistag (Sigma). Os produtos da diálise foram misturados ao tampão de amostra (100-mM Tris-HCl at pH= 6.8, 100 mM β -mercaptoetanol, 4 % SDS, 0,2 % azul de bromofenol, 20 % glicerol) sob condições redutoras e aquecidas a 100 °C durante 10 min e em seguida submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12 %. Então, as proteínas do gel foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare). A membrana foi bloqueada com leite em pó 5% diluído em PBS-1X, por 16 h a 4°C, depois lavada com PBS-T 1x por 3x. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-6Xhistag (Sigma) na diluição 1:4000 em PBS-T 1x, por 1h, lavada igualmente ao passo anterior, e envolvida por anti-mouse em PBS-T 1X, também na concentração 1:4000. Para a revelação do *Western blot*, utilizou-se uma solução contendo sulfato de níquel, Tris-HCL pH 7,6, 0,0012 mg de 3,3'-tetrahidrocloreto (DAB) e 50 μL de H_2O_2 .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* foram expressas em *E. coli* BL21 Star apresentando tamanho esperado de aproximadamente, CP40 40 KDa, HIPO 37 Kda, SEC 24Kda e SPLA 38Kda, como pode ser observado na figura 1. As proteínas apresentaram insolubilidade em água devido às formações de pontes dissulfetos o que mudam a conformação das moléculas e conferem essa característica de hidrofobicidade, mediante a isso, elas foram solubilizadas em uréia.

Alguns estudos foram realizados para a identificação de proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis* para que possam ser utilizadas no desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos. Dentre esses estão: testes com chaperoninas (HSP60-HSP10) para avaliação da resposta imune por vacina de DNA com hsp60 em camundongos (PINHO et al., 2009); Análises de diferentes exoproteomas para cepas de cabras e ovelhas (Silva et al., 2013); Desenvolvimento de ELISA para detecção de anticorpos específicos para *C. pseudotuberculosis* em ovelhas (REBOUÇAS et al., 2013).



Figura 1: Teste de expressão das proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* em eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%. (1): rCP40 40 KDa, (2): Proteína recombinante rCP_SPLA 38KDa purificada, (3): Proteína recombinante rCP_SEC 24 KDa purificada, (4): Proteína recombinante rCP_SPLA 38KDa purificada.

As proteínas foram caracterizadas mediante *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-6xHis. (Figura 2)

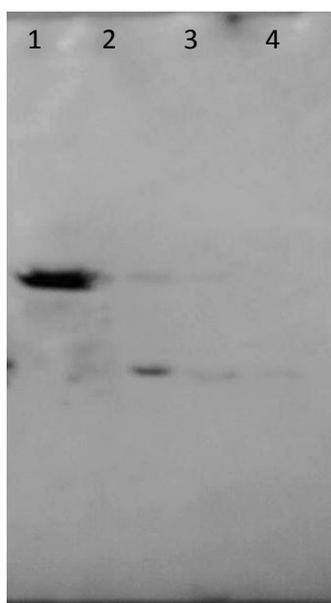


Figura 2: *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti- 6Xhis Tag (Sigma). (1): Controle com rCP40 (2): rCP_HIPO, (3): rCP_SEC, (4): rCP_SPLA.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstra que as proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* foram expressas em *E. coli* BL21 Star. Como perspectivas futuras essas proteínas poderão ser utilizadas tanto para desenvolvimento de testes de ELISA diagnóstico como para vacinas de subunidades recombinantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, 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.

PACHECO, L. G. C. et al. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Genomics**, v.11, p.12, 2011.

PINHO, J. M. R. et al. Immunization with Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, But Fails to Confer Protection Against Infection. **The Open Veterinary Science Journal**, v.3, p.22-27, 2009.

PINTO, A. C. et al. The core stimulon of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002 identified using ab initio methodologies. **Integr.Biol.(Camb.)**, v.4, n.7, p.789-794, 2012.

PINTO, Anne C. et al. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response of abiotic stresses. **BMC Genomics**, v.15, p. 14, 2014.

REBOUÇAS, M.F et al. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. **Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso)**, v.33, p.1296-1302, 2013.

SANTOS, A. R. Et al. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC.Genomics**, v.13 Suppl 5, p.S6, 2012.

SILVA, M. W. et al. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. **Microbial Pathogenesis**, v.61-62, p.37-42, 2013.

SILVA, W. M. et al. Differential exoproteome analysis of two *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis strains isolated from goat (1002) and shee (C231). **Current Microbiology (print)**, v.67, p. 460-465, 2013.