

## **AValiação DA EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DE TRÊS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DA TOXINA LETAL DE *Paeniclostridium sordellii***

**MARIANA BARROS DEUNER<sup>1</sup>; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES<sup>2</sup>; PEDRO HENRIQUE DALA NORA QUATRIN<sup>3</sup>; CRISTIAN HENRIQUE SOTT<sup>4</sup>; FLÁVIA ROCHA MEDEIROS<sup>5</sup>; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – marianabarros135@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – rafaelfr458@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – quatrinp@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – cristian.sott@ufpel.edu.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – rochamedeirosflavia@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – frabricio.rochedo@ufpel.edu.br

### **1. INTRODUÇÃO**

O gênero *Clostridium* compreende uma ampla diversidade de espécies bacterianas anaeróbias, muitas das quais são conhecidas por produzir toxinas potentes responsáveis por doenças graves em humanos e animais. Entre as espécies patogênicas, *Paeniclostridium sordellii* se destaca por afetar diversos animais, causando o agravamento rápido de doenças graves como a gangrena gasosa (LEWIS, et al., 2007; NYAOKE et al., 2020). A toxina letal (TcsL) e a toxina hemorrágica (TcsH) produzidas por essa espécie ligam-se nas células-alvo, destruindo-as ao invadir a célula hospedeira. Essas toxinas consistem em quatro domínios funcionais: o GTD, domínio de glicosiltransferase N-terminal; o CPD, domínio de protease de cisteína com a função de mediar a autoclivagem; o domínio DRBD, responsável pela entrega transmembrana e ligação ao receptor; e o domínio CROP, composto por oligopeptídeos repetitivos combinados (ZHOU et al., 2023).

As cepas de *P. sordellii* que produzem TcsL são mais frequentemente associadas a surtos em animais de campo do que aquelas que produzem TcsH (THIELE et al., 2013). TcsL é um alvo importante em vacinas comerciais, utilizadas para prevenir infecções causadas por *P. sordellii* (AMIMOTO et al., 2001; THIELE et al., 2013). No entanto, essas vacinas enfrentam limitações, como baixa imunogenicidade e processos complexos de cultivo de bactérias anaeróbicas, o que impulsiona a busca por alternativas de imunização (LOBATO et al., 2004; THIELE et al., 2013).

Entre as estratégias vacinais mais promissoras está o uso de domínios recombinantes de toxinas, que apresentam alta expressão em *Escherichia coli* e são capazes de induzir uma resposta imunológica eficaz (Rodrigues et al., 2021). Essas abordagens têm se mostrado promissoras no desenvolvimento de vacinas. A expressão de domínios isolados é mais simples que a de toxinas completas, que possuem alta massa molecular (ROSANO; CECCARELLI, 2014). No entanto, a solubilidade dessas proteínas recombinantes é um fator crítico, pois a insolubilidade pode afetar a formação de epítomos conformacionais essenciais para a resposta imunológica, comprometendo a eficácia da vacina (Rodrigues et al., 2021). Este estudo visa avaliar a solubilidade e a expressão de diferentes domínios da toxina TcsL, buscando otimizar a produção de uma vacina recombinante contra *Paeniclostridium sordellii*.

## 2. METODOLOGIA

Três domínios distintos da toxina TcsL de *P. sordellii* foram analisados e projetados utilizando ferramentas de bioinformática. Os domínios com maior relevância foram selecionados e denominados rD1, rD2 e rD3. Os domínios selecionados foram clonados em vetor pET28a e sintetizados pela *Epoch Life Science* (Texas, USA). A transformação e propagação do material genético foram realizadas em *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , conforme descrito por Green e Sambrook (2012).

A expressão foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 (DE3) SoluBL21 e as células foram transformadas seguindo a metodologia de choque térmico (Green e Sambrook, 2012). Após a transformação foi feito um pré-inóculo de 25 mL de caldo LB suplementado com 100  $\mu$ g/mL de canamicina e incubado em agitador orbital durante 16 horas, 37 °C sob agitação de 180 RPM. O pré-inóculo foi transferido para um volume final de 250 mL de LB igualmente suplementado com 100  $\mu$ g/mL de canamicina. Na fase de crescimento logarítmico ( $D.O_{600nm} = 0.6 - 0.8$ ) o cultivo foi induzido por 3 horas com a adição de 0,5 mM de IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside). Alíquotas de 1 mL foram retiradas dos cultivos para análise.

Após a expressão, os cultivos foram centrifugados (7.000 RPM, 5 minutos), e as células ressuspensas em 25 mL de tampão de lavagem (200 mM  $NaH_2PO_4$ , 0,5 M NaCl e 5 mM imidazol, pH 8,0), ao qual foi adicionada lisozima a 1  $\mu$ g/mL. Em seguida, a amostra foi incubada em agitador orbital por 1 hora a 37 °C e 180 RPM. Para complementar a etapa de lise celular, as amostras passaram por 6 ciclos de ultrassonicação de 15 segundos, com intervalos de 30 segundos entre os ciclos. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM, a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante (fração solúvel) foi armazenado, e o *pellet* (fração insolúvel) foi ressuspensado em 25 mL de tampão de lavagem contendo 8M de ureia, sendo incubado em leve agitação a 8 °C por 16 horas. As amostras foram novamente centrifugadas, e o sobrenadante contendo a ureia (corpo de inclusão) foi armazenado.

As amostras foram coletadas do cultivo antes e após a indução por IPTG, no sobrenadante do tampão de lise e no sobrenadante do tampão de ureia para caracterização pela técnica de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-His6x (Sigma, USA).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os domínios de interesse rD1(88 kDa), rD2 (122 kDa) e rD3(64 kDa) foram expressos nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 (DE3) SoluBL21<sup>TM</sup>, e suas expressões foram analisadas por meio de *Western blot* (Figura 1). Os resultados evidenciaram que os domínios rD1 e rD3 apresentaram desempenho superior em termos de nível de expressão e solubilidade em ambas as cepas de *E. coli*. A cepa SoluBL21<sup>TM</sup> destacou-se por melhorar significativamente a solubilidade geral dos domínios expressos. Em contraste, o domínio rD2 apresentou dificuldades de expressão na cepa BL21 (DE3), resultando em frações insolúveis, possivelmente devido ao seu maior peso molecular. No entanto, a cepa SoluBL21<sup>TM</sup> demonstrou uma melhora considerável na expressão e solubilidade de rD2.

A cepa de *E. coli* BL21(DE3) Solu é projetada para melhorar a expressão de proteínas solúveis. Essa cepa contém modificações genéticas que ajudam a superar problemas comuns de agregação de proteínas e corpos de inclusão, que

podem ocorrer frequentemente durante a produção de proteínas recombinantes de *E. coli*.

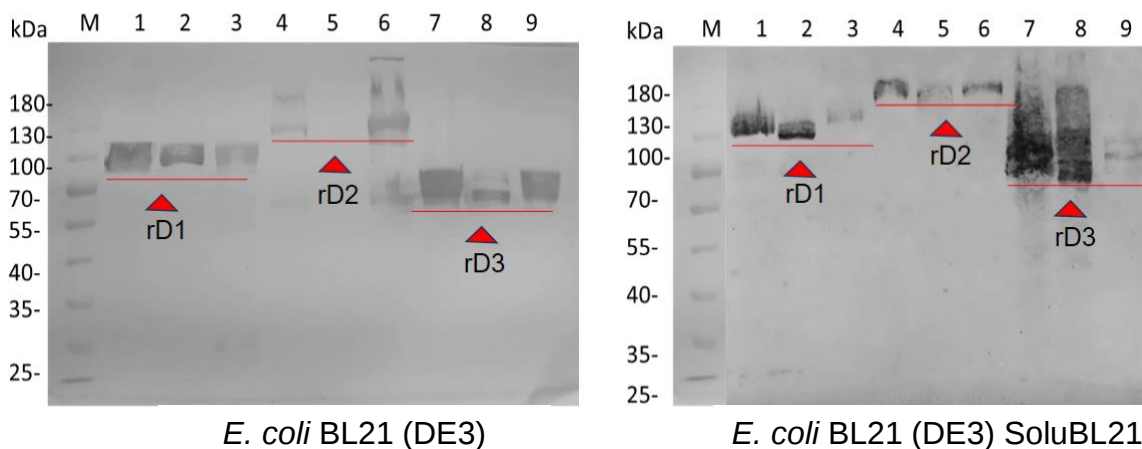


Figura 1. Caracterização da expressão e solubilidade de rD1, rD2 e rD3. *Western blot* do nível de expressão e frações de solubilidade após expressão em *E. coli*. (A) M - Marcador; 1 – *E. coli* BL21 (DE3) SoluBL21<sup>TM</sup> competente após indução de rD1 (88 kDa) com IPTG; 2- Fração sobrenadante da lise de rD1; 3 – Fração corpo de inclusão de rD1; 4 - *E. coli* BL21 (DE3) SoluBL21<sup>TM</sup> competente após indução de rD2 (122 kDa) com IPTG; 5 - Fração sobrenadante da lise de rD2; 6 – Fração corpo de inclusão de rD2; 7 - *E. coli* BL21 (DE3) SoluBL21<sup>TM</sup> competente após indução de rD3 (64 kDa) com IPTG; 8- Fração sobrenadante da lise de rD3; 9 – Fração corpo de inclusão de rD3. (B) M - Marcador; 1 – *E. coli* BL21 (DE3) SoluBL21<sup>TM</sup> competente após indução de rD1 (88 kDa) com IPTG; 2- Fração sobrenadante da lise de rD1; 3 – Fração corpo de inclusão de rD1; 4 - *E. coli* BL21 (DE3) após indução de rD2 (122 kDa) com IPTG; 5 - Fração sobrenadante da lise rD2; 6 – Fração corpo de inclusão rD2; 7 - *E. coli* BL21 (DE3) após indução de rD3 (64 kDa) com IPTG; 8- Fração sobrenadante da lise de rD3; 9 – Fração corpo de inclusão de rD3.

#### 4. CONCLUSÕES

Em conclusão, a expressão dos domínios rD1, rD2 e rD3 nas cepas de *E. coli* demonstrou bom desempenho em termos de expressão e solubilidade. A cepa SoluBL21<sup>TM</sup> proporcionou uma melhoria significativa na solubilidade de rD2, que foi insolúvel na cepa BL21 (DE3). Essas observações ressaltam a eficácia da cepa SoluBL21<sup>TM</sup> na otimização da produção de proteínas recombinantes. Esse avanço é especialmente relevante para a produção de vacinas, onde a solubilidade adequada dos antígenos é crucial para a qualidade e eficácia do imunógeno final.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIMAL, O. S. Artigos - Vacinação contra as clostridioses. Ourofinosaudeanimal.comOurofino Saúde Animal, , 8 May 2019. Disponível em: <<https://www.ourofinosaudeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/vacinacao-contra-clostridioses/>>. Acessoem: 8 oct. 2024

GEYER, M. et al. Glucosylation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin: consequences for effector loop conformations observed by NMR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 42, n. 41, p. 11951–11959, 2003.

GUSMÃO, A. **Ranking dos países com mais cabeças de gado; veja posição brasileira.** Disponível em: <<https://www.comprerural.com/ranking-dos-paises-com-mais-gado-veja-posicao-brasileira/>>. Acesso em: 9 oct. 2024.

LEE, H. et al. Recognition of semaphorin proteins by *P. sordellii* lethal toxin reveals principles of receptor specificity in clostridial toxins. **Cell**, v. 182, n. 2, p. 345–356.e16, 2020.

NYAOKE, A. C. et al. Paeniclostridium (*Clostridium*) *sordellii*-associated enterocolitis in 7 horses. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 32, n. 2, p. 239–245, 2020.

ORRELL, K. E.; MELNYK, R. A. Large clostridial toxins: Mechanisms and roles in disease. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 85, n. 3, 2021.

VARELA CHAVEZ, C. et al. The catalytic domains of *Clostridium sordellii* lethal toxin and related large clostridial glucosylating toxins specifically recognize the negatively charged phospholipids phosphatidylserine and phosphatidic acid: LCGT catalytic domains specifically bind to anionic phospholipids. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1477–1493, 2015a.

VARELA CHAVEZ, C. et al. The catalytic domains of *Clostridium sordellii* lethal toxin and related large clostridial glucosylating toxins specifically recognize the negatively charged phospholipids phosphatidylserine and phosphatidic acid. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1477–1493, 2015b.

ZHOU, Y. et al. Structural dynamics of the CROPs domain control stability and toxicity of *Paeniclostridium sordellii* lethal toxin. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 8426, 2023.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.