

EXPRESSÃO DE Ag85B de *Mycobacterium bovis* EM *Escherichia coli*

RIZZI, Caroline¹; LEAL, Karen¹; HARTLEBEN, Cláudia Pinho²; COSTA, Juliana Hartleben²; MONTE, Leonardo²; SEIXAS, Fabiana Kömmling¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular; ²Laboratório de Imunohistoquímica – Centro de Biotecnologia – Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
Universidade Federal de Pelotas
ccrizzi@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) bovina é uma grave patologia que permanece como um importante problema econômico na América Latina com conseqüências zoonóticas potenciais. Programas de erradicação diminuíram drasticamente a prevalência da doença em países desenvolvidos, mas somente estratégias efetivas de vacinação em animais apresentariam impacto nos países que possuem medidas sanitárias precárias (Thoen *et al.*, 2009). A vacina BCG, que é atualmente empregada com sucesso no controle da TB humana, é pouco eficaz contra a TB bovina (Vordermeier & Hewinson, 2006).

O seqüenciamento do genoma de *M. bovis*, agente etiológico da TB bovina, abriu a possibilidade de desenvolvimento de novas vacinas, ou o aperfeiçoamento da vacina existente (Garnier *et al.*, 2003). A proteína Ag85B de *M. bovis*, codificada pelo gene *fbpB*, é o antígeno imunodominante deste bacilo e promissor alvo para superexpressão em BCG (Horwitz, 2005). Nosso grupo de pesquisa está desenvolvendo uma vacina contra TB bovina empregando esta estratégia. Entretanto, para produção desta vacina, são necessárias quantidades significativas da proteína recombinante e anticorpos policlonais anti-Ag85B.

Ademais, o antígeno Ag85B associado a outros imunógenos é considerado como potencial ferramenta diagnóstica da TB em ensaio de ELISA (Kumar *et al.*, 2010). Já anticorpos anti-Ag85B apresentam alta sensibilidade e especificidade na detecção de micobactérias em testes comerciais (McNerney *et al.*, 2010).

Proteínas recombinantes podem ser produzidas em células hospedeiras derivadas de *E. coli* (DE3), as quais são compatíveis com o sistema de expressão empregando promotor *T7 lacO* e permitem altos níveis de expressão em curto espaço de tempo e a baixo custo. Além disso, este sistema de expressão permite a produção de proteínas fusionadas à cauda de histidina, a qual facilita a purificação e raramente afeta sua atividade biológica ou imunológica (Structural Genomics Consortium, 2008).

Desta maneira, descrevemos aqui a clonagem e expressão de Ag85B de *M. bovis*, bem como sua purificação e produção de anticorpos policlonais. Estes produtos auxiliarão a produção de linhagens BCG expressando Ag85B, além de possuírem potencial para o emprego em ensaios diagnósticos e produção de anticorpos monoclonais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A região interna gene *fbpB* (875 pb) foi amplificada por PCR e ligada ao vetor de expressão em *E. coli*, pAE. A ligação foi transformada por eletroporação em células competentes de *E. coli* TOP 10. O DNA plasmidial extraído das colônias recombinantes foi digerido com enzimas de restrição para confirmar a clonagem do gene *fbpB*.

O vetor recombinante obtido, pAE::*fbpB*, foi transformado por choque térmico em *E. coli* Star™ (DE3) e a expressão de Ag85B foi realizada cultivando-se as colônias recombinantes em meio LB na presença de 1 mM de IPTG. As células induzidas foram lisadas por sonicação e o padrão de expressão foi analisado em SDS-PAGE 15%. A proteína homogênea foi obtida através cromatografia de afinidade por níquel na presença de 6M de uréia, diálise para *refolding* e concentração através de ultrafiltração. Posteriormente, esta foi caracterizada através de *Western blot* com monoclonal anti-cauda de histidina e quantificada pelo método de BCA (BCA Protein Assay Kit® – Thermo Scientific).

Para a produção de anticorpos policlonais, três inoculações com intervalo de uma semana foram realizadas em três camundongos BALB/c, por via intraperitoneal. O inóculo continha 100 µg de Ag85B purificada, em adjuvante incompleto de Freund. A eficácia da imunização e o título do soro foram determinados através de ELISA indireto empregando os soros coletados nos dias 0 e 28 após a inoculação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A fração do gene *fbpB* foi amplificada por PCR somente na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) 7,5%. Genomas de micobactérias são ricos em GC e a presença de solventes orgânicos como o DMSO facilita a desnaturação do DNA e a extensão da DNA polimerase (Pomp & Medrano, 1991). A digestão com a enzima de restrição *XhoI* confirmou a clonagem do inserto em pAE. Quando o vetor recombinante foi transformado em *E. coli* Star™ (DE3), a Ag85B foi expressa na massa molecular esperada, mas na fração insolúvel (Figura 1).

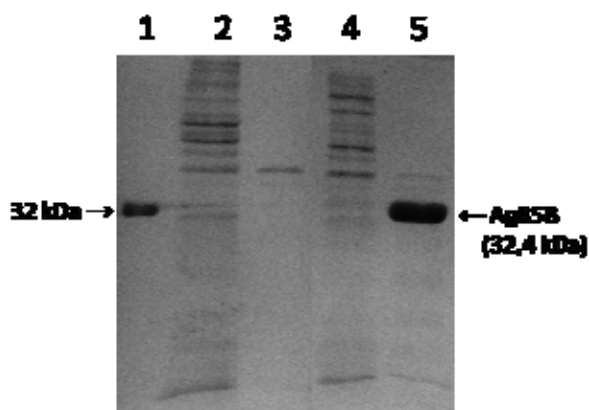


FIGURA 1: Expressão de Ag85B em *E. coli* Star™ (DE3). Coluna 1: Marcador de peso molecular (LipL 32; 32 kDa); Coluna 2 e 3: Frações solúvel e insolúvel, respectivamente, de Star™ (DE3) transformada com pAE (controle negativo); Colunas 4 e 5: frações solúvel e insolúvel, respectivamente, de Star™ (DE3) transformada com pAE::*fbpB*.

Desta maneira, a solubilização da proteína em tampão contendo uréia 6M permitiu a purificação da proteína. A diálise e a ultrafiltração favoreceram o *refolding* da proteína e a eliminação de contaminantes de baixo peso molecular. A

partir de um litro de cultura celular foram obtidos ~6 mg de Ag85B purificada, tendo sua identidade confirmada por *Western blot* (Figura 2).

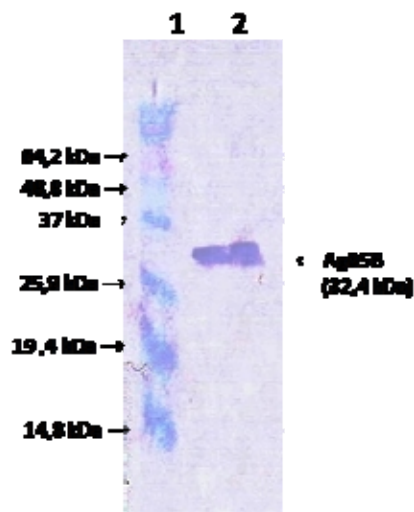


FIGURA 2: *Western Blot* empregando anticorpos anti-histidina, confirmando a identidade de Ag85B purificada. Coluna 1: marcador de peso molecular *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen); Coluna 2: Ag85B purificada.

Todos os animais inoculados apresentaram resposta imune humoral específica para Ag85B 28 dias após a primeira inoculação. A soroconversão e o valor do título dos anticorpos (51.200), detectados através de ELISA indireto, foram evidenciados utilizando-se como controle negativo o soro coletado anteriormente à inoculação (Figura 3).

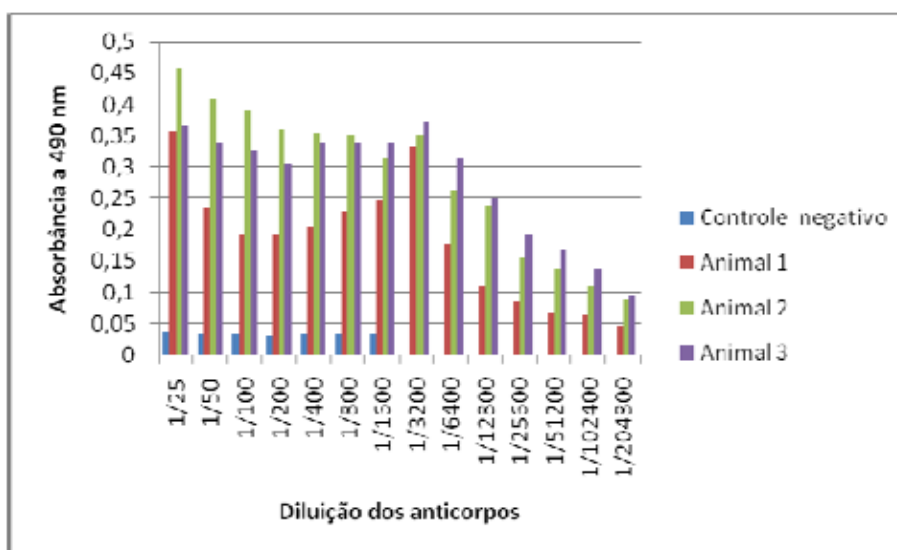


FIGURA 3: Reatividade dos anticorpos policlonais de camundongos Anti-Ag85B em ELISA indireto. Os soros dos animais inoculados com Ag85B foram avaliados quanto ao maior título capaz de reagir com a proteína recombinante (250 µg por cavidade). Controle negativo: *pool* dos soros dos animais pré-inoculação.

4 CONCLUSÕES

A clonagem do gene *fbpB* e expressão foi realizada com sucesso, sendo que a identidade da proteína purificada foi confirmada por *Western blot* e apresentou imunogenicidade em camundongos. Foram obtidos anticorpos

policlonais, os quais serão empregados para evidenciar a expressão de Ag85B em BCG recombinante. Os animais imunizados serão utilizados para a produção de anticorpos monoclonais anti-Ag85B.

5 REFERÊNCIAS

GARNIER, Thierry; EIGLMEIER, Karin; CAMUS, Jean-Christophe; MEDINA, Nadine; MANSOOR, Huma; PRYOR, Melinda; DUTHOY, Stephanie; GRONDIN, Sophie; LACROIX, Celine; MONSEMPE, Christel; SIMON, Sylvie; HARRIS, Barbara; ATKIN, Rebecca; DOGGETT, Jon; MAYES, Rebecca; KEATING, Lisa; WHEELER, Paul; PARKHILL, Julian; BARRELL, Bart G; COLE, Stewart T.; GORDON, Stephen V.; HEWINSON, Glyn. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100, 13, 7877-7882 (2003).

HORWITZ, Marcus A. Recombinant BCG expressing *Mycobacterium tuberculosis* major extracellular proteins. **Microbes and Infection**, 7, 947-954 (2005).

KUMAR, Gavish; DAGUR, Pradeep Kumar; SINGH, Prashant Kumar; SHANKAR, Hari; YADAV, Virendra S.; KATOCH, Vishwa M.; BAJAJ, Bharat; GUPTA, Rajesh; SENGUPTA, Utpal; JOSHI, Beenu. Serodiagnostic efficacy of *Mycobacterium tuberculosis* 30/32-kDa mycolyl transferase complex, ESAT-6, and CFP-10 in patients with active tuberculosis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 58, 57-65 (2010).

McNERNEY, Ruth; WONDAFRASH, Beyene A.; AMENA, Kebede; TESFAYE, Ato; McCASH, Elaine M.; MURRAY, Nicol J. Field test of a novel detection device for *Mycobacterium tuberculosis* antigen in cough. **BMC Infectious Diseases**, 10, 161-165 (2010).

POMP, D.; MEDRANO, J.F. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. **Biotechniques**, 10, 58-59 (1991).

STRUCTURAL GENOMICS CONSORTIUM. Protein production and purification. **Nature Methods**, 5, 2, 135-146 (2008).

THOEN, Charles O., LoBUE, Philip A.; ENARSON, Donald A.; KANEENE, John B.; KANTOR, Isabel N. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. **Veterinaria Italiana**, 45, 1 (2009).

VORDERMEIER, Martin; HEWINSON, Glyn. Development of cattle TB vaccines in the UK. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 112, 38-48 (2006).