



EPAMIG

## 31º Congresso Nacional de Laticínios

Instituto de Laticínios Cândido Tostes

18 a 20 de Julho de 2017 - Juiz de Fora - MG

**OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Escherichia coli* PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE DOMÍNIOS FUNCIONAIS DE ADESINAS DE *Staphylococcus aureus* PROVENIENTES DE MASTITE BOVINA**

Juliana Rosa da Silva<sup>(1)</sup>, João Batista Ribeiro<sup>(2)</sup>, Geraldo Márcio da Costa<sup>(1)</sup>,  
Gabryella Russi Ribeiro<sup>(2)</sup>, Antonio Marcos Saraiva<sup>(3)</sup>,  
Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária, Lavras, MG, Brasil, ju\_rosa\_silva@hotmail.com, gmcosta@dmv.ufla.br;

<sup>(2)</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil, gabryella.russi@hotmail.com, joao-batista.ribeiro@embrapa.br, maria.brito@embrapa.br;

<sup>(3)</sup> Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, amsaraiva@inmetro.gov.br

**Resumo**

Este trabalho teve como objetivo a construção de vetores e linhagens bacterianas recombinantes para a expressão heteróloga dos domínios funcionais de duas adesinas de *Staphylococcus aureus*: a região A da proteína ligante de colágeno (CNA) e a região A do fator de aglutinação A (ClfA). O plasmídeo pET-28a(+) (Novagen, USA) e as linhagens de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e BL21-Codon Plus (DE3) foram utilizados para construção dos vetores de expressão e linhagens recombinantes, respectivamente. A identidade e orientação dos insertos nos plasmídeos recombinantes foram confirmadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos para anelamento no vetor e no inserto. As duas linhagens recombinantes obtidas serão utilizadas para produzir, purificar e caracterizar físico-química e funcionalmente as regiões. A das proteínas ClfA e CNA de *S. aureus* visando sua aplicação tecnológica para a profilaxia e controle da mastite bovina.

**Palavras-chave:** Mastite bovina; fator de aglutinação A; proteína ligante de colágeno

**Introdução**

*Staphylococcus aureus* é um agente contagioso da mastite bovina, presente na maioria dos rebanhos brasileiros (BRITO et al., 1999). Componentes proteicos da superfície bacteriana têm papel importante no estabelecimento das infecções por esse patógeno e têm sido objeto de estudos relacionados à imunoproteção (PEREIRA et al., 2011). Estudos sobre a frequência e expressão de genes que codificam adesinas em *S. aureus* isolados de mastite bovina de rebanhos brasileiros têm apontado a importância da investigação destes fatores de virulência como

alternativas para a produção de imunógenos que poderão ser utilizados na profilaxia da mastite, considerando a importância dessas proteínas na adesão bacteriana, primeira etapa da patogênese (KLEIN et al., 2012).

O fator de aglutinação A (ClfA) é uma adesina que medeia a ligação de *S. aureus* ao fibrinogênio na superfície da célula hospedeira e promove a invasão bacteriana nos tecidos, enquanto a proteína ligante de colágeno (CNA) auxilia na ligação do patógeno ao colágeno presente na matriz tecidual do hospedeiro (MCDEVITT et al., 1994; PATTI et al., 1992). Foi observada elevada frequência dos genes *clfA* (82,76%) e *cna* (94,2%) em uma população de *S. aureus* (n = 157 linhagens) isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos das regiões sudeste, sul e norte do Brasil (dados não publicados).

O objetivo deste trabalho foi construir vetores e linhagens bacterianas para a expressão heteróloga dos domínios de ligação da proteína de ligação ao colágeno (r-CNA) e do fator de aglutinação A (r-ClfA) de *S. aureus* visando ao desenvolvimento de imunógenos para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite.

## **Material e Métodos**

Microrganismos e plasmídeos: Para amplificação das regiões codificadoras dos genes *cna* e *clfA* foram utilizadas, respectivamente, as linhagens CI287 e CT22, previamente isoladas de amostras de leite bovino e conservadas na Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária (CMIAP) da Embrapa sediada na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG. Os fragmentos dos genes supracitados foram clonados no vetor pET-28a(+) Novagen<sup>®</sup> sendo as linhagens de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e BL21-Codon Plus (DE3) (Agilent Technologies, USA) utilizadas para selecionar os plasmídeos contendo os insertos gênicos e para a construção de linhagens recombinantes para expressão proteica, respectivamente. As linhagens de *S. aureus* foram cultivadas em meio de cultura ágar BHI e as de *E. coli* em meio *Luria Bertani* (LB). Todos os microrganismos foram preservados a -80°C em meio de cultura apropriado, contendo 10 % de glicerol.

Construção dos vetores de expressão: Fragmentos dos genes *CNA* (1590pb) e *clfA* (1034pb) correspondentes à região codificadora dos domínios funcionais das

respectivas adesinas foram amplificados por PCR utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade (GoTaq DNA Polymerase - Promega<sup>®</sup>), os oligonucleotídeos CnaF (5'-ATATGAATTCGAGTATAAGGAAGGGGTT-3'), CnaR (5'-TTTGGATCCGTTTTTCAGTATTAGTAACCA-3'), ClfAF (5'-TATGGATCCGTAGCTGCAGATGCACC-3') e ClfAR (5'-CGCGTCGACCTCTGGAATTGGTTCAATTTC-3') e DNA molde das linhagens doadoras dos genes de interesse. Os fragmentos de DNA foram purificados com emprego do kit Purelink<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Invitrogen<sup>®</sup>) e inseridos no vetor pET-28a(+) utilizando T4 DNA Ligase (Promega<sup>®</sup>) conforme previamente descrito (GONG et al., 2010; PATTI; BOLES; HOOK, 1993).

Confirmação da clonagem dos genes *cna* e *clfA*: A confirmação da identidade e orientação dos insertos no vetor pET-28a(+) foi realizada por PCR utilizando os iniciadores Pt7R (TTAATACGACTCACTATAGG) e Tt7R (GCTAGTTATTGCTCAGCGG) que se anelam no vetor e os iniciadores supracitados que se anelam nos insertos.

Construção das linhagens recombinantes: Após amplificação dos plasmídeos recombinantes em *E. coli* DH5 $\alpha$  crescida na presença de canamicina, os mesmos foram extraídos e purificados utilizando o kit Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Maxi (Qiagen) e inseridos em *E. Coli* BL21-Codon Plus (DE3) ultracompetentes por transformação química.

## Resultados e Discussão

Foram construídos dois vetores recombinantes, designados pET28a(+)-*cna* e pET28a(+)-*clfA*, contendo os segmentos gênicos para expressão dos domínios de ligação da proteína de ligação ao colágeno (r-CNA) e do fator de aglutinação A (r-ClfA) de *S. aureus*, respectivamente (Figura 1). A correta inserção e orientação dos fragmentos dos genes *cna* e *clfA* nos vetores foi confirmada por meio de ampliações específicas de fragmentos de DNA de tamanhos compatíveis com os esperados. Esses vetores foram inseridos em *E. coli* BL21 gerando duas linhagens recombinantes (BL21-cp-*cna*-*Saureus* e BL21-cp-*clfA*-*Saureus*). A expressão e a purificação das proteínas recombinantes são os próximos passos para sua caracterização físico-química e funcional.

A complexidade e a variação dos fatores de virulência *S. aureus* e o conhecimento limitado de respostas imunitárias adaptativas da glândula mamária têm sido um empecilho para formulações de vacinas bem sucedidas contra a mastite (AITKEN; CORL; SORDILLO, 2011). A imunização com adesinas leva à produção de anticorpos específicos que impedem a infecção pela inibição da ligação bacteriana e colonização, bem como o aumento da opsonofagocitose bacteriana. As proteínas recombinantes das adesinas CNA e ClfA já foram usadas em tentativas de produção de vacinas contra *S. aureus* e se mostraram promissoras (NILSSON et al., 1998; GONG et al., 2010).

O desenvolvimento de um imunógeno eficaz para a mastite bovina causada por *S. aureus* poderá reduzir o uso de antimicrobianos gerando grande impacto econômico e ambiental. Além disso, contribui para o aumento da produção e melhoria da qualidade do leite, impactando na qualidade de vida do produtor rural.

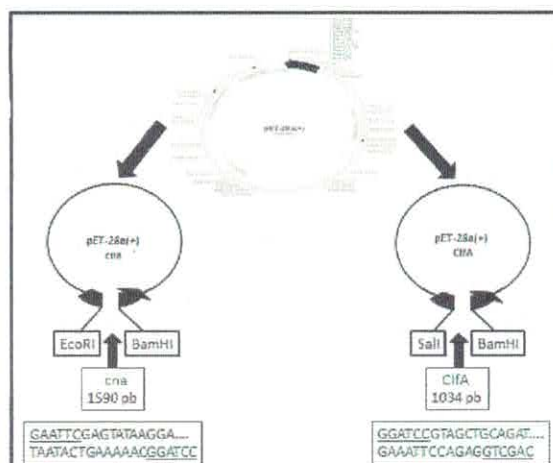


Figura 1. Representação esquemática da construção dos vetores recombinantes para a expressão das proteínas CNA e ClfA de *S. aureus* em *E. coli*.

## Conclusões

As linhagens BL21-cp-cna-*Saureus* e BL21-cp-clfA-*S.aureus* contendo os vetores pET28a(+)-cna e pET28a(+)-clfA permitirão a expressão, purificação e caracterização físico-química e funcional dos domínios de ligação das proteínas ClfA e CNA, ligantes de fibrinogênio e colágeno, respectivamente, presentes na superfície de *S. aureus*, permitindo a caracterização dessas e posteriormente, o

desenvolvimento de ferramentas inovadoras para a profilaxia e controle da mastite bovina.

### Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Embrapa (Projeto 02.13.14.001.00.04.01), pela FAPEMIG (Processo CVZ-PPM-00406-14) e pelo CNPq (processo 403098/2013-0). Juliana Rosa da Silva recebe bolsa de doutorado da CAPES (Edital Capes/Embrapa nº 015/2014).

### Referências

AITKEN, S.L.; CORL, C.M.; SORDILLO, L.M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, London, v. 16, p. 291-304, 2011.

BRITO, M.A.V.P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

GONG, R. et al. Evaluation of Clumping Factor A Binding Region A in Subunit Vaccine against *Staphylococcus aureus* Induced Mastitis in Mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, n. 11, p. 1746-1752, 2010.

KLEIN, R. C. et al. *Staphylococcus aureus* bovine origin: Genetic diversity, prevalence and expression of adhesion-encoding genes, **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 160, p. 183-188, 2012.

MCDEVITT, D. et al. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 11, n. 2, p. 237-248, 1994.

NILSSON, I. et al. Vaccination with a Recombinant Fragment of Collagen Adhesin Provides Protection against *Staphylococcus Aureus*-mediated Septic Death, **Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 101, n.12, p. 2640-2649, 1998.

PATTI, J. M.; BOLES, J. O.; HOOK, M. Identification and Biochemical Characterization of the Ligand Binding Domain of the Collagen Adhesin from *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, Washington, v. 32, p. 11428-11435, 1993.

PATTI, J. M. et al. Molecular Characterization and Expression of a Gene Encoding a *Staphylococcus aureus* Collagen Adhesin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 7, p. 4766-4772, 1992.

PEREIRA, U.P. et al. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 148, p. 117-124, 2011.