

Clonagem e Expressão do Gene *virB9*, Proteína do Sistema de Secreção Tipo IV, de *Brucella abortus*

Carina Elisei¹
Lenita Ramires dos Santos²
Renata Bastos³
Thaís Andrade Farias⁴
Carlos Alberto do Nascimento Ramos⁵
Cleber Oliveira Soares⁶
Flábio Ribeiro Araújo⁷
Grácia Maria Soares Rosinha⁸

Introdução

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas do gênero *Brucella*, que infectam os animais domésticos, silvestres e os seres humanos. É uma enfermidade adquirida, principalmente, por meio do contato com animais infectados ou por consumo de leite e seus derivados contaminados (NICOLETTI, 1969). Em humanos, a doença caracteriza-se por febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas, enquanto nos animais domésticos e silvestres, os órgãos reprodutivos são os mais afetados, causando aborto e infertilidade (YOUNG, 1983; YOUNG, 1988).

Essa doença é responsável por grandes problemas sanitários e econômicos, particularmente nos trópi-

cos e em países com pouco investimento nas áreas de produção de leite e carne, onde a sua incidência é alta (POESTER, 2002). As grandes perdas econômicas relacionadas à cadeia da bovinocultura são: (a) os prejuízos ocasionados em consequência dos distúrbios reprodutivos, e (b) os animais reagentes aos testes de diagnósticos devem ser eliminados e considerados impróprios para consumo (BRASIL, 2006).

As espécies de *Brucella* apresentam características peculiares de resistência ao hospedeiro, induzindo infecções crônicas e persistentes, sobrevivendo e se multiplicando dentro de células fagocíticas (OLIVEIRA et al., 2002; SEXTON ; VOGEL, 2002). Essas habilidades são determinadas pelos fatores de virulência associados a essa bactéria. Segundo Delrue et al. (2004), os fatores de virulência são os

¹ Bióloga, Ph.D., Bolsista DTI CNPq, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, elisei@cnpq.embrapa.br

² Bióloga, Ph.D., Bolsista DCR CNPq/Fundect, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, lenitasantos@hotmail.com

³ Bióloga, Estudante de Pós-Graduação em Ciência Animal/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Bolsista, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, renatabastos@gmail.com

⁴ Bióloga, M.Sc., Bolsista, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, thaisfarias@yahoo.com.br

⁵ Médico Veterinário, M.Sc., Estudante de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, carlosanramos@yahoo.com.br

⁶ Médico Veterinário, Ph.D., pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, cleber@cnpq.embrapa.br

⁷ Médico Veterinário, Ph.D., pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, flabio@cnpq.embrapa.br

⁸ Engenheira Agrônoma, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, rosinha@cnpq.embrapa.br

envoltórios moleculares (lipopolissacarídeos - LPS, proteínas da membrana externa - OMP e peptideo-glicanos) e os sistemas de transporte ou secreção (tipo IV, transportadores e flagelos).

Envolvidas no processo de replicação intracelular, as proteínas VirB são consideradas um fator de virulência em *Brucella* spp., e fazem parte do sistema de secreção tipo IV, com o LPS, que é o principal fator de virulência até hoje descrito (LAPAQUE et al., 2005; CARDOSO et al., 2006). O sistema de secreção tipo IV está relacionado evolucionária e funcionalmente ao sistema de transferência de DNA por conjugação e ao sistema de secreção de fatores ligados à virulência (FOULONGNE et al., 2000; CHRISTIE, 2001). Esse tipo de sistema foi identificado em *Brucella* spp. e está sendo investigado com muito interesse, pois apresenta um relevante papel no transporte de fatores de virulência e na capacidade de sobrevivência e multiplicação intracelular (BARON et al., 2002; MORENO ; MORIYÓN, 2002).

Além de ser essencial para a sobrevivência intracelular, o operon *virB* constituiu o principal determinante de virulência ao ser testado em modelos de infecção de macrófagos humanos e em camundongos (ROUOT et al., 2003). Proteínas VirB de outras bactérias e riquetsias (*Ehrlichia canis*, *Anaplasma marginale* e *Anaplasma phagocytophilum*) apresentaram-se altamente imunogênicas e antigênicas (ROLÁN et al., 2008).

As VirB9, proteínas componentes de membrana das bactérias gram-negativas e riquetsias são proteínas homólogas com aproximadamente 300 resíduos apresentando nível moderado de sequências conservadas que compõem o sistema de secreção tipo IV. A proteína VirB9 com a VirB7 forma uma estrutura heterodímera responsável pela estabilização das outras proteínas VirB, formando canais que conectam a membrana externa com a interna (YEO ; WAKSMAN, 2004).

Neste estudo objetivou-se a expressão do gene *virB9* de *B. abortus* com a finalidade de produzir a proteína recombinante por este codificada, para avaliações futuras, como: potencial antígeno em ensaios de imunização e diagnóstico da brucelose.

Metodologia

A cepa S2308 de *B. abortus* foi utilizada para

extração de DNA genômico, utilizando a metodologia descrita por Rosinha (2002). Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram desenhados primers a partir da sequência ortóloga depositada no *GenBank*, com o número de acesso AF226278, utilizando o programa *DNAStar*.

A sequência amplificada do gene *virB9* foi inserida no vetor pGEM-T easy (Promega) por meio de uma reação de ligação, a qual foi utilizada na transformação por choque térmico de *Escherichia coli* linhagem DH5 α (Promega), competentes por tratamento com CaCl₂. O plasmídeo recombinante obtido denominado pGEM-*virB9*, foi digerido com as enzimas *Bam* HI e *Sal* I, para liberação do gene, de acordo com as recomendações do fabricante.

O fragmento liberado na digestão foi purificado e subclonado em plasmídeos de expressão pET47b (Novagen) previamente digerido com as enzimas supracitadas. A construção obtida *pET-virB9* foi utilizada para transformar células de *E. coli* linhagem Rosetta. O produto da transformação foi selecionado em meio Luria-Bertani (LB) ágar com 25 µg/mL de canamicina e 36 µg/mL de cloranfenicol e a certificação da clonagem foi confirmada por PCR de colônia.

A expressão do gene foi realizada após cultivo de uma colônia transformada em caldo LB canamicina/ cloranfenicol e com a adição de 1 mM de isopropil-β-galactosídeo (IPTG) para indução da expressão. A cinética de expressão foi avaliada após 1, 2, 3 e 4 horas de indução com IPTG por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12%.

A purificação da proteína recombinante VirB9 (rVirB9) foi realizada por eletroeluição. Após a separação eletroforética, o gel foi tratado com 100 mM de cloreto de potássio para visualização das bandas proteicas. A banda correspondente à rVirB9 foi cortada do gel e submetida à eletroeluição contra tampão Laemmli.

Para avaliação da pureza e concentração da rVirB9 obtida, esta foi analisada em gel de SDS-PAGE a 12%, utilizado como amostra padrão albumina de soro animal (BSA) em concentração conhecida, seguida de coloração com azul de Coomassie. As imagens dos géis foram capturadas por fotodocumentador (LabImage® 1D 2006 Professional) e analisadas.

A expressão do gene *virB9* foi confirmada por

SDS-PAGE e pela técnica de *Western blot*. A rVirB9 purificada foi submetida em gel SDS-PAGE a 12% e transferida para membranas de nitrocelulose. Estas foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-6x-histidina (Amersham), que reconhece uma porção de seis histidinas fusionadas à rVirB9 (essa histidina é codificada por uma sequência do vetor de expressão), diluído a 1:3.000, e com soros de camundongo inoculados experimentalmente com rVirB9 e soros de camundongo livres de patógenos, ambos os soros diluídos 1:500 em tampão fosfato salino (PBS).

Resultados e Discussão

O fragmento gênico correspondente à região codificante do gene *virB9*, amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *B. abortus* cepa S2308, apresentou, aproximadamente, 870 pb, que compreende a sequência completa do gene *virB9* (Figura 1).

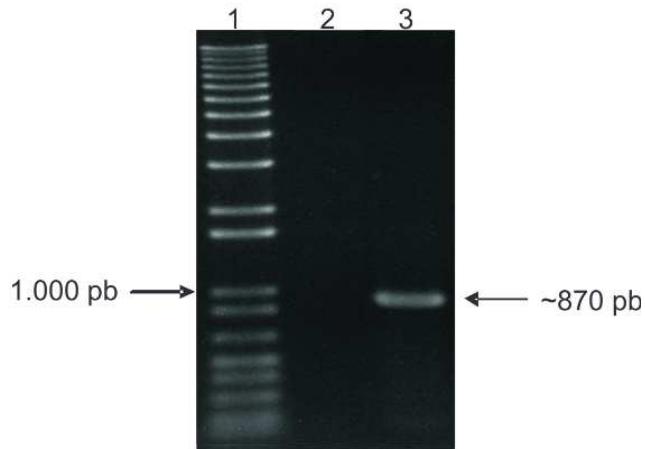


Figura 1. Análise do produto da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), da sequência completa do gene *virB9*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando na canaleta 3 o produto da amplificação do gene *virB9*. A canaleta 2 corresponde ao controle negativo da PCR, onde não foi adicionado DNA. A canaleta 1 mostra o perfil eletroforético do padrão de pares de bases 1 kb DNA Plus (Invitrogen).

A análise da expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida revelou uma banda de proteína de aproximadamente 30 kDa, específica para o gene *virB9* (Figura 2), sendo esse valor de massa molecular compatível com a esperada pela tradução *in silico* do gene no programa *Edit Sequence (DNAStar)*. A avaliação da cinética de expressão demonstrou que não houve diferença na intensidade da banda correspondente à *virB9* em relação à coleta de 1 hora e as demais, após a indução com IPTG (dados não mostrados).

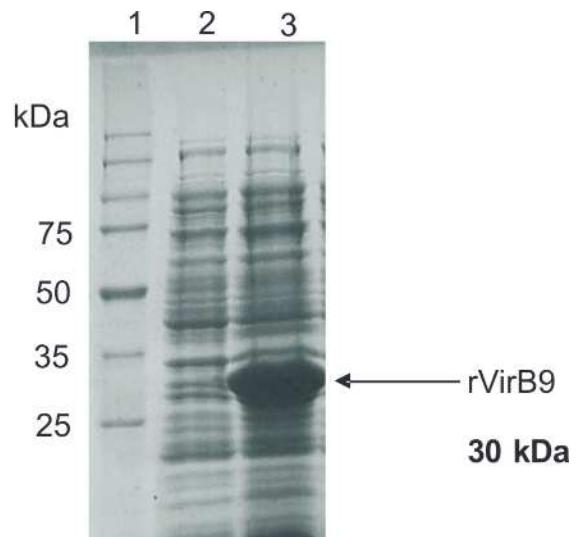


Figura 2. Indução da proteína do gene *virB9* em *Escherichia coli* Rosetta. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) corado com azul de Coomassie, mostrando a expressão da proteína VirB9. Na canaleta 2 observa-se o perfil das proteínas de *E. coli* antes da indução com isopropil- β -galactosídeo (IPTG) e na canaleta 3, expressão da proteína rVirB9, quatro horas após a indução com IPTG. Na canaleta 1 observa-se o padrão de peso molecular [Broad Range Protein Molecular], Promega, V491.

A massa molecular da proteína VirB9 de *B. abortus* obtida neste estudo foi semelhante às massas moleculares de VirB9 de *E. canis* e de *A. marginale* que apresentaram uma banda de aproximadamente 33 KDa (FELEK et al., 2003) e 29 KDa (ARAÚJO et al., 2008), respectivamente.

O resultado da quantificação da proteína analisada no programa (LabImage®) foi de 2,46 mg/mL.

A purificação da VirB9 por eletroeluição resultou na obtenção de uma banda proteica única, a qual foi analisada quanto a sua reatividade, pela técnica de *Western blotting*. Essa proteína reagiu com o anticorpo monoclonal anti-histidina e também com o anticorpo IgG específico contra VirB9 (Ac α -VirB9) de *B. abortus*, induzidos em camundongos injetados com VirB9, mostrando a capacidade imunogênica dessa proteína (Figura 3). Embora tenham sido utilizados agentes desnaturantes proteicos, como ureia em altas molaridades, o protocolo de purificação, aparentemente, não alterou, de maneira significativa, a estrutura terciária da proteína, que se manteve抗原性的.

Estudo realizado com VirB9 recombinante de *E. canis* mostrou que essa proteína é expressa durante

a infecção natural e experimental desse patógeno em cães, sendo essa proteína altamente imunogênica (FELEK et al., 2003). Nesse mesmo estudo foi possível verificar que a proteína VirB9 de *E. canis* se manteve conservada entre os diferentes isolados geográficos obtidos.

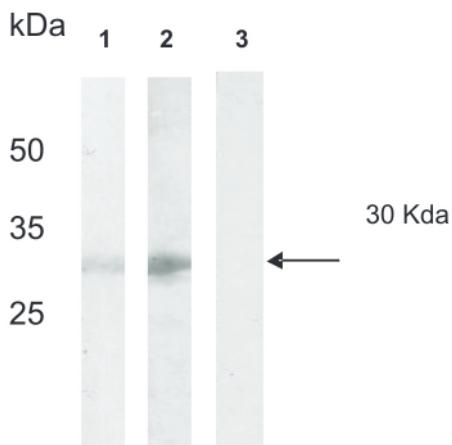


Figura 3. Análise por meio de *immunoblotting* da proteína recombinante VirB9 de *Brucella abortus*. Observa-se o resultado do *immunoblotting* mostrando o reconhecimento da proteína rVirB9 (canaleta 1) pelo soro de camundongo anti-histidina e pelo soro de camundongos inoculados experimentalmente pelo VirB9 (canaleta 2). Na canaleta 3 utilizou soro de camundongos livre de patógeno como controle negativo. Os números à esquerda correspondem ao padrão de peso molecular [Broad Range Protein Molecular], Promega, V491.

Para o desenvolvimento de uma vacina, o ideal é que os epitopos antigênicos sejam conservados para que ocorra uma proteção contra todos os isolados (DE GROOT et al., 2001; FELEK et al., 2003).

A produção da rVirB9, originada da cepa S2308 de *B. abortus*, permitiu a obtenção do antígeno purificado, o qual manteve suas propriedades imunogênicas e antigênicas. Desta forma, esse antígeno pode ser empregado no incremento de métodos sorológicos para o diagnóstico da brucelose em bovinos e humanos, e em estudos de desenvolvimento de novas vacinas contra *B. abortus*.

Referências

- ARAÚJO, F.R.; COSTA, C. M.; RAMOS, C. A. N.; FARIAS, T. A.; SOUZA, I. I. F. de; MELO, E. S. P.; ELISEI, C.; ROSINHA, G. M. S.; SOARES, C. O.; FRAGOSO, S. P.; FONSECA, A. H. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 186-190, Mar. 2008.
- BARON, C.; O'CALLAGHAN, D.; LANKA, E. Bacterial secrets of secretion: euro conference on the biology of type IV secretion processes. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1359-1365, Mar. 2002. Issue 5.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, DF: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. Organizadores: Vera Cecilia Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves.
- CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 13, p. 1-11, Mar. 2006.
- CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. **Molecular Microbiology**, v. 40, p. 294-305, Apr. 2001. Issue 2.
- DE GROOT, A. S.; BROSMA, A.; CHINAI, N.; FROST, J.; JESDALE, B. M.; GONZALEZ, M. A.; MARTIN, W.; SAINT-AUBIN, C. From genome to vaccine: *in silico* predictions, ex vivo verifications. **Vaccine**, v. 19, p. 4385-4395, Aug. 2001. Issue 31.
- DELRIEU, R-M.; LESTRATE, P.; TIBOR, A.; LETESSON, J-J.; BOLLE, X. DE. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. **Microbiology Letters**, v. 231, p. 1-12, Feb. 2004. Issue 1.
- FELEK, S.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Sequence and expression analysis of *virB9* of the Type IV secretion system of *Ehrlichia canis* strains in ticks, dogs, and cultured cells. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6063-6067, Oct. 2003. Issue 10.
- FOULONGNE, V.; BOURG, G.; CAZEVIEILLE, C.; MICHAUX-CHARACHON, S.; O'CALLAGHAN, D. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an *in vitro* human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1297-1303, Mar. 2000. Issue 3.
- LAPAUQUE, N.; MORYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as virulence factor. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 60-66, Feb. 2005. Issue 1.

MORENO, E.; MORIYON, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 1, p. 1-3, Jan. 2002.

NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, p. 1811-1816, 1969.

OLIVEIRA, S.C.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 417-424, Dec. 2002. Issues 1-4.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, U. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55-62, Dec. 2002. Issues 1-4.

ROLÁN, H. G.; HARTIGH, A. B. DEN.; KAHL-MCDONAGH, M.; FICHT, T.; ADAMS, L. G.; TSOLIS, R. M. VirB12 is a serological marker of *Brucella* infection in experimental and natural hosts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p. 208-214, Feb. 2008. Issue 2.

ROSINHA, G. M. S. Isolamento, identificação e avaliação do envolvimento dos genes *gap*, *pgk*, *tkt*, *vacB* e *exsA* da *Brucella abortus* na patogênese molecular e imunoproteção. 2002. 226 f.

Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

ROUOT, B.; ALVAREZ-MARTINEZ, M. T. MARIUS, C.; MENANTEAU, P.; GUILLOTEAU, L.; BOIGEGRAIN, R. A.; ZUMBIHL, R.; O'CALLAGHAN, D.; DOMKE, N.; BARON, C. Production of the type IV system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1075-1082, Mar. 2003. Issue 3.

SEXTON, J.; VOGEL, J. P. Type IVB-secretion by intracellular pathogens. **Traffic**, v. 3, n. 3, p. 178-185, Mar. 2002.

YEO, H. J.; WAKSMAN, G. Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 1919-1926, Apr. 2004. Issue 7.

YOUNG, E. J. Human brucellosis. **Reviews of infectious diseases**, v. 5, n. 5, p. 821-842, Sept.-Oct. 1983.

YOUNG, E. J. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. Supplementum**, v. 3, p. 17-20, 1988.

CGPE 8266

Comunicado Técnico, 115 Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
Endereço: Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368-2083
Fax: (67) 3368-2083
E-mail: publicacoes@cnpq.embrapa.br

1ª edição
Versão online (2009)

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações Presidente: Cleber Oliveira Soares
Secretário-Executivo: Grácia Maria S. Rosinha
Membros: Fabiane Siqueira, Ecila Carolina N. Z. Lima, Elane de Souza Salles, Grácia Maria S. Rosinha, Jaqueline Rosemeire Verzignassi, Lucimara Chiari, Paulo Henrique Nogueira Biscola, Roberto Giolo de Almeida, Rodrigo Amorim Barbosa

Expediente Supervisão editorial: Ecila Carolina N. Zampieri Lima
Revisão de texto: Lúcia Helena Paula do Canto
Editoração eletrônica: Ecila Carolina N. Zampieri Lima