

CONSTRUÇÃO DE DIFERENTES VETORES DE EXPRESSÃO EM BCG PARA A CLONAGEM DE QUIMERAS RECOMBINANTES DE *Leptospira interrogans*

JESSICA DORNELES; THAÍS OLIVEIRA; CARLOS EDUARDO CUNHA;
CAROLINE RIZZI; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN

Laboratório de Vacinologia - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento
Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
jeehdorneles@hotmail.com; odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

Espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* são os agentes etiológicos da leptospirose, uma zoonose amplamente distribuída. Esta doença é contraída através do contato com ambiente contaminado com a urina de animais carreadores da bactéria (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). A vacinação com bacterinas (bactérias inativadas) é o método atualmente disponível para controle da leptospirose animal; porém apresentando diversas limitações, como a proteção de curta duração, e apenas contra os sorovares presentes na composição vacinal (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Leptospiras patogênicas apresentam ancoradas em sua membrana externa, as proteínas conservadas LigA, LigB, LipL32 e LemA, as quais são promissores alvos vacinais, uma vez que têm demonstrado capacidade de conferir proteção contra leptospirose em hamsters (SEIXAS et al., 2007, SILVA et al., 2007, HARTWIG et al., 2013). Entretanto, a vacinação com cada proteína individualmente não impede a colonização renal do animal infectado, o qual permanece como um disseminador da bactéria. A combinação de antígenos como quimeras apresenta a possibilidade de melhorar a eficácia vacinal quando comparada à utilização dos antígenos isolados (LOURDAULT et al., 2014).

Mycobacterium bovis BCG é uma vacina viva atenuada com potencial para utilização como vetor vacinal, pois apresenta fatores vantajosos, como estabilidade, segurança, baixo custo de produção, propriedades adjuvantes e indução de imunidade humoral e celular à longo prazo (MATSUO; YASUTOMI, 2011). Diversos antígenos heterólogos, incluindo antígenos de *Leptospira interrogans*, já foram expressos em BCG com sucesso (BASTOS et al., 2009). A expressão destes antígenos é dirigida pela utilização de diferentes promotores, cuja atividade interfere no nível de expressão destes antígenos e na estabilidade do vetor vacinal.

O sistema BioBricks® consiste em uma estratégia que permite a construção de partes biológicas compatíveis, cujos sítios de clonagem são mantidos mesmo após a combinação de diferentes partes. Isso ocorre pela utilização de sequências prefixo e sufixo, que flanqueiam o fragmento alvo, contendo sítios para diferentes enzimas de restrição, os quais geram extremidades compatíveis quando clivados (SHETTY et al., 2008). O emprego desse sistema na construção de vacinas vetorizadas por BCG é inovador e torna o processo de clonagem mais prático e econômico.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a construção de vetores de expressão em BCG com diferentes promotores de micobactéria e a posterior clonagem de quimeras recombinantes contendo os genes *lipL32*, *lemA*, *ligBrep* e *ligAni* de *Leptospira interrogans* nestes vetores, utilizando o sistema BioBricks®. Assim, pretendemos obter construções com diferentes combinações de quimeras

e promotores a serem utilizadas como candidatos vacinais contra leptospirose empregando BCG como vetor vacinal.

2. METODOLOGIA

Os promotores Hsp60, 18kDa, pAN, Ag85B e Ag85B acrescido de uma sequência sinal foram amplificados através da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos contendo sítios para as enzimas de restrição *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* e *PstI*. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR e o vetor de expressão em BCG foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*. As reações de digestão foram purificadas com o mesmo kit citado acima. Os promotores amplificados foram ligados individualmente ao vetor de expressão em BCG utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Os produtos das ligações foram utilizados para transformar *Escherichia coli* DH5α através de eletroporação e os clones recombinantes foram cultivados em meio Luria-Bertani líquido para posterior extração de plasmídeo com o kit *GFX™ Micro Plasmid Prep*. Os plasmídeos foram caracterizados quanto à presença das sequências dos promotores através de PCR e digestão com as mesmas enzimas citadas acima, e os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Três diferentes quimeras, previamente construídas, formadas por combinações variadas dos fragmentos *ligAni*, *ligBrep*, *lipL32* e *lemA*, foram amplificadas por PCR. Os produtos das reações foram purificados com o kit *GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%. Cada vetor de expressão contendo um dos promotores foi digerido com as enzimas de restrição *SpeI* e *PstI* e cada quimera, com as enzimas *XbaI* e *PstI*. A ligação de cada quimera a cada vetor de expressão construído foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), gerando diferentes combinações. Os produtos das ligações foram utilizados para transformar *Escherichia coli* DH5α através de eletroporação.

Após, foi realizada a seleção dos clones recombinantes, através de extração de plasmídeo seguido de PCR e digestão para confirmar a presença do inserto. Os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os promotores foram amplificados através de PCR no tamanho esperado de aproximadamente 167, 267, 384, 505 e 616 pb, respectivamente (Figura 1).

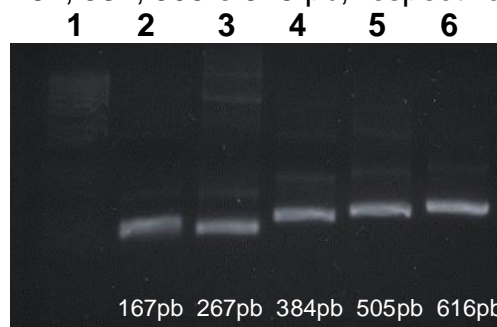


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose dos promotores amplificados por PCR. 1, Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); 2, pAN; 3, 18kDa; 4, Hsp60; 5, Ag85b; 6, SAg85b.

As sequências dos cinco promotores foram eficientemente clonadas no vetor de expressão em BCG. A digestão dos plasmídeos resultou na liberação dos fragmentos (sequência dos promotores) no tamanho esperado, conforme pode ser visualizado na Figura 2.

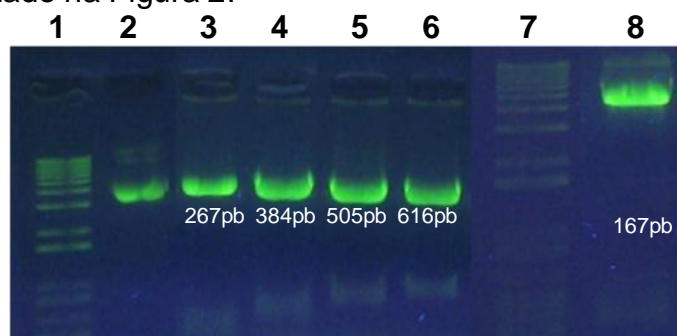


Figura 2: Confirmação da clonagem das sequências dos promotores no vetor de expressão em BCG. 1, 1 kb plus (Invitrogen); 2, plasmídeo controle (sem inserto); 3, 18kDa; 4, Hsp60; 5, Ag85bg; 6, SAg85b; 7, 1kb plus (Invitrogen); 8, pAN

As três quimeras previamente construídas com combinações variadas, foram amplificadas com êxito por PCR no tamanho de aproximadamente 2196, 2906, 2596 pb, respectivamente (Figura 3).

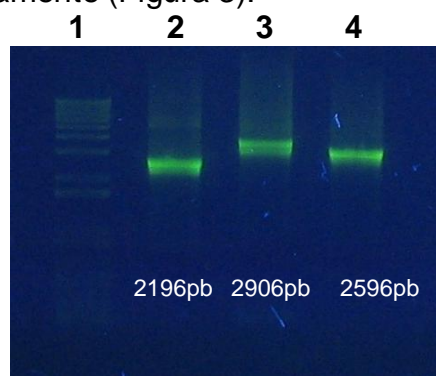


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose da amplificação das quimeras por PCR. 1, Marcador de peso molecular, 1 kb plus (Invitrogen); 2, quimera 1; 3, quimera 2; 4, quimera 3.

Após purificação e digestão, os fragmentos foram ligados individualmente nos vetores de expressão em BCG construídos com os diferentes promotores. Após a transformação das ligações por eletroporação em *E. coli*, foram selecionados quinze clones recombinantes, referente à clonagem de cada quimera com cada um dos cinco promotores. Através da técnica de PCR, utilizando os plasmídeos recombinantes extraídos como DNA molde, foi possível verificar a presença dos insertos (promotor + quimera). Da mesma forma, após a digestão, houve a liberação dos fragmentos no tamanho esperado.

4. CONCLUSÕES

O emprego do padrão BioBricks[®] mostrou-se eficaz para a clonagem dos diferentes promotores de micobactéria no vetor de expressão em BCG bem como para a clonagem das quimeras recombinantes nos vetores construídos. Neste trabalho, obtivemos quinze diferentes construções, as quais serão utilizadas na transformação de BCG para avaliação da expressão das quimeras recombinantes sob o comando dos diferentes promotores. Posteriormente, pretendemos avaliar as construções que demonstrarem melhores níveis de expressão *in vitro*, como

candidatas vacinais contra leptospirose utilizando *M. bovis* BCG como vetor vacinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B., DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.

DELLAGOSTIN, O.A.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FELIX, S.R.; DA SILVA, E.F.; MCBRIDE, A.J.A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, p. 1215-1224, 2011.

SEIXAS, F.K.; DA SILVA, E.F.; HARTWIG, D.D.; CERQUEIRA, G.M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M.Q.; DOSSA, R.G.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, p.88-95, 2007.

SILVA, E.F.; MEDEIROS, M.A.; MCBRIDE, A.J.A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G.S.; RAMOS, J.G.; SANTOS, C.S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O.A.; HAAKE, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, p. 6277-6286, 2007.

HARTWIG, D.D.; FORSTER, K.M.; OLIVEIRA, T.L.; AMARAL, M.; MCBRIDE, A.J.A.; DELLAGOSTIN, O.A. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p.747-752, 2013.

LOURDAULT, K.; WANG, L.C.; VIEIRA, A.; MATSUNAGA, J.; MELO, R.; LEWIS, M.S.; HAAKE, D.A.; GOMES-SOLECKI, M. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Infection and immunity**, v. 82, p. 893-902, 2014.

MATSUO, K.; YASUTOMI, Y. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2011, p. 9, 2011.

BASTOS, R.G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, p. 6495-6503, 2009.

SHETTY, R.P.; ENDY, D.; KNIGHT, T.F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **Journal of Biological Engineering**, v. 2, p. 1-12, 2008.