

CLONAGEM E ANÁLISE DA ATIVIDADE DO PROMOTOR *HspX* EM *Mycobacterium bovis* BCG

JESSICA DORNELES¹; THAÍS OLIVEIRA¹; CAROLINE RIZZI¹; CARLOS
EDUARDO CUNHA¹; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN¹

¹Laboratório 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

Mycobacterium bovis BCG é uma bactéria atenuada empregada como vacina contra tuberculose. Ela apresenta potencial para utilização como vetor vacinal, pois apresenta diversos fatores vantajosos: pode ser administrada por via oral e logo após o nascimento devido ao fato de não ser afetada por anticorpos maternos, é estável e segura sendo já utilizada há décadas, não requer refrigeração, possui um baixo custo de produção e propriedades adjuvantes (BASTOS et al., 2009). Além disso, é capaz de induzir imunidade humoral e celular de longa duração, sendo necessária a administração de apenas uma dose, pois o BCG replica-se dentro das células apresentadoras de antígeno (APCs) (MATSUO; YASUTOMI, 2011).

Diversos antígenos heterólogos, incluindo antígenos de *Leptospira interrogans* (BASTOS et al., 2009), *Borrelia burgdorferi* (LANGERMANN et al., 1994a), *Leishmania major* (ABDELHAK et al., 1995; CONNELL et al., 1993), já foram expressos em BCG com sucesso. A expressão destes antígenos é dirigida pela utilização de diferentes promotores, cuja atividade determina o nível de expressão destes antígenos e a estabilidade do vetor vacinal.

O HspX ou proteína α - cristalina de *M. bovis* possui um promotor que pode ser utilizado para regular a expressão de genes em BCG recombinante *in vivo*, já que é induzido no interior das APCs (DOKLADDA et al., 2015). A indução do promotor ocorre rapidamente após a entrada do BCG recombinante em células dendríticas (KONG et al., 2011), o que pode gerar uma maior estabilidade e maiores níveis de expressão na cepa recombinante.

A principal limitação dos tradicionais métodos de clonagem é a complexidade do processo. A tecnologia BioBricks® consiste em uma estratégia que permite a construção de sequências biológicas compatíveis, cujos sítios de clonagem são mantidos mesmo após a combinação de diferentes fragmentos. 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 moléculas de DNA recombinante é inovador e torna o processo de clonagem mais prático e econômico.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo clonar diferentes porções da sequência do promotor HspX no vetor de expressão em micobactéria pUP500, o qual é compatível com o Sistema BioBricks®, bem como caracterizar a funcionalidades das diferentes construções através da utilização do gene repórter codificando a proteína verde fluorescente (GFP).

2. METODOLOGIA

As sequências do promotor HspX truncada (HspXT) e não truncada (HspX) foram amplificadas 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, nomeado pUP500, foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*. As reações de digestão foram purificadas com o kit citado anteriormente. As sequências amplificadas foram ligadas 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%. Cada plasmídeo pUP500 contendo separadamente o promotor HspXT e HspX foi digerido com as enzimas de restrição *PstI* e *SpeI*, e o gene *gfp*, com as enzimas *XbaI* e *PstI*. A ligação do gene *gfp* a cada plasmídeo foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Os produtos das ligações foram utilizados para transformar *E. coli* DH5α através de choque térmico e os clones recombinantes foram cultivados em meio Luria-Bertani líquido e após foi realizada a extração de plasmídeo com o kit *GFX™ Micro Plasmid Prep*. A presença da sequência *gfp* nas construções foi verificada através de PCR e digestão com as mesmas enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, e os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

As construções do vetor pUP500 com os promotores ligados ao gene *gfp*, foram utilizadas para transformar BCG Pasteur através de eletroporação. Após o período de um mês, tempo necessário para o crescimento do BCG em meio sólido, e mais sete dias em meio líquido sob agitação de 180 rpm, as colônias recombinantes expressando GFP foram visualizadas através de microscopia de fluorescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências do promotor HspXT e HspX foram amplificadas através de PCR no tamanho esperado de aproximadamente 260 e 310 pb respectivamente (Figura 1).

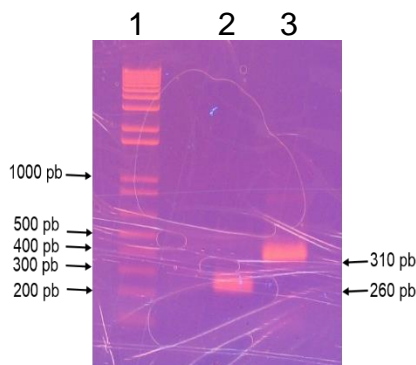


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% dos promotores amplificados por PCR, corado com brometo de etídeo. 1, Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); 2, promotor HspXT; 3, promotor HspX.

Os promotores foram eficientemente clonados no vetor de expressão em BCG. A digestão dos plasmídeos resultou na liberação dos fragmentos (sequência dos promotores) no tamanho esperado.

A sequência codificadora do gene *gfp* foi clonada no vetor micobacteriano pUP500 contendo os diferentes promotores, o que foi confirmado através da liberação dos fragmentos no tamanho esperado (promotor + *gfp*) após digestão dos clones recombinantes (Figura 2).

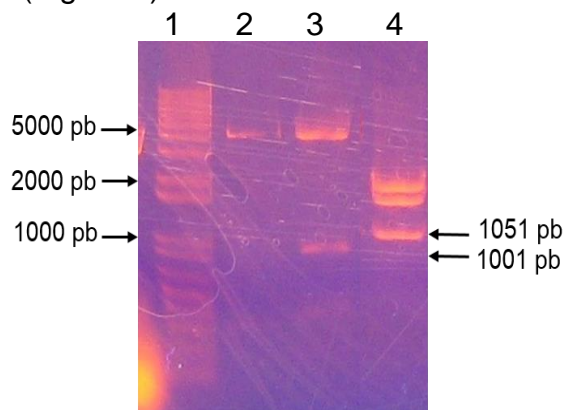


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% confirmando a clonagem do gene *gfp* no vetor micobacteriano pUP500. 1, 1 kb plus (Invitrogen); 2, plasmídeo controle (sem inserto); 3, promotor HspXT + *gfp*; 4, HspX + *gfp*.

As construções do vetor pUP500 com os promotores ligados ao gene *gfp*, foram inseridos em BCG. A expressão da GFP pode ser visualizada através de microscopia de fluorescência. As colônias que estavam expressando GFP em níveis elevados apresentaram fluorescência mais intensa (figura 3). Aparentemente, foi possível observar maiores níveis de expressão de GFP quando a sequência inteira do promotor HspX foi utilizada. Esse resultado está em concordância com outros estudos (DOKLADDA et al., 2015), nos quais foi observado que o promotor truncado (HspXT) foi ativado apenas em cepas virulentas crescidas dentro de macrófagos ou em condições de baixa tensão de oxigênio. No entanto, os resultados obtidos ainda devem ser avaliados de forma quantitativa, através de citometria de fluxo.

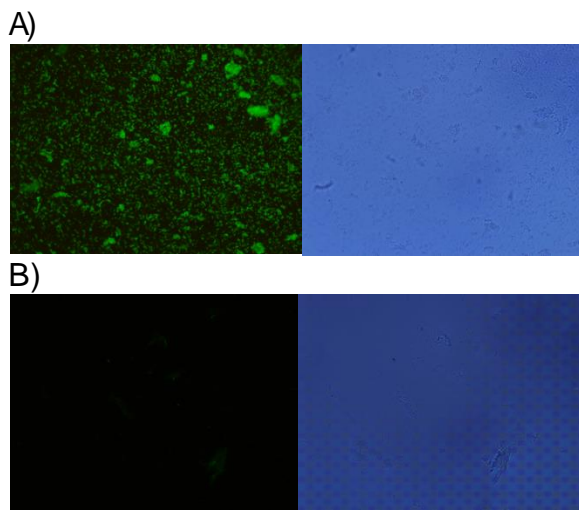


Figura 3. Microscopia de fluorescência dos clones de BCG recombinante expressando GFP sob o comando de promotores micobacterianos. A, Promotor HspX + *gfp*; B, Promotor HspXT + *gfp*.



4. CONCLUSÕES

As técnicas utilizadas mostraram-se eficazes para clonagem das duas versões do promotor HspX, no vetor de expressão em BCG bem como para a clonagem do gene repórter *gfp*, os quais passam a conter extremidades compatíveis com o padrão BioBricks®. A funcionalidade das construções também foi demonstrada pela expressão da proteína GFP *in vitro*. Posteriormente, pretendemos avaliar a regulação deste promotor em BCG cultivado dentro de macrófagos e a expressão de antígenos vacinais em BCG sob o comando do promotor HspX.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

KONG, C.U.; NG, L. G., NAMBIAR, J.K.; SPRATT, J.M.; WENINGER, W.; TRICCAS, J. A. Targeted induction of antigen expression within dendritic cells modulates antigen-specific immunity afforded by recombinant BCG. **Vaccine**, v. 29, p. 1374–1381, 2011.

BILLAMAS P.; PALITTAPONGARNPIM P. Different behaviours of promoters in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra. **World J Microbiol Biotechnol**, 2015.

OLIVEIRA T.L.; RIZZI C.; DELLAGOSTIN O. A. Recombinant BCG vaccines: molecular features and their influence in the expression of foreign genes. 2017.

PANDO R. H.; CASTAÑÓN M.; ESPITIA C.; VIDAL Y. L. Recombinant BCG vaccine candidates. **Current Molecular Medicine**, v.7, p. 365-372, 2007.

SHIA C.; CHENAL.; CHENAZ.; ZHANGB Y., ZHOUA Z.; LUA J.; FUA R.; WANGA C.; FANGA Z.; FANA X. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant BCG over-expressing HspX protein. **Vaccine**, V.28 P. 5237–5244, 2010.