

CLONAGEM DE ANTÍGENOS DE LEPTOSPIRAS UTILIZANDO O PADRÃO BIOBRICKS® E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO EM *Mycobacterium bovis* BCG

JESSICA DORNELES¹; THAÍS OLIVEIRA¹; CAROLINE RIZZI¹; ODIR
DELLAGOSTIN¹

¹Laboratório de Vacinologia - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
jehdorneles@hotmail.com; odirad@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de abrangência mundial, responsável por aproximadamente 1 milhão de casos e 58 mil mortes em humanos anualmente (COSTA et al., 2015). Esta infecção é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, sendo contraída através do contato com solo, água ou alimentos contaminados com a urina dos animais portadores da bactéria (ADLER et al., 2009). O controle da leptospirose animal se dá através da vacinação com bacterinas (bactérias inativadas), as quais apresentam limitações, pois conferem proteção de curta duração e sorovar-específica (DELLAGOSTIN et al., 2011).

As proteínas LigA, LipL32 e LemA são conservadas e encontram-se ancoradas na membrana externa de leptospiras patogênicas, sendo 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), porém a ação de cada proteína isolada não impede a colonização renal do animal infectado, mantendo-o como um disseminador da bactéria. A combinação destes抗ígenos na forma de uma proteína químérica expressa por *Mycobacterium bovis* BCG resultou em proteção contra infecção e colonização renal de hamsters infectados com cepa virulenta de *Leptospira interrogans* (dados não publicados).

A utilização de *M. bovis* BCG como vetor vacinal expressando抗ígenos leptospirais é uma estratégia promissora para controle desta infecção, considerando a segurança, baixo custo de produção, capacidade adjuvante e de indução de imunidade humoral e celular a longo prazo deste bacilo (MATSUO; YASUTOMI, 2011). No entanto, sabe-se que a expressão de抗ígenos heterólogos por esse bacilo, pode acarretar em sobrecarga metabólica, comprometendo a estabilidade vacinal, o que pode ser atribuído a diversos fatores, como ao promotor utilizado ou ao tamanho do抗ígeno, por exemplo (OLIVEIRA et. al, 2017).

O padrão BioBricks® é uma estratégia de clonagem padronizada que permite a construção de moléculas com extremidades compatíveis, cujos sítios de clonagem são mantidos mesmo após a combinação de diferentes fragmentos (SHETTY et al., 2008). A utilização desta estratégia para construção de genes químéricos leptospirais é inovadora, e torna este processo mais prático e econômico do que a metodologia convencional.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a clonagem de cinco porções de uma quimera recombinante previamente construída, contendo os genes *lipL32*, *lemA* e *ligAni* de *L. interrogans*, no vetor pUP500/pAN, utilizando o padrão BioBricks® e a avaliação da expressão destes抗ígenos por *M. bovis* BCG. Com esta estratégia, pretendemos posteriormente detectar quais porções antigenicas são requeridas para proteção contra leptospirose e para estabilidade destas vacinas vetorizadas por BCG.

2. METODOLOGIA

Cinco fragmentos foram amplificados através da técnica de PCR a partir de uma quimera recombinante previamente construída composta pelos genes *lipL32*, *ligANI* e *lemA* de *L. Interrogans*, utilizando oligonucleotídeos contendo sítios para as enzimas de restrição *EcoRI*, *XbaI*, *Spel* e *PstI*. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% e digeridos com as enzimas de restrição *XbaI* e *PstI* e o vetor previamente construído pUP500/pAN foi digerido com as enzimas *Spel* e *PstI* (New England BioLabs), tornando possível a ligação dos genes amplificados ao plasmídeo utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen).

Os produtos das ligações foram utilizados para transformar *Escherichia coli* DH5 α através de choque térmico. Os clones recombinantes foram cultivados em meio Luria-Bertani líquido e submetidos à extração de plasmídeo com o kit GFXTM Micro Plasmid Prep (GE Healthcare). A presença dos insertos foi confirmada por PCR e digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*.

Na sequência, os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar *M. bovis* BCG Pasteur através da técnica de eletroporação. As colônias crescidas em meio sólido foram repicadas para meio líquido 7H9 e submetidas à lise celular através da técnica de sonicação. Para análise da expressão desses抗ígenos por BCG, foi realizada a técnica de *Western blot* utilizando anticorpos primários policlonais anti-quimera recombinante, anti-*lipL32*, anti-*ligANI* ou anti-*lemA* e anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de hamster, seguido de revelação por quimioluminescência. Para o controle negativo foi utilizado extrato de BCG Pasteur e para controle positivo a quimera recombinante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências das 5 porções: P1 (*lipL32*), P2 (*lemA*), P3 (*ligANI*), P4 (*lemA* + *ligANI*) e P5 (*lipL32* + *lemA*) foram eficientemente amplificadas por PCR no tamanho esperado de aproximadamente 795, 438, 882, 1290 e 1224 pb respectivamente. A ligação dos fragmentos individualmente no vetor pUP500/pAN foi confirmada tanto por PCR como por digestão o que resultou na liberação dos insertos no tamanho esperado, como pode ser visualizado na figura 1.

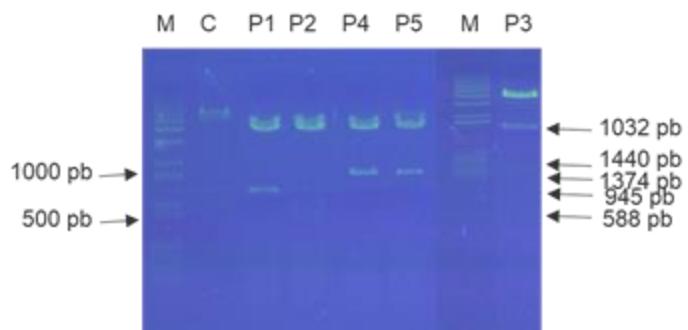


Figura 1: Confirmação da clonagem dos genes alvo no vetor pUP500/pAN. Digestão com *EcoRI* e *PstI* dos plasmídeos recombinantes pUP500/pAN:P1, pUP500/pAN:P2, pUP500/pAN:P3, pUP500/pAN:P4 e pUP500/pAN:P5. M, Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); C, pUP500, P1, pUP500/pAN:P; P2, pUP500/pAN:P2; P4, pUP500/pAN:P4; P5, pUP500/pAN:P5; e P3, pUP500/pAN:P3.

Após a inserção das construções pUP500/pAN:P1; pUP500/pAN:P2; pUP500/pAN:P3; pUP500/pAN:P4 e pUP500/pAN:P5 em BCG, foi possível verificar a expressão de quatro porções pelo BCG, no tamanho esperado de 28 kDa (P1), 32 kDa (P2), 46 kDa (P4) e 45 kDa (P5) (Figura 2). Nenhuma expressão foi observada no controle negativo, BCG Pasteur não transformado.



Figura 2: Avaliação da expressão dos抗ígenos recombinantes por *M. bovis* BCG através de Western blot. P1 (*lipL32*), anti-*lipL32* e anti-IgG de camundongo; P3 (*ligANi*), anti-*ligANi* e anti-IgG de hamster; P4 (*lemA* + *lipL32*), anti-quimera recombinante e anti-IgG de camundongo; P5 (*lipL32* + *lemA*), anti-*lemA* e anti-IgG de hamster; Pasteur *wt*, BCG não transformado (controle negativo).

4. CONCLUSÕES

A clonagem dos insertos (cinco porções da quimera recombinante contendo os genes *lipL32*, *lemA* e *ligANi* de *L. interrogans*), no vetor pUP500/pAN, foi realizada com êxito. A utilização do padrão BioBricks® para clonagem destes fragmentos permite padronização e reproduzibilidade neste processo.

As porções antigênicas foram expressas por BCG no tamanho esperado e reconhecidas por anticorpos específicos, confirmando sua antigenicidade. Posteriormente iremos avaliar os抗ígenos construídos como vacina contra leptospirose animal utilizando *M. bovis* BCG como vetor vacinal bem como a estabilidade destas construções.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B., DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.
- BASTOS, R.G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, p. 6495-6503, 2009.
- COSTA F, HAGAN JE, CALCAGNO J, KANE M, TORGERSON P, MARTINEZ-SILVEIRA MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 9:e0003898; 2015.
- 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.
- 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.

OLIVEIRA, T.L.; RIZZI, C.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant BCG vaccines: molecular features and their influence in the expression of foreign genes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 101, p. 6865-6877, 2017.

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.

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