

CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEO RECOMBINANTE COMPATÍVEL COM A ESTRATÉGIA BIOBRICKS PARA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS EM *Mycobacterium bovis* BCG $\Delta leuD$

JADY DUARTE NOGUEIRA¹; ANDRIELE BONEMANN MADRUGA²; MARA
ANDRADE COLARES MAIA³; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁴; THAÍS LARRÉ
OLIVEIRA BOHN⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas – jadyduartenogueira2@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelota – andrielebonemann@outlook.com

³Universidade Federal de pelotas – maracamaia@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – odirad@ufpel.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas - thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) é uma vacina viva atenuada muito promissora para utilização como vetor vacinal, pois apresenta fatores vantajosos, como estabilidade, segurança, baixo custo de produção, capacidade adjuvante e indução de imunidade humoral e celular em longo prazo (MATSUO; YASUTOMI, 2011). No entanto, existem alguns fatores que limitam sua utilização como vetor vacinal, incluindo a utilização de genes que conferem resistência a antibióticos como marcadores de seleção nos plasmídeos empregados para transformação genética de BCG. A presença destes genes permite a seleção dos clones recombinantes *in vitro*, mas não fornece pressão seletiva para a vacina *in vivo*, impactando negativamente na sua estabilidade (BASTOS et al., 2009).

A ausência do gene de resistência a antibiótico requer a utilização de um outro marcador de seleção, a fim de permitir a identificação das bactérias portadoras do vetor de interesse após o processo de transformação. Cepas auxotróficas, ou seja, que possuem deleção em algum gene essencial para sua sobrevivência, podem ser uma promissora alternativa para esta problemática. Embora elas necessitem da suplementação externa com compostos essenciais para seu crescimento, a inserção de um plasmídeo que contenha o gene deletado complementa a mutação, permitindo a sobrevivência do microrganismo (DELLAGOSTIN, et al., 2022). Borsuk e colaboradores (2007) relataram a construção de uma cepa de BCG auxotrófica para o aminoácido leucina (BCG $\Delta leuD$) e um plasmídeo capaz de complementar a mutação, os quais já foram empregados em aplicações vacinais e terapêuticas, demonstrando maior estabilidade que a cepa parental (BORSUK et al., 2007).

Em um estudo prévio do nosso grupo, foi desenvolvida uma série de plasmídeos, denominada pUP500, contendo diferentes promotores de micobactéria para expressão de antígenos em BCG, através da estratégia de clonagem Biobricks. A estratégia Biobricks permite a clonagem de sequências de DNA de forma compatível e padronizada devido à utilização de sequências prefixo e sufixo, que flanqueiam o fragmento alvo. Essas sequências contêm sítios para diferentes enzimas de restrição, os quais geram extremidades compatíveis quando clivados, permitindo a ligação de uma sequência à outra, conservando os sítios de clonagem originais mesmo após a combinação de diferentes fragmentos (SHETTY et al., 2008). Sendo assim, este trabalho teve por objetivo construir um vetor da série pUP500 para aplicação na expressão de antígenos heterólogos em BCG $\Delta leuD$, com potencial aplicação vacinal e/ou terapêutica.

2. METODOLOGIA

2.1 Clonagem do cassete de expressão contendo a sequência codificadora *leuD* no vetor pUP500/18kDa

O cassete de expressão contendo o promotor pAN e o gene *leuD* foi amplificado a partir do vetor pUP410 (BORSUK et al., 2007) através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR foi realizada contendo 50-100 ng de DNA molde e primers específicos para a sequência alvo. A reação ocorreu em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial à 94 °C por 4 min seguido de 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 s, anelamento na temperatura de 56 °C por 30 s, extensão à 72 °C por 30 s e, ao final dos 30 ciclos, extensão final à 72 °C por 5 min. O plasmídeo da série pUP500 (OLIVEIRA et al., 2019) contendo apenas o promotor micobacteriano 18 kDa foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* cepa TOP 10 e posteriormente, foi realizada a extração do vetor usando o kit de extração Illustra™ *Plasmid prep mini spin* (GE Healthcare). O plasmídeo propagado foi submetido a reação de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI* (New England Biolabs) e o cassete de expressão *pAN-leuD* foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *SpeI* (New England Biolabs), ambas as reações ocorreram à 37 °C por 2 h. Após, ocorreu a reação de ligação do inserto no vetor, na região a montante do promotor 18 kDa, utilizando a enzima T4 DNA ligase (ThermoFisher), a qual foi incubada *overnight* à 16 °C. O produto da ligação foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* cepa TOP 10 através de eletroporação. As células transformadas foram plaqueadas em ágar Luria Bertani (LB) com acréscimo de canamicina (50 µg/mL). A seleção dos clones recombinantes foi realizada por extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio, seguida de confirmação através de digestão com enzimas de restrição nas condições descritas anteriormente. As reações foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 1%.

2.2 Clonagem do gene *gfp* (Green Fluorescent Protein) no plasmídeo alvo

A sequência codificadora da proteína verde fluorescente (GFP) foi obtida a partir de um plasmídeo previamente construído por nosso grupo através de PCR, conforme descrito anteriormente, porém empregando uma temperatura de anelamento de 60 °C. O plasmídeo recombinante construído na etapa anterior foi digerido com as enzimas de restrição *SpeI* e *PstI* à 37 °C por 6 horas e purificado com o kit comercial Illustra™ *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e ligado ao gene *gfp* previamente digerido com as enzimas *XbaI* e *PstI*, utilizando a enzima T4 DNA ligase (ThermoFisher) à 16°C *overnight*, de modo a inserir o gene repórter a jusante do promotor 18 kDa. As etapas de transformação do produto da ligação em *E. coli* TOP 10 e a seleção e confirmação dos clones recombinantes foram realizadas conforme descrito anteriormente e visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 1%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a reação de PCR, podemos observar que o cassete de expressão contendo o gene *pAN-leuD* foi eficientemente amplificado, apresentando o tamanho esperado de 764 pb (Figura 1A). Após a amplificação, o cassete de expressão foi

eficientemente digerido e ligado ao vetor contendo o promotor micobacteriano 18 kDa, conforme o esperado. A clonagem foi confirmada pela visualização, em gel de agarose, da liberação do inserto após a digestão com enzimas de restrição, onde foi possível observar uma banda no tamanho de 1031 pb, referente ao cassete *pAN-leuD* juntamente com o promotor 18 kDa (Figura 1B). A sequência codificadora da proteína GFP, previamente amplificada por PCR com 720 pb (Figura 2A), foi clonada através da estratégia Biobricks a jusante do promotor 18 kDa no vetor de expressão em BCG pUP500/18kDa já contendo o cassete de expressão *pAN-leuD*. A digestão do plasmídeo recombinante com enzimas de restrição permitiu a confirmação da clonagem, resultando na liberação de um fragmento no tamanho esperado de 1751 pb, referente à sequência *pAN-leuD* ligada ao cassete de expressão contendo o promotor 18 kDa e o gene *gfp* (Figura 2B).

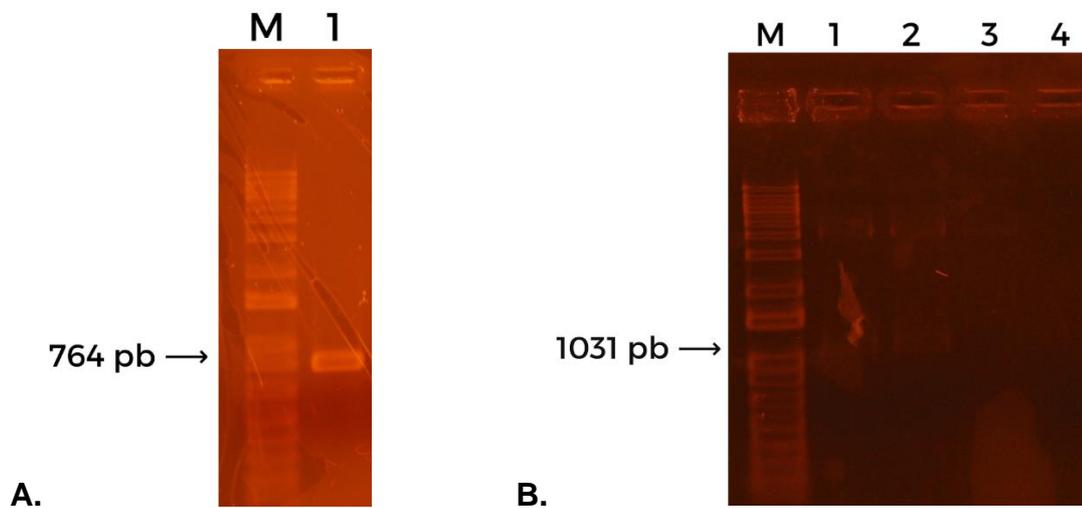


Figura 1: **A** - Amplificação do cassete de expressão *pAN-leuD* através de PCR; M. Marcador 1 kb DNA *plus ladder*; 1. Fragmento *pAN-leuD* amplificado em temperatura de anelamento de 60 °C. **B** - Confirmação da ligação do cassete de expressão *pAN-leuD* no vetor pUP500/18kDa através de digestão com enzimas de restrição; M. 1 kb DNA *plus ladder*; 1. e 2. Clones recombinantes contendo o vetor pUP500/18kDa-*pAN-leuD*; 3. pUP500/18kDa (controle negativo).

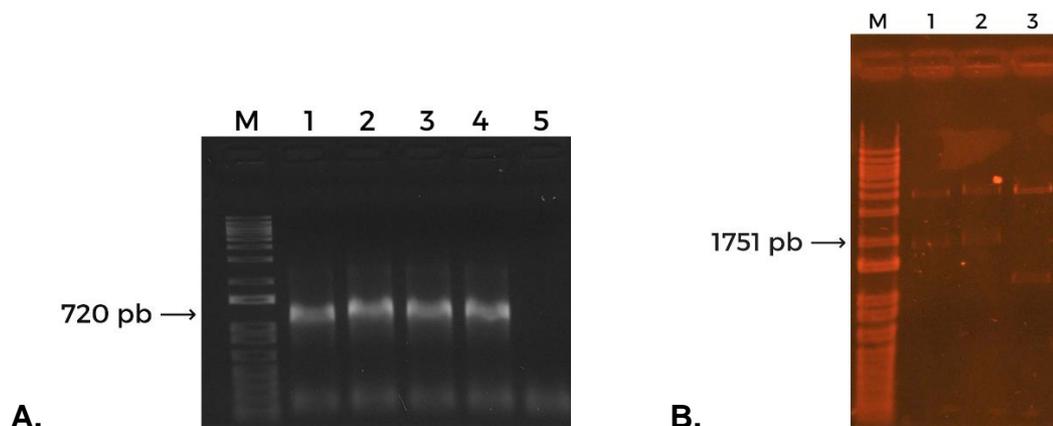


Figura 2: **A** - Amplificação do gene *gfp* por PCR; M. Marcador 1 kb DNA *plus ladder*; 1. a 4. Gene *gfp* amplificado por PCR; 5. Controle negativo sem DNA. **B** - Reação

de digestão para confirmação da clonagem do gene *gfp* no vetor de expressão em BCG pUP500/18kDa; M. Marcador 1 kb DNA *plus ladder*; 1. e 2. Clones recombinantes contendo o gene *gfp* ligado ao vetor auxotrófico; 3. pUP500/18kDa (controle negativo).

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a metodologia empregada na clonagem do cassete de expressão *pAN-leuD* ao vetor pUP500/18kDa foi eficiente, assim como para clonagem do gene *gfp* nesta construção, gerando um plasmídeo recombinante que permite a clonagem de genes heterólogos para expressão em *Mycobacterium bovis* BCG $\Delta leuD$. Os próximos passos envolvem a remoção do gene de resistência a antibiótico, a transformação do vetor em BCG $\Delta leuD$, e a avaliação da funcionalidade da construção através de monitoramento da fluorescência de GFP por microscopia e citometria de fluxo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, R.G. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495-6503, 2009.

BORSUK, S. et al. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. **Tuberculosis**, v. 87, n. 6, p. 474-480, 2007.

DELLAGOSTIN, O.A.; Borsuk, S.; Oliveira, T.L.; Seixas, F.K. Auxotrophic *Mycobacterium bovis* BCG: Updates and Perspectives. **Vaccine**, 2022

DORNELES, J. et al. Protection against leptospirosis conferred by *Mycobacterium bovis* BCG expressing antigens from *Leptospira interrogans*. **Vaccine**, v. 38, n. 51, p. 8136-8144, 2020.

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 et al. A standardized BioBrick toolbox for the assembly of sequences in mycobacteria. **Tuberculosis**, v. 119, p. 101851, 2019.

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