

CLONAGEM DO GENE *cp1002_1802* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM VETORES FUNCIONAIS PARA BCG

**FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA^{1,2}; KAREN SILVA LEAL²;
ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA REZENDE²; FERNANDA KEGLES³; SIBELE
BORSUK⁴**

¹Departamento de Ciências Animais. Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) – silvestrebrilhante@gmail.com

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – karensleal@hotmail.com, andreabiomedica@hotmail.com,

³Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – fkegles@hotmail.com

⁴Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis bacilo de Calmette-Guerin (BCG) é uma vacina usada há mais de 100 anos, com mais de oito milhões de doses administradas em todo o mundo (COSTA et al., 2014). Trata-se de uma vacina viva bastante segura, estável e com baixo custo de produção, que é usada em dose única, possuindo propriedades adjuvantes intrínsecas (BASTOS et al., 2009).

O interesse por BCG aumentou bastante desde que se aventou a possibilidade de expressão de antígenos heterólogos em *Mycobacterium* (BASTOS et al., 2009). E, desta forma, antígenos de bactérias, vírus e parasitas vem sendo expressos em BCG, o que tem demonstrado que o BCG recombinante (rBCG) elicitava tanto respostas imune celular quanto humoral contra antígenos heterólogos (AGHABABA et al., 2014; XUE et al., 2014; YU et al., 2013).

Dentro desta perspectiva, o uso de rBCG expressando antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente causador da linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes, poderia representar uma boa alternativa no desenvolvimento de uma vacina eficiente. Até o presente momento, as vacinas desenvolvidas para combate da LC não apresentaram bons índices de proteção e não há tratamento eficaz (GUIMARÃES et al., 2011).

O gene *cp1002_1802* codifica para uma provável lipase secretada e foi identificado a partir de uma análise *in silico* e predição do pan-exosecretoma de 5 cepas de *C. pseudotuberculosis*. Uma vez que a proteína codificada por este gene foi apontada como provável candidata a antígeno vacinal (SANTOS et al., 2012), o *cp1002_1802* já foi clonado em vetor pAE para a expressão de proteína recombinante em *E. coli* BL21 star a ser usada como vacina de subunidade (BRUM et al., 2013), bem como em vetor pTARGET para construção de vacina de DNA (LEAL et al., 2013), tendo sido ambos os objetivos alcançados com sucesso por nosso grupo.

Uma vez que vacinas vivas, em geral apresentam melhor imunogenicidade que vacinas de DNA ou de subunidade, buscou-se com este trabalho, clonar o gene *cp1002_1802* com e sem peptídeo sinal em vetores funcionais para BCG.

2. METODOLOGIA

Os genes *cp1002_1802* e *cp1002_1802PS* (com peptídeo sinal) foram amplificados a partir do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* por meio da

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando primers específicos para cada gene (1802F 5'-GCT CTA GAC ATT CCC TAT ACC GAC-3', 1802PSF 5'-GCT CTA GAC ATG CTT TTT CCC TCT C-3' e 1802R 5'-AGC AAG CTT TCG GGG AGG-3'). A reação de PCR foi realizada com 1 μ L de DNA, 25 μ L de PCR Master Mix (Promega), 22 μ L de água e 1 μ L de cada primer, em um volume final de 50 μ L. A ciclagem de temperaturas foi de 5 min a 94 °C, seguido de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min por 30 ciclos, e uma extensão final a 72 °C por 7 min. A visualização dos fragmentos de DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%.

Os amplicons e os vetores de expressão bifuncionais em *E. coli* e *M. bovis* BCG Pasteur pUS977 (contendo o promotor pAN isolado de *M. paratuberculosis*) e pUS2000 (contendo o promotor 18 kDa de *M. leprae*) foram submetidos à digestão dupla utilizando as enzimas de restrição XbaI e HindIII, seguindo-se à purificação por meio do Kit de Purificação Illustra GFX® (GE Healthcare). Os genes foram então ligados aos vetores utilizando a enzima T4 DNA ligase, gerando as combinações pUS977/1802, pUS977/1802PS, pUS2000/1802 e pUS2000/1802PS.

Essas combinações foram utilizadas para a transformação de *E. coli* TOP10 para obtenção dos clones recombinantes, utilizando um pulso de 3s com capacitância de 25 μ FD, resistência de 200 OHMs e voltagem de 2,5 kV. O produto da transformação foi semeado em meio Luria-Bertani (LB) acrescido de Ágar e antibiótico canamicina (50 mg/mL) e incubado a 37°C por 16 h.

Foi realizada uma triagem para a seleção das possíveis colônias recombinantes por meio da eletroferese do DNA das colônias, obtido pelo método de extração rápida com fenol-clorofórmio. As colônias selecionadas foram então semeadas em meio LB líquido contendo canamicina e incubadas a 37 °C por 16h. Posteriormente, os plasmídios foram purificados usando o Illustra™ plasmid Prep Mini Spin Kit® (GE Healthcare) e submetidos à digestão enzimática com as enzimas XbaI e HindIII para a caracterização enzimática dos clones.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes *cp1002_1802* e *cp1002_1802PS* foram amplificados com sucesso, resultando em bandas com 790 e 890 pb, respectivamente, conforme pode ser visualizado na figura 1.

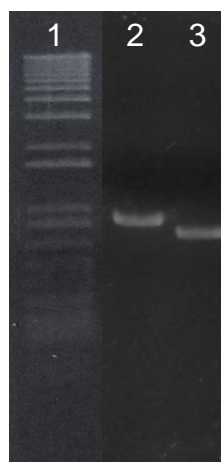


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, demonstrando a amplificação do gene *cp1002_1802* com e sem peptídeo sinal. Poço 1. Marcador de peso molecular (1 kb); Poço 2. Gene *cp1002_1802PS*; Poço 3. Gene *cp1002_1802* sem peptídeo sinal

Após a ligação dos insertos aos vetores, várias colônias cresceram em ágar LB contendo canamicina, o que demonstrou a transfecção dos plasmídeos à *E. coli*, uma vez que o pUS977 e o pUS2000 apresentam um gene de resistência a este antibiótico. Entretanto, a confirmação de que esses plasmídeos possuíam os insertos de *C. pseudotuberculosis* só foi possível após a digestão e caracterização enzimática final dos plasmídeos extraídos das colônias, conforme pode ser visualizado na Figura 2.

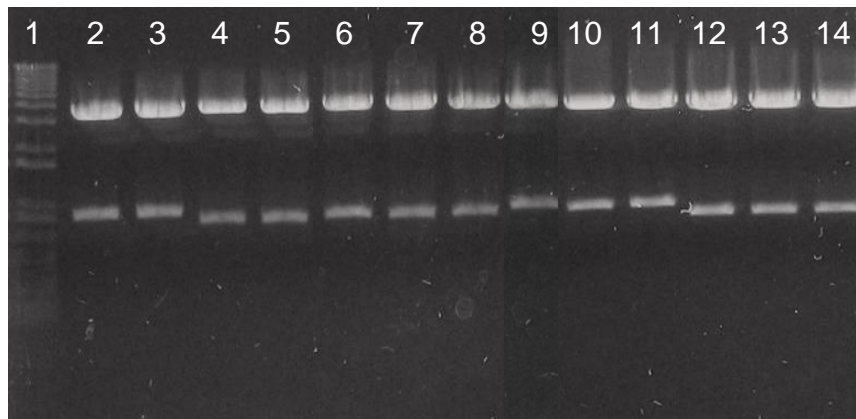


Figura 2. Caracterização enzimática dos plasmídeos pUS977 e pUS2000 extraídos das colônias de *E. coli* transformadas e contendo o inserto *cp1002_1802* com e sem peptídeo sinal. Poço 1. Marcador de peso molecular (1 kb plus, Invitrogen®); Poços 2 a 5. Liberação do inserto *cp1002_1802* PS do plasmídeo pUS977; Poços 6 a 8. Liberação do inserto *cp1002_1802* do plasmídeo pUS977; Poços 9 a 11. Liberação do inserto *cp1002_1802* PS do plasmídeo pUS2000; Poços 12 a 14. Liberação do inserto *cp1002_1802* do plasmídeo pUS2000.

4. CONCLUSÕES

O gene *cp1002_1802* de *C. pseudotuberculosis* contendo ou não peptídeo sinal pode ser clonado com sucesso em *E. coli* BL21 star nos vetores bifuncionais pUS977 e pUS2000. E, desta, forma, trabalhos futuros devem avaliar se essas construções são transfectadas com sucesso em *M. bovis* BCG, e se, a proteína heteróloga é corretamente expressa nesse sistema, para que então se possa obter uma vacina viva com potencial para proteção contra a linfadenite caseosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHABABA, H.; MOBAREZ, A.M.; KHORAMABADI, N.; BEHMANESH, M.; MAHDAVI, M.; TEBIANIAN, M.; NEJATI, M. A Comparative Approach to Strategies for Cloning, Expression, and Purification of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolyl Transferase 85B and Evaluation of Immune Responses in BALB/c Mice. **Molecular Biotechnology**, v.56, n.6, p.487-497, 2014.
- BASTOS, R.G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v.27, n.47, p.6495-6503, 2009.

- BRUM, A.A.; REZENDE, A.F.S.; RODRIGUES, A.P.; ÂNGELO, H.R.; REIS, C. G.R.; BORSUK, S. Avaliação da proteção conferida por vacinas recombinantes de subunidade para o controle de linfadenite caseosa. In: **Encontro de Pós-graduação UFPel**, 15, Pelotas, 2013. Anais... Pelotas: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFPel, 2013.
- COSTA, A.C.; NOGUEIRA, S.V.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Recombinant BCG: Innovations on an Old Vaccine. Scope of BCG Strains and Strategies to Improve Long-Lasting Memory. **Frontiers in Immunology**, v.5, n.152, p. 1-9, 2014.
- GUIMARÃES, A.D.S.; BORGES, F.; PAULETTI, R.B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A.M.G. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and control. **The IIOAB Journal**, v.2, n.2, p. 33–43, 2011.
- LEAL, K.S.; REZENDE, A.F.S.; BRUM, A.A.; FELICETTI, C.P.D.; ÂNGELO, H.R.; BORSUK, S. Desenvolvimento de vacinas de DNA utilizando os genes cp0369 e cp1802 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: **Encontro de Pós-graduação UFPel**, 15, Pelotas, 2013. Anais... Pelotas: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFPel, 2013.
- SANTOS, A.R.; CARNEIRO, A.; GALA-GARCÍA, A.; PINTO, A.; BARH, D.; BARBOSA, E.; ABURJAILE, F.; DORELLA, F.; ROCHA, F.; GUIMARÃES, L.; ZURITA-TURK, M.; RAMOS, R.; ALMEIDA, S.; SOARES, S.; PEREIRA, U.; ABREU, V.C.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC Genomics**, v.13, supl. 5, S6, 2012.
- XUE, Q.; DAI, J.; LI, X.; ZHU, W.; SI, C.; CHEN, T. Construction of a Recombinant-BCG Containing the LMP2A and BZLF1 Genes and its Significance in the Epstein-Barr Virus Positive Gastric Carcinoma. **Journal of Medical Virology**, v.86, n.9, p.1–8, 2014.
- YU, Q.; HUANG, X.; GONG, P.; ZHANG, Q.; LI, J.; ZHANG, G.; YANG, J.; LI, H.; WANG, N.; ZHANG, X. (2013). Protective immunity induced by a recombinant BCG vaccine encoding the cyclophilin gene of *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v.31, n.51, p.6065–6071, 2013.