

CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO CAPAZ DE PRODUZIR AG85B de *Mycobacterium bovis* EM *M. smegmatis mc*²

**LEAL, Karen¹; RIZZI, Caroline¹; BIANCO, Veronica²; SEIXAS, Fabiana
Kömmeling¹; HARTWIG, Daiane Drawanz¹;**

DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
Universidade Federal de Pelotas

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Buenos Aires– Argentina
karensleal@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) bovina, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium bovis*, se caracteriza como um importante problema econômico para a agricultura e indústria alimentícia (Pollock & Neill, 2002). Nos países onde a doença ainda não foi erradicada, a TB bovina também se apresenta como uma importante zoonose (Cosivi *et al.*, 1998).

A única vacina disponível atualmente, a *M. bovis* BCG, possui limitada eficácia. Portanto, o desenvolvimento de novas e mais eficazes vacinas contra TB é necessário. Uma estratégia promissora para melhorar a segurança e eficácia protetora da vacina inclui alterações genéticas em BCG (Vondermeir & Hewinson, 2006).

Em nosso laboratório foi desenvolvido um sistema de expressão empregando um mutante de BCG Pasteur auxotrófico para leucina (BCG Pauster $\Delta leuD$) e um vetor integrativo (pUP410) que suplementa esta mutação (Borsuk *et al.*, 2007). Este sistema de complementação auxotrófica permite a produção de cepas recombinantes estáveis *in vivo* com altos níveis de expressão da proteína recombinante sem a utilização de antibióticos como marcadores, aumentando a segurança da vacina (Seixas *et al.*, 2010).

A proteína Ag85B de *M. bovis*, codificada pelo gene *fbpB*, é o antígeno imunodominante deste bacilo e promissor alvo para superexpressão em BCG (Horwitz, 2005). Assim, este trabalho descreve a clonagem do gene *fbpB* em vetor pUP410 e sua expressão em *M. smegmatis mc*², que permite a avaliação rápida da expressão em sistemas micobacterianos. A eficácia da clonagem e expressão permitirá a transformação em BCG $\Delta leuD$ para posterior desenvolvimento de vacinas anti-TB bovina.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Baseado na sequência completa do genoma de *M. bovis* AF2122/97, *primers* sintéticos foram construídos usando o software Vector NTI. Estes *primers* continham sítios de restrição para *KpnI* nas extremidades 5' e 3' e foram utilizados para a amplificação do gene *fbpB* e seu promotor endógeno através da reação de PCR.

O produto da PCR foi purificado, digerido com *KpnI* e ligado em vetor pUP410, previamente digerido com a mesma enzima de restrição. A ligação foi transformada por eletroporação em células competentes de *E. coli* TOP 10. As

células transformadas foram selecionadas em meio LB Agar contendo canamicina 50 µg/mL. O DNA plasmidial das colônias recombinantes foi extraído empregando o kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). Para confirmar a clonagem do gene *fbpB*, os vetores recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *XhoI*, a qual possui sítio de restrição no interior do fragmento clonado e do vetor pUP 410.

Células *M. smegmatis* mc² eletrocompetentes foram transformadas com os vetores recombinantes, crescidas por 48 horas em meio seletivo (7H9 suplementado com 10% de OADC, 0,2% de Glicerol e 0,05% de Tween 80) contendo 25 µg/mL de canamicina. A cultura foi centrifugada, o pellet suspenso em tampão Tris-HCl 50 mM e lisado em ribolizador. As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação e, para a visualização da expressão de Ag85B, foi realizado *Western Blot* empregando-se anticorpos policlonais de coelho anti-Ag85B.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O gene e seu promotor foram amplificados com sucesso através da reação de PCR somente na presença de DMSO 7,5% (Figura 1). Este é um solvente que aumenta a atividade da DNA polimerase em genomas ricos em GC (Pomp & Medrano, 1991) como é observado em *M.bovis* (Garnier *et al.*, 2003).

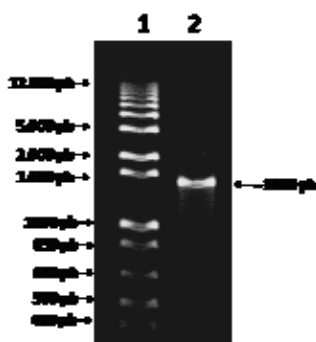


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação por PCR do gene *fbpB* e seu promotor (~1500 pb) do DNA genômico de *M. bovis*. Coluna 1: Marcador de tamanho de cadeia para DNA 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); Coluna 2: Amplificação na presença de DMSO 7,5%.

A liberação do inserto (1500 pb) e sua clivagem interna através das digestões dos vetores recombinantes confirmaram a clonagem de *fbpB* e seu promotor em pUP410 (Figuras 2 e 3). A presença em pUP410 de origens de replicação distintas para *E. coli* e micobactérias permite a propagação em dois hospedeiros de espécies diferentes (Borsuk *et al.*, 2007). Esta característica facilitou a manipulação genética do vetor, que foi realizada em células de fácil e rápido cultivo (*E. coli*).

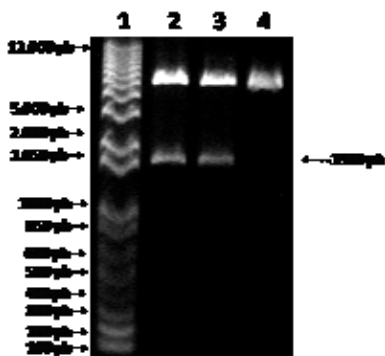


FIGURA 2: Digestão do vetor recombinante pUP410::*fbpB* com *KpnI*. Coluna 1: Marcador de tamanho de cadeia para DNA 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); Colunas 2 e 3: clivagem de pUP410::*fbpB* liberando o inserto de ~1500 pb; Coluna 4: clivagem de pUP410.

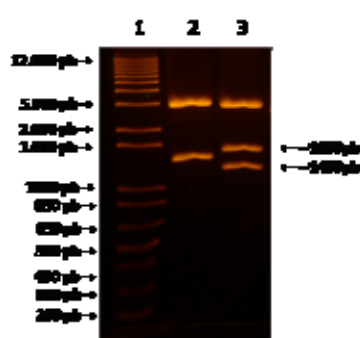


FIGURA 3: Digestão do vetor recombinante pUP410::*fbpB* com *XhoI*. Coluna 1: Marcador de tamanho de cadeia para DNA 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); Coluna 2: clivagem de pUP410; Coluna 3: clivagem de pUP410::*fbpB* liberando fragmentos de ~1600 e ~1400 pb.

A expressão da proteína recombinante com massa molecular esperada foi observada na fração solúvel de *M. smegmatis* mc² (Figura 4). Em relação aos controles positivos (extratos celulares de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* mc²), observou-se uma expressão supostamente mais acentuada de Ag85B, demonstrando que a proteína visualizada não é constitutiva, e sim, recombinante. Altos níveis de expressão de Ag85B ocorreram já que pUP410 é um vetor integrativo aleatório baseado em elementos de inserção os quais permitem a incorporação de inúmeras cópias no genoma (Borsuk *et al.*, 2007).

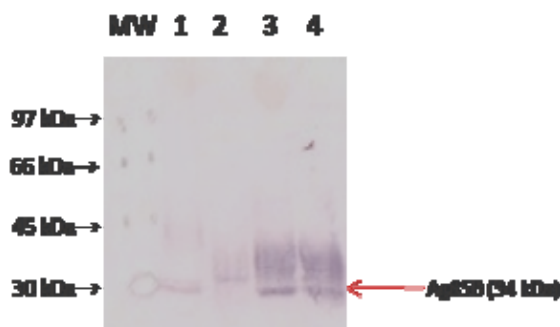


FIGURA 4: *Western Blot* demonstrando a expressão de Ag85B no sobrenadante celular de *M. smegmatis* mc² recombinante. Coluna MW: marcador de peso molecular “High range” (Gibco BRL); Coluna 1: extrato celular de *M. tuberculosis*; Coluna 2: extrato celular de *M. smegmatis*; Colunas 3 e 4: *M. smegmatis* + pUP410::fbpB.

4 CONCLUSÕES

A clonagem do gene *fbpB* e seu promotor endógeno foi realizada com sucesso, já que a proteína recombinante foi expressa na fração solúvel e com massa molecular esperada em *M. smegmatis* mc². Desta maneira, acredita-se que a linhagem BCG Δ *leuD* transformada com pUP410::fbpB possibilitará o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura contra a TB bovina.

5 REFERÊNCIAS

BORSUK, Sibebe; MENDUM, Tom; FAGUNDES, Michel Quevedo; MICHELON, Marcelo; CUNHA, Cristina Wetzel; MCFADDEN, Jonhjo; DELLAGOSTIN, Odir Antônio. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. **Tuberculosis**, 87, 474-480 (2007).

COSIVI, Ottorino; GRANGE, John M; RAVIGLIONE, Mario. FUJIKURA, T.; ROBINSON, R.A.; HUCHZERMEYER, H.F.A.K.; KANTOR, I.; MESLIN, Xavier. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Disease**, 4,1, 59-70 (1998).

GARNIER, Thierry; EIGLMEIER, Karin; CAMUS, Jean-Christophe; MEDINA, Nadine; MANSOOR, Huma; PRYOR, Melinda; DUTHOY, Stephanie; GRONDIN, Sophie; LACROIX, Celine; MONSEMPE, Christel; SIMON, Sylvie; HARRIS, Barbara; ATKIN, Rebecca; DOGETT, Jon; MAYES, Rebecca; KEATING, Lisa; WHEELER, Paul; PARKHILL, Julian; BARRELL, Bart G; COLE, Stewart T.; GORDON, Stephen V and HEWINSON, Glyn. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100, 13, 7877-7882 (2003).

HORWITZ, Marcus A. Recombinant BCG expressing *Mycobacterium tuberculosis* major extracellular proteins. **Microbes and Infection**, 7, 947–954 (2005).

POLLOCK, John M. and NEILL, Sidney. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, 163, 115-117 (2002).

POMP, D. and MEDRANO, J.F. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. **Biotechniques**, 10, 58–59 (1991).

SEIXAS, Fabiana Kömmling; BORSUK, Sibeles; FAGUNDES, Michel Quevedo; HARTWIG, Daiane. SILVA, Éverton; CERQUEIRA, Gustavo. and DELLAGOSTIN, Odir Antônio. Stable expression of *Leptospira interrogans* antigens in auxotrophic *Mycobacterium bovis* BCG. **Biological Research**, 43, 13-18 (2010).

VORDERMEIER, Martin and HEWINSON, Glyn. Development of cattle TB vaccines in the UK. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 112, 38–48 (2006).