UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
INSTITUTO BUTANTAN

**ANÁLISE DO LOCUS DE β -LACTAMASE DE BCG COMO SÍTIO DE
INSERÇÃO DE ANTÍGENOS HETERÓLGOS**

SORAIA FERINI NAMORA
Dissertação de Mestrado

Orientadora
Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite

São Paulo, 13 de agosto de 2004.

"Análise do locus de β -lactamase de BCG como sítio de inserção de antígenos heterólogos"

SORAIA FERINI NAMORA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. LUCIANA CEZAR DE CERQUEIRA LEITE
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Aprovada por:

Prof. Dr. EMMANUEL DIAS NETO
FM - USP

Aprovada por:

Profa. Dra. MARILIS DO VALLE MARQUES
ICB - USP

SÃO PAULO
26 DE OUTUBRO DE 2004.

Aos **meus pais e irmão** por **TUDO** o que sou,
pelo eterno apoio, força e por sempre acreditarem
em meu potencial. E pelos “paitrocínios”...
Amo vocês.

Ao **Fabio** pelo carinho, amor, paciência e broncas construtivas...
Amo você.

À **Luciana** por me permitir fazer parte de sua equipe e pelo enorme aprendizado.
Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química da USP e ao Instituto Butantan.

Às professoras doutoras Denise de Oliveira Silva e Ohara Augusto pela iniciação científica em seus laboratórios.

A todos os meus professores de graduação e pós-graduação.

Aos doutores Paulo Lee Ho, Ana Lúcia T. O. do Nascimento, Elisabeth Martins, Martha Tanizaki e Waldely Dias pelas reuniões, seminários e super ajuda com os camundongos.

Aos colegas: Dr. Ivan Nascimento (pelo primeiro gel de agarose), Dra. Márcia Gamberini (pelo primeiro todo o resto, incluindo fluxo, transformação, etc.), Dra. Eliane Miyaji (por sempre saber TUDO).

Às colegas super poderosas: Paula, Ana Paula, Michelle, Jamile, Sheyla, Fernanda, Léo, Dani, Ingrid, Eliane pelas conversas sempre animadas, fofocas e adjacências...ao Digão pelas risadas...

A todas as outras pessoas dos laboratórios de BCG recombinante e Biotecnologia Molecular que contribuíram com esse trabalho.

Aos amigos de IQ: Marco, Patrícia, Érica, Rodrigo (Peta), Gustavo, Lia, Tatiana, Célio, Marcelo, Fernando, Alexandre, Edilaine.

Aos colegas de provação espiritual da turma de 1996.

À FAPESP pelo apoio financeiro a este projeto.

ÍNDICE

1. Introdução	pág. 1
1.1. Tuberculose	pág. 1
1.1.1. A tuberculose no mundo	pág. 3
1.1.2. Situação atual da doença no Brasil	pág. 4
1.2. BCG	pág. 6
1.3. Recombinação homóloga em BCG	pág. 8
1.4. Antibióticos β -lactâmicos	pág. 11
1.5. Resistência micobacteriana aos antibióticos β -lactâmicos	pág. 15
1.6. Toxina Lábil de <i>E. coli</i> (LT)	pág. 17
1.6.1. Estrutura e poder adjuvante	pág. 17
1.6.2. A subunidade A	pág. 19
1.6.3. O pentâmero B	pág. 20
1.6.4. Moléculas mutantes de LT	pág. 20
2. Objetivos	pág. 22
3. Materiais e Métodos	pág. 23
3.1. Cepas bacterianas e meios de cultura	pág. 23
3.2. Transformação de <i>E. coli</i> DH5 α quimio-competente	pág. 23
3.3. Preparação de BCG eletrocompetente e preparações vacinais	pág. 23
3.4. Eletroporação de BCG Competente	pág. 24
3.5. Manipulações de DNA	pág. 24
3.6. Extração de DNA genômico de <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. smegmatis</i>	pág. 25
3.7. Biblioteca de DNA genômico de <i>M. smegmatis</i>	pág. 26
3.8. PCR de DNA genômico de <i>M. smegmatis</i>	pág. 26
3.9. Clonagem e interrupção do gene da β -lactamase de BCG	pág. 27
3.10. Vetor pUC18/higromicina (<i>hyg</i>)/ <i>sacB</i>	pág. 27
3.11. Construção do vetor pUC18/higromicina (<i>hyg</i>)/ <i>sacB</i> / β -lactamase	pág. 28
3.12. Curva de crescimento micobacteriano	pág. 28
3.13. PCR para obtenção do gene da LT-K63 para vetores micobacterianos	pág. 28
3.14. Clonagem de LT-K63 em pMIP12	pág. 30
3.15. Expressão de LT-K63 em BCG	pág. 30
3.16. Imunizações de camundongos Balb/c com BCG-LT-K63	pág. 30
4. Resultados	pág. 32
4.1. Clonagem e sequenciamento do gene da β -lactamase de BCG	pág. 32
4.2. Obtenção do gene truncado da β -lactamase (<i>blam'</i>)	pág. 34
4.3. Construção do vetor suicida pUC18/ <i>hyg</i> / <i>sacB</i> / <i>blam'</i>	pág. 36
4.4. Ensaio para obtenção do gene da β -lactamase de <i>M. smegmatis</i>	pág. 39
4.4.1. Obtenção de biblioteca de expressão a partir de DNA genômico de <i>M. smegmatis</i>	pág. 39
4.4.2. Estudos para obtenção do gene da β -lactamase de <i>M. smegmatis</i> por PCR	pág. 41
4.5. Ensaio de recombinação homóloga em BCG com o vetor suicida	pág. 45
4.6. Experimentos de PCR para confirmação da recombinação homóloga	pág. 49
4.7. Caracterização do clone	pág. 52
4.8. Novo experimento de recombinação homóloga	pág. 53
4.9. Clonagem e expressão de LT-K63 em BCG	pág. 53
5. Discussão	pág. 55
5.1. Experimentos para interrupção do gene da β -lactamase	pág. 55
5.2. Expressão de LT-K63 em BCG recombinante	pág. 59
6. Conclusões	pág. 62
7. Referências Bibliográficas	pág. 65

Resumo

ANÁLISE DO LOCUS DE β -LACTAMASE DE BCG COMO SÍTIO DE INSERÇÃO DE ANTÍGENOS HETERÓLGOS

A tuberculose, doença causada pelo patógeno *M. tuberculosis*, é um dos grandes problemas da saúde pública mundial. A única vacina disponível contra tuberculose é o *M. bovis* BCG.

As micobactérias são naturalmente resistentes a uma grande variedade de antibióticos, entre os quais os β -lactâmicos, que são as penicilinas e cefalosporinas. O mecanismo mais comum de resistência aos antibióticos é a produção de β -lactamase, que cliva o anel β -lactâmico. Nas micobactérias, o mecanismo parece ser um pouco mais complexo, já que a parede celular dessas bactérias contém os ácidos micólicos, que conferem característica altamente hidrofóbica à parede.

O objetivo deste projeto foi a disrupção do gene da β -lactamase de BCG por recombinação homóloga, para investigação do papel desta na resistência de micobactérias a antibióticos β -lactâmicos, e da possibilidade de utilizá-la como sítio de inserção de cassete de expressão de antígenos heterólogos.

Para tal, foi clonado o gene β -lactamase de BCG, que posteriormente, foi truncado e inserido em um vetor suicida, contendo gene de resistência a higromicina e o gene *sacB* para contra-seleção. BCG então foi transformado com este vetor. Verificou-se que após a primeira etapa de recombinação, as bactérias cresciam pouco, sendo, provavelmente, a β -lactamase, um gene essencial. Infelizmente, não foram obtidos mutantes secundários.

Verificou-se também que é possível a expressão de LT em rBCG, utilizando-se vetores extracromossomais, o que abre a possibilidade de expressão no genoma micobacteriano.

1. Introdução

1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) continua sendo um importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 1,7 bilhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, correspondendo a um terço da população mundial. Nos países desenvolvidos, cerca de 40.000 mortes são devidas à tuberculose e mais de 400.000 casos novos são descobertos a cada ano (1). Nesses países, a tuberculose é mais freqüente entre as pessoas idosas, nas minorias étnicas e imigrantes estrangeiros. Nos países em desenvolvimento, estima-se que ocorram cerca de 2,8 milhões de mortes por tuberculose e 7,5 milhões de casos novos por ano, atingindo a todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos. Com o surgimento, em 1981, da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), vem-se observando, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, um crescente número de casos notificados de tuberculose em pessoas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A tuberculose é, nos dias atuais, a principal causa de morte dos indivíduos infectados pelo HIV.

O principal agente etiológico da tuberculose é o bacilo de Koch, ou *Mycobacterium tuberculosis*. Existem, entretanto, outras micobactérias que podem causar a doença. O complexo *M. tuberculosis* é constituído de várias espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Outras espécies de micobactérias podem produzir quadro clínico semelhante à tuberculose, sendo necessário para diagnóstico diferencial, a cultura e a identificação das mesmas, pelos laboratórios de referência. O reservatório

bacteriano principal é o homem. Em algumas regiões, o gado bovino doente. Em raras ocasiões, os primatas e outros mamíferos.

Em geral, a fonte de infecção é o indivíduo com a forma pulmonar da doença, eliminando bacilos para o exterior por aerosol. Calcula-se que durante um ano, numa comunidade, uma fonte de infecção poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas que com ela tenham tido contato. A fala, o espirro e, principalmente, a tosse de um doente de tuberculose pulmonar bacilífera, lançam no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados. As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente e as mais leves permanecem em suspensão no ar. Os núcleos das gotículas, com 1 a 2 bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos e aí iniciar a multiplicação. Após a infecção pelo *M. tuberculosis*, transcorrem, em média, 4 a 12 semanas para detecção das lesões primárias. A maioria dos novos casos de doença pulmonar ocorre em torno de 12 meses após a infecção inicial. A probabilidade de o indivíduo vir a ser infectado e de que essa infecção evolua para a doença depende de múltiplas causas. As condições sócio-econômicas são essenciais para essa multicausalidade. A evolução depende também do indivíduo estar sendo infectado pela primeira vez (primo-infecção) ou reinfectado (reinfecção exógena). A probabilidade de adoecer em uma primo-infecção depende da virulência do bacilo, da fonte infectante e das características genéticas dos indivíduos infectados. Em novo contato, após uma infecção natural ou induzida pela BCG, a resistência depende da resposta imunológica. O risco de adoecimento é maior nos menores de 5 anos, nos adolescentes, adultos jovens e nos idosos. As reativações de infecções antigas e latentes explicam grande parte dos casos de doença em idosos. Entre os infectados, a probabilidade de adoecer aumenta quando apresentam a infecção pelo

vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras formas de imunodepressão. Também é maior nas pessoas desnutridas, com silicose, diabetes e usuários de drogas endovenosas.

A tuberculose não apresenta variações cíclicas ou sazonais, de importância prática. A prevalência observada é maior em áreas de grande concentração populacional e precárias condições sócio-econômicas e sanitárias. A distribuição da doença é mundial, com tendência decrescente da morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos. Nas áreas com elevada prevalência de infecção pelo HIV, vem ocorrendo estabilização ou aumento do número de casos e óbitos por tuberculose. Estão mais sujeitos à doença indivíduos que convivam com doente bacilífero, determinados grupos com redução da imunidade, como os silicóticos e pessoas que estejam em uso de corticosteróides ou infectados pelo HIV.

1.1.1. A tuberculose no mundo

Como já mencionado, o padrão sócio-econômico tem influência direta no número de casos de tuberculose. É de se esperar, portanto, que os países em desenvolvimento sejam os principais nichos da doença. No Gráfico 1 (2, 3), pode-se verificar que apenas 22 países (destaque em laranja) são responsáveis por cerca de 80% dos casos do mundo.

Gráfico 1. Informações sobre a epidemiologia de TB no mundo. Em destaque laranja, os 22 países responsáveis por 80% dos casos do mundo. Fonte: Organização Mundial de Saúde (OMS).

1.1.2. Situação atual da doença no Brasil

No Brasil, estima-se que entre 35 a 45 milhões de pessoas estejam infectados pelo *M. tuberculosis*, com aproximadamente 100 mil casos novos por ano. O número de mortes pela doença em nosso meio é de 5 a 6 mil, anualmente (1). Com a introdução de novos esquemas de curta duração, na década de 1980, a tuberculose estabilizou-se no patamar entre 70 e 90 mil casos/ano. O modelo adotado no seu controle, de excessiva centralização da assistência, o longo tempo exigido para os tratamentos atualmente disponíveis (mínimo de seis meses) e o adensamento populacional nas periferias das grandes cidades sem adequada condição sanitária, entre outros fatores, influíram no estabelecimento dessa situação. Sobre a tuberculose, registre-se ainda que a associação com a AIDS tem impulsionado seu crescimento em todo o mundo. No Brasil, cerca de 25,5% dos casos de AIDS apresentam a tuberculose como doença associada.

O Gráfico 2 (1) mostra a evolução do número total de casos de tuberculose no Brasil entre 1980 e 2000. Pode –se observar que apesar das tentativas de conter a doença o número de casos e de óbitos varia pouco. Existem algumas diminuições no número de casos nos anos de 1980, 1990, 1993 e 1994, o que não implicou em diminuição no número de óbitos.

Tuberculose (todas as formas) - Casos confirmados e óbitos. Brasil, 1980 - 2000

Fonte: MS/FUNASA/CENEPI/ MS/SVS.

Gráfico 2. Número total de casos de tuberculose no Brasil entre 1980 e 2000. Nele estão representados também o número de óbitos ocorridos no período. Fonte: Fundação Nacional de Saúde (Funasa) e Ministério da Saúde (MS).

As estatísticas mais recentes da Organização Mundial da Saúde apresentam os seguintes dados:

Tabela I: Estatísticas recentes da incidência de tuberculose no Brasil.

POPULAÇÃO	176.257.330
Classificação Mundial (número de casos estimados)	15º
Incidência (casos/100.000 habitantes)	62
Mortalidade (casos/ 100.000 habitantes)	8
% de adultos (15-49 anos) TB + HIV	3,8
% novos casos TB multi-droga resistentes	0,9

Fonte: OMS (WHO Report 2004).

1.2. BCG

BCG ou Bacilo Calmette-Guérin é uma cepa derivada de *Mycobacterium bovis* virulento (4). Em 1908, Calmette e Guérin, no Instituto Pasteur de Lille, começaram a cultivar a cepa virulenta de *M. bovis* com passagens a cada três semanas, por 231 passagens, em meio contendo batata e 5 % de bile bovina glicerizada. A adição de bile bovina dispersou os grumos bacterianos em organismos separados, tornando possível a seleção de clones individuais. Após 39 passagens, Calmette observou uma mudança drástica na morfologia das colônias. Este variante de *M. bovis* não era mais patogênico para camundongos, cobaias e macacos. Além disso, era capaz de induzir resistência significativa contra micobactérias virulentas, entre elas *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Em 1921, Calmette inoculou oralmente essa nova cepa em um recém-nascido cuja mãe havia recentemente morrido de tuberculose. A criança sobreviveu. Em 1928, a Liga das Nações aprovou o uso de BCG para vacinação humana e animal.

Desde então e até os dias de hoje, o BCG continua sendo a única vacina disponível contra tuberculose. Já foram administradas mais de 3 bilhões de doses e a vacina mostrou-se extremamente segura, com casos raros de complicações sérias (razão de $0,19/10^6$ imunizações). É recomendado seu uso ao nascimento e uma única dose leva à proteção duradoura. O custo de produção da vacina é baixo.

A proteção conferida pelo BCG contra tuberculose pulmonar varia entre 0 a 70%. Vários estudos evidenciam que, em crianças, a aplicação de BCG diminui a incidência de formas graves de tuberculose, como a meningite e a forma miliar (1). A vacina BCG é administrada sem prova tuberculínica prévia, na dose de 0,1 mL. É indicada para crianças na faixa etária de 0 a 4 anos, sendo obrigatória, no Brasil, para as crianças menores de um ano. Os recém-nascidos e crianças soropositivas para HIV ou filhos de mães com AIDS, desde que não apresentem os sintomas da doença, deverão ser vacinados. Recomenda-se o adiamento da aplicação da vacina nos seguintes casos: peso ao nascer inferior a 2 kg; reações dermatológicas na área de aplicação; doenças graves; uso de drogas imunossupressoras. Há contra-indicação absoluta para aplicar a vacina BCG nos portadores de imunodeficiências congênitas ou adquiridas.

Além de proteger contra as várias formas de tuberculose, sabe-se que BCG é um excelente adjuvante. Uma prova disso é sua utilização na imunoterapia de neoplasias. As propriedades adjuvantes são provenientes de componentes da parede celular micobacteriana.

Isso tudo faz com que *M. bovis* BCG seja considerado um excelente candidato para expressão de antígenos heterólogos, principalmente antígenos virais, bacterianos e de parasitas. Ultimamente, um grande esforço tem sido empenhado para se obter vacinas multivalentes baseadas em BCG recombinante (rBCG).

Vários estudos já vêm sendo realizados em nossos laboratórios, como a expressão em rBCG de CRM-197, um mutante não tóxico da toxina diftérica (5), da subunidade S1 de pertussis (6), de uma proteína híbrida contendo toxóides pertussis-tetânico (7), entre outros. Uma grande vantagem das vacinas múltiplas baseadas em rBCG seria a redução do número de doses necessárias e, portanto, de campanhas de vacinação.

1.3.Recombinação homóloga em BCG

Recombinação homóloga é um fenômeno comum entre os organismos vivos. Muito do que se conhece sobre os mecanismos de recombinação foi obtido a partir de estudos em *E.coli*, organismo em que mutantes podem ser rapidamente obtidos e a recombinação facilmente quantificada. Entretanto, até recentemente, tem sido difícil de demonstrar este fundamento da genética em micobactérias, principalmente naquelas de crescimento lento.

Muito esforço tem sido empenhado no desenvolvimento da metodologia de troca alélica, para a disrupção seletiva de genes de variadas espécies de micobactérias. Vários grupos usaram fragmentos lineares de DNA, tanto longos quanto curtos, ou ainda vetores suicidas para conseguir a troca alélica em micobactérias de crescimento rápido e lento. A troca alélica em micobactérias de crescimento rápido, como *M. smegmatis*, é mais fácil do que em micobactérias de crescimento lento, como *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG (17). Os primeiros trabalhos que tiveram sucesso na obtenção de mutantes de BCG por troca alélica mostraram que a eficiência do processo foi dez vezes menor do que em *M. smegmatis*. Isso leva à idéia de que a maquinaria de recombinação das micobactérias de crescimento lento é ineficiente. Uma das enzimas-chave na recombinação ou reparo em bactérias é a proteína RecA. Estudos mostraram que as estruturas dos genes *recA* em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG são diferentes (18). O gene *recA* de micobactérias patogênicas, incluindo *M. bovis*

BCG, contém uma sequência que codifica para uma inteína (intron da proteína). A proteína RecA ativa de micobactérias patogênicas é obtida por splicing pós-transcricional e a presença de RecA inativa bloqueia a atividade de RecA ativa (19). O baixo nível de rearranjo de genes em BCG pode ser devido a essa maturação não usual de RecA.

Entretanto, um trabalho realizado por Pavelka e col. (20) mostrou que a recombinação homóloga em *M. bovis* e *M. tuberculosis* é tão eficiente quanto em *M. smegmatis*. Existe uma pequena diferença no número de recombinantes primários obtidos nas micobactérias de crescimento lento, mas a de frequência de recombinação é muito parecida. Atribuiu-se ao menor número de recombinantes primários a maior dificuldade de entrada de DNA no interior das micobactérias de crescimento lento.

A primeira demonstração de recombinação homóloga em micobactérias utilizando vetores suicidas foi a disrupção do gene *pyrF* por Husson e col. (21) em *M. smegmatis*. Já em *M. bovis* BCG, o primeiro sucesso a partir dessa estratégia foi obtida por Reyrat e col. em 1995 (18), na disrupção do gene *ureC*, em que 4% dos transformantes haviam sofrido troca alélica.

Uma abordagem para selecionar com maior eficiência os transformantes e ainda gerar mutantes sem marcadores de resistência a antibióticos é utilizar no plasmídeo o gene *sacB* de *Bacillus subtilis*, que codifica para uma levansucrase e leva os transformantes por recombinação ilegítima a morte na presença de 10% de sacarose (22 e 23). Desse modo, após uma dupla seleção, sendo a primeira feita por resistência a antibiótico e a contra seleção em meio contendo sacarose, são obtidos os mutantes desejados em uma maior porcentagem.

O procedimento básico para obtenção dos mutantes consiste na utilização de um vetor suicida, que contém o gene estudado mutado, um gene de resistência a antibiótico e o gene *sacB*, para contra-seleção (22). (Esquema 1)

Esquema 1. Obtenção de mutantes BCG-*blam*⁻ através da troca alélica em dois passos. Inicialmente, ocorre a integração do vetor no cromossomo. Um segundo evento de recombinação, que ocorre em baixa frequência, pode levar ao mutante desejado ou à reversão, resultando em bactérias selvagens.

A troca alélica é realizada em dois passos. O plasmídeo é eletroporado nas células e os recombinantes primários são selecionados primeiramente em meio com antibiótico. Como este tipo de plasmídeo não possui origem de replicação em micobactérias, todas as colônias resistentes obtidas têm que ter integrado o plasmídeo no cromossomo. Como o gene *sacB* está presente no vetor integrado, todos os mutantes resistentes ao antibiótico são também sensíveis a sacarose. Os mutantes primários são crescidos em meio líquido até a saturação. Durante esse tempo, deverá ocorrer um segundo evento de recombinação homóloga, em que parte do plasmídeo é perdida, entre os genes de resistência a antibiótico

e *sacB*, podendo haver dois possíveis resultados: a) reversão total do processo com a obtenção de bactérias selvagens; b) o alelo mutado permanece integrado ao cromossomo, eliminando o alelo selvagem junto com os genes provenientes do vetor, resultando no fenótipo mutado. Esse segundo evento de recombinação ocorre em frequências muito baixas, tornando-se necessária a seleção com sacarose. Todos os clones que não sofreram o segundo evento de recombinação morrerão na presença de sacarose. Nos clones resistentes a sacarose, verifica-se então a presença ou não da deleção do gene por PCR a partir do DNA genômico da micobactéria selecionada. Alguns clones resistentes a sacarose também poderão ter sofrido mutação no gene *sacB*, o que em geral ocorre em mais baixa frequência.

1.4. Antibióticos β -lactâmicos

Em 1928, Alexander Fleming observou uma contaminação por fungo em uma placa em que havia semeado *Staphylococcus*. Verificou que em torno do fungo não cresceram bactérias. O fungo foi posteriormente identificado como *Penicillium notatum* (Fig.1). Estava descoberta a penicilina, composto que revolucionou a medicina (15).

Figura 1. Inibição do crescimento bacteriano pelas três colônias circulares de *Penicillium notatum*. (Merck & Co.) (16)

A penicilina pertence a um grupo de antibióticos chamados de β -lactâmicos. Todos os membros deste grupo possuem um anel β -lactâmico em sua estrutura. Os antibióticos dessa família atuam na formação da parede celular bacteriana, portanto, apenas durante a divisão celular. Os alvos desses antibióticos são as transpeptidases (ref), as enzimas que ligam as cadeias de peptidoglicano entre si. As transpeptidases são também conhecidas como PBP, penicillin binding proteins ou proteínas ligadoras de penicilina.

Figura 2. **A.** Estrutura da penicilina G ou benzil-penicilina. O anel β -lactâmico é mostrado em azul e vermelho. A seta verde indica o local de atuação da enzima (β -lactamase) que quebra o anel, mecanismo de resistência desenvolvido por muitas bactérias (16). **B.** Estrutura do peptidoglicano encontrado na parede bacteriana (NAM: ácido N-acetilmurâmico, NAG: ácido N-acetilglicosamínico, Peptide Bridge: Ponte peptídica que une as cadeias, dando estrutura rígida ao peptidoglicano).

A estrutura química do anel β -lactâmico é muito parecida com a da ligação peptídica (Figura 2). As cadeias de peptidoglicano são unidas entre si através de peptídeos durante a divisão bacteriana. A presença do antibiótico β -lactâmico faz com

que haja uma competição entre o peptídeo e o antibiótico. Isso leva à formação incompleta do peptidoglicano, submetendo a bactéria ao meio hipotônico. A bactéria não consegue resistir à pressão osmótica e morre. Os antibióticos β -lactâmicos são, portanto, bactericidas.

Os antibióticos dessa família podem ser subdivididos em duas classes: penicilinas e cefalosporinas (Figuras 3A, B e 4). Os radicais ligados aos anéis diferenciam cada membro da família.

Figura 3. A. Estrutura básica das penicilinas. **B.** Estrutura básica das cefalosporinas (15).

Figura 4. Alguns dos principais antibióticos β -lactâmicos. Ampicilina, oxacilina e amoxicilina são do grupo das penicilinas, enquanto que a cefazolina sódica, cefaclor e cefoxitin são cefalosporinas (15).

Muitos microorganismos desenvolveram mecanismos de resistência à ação dos antibióticos β -lactâmicos. O principal mecanismo desenvolvido é a produção de uma enzima que cliva o anel β -lactâmico, as penicilinas ou β -lactamases, como são mais conhecidas. Alguns dos antibióticos β -lactâmicos possuem radicais carbônicos que os

tornam imunes às β -lactamases. Além disso, existem associações de antibióticos com inibidores das β -lactamases. O principal inibidor utilizado é o ácido clavulânico, que também possui um anel β -lactâmico em sua estrutura (Figura 5).

Figura 5. Estrutura química do clavulanato, inibidor das β -lactamases (15).

1.5. Resistência micobacteriana aos antibióticos β -lactâmicos

Sabe-se que a parede celular das micobactérias constitui uma barreira de permeabilidade eficiente e várias propriedades micobacterianas, tais como a grande quantidade de ácidos graxos, as baixas taxas de crescimento e a resistência natural a uma grande gama de antibióticos, são pelo menos parcialmente relacionadas à pobre penetração de solutos através da parede celular (8). É também bem conhecido que a parede celular micobacteriana é extremamente rica em lipídios, os quais, principalmente na forma de ácidos graxos de cadeias longas (ácidos micólicos), somam entre 30 a 60 % do peso da parede celular. Uma camada tão grossa de material lipídico certamente atua como uma barreira na penetração de solutos hidrofílicos.

Além dessa baixa permeabilidade da parede celular, a resistência das micobactérias aos compostos β -lactâmicos também é devida em parte à produção de β -lactamases (9). A presença da enzima foi detectada em um grande número de espécies, incluindo os patógenos *M. tuberculosis* e *M. leprae*. A contribuição do terceiro fator, as proteínas ligadoras de penicilinas, tem sido pouco estudado.

A β -lactamase micobacteriana melhor estudada é a de *Mycobacterium fortuitum*. Em 1997, Quinting e col. (10) conseguiram isolar a β -lactamase de *M. smegmatis*, através de sua purificação do sobrenadante da cultura, mas sem determinar a seqüência do gene que a codifica. Os vinte primeiros aminoácidos da porção N-terminal da proteína foram seqüenciados e puderam ser comparados com os de *M. fortuitum*, mostrando uma grande homologia entre essas porções das proteínas.

Já em 1998, Voladri e col. (11) conseguiram expressar a β -lactamase principal de *M. tuberculosis* em *E. coli* e assim puderam determinar suas propriedades cinéticas. Esse mesmo estudo possibilitou identificar a presença de β -lactamases distintas em *M. tuberculosis*. Foram identificados três picos de atividade β -lactamásica em purificação do sobrenadante do meio de cultura, com valores de pI 5,1, 4,9 e 4,5, que responderam por 10, 78 e 12 % da atividade enzimática, respectivamente. Entretanto, as enzimas de pI 4,9 e 5,1 mostraram-se cineticamente indistinguíveis e apresentam atividade predominantemente de penicilinase. Já a enzima de pI 4,5 mostrou maior atividade de cefalosporinase. A caracterização da enzima de *M. tuberculosis* expressa em *E. coli* mostrou que esta apresenta propriedades cinéticas iguais às de pI 4,9 e 5,1. Estes trabalhos mostram que a caracterização da atividade β -lactamásica é de extrema importância para o melhor conhecimento da resistência aos antibióticos e poderia possibilitar o uso desses antibióticos contra doenças micobacterianas, desde que combinadas com um inibidor da enzima, por exemplo, o ácido clavulânico (12).

Essa caracterização enzimática não mostra, contudo, quanto da resistência a antibióticos é devida à parede micobacteriana e quanto é devido à produção de β -lactamase. Por outro lado, estudos previamente realizados com *M. fallax*, única micobactéria sensível aos antibióticos β -lactâmicos, quando transformada com plasmídeo contendo o gene da β -

lactamase de *M. fortuitum* adquiriu resistência aos mesmos (13). Um outro estudo realizado com *M. smegmatis*, em que um mutante mais resistente aos antibióticos β -lactâmicos foi gerado por mutagênese química, não se constatou alteração de atividade β -lactamásica, mas apenas alterações na parede celular (14). Uma forma de se determinar quanto da resistência é conferido pela atividade β -lactamásica, seria um estudo de disrupção gênica, em que a atividade da enzima seja eliminada.

1.6. Toxina Lábil de *E. coli* (LT)

1.6.1. Estrutura e poder adjuvante

Relativamente poucas moléculas são altamente imunogênicas quando em contato com superfícies de mucosas, no sentido de gerar forte resposta humoral e alta secreção de anticorpos. Tais moléculas são chamadas de imunógenos ou adjuvantes de mucosas.

Os melhores imunógenos de mucosa conhecidos são a toxina colérica (CT) e a enterotoxina lábil de *E. coli* (heat labile toxin, LT), as moléculas que causam grave desidratação e a chamada diarreia do viajante, respectivamente. O sistema imune de mucosa reconhece de alguma forma que tais toxinas são uma ameaça e pouco tempo depois que as toxinas entram em contato com alguma superfície de mucosa, uma forte resposta imune é desenvolvida contra elas. Esta resposta antitoxina é tão potente que às vezes uma resposta imune forte e facilmente mensurável é ativada contra outras moléculas estranhas que estão simultaneamente presentes na superfície de mucosa (30).

Como consequência dessa propriedade imunogênica, CT e LT têm sido extensivamente exploradas como imunógenos e adjuvantes em modelos animais. Entretanto, a alta toxicidade de CT e LT as torna inadequadas para uso humano. Mutações sítio-dirigidas, guiadas pela estrutura cristalina ajudaram a entender o que faz estas moléculas tão especiais em termos de imunidade de mucosa. Assim como CT, a LT faz parte das toxinas bacterianas da classe AB. É composta por uma unidade pentamérica B que se liga ao receptor na superfície das células eucarióticas, e por uma unidade enzimaticamente ativa A, subunidade responsável pela toxicidade (Figura 6).

Figura 6: **A.** Estrutura da subunidade B da proteína LT. A figura mostra o pentâmero, de aproximadamente 55 kDa, responsável pela ligação da proteína na célula do hospedeiro. **B.** Estrutura da LT, com suas duas subunidades. A subunidade A ainda pode ser dividida em A₁ e A₂, sendo A₁ responsável pela toxicidade e A₂ a α -hélice responsável pela ligação das subunidades (29).

1.6.2. A subunidade A

A subunidade A é composta de uma estrutura globular ligada ao oligômero B por um “loop” sensível à tripsina e uma longa α -hélice, a porção C-terminal que entra na cavidade central o oligômero B, ancorando a subunidade A ao pentâmero B. Com a clivagem proteolítica do “loop”, a subunidade A é dividida em A₁, porção globular enzimaticamente ativa e A₂, porção C-terminal, que se mantêm ligados por uma ponte dissulfeto entre A₁-Cys187 e A₂-Cys199. Para que a unidade A₁ se torne enzimaticamente ativa, é necessária a redução da ponte dissulfeto, além da clivagem proteolítica do “loop”. A subunidade A₁ possui atividade ADP-ribosilase, que se liga a NAD e transfere a ADP-ribose para a subunidade α de várias proteínas ligadoras de GTP, que são envolvidas na transdução de sinal.

A seqüência de eventos que ocorrem durante a intoxicação de células eucarióticas envolvem a ligação da toxina ao receptor e sua internalização em vesículas que a transportam ao Complexo de Golgi. Subseqüentemente, as subunidades A e B são dissociadas e a subunidade A é transportada do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático, enquanto a subunidade B permanece no complexo de Golgi e depois é degradado. A subunidade A₁ é então translocada do retículo endoplasmático para o citosol, onde interage com os fatores de ADP-ribosilação solúveis e é ativada. Finalmente, a subunidade A₁ ADP-ribosila a subunidade de G_s e possivelmente outras proteínas G localizadas na membrana plasmática.

1.6.3. O pentâmero B

O oligômero B é uma molécula de 55 kDa, que se associa em uma forma pentamérica. A estrutura é compacta, resistente à tripsina e requer fervura na presença de SDS para ser dissociada. As cinco subunidades são arranjadas em uma estrutura cilíndrica, com uma cavidade central que expõe, em um dos lados, cinco cavidades simétricas responsáveis pela ligação ao receptor das células eucarióticas. O sítio de ligação ao receptor é específico para uma variedade de moléculas que contém galactose. LT se liga a GM1 majoritariamente, além de lipídios e receptores de glicoproteínas presentes nos intestinos de coelhos e humanos. De forma geral, duas propriedades são associadas ao oligômero B: a habilidade para se ligar ao receptor e a indução de apoptose de células CD8⁺ e, em menor extensão, CD4⁺

1.6.4. Moléculas mutantes de LT

Para estudar a estrutura e função de LT, assim como para definir moléculas que não são tóxicas, mas ainda assim ativas como adjuvantes de mucosa e imunógenos, vários mutantes, obtidos através de mutação sítio-dirigida, foram estudados e caracterizados.

Mutantes da subunidade B, independentemente expressos, foram os primeiros derivados não-tóxicos de LT produzidos. Um mutante de LTB, defeituoso na ligação ao receptor, não é imunogênico nas superfícies mucosas, sugerindo que um sítio de ligação intacto é necessário tanto para ligação quanto para imunogenicidade. Dados a respeito do poder adjuvante de mutantes deste tipo, em que não há atividade enzimática, nem ligação ao receptor, são controversos. Mutantes de LTB que não se ligam ao receptor também perdem outras atividades imunomoduladoras, incluindo a habilidade de induzir apoptose de células CD4⁺ e CD8⁺.(30, 31)

Holotoxoides, mutantes da toxina que não possuem atividade enzimática, também não possuem toxicidade *in vitro* ou *in vivo*. Esta classe de mutantes inclui LTK63, que possui uma lisina na posição 63, em substituição a serina na subunidade A. A estrutura de raios-X do mutante LTK63 é idêntica à da LT selvagem dentro de toda a molécula, com exceção do sítio ativo, em que a cadeia lateral da lisina preenche a cavidade catalítica, tornando-a inviável para atividade enzimática. LTK63 é excelente adjuvante de mucosa, ainda que tal atividade seja bastante reduzida quando comparada com LT selvagem (30, 32). Esta atividade adjuvante foi demonstrada com uma série de antígenos-modelo, tais como ovalbumina e antígenos protetores de patógenos bacterianos e virais. LTK63 é um imunógeno melhor que LTB (30), sugerindo que há um papel importante para a subunidade A enzimaticamente inativa na modulação da resposta imune.

Uma outra classe de mutantes é a LTR72, que contém uma arginina na posição 72 da subunidade A, substituindo uma alanina. Este mutante tem aproximadamente 1% da atividade ADP-ribosilante. É um excelente adjuvante de mucosa, tão eficiente quanto LT selvagem. Este holotoxoide tem toxicidade baixa o suficiente para ser usada em humanos.

2. Objetivos

Os objetivos do projeto são a disrupção do gene da β -lactamase de BCG, através da técnica de recombinação homóloga, utilizando a contra-seleção com *sacB*, e a posterior investigação de seu papel na resistência de micobactérias a antibióticos β -lactâmicos. Este mutante poderia ser utilizado como vacina contra TB, mais susceptível ao tratamento com antibióticos, a ser usada em pacientes imuno comprometidos. No caso deste gene não ser essencial, poderia então ser utilizado como sítio de inserção de cassetes de expressão de genes heterólogos.

Para obter o mutante β -lactamase⁻, será necessário clonar e sequenciar o gene da β -lactamase nativo de *M. bovis* BCG, em seguida truncá-lo e adicioná-lo a um vetor especialmente construído para recombinação homóloga em micobactérias. Os passos seguintes são a seleção dos mutantes, inicialmente em higromicina e posteriormente em sacarose. A confirmação final deve ser feita através de PCR e só então poderá ser testada a susceptibilidade da nova cepa aos antibióticos β -lactâmicos. Além disso, tenta-se a obtenção de um mutante similar em *M. smegmatis*, uma micobactéria de crescimento rápido, em que a recombinação homóloga ocorre mais facilmente. Este mutante poderia fornecer dados comparativos.

Uma outra vertente do projeto visa investigar a expressão de LT (heat-labile toxin de *E. coli*) em BCG recombinante e um possível efeito adjuvante dessa proteína em BCG, levando a uma modulação da resposta imunológica contra tuberculose. Para isso, será necessário clonar o gene em vetor apropriado para expressão micobacteriana, verificar sua expressão por Western Blot e avaliar sua imunogenicidade em camundongos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cepas bacterianas e meios de cultura

As cepas bacterianas utilizadas foram *M.bovis* BCG cepas Pasteur e Moreau, *M. smegmatis* mc²155 e *E. coli* DH5 α . As micobactérias foram crescidas em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com ADC (Difco), ou em meio sólido Middlebrook 7H10 (Sigma) suplementado com OADC (Difco). Já para *E. coli*, utilizaram-se os meios LB (Gibco BRL) e LB-Ágar (Gibco BRL). Quando necessário, antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações: kanamicina, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; cloranfenicol 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ampicilina, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e higromicina, 20 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Sacarose foi utilizada a 2 e 10% de concentração final no meio.

3.2. Transformação de *E. coli* DH5 α quimio-competente

Descongelou-se bactéria competente armazenada a -80 °C no gelo por 15 min. Plasmídeo foi adicionado e as bactérias foram mantidas no gelo por 30 min. Em seguida, as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 2 min, retornaram ao gelo por mais 5 min e depois foram colocados em 300 μL de meio LB. Seguiu-se uma incubação de 1h a 37°C e depois as bactérias foram plaqueadas em LB-Ágar contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$).

3.3. Preparação de BCG eletrocompetente e preparações vacinais

Colocou-se uma colônia isolada de BCG (cepas Moreau ou Pasteur) em 200 mL de meio Middlebrook 7H9 suplementado com ADC e cerca de 3 a 4 semanas depois foi obtida uma cultura com densidade óptica a 600 nm (D.O._{600}) entre 0,6 e 0,8. A cultura foi

centrifugada em frascos estéreis a $4000 \times g$ por 15 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em 200 mL de água MilliQ estéril e novamente centrifugado nas mesmas condições. O precipitado bacteriano foi novamente lavado em 100 mL de água e centrifugado. Lavou-se o precipitado então com 10 mL de glicerol 10% estéril gelado e nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi então ressuspendido em 1 mL de glicerol 10%. Foram feitas alíquotas de 50 µL e estas congeladas a -80°C.

Para obtenção das preparações vacinais, o procedimento é muito parecido com a preparação de BCG eletrocompetente. A única diferença está no número de lavagens da massa celular bacteriana. É feita uma única lavagem com 100 mL de água MilliQ estéril geleda. O restante do procedimento é idêntico.

3.4. Eletroporação de BCG Competente

Adicionou-se 1 µg de plasmídeo (aproximadamente 1-2 µL) em 50 µL de BCG eletrocompetente. A mistura foi colocada em cubetas de eletroporação previamente geladas. O eletroporador usado foi modelo Gene Pulser Biorad. O pulso dado foi realizado nas seguintes condições: 2,5 volts, 200 Ω de resistência e 25 µF de capacitância. A mistura foi diluída em 5 mL de meio Middlebrook 7H9 suplementado com ADC e incubada por 24 h a 37 °C sob agitação. Após esse período, a cultura foi plaqueada em meio Middlebrook 7H10 suplementado com OADC e higromicina em concentrações variáveis.

3.5. Manipulações de DNA

As minipreparações e midipreparações de DNA plasmidial, assim como a extração de DNA de gel de agarose, foram realizadas com Concert Rapid Plasmid Miniprep e

Midiprep Systems e Concert Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL), respectivamente. A subclonagem dos genes foi realizada através dos sistemas Sure Clone (Amersham Pharmacia Biotech) e pGEM T (Promega). As enzimas de restrição e Taq DNA polimerase foram adquiridos da Gibco BRL, Invitrogen e Amersham Pharmacia Biotech. Os plasmídeos usados foram pUC18 e pBC adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech.

3.6. Extração de DNA genômico de *M.bovis* BCG e *M.smegmatis*

DNA genômico das micobactérias foi isolado de acordo com procedimento descrito por Pelicic e col. (22) com algumas modificações. Inicialmente, centrifugou-se 5 mL de uma cultura de micobactéria com D.O.₆₀₀ entre 0,6 e 0,8 por 15 min a $5000 \times g$. O precipitado foi ressuspendido em 250 μ L de solução I (25% de sacarose, Tris-HCl pH 8,0 50 mmol.L⁻¹, EDTA 50 mmol.L⁻¹, lisozima 500 μ g mL⁻¹) e incubado durante a noite a 37 °C. Adicionaram-se 250 μ L de solução II (Tris-HCl pH 8,0 100 mmol.L⁻¹, 1% SDS, proteinase K 400 μ g.mL⁻¹) e as amostras foram incubadas por 4 h a 55 °C. O DNA foi então extraído duas vezes com 500 μ L de fenol-clorofórmio, precipitado pela adição de 50 μ L de acetato de sódio 3 mol.L⁻¹ e 2,5 mL de etanol gelado. Em seguida, centrifugaram-se as amostras a $10000 \times g$, a 4 °C por 30 min. O precipitado foi então lavado com etanol 70% gelado e uma nova centrifugação nas mesmas condições foi realizada. O DNA precipitado foi então ressuspendido em água Milli Q.

3.7. Biblioteca de DNA genômico de *M. smegmatis*

Fez-se uma biblioteca de DNA genômico da micobactéria, utilizando-se a nebulização com nitrogênio para quebrar o DNA. Para tal procedimento, foram utilizados 50 µg de DNA, 600 µL de glicerol 50% autoclavado e água autoclavada para completar 1000 µL. Nebulizou-se a amostra sob pressão de 7 kPa de nitrogênio durante diferentes intervalos de tempo. Os fragmentos foram clonados no vetor pJem17, com gene de resistência kanamicina.

3.8. PCR de DNA genômico de *M. smegmatis*

Ainda na tentativa de encontrar o gene da β -lactamase de *M. smegmatis*, foram desenhados oligonucleotídeos complementares aos da sequência de *M. fortuitum*, que também é uma micobactéria de crescimento rápido e poderia ter a sequência da enzima β -lactamase semelhante à de *M. smegmatis*, contendo sítios de restrição para a enzima KpnI (negrito).

Direto: TAG **GGT ACC** ATG ACC GGA CTA TCG CGA CG

Reverso: TAG **GGT ACC** TCA GAG TAA GGA CGG CAG CA

Várias condições de PCR foram testadas, mas a que resultou em bandas amplificadas foi: 94°C / 5 min, 30 ciclos de 94 °C / 30 s, 37 °C / 50 s e 72 °C / 3 min; e finalmente 72 °C / 7 min e mantido a 4°C até ser processado.

3.9. Clonagem e disrupção do gene da β -lactamase de BCG

O gene da β -lactamase (*blam*) de BCG foi obtido por PCR, usando DNA genômico de BCG cepa Pasteur na amplificação. Os oligonucleotídeos utilizados têm seqüências complementares à seqüência do gene de *M. tuberculosis* previamente conhecida, com sítios para a enzima de restrição XbaI (negrito):

Direto: TAG TAG **TCT AGA** ATG CGC AAC AGA GGA TTC GGT

Reverso: TAG TAG **TCT AGA** CTA TGC AAG CAC ACC GGC AAC

As condições de reação de PCR utilizadas foram: 94°C / 5 min, 30 ciclos de 94 °C / 30 s, 55 °C / 50 s e 72 °C / 3 min; e finalmente 72 °C / 7 min e mantido a 4°C até ser processado. Foi necessária a adição de DMSO à mistura de reação, em volume correspondente a 10% do volume final para amplificação do gene. O produto de PCR foi clonado no sítio SmaI do vetor pUC18 (Sure Clone, Pharmacia Biotech) e foi seqüenciado.

Para trancar o gene da β -lactamase de BCG, foi feita uma digestão com a enzima Sma I e a religação dos fragmentos. A digestão provocou a eliminação de 100 pb do gene, gerando um gene truncado, *blam'*.

3.10. Vetor pUC18/higromicina (*hyg*)/*sacB*

O vetor pUC18/*hyg/sacB* foi construído pela doutora Márcia Gamberini e pela doutoranda Sheyla Grellet e foi gentilmente cedido para esse estudo. É um vetor que possui origem de replicação em *E.coli*, mas não em micobactérias, induzindo a estratégia de integração no genoma da micobactéria. O vetor também possui o gene de resistência a higromicina e o cassete de expressão de *sacB* (que expressa a enzima levansucrase), sendo letal à bactéria na presença de sacarose.

3.11. Construção do vetor pUC18/higromicina (*hyg*)/*sacB*/ β -lactamase

O gene da β -lactamase de BCG, deletado de 100 pb (*blam'*) foi inserido no vetor pUC18/higromicina (*hyg*)/*sacB* previamente construído. O gene truncado *blam'*, previamente clonado em pUC18, foi digerido com *Xba*I e posteriormente clonado nesse mesmo sítio contido no vetor pUC18/higromicina (*hyg*)/*sacB*. A construção foi confirmada por meio de ensaio de restrição e seqüenciamento.

3.12. Curva de crescimento micobacteriano

Coloca-se uma alíquota de 10 μ L de preparação vacinal em 1 mL de meio Middlebrook 7H9 com ADC. Mede-se a D.O.₆₀₀ em relação a uma referência contendo apenas meio Middlebrook 7H9 com ADC. A partir desse valor calcula-se quanto de volume de preparação vacinal é necessário para que seja obtida uma cultura de 10 mL com D.O.₆₀₀ inicial de 0,1. Faz-se a cultura e mede-se a D.O.₆₀₀ inicial. A partir daí, todos os dias retira-se uma alíquota de 500 μ L, adiciona-se mais 500 μ L de água e mede-se a D.O.₆₀₀ contra a referência contendo apenas meio. A DO₆₀₀ obtida é multiplicada por dois. O procedimento é repetido até o final da cultura.

3.13. PCR para obtenção do gene da LT-K63 para vetores micobacterianos

O gene da LT-K63 foi gentilmente cedido pelo Dr. Rino Rappuoli (Chiron Vaccines), clonado no vetor pBluescript. Para expressar a proteína em BCG, foi necessária a construção de vetores com sítios de restrição adequados para os vetores micobacterianos. Além disso, foi removida a seqüência sinal de *E. coli* e adicionada uma seqüência consenso

de Shine-Dalgarno para micobactérias entre os genes das subunidades A e B da LT-K63, para que haja melhora na expressão das proteínas.

Os vetores foram planejados de acordo com o esquema abaixo:

Esquema 2: Esquema dos primers para clonagem da LT-K63 em vetor micobacteriano. No esquema, s.s. significa seqüência sinal.

Os primers desenhados foram os seguintes:

Primer 1: TAG GGT ACC C AAA AAT ATA ACT TCA TTT TTT TTA TTT T
KpnI

Primer 2: TAG GCG GCC GC GAA TTC *CGG TAC TTC TCC TTC TAA TCC*
Not I Eco RI *Seqüência Shine-Dalgarno*
TCA TAA TTC ATC CCG AAT TCT GT

Primer 3: TAG GAA TTC ATG AAT AAA GTA AAA TGT TAT GTT
Eco RI

Primer 4: TAG CTG CAG CTA GTT TTT CAT ACT GAT TGC CG
Pst I

Foram feitas duas reações distintas. Na primeira, utilizaram-se os primers 1 e 2, para obter a subunidade A, adicionada da seqüência consenso de Shine-Dalgarno. Já na segunda, foram utilizados os primers 3 e 4, para obter a subunidade B. As condições das duas reações foram as mesmas: 94°C/ 4 min, 30 ciclos de 94 °C / 30 s, 55 °C / 50 s e 72 °C / 3 min; e finalmente 72 °C / 7 min e mantido a 4°C até ser processado.

Os produtos obtidos foram purificados e clonados em pGEM-T. *E. coli* DH5α quimio-competente foi transformada com pGEM-T e colônias resistentes foram

selecionadas. Minipreparações de DNA foram realizadas e as clonagens em pGEM-T confirmadas. Em seguida, os fragmentos LTA-K63, com a sequência de Shine-Dalgarno, e LTB foram unidos. Para isso, foram utilizados os sítios ApaI do próprio vetor pGEM-T. Foram feitas digestões com ApaI e EcoRI com os dois produtos, o que permitiu a junção de LTA-K63 com LTB em pGEM-T.

3.14. Clonagem de LT-K63 em pMIP12

O vetor pMIP12 é um vetor ponte, com origens de replicação para *E. coli* e micobactérias. Possui gene de resistência à kanamicina e o cassete Mega SD, contendo a sequência consenso de Shine-Dalgarno para micobactérias. O gene da LT-K63 foi clonado entre os sítios KpnI e PstI. Transformou-se *E.coli* DH5 α , minipreparações de DNA foram realizadas para as colônias selecionadas e digestões foram realizadas, para confirmar a construção.

3.15. Expressão de LT-K63 em BCG

BCG Moreau eletrocompetente foi transformado com vetor pMIP12/LT-K63 e incubado durante 3 a 4 semanas em placas de 7H10 suplementadas com OADC e kanamicina, para seleção dos transformantes, a 37 °C. Algumas colônias foram escolhidas ao acaso e passadas para meio líquido 7H9 suplementado com ADC e kanamicina. As colônias foram mantidas a 37 °C até atingirem D.O.₆₀₀ de 0,6. As culturas então foram centrifugadas e lavadas com TE-Prot. Após nova centrifugação, as culturas foram ressuspensas em 200 μ L de TE-Prot e mantidas a -20°C por 2 horas. Em seguida, foram sonicadas por 1,5 min. Os extratos foram então centrifugados e o pellet descartado. A

concentração protéica no sobrenadante foi determinada através do método de Bradford. Aliquotas de 25 µg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida e, após a eletroforese, a expressão de LT-K63 foi confirmada através de Western Blot. Utilizou-se anticorpo anti-LT, gentilmente cedido pela Dra. Roxane M. F. Piazza (Laboratório de Microbiologia-Instituto Butantan) na diluição 1:1000 e anticorpo anti IgG de camundongo conjugado com HRP, também na mesma diluição.

3.16. Imunizações de camundongos Balb/c com BCG-LT-K63

Grupos de seis camundongos Balb/c fêmeas foram imunizados via intra-peritoneal com salina, BCG vazio ou BCG-LT-K63. A dose de vacina foi de 10^6 bactérias em 100 µL. Foram feitas sangrias após 15 e 30 dias. Foi dada uma dose de reforço no 30º dia e mais duas sangrias foram realizadas, 45 e 60 dias após o início do experimento. Em todas as sangrias, o sangue dos animais foi mantido a 37 °C por 30 min e, em seguida, centrifugado em baixa rotação para sedimentar as hemácias, sem rompê-las. O coágulo foi descartado e com o soro foram realizados ensaios de detecção de anticorpos anti-LT e anti-proteínas de BCG, por ELISA. A diluição inicial do soro foi de 1:20 e o "coating" foi feito com 2 µg de proteínas concentradas de sobrenadante de cultura de BCG ou LT.

4. Resultados

4.1. Clonagem e seqüenciamento do gene da β -lactamase de BCG

Existindo apenas duas seqüências de genes de β -lactamase de micobactérias disponíveis nos bancos de dados (25), sendo uma de *M.tuberculosis* e a outra de *M.fortuitum* e sabendo-se que *M.bovis* e, portanto, BCG pertencem ao complexo de *M.tuberculosis*, sendo micobactérias de crescimento lento, imaginou-se que as seqüências dos genes da β -lactamase das duas micobactérias poderiam ser homólogas. Portanto, os oligonucleotídeos para amplificação foram desenhados complementares à seqüência de *M.tuberculosis*. A amplificação a partir do DNA genômico de BCG resultou em uma banda de aproximadamente 900 pb (Figura 7). Pode-se observar que foi necessária a adição de DMSO à mistura de reação para se obter a amplificação do produto de PCR.

Figura 7. Gel de agarose do produto de PCR realizado a partir do DNA genômico de BCG. **1:** Padrão de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Gibco). **2:** Produto de PCR da amplificação do gene da β -lactamase (900 pb), realizado com 10% de DMSO. **3:** Mesma reação de PCR sem adição de DMSO.

A banda de 900 pb obtida foi extraída do gel e o fragmento de DNA purificado foi subclonado em pUC18, utilizando-se o 'kit' Sure Clone. Esse vetor permite a seleção de colônias brancas e azuis quando cultivado na presença de X-Gal, para identificação de

plasmídeos que contêm o inserto. Algumas colônias brancas foram escolhidas ao acaso e cultivadas em meio líquido LB com ampicilina. A extração dos plasmídeos dessas colônias indicou alguns clones que poderiam inseridos do tamanho esperado (Figura 8, linhas 6 e 8). A presença do inserto foi confirmada por análise de restrição (dados não apresentados).

Figura 8. Gel de agarose dos plasmídeos obtidos da ligação do fragmento da Figura 7 em pUC18. **1:** Padrão de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco). **2:** Vetor vazio pUC18 (2686 pb). **3 – 8:** Clones obtidos.

Os plasmídeos contendo o gene da β -lactamase, pUC18-blam, foram seqüenciados, mostrando que a seqüência do gene da β -lactamase de BCG é idêntico ao gene de *M.tuberculosis* (Figura 9).

A: Sequência do gene da β -lactamase de BCG amplificada por PCR

```

ATGCGCAACAGAGGATTTCGGTCGTCGCGAACTGCTGGTAGCGATGGCAATGCTGG
TTTCCGTGACGGGGTGTGCACGGCATGCGAGCGGGGCGTCCGGCATCGACAAC
CTTGCCGGCCGGAGCGGATCTGGCGGATCGCTTCGCCGAGCTGGAGCGCAGATAC
GATGCCCCGGCTTGGGGTGTATGTGCCCGCCACCGGCACCACCGCCGCGATCGAAT
ACCGCGCCGATGAGCGGTTTCGCATTCTGCTCCACGTTCAAGGCGCCGCTCGTGGC(
GCGGTGCTGCACCAAAACCCGCTCACGCATCTGGACAAACTGATCACCTACACCA
GTGACGACATTCGGTCGATCTCCCCGGTGGCCCAACAACACGTTTCAGACCGGGAT
GACGATCGGGCAGCTTTGCGATGCGGCGATACGCTATAGCGACGGCACCGCCGCC
AACCTGTTGCTGGCCGATCTTGGCGGTCCCGGGGCGGCACCGCGGCATTTACCG
GCTACCTCCGCAGCTTGGGTGACACCGTGAGCCGGTTGGACGCCGAGGAACCGGA
GTTGAACCGCGATCCGCGCCGGGACGAACGGGATACCACAAACACCGCACGCCA(
CGCCCCCTGGTGTTCAGCAGCTTGTCTCGGCAACGCGTTGCCGCCGACAAGC(
GCACCTGCTCACCGATTGGATGGCGCGCAACACCACCGGAGCCAAGCGGATCCGAC

```

Figura 9 **A:** Sequência da β -lactamase obtida da amplificação do DNA genômico de BCG. Em vermelho os sítios *Sma*I. **B:** Alinhamento da sequência obtida com a sequência da β -lactamase de *M.tuberculosis*

4.2.Obtenção do gene truncado da β -lactamase (*blam'*)

Uma vez que o produto de PCR foi clonado no sítio *Sma*I de pUC18, ocorreu a eliminação deste sítio do vetor. O gene da β -lactamase de BCG contém mais dois sítios de *Sma*I, nos núcleotídeos 469 e 568. A digestão do vetor pUC18-*blam* com *Sma*I permitiu a eliminação deste fragmento de aproximadamente 100 pb. O plasmídeo digerido foi então

religado, produzindo o gene da β -lactamase truncado (*blam'*) e restituindo um sítio de *SmaI* (Esquema 3).

Esquema 3. Obtenção do gene truncado da β -lactamase (*blam'*). O gene, clonado em *SmaI* no sítio de múltipla clonagem (MCS) do vetor pUC18, é digerido com *SmaI*, nos nucleotídeos 469 e 568, resultando em um fragmento com 100 pares de bases a menos, após a ligação.

Como o gene *blam* foi amplificado com sítios de *XbaI* nas extremidades, digestões dos vetores pUC-*blam* e pUC-*blam'* com *XbaI* provocam a excisão dos fragmentos *blam* e *blam'*, respectivamente. Esse resultado é mostrado na Figura 10 e confirmado por seqüenciamento do vetor resultante (Figura 11).

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose do produto da digestão de plasmídeos pUC18/*blam'* (2 e 3) e pUC18/*blam* (4 e 5) com *XbaI* 1: Padrão de peso molecular 1kb Plus Ladder (Gibco).

Seqüência da β -lactamase truncada

```

ATGCGCAACAGAGGATTCGGTCGTCGCGAACTGCTGGTAGCGATGGCAATGCTGG
TTCCGTGACGGGGTGTGCACGGCATGCGAGCGGGGCCCCGTCCGGCATCGACAACC
TGCCGGCCGGAGCGGATCTGGCGGATCGCTTCGCCGAGCTGGAGCGCANACACGA
TGCCCGGCTTGGGGTGTATGTGCCCCGCCACCGGCACCACCGCCGCGATCGAATACT
GCGCCGATGAGCGGTTTCGATTCTGCTCCACGTTCAAGGCGCCGCTCGTGGCGGC(
GTGCTGCACCAAAACCCGCTCACGCATNTGGACAAACTGATCACCTACATCAGTG/
CGACATTTCGGTCGATCTCCCCGGTGGCCCAACAACACGTTCANACCGGGATGACG/
TCGGGCAGCTTTGCGATGCGGCGGATACGCTATANCGACGGNACCGCCGCCAACCT/
TTGCTGGCCGATCTTGGCGGTCCCCGGGACGAACGGGATACCACAACACCCGCAC
GCCATCGCCCTGGTGTTGCAGCAGCTTGTTCTCGGCAACGCGTTGCCGCCCGACAA
GCGGGCACTGCTCACCGATTGGATGGCGCGCAACACCACCAGGAGCCAAGCGGAT
CCGAGCGGGCTTCCCGCCGATTGGAAGGTGATCGACAAGACCGGGACCGGAGAC

```

Figura 11: Seqüência obtida do gene *blam'*. Em destaque o sítio *Sma*I restituído.

4.3. Construção do vetor suicida pUC18/*hyg/sacB/blam'*

Tendo obtido o gene da β -lactamase de BCG truncado (*blam'*), partiu-se para a construção do vetor para recombinação em BCG. O vetor pUC18/*hyg/sacB* havia sido construído pela Dra. Márcia Gamberini e pela estudante de doutorado Sheyla Grellet. Inicialmente, o vetor pUC18/*hyg/sacB* foi digerido com a enzima *Xba* I, para linearizar o vetor, de acordo com o Esquema 4. Em seguida, fez-se uma reação de desfosforilação, visando evitar uma eventual religação do vetor sem o inserto. Como o gene da β -lactamase foi clonado com sítios de *Xba* I nas extremidades, foi feita a ligação desse inserto purificado no vetor pUC18-*blam'* e digerido com a mesma enzima no vetor desfosforilado (Esquema 4).

Esquema 4. Obtenção do vetor suicida pUC18/hyg/sacB/blam'.

E. coli competente foi transformado com o produto de ligação. Foram obtidas doze colônias que, após crescerem em meio líquido com ampicilina, tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos. Para verificar quais desses plasmídeos continham a construção correta, inicialmente colocou-se uma alíquota de cada preparação em gel de agarose 1%, para verificar os tamanhos dos plasmídeos. Verificou-se que dez deles tinham o tamanho esperado (6550 pb). Em seguida, foram feitas digestões com as enzimas EcoRI e XbaI, seguindo o Esquema 5.

Esquema 5. Fragmentos obtidos da digestão do vetor pUC18/hyg/sacB/blam' com as enzimas EcoRI e XbaI. A digestão com XbaI produz um fragmento de 824 pb, correspondente ao inserto *β-lact*. Já a digestão com EcoRI produz um fragmento de 2010 pb, correspondente aos sítios da enzima nos genes *hyg* e *sacB*.

A análise de restrição de um dos clones indica a construção correta. Pode-se observar na digestão com EcoRI que ocorre a eliminação de um fragmento de 2010 pb, assim como no controle (Figura 12, poços 3 e 5). Já a digestão com XbaI mostra a banda do gene *blam'*, que não estava presente no controle (Figura 12, poços 2 e 6).

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos digeridos com as enzimas EcoRI e XbaI. 1: Padrão de peso molecular 1kb Plus Ladder (Gibco). 2: Vetor pUC18/hyg/sacB, digerido com XbaI. 3: mesmo, digerido com EcoRI. 4: mesmo, não digerido. 5: Vetor pUC18/hyg/sacB/blam', digerido com EcoRI. 6: mesmo, digerido com XbaI. 7: mesmo, não digerido.

Foram realizados testes preliminares em *E.coli* para verificar a eficiência dos genes de seleção *hyg* e *sacB*. Algumas colônias de *E.coli* transformadas com o vetor pUC18/hyg/sacB/blam' foram semeadas em placas LB-Ágar contendo higromicina na concentração final de 100 µg mL⁻¹. Verificou-se o crescimento das colônias, confirmando a funcionalidade do cassete de expressão da higromicina. Em seguida, essas colônias foram colocadas em meio LB-Ágar contendo sacarose a 10%. Verificou-se o crescimento das colônias. Este resultado não era esperado, uma vez que o gene *sacB* deveria expressar a

levansucrase, levando as bactérias à morte. No entanto, um último teste foi passar as colônias que cresceram em sacarose para meio LB-Ágar contendo ampicilina, já que o vetor pUC18 tem um gene de resistência a ampicilina em sua estrutura. Não houve crescimento das colônias. Esse último teste indica que os plasmídeos foram expelidos pelas bactérias durante a passagem em sacarose, o que possivelmente permitiu seu crescimento nesse meio, mas eliminou sua resistência a ampicilina.

4.4. Ensaios para obtenção do gene da β -lactamase de *M. smegmatis*

4.4.1. Obtenção de biblioteca de expressão a partir de DNA genômico de *M. smegmatis*

Uma vez que os dados da literatura mostram que a recombinação homóloga em *M. smegmatis* é mais eficiente do que em BCG (18) e seu crescimento se dá em apenas 3 a 4 dias, decidiu-se tentar a clonagem do respectivo gene da β -lactamase, para um estudo em paralelo em *M. smegmatis* análogo ao realizado em BCG. Considerando que o gene da β -lactamase confere resistência a antibióticos β -lactâmicos, como a ampicilina, propusemos fragmentar o DNA genômico de *M. smegmatis* e clonar os fragmentos de tamanho desejado em um vetor de expressão em micobactéria que não tivesse gene de resistência a ampicilina, buscando clones que apresentassem esta resistência. O plasmídeo escolhido foi pJEM17, um vetor ponte, com origem de replicação em *E. coli* e em micobactérias, usado freqüentemente na expressão de proteínas heterólogas em BCG. Esse vetor carrega o gene de resistência a kanamicina e não a ampicilina, como pUC18. Buscaram-se clones resistentes a kanamicina para depois passá-los para meio com ampicilina. As colônias resistentes a ampicilina poderiam estar então carregando o gene da β -lactamase de *M. smegmatis*.

Inicialmente foi feita uma cinética de quebras do DNA genômico de *M. smegmatis*, para determinar o tempo ideal de nebulização para se obter bandas de tamanho entre 700 e 2000 pares de bases (pb). Essa faixa de tamanho de DNA foi escolhida acreditando-se que o gene pudesse ter tamanho semelhante ao respectivo gene de *M. fortuitum* (outra micobactéria de crescimento rápido), de 1210 pb. Para nebulização de 1 segundo (Figura 13A), as bandas estavam acima do tamanho esperado. A amostra foi nebulizada por mais dois segundos (Figura 13B) e verificou-se a presença de bandas na região esperada, além de uma banda de tamanho menor, referente ao excesso de quebras do DNA. A quantidade de amostra de DNA aplicada nos géis mostrados na Figura 13 é pequena, 10 μ L, considerando que o volume total é de 1 mL.

Figura 13: Géis de agarose dos produtos de nebulização do DNA genômico de *M. smegmatis*. A: 1 segundo de nebulização, B: 3 segundos de nebulização. 1: Padrão de peso molecular 1kb DNA ladder Plus (Gibco). 2: DNA nebulizado.

O restante da amostra obtida após três segundos de nebulização foi aplicada em gel de agarose “low melting”, para purificar o produto na faixa escolhida. Após a purificação, foram feitas duas ligações em vetores diferentes: uma em pUC18, apenas para controle do processo de ligação e a segunda em vetor pJEM17. Após a ligação dos fragmentos nos vetores, *E. coli* foi transformada com os produtos. Os clones transformados com pUC18 foram selecionados em ampicilina, já os transformados com pJEM17 foram selecionados

kanamicina. Foram obtidas poucas colônias tanto na clonagem em pUC18, quanto em pJEM17. Foi então feita uma reação de blunt/kinase nos fragmentos de DNA genômico obtidos e verificou-se que a eficiência de ligação melhorou muito nos dois vetores, cerca de cem vezes. As colônias transformadas com o vetor pJEM17 foram plaqueadas em meio contendo ampicilina, porém não foram encontradas colônias que fossem resistentes a ampicilina.

Consideramos que a baixa eficiência de clonagem do fragmento em vetor de expressão pJEM17 se deva possivelmente a seu elevado tamanho, 12000 pb. Esta baixa eficiência tornará esta metodologia inviável a curto prazo e esta abordagem foi abortada.

4.4.2. Estudos para obtenção do gene da β -lactamase de *M. smegmatis* por PCR

Uma vez que o seqüenciamento da proteína β -lactamase purificada de *M. smegmatis* revelou que os 20 primeiros aminoácidos eram idênticos aos da β -lactamase de *M. fortuitum* (10), que também é uma micobactéria de crescimento rápido, existia a possibilidade dos genes terem seqüência semelhante. Os oligonucleotídeos foram desenhados para as reações de PCR, para uma temperatura de 'anelamento' de aproximadamente 62°C, mas foi necessário abaixar a temperatura para 37°C para que a reação mostrasse alguma amplificação, o que indica que talvez os genes não tenham homologia tão alta. Uma banda de aproximadamente 1200 pb foi purificada e clonada em vetor pGEM T, que assim como pUC18 permite a seleção de colônias brancas quando cultivadas na presença de X-Gal. Alguns clones brancos foram escolhidos ao acaso e passados para meio líquido LB com ampicilina. Os plasmídeos desses clones foram extraídos e digeridos com KpnI, uma vez que os oligonucleotídeos que possuem sítios de

KpnI nas extremidades, e estes analisados em eletroforese em gel de agarose. Alguns clones tinham o tamanho esperado. Como não se sabia se o gene possuía outros sítios de KpnI, a soma dos tamanhos dos fragmentos obtidos deveria ser igual ao tamanho do gene original. Verificou-se que não havia outros sítios de KpnI no inserto obtido (Figura 14).

Figura 14. Gel de agarose dos clones obtidos da ligação do vetor pGEM T com o inserto amplificado de *M.smegmatis*. 1: Padrão de peso 1kb Plus Ladder (Gibco). 2-4: Clones digeridos com KpnI.

Uma vez que os resultados de seqüenciamento iriam demorar, foi realizada uma série de novas digestões, utilizando-se os sítios de restrição presentes no gene de *M. fortuitum*, visando verificar se os mesmos sítios, ou pelo menos alguns deles, também estariam presentes no fragmento. As enzimas escolhidas foram Pst I, Sma I, Xho I, BamH I, Eco RI e Hind III.

Caso o gene fosse idêntico ao de *M. fortuitum*, seriam esperadas quatro bandas na digestão com PstI, mas o vetor foi apenas aberto, devido ao sítio do vetor pGEM T. A digestão com SmaI também parece ter aberto a construção, mas devido a sítio presente no gene. Não houve digestão quando a enzima utilizada foi XhoI; a beta-lactamase de *M. fortuitum* possui um sítio para essa enzima de restrição. EcoR I, BamH I e Hind III, geraram o inserto completo, devido apenas os sítios no vetor (Figura 15).

Figura 15. Gel de agarose das digestões realizadas com o vetor pGEM T ligado ao inserto obtido por PCR. 1: Vetor digerido com Pst I, 2: mesmo, digerido com Sma I, 3: mesmo, digerido com Xho I, 4: mesmo digerido com BamH I, 5: mesmo digerido com Eco RI, 6: mesmo digerido com Hind III, 7: mesmo, não digerido.

Portanto, DNA de seis minipreparações foram seqüenciados, pois poderia haver diferentes fragmentos, uma vez que foi necessário utilizar uma temperatura de anelamento de 37 °C. Foi obtida uma única seqüência (Figura 16A). No entanto, quando traduzida para os aminoácidos correspondentes (24), mostrou conter códons de parada logo em seu início, o que indica que foi amplificada uma região não codificante. Foram verificadas todas as fases de leitura possíveis, o que apenas confirmou que a amplificação resultante era de uma região não codificante (Figura 16 B).

A

```

ATGACCGGACTATCGCGACGCGTCGCACCGCTCGGCCAGAGGGCGCGAAAGATTCTGCGACACCCTTGA
ATTCCCGGGCGGCGAGTGAATCACCAACCTGTGAGTTATCAATTCTCGGCATCGACTGCCCTTCCCGCGC
CGCAAGCCCTTGGGCCAGCATTCTGCCAGTCGAGATCGCAATGCTAACACCCCTTTGCCAAGATGGGACC
ACATGACAGAACAAGTCACCTGAAGATCCAAGACAATGAGTCGAGAGGATCCGATCGTCTTCCCTTTTC
CTACCTTCATGACGGCTTCCACCTGGGCTTTTGTGACGCGCCAGGAAGCTGTGCAACCCACGCTGCTGGGG
GGTATTGATTAGTTCATTACATTTCAAATAGCTGCGTACACCGGTTGCTCACAGTGGCACCTACTTCAA
CCCTCGGTACAAACCGGCTATCCCCCTGGCAAATGGTTCGACTGGGGCCAGATGAGGCAAAAGTGGATTA
ACTCCGCAAATCCCGAATCCATATCGAAAAGCGCGCCCGGTGGGTAGCCTGAGCACAGCCAAATCCCG
GACTCCCATTTGATTCCATTACGAAGGGACATGACGTGGACCTGTTTGTATGTAGTGCGGTCTGTGCTCCGC
CGCTGGTACGTCTTTGTTCCGCTGTTGGCGATCGTGACCTGGCTCAGTACTCGACATACAACCTCGGTGC
AACCGGTTTACTACTCGAACGCCGTCATCGGCCTTGCCGCCCCGAGCTCGCGGATCGACAACGCGGTGC
AGGGGGTTCCCGTGCCACGCAACGGGCTTCTGGATGTTGGCGCGCCATCGCTGATCGCCAAATGACGG
CTCTGGGCTCAAGGAGCCGGCGGTGGTCGACAAGGTGGTCGCGTCGGGCGGGATACCGGATTACGACG
CAAGGATGTTCCCGAGCCGGCGAACATGCAGCAGTTGCCGCTCGTGATGATCGAGGCGACGGATGCCGA
CGAGGAAGCTTGTCATCACGATGCAACTCGTCACCGCTCSGGCCGAAGAAACACTGCGAAAAGTTACAG
CACGAGGCGCAGGTCCCAGACGCACAGATGGGCCGCCCTTCATGGTGTACCTCCGAGTACCCAGCC
GCCGGAATGCCGCCCCGACCCGCTCGACAATCGCGATTTTCGTGCGGATGTCCGGTCATGGTACCC

```

B

```

MTGLSRRVAPLGQRRARKILRHPStopIPGRRVNHHPVSYQFS
ASTALPAPQALGP AFCQSRSQCStopHPLPRWDHMQVT
StopRSKTM SREDPIVF PPTFM TASTWAFV SARKLSNPRCW
GVFDStopFITFQIAA YTGCSQW HLLQPSVQTGYPPGKWSTG
ARStopGK SGLTPQIPNPYRKARP VGSLS TAKSPDSHStopFHY
EGTStopRGPVStopCSA VVLPLVRLCSA VGD RDLAQLLDIQ
LGATGLLLERRHRPCRPELADRQRGAGGS RATQRASGCW
RAIADRQHDGSGPQGA GGGRQGGRVGRDTGLRRKDVPEP
ANMQQLPLVM IEATDADEEA CPSRCNSSPLXPKKHCESYS
TRRRSQTHRWAAPS WCHLRVPQPPECRPAPARQSRFSSRC
PVMVP

```

Figura 16. A. Sequência do fragmento obtido por PCR a partir de DNA genômico de *M.smegmatis*. B. Tradução da mesma sequência feita pelo programa ExPASy (24).

4.5. Ensaios de recombinação homóloga em BCG com o vetor suicida pUC18/*hyg/sacB/blam*'

Inicialmente, BCG competente foi transformado com o plasmídeo pUC18/*hyg/sacB/blam*' em sua forma circular, mas não foram obtidos transformantes. Sabe-se da literatura que procedimentos como a exposição do plasmídeo a agentes que danificam DNA, físicos ou químicos (28) ou a linearização do mesmo a ser eletroporado (27), aumentam o rendimento de recombinação homóloga. A irradiação das amostras de DNA com luz ultravioleta antes da introdução na micobactéria poderia ativar a resposta SOS de reparo de DNA, o que levaria a um aumento na taxa de recombinação homóloga. Portanto, nos experimentos seguintes, foram testadas também algumas condições, como por exemplo, irradiação do plasmídeo pUC18/*hyg/sacB/blam*' com luz ultravioleta ou a linearização.

Em papel do tipo Parafilm, foi colocado 1µg de DNA, que foi irradiado com luz ultravioleta do fluxo laminar por diferentes intervalos de tempo (2, 5 e 10 s). Esses plasmídeos foram eletroporados em BCG cepa Moreau. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio MB 7H10, tendo higromicina em concentração 100 µg.mL⁻¹. No entanto, após cinco semanas nenhum clone foi obtido.

No segundo experimento, melhorou-se a qualidade do DNA introduzido nas bactérias. Foi feita uma midipreparação do vetor pUC18/*hyg/sacB/blam*', o que forneceu DNA mais puro e concentrado. Além disso, decidiu-se linearizar o plasmídeo antes da transformação. A linearização foi realizada por digestão com a enzima Sall. As amostras de DNA foram irradiadas da mesma forma que no primeiro experimento. BCG foi

transformado com 1 ou 2 μg de plasmídeo linearizado e as bactérias foram semeadas em meio com higromicina em concentração 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em quatro semanas foram obtidas colônias muito pequenas em todas as placas transformadas com 1 μg de DNA, inclusive na transformada com DNA não irradiado. O maior número de clones foi obtido na placa que continha as bactérias transformadas com plasmídeo irradiado por 5 segundos. As colônias selecionadas em higromicina foram colocadas em placa de 96 wells contendo meio líquido MB 7H9, sem antibiótico, sob agitação constante de 100 rpm, para que o segundo evento de recombinação pudesse acontecer. Verificou-se que, após quatro semanas de incubação, não houve crescimento. Mesmo assim, os cultivos foram semeados em meio MB 7H10 com sacarose a 2 e 10 % e mantidos por mais quatro semanas. Não houve crescimento bacteriano. Foram utilizadas duas concentrações diferentes de sacarose no meio, devido a diferentes dados de literatura. Há dados que mostram seleção eficiente com 2% de sacarose (23) e outros com 10% (22), por isso decidiu-se verificar qual o efeito da concentração de sacarose na obtenção dos clones.

Como as colônias obtidas nas placas do experimento anterior com higromicina tinham tamanho muito pequeno, isto poderia sugerir que a concentração do antibiótico estivesse muito elevada. A concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é normalmente utilizada para seleção de BCG transformado com vetores extra-cromossomais, que possuem origem de replicação em micobactérias e, portanto, estão presentes em mais de uma cópia por célula. Ao contrário, o vetor suicida pUC18/*hyg/sacB/blam'*, não possui origem de replicação em micobactérias e estaria presente em apenas uma cópia integrada no genoma.

Em um terceiro experimento, BCG competente foi então transformado com 1 μg de plasmídeo, circular ou linearizado por digestão com a enzima Sal I. Além disso, manteve-se

a irradiação e as amostras foram aproximadas da fonte de UV, ficando a cerca de 10 cm da mesma, na tentativa de otimizar a irradiação. As bactérias eletroporadas foram plaqueadas em meio MB 7H10 com higromicina em três concentrações, 20, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após aproximadamente três semanas de incubação, foram observadas 6 colônias na placa contendo BCG Moreau transformado com plasmídeo linearizado e irradiado por 10 s (Tabela II). Estes resultados indicam que a linearização do vetor é importante para a obtenção do primeiro passo da recombinação e que o dano provocado pela irradiação também pode contribuir. Além disto, o experimento evidenciou que de fato, quando o gene de resistência a higromicina é integrado, deve-se reduzir a concentração do antibiótico para a seleção.

Os clones foram passados para meio líquido, 5 mL de meio MB 7H9, sem antibiótico e foram mantidos sob agitação (120 rpm) até turvação do meio. Então, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em 200 μL de meio e plaqueadas em meio com sacarose a 2 e 10%, para a segunda seleção dos transformantes.

Nas placas de sacarose foram obtidos vários clones, em ambas concentrações do açúcar no meio. Alguns clones de cada placa foram selecionados ao acaso e passados para meio líquido MB 7H9 com ADC e mantidos sob agitação até a turvação. Mais uma vez, após a turvação, as amostras foram centrifugadas e uma parte das bactérias foi utilizada para extração de DNA genômico, para realização dos PCRs confirmatórios da recombinação e outra parte foi plaqueada em meio MB 7H10 suplementado com OADC e no mesmo meio adicionado de ampicilina, na concentração 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esse experimento visou observar se a resistência a ampicilina dos clones selecionados ao acaso havia desaparecido. Como controle positivo, BCG Moreau selvagem foi plaqueado nos mesmos

meios. Após cinco semanas de incubação, foi observado que: BCG selvagem cresceu normalmente em meio MB 7H10 e nas placas de meio MB 7H10 adicionado de ampicilina foram observadas colônias menores das observadas na placa sem ampicilina, mostrando que apesar de possuir mecanismos de resistência, a presença do antibiótico no meio de cultura afeta seu crescimento normal. Os clones selecionados do meio com sacarose não cresceram em meio com ampicilina. Entretanto, dos vinte clones inicialmente selecionados, apenas sete cresceram em meio sem antibiótico. Uma colônia de cada um dos clones que cresceram em MB 7H10 foi passada para placas contendo higromicina, para verificar se o gene de resistência havia sido perdido. Após cinco semanas de incubação, nenhum dos clones havia crescido nesse meio.

Tabela II. Resumo das condições utilizadas nos experimentos de recombinação homóloga em *M. bovis* BCG cepa Moreau.

EXPERIMENTO	1	2	3
CONDIÇÃO			
Quantidade de DNA (μg)	1	1/2	1
Linearização do Vetor	C	L e C	L e C
Irradiação com luz U.V. (0, 2, 5, 10 s)	Sim	Sim	Sim ^b
Concentração de Higromicina ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	100	100	20, 50, 100
Obtenção de Colônias da 1ª etapa	Não	Sim ^a	Sim
Obtenção de Colônias da 2ª etapa	Não	Não	Sim

^a Colônias muito pequenas, não cresceram em meio líquido posteriormente. ^b Irradicação com luz UV em fluxo, mais próximo da fonte. L: plasmídeo linearizado. C: plasmídeo circular.

4.6. Experimentos de PCR para confirmação da recombinação homóloga

Enquanto as amostras estavam em crescimento nas placas contendo meios com e sem ampicilina, foram feitas amplificações por PCR com o DNA genômico extraído dos clones selecionados, para verificar a presença do gene da β -lactamase mutado. Escolheu-se inicialmente para o estudo quatro clones retirados de diferentes placas de sacarose. Nos experimentos iniciais foram utilizados os primers e as condições de PCR usados na clonagem do gene da beta-lactamase, com temperatura de anelamento de 45 °C. No entanto, devido a amplificações inespecíficas, foram testadas várias temperaturas de anelamento, na tentativa de aumentar a especificidade. A temperatura de anelamento foi variada, de 45 °C para 47, 50 e 55 °C (Figura 17).

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para amplificação do gene da β -lactamase, a partir de DNA genômico dos clones. 1: Padrão de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Gibco). CT: Controle de tamanho esperado, blam'(824 pb). 2 a 5: PCR dos clones com anelamento a 45 °C. 6: PCR de BCG Moreau selvagem a 45 °C. 7 a 10: PCR dos clones com anelamento a 47 °C. 11: PCR de BCG Moreau selvagem a 47 °C. A presença da letra 'd' ao lado do número indica que foi adicionado 10% de DMSO à reação.

Pode-se observar em uma banda de aproximadamente 1500 pb bastante forte em alguns produtos de PCR, possivelmente devida a algum tipo de amplificação inespecífica. Já a banda observada a 600 pb é esperada, uma vez que foi observada também no PCR inicial em que o gene da beta-lactamase de BCG foi obtido. Observa-se que a uma temperatura de anelamento de 45°C (Figura 17 poços 3d e 4), há uma banda na região esperada (824 pb), ainda que bem fraca. Quando a temperatura de anelamento é aumentada para 47 °C, ainda é verificada a banda de interesse (poço 9). Os poços 4 e 9 representam produtos da amplificação de DNA do mesmo clone. Nota-se também que no poço 9, a banda de interesse parece mais forte e a banda de 1500 pb diminuiu sensivelmente com o aumento da temperatura de anelamento. Já as amplificações obtidas com anelamento a 50 e a 55 °C (dados não mostrados) não resultaram em bandas de tamanho esperado.

Com a possibilidade de ter encontrado um clone de BCG mutante *blam*⁻, decidiu-se repetir a reação de PCR com uma enzima mais precisa, a High Fidelity Taq DNA Polymerase (Invitrogen), utilizando a temperatura de anelamento de 47 °C. Além da amplificação do material do clone, amplificou-se também DNA genômico de BCG selvagem e do plasmídeo contendo o gene mutado (Figura 18).

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR da, utilizando a enzima High Fidelity Taq DNA Polymerase (Invitrogen). PM: Padrão de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco). BCG: Produto da amplificação do gene da beta-lactamase de BCG Moreau selvagem (924 pb). CT: Controle de peso esperado (824 pb). 9: Amplificação do gene *blam*' de um dos clones.

Apesar do produto de PCR a partir do DNA apresentar um arraste, pode-se observar a banda de referência, de aproximadamente 850 pb. O produto da amplificação do clone selecionado apresenta uma banda na região esperada, de mesmo tamanho que aquela obtida a partir do plasmídeo controle, aproximadamente 100 pb abaixo da banda amplificada do DNA genômico de BCG selvagem.

Nova preparação de DNA genômico de outras colônias provenientes das placas de sacarose foram colocadas em meio líquido e após o crescimento, foram plaqueadas em meio sólido. Em uma das placas, houve crescimento de uma colônia em cerca de 7 dias. Essa colônia foi crescida em meio líquido, em 4 dias sob agitação, e teve seu DNA cromossomal extraído. Foi realizado um PCR para confirmação da mutação, nas mesmas condições de clonagem do gene da β -lactamase nativo, utilizando-se a enzima High Fidelity Taq DNA Polimerase. Verifica-se que o PCR usando DNA genômico do clone recombinante amplifica um produto ao redor de 800 pb, menor que o amplificado de BCG selvagem e de igual tamanho que o amplificado do plasmídeo contendo o gene *blam'*. Estes resultados sugeriam que a recombinação ocorreu com sucesso (Figura 19).

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR do DNA genômico do clone obtido da segunda etapa da recombinação homóloga. 1. Peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). 2. PCR utilizando o plasmídeo pUC18 contendo o gene *blam* (924 pb). 3. PCR utilizando o DNA genômico do clone. 4. PCR utilizando o plasmídeo pUC18 contendo o gene *blam'* truncado. (824 pb).

4.7. Caracterização do clone

Apesar de serem bactérias Gram-positivas, as micobactérias não são coradas pelo método de Gram, devido à presença dos ácidos micólicos na parede celular bacteriana, que impedem a entrada do corante em seu interior. Esse método foi utilizado apenas para verificar uma eventual presença de contaminação. Nas lâminas, pôde-se verificar apenas bacilos de coloração rosa, o esperado para as micobactérias.

A coloração de Ziehl-Nielsen é um teste importante, porque caracteriza as bactérias álcool-ácido resistentes, como as micobactérias. Entretanto, este teste não permite a distinção entre as diferentes espécies micobacterianas. Verificou-se nas lâminas apenas a presença de bacilos de coloração rosa, de acordo com o esperado. Caso houvesse algum tipo de contaminação não álcool-ácido resistente, estas ficariam coradas em azul.

Foram realizadas as curvas de crescimento do clone obtido em relação a BCG selvagem, demonstrando que o clone de fato cresce mais rapidamente que BCG (Figura 20).

Figura 20: Curvas de crescimento do clone mutante comparada com a de BCG selvagem.

Como o mutante apresentou crescimento em tempo muito menor que BCG selvagem, decidiu-se confirmar se este se tratava de *M. bovis* BCG. Foi realizado um teste de tipagem micobacteriana no Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz. O resultado indicou que se tratava de contaminação por *M. smegmatis*.

4.8. Novo experimento de recombinação homóloga

Como se tratava de uma contaminação por outra micobactéria, repetiu-se o experimento de transformação de BCG Moreau, da mesma forma que o Experimento 3 descrito na Tabela II. Foram obtidas três pequenas colônias, na condição em que BCG foi transformado com plasmídeo não-linearizado e irradiado por 10 s. Essas três colônias foram passadas para meio líquido sem antibiótico, para que a segunda fase da recombinação ocorresse. Entretanto, estas colônias iniciavam o crescimento em meio líquido, mas paravam de crescer quando atingiam DO₆₀₀ de aproximadamente 0,2. Portanto, não foi possível completar o estudo da disrupção do gene da beta-lactamase de BCG.

4.9. Clonagem e expressão de LT-K63 em BCG

Foi realizada a construção dos vetores de expressão de LTK63 em micobactéria, baseado em pMIP12. Os fragmentos *lta*-K63 e *ltb* foram amplificados a partir de plasmídeos contendo os respectivos genes (gentilmente cedido pelo Dr. Rino Rappuoli, Chiron, Siena, It.), utilizando primers adequados para clonagem em vetores de expressão em micobactérias. Os primers para amplificação de *lta* continham a sequência Shine-Dalgarno conservada de micobactéria para obtenção de elevada expressão. A análise em gel de agarose mostrou a amplificação de 1000 e 400 pb respectivamente (Figura 20).

Figura 21: Eletroforese em gel de agarose do PCR para amplificação dos fragmentos de LT.

1 : Padrão de peso molecular 1kb (Gibco).

2: Amplificação da subunidade A e sequência de Shine-Dalgarno.

3: Amplificação da subunidade B.

Esses fragmentos foram purificados e subclonados no vetor pGEM-T. *E. coli* quimiocompetente foi transformada e minipreparações de DNA dos clones obtidos foram realizadas. Os vetores que continham os insertos foram digeridos com as enzimas apropriadas, os fragmentos purificados e posteriormente inseridos no vetor de expressão para micobactérias pMIP12, também previamente digerido com as mesmas enzimas.

A construção de pMIP-ltk63 foi confirmada com ensaio de restrição com KpnI.

BCG eletrocompetente foi transformado com o vetor pMIP12-LT-K63 e plaqueado em meio sólido com kanamicina, para selecionar apenas as bactérias transformadas. Após 3 semanas, algumas colônias foram escolhidas ao acaso e passadas para meio líquido com antibiótico e mantidas em crescimento até aproximadamente $D.O_{600} = 0,6$. Em seguida, a expressão de LT-K63 foi confirmada em extratos das colônias de BCG recombinante através de Western Blot, utilizando soro específico anti-LT.

Figura 22: Western Blot para verificação da expressão de LT-K63 em rBCG. 25 µg dos extratos protéicos foram de BCG e rBCG-LT e o soro anti-LT, utilizado na diluição de 1:1000.

1: Controle positivo LT

2: BCG vazio (vazamento do poço 3)

3 e 4: Clones expressando LT-K63.

Estes resultados demonstram que a construção baseada em pMIP12, contendo o promotor pBlaf e as sequências de Shine-Dalgarno São eficientes para a expressão de LT em BCG.

5. Discussão

5.1. Experimentos para disrupção do gene da β -lactamase

O objetivo inicial do projeto consistiu em realizar a disrupção ou ‘knockout’ do gene da β -lactamase de *M. bovis* BCG para, inicialmente, tentar responder a uma questão ainda aberta na literatura: qual o papel da enzima β -lactamase de micobactérias na resistência aos antibióticos da grande família dos β -lactâmicos. A dúvida surge de trabalhos anteriores que mostram por um lado, o ganho de resistência por uma micobactéria inicialmente não resistente, após transformação com vetor contendo o gene da β -lactamase de *M. fortuitum* (13) e, por outro lado, o aumento da resistência de um mutante de *M. smegmatis* que teve alterações apenas em sua parede celular (14).

Além disso, sabe-se que a tuberculose é hoje em dia a doença que mais mata portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Sendo BCG a única vacina disponível contra tuberculose, seria interessante que esses doentes e outros indivíduos imunodeprimidos recebessem uma nova dose dessa vacina. Entretanto, BCG é uma vacina viva atenuada e aqueles indivíduos com sistema imune deficitário poderiam vir a ter uma infecção por esta micobactéria, que seria de difícil tratamento, já que as micobactérias em geral são naturalmente resistentes a uma grande variedade de antibióticos. Tendo em mãos uma cepa menos resistente a antibióticos, como poderia ser o caso do mutante BCG-blam’,

poderia-se utilizar esta como vacina para indivíduos imunocomprometidos e com elevado risco de desenvolvimento de tuberculose.

Uma outra vantagem seria a possibilidade de utilizar o locus da β -lactamase para inserção de um cassete de expressão de antígenos heterólogos integrados no cromossomo da bactéria, fazendo com que a expressão das proteínas fosse constitutiva. Além disso, essa estratégia, acoplada à contra-seleção com *sacB* faz com que os recombinantes não contenham genes de resistência a antibióticos, desvantagem da expressão extra-cromossomal, normalmente utilizada para expressão de genes heterólogos em BCG recombinante e que *in vivo*, sem a pressão seletiva, pode resultar na perda do plasmídeo e, portanto, em uma expressão menos estável.

Tentou-se realizar o estudo do ‘knock out’ do gene da β -lactamase em *M. smegmatis*, uma micobactéria de crescimento rápido, que sofre recombinação homóloga mais facilmente que as micobactérias de crescimento lento. Da enzima β -lactamase dessa micobactéria conhecia-se apenas a sequência dos vinte primeiros aminoácidos (10), mas a sequência de nucleotídeos não havia sido determinada. Existia a possibilidade de haver homologia entre os genes de *M. smegmatis* e *M. fortuitum*, cuja sequência é conhecida, como observada entre algumas proteínas de micobactérias do grupo de tuberculose. Portanto, reações de PCR foram realizadas usando primers que anelariam no gene de *M. fortuitum*. Foi necessário diminuir a temperatura de anelamento da reação de PCR para que fosse obtido um fragmento, de tamanho semelhante ao do gene de *M. fortuitum*. Esse fragmento foi clonado e seqüenciado, mas foi resultante da amplificação de uma região não-codificante (Figura 16). Portanto, sem o gene da β -lactamase de *M. smegmatis*, decidiu-se concentrar os estudos em BCG.

Foram realizadas PCRs utilizando primers que anelariam no gene de *M. tuberculosis*, para a obtenção do gene da β -lactamase de BCG. Determinou-se inicialmente que o gene da β -lactamase de BCG é idêntico ao de *M. tuberculosis*. Em *M. tuberculosis* foram detectadas duas β -lactamases distintas, uma do tipo “penicilinase” e a outra do tipo “cefalosporinase”(11). A penicilinase está presente em maior quantidade e é responsável pela maior parte da atividade enzimática. Já a cefalosporinase é minoritária. O gene clonado e mutado neste projeto é o responsável pela atividade penicilinase, portanto não seria esperada alteração no nível de resistência às cefalosporinas.

Em seguida, o gene foi truncado e inserido em um vetor “suicida”, que além do gene mutado contém um gene de resistência à higromicina, para uma seleção primária dos mutantes, e outro gene para a contra-seleção, *sacB*. Este gene leva os transformantes ilegítimos à morte em presença de sacarose e deve eliminar as seqüências do gene nativo e demais seqüências do plasmídeo, incluindo *hyg* e *sacB*. Vale salientar que esse tipo de vetor não possui origem de replicação em micobactérias, apenas em *E. coli* e, portanto, deve ser integrado ao genoma micobacteriano para que ocorra o crescimento dos mutantes resistentes a higromicina.

Verificou-se que a primeira etapa da recombinação homóloga em BCG cepa Moreau é difícil e foi necessária a linearização do vetor e utilizar algumas condições que danificam o DNA, como irradiação UV, que levaria a uma ativação da resposta SOS de reparo de DNA, para que mutantes fossem obtidos. Apesar de estar descrita, a resistência de BCG a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de higromicina (28), quando transformado com o gene de resistência a higromicina, em geral os vetores são extra-cromossomais e estão presentes, em média, em cinco cópias dos mesmos por bactéria. Em nossos experimentos, esta resistência

a alta concentração de higromicina não foi observada, já que tem-se apenas uma cópia do gene de resistência integrado ao cromossomo. Em nossos experimentos, a redução da concentração de antibiótico no meio de cultura foi importante para a obtenção de clones que sofreram a primeira recombinação, já que os clones de BCG Moreau surgiram apenas quando a concentração de antibiótico no meio foi de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. BCG transformado nas mesmas condições de irradiação e circularização ou linearização do plasmídeo, mas plaqueadas em meio com higromicina nas concentrações de 50 ou 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não geraram clones. A concentração de sacarose no meio, 2 ou 10%, não mostrou interferência no crescimento bacteriano.

Infelizmente, durante o processamento dos clones obtidos da primeira recombinação, em que não se utiliza antibióticos, houve uma contaminação com outra micobactéria, *M. smegmatis*, que apresenta muitas propriedades semelhantes a BCG. Todos os testes realizados inicialmente indicavam não se tratar de uma contaminação e foram realizados muitos ensaios de caracterização da resistência a antibióticos β -lactâmicos, que não foram apresentados. Foi somente após caracterização mais específica, realizada no Instituto Adolfo Lutz, que se comprovou a ocorrência desta contaminação.

Nos novos experimentos realizados, após a confirmação da contaminação por *M. smegmatis* nas culturas, observou-se que os transformantes primários iniciavam o crescimento em meio de cultura líquido, mas este era interrompido antes de alcançar uma concentração bacteriana significativa. Como consequência, não foi possível realizar os ensaios de sensibilidade aos antibióticos.

A interrupção do crescimento dos transformantes primários no meio de cultura líquido, poderia indicar que o gene da β -lactamase seria um gene essencial, responsável por

atividades outras que não somente a proteção bacteriana contra os antibióticos penicilínicos. Revendo a estratégia experimental, verificamos que no primeiro evento de recombinação, ocorre a separação entre o promotor e o gene da β -lactamase, antes mesmo da substituição deste pelo gene truncado. Isto poderia ser um problema se estivéssemos tendo a disrupção de um gene essencial. Com isso, as bactérias cresceriam enquanto ainda houvesse a proteína β -lactamase para ser utilizada. Terminado o estoque de proteína na bactéria e estando as células incapacitadas de produzirem mais β -lactamase devido à recombinação primária do vetor suicida no locus, não haveria crescimento bacteriano. O interessante seria comprovar a redução na atividade da β -lactamase, na sua curta fase de crescimento, mas isto não foi possível por não haver quantidade de células suficientes para um experimento de quantificação da enzima.

5.2. Expressão de LT-K63 em BCG recombinante

Um dos objetivos do projeto a médio prazo seria realizar experimentos de “knock out/ knock in”, em que ao mesmo tempo em que se realiza a disrupção do gene, ocorreria a integração de um cassete de expressão de um gene heterólogo. Escolheu-se para tal o gene de LT de *E. coli*.

LT e CT são os melhores imunógenos de mucosa e adjuvantes conhecidos, excelentes indutores de resposta humoral, mas extremamente tóxicos para uso em vacinas humanas. O grupo do Dr Rino Rappuoli realizando estudos de mutações pontuais, obteve algumas proteínas derivadas de LT selvagem, de forma que a toxicidade das mesmas fosse reduzida ou até mesmo eliminada, mas que o poder adjuvante fosse mantido. É o caso da

LT-K63, em que o aminoácido serina da posição 63 foi substituído por um aminoácido lisina, tornando impossível a detecção de toxicidade residual. Esta mutação, faz com que as propriedades adjuvantes da molécula sofram uma mudança , ou “shift”, em direção à indução de resposta mais celular, quando comparada com a LT nativa. Esta resposta seria caracterizada pela maior formação de INF- γ de linfócitos T-helper e menor formação de anticorpos de moléculas coadjuvantes.

BCG é uma vacina que induz resposta mista dos tipos Th1 e Th2. Para a imunização eficiente contra *M. tuberculosis*, é necessária uma resposta predominantemente celular. A expressão de LT-K63 em BCG recombinante poderia induzir uma resposta imunológica mais celular em relação ao BCG, com características Th1, contra BCG e conseqüentemente contra *M. tuberculosis* e, portanto, ser mais protetora..

Foi necessário, inicialmente, verificar a possibilidade de expressar LTK63 em BCG através de vetores de expressão extracromossomais, como o pMIP12. O gene da LT-K63, gentilmente cedido pelo Dr. Rino Rappuoli, estava clonado no vetor p-Bluescript. Para realizar a construção em pMIP12, foi necessário alterar os sítios de restrição, remover as seqüências sinal das Subunidades A e B e inserir a seqüência consenso de Shine-Dalgarno entre as subunidades, para assegurar a expressão das duas porções, e não apenas da Subunidade A.

O gene foi montado em pGEM-T e então clonado no vetor para expressão em micobactérias pMIP12, que possui gene de resistência a kanamicina. Após a transformação de BCG Moreau com esse vetor de expressão, pMIP-ltk63, a análise por Western Blot dos extratos protéicos confirmaram a expressão da proteína em BCG.

Camundongos Balb/c imunizados com rBCG-LTK63 não mostraram a produção anticorpos anti-LT, até dois meses após a primeira dose. Estes resultados preliminares são semelhantes àqueles obtidos para rBCG expressando a Subunidade 1 geneticamente detoxificada da toxina pertussis, S1PT (9k/1296), em que não houve a formação de anticorpos anti-PT, mas a indução de uma forte resposta celular contra PT e contra proteínas de micobactéria. Será necessária uma caracterização imunológica mais aprofundada para verificar se esta cepa, rBCG-LTK63, induziria uma resposta com características celulares contra *M. tuberculosis*.

6. Conclusões

Este projeto teve como objetivo realizar a disrupção do gene da beta-lactamase de BCG para investigar: 1) seu papel na resistência a antibióticos beta-lactâmicos e 2) sua utilização como sítio de inserção de cassete de expressão de antígenos heterólogos. Para o segundo objetivo, seria utilizado o gene *ltk63*, derivado de mutação da toxina lábil de *E.coli* e verificar inicialmente sua expressão através de vetores extracromossomais.

Como a sequência do gene da β -lactamase de *M. bovis* BCG não era conhecido, sua possível homologia como o mesmo gene de *M. tuberculosis* foi usada para cloná-lo via PCR a partir de seu DNA genômico. A sequência de nucleotídeos do gene mostrou-se idêntico ao do mesmo gene de *M. tuberculosis*. A utilização de *M. smegmatis* poderia produzir resultados mais rapidamente, mas não foi possível obter o gene da β -lactamase de *M. smegmatis*.

Para a realização da disrupção do gene da β -lactamase de BCG, o gene obtido foi truncado e inserido em um vetor suicida para recombinação homóloga em BCG, sem origem de replicação em micobactéria e contando com um gene de resistência a higromicina e um gene para contra-seleção, *sacB*.

Foi possível estabelecer as condições para realização do 1º passo da recombinação, em que o vetor inteiro seria integrado ao genoma de BCG em locus adjacente ao da β -lactamase. Foram necessários vários ensaios para estabelecer a necessidade da linearização do plasmídeo e a utilização da irradiação com luz UV para aumentar o rendimento de recombinação. Foi também importante a constatação de que é necessário reduzir a concentração de higromicina descrita na literatura para seleção de mutantes por integração.

Infelizmente, o cultivo dos clones de BCG resultantes da primeira recombinação em meio sem antibiótico, necessário para o segundo passo da recombinação, levou à contaminação por *M. smegmatis*, outra micobactéria com características semelhantes, o que acarretou grande perda de tempo com sua caracterização, antes que a contaminação fosse detectada.

Verificou-se, com a repetição dos experimentos de recombinação homóloga, que os clones obtidos da primeira recombinação perdiam sua capacidade de crescimento. Estes resultados poderiam indicar que o gene da β -lactamase seria um gene essencial para o crescimento de BCG, uma vez que o procedimento utilizado leva à separação do gene do seu promotor, antes mesmo de substituir o gene nativo pelo truncado. No entanto, são necessários outros ensaios para comprovar esta possibilidade. Atualmente, os ensaios de disrupção gênica deletam o gene inteiro, mas somente após o segundo passo da recombinação, para reduzir este tipo de problema e manter o promotor funcional para a expressão de outros genes downstream.

Em relação à expressão de LT-K63 em BCG recombinante, foi possível realizar a construção do vetor pMIP-ltk63, o que exigiu a inclusão de uma sequência de Shine-Dalgarno entre as duas subunidades que seriam expressas em um operon, um vez que não sabíamos se as sequências de *E. coli* seriam reconhecidas pela micobactéria para a expressão de ambas. BCG transformado com este vetor de expressão mostrou elevada expressão do antígeno na forma complexada provavelmente envolvendo um complexo com 5 subunidades de LTB e uma de LTA, como em *E. coli*. Estes resultados indicam que seria possível obter um BCG recombinante que tivesse o cassete de expressão de LTK63 integrado ao genoma.

Camundongos imunizados com rBCG-LTK63 não induziram a formação de anticorpos anti-LT, o que faz um paralelo com nossos resultados obtidos com rBCG-S1PT, e lança a possibilidade destes recombinantes induzirem resposta polarizada para uma resposta celular, com características Th1. Experimentos adicionais serão necessários para comprovar esta hipótese.

Em suma, embora não tenha sido possível alcançar o objetivo de caracterizar o papel da β -lactamase na resistência a antibióticos β -lactâmicos, este projeto permitiu estabelecer uma série de condições para a recombinação homóloga em BCG, e levantou algumas hipóteses novas sobre a função da β -lactamase de BCG que seriam extremamente interessantes caso forem comprovadas. Foi também possível obter a elevada expressão de LTK63 em BCG, o que viabiliza estudos de integração do cassete de expressão no genoma da micobactéria. Técnicas de “knock out/ knock” in por recombinação homóloga estão sendo investigadas por vários grupos envolvidos com BCG recombinante, sem sucesso até o momento. Este projeto lançou as bases para novos experimentos visando estabelecer as condições para este tipo de tecnologia.

7. Referências Bibliográficas

1. <http://www.funasa.gov.br>
2. <http://www.stoptb.org>
3. www.who.int/health-topics/tb.htm
4. Fennelly, G.J., Jacobs, Jr., W.R. and Bloom B.R. (1997) *BCG as a recombinant vaccine vector*, in New Generation Vaccines, Levine, M., Woodrow, G.C., Kaper, J.B., Cobon, G.S., eds., p. 363-377, Marcel Dekker, Inc., N.Y.
5. Miyaji, E.N., Mazzantini, R.P., Dias, W.O., Nascimento, A.L., Marcovistz, R., Matos, D.S., Raw, I., Winter, N., Gicquel, B., Rappuoli, R., Leite, L.C. (2001) *Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing CRM(197), a mutant diphtheria toxin*. Infect. Immun. **69**(2):869-74.
6. Nascimento, I.P., Dias, W.O., Mazzantini, R.P., Miyaji, E.N., Gamberini, M., Quintilio, W., Gebara, V.C., Cardoso, D.F., Ho, P.L., Raw, I., Winter, N., Gicquel, B., Rappuoli, R., Leite, L.C. (2000) *Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live Bordetella pertussis in mice*. Infect. Immun. **68**(9):4877-83.
7. Abomoelak, B., Huygen, K., Kremer, L., Turneer, M., Locht, C. (1999) *Humoral and cellular immune responses in mice immunized with recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein*. Infect Immun **67**(10):5100-5.
8. Jarlier, V.; Nikaido, H. (1990) *Permeability Barrier to Hydrophilic Solutes in Mycobacterium chelonae*. Journal of Bacteriology **172** (3): 1418-1423.

9. Jarlier, V., Gutmann, L., Nikaido H. (1991) *Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in Mycobacterium chelonae*. Antimicrob Agents Chemother **35** (9): 1937-9.
10. Quinting, B., Galleni, M., Timm, J., Gicquel, B., Amicosante, G., Frère, J. M. (1997) *Purification and Properties of the Mycobacterium smegmatis mc²155 β -lactamase*. FEMS Microbiology Letters **149**: 11-15.
11. Voladri, R. K. R., Lakey, D. L., Hennigan, S., H., Menzies, B., E., Edwards, K. M., Kernodle, D., S. (1998) *Recombinant Expression and Characterization of the Major β -lactamase of Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother **42** (6): 1375-1381.
12. Segura, C., Salvadó, M., Collado, I., Chaves, J, Coira, A. (1998) *Contribution of β -lactamases to β -lactam Susceptibilities of Susceptible and Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates*. Antimicrob Agents Chemother **42** (6): 1524-1526.
13. Quinting, B., Reyrat, J.M., Monnaie, D., Amicosante, G., Pelicic, V., Gicquel, B., Frere, J.M. and Galleni, M. (1997). *Contribution of Beta—Lactamases Production to the Resistance of Mycobacteria to Beta-Lactam Antibiotics*. FEBS Lett. **406**(3), 275-278.
14. Mukhopadhyay, S. and Chakrabarti, P. (1997). *Altered Permeability and Beta-Lactam Resistance in a Mutant of Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob. Agents Chemother **41**(8), 1721-1724.
15. <http://www.pharm.su.ac.th/PharmCourse/betalactam/Index.htm>

16. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Antibiotics.html>
17. Stewart, G. R. and Mc Fadden, J (1999) *Recombination*. In *Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence*, pp.1-16, edited by Ratledge, C. and Dale, J., Oxford.
18. Reytrat, J. M., Berthet, F. X., Gicquel, B. (1995) *The urease locus of Mycobacterium tuberculosis and its utilization for the demonstration of allelic exchange in Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**(19):8768-877292
19. Davis, E. O., Jenner, P. J., Brooks, P.C., Colston, M.J. (1992) Cell **71**: 201-210.
20. Pavelka, M. S., Jacobs, W. R. (1999). *Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin, and Mycobacterium tuberculosis H37Rv by allelic exchange*. Journal of Bacteriology **181** (16): 4780-4789.
21. Husson, R. N., James, B. E., Young, R. A. (1990) *Gene replacement and expression of foreign DNA in Mycobacteria*. Journal of Bacteriology **172**: 519-524.
22. Pelicic, V., Reytrat, J.M. and Gicquel, B. (1996). *Generation of Unmarked Directed Mutations in Mycobacteria, Using Sucrose Counter-Selectable Suicide Vectors*. Molecular Microbiology **20**(5): 919-925.
23. Larsen, M. H. (2000) *Appedix 1. Some common methods in mycobacterial genetics*. In *Molecular Genetics of Mycobacteria*, pp. 314, edited by Hatfull, G. F. and Jacobs, W. R., Washington D.C.
24. <http://www.expasy.ch>
25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>

27. Hinds, J., Mahenthiralingam, E., Kempell, K.E., Duncan, K., Stokes, R.W., Parish, T., Stoker, N.G. (1999) *Enhanced gene replacement in mycobacteria*. Microbiology, **145**: 519-527
28. Colston, M. J., Davis, E. O. Papavinasasundaram, K. G. (2000): *General Recombination*. In Molecular Genetics of Mycobacteria, pp. 85-91, edited by Hatfull, G. F. and Jacobs, W. R., Washington D.C.
29. Voet, D. Voet, J. G. (1995): in *Biochemistry*, pp. 1281, New York, N.Y.
30. Rappuoli, R., Pizza, M., Douce, G., Dougan, G., (1999): *Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and Escherichia coli heat-labile enterotoxins*. View Point Immunology Today **20** (11), 493-500.
31. Millar, D. G., Hirst, T. R., Snider, D. P. (2001) : *Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin B Subunit Is a More Potent Mucosal Adjuvant than Its Closely Related Homologue, the B Subunit of Cholera Toxin*. Infection and Immunity **69** (5), 3479-3482.
32. Barackman, J. D., Ott, G., Pine, S., O'Hagan, D. T. (2001): *Oral Administration of Influenza Vaccine in Combination with the Adjuvants LT-K63 and LT-R72 Induces Potent Immune Responses Comparable to or Stronger than Traditional Intramuscular Immunization*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology **8** (3), 652-657.