

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**Clonagem e análise da atividade do promotor *hspX*
endógeno em *Mycobacterium bovis* BCG**

Jessica Dorneles

Pelotas, 2017

Jessica Dorneles

Clonagem e análise da atividade do promotor *hspX* endógeno em *Mycobacterium bovis* BCG

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D713c Dorneles, Jessica

Clonagem e análise da atividade do promotor Hsp_x endógeno em *Mycobacterium bovis* BCG / Jessica Dorneles ; Odir Antônio Dellagostin, orientador ; Thaís Larré Oliveira, coorientadora. — Pelotas, 2017.

41 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Vetor vacinal BCG. 2. Biobricks®. 3. Promotor. 4. Hsp_x. 5. Egfp. I. Dellagostin, Odir Antônio, orient. II. Oliveira, Thaís Larré, coorient. III. Título.

CDD : 615.372

Jessica Dorneles

Clonagem e análise da atividade do promotor *hspX* endógeno em *Mycobacterium bovis* BCG

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/11/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador)
Dra. Caroline Rizzi
Dra. Karine Rech Begnini

Dedico este trabalho a minha mãe Helena Dorneles, por todo amor, incentivo, dedicação e esforços realizados para que eu tivesse a oportunidade de ter uma formação de ensino superior.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica e por oferecer um curso gratuito de qualidade, e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTEC, sendo composto por professores dedicados, experientes, com grande conhecimento na área científica.

Ao meu orientador, Prof. Odir Antônio Dellagostin, por ser um excelente profissional, pela oportunidade de estágio e orientação.

À minha orientadora de estágio Thaís Larré Oliveira, pelos ensinamentos, por confiar que eu poderia contribuir em seus experimentos, pela preocupação, persistência e dedicação.

A Deus, pelo Seu amor, alegria, pelas bênçãos e por sempre me dar forças para continuar em momentos difíceis.

À minha mãe Helena, por todo amor, dedicação, apoio, por ser minha base e ótimo exemplo.

À minha família, por sempre querer o melhor para mim e pelo incentivo a continuar estudando e ter um futuro melhor.

À Caroline Rizzi, pelos ensinamentos, incentivo, pela disposição em ajudar, sempre colaborando nos experimentos.

Às minhas queridas colegas, Gabrielle, Gabriela e Amanda pela ótima convivência nas aulas e pela parceria nos diversos seminários e trabalhos que realizamos.

Aos colegas do Laboratório de Vacinologia, pelo bom convívio, incentivo, ajuda, compreensão e alegria.

Muito obrigada.

DORNELES, Jessica. Clonagem e Análise da atividade do promotor *HspX* endógeno em *Mycobacterium bovis* BCG. 2017. 41f. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Resumo

Mycobacterium bovis BCG é uma bactéria atenuada empregada como vacina contra tuberculose em humanos. Ela apresenta potencial para utilização como vetor vacinal, pois apresenta diversos fatores vantajosos: é estável e segura, possui um baixo custo de produção, propriedades adjuvantes e é capaz de induzir imunidade humoral e celular a longo prazo. Diversos antígenos heterólogos já foram expressos em BCG com sucesso e sua expressão é dirigida pela utilização de diferentes promotores, cuja atividade determina o nível de expressão destes antígenos e a estabilidade do vetor vacinal. O *hspX* de *M. bovis* possui um promotor que pode ser utilizado para regular a expressão de genes em BCG recombinante (rBCG) *in vivo*, já que este é induzido no interior das APCs, sendo rápida esta indução após a entrada de rBCG em células dendríticas. A inserção de uma sequência de DNA em um vetor de expressão pode ser facilitada através do Padrão BioBricks®, sendo este uma estratégia padronizada que torna o processo de clonagem mais prático e econômico, permitindo a construção de sequências biológicas compatíveis, cujos sítios de clonagem são mantidos mesmo após a combinação de diferentes fragmentos. Neste trabalho, nós clonamos duas sequências (completa e truncada) do promotor micobacteriano *hspX* juntamente com o gene repórter *egfp* de acordo com o Padrão BioBricks®, para transformação em *M. bovis* BCG. Além disso, a funcionalidade das diferentes construções foi determinada através da visualização de fluorescência das cepas de rBCG cultivadas *in vitro* e no interior de macrófagos. As sequências do promotor também foram clonadas no vetor base do Padrão BioBricks® pSB1C3 para depósito no banco de dados. As clonagens se mostraram eficazes e as construções passam a conter sítios compatíveis com o Padrão BioBricks®; ambas as versões do promotor *hspX* mostraram funcionalidade, porém foi possível observar maiores níveis de expressão de eGFP quando a sequência completa do promotor foi utilizada. A metodologia utilizada para clonagem das duas sequências do promotor *hspX* nos vetores pUP500 e pSB1C3 é eficiente, bem como para a clonagem de *egfp* nas construções pUP500/*hspX* e pUP500/*hspXT*, gerando construções funcionais capazes de expressar a proteína em *M. bovis* BCG.

Palavras-chave: Vetor vacinal BCG; BioBricks®; promotor; *hspX*; eGFP.

DORNELES, Jessica. **Cloning and analysis of the activity of the endogenous *hspX* promoter in *Mycobacterium bovis* BCG.** 2017. 41f. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Abstract

Mycobacterium bovis BCG is an attenuated bacterium used as a vaccine against tuberculosis in humans. It has potential for use as a vaccine vector due to several advantages: it is stable and safe; it presents low cost of production and adjuvant properties and it is able to induce long-lasting humoral and cellular immunity. Several heterologous antigens have been successfully expressed in BCG. The expression of these antigens is driven by the use of different promoters whose activity determines the level of expression of these antigens and the stability of the vaccine vector. The *hspX* from *M. bovis* has a promoter that can be used to regulate gene expression in recombinant BCG (rBCG) *in vivo*, considering its induction upon entry of the rBCG into dendritic cells. The insertion of a DNA sequence into an expression vector can be improved through the BioBricks® Standard, which is a standardized strategy that makes the cloning process more practical and economical, and allows the construction of compatible biological sequences whose cloning sites are maintained even after the combination of different fragments. In this work, we cloned two sequences (whole and truncated) of the *hspX* promoter upstream of the reporter gene *egfp* using the BioBricks standard, for transformation in *M. bovis* BCG. In addition, the functionality of the different constructs was determined by fluorescence visualization of the rBCG strains *in vitro* and inside macrophages. The promoter sequences were also cloned into pSB1C3, a standard plasmid for deposition in the BioBricks Repository. The cloning was effective and the constructs included compatible ends with the BioBricks standard; both versions of the *hspX* promoter showed functionality, however, higher levels of GFP were observed when the whole promoter sequence was used. The methodology used to clone the *hspX* promoter sequences into pUP500 and pSB1C3 is efficient, as well as for cloning of *egfp* sequence into pUP500/*hspX* and pUP500/*hspXT* constructs, resulting in functional molecules capable of expressing the eGFP in *M. bovis* BCG.

Keywords: BCG vaccine vector; BioBricks®; promoter; *hspX*; eGFP.

Lista de figuras

- Figura 1: Representação esquemática do vetor base pSB1C3 utilizado para depositar as sequências biológicas construídas segundo o Padrão BioBricks®. 24
- Figura 2: Representação esquemática do vetor de expressão em BCG pUP500. 25
- Figura 3: Eletroforese em gel de agarose dos promotores amplificados por PCR 28
- Figura 4: Confirmação da clonagem das sequências dos promotores no vetor de expressão pUP500 e no vetor pSB1C3 29
- Figura 5: Confirmação da clonagem de *egfp* nos vetores de expressão em BCG 29
- Figura 6: Microscopia de fluorescência dos clones de rBCG expressando eGFP sob o comando de promotores micobacterianos *in vitro* (A e B) e no interior de macrófagos (C e D). 30

Sumário

1. Introdução	11
2. Revisão de Literatura	13
2.1 Micobactérias	13
2.2 <i>Mycobacterim bovis</i> BCG.....	13
2.3 Utilização de rBCG para a expressão de antígenos heterólogos	14
2.4 Vetores epissomais e integrativos	15
2.5 Sistemas de expressão pUS e pUP	16
2.6 Promotores micobacterianos	18
2.7 GFP	19
2.8 Padrão BioBricks® de clonagem	20
3. Objetivo	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. Metodologia	23
4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo	23
4.2 Construção de plasmídeos e seleção dos clones recombinantes	23
4.3 Transformação	26
4.4 Análise da Fluorescência	26
4.4.1 Microscopia das cepas de rBCG em cultivo	26
4.4.2 Microscopia de macrófagos infectados com as cepas de rBCG	27
5. Resultados	28
5.1 Amplificação dos promotores <i>hspX</i> e <i>hspX</i> truncado por PCR	28
5.2 Clonagem dos promotores nos vetores pUP500 e pSB1C3.....	28
5.3 Ligação do gene <i>egfp</i> nos plasmídeos de expressão em BCG contendo os diferentes promotores.....	29

5.4 Visualização da fluorescência dos clones de BCG recombinante e dos macrófagos infectados	30
6. Discussão	31
7. Conclusão	33
Referências	36

1. Introdução

Mycobacterium bovis BCG é uma vacina viva atenuada muito promissora para utilização como vetor vacinal, pois apresenta fatores vantajosos, como estabilidade, segurança, baixo custo de produção, capacidade adjuvante e indução de imunidade humoral e celular em longo prazo (MATSUO; YASUTOMI, 2011). Diversos antígenos heterólogos, incluindo virais, bacterianos e parasitários (CONNELL et al., 1993; ABDELHAK et al., 1995; BASTOS et al., 2004; RIZZI et al., 2012;) já foram expressos em BCG com sucesso, sendo esta expressão dirigida pela utilização de diferentes promotores, cuja atividade determina o nível de expressão dos antígenos e também a estabilidade do vetor vacinal.

Neste estudo, nós avaliamos o promotor *hspX* de *M. bovis*, o qual pode ser utilizado para regular a expressão de genes em BCG recombinante *in vivo*, já que é induzido no interior das APCs (KONG et al., 2011) e esta indução ocorre rapidamente após a entrada do BCG recombinante em células dendríticas. Esta característica pode gerar maior estabilidade e maiores níveis de expressão na cepa recombinante (KONG et al., 2011).

Para se estudar e analisar a atividade de promotores, a clonagem da sequência codificadora da proteína verde fluorescente (GFP) torna-se uma importante ferramenta, bem como para avaliar a expressão de genes *in vivo*, marcar células, compartimentos celulares e proteínas específicas. A expressão desta proteína repórter pode ser observada por microscopia ou citometria de fluxo, através do monitoramento da emissão de uma luz verde e a sua intensidade (KAVITA et al., 2008).

A clonagem de sequências de DNA, pode ser facilitada pela utilização do Padrão BioBricks®, sendo este uma estratégia inovadora e simples, porém engenhosa, que permite a construção de partes biológicas compatíveis, cujos sítios de clonagem são mantidos mesmo após a combinação de diferentes fragmentos. Isso ocorre pela utilização de sequências prefixo e sufixo, que flanqueiam o fragmento alvo, contendo sítios para diferentes enzimas de restrição, os quais geram extremidades compatíveis quando clivados (SHETTY et al., 2008). As construções obtidas a partir do emprego desse padrão são desenhadas e depositadas no repositório de partes do *Massachusetts Institute of Technology*, utilizando o plasmídeo base pSB1C3.

Sendo assim, no presente trabalho nós clonamos duas diferentes sequências (completa e truncada) do promotor *hspX* endógeno de *M. bovis* BCG no vetor de expressão de micobactéria pUP500, o qual é compatível com o Padrão BioBricks®, e caracterizamos a funcionalidade das diferentes construções através da utilização do gene repórter codificante da proteína verde fluorescente mutada (eGFP). Além disso, as duas sequências do promotor também foram clonadas no vetor base do Padrão BioBricks® pSB1C3 para depósito no banco de dados.

2. Revisão de Literatura

2.1 Micobactérias

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*, que possui um único gênero denominado *Mycobacterium*. Estas bactérias são caracterizadas por um envelope celular complexo composto pelos ácidos micólicos, ácidos graxos de cadeia longa, que permitem a caracterização do gênero através da coloração de Ziehl-Neelsen. Estes ácidos graxos incomuns conferem baixa permeabilidade à parede celular micobacteriana. Os bacilos são resistentes à ação de agentes químicos e alguns antibióticos, mas sensíveis aos agentes físicos, como a radiação ultravioleta e calor. As micobactérias são aeróbicas, não formam esporos e podem ser de crescimento rápido ou lento, sendo que esta última característica se restringe às patogênicas (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) refere-se a um grupo de espécies (*M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*) (COSMA; SHERMAN; RAMAKRISHNAN, 2003), que são geneticamente muito similares e causam tuberculose (TB) em humanos e animais (BROSCH et al., 2002). Destas espécies, *M. tuberculosis* é o membro mais conhecido, infectando mais de um terço da população mundial (CORBETT EL., 2003). Já o *M. bovis* apresenta o mais amplo espectro de infecção de hospedeiros (THOEN et al., 2009).

2.2 *Mycobacterim bovis* BCG

Mycobacterium bovis Bacilo Calmette-Guérin é uma vacina viva atenuada que foi desenvolvida por Léon Charles Albert Calmette e Jean-Marie Camille Guérin no Instituto Pasteur, França. A atenuação de uma cepa de *M. bovis* patogênico foi possível após 230 passagens sucessivas no laboratório, entre os anos de 1908 e 1921 (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007). Estudos posteriores demonstraram que, mesmo depois da sua completa atenuação, o BCG ainda apresentava infectividade quando inoculado em diversos modelos animais experimentais. O BCG é a única vacina utilizada contra Tuberculose Humana (TB) desde 1928, quando foi

recomendado pela Liga das Nações como vacina oficial contra a TB (CALMETTE, 1931).

Um avanço em respeito à construção de novos candidatos vacinais é o emprego de cepas vacinais atenuadas como vetores de antígenos. Vacinas vivas apresentam a capacidade de replicação e persistência no organismo, estimulando constantemente o sistema imune do hospedeiro. Vacinas recombinantes vetorizadas são capazes de fornecer múltiplos antígenos, gerando vacinas polivalentes capazes de proteger contra vários patógenos, com uma única dose (BASTOS et al., 2009).

O BCG possui potencial para ser utilizado como vetor vacinal, devido aos diversos fatores vantajosos apresentados: pode ser administrada logo após o nascimento devido ao fato de não ser prejudicada por anticorpos maternos, é estável e segura sendo já utilizada há décadas, não requer refrigeração, possui um baixo custo de produção e propriedades adjuvantes (BASTOS et al., 2009). Além disso, é capaz de induzir imunidade humoral e celular a longo prazo, sendo necessária a administração de apenas uma única dose, pois o BCG replica-se dentro das células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas (MATSUO; YASUTOMI, 2011), o que também o torna eficaz na apresentação de antígenos ao sistema imune do hospedeiro (MATSUO; YASUTOMI, 2011).

Os esforços de pesquisa se concentraram em melhorar a eficácia do BCG, que não protege os adultos contra a tuberculose (TB), especialmente em países onde a tuberculose é endêmica. Vários estudos se concentraram na super-expressão de antígenos imunodominantes de BCG e na reintrodução de quaisquer antígenos benéficos que podem ter sido perdidos durante o processo de atenuação da cepa (DA COSTA et al., 2014). Os principais antígenos que foram avaliados nos esforços de pesquisa até agora têm sido a proteína HspX e os do complexo Ag85B (LIANG et al. 2015; YUAN et al., 2015).

2.3 Utilização de rBCG para a expressão de antígenos heterólogos

Sistemas para a manipulação e expressão de genes heterólogos em micobactérias foram desenvolvidos, permitindo a avaliação do BCG recombinante (rBCG) como um veículo para uma variedade de antígenos. Diversos estudos tem sido realizados utilizando rBCG para a expressão de antígenos virais, bacterianos e parasitários (CONNELL et al. 1993; ABDELHAK et al., 1995; BASTOS et al., 2004;

RIZZI et al., 2012;). A expressão destes antígenos é dirigida pela utilização de diferentes promotores, cuja atividade determina o nível de expressão destes antígenos e interfere na estabilidade do vetor vacinal (BASTOS et al., 2009).

Antígenos bacterianos e virais foram expressos usando os promotores hsp60 e hsp70, resultando em alto nível de expressão (STOVER et al., 1993; LANGERMANN et al., 1994; KANEKIYO et al., 2005) e, em alguns casos, conferindo proteção (BASTOS et al., 2004). O antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* foi expresso em BCG sob o controle do promotor pBlaF, e esta construção mostrou proteger os camundongos do desafio realizado (VARALDO et al., 2004). O promotor do gene de 18 kDa de *M. leprae*, que é conhecido por ser regulado positivamente durante o crescimento de BCG no interior dos macrófagos (DELLAGOSTIN et al., 1993) foi utilizado para dirigir a expressão dos antígenos MSP1a de *Anaplasma marginale*, onde foi demonstrada a imunogenicidade do rBCG expressando o antígeno em altos níveis (MICHELON et al., 2006), e LipL32 de *Leptospira interrogans* (SEIXAS et al., 2007). Os hamsters inoculados com rBCG expressando LipL32 desenvolveram uma resposta humoral forte contra o antígeno recombinante e foram protegidos contra um desafio letal (SEIXAS et al., 2007). Esses resultados confirmam o potencial do promotor de 18 kDa para expressar antígenos heterólogos em BCG.

Em um estudo realizado por Jongwe et. al, foi utilizada a cepa recombinante auxotrófica rBCGΔ *panCD* (não sintetiza ácido pantotênico) como um vetor vacinal para entregar o antígeno mosaico Gag de HIV-1C, utilizando camundongo como modelo animal. Foi demonstrada a estabilidade da vacina tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A cepa BCG-Gag^M persistiu nos tecidos dos camundongos vacinados, nos órgãos linfoides periféricos (baço e nódulos linfáticos) por até 11,5 semanas após a vacinação. A resposta gerada foi predominantemente de células T citocinas positivas de memória efectoras, controlando a carga viral após a vacinação (JONGWE et al., 2016).

2.4 Vetores episomais e integrativos

Desde seu desenvolvimento inicial na década de 90, as vacinas de BCG recombinante têm sido desenvolvidas para expressar antígenos homólogos e heterólogos de uma variedade de microrganismos. Para tal, faz-se necessário a utilização de um vetor micobacteriano eficiente, com vários elementos importantes: a

origem de replicação em *E. coli* para expansão do plasmídeo, um gene marcador de resistência a antibiótico, origem de replicação em micobactéria, promotor ativo em micobactéria e sítios de enzima de restrição para inserção de sequências de interesse e sítio para integração ao genoma para os vetores integrativos (BASTOS et al., 2009).

A entrega dos genes heterólogos, em geral, é realizada empregando-se dois tipos distintos de sistemas genéticos, vetor episomal ou vetor integrativo. Cepas recombinantes empregando vetores integrativos demonstram síntese persistente de antígenos heterólogos *in vivo* e maior estabilidade, mas apresentam baixos níveis de expressão devido à presença de apenas uma cópia do gene heterólogo no genoma micobacteriano (BASTOS et al., 2009).

A grande maioria dos sistemas genéticos extracromossômicos desenvolvidos para a expressão de antígenos heterólogos em BCG, usaram a origem da replicação derivada de pAL5000, um plasmídeo de *M. fortuitum* (BASTOS et al., 2009). Os vetores de transporte derivados de pAL5000 permitem aproximadamente cinco cópias de plasmídeo por célula, resultando em maiores níveis de expressão do que aqueles que podem ser alcançados com vetores integrativos (BASTOS et al., 2009). Uma versão com número alto de cópias deste replicon, que manteve aproximadamente 35 cópias por célula, foi desenvolvida por Bourn et al. (BOURN et al., 2007). Mais recentemente, foi desenvolvido um vetor *shuttle Mycobacterium-E. coli* usando o plasmídeo pMyong2 de *M. yongonense*. O vetor pMyong2 permitiu cópias 37 vezes maiores que o pAL5000, e os níveis de expressão de antígeno heterólogo aumentaram 50 vezes em comparação com pAL5000 (LEE et al., 2015).

Contudo, vários trabalhos relatam a baixa estabilidade destes vetores que utilizam gene de resistência a antibiótico como marcador seletivo *in vivo* (MEDEIROS et al., 2002; DENNEHY; WILLIAMSON, 2005). Desse modo, a pressão de seleção exercida pelo antibiótico presente no meio de cultivo deixa de existir quando a vacina é administrada. Esta característica pode prejudicar a indução de memória imune em longo prazo, além de comprometer a segurança da vacina (MEDERLE et al., 2002).

2.5 Sistemas de expressão pUS e pUP

Como uma maneira de tornar *M. vaccae* um hospedeiro alternativo de clonagem, sendo útil para estudar a biologia micobacteriana e proporcionar maior

flexibilidade para expressão de proteínas recombinantes em micobactérias, foi desenvolvida e avaliada uma nova série de plasmídeos (série pUS). A série pUS compreende vetores *shuttle*, pUS972 (que apresenta gene de resistência à canamicina) e pUS982 (que apresenta gene de resistência à higromicina), um vetor denominado pUS986 (contendo o gene repórter *lacZ* sem promotor) e uma gama de vetores de expressão com base em pUS972 que incorporam diferentes sequências de promotores micobacterianos. Assim, Medeiros e colaboradores (2002), demonstraram que esta série de vetores pUS é funcional em *M. vaccae* com baixa instabilidade, assim como em BCG e em *M. smegmatis* (MEDEIROS et al., 2002).

Para aprimorar a construção de micobactérias recombinantes, foi desenvolvido um outro sistema de expressão empregando um mutante de BCG Pasteur auxotrófico para leucina (BCG Pasteur $\Delta leuD$) e um vetor replicativo (pUP410) que suplementa esta mutação (BORSUK et al., 2007). Este sistema de complementação auxotrófica possui duas principais vantagens: proporciona seleção ativa *in vivo*, e elimina a necessidade de utilização de um gene de resistência a antibiótico como um componente do vetor, aumentando a segurança da vacina (BORSUK et al., 2007; SEIXAS et al., 2010). O sistema permite altos níveis de expressão da proteína recombinante sem a utilização de antibióticos como marcadores (SEIXAS et al., 2010). Cepas de rBCG geneticamente estáveis são de primordial importância como vacinas pois a expressão constante do antígeno induz respostas imunes maiores e duradouras (HIMMELRICH et al., 2000; MEDERLE et al., 2002).

Utilizando um sistema auxotrófico de leucina para a expressão de antígenos lentivirais em BCG, Hart et al. demonstrou a estabilidade da vacina e controle de qualidade pós-produção em termos de retenção de plasmídeo, expressão de antígeno e imunogenicidade (HART et al., 2015). A expressão de antígenos lentivirais foi mantida *in vivo* durante pelo menos 60 dias; como tal, este sistema pode contribuir para a indução de uma resposta imune duradoura. Assim, esses sistemas mantêm os altos níveis de expressão do antígeno estranho e a pressão seletiva *in vivo*, enquanto eles evitam o uso de genes de resistência a antibióticos como marcadores seletivos, melhorando assim a segurança da vacina (HART et al., 2015).

2.6 Promotores micobacterianos

Os fatores que afetam a expressão de proteínas recombinantes em BCG e a geração da resposta imune contra os antígenos alvo são promotores micobacterianos, localização de antígenos heterólogos e estabilidade dos vetores. A expressão de um gene alvo é inicialmente regulada na transcrição e parcialmente determinada pela força do promotor. A seleção de um promotor efetivo é crucial para atingir um nível ótimo de transcrição e otimizar a produção de proteínas (NEWTON-FOOT; GEY VAN PITTIUS, 2013). Uma característica útil de um promotor ativo de BCG recombinante seria expressar em níveis elevados durante o crescimento intracelular de rBCG nas células apresentadoras de antígeno, induzindo expressão de antígeno quando uma resposta imune é necessária (DELLAGOSTIN et al., 1995).

Promotores induzíveis regulam a expressão de determinado antígeno sob o estímulo de diferentes condições e podem ser utilizados para melhorar e manter a imunidade induzida pelas cepas recombinantes. Estes promotores representam uma alternativa atrativa pela qual a toxicidade e carga metabólica podem ser reduzidas durante o crescimento *in vitro* (SCHNAPPINGER e EHRT, 2014).

Existem diversos promotores de micobactéria, dentre eles estão os clássicos Hsp60 e Hsp70 e os promotores alternativos 18kDa, pAN, mtrA, pBlaF, fpbB e 19 kDa (OLIVEIRA et al., 2017). Os promotores geneticamente engenheirados também representam uma ferramenta potente pela qual a expressão do antígeno recombinante pode ser otimizada, resultando em promotores com diferentes atividades e perfis regulatórios alterados (RUTH e GLIEDER, 2010). Esta abordagem emprega técnicas como mutações nas sequências promotoras (OLDFIELD e HATFULL, 2014; KANNO et al., 2016), sequências reguladoras ou alteração do códon de iniciação (FAN et al., 2009; OLDFIELD e HATFULL 2014). Para obter um conjunto de promotores micobacterianos que oferecessem níveis previsíveis de expressão de antígenos recombinantes em BCG, Kanno et al. submeteu recentemente a sequência reguladora do promotor PL5 a mutagênese aleatória por PCR de erro. Os promotores PL5 mutados permitiram a expressão do antígeno Sm29 de *S. mansoni* em BCG e a expressão estável de proteína fluorescente verde mutada (eGFP), (KANNO et al., 2016).

2.7 GFP

O desenvolvimento dos sistemas repórter utilizando a proteína verde fluorescente (GFP), deu-se devido a necessidade de visualizar as micobactérias patogênicas no interior de células eucarióticas (macrófagos) e monitorar a expressão de genes em ambientes intracelulares (VIA et al., 1998). Esta proteína foi descoberta em 1961, pelo Dr. Osamu Shimomura (SHIMOMURA, 2005) e seu gene foi clonado pela primeira vez por Prasher et al., em 1992, da *Aequorea victoria* (uma água viva) (PRASHER et al., 1992).

A GFP produz uma luz verde brilhante ao ser estimulada com a luz ultravioleta (UV) (WARD, 1998). É uma proteína citoplasmática com baixa toxicidade e síntese contínua, sendo mínimos os efeitos tanto sobre a dinâmica bacteriana quanto à diluição do sinal de fluorescência durante a replicação bacteriana. Uma importante vantagem da GFP reside no fato de que o fluoróforo faz parte da cadeia peptídica, portanto ela não precisa de nenhum aditivo para fluorescer, ao contrário de outras proteínas, que necessitam de cofatores para a emissão de luz (CHALFIE et al., 1994). A proteína GFP representa um excelente marcador para avaliar a atividade temporal de promotores de micobactérias, bem como avaliar expressão *in vivo*, marcar células, compartimentos celulares e proteínas específicas. Atualmente, tem-se utilizado proteínas verdes fluorescentes mutantes que possuem incremento no brilho (KAVITA et al., 2008).

A proteína mutada *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) é uma das variantes manipuladas mais utilizadas da Proteína verde fluorescente de tipo selvagem sendo amplamente utilizada por apresentar até 35 vezes mais fluorescência (KENDALL et al., 1998). A proteína eGFP tem maior eficiência de dobramento (aumento da fluorescência devido a uma maior proporção de proteína dobrada corretamente) a 37 ° C, tem um único pico de excitação a ~ 490 nm e possui códon otimizado para expressão em hospedeiros de mamíferos. Duas mutações que geram eGFP, F64L e S65T, contribuem para essas propriedades melhoradas. O S65T é considerado essencial para a supressão do pico de excitação de 395 nm através da modulação do estado ionizado do Glu222 nas proximidades, enquanto que a mutação F64L é responsável pela eficiência de dobragem melhorada a 37 ° C (ARPINO et al., 2012).

As proteínas fluorescentes são amplamente utilizadas como sistemas repórter em cepas de rBCG. Eitson et al. (2012) desenvolveram vetores de transporte para gerar um alto nível de expressão proteica. Usando *gfp* como gene repórter, eles avaliaram níveis de expressão *in vitro* e em macrófagos infectados através de citometria de fluxo (EITSON et al., 2012). Da mesma forma, as proteínas fluorescentes também foram usadas para caracterizar um sistema de vetores de alto número de cópias derivado de *M. yongonense* em relação a sua estabilidade, compatibilidade com o sistema pAL5000 e capacidade de expressar antígenos estranhos *in vitro* e *in vivo* (LEE et al., 2015). Como mencionado acima, Kanno et al. selecionou um grupo de promotores mutados que foram derivados do promotor pL5 e, em seguida, utilizaram a proteína eGFP para avaliar a força desses promotores em *M. smegmatis* e *M. bovis BCG*. Assim, eles estabeleceram um sistema racional e previsível pelo qual os antígenos poderiam ser expressos em micobactérias (KANNO et al., 2016). No entanto, a atividade desses promotores também deve ser medida dentro dos macrófagos. Um sistema repórter fluorescente integrativo foi desenvolvido para estudar a atividade de promotores *in vitro* e *in vivo* (ROY et al., 2012), que geralmente é avaliada usando vetores episomais.

2.8 Padrão BioBricks de clonagem

Uma das estratégias da Biologia Sintética de maior sucesso é o uso de partes biológicas padronizadas, denominadas BioBricks®, sendo uma tecnologia estabelecida em 2003 por Tom Knight para padronizar a construção de sistemas biológicos e a clonagem de sequências de DNA, sejam elas promotores, CDS, RBS, esqueletos plasmidiais, entre outras 'partes'. Todos os elementos construídos como BioBricks® são depositados em um repositório de partes criado também em 2003 em um estudo do *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) utilizando o plasmídeo base denominado pSB1C3. Esse repositório funciona como um banco de partes padronizadas e compatíveis desenhadas e depositadas em um mesmo plasmídeo base. A padronização proposta no Padrão BioBricks ocorre pelo uso de sequências prefixo e sufixo, contendo sítios para enzimas de restrição, nas extremidades dos fragmentos alvo. Tais sequências são idênticas para todos os fragmentos clonados, tornando-os compatíveis entre si e permitindo a montagem de inúmeras combinações entre os mesmos (SHETTY et al., 2008; LEWENS T., 2013).

O Padrão BioBricks® consiste em um protocolo simples mas engenhoso. Sequências prefixo (que apresentam sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*) e sequências sufixo (sítios *SpeI* e *PstI*) são projetadas para flanquear as regiões terminais 5' e 3' de uma porção genética, respectivamente. Durante a montagem de quaisquer duas peças BioBricks, a extremidade *upstream* 3' do fragmento de DNA a ser montado é digerido com *SpeI* e a extremidade *downstream* 5' é digerida com *XbaI*. Já que *SpeI* e *XbaI* produzem extremidades coesivas compatíveis, a ligação das partes a montante e a jusante produz uma região de 8 pb "mista" ou "resíduo" de sequência entre as duas partes, que não é reconhecido por qualquer uma das enzimas. Uma vez obtida a peça composta, essa ainda pode ser novamente digerida com *XbaI* ou *SpeI* em etapas subsequentes de montagem. Assim, o mesmo processo, iterativo de digestão e de ligação pode ser usado para montar várias peças num sistema biológico sintético (SHETTY et al., 2008). Sendo assim o Padrão BioBricks® facilita a clonagem de sequências de DNA compatíveis entre si, de forma padronizada e reprodutível.

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi clonar as sequências do promotor *hspX* completa e truncada (fragmento menor) em um vetor de expressão em BCG, utilizando o Padrão BioBricks® e caracterizar as suas funcionalidades através da utilização de um gene repórter.

3.2 Objetivos específicos

- Clonar os promotores *hspX* e *hspX truncado* nos plasmídeos pUP500 e pSB1C3 segundo o Padrão BioBricks®;
- Clonar a sequência codificadora da proteína repórter eGFP nas construções pUP500/*hspX* e pUP500/*hspXT* segundo o Padrão BioBricks®
- Obter cepas de rBCG expressando eGFP como proteína repórter sob o controle dos promotores *hspX* e *hspX truncado (hspXT)*;
- Avaliar a atividade dos promotores em BCG cultivado *in vitro* e em BCG internalizado pelos macrófagos através de microscopia de fluorescência.

4. Metodologia

4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Mycobacterium bovis BCG (cepa Pasteur) foi cultivado em meio líquido 7H9 suplementado com 0,5% de glicerol, 0,05% de Tween 80 e 10% de OADC ou em meio sólido 7H10 suplementado com 10% de OADC. Quando necessário, foi adicionado o antibiótico canamicina na concentração de 25 µg.mL⁻¹. *Escherichia coli* TOP10 foi utilizada para manutenção e clonagem dos plasmídeos, e foi cultivada a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) (1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 1,5% agar) sob agitação de 200 rpm ou acrescido de 1,5% de ágar e, quando necessário, suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de canamicina.

4.2 Construção de plasmídeos e seleção dos clones recombinantes

As sequências do promotor *hspX* truncado (*hspXT*) e não truncado (*hspX*) foram amplificadas a partir do DNA genômico de *M. bovis* BCG (cepa Pasteur) através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os *primers* para a amplificação destas sequências foram desenhados a partir de sequências depositadas no GenBank, com o auxílio do software VectorNTI 11 (Invitrogen). Para amplificação da sequência *hspX* foi utilizado o seguinte primer forward: 5' CCGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGACGCGTAAAGCACCCGATCCTT 3'. Para amplificação da sequência truncada (*HspXT*) foi utilizado o *primer forward* 5' CCGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCATGATCAACCTCCGCTGTTC 3'. O primer reverse utilizado foi o mesmo para amplificação de ambas as sequências: 5' TGCACTGCAGGCGGCCGCTACTAGTTGGTGGCCATTTGATGCCTCCT 3'. Ambos os *primers forward* apresentam sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI* enquanto que o *primer reverse* apresenta sítios para as enzimas *SpeI* e *PstI* (sublinhados). A PCR compreendeu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 4 min seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min, e extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 4 min. As reações foram realizadas utilizando 12,5 µl de *GoTaq Coloress Master Mix* (Promega), 2 µl de DMSO, 1 µl de *primer reverse* à concentração de 12,5 pmol/µl,

1 μ l de *primer forward* à concentração de 12,5 pmol/ μ l, 1 μ l de DNA genômico de BCG e 7,5 μ l de H₂O para completar o volume da reação em 25 μ l.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e digeridos com *EcoRI* e *PstI*, assim como o vetor base para a clonagem do Padrão BioBricks pSB1C3 (Figura 1) e o vetor de expressão em BCG pUP500 (Figura 2). Todas as reações de digestão foram realizadas a 37 °C por 1 h 30 min e purificadas com o kit *GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Após, as sequências *hspX* e *hspXT* amplificadas foram ligadas individualmente aos vetores pSB1C3 e pUP500 utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) à 4°C *overnight*, totalizando quatro construções denominadas pUP500/*hspX*, pSB1C3/*hspX*, pUP500/*hspXT* e pSB1C3/*hspXT*.

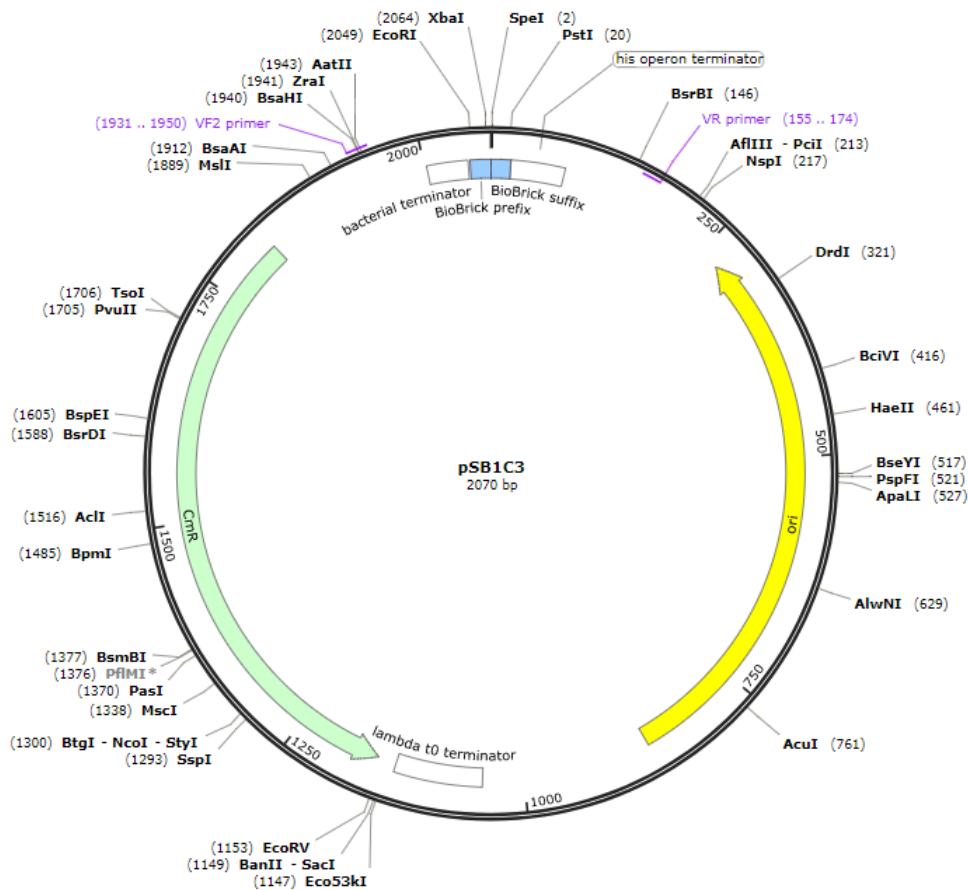


Figura 1: Representação esquemática do vetor base pSB1C3 utilizado para depositar as sequências biológicas construídas segundo o Padrão BioBricks®.O vetor pSB1C3 possui origem de replicação em *Escherichia coli* e gene de resistência a cloranfenicol. Apresenta sítio para as enzimas de restrição *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* e *PstI*.

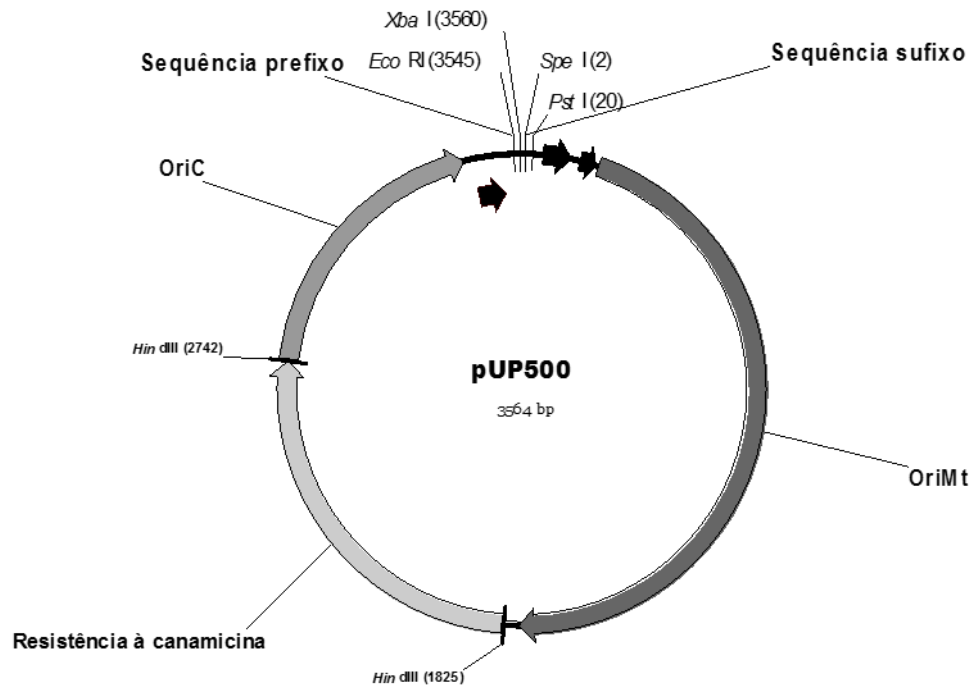


Figura 2: Representação esquemática do vetor de expressão em BCG pUP500. O vetor pUP500 possui origem de replicação em micobactéria (OriMt) e *Escherichia coli* (OriC) e gene de resistência à canamicina. Este vetor foi construído segundo o Padrão BioBricks® e possui sítio para as enzimas de restrição *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* e *PstI*.

Os produtos das reações de ligação foram inseridos em *E. coli* TOP10 eletrocompetente através de choque térmico e após 1 h de incubação a 37 °C sob agitação de 180 rpm, as células foram plaqueadas em meio Lúria Bertani sólido acrescido de canamicina (50 µg/ml) para o vetor pUP500 ou cloranfenicol para o vetor pSB1C3. As placas ficaram incubadas a 37°C *overnight* e as colônias crescidas no meio sólido seletivo foram repicadas para meio líquido para posterior extração de plasmídeo com o *kit* comercial *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare). Os plasmídeos extraídos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio e a presença dos insertos foi confirmada por digestão e PCR conforme descrito acima.

A sequência codificadora da proteína eGFP foi obtida através de PCR a partir do plasmídeo pUS977 previamente construído, utilizando os seguintes *primers forward* e *reverse*, respectivamente: 5' CCCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAATGTGAGGAGATTCTCAATGACG 3' e 5' GCACTGCAGCGGCCGCTACTAGTTCACTTGTAC 3'. A PCR compreendeu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 4 min seguido de 35 ciclos de

desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 60 °C por 1 min, e extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 4 min. A reação foi realizada utilizando 12,5 µl de *GoTaq Colores Master Mix* (Promega), 2 µl de DMSO, 0,25 µl de *primer reverse* à concentração de 12,5 pmol/µl, 0,25 µl de *primer forward* à concentração de 12,5 pmol/µl, 0,5 µl do plasmídeo pUS977 e 8,5 µl de H₂O para completar o volume da reação em 25 µl. Os plasmídeos recombinantes pUP500/*hspX* e pUP500/*hspXT* foram digeridos com as enzimas de restrição *SpeI* e *PstI* à 37°C por 1h30min, purificados com o kit comercial citado anteriormente e ligados ao gene *egfp* previamente digerido com as enzimas *XbaI* e *PstI*, utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) à 4°C *overnight*. As etapas de transformação dos produtos em *E. coli* TOP 10 e seleção e confirmação dos clones recombinantes, foram realizados conforme descrito anteriormente, resultando em duas novas construções denominadas pUP500/*hspX:egfp* e pUP500/*hspXT:egfp*.

4.3 Transformação

Para produção de BCG recombinante, células eletrocompetentes de BCG Pasteur foram preparadas através de três etapas de centrifugações de 10 min a 4000 rpm intercaladas por etapas de lavagens com água apirogênica e glicerol 10%. As células foram transformadas, por eletroporação, com as construções pUP500/*hspX:egfp* e pUP500/*hspXT:egfp*. Todas as células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo (meio 7H10 contendo 25 µg.mL⁻¹ de canamicina) e incubadas a 37 °C por aproximadamente 21 dias, até as colônias ficarem visíveis. Posteriormente, as colônias foram cultivadas em meio líquido seletivo (meio 7H9 Middlebrook Difco suplementado com 10% do suplemento *Oleic Acid Albumin Dextrose Complex*, 0,2% de glicerol 0,05% de Tween 80 acrescido de 25 µg.mL⁻¹ de canamicina) para análise da expressão de eGFP.

4.4 Análise da Fluorescência

4.4.1 Microscopia das cepas de rBCG em cultivo *in vitro*

As colônias de BCG transformadas com os vetores pUP500/*hspX:egfp* e pUP500/*hspXT:egfp* crescidas nas placas, foram analisadas no microscópio de

fluorescência. As colônias com maior intensidade de fluorescência foram repicadas para meio líquido 7H9 contendo $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina, e os cultivos foram mantidos à 37°C sob agitação por 7 dias. Após, 1 ml de cada cultivo foi centrifugado por 10 min a 11000 rpm e os *pellets* foram ressuspensos em 100 μl de Tris-HCl 100 mM pH 7,8. Lâminas de microscopia foram preparadas utilizando 10 μl de amostra de cada clone e a fluorescência foi visualizada em microscópio de fluorescência em aumento de 20 x. Como controle negativo, foi utilizado um cultivo de BCG Pasteur não transformado.

4.4.2 Microscopia de macrófagos infectados com as cepas de rBCG

A linhagem de macrófagos J774.A1 (derivada de um tumor de camundongo BALB/c fêmea; produz Interleucina-5 e lisozima) foi mantida à 37°C em atmosfera de 5% CO_2 em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (5×10^4 células/poço). Os cultivos de rBCG em uma densidade ótica de 0,6 foram usados para infecção dos macrófagos. Os bacilos foram adicionados em uma multiplicidade de infecção de 1:500 e os macrófagos foram incubados por 2 h para permitir a fagocitose. As bactérias que não foram internalizadas foram removidas após duas lavagens com PBS-CMF, e as células infectadas foram mantidas em cultivo por 24 h. Posteriormente, os macrófagos infectados foram lavados com PBS-CMF e visualizados em microscópio de fluorescência invertido.

5. Resultados

5.1 Amplificação dos promotores *hspX* e *hspX* truncado por PCR

As sequências dos promotores foram eficientemente amplificadas por PCR gerando fragmentos no tamanho esperado de aproximadamente 209 pb e 358 pb (Fig. 3).

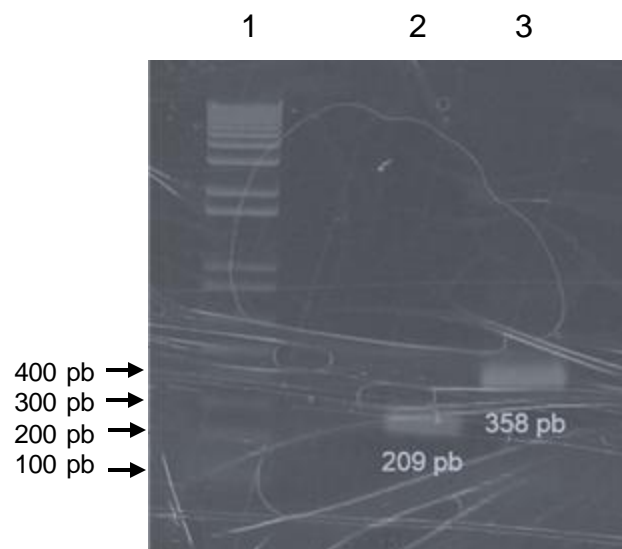


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% dos promotores amplificados por PCR. 1, Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); 2, promotor *hspX* truncado; 3, promotor *hspX* completo.

5.2 Clonagem dos promotores nos vetores pUP500 e pSB1C3

As sequências dos promotores foram eficientemente clonadas no vetor de expressão em BCG pUP500, bem como no vetor base para depósito das sequências no Repositório BioBricks®, pSB1C3. A digestão dos plasmídeos pUP500/*hspXT*, pUP500/*hspX* e pSB1C3/*hspXT* foi realizada com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e a do plasmídeo pSB1C3/*hspX* com as enzimas *XbaI* e *SpeI*, resultando na liberação dos fragmentos (sequência dos promotores) no tamanho esperado, conforme pode ser visualizado na figura 4.

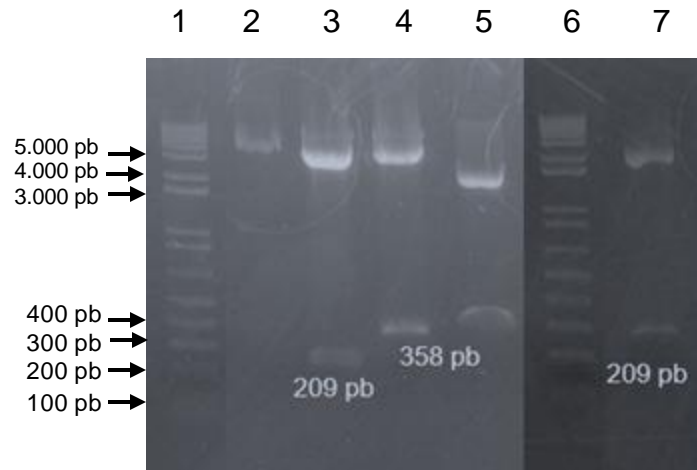


Figura 4. Confirmação da clonagem das sequências dos promotores no vetor de expressão pUP500 e no vetor pSB1C3. 1, 1 kb plus (Invitrogen); 2, plasmídeo controle pUP500 (sem inserto); 3, pUP500/hspX truncado; 4, pUP500/hspX; 5, pSB1C3/hspX; 6, 1 kb plus (Invitrogen); 7, pSB1C3/hspX truncado.

5.3 Ligação do gene *egfp* nos plasmídeos de expressão em BCG contendo os diferentes promotores

A sequência codificadora do gene *egfp* (741 pb) foi clonada nos vetores de expressão em BCG pUP500/*hspX* e pUP500/*hspXT*, o que foi confirmado através da libera o dos fragmentos no tamanho esperado (promotor + *egfp*) após digestão dos clones recombinantes com as enzimas *EcoRI* e *PstI* (Fig. 5).

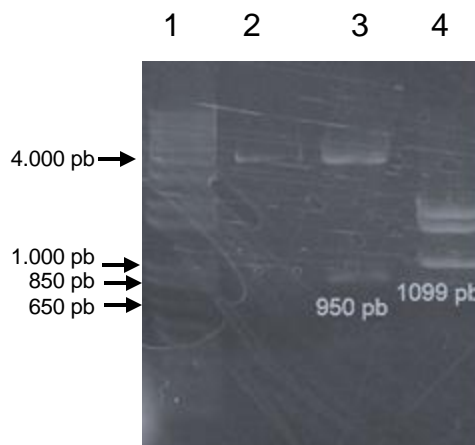


Figura 5. Confirma o da clonagem de *egfp* nos vetores de expressão em BCG. 1, 1 kb plus (Invitrogen); 2, pUP500 (controle negativo); 3, pUP500/*hspXT:egfp*; 4, pUP500/*hspX:egfp*.

5.4 Visualização da fluorescência dos clones de BCG recombinante e dos macrófagos infectados

As construções do vetor pUP500 com os promotores ligados ao gene *egfp*, foram inseridos em BCG e após, a linhagem de macrófagos J774.A1 foi infectada com estas cepas de rBCG. Pode-se visualizar através de microscopia de fluorescência as colônias de *M. bovis* BCG que estavam expressando o gene *egfp in vitro* de acordo com a regulação de cada promotor (Fig.6A e B). Também pode-se visualizar a intensidade da fluorescência dos macrófagos infectados com as cepas de rBCG (Fig.6D e E). Tanto *in vitro* como no interior de macrófagos, foi possível observar que maiores níveis de expressão de eGFP foram obtidos quando a sequência do promotor *hspX* completa foi utilizada. Nenhuma fluorescência foi observada nos controles negativos, utilizando a cepa BCG Pasteur não transformada cultivada *in vitro* e dentro de macrófagos (Fig. 6C e F).

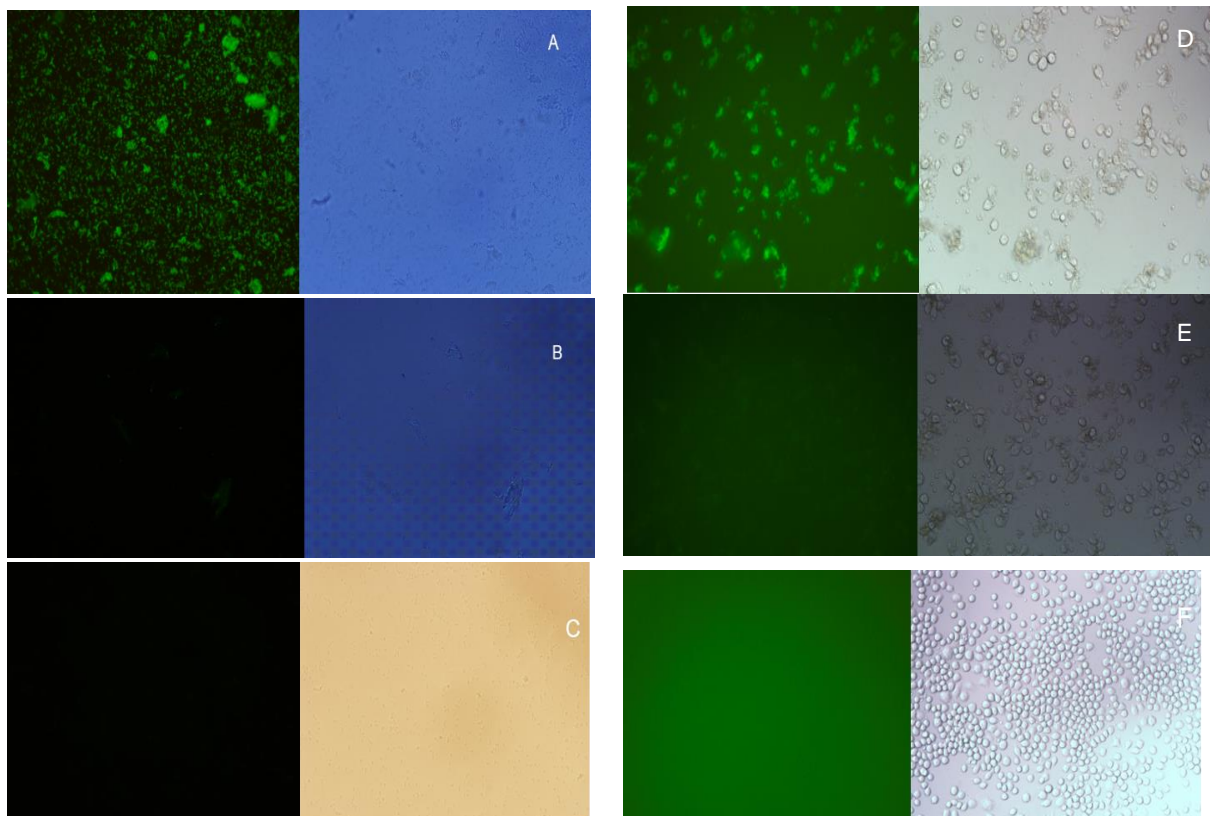


Figura 6. Microscopia de fluorescência dos clones de rBCG expressando eGFP sob o comando de promotores micobacterianos *in vitro* (A e B) e dentro de macrófagos (D e E). A, Expressão de *eGFP in vitro* sob comando do promotor *hspX*; B, Expressão de *eGFP in vitro* sob comando do promotor *hspX* truncado; C, BCG Pasteur não transformado (controle negativo); D, Expressão de *eGFP* no interior de macrófagos sob comando do promotor *hspX*; E, Expressão de *eGFP* no interior de macrófagos sob comando do promotor *hspX* truncado; F, Linhagem dos macrófagos J774.A1 com BCG Pasteur não transformado (controle negativo).

6. Discussão

Neste estudo, foi proposto avaliar a expressão da proteína repórter eGFP em *M. bovis* BCG, cultivado *in vitro* e no interior de macrófagos, sob o comando de duas sequências do promotor *hspX* endógeno (sequência completa – *hspX*; e truncada - *hspXT*) clonadas no vetor de expressão em BCG pUP500, sendo estas construções adaptadas ao Padrão BioBricks® de clonagem. Também foi possível utilizar o Padrão para clonar os promotores no vetor pSB1C3 para posterior depósito no banco de partes BioBricks®. A obtenção das duas sequências do promotor *hspX* através da técnica de PCR utilizando DNA genômico de *M. bovis* BCG (cepa Pasteur), mostrou-se eficaz, bem como à amplificação da sequência do gene *egfp* a partir do plasmídeo pUS977 previamente construído.

Inicialmente foi realizada a clonagem em *E. coli* das sequências do promotor no vetor pUP500, de maneira que estas passassem a conter extremidades compatíveis com o Padrão BioBricks® e após, as construções obtidas foram clonadas com o gene *egfp*. Separadamente, *hspX* e *hspXT*, também foram clonados no plasmídeo pSB1C3. Todas as clonagens foram realizadas com sucesso de maneira rápida e eficaz, o que pode ser atribuído a padronização e reprodutibilidade proporcionada pelo Padrão BioBricks de clonagem.

A inserção das construções obtidas pUP500/*hspX:egfp* e pUP500/*hspXT:egfp* em *M. bovis* BCG através da técnica de transformação por eletroporação, foi realizada com êxito e após o período de crescimento dos clones de rBCG, pode-se visualizar a fluorescência das colônias através de microscopia, indicando portanto a expressão da proteína eGFP sob o comando dos promotores *hspX* e *hspXT*. As mesmas técnicas de análise de fluorescência foram utilizadas para observar a expressão de eGFP dirigida pelos promotores dentro dos macrófagos após estes serem infectados com as cepas de rBCG. A ligação da sequência dos promotores à sequência codificadora *egfp* segundo o Padrão BioBricks adiciona obrigatoriamente alguns nucleotídeos entre as duas sequências (*scar sequence* – fusão dos sítios de restrição de *SpeI* e *XbaI*), resultando na inserção de novos aminoácidos na região N-terminal da proteína, o que poderia alterar a conformação tridimensional de eGFP e impedir a emissão de fluorescência. Assim, o primer *forward* utilizado para amplificação de *egfp* foi desenhado de maneira a inserir um stop códon (TGA) após a “*scar sequence*”, e também um novo sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e novo ATG *upstream* da

sequência codificadora do gene. Assim, a transcrição do gene *egfp* não se inicia no RBS e ATG presentes na região do promotor e sim no RBS/ATG inserido no primer, conservando a sequência de aminoácidos original da proteína. Esta estratégia foi bem sucedida, tendo em vista a detecção de fluorescência de eGFP no cultivo de rBCG *in vitro* e em macrófagos.

Houve uma expressiva diferença no nível de expressão da proteína eGFP entre as sequências em estudo, tanto na cultura de rBCG *in vitro*, como na infecção dos macrófagos. Maiores níveis de expressão de eGFP foram observados quando a sequência completa do promotor *hspX* foi utilizada, e baixos níveis de expressão sob o comando promotor *hspX* truncado (*hspXT*). Esse resultado está em concordância com outro estudo (DOKLADDA et al., 2015), no qual foi observado que o promotor truncado foi ativado apenas em cepas virulentas crescidas dentro de macrófagos ou em condições de baixa tensão de oxigênio.

Em um estudo realizado por Dokladda et al. (2015), foram testadas as atividades de diferentes fragmentos da sequência do promotor *hspX* em uma cepa de *M. tuberculosis* virulenta (H37Rv) e não virulenta (H37Ra) usando o gene repórter *gfp*. As atividades do promotor foram comparadas entre o crescimento *in vitro* e o crescimento de micobactérias no interior de macrófagos (linhagem U937). Como resultado, os autores observaram que a sequência truncada do *hspX* na cultura *in vitro* não foi ativa em nenhuma das cepas avaliadas, devido a necessidade da micobactéria ser cultivada em baixa tensão de oxigênio para ativação deste promotor. Já no interior dos macrófagos, o promotor truncado foi induzível apenas na cepa virulenta H37Rv, com altos níveis de expressão. A sequência inteira do promotor *hspX* mostrou similaridade nos níveis de expressão de GFP na cepa não virulenta, com alto nível de expressão tanto na cultura líquida quanto no interior dos macrófagos; por outro lado, na cepa virulenta o promotor *hspX* mostrou ser pouco induzível em ambas as condições (DOKLADDA et al., 2015). As cepas possuem mutações que as diferem em 198 SNPs no genoma (ZHENG et al., 2008). Algumas dessas variantes estão presentes em genes associados com a virulência incluindo resposta ao stress, ativação da transcrição e biossíntese de aminoácidos. Os resultados do repórter *hspX/GFP* mostram que a sequência adicional *upstream* do gene (a qual *hspXT* não possui) modula as propriedades induzíveis do promotor *hspX* e o nível de expressão na cepa não virulenta H37Ra. O contexto preciso da sequência do promotor *hspX*

determina assim a sua atividade, com as diferenças nos genes reguladores de transcrição entre as cepas e nas condições de cultivo afetando sua regulação.

Em outro experimento realizado por Kong et al. (2011), foi demonstrado que o promotor *hspX* de *M. tuberculosis* pode ser utilizado para regulação *in vivo* e indução de antígenos expressos por BCG recombinante. A indução do promotor *hspX* ocorreu rapidamente após a entrada de rBCG em células dendríticas cultivadas (DCs), tendo em vista os níveis de GFP nestas células quando infectadas com uma cepa de rBCG em que a expressão de GFP foi controlada pelo promotor *hspX* (KONG et al., 2011). A vacinação de camundongos com esta cepa rBCG:*PhspX-gfp* levou a uma rápida expressão *in vivo* de GFP associada a um influxo de GFP + células dendríticas no local da infecção (KONG et al., 2011). A expressão de antígeno controlada pelo *hspX* resultou em uma melhor capacidade das células dendríticas gerarem células T específicas (KONG et al., 2011); o promotor também foi utilizado para expressão do gene *Ag85B*, onde o rápido recrutamento de células dendríticas para o local da infecção e rápida fagocitose do BCG foram correlacionados com a iniciação e ativação aprimoradas das células T reativas antígeno-específicas após a vacinação com BCG: *PhspX-85B*. Além disso, esta iniciação melhorada das células T resultou na geração sustentada de células secretoras de IFN- γ reconhecendo *Ag85B* até 3 meses após a vacinação (KONG et al., 2011).

Estudos tem demonstrado que a escolha do promotor é de fundamental importância em sistemas de expressão de antígenos com o objetivo de melhorar os níveis de expressão dos candidatos vacinais em vetores vacinais vivos como o BCG (BASTOS et al., 2009). Para determinar uma resposta imunológica adequada e eficiente, é necessário o uso do promotor como regulador do nível de produção do antígeno (DHAR et al., 2003), evitando assim a expressão nula ou baixa expressão.

A engenharia genética tem trazido uma série de inovações e benefícios na área de biotecnologia aplicada à saúde humana e animal. A evolução das técnicas neste campo de atuação está diretamente relacionada à manipulação do DNA *in vitro*. Os métodos para clonagem convencional de DNA são frequentemente laboriosos, imprevisíveis, de alto custo e pouco reprodutíveis (KNIGHT et al., 2003). Superando tais limitações o Padrão BioBricks®, desenvolvido por Knight e colaboradores, é uma área da biologia sintética, que contribui com êxito neste trabalho, pois é uma técnica engenhosa e de fácil realização que visa padronizar a construção de sequências de DNA trazendo reprodutibilidade e praticidade para a clonagem de sequências, além

de reduzir o tempo de realização e os custos (KNIGHT et al., 2003). O plasmídeo pSB1C3 é o vetor base para a clonagem de sequências de DNA a serem depositadas no banco de dados do Repositório BioBricks®. Neste plasmídeo, foram clonadas as sequências do promotor *hspX*, as quais passam a conter suas extremidades compatíveis com o método BioBricks®. Assim, quaisquer outras sequências codificadoras também clonadas por este sistema poderão ser expressas em rBCG sob o comando dos promotores avaliados neste estudo.

Através deste trabalho, e de outros estudos citados anteriormente, constata-se que a sequência inteira do promotor *hspX* possui grande potencial a ser utilizada para comandar a expressão de antígenos heterólogos, utilizando *M. bovis* BCG como vetor vacinal.

7. Conclusão

- A metodologia utilizada para clonagem das duas sequências do promotor *hspX* nos vetores pUP500 e pSB1C3 é eficiente, bem como para a clonagem de *egfp* nas construções pUP500/*hspX* e pUP500/*hspXT*, gerando construções funcionais capazes de expressar a proteína em *M. bovis* BCG.
- O Padrão BioBricks de clonagem, mostrou-se de fato ser uma estratégia engenhosa, simples de ser utilizada e eficaz para clonagem de sequências micobacterianas.
- As construções pSB1C3/*hspX* e pSB1C3/*hspXT* poderão ser depositadas no Repositório de partes BioBricks padrão, criado em um estudo do *Massachusetts Institute of Technology* (MIT).
- A sequência inteira do promotor *hspX* está ativa no rBCG, expressando altos níveis de eGFP, tanto na cultura *in vitro* da micobactéria, como no interior dos macrófagos.
- A sequência truncada do promotor *hspX* mostrou-se pouco ativa no rBCG, com baixa expressão na cultura *in vitro* e no interior dos macrófagos.
- A metodologia para infecção da linhagem J774.A1 de macrófagos pelas cepas de rBCG mostrou-se eficaz, permitindo a análise da expressão de eGFP sob o comando dos diferentes promotores.
- Posteriormente serão realizadas análises quantitativas para avaliar o nível de expressão da proteína eGFP sob o comando dos promotores, através da técnica de citometria de fluxo. Estudos subsequentes serão executados com o objetivo de utilizar BCG recombinante como um vetor vacinal expressando antígenos heterólogos sob o comando do promotor *hspX*, e avaliar seu potencial como vacina vetorizada.

Referências

- ABDELHAK S.; LOUZIR H.; TIMM J., BLEL L.; BENLASFAR Z.; LAGRANDERIE M.; GHEORGHIU M.; DELLAGI K.; GICQUEL B. Recombinant BCG expressing the *leishmania* surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Microbiology**, v. 141, p. 1585 -1592,1995.
- ARPINO J. A.; RIZKALLAH P. J.; JONES D. D. Crystal Structure of Enhanced Green Fluorescent Protein to 1.35 Å Resolution Reveals Alternative Conformations for Glu222. **Plos one**. 7(10): e47132, 2012.
- BASTOS R. G.; DELLAGOSTIN O. A.; BARLETTA R. G.; DOSTER A. R.; NELSON E.; ZUCKERMANN F.; OSORIO F. A. Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vaccine** 22:467-474, 2004.
- BASTOS, R. G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, p. 6495-6503, 2009.
- BOURN W. R.; JANSEN Y.; STUTZ H.; WARREN R. M.; WILLIAMSON A. L.; VAN HELDEN P. D. Creation and characterisation of a high-copy-number version of the pAL5000 mycobacterial replicon. **Tuberculosis (Edinb)** 87(6), p. 481–488, 2007.
- BORSUK S.; MENDUM T.A.; FAGUNDES M.Q.; MICHELON M.; CUNHA C.W.; MCFADDEN J., DELLAGOSTIN O.A. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. **Tuberculosis**, v. 87, p. 74-480, 2007.
- BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.6, p.3684-3689, 2002.
- CHALFIE M.; TU Y.; EUSKIRCHEN G.; WARD W. W.; PRASHER D. C.; Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.
- CONNELL N. D.; ACOSTA E. M.; MCMASTER W. R.; BLOOM B. R.; RUSSELL D. G. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille

Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. **Immunology**, v.90, p. 11473 - 11477, 1993.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.57, n.1, p.641-676, 2003.

CORBETT EL, W. C. W. The growing burden of tuberculosis: Global trends and interactions with the HIV epidemic. **Archives of Internal Medicine**, v.163, n.9, p.1009-1021, 2003.

DA COSTA A. C.; NOGUEIRA S. V.; KIPNIS A.; JUNQUEIRA-KIPNIS A. P. Recombinant BCG: innovations on an old vaccine. Scope of BCG strains and strategies to improve long-lasting memory. **Frontiers Immunology** 5:–152, 2014.

DELLAGOSTIN O. A.; WALL S.; NORMAN E.; OSHAUGHNESSY T.; DALE J.W.; MCFADDEN J. Construction and a use of integrative vectors to express foreign genes in Mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v.10, p. 983-993, 1993.

DELLAGOSTIN O. A.; ESPOSITO G.; EALES L. J.; DALE J. W.; MCFADDEN J. Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. **Microbiology**, v.141, p.1785–1792,1995.

DENNEHY, M.; WILLIAMSON, A. L. Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines. **Vaccine**, v.23, n.10, p.1209-1224, 2005.

DOKLADDA KBILLAMAS P.; PALITTAPONGARNPIM P. Different behaviours of promoters in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31 p. 407–413, 2015.

DHAR N.; RAO V.; TYAGI A. K.; Skewing of the Th1/Th2 responses in mice due to variation in the level of expression. Of an antigen in a recombinant BCG system. **Immunology Letters**, v. 88, p. 197-184, 2003.

EITSON J. L.; MEDEIROS J. J.; HOOVER A. R.; SRIVASTAVA S.; ROYBAL K. T.; AINSA J. A.; HANSEN E. J.; GUMBO T.; VAN OERS N. S. Mycobacterial shuttle vectors designed for high-level protein expression in infected macrophages. **Applied Environmental Microbiology** 78(19), p. 6829–6837, 2012.

HIMMELRICH, H.; LO-MAN, R.; WINTER, N.; GUERMONPREZ, P.; SEDLIK, C.; ROJAS, M.; MONNAIE, D.; GHEORGHIU, M.; LAGRANDERIE, M.; HOFNUNG, M.; GICQUEL, B.; LECLERC, C. Immune responses induced by recombinant BCG strains according to level of production of a foreign antigen: MalE. **Vaccine**, v.18, n.24, p.2636-2647, 2000.

HART B. E.; ASRICAN R.; LIM S. Y.; SIXSMITH J. D.; LUKOSE R.; SOUTHER S. J.; RAYASAM S. D.; SAELENS J. W.; CHEN C. J.; SEAY S. A.; BERNEY-MEYER L.; MAGTANONG L.; VERMEUL K.; PANJANIRASSA P.; JIMENEZ A. E.; NG T. W.; TOBIN D. M.; PORCELLI S. A.; LARSEN M. H.; SCHMITZ J. E.; HAYNES B. F.; JACOBS W. R. Jr; LEE S.; FROTHINGHAM R. Stable expression of lentiviral antigens by quality-controlled recombinant *Mycobacterium bovis* BCG vectors. **Clinical and Vaccine Immunology** 22(7), p. 726–741, 2015.

JONGWE T. I.; CHAPMAN R.; DOUGLASS N.; CHETTY S.; CHEGE G.; WILLIAMSON A. L. HIV-1 Subtype C Mosaic Gag Expressed by BCG and MVA Elicits Persistent Effector T Cell Responses in a Prime-Boost Regimen in Mice. **PLoS One**. 11(7):e0159141, 2016.

KANEKIYO M.; MATSUO K.; HAMATAKE M.; HAMANO T.; OHSU T.; MATSUMOTO S., et al. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette–Guerin expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag. **Journal of Virology**, 2005.

KANNO A. I.; GOULART C.; ROFATTO H. K.; OLIVEIRA S. C.; LEITE L. C.; MCFADDEN J. New recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expression vectors: improving genetic control over mycobacterial promoters. **Applied Environmental Microbiology** 82(8), p. 2240–2246, 2016.

KAVITA P.; BURMA P. K.; A comparative analysis of green fluorescent protein and b-glucuronidase protein-encoding genes as a reporter system for studying the temporal expression. Profiles of promoters. **Journal of Biosciences**, v. 33, p 337-343, 2008.

KENDALL J. M.; BADMINTON M.N.; *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 216-224, 1998.

KNIGHT T. Idempotent vector design for standard assembly of Biobricks. MIT Artificial Intelligence Laboratory, 2003.

KONG C. U.; NG L. G.; NAMBIAR J. K.; SPRATT J. M.; WENINGER W.; TRICCAS J. A. Targeted induction of antigen expression within dendritic cells modulates

antigen-specific immunity afforded by recombinant BCG. **Vaccine** v. 29 p.1374-1381, 2011.

LANGERMANN S.; PALASZYNSKI S.; SADZIENE A.; STOVER C. K.; KOENIG S. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. **Nature** v, 372, 1994.

LEE H.; KIM B. J.; KIM B. R.; KOOK Y. H. The development of a novel *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector system using pMvona2, a linear plasmid from *Mycobacterium yongonense* DSM 45126T. **PLoS One** 10(3):e0122897, 2015.

LEWENS T. From bricolage to BioBricks: Synthetic biology and rational design. Studies in history and philosophy of biological and biomedical sciences, 2013.

LIANG J.; TENG X.; YUAN X.; ZHANG Y.; SHI C.; YUE T.; ZHOU L.; LI J.; FAN X. Enhanced and durable protective immune responses induced by a cocktail of recombinant BCG strains expressing antigens of multistage of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Immunology** 66(2), p. 392–401, 2015.

MATSUO, K.; YASUTOMI, Y. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2011, p. 9, 2011.

MEDEIROS, M. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; ARMOA, G. R.; DEGRAVE, W. M.; DE MENDONÇA-LIMA, L.; LOPES, M. Q.; COSTA, J. F.; MCFADDEN, J.; MCINTOSH, D. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. **Microbiology**, v.148, n.Pt 7, p.1999-2009, 2002.

MEDERLE, I.; BOURGUIN, I.; ENSERGUEIX, D.; BADELL, E.; MONIZ-PEIREIRA, J.; GICQUEL, B.; WINTER, N. Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses. **Infection and Immunity**, v.70, n.1, p.303-314, 2002.

MICHELON A.; CONCEIÇÃO F. R.; BINSFELD P. C.; DA CUNHA C. W.; MOREIRA A. N.; ARGONDISO A. P.; et al. Immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Anaplasma marginale* MSP1a antigen. **Vaccine**, v 24, p. 37–39, 2006.

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

PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACOO, V. Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. Disponível em <www.tuberculosis-textbook.com>

PANDO R. H.; CASTAÑÓN M.; ESPITIA C.; VIDAL Y. L. Recombinant BCG vaccine candidates. **Current Molecular Medicine**, v.7, p. 365-372, 2007.

PRASHER D.C; ECKENRODE V.K.; WARD W. W. Primary structure of the *Aequore victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, v.111, p. 229-233, 1992.

RIZZI C; BIANCO M.V.; BLANCO F.C.; SORIA M.; GRAVISACO M. J.; MONTENEGRO V.; VAGNONI L.; BUDDLE B.; GARBACCIO S.; DELGADO F.; LEAL K. S.; CATALDI A. A.; DELLAGOSTIN O. A.; BIGI F. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. **PLoS One** 7:e51396, 2012.

ROY S.; NARAYANA Y.; BALAJI K. N.; AJITKUMAR P. Highly fluorescent GFPm 2+-based genome integration-proficient promoter probe vector to study *Mycobacterium tuberculosis* promoters in infected macrophages. **Microbial Biotechnology** 5(1), p. 98–105, 2012.

SEIXAS F.K.; BORSUK S.; FAGUNDES M.Q.; HARTWIG D.D.; DA SILVA E.F., CERQUEIRA G.M.; DELLAGOSTIN O.A. Stable expression of *Leptospira interrogans* antigens in auxotrophic *Mycobacterium bovis* BCG. **Biological Research**, 2010.

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

KONG, C.U.; NG, L. G., NAMBIAR, J.K.; SPRATT, J.M.; WENINGER, W.; TRICCAS, J. A. Targeted induction of antigen expression within dendritic cells modulates antigen-specific immunity afforded by recombinant BCG. **Vaccine**, v. 29, p. 1374–1381, 2011.

SHIA C.; CHENA L.; CHENA Z.; ZHANGB Y., ZHOUA Z.; LUA J.; FUA R.; WANGA C.; FANGA Z.; FANA X. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant BCG over-expressing *HspX* protein. **Vaccine**, V.28 P. 5237–5244, 2010.

SHIMOMURA O.; The discovery of aeroguanin and green fluorescent protein. **Journal Microscopy**, v. 217, p. 1-2, 2005.

THOEN, C. O.; LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; KANEENE, J. B.; DE KANTOR, I. N. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. **Veterinaria Italiana.**, v.45, n.1, p.135-181, 2009.

STOVER C. K.; BANSAL G. P.; HANSON M. S.; BURLEIN J. E.; PALASZYNSKI S. R.; YOUNG J. F.; et al. Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette–Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. **The Journal of Experimental Medicine** v, 178, p. 197–209, 1993.

VARALDO P. B.; LEITE L. C.; DIAS W. O.; MIYAJI E. N.; TORRES F. I.; GEBARA V. C.; et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. **Infection and Immunity**, 2004.

VIA L. E.; DHANDAYUTHAPANI S.; DERETIC D.; DERETIC V.; Green Fluorescent Protein: A Toll for Gene Expression and Cell Biology in Mycobacteria. **Methods in Molecular Biology**, v. 101, p. 245-260, 1998.

WARD W. W.; Biochemical and Physical Properts of Green Fluorescent Protein. In : CHALFIE M., KAIN S., eds. **Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-liss, p. 45-75, 1998.

ZHENG H.; LU L.; WANG B.; PU S.; ZHANG X.; ZHU G.; SHI W.; ZHANG L.; WANG H.; WANG S.; ZHAO G.. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. **PLoS One** 3:e2375, 2008.

YUAN X.; TENG X.; JING Y.; MA J.; TIAN M.; YU Q.; ZHOU L.; WANG R.; WANG W.; LI L.; FAN X. A live attenuated BCG vaccine overexpressing multistage antigens Ag85B and HspX provides superior protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Applied Microbiology and Biotechnology** 99(24), p.10587–10595, 2015.