

13º CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE HANSENÍASE

Haia, Holanda - Set. 1988

RESUMOS SOBRE A BIOLOGIA MOLECULAR DAS MICOBACTÉRIAS *

FP 121- Molecular relatedness among *Mycobacterium leprae* Isolates defined using recombinant DNA probes. Josephine E. Clark-Curtis.

Fragmentos de insertos de 14 moléculas recombinantes de DNA, selecionados de bancos genômicos de DNA de ***Mycobacterium leprae*** foram utilizadas como sondas em hibridizações Southern com DNAs cromossômicos de quatro diferentes isolados de ***M.leprae***, digeridos por endonuclease de restrição. Os isolados de ***M.leprae*** eram provenientes de pacientes hansenianos da Índia, de um tatu naturalmente infectado dos E.U.A., e de um macaco Mangabey naturalmente infectado da África. As preparações do DNA cromossômico foram totalmente digeridos com seis diferentes endonucleases de restrição antes da separação eletroforética dos fragmentos e da transferência desses fragmentos para filtros de nitrocelulose. Os experimentos da hibridação demonstraram, essencialmente uma identidade completa entre os genomas dos isolados de ***M.leprae***, indi-

cando uma extraordinária conservação das sequências genômicas.

Uma das sondas, pYA1065, hibridiza com pelo menos 19 fragmentos do DNA cromossômico de ***M.leprae***. Essa sonda foi utilizada em experimentos de hibridização em "dot-blot" com DNA cromossômico purificado de ***M.leprae*** e hibridiza a um nível facilmente detectável com DNA de 4×10^3 células. A sonda também foi utilizada em experimentos "dot-blot" com material de biópsia de pacientes hansenianos e hibridiza facilmente com 10^4 células de ***M.leprae*** em um "dot". Essa sonda apresenta um uso potencial como método, diagnóstico para a detecção da hanseníase e também pode ser útil para monitorar o crescimento de ***M.leprae*** em coxins plantares de camundongos em experimentos que visam averiguar a eficiência de drogas para o tratamento da hanseníase.

FP 122 - Expression In recombinant E.coll of blotnlylated proteins of *M. leprae*.

M.T. Moss & J.W. Dale

(*) Versão em português de: Quaderna di cooperazione sanitaria Health cooperation papers/Cahiers de cooperation medicale.

Publicado por: Associazione italiana "Amid di R. Follereau" e, Organizzazione per la Cooperazione Sanitaria Internazionale (O.C.S.I.) of *M. leprae*.

Quando se faz o "screening" de bancos genômicos para avaliar a expressão gênica utilizando anticorpos mais um sistema de detecção streptavidina/biotina/ peroxidase, é comum o achado de clones que reagem diretamente com o reagente de detecção, na

ausência do anticorpo. Acredita-se que os produtos desses clones sejam proteínas micobacterianas que, não somente são expressas, mas também biotiniladas com sucesso pelo organismo hospedeiro (Colins e cols. 1987). Três clones foram isolados de um banco genômico de *M.leprae* construída no fago gt11; a estrutura do fragmento inserido era a mesma nos três casos. A técnica de "Western blot" demonstrou a presença de uma proteína biotinilada de 85 kDa, de mesmo tamanho que a identificada previamente em clones de BCG.

Um fenômeno semelhante foi observado com um dos clones descritos por Young e cols. (1985): o clone gt11/Y3184 expressa uma presumível proteína de fusão (> 116kDa), a qual é detectada na ausência do anticorpo, sendo provavelmente uma proteína biotinilada. Ref: Collins e cols. (1987). FEMS Microbiology Letters 43, 53-56.

Young e cols. (1985). Nature 316, 450-452.

FP 123 - Analysis of Mycobacterial Ribosomal RNA-T. Estrada-G, K. Kempself, F.T. Lamb e M.J. Colston

O estudo das sequências de RNA ribossômico fornece valiosas informações para classificação taxonômica dos organismos, as quais também podem ser exploradas para a construção de sondas marcadas para hibridização e que podem detectar pequenos números de bactérias e distinguir entre gênero e espécie. Tendo por objetivo o desenvolvimento de tais sondas, os autores determinaram as sequências nucleotídicas parciais da unidade 16S de rRNA de **Mycobacterium leprae** e outras micobactérias pela técnica de extensão de "primer". As regiões do operon de **M.tuberculosis** compreendendo a extremidade 5' da unidade 16S e a extremidade 3' da unidade 23S de rRNAs foram clonadas e sequenciadas; espera-se completar essa análise em futuro próximo. O operon de **M.leprae** também está sendo clonado antes da análise de sequência. As análises pela técnica de "Southern blot" do

genoma de **M.tuberculosis** utilizando como sondas o rRNA total marcado, e as duas regiões clonadas, demonstraram a existência de um único operon para o rRNA nessa espécie, mapeado com enzimas de restrição. As análises pela técnica de "Southern blot" também demonstraram um alto grau de conservação dentro do operon rRNA de várias cepas de **M.tuberculosis**, e que **M.microti** é extremamente relacionado ao **M.tuberculosis**.

O elevado número de cópias de RNAs ribossômicos e a existência no seu interior de sequências gênero - ou espécie - específicas torna-os atraentes para o desenvolvimento de sondas de hibridação sensíveis para detecção de bactérias dentro de tecidos de mamíferos. Os autores construíram um oligonucleotídeo que é complementar a uma das regiões mais largamente conservadas da molécula 16S bacteriana e demonstraram a sua capacidade de reconhecer o rRNA isolado de vários gêneros e espécies de bactérias, incluindo o **M.leprae**. Demonstrou-se que a sonda não reconhece o rRNA equivalente de espécies de eucariotos. Os autores estão utilizando o modelo de coxim plantar de camundongo para investigar a capacidade dessa sonda detectar e quantificar a presença de pequenos números de bactérias em tecido.

FP 124 - Expression, purification and Immunologic activity of recombinant 65-Kilodalton protein of Mycobacterium leprae.

Thomas P. Gillis & Diana Williams

Bacteriófagos lambda gt 11 lisogênicos recombinantes de **E.coli** Y1089 e plasmídios pKK223-3 e pUC18 transformantes de **E.coli** JM105 e JM103, respectivamente, foram desenvolvidos e analisados para a produção da proteína recombinante de 65-Kilodalton (r65-KDa) de **M.leprae**. Bacteriófagos recombinantes lisogênicos foram produzidos em **E.coli** Y1089 com o clone lambda gt11 Y3178, o qual contém o gene para proteína de 65-KDa de **M.leprae**. Os resultados demonstraram que todos os lisogênicos testados produziram a

r65-KDa em quantidades pequenas, porém detectáveis, confirmados pela técnica de "imunoblotting" utilizando-se um anticorpo monoclonal (MCAb) contra a proteína natural de 65-KDa. Quantidades equivalentes de células JM105 transformadas com o vetor de expressão pKK223-3, contendo um fragmento de 3,6 Kilobases (Kb) Eco RI de Y3178, produziram quantidades significativamente maiores de r65-KDa. Células JM103 de **E.coli** foram transformadas com o vetor pUC18 contendo um fragmento de 2,9Kb Nrut derivado do fragmento de 3,6 Kb Eco RI de Y3178. Em condições ótimas de crescimento, esses transformantes pUC-2,9 produziram a maior quantidade de r65-KDa após extração e purificação em cromatografia por afinidade baseada em anticorpo monoclonal. A proteína r65-KDa foi purificada de uma fração SDS-solúvel, extraída de uma fração bacteriana insolúvel, coletada por centrifugação após tratamento com lisozima-EDTA e fracionada por alta pressão. A atividade imunológica de r65-KDa mostrou que tanto os epitopos de células B quanto os de células T estavam presentes na molécula purificada, por comparação das respostas humorais e linfoproliferativas em camundongos Balb/c da proteína natural e da recombinante. Investigações futuras sobre a resposta imune à proteína de 65-KDa em outros animais e em seres humanos deverão permitir a definição do significado da resposta imune à essa molécula durante a infecção com **M.leprae**.

FP 125 Selection of recombinant DNA clones expressing the 12K 36K M.leprae antigens in E.coli K12.

R.A. Hartskeerl, M.E.G. Suykarbuyk, R. Gupta, J.E.A. Tole.

Bancos recombinantes de DNA de **M.leprae** contidos nos vetores lambda gtl1 e pEx 1,2,3 foram utilizadas para a expressão de antígenos de **M.leprae** em **E.coli** K12. Utilizando-se um "pool" de anticorpos monoclonais que reconhecem vários antígenos de **M.leprae**, selecionaram-se clones recombinantes que expressavam os determinantes antigênicos das proteínas de

12K e de 36K. A análise em "Western-blot" revelou que todos os recombinantes 12K foram produzidos como proteínas de fusão com a beta-galactosidase. A caracterização molecular e as propriedades antigênicas das proteínas recombinantes de 12K e de 36K serão apresentadas.

FP 126- Expression of heterologous genes by lysates of Mycobacterium smegmatis.

F.I. Lamb, E. Mahenthiralingam, P. Draper, H.Thangaraj e M.J.Colston.

A utilização de micobactérias e, em particular, do **M.bovis-BCG**, como agente para a construção de vacinas múltiplas, requer o desenvolvimento de vetores de clonagem que sejam capazes de exprimir uma grande variedade de genes que codificam produtos imunogênicos "estrangeiros" nesses organismos. Os meios pelos quais a expressão dos genes heterólogos será obtida, dependerão da capacidade de reconhecimento dos sinais de controle presentes nas sequências desse genes por parte dos mecanismos de transcrição e tradução micobacteriana; é possível que se torne necessária a construção de vetores de expressão micobacterianos. Enquanto que outros grupos estão envolvidos com a construção de vetores básicos de clonagem, nós estamos investigando a capacidade de transcrição e de tradução de genes heterólogos clonados em extratos "livres de células" de **M.smegmatis**. Como um auxílio na otimização e no desenvolvimento do sistema, estamos utilizando alguns genes de antígenos de **M.leprae** clonados, para um dos quais, o gene do antígeno de 18KDa, já demonstrou a eficiência do sistema.

Uma vez que é altamente provável que vetores de expressão micobacterianos também tenham que ser construídos, nós iniciamos o estudo de um possível promotor de micobactérias. A expressão de grandes quantidades do produto do gene da amidase de **M.smegmatis** pode ser introduzida pela presença do substrato acetamida no meio de cultura. Nós purificamos a amidase para a determinação de parte de sua sequência de aminoácidos, e à partir desses dados nós selecionaremos um oligonucleotídeo para identificar clones contendo esse gene. Nós então

estudaremos as propriedades do promotor, o qual apresenta um interesse potencial óbvio na elaboração de vetores de expressão micobacterianos reguláveis.

FP 127 - Construction of genomic library of *Mycobacterium leprae* gene and Its expression in *Streptomyces* lividans.

Masanao Makino, Yasuhiko Suzuki, Akihisa Nagata, Atsuo Nagata e Tonetaro Ito.

Foram construídos vetores "shuttle" que podem replicar-se tanto em *Escherichia coli* quanto em *Streptomyces lividans*. Utilizando-se um desses vetores, o pSN463, construiu-se um banco genômico de *Mycobacterium leprae* em *E.coli*. Três mil e quinhentas colônias transformadas, portadoras dos ADNs recombinantes, foram recuperadas das placas de seleção. Uma vez que o tamanho médio do ADN ligado no vetor pSN463 era de 7000 pares de bases (7 kilobases), o banco deve compreender todo ou maior parte do genoma de *M.leprae*. Os plasmídios recombinantes foram introduzidos em *S.lividans* por transformação protoplástica, e a expressão dos genes de *M.leprae* em *S.lividans* foi examinada. Em experimentos utilizando-se a técnica do "Western-blotting", verificou-se que os primeiros dentre 600 extratos de colônias transformadas de *S.lividans* apresentaram reação positiva com soro policlonal anti-*M.leprae*. Dois desses extratos reagiram com um anticorpo monoclonal específico para a proteína de 65 KDa de *M.leprae*. Esses resultados indicam que muitos genes de *M.leprae* se expressaram em *S.lividans*. Esse sistema pode ser útil para a clonagem e a expressão dos genes de *M.leprae*.

FP 128 - Use of DNA probes to investigate the genetics of *Mycobacterium leprae*.

Johnjoe McFadden, Dilip Banerjee, John Stanford

O *M.leprae* foi coletado de camundongos nu/nu inoculados com tecido de hanseníase virchoviana. Os bacilos foram extraídos com solvente orgânico - e recuperados por

centrifugação. ADN de peso molecular elevado foi extraído dos bacilos após lise celular por incubação com subtilisina, lisozima, protease e SDS. O ADN foi digerido com endonucleases de restrição e clonado em vetores plasmídicos, e também submetido à eletroforese e transferido para membranas por intermédio da técnica de "Southern-blott". Clones recombinantes radioativamente marcados foram hibridizados ao ADN ligado à membrana e os filtros foram autoradiografados. Clones derivados de *M.Ieprae* hibridizaram intensamente com o ADN e *M.Ieprae* mas reagiram muito fracamente com ADN de outras micobactérias, indicando que o *M.leprae* achasse apenas distantemente relacionado com essas micobactérias. Um clone portador de uma sequência de inserção encontrada no genoma de *M.paratuberculosis* demonstrou hibridização com o ADN de *M.leprae*, indicando que *M.leprae* pode ter sequência de inserção no seu genoma.

FP 129 - Overproduction and purification of *Mycobacterium leprae* 65 KDa protein in *Escherichia coli*.

Hiroko Nomaguchi, Masanori Matsuoka, Atsuo Nagata e Tonetaro Ito.

Com a finalidade de construir um subclone superprotetor de antígenos 65 KDa, o fago recombinante Y4178 foi digerido com EcoRI e subclonado no sítio EcoRI do vetor de expressão pUC8. Clones de plasmídios contendo o fragmento de ADN de 3.6 Kb para proteína completa de 65 KDa foram obtidos (pUC-N5 e pUC-N4, pUC-N7). A orientação desse fragmento nestes plasmídios era diferente, no entanto, um nível igualmente elevado de produção de proteína de 65 KDa foi observado, quer sob condições não indutoras ou indutoras com IPTG em ambas orientações no plasmídio vetor pUCB.

A proteína de 65 KDa de *M.leprae* de extratos proteicos brutos de células portadoras do plasmídio pUC-NS foi purificada por cromatografia de imunoafinidade em 3A-Sepharose com anticorpo monoclonal de reação cruzada de *M.leprae*.

A resposta tecidual de camundongos BALB/c pré-inoculados com *M.leprae*. (4 me-

ses antes) à proteína de 65 KDa purificada foi avaliada, observando-se grandes alterações não só nos sítios testados (coxim plantar posterior esquerdo), mas também nos sítios de pré-inoculação (coxim plantar posterior direito).

P0345- Molecular Cloning of Mycobacterial DNA.

Archana Kapoor, Anil Munshi, Pramod Khandekar e G.P. Talwar.

Uma estratégia "shot gun" ("tiro de espingarda") foi adotada para a construção de bancos genômicos de **M.leprae**, **M.tuberculosis**, H37Rv, BCG e **M.vaccae**, no plasmídeo bacteriano pBR322, no hospedeiro **E.coll**. Um dos clones recombinantes de **M.leprae**, o pMLD36, produz um antígeno imunoreativo com soro **anti-M.leprae** e não reativo com soro anti-H37Rv. Esse clone possui um inserto de 5,1 Kb e expressa uma proteína de 35 KDa. Alguns clones com DNA de BCG foram identificados, os quais reagem mais intensamente com soro anti-H37Rv e também com um "pool" de soros coletados de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, quando comparados com soro coletado de pacientes com hanseníase virchoviana. No entanto, alguns clones apresentam reações cruzadas com ambos os soros. A imunoreatividade dos sonicados desses clones, tal como determinado por ELISA, demonstra uma reatividade várias vezes maior com soro de pacientes do que com soro humano normal. Realizou-se um mapa de restrição parcial de dois desses clones, revelando a inserção de fragmentos de 3Kb e de 0,9 Kb, respectivamente. O tamanho da proteína de um dos produtos gênicos clonados, varia entre 12 e 19 KDa. O peso molecular preciso está sendo estabelecido. Os resultados serão discutidos.

PO 356 - Restriction fragment length polymorphism analysis of various isolates of mycobacteria using DNA probes of protein antigens of Mycobacterium leprae.

Diana L. Williams e Thomas P. Gillis.

A classificação das micobactérias apresenta problemas singulares atribuíveis em parte às características de crescimento fastidioso observadas para a maior parte dos membros desse gênero. Em particular, a incapacidade de cultivar o **M.leprae** in vitro limita severamente as análises fenotípicas compreensivas de isolados individuais, deixando sem resposta a questão do grau de relacionamento desses isolados. Para estudar o grau de relação de vários isolados de micobactérias, nós empregamos a técnica de análise de polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) de ADN cromossômico de vários isolados de **M.leprae** e de **M.gordonae**. As sondas de ADN utilizadas nos experimentos de hibridização foram os genes das proteínas de 65 e 28 Kda de **M.leprae** que foram isolados do banco de **M.leprae** inserida no Pago lab da gttll, subclonados no vetor plasmídico pKK223-3 purificados do ADN plasmidial por digestão com endonuclease de restrição seguida de eletroforese em gel e eluição dos fragmentos apropriados de ADN do gel. Os ADNs cromossômicos de vários isolados fenotipicamente distintos de **M.gordone** foram digeridos com diversas endonucleases de restrição. Os fragmentos de ADN foram separados em géis de agarose a 1%, transferidos para filtros Immobilon usando uma modificação da técnica de transferência de Southern e hibridados em condições de estringência elevada com as sondas de ADN de **M.leprae** marcadas com P. A análise das autorradiografias resultantes demonstrou que ambas as sondas dos genes de 65 KDa e de 28KDa de **M.leprae** forneceram padrões de RFLP nitidamente diferentes para ADNs cromossômicos de seis isolados fenotipicamente distintos de **M.gordone** digeridos com a enzima Bst EII. Quando os ADNs de dois isolados geograficamente distintos de **M.leprae** (das Filipinas e do Estado de Louisiana) foram digeridos quer com Bst EII, PvuI ou com PstI, e hibridizados com a sonda do gene da proteína de 65 KDa, padrões idênticos de RFLP foram observados. Esses resultados demonstraram a utilidade da análise dos RFLP para a diferenciação dos isolados

micobacterianos.

PO 357 - DNA probes for mycobacterium detection and classification. Raul J. Franco, Alejandro Ruiz Trevisan, Jorge Zorzopulos.

Uma grande variedade de sondas de DNA foi recentemente desenvolvida para o diagnóstico de doenças bacterianas, parasitárias e virais. Essas sondas ("probes") demonstraram ser de extrema utilidade em estudos clínicos e epidemiológicos. Com o objetivo de obter sondas micobacterianas, nós inserimos fragmentos de DNA de BCG no plasmídeo pBR322. As colônias foram hibridizadas com DNA de BCG marcado com P. Colônias que produziram sinais intensos, foram selecionadas e a especificidade dos plasmídios híbridos utilizados subsequen-

temente como sondas foi avaliada por experimentos de hibridização por "Shouthern" e por "dot". Observou-se que várias sondas independentes revelavam fortes sinais de hibridização com DNA de **M.tuberculosis** e fracos sinais com **M.bovis**, **M.avlum** e **M.gastrli**. Nenhuma reação foi observada com **M.kansasil**, **M.flavescens**, **M.fortuitum**, **M.vaccae**, **M.leprae**, **M.smegmatis**, **M.phlel** e **M.marinum**. Isto indica que a micobactéria BCG é mais relacionada ao **M.tuberculosis** do que ao **M.bovis**. Resultados semelhantes foram anteriormente obtidos por ensaios de hibridização em solução (Baess, I, Acta. Pathol. Microbiol. Scan. Sect. **B.** 87:221, 1979). Portanto, o BCG deve ser considerado uma variante de **M.tuberculosis** e a denominação **M.bovis-BCG** é imprópria. Estudos complementares sobre o uso clínico das sondas construídas estão sendo executados.