

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EXPRESSAS EM *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE

PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS OF *Mycoplasma hyopneumoniae* EXPRESSED IN *Escherichia coli* AND ANTIGENICITY ASSESSMENT

SIMIONATTO, S.¹; GALLI, V.¹; MARCHIORO, S.B.¹; PAGLIARINI, R.^{1*}; PANZARDI, A.²; SHUCK, D.C.³; SILVA, E.F.¹ DELLAGOSTIN, O.A.¹

INTRODUÇÃO

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma doença respiratória contagiosa, causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*. Este agente coloniza o epitélio respiratório ciliar, comprometendo a sua integridade e tornando-o suscetível a infecções secundárias e oportunistas (THACKER et al., 1999). A infecção apresenta ampla distribuição sendo caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade, afetando suínos de todas as idades (SOBESTIANSKY et al., 1999; FANO et al., 2005). A PES é controlada com o uso de antibióticos e procedimentos de manejo animal, além de medidas preventivas como a vacinação. A vacina disponível no mercado é uma bacterina, a qual apresenta elevado custo de produção, principalmente devido ao crescimento fastidioso deste agente. Além disso, a mesma não apresenta uma proteção satisfatória (HAESEBROUCK et al., 2004). Desta forma, estudos vêm sendo desenvolvidos buscando novas alternativas para o diagnóstico e profilaxia da PES, uma vez que a mesma apresenta elevado impacto econômico, principalmente na região Sul do Brasil. As vacinas de terceira geração em fase de testes são baseadas em antígenos nativos da bactéria, em antígenos recombinantes ou em formulações com DNA (CHEN et al., 2003; LIN et al., 2003; OKAMA et al., 2007). Porém, o número de antígenos caracterizados até o momento é bastante restrito, sendo que destes somente dois foram testados num ensaio de imunoproteção em suínos e protegeram apenas parcialmente os animais (FAGAN et al., 2000; CHEN et al., 2003). A identificação e caracterização imunológica de um número maior de proteínas antigênicas do agente podem propiciar o desenvolvimento de uma nova vacina recombinante contra PES.

Os dados gerados com o seqüenciamento e a análise proteômica complementar de duas cepas de *M. hyopneumoniae* (VASCONCELOS et al., 2005), possibilitaram a identificação de seqüências codificadoras (CDS) de proteínas antigênicas e/ou envolvidas na patogenicidade. Estas são alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas e testes de imunodiagnóstico. Entretanto, a expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em sistemas de heterólogos como *E. coli* é dificultada uma vez que o código genético do *M. hyopneumoniae* possui o códon TGA codificando para o aminoácido triptofano enquanto que em *E. coli*, TGA é um códon de terminação. No entanto, a substituição na seqüência do DNA do codon TGA para TGG, o qual codifica para o aminoácido triptofano em *E. coli*, possibilita a expressão de proteínas de *M.*

¹ Laboratório de Biologia Molecular, CenBiot/UFPel, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, s_simionatto@yahoo.com.br

² Laboratório de Patologia Suína, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS

³ Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, CeBiot, UFRGS, Porto Alegre, RS

hyopneumoniae em sistemas heterólogos. Este trabalho teve por objetivo a produção de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli* e avaliação de sua antigenicidade, buscando eleger alvos potencialmente protetores para serem testados em ensaio de imunoproteção em suínos. A realização deste estudo permitirá a identificação e caracterização de novos alvos antigênicos, contribuindo para o desenvolvimento de vacinas de subunidade, sendo, portanto, um passo importante na definição de estratégias alternativas para produção de insumos eficientes no controle da PES.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amplificação dos alvos e mutação sítio-dirigida: Treze alvos correspondentes a dez diferentes CDS foram amplificados por PCR com o auxílio da ezinma Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448. As CDS que continham códons TGA foram submetidas à mutagênese sítio-dirigida através da técnica de PCR-overlapping (HO et al., 1989), modificada conforme segue. Os genes foram amplificados em dois segmentos, tendo o *primer forward* do primeiro segmento e o *reverse* do segundo a seqüência alterada de TGA para TGG, com sobreposição de pelo menos 12 nucleotídeos. Cada um dos segmentos foi amplificado separadamente e purificado. Estes *amplicons* foram utilizados como DNA molde para uma segunda amplificação, que por haver sobreposição das regiões, a *Taq* DNA Polimerase é capaz de incorporar os nucleotídeos havendo a extensão de todo o alvo selecionado. Para aumentar a sensibilidade, foi realizada uma terceira amplificação utilizando os *primers* externos, aumentando também a especificidade dos alvos mutados a serem clonados.

2.2 Clonagem dos alvos: Os fragmentos gerados na PCR, bem como os *amplicons* mutados, foram submetidos à clonagem direcional no vetor de expressão em *E. coli* Champion pET200D/TOPO His-tag (Invitrogen), e transformados por eletroporação em *E. coli* TOP10F. A triagem dos clones recombinantes foi realizada através da técnica *microprep* (JOUGLARD et al., 2002) e a confirmação por digestão com enzimas de restrição.

2.3 Expressão e Purificação das proteínas recombinantes: As proteínas foram expressas em *E. coli* BL21DE₃ Codon Plus RIL, e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema automatizado de purificação de proteínas ÄKTAPrime (GE Healthcare). A pureza das mesmas foi verificada em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a concentração determinada pelo kit BCA™ Protein Assay (Pierce).

2.4 Análise da antigenicidade: As proteínas recombinantes purificadas foram avaliadas quanto ao reconhecimento por anticorpos produzidos durante a infecção natural, através das técnicas de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e *Western blot*. Para ambas as técnicas, a concentração de antígeno, a diluição do soro e do anti-soro IgG de suíno, foram otimizados. Para o ELISA, as condições utilizadas foram de 10 ng de proteína para a sensibilização das placas, diluição dos soros 1:100 e anti-soro IgG de suíno diluído 1:6000. Foram testados 37 soros de suínos naturalmente infectados com necropsia positiva para a PES, 10 soros de suínos livres de patógenos específicos (SPF) e 1 soro de um suíno previamente imunizado com a cepa patogênica 7448 (hiperimune). A reação colorimétrica do ELISA foi desenvolvida com *o-phenylenediamine dihydrochloride* (Sigma) e peróxido de hidrogênio, após 15 min de incubação no escuro. A reação foi bloqueada com 1 M H₂SO₄ e a absorbância foi determinada a 492 nm com

leitor de microplacas (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments, Huntsville, AL). A média das absorbâncias do ELISA foi calculada com os soros analisados em triplicata. O ponto de corte foi determinado usando os soros de animais SPF (Specific Pathgen Free). Foi calculada a média dos valores de ELISA e o desvio padrão (S.D.) dos soros SPF. O ponto de corte foi calculado com os valores das médias + 2 S.D. Os valores iguais ou superiores ao ponto de corte foram considerados positivos.

No *Western blot* foram testados 5 soros de suínos naturalmente infectados com necrópsia positiva para a PES, 1 soro de suíno SPF e 1 soro de suíno hiperimune, previamente imunizado com a cepa patogênica 7448. Para tanto, foi utilizado 2 µg de proteína purificada, soros diluído 1:100 e anti-soro IgG de suíno diluído 1:6000. Visando diminuir reações inespecíficas contra antígenos de *E. coli* os soros de suínos foram adsorvidos em extrato de *E. coli*. As bandas das proteínas imunoreativas foram detectadas com 4-chloro-1-naphthol e 0,015% (v/v) de peróxido de hidrogênio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os treze alvos selecionados foram amplificados por PCR e clonados no vetor pET200D-TOPO. A metodologia adotada para a realização da mutação sítio-dirigida foi bem sucedida, uma vez que os 3 alvos selecionados e submetidos à mutação tiveram a substituição do códon TGA por TGG, resultado confirmado por seqüenciamento. As 13 proteínas foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus RIL e purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel. A Figura 1 demonstra 9 proteínas purificadas.

No ELISA todas as proteínas recombinantes foram reconhecidas por anticorpos presentes nos soros dos suínos com lesões características da doença e no soro de suíno previamente imunizado (hiperimune). Para todas as proteínas os valores de absorbância obtidos com estes soros foram superiores ao ponto de corte e, portanto considerados positivos. No entanto, algumas proteínas foram mais reativas que as demais, como a adesina P102AB e a proteína de choque térmico P42 e P42 C-terminal (Fig.2). No *Western blot*, somente algumas proteínas foram reconhecidas por anticorpos presentes nos soros dos suínos naturalmente infectados com o *M. hyopneumoniae* (Fig. 3). Em ambas as técnicas utilizadas para a avaliação da antigenicidade, as proteínas P102AB (adesina), P42 (proteína de choque térmico) e P42 C-terminal foram reativas. O reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos presentes no soro de suínos convalescentes indica que estas proteínas são expressas pela bactéria durante a infecção, tornando-as candidatas promissoras ao desenvolvimento de vacinas. A especificidade destas proteínas recombinantes com outras espécies de micoplasma também será avaliada, buscando contribuir para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico. Além dos testes de antigenicidade, estas proteínas recombinantes serão avaliadas quanto ao potencial imunogênico. Para tanto, um experimento de inoculação de camundongos com as proteínas recombinantes está sendo realizado.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a estratégia de clonagem direcional no vetor de expressão em *E. coli* pET200/TOPO foi eficiente uma vez que possibilitou a clonagem dos treze alvos de *M. hyopneumoniae* selecionados. Todos os genes clonados expressaram a proteína de interesse em *E. coli*, possibilitando a purificação das mesmas em quantidades suficientes para os

estudos de antigenicidade e imunogenicidade. As proteínas reconhecidas por anticorpos presentes no soro de suínos naturalmente infectados indicam que as mesmas são expressas durante a infecção pelo *M. hyopneumoniae* e, portanto, são alvos promissores para testes de imunoproteção em suínos. A associação de diferentes técnicas nos permitiu inferir quanto à capacidade imunogênica de cada proteína recombinante, possibilitando com isso a seleção dos antígenos mais imunoreativos. Estes antígenos serão testados num ensaio de desafio em suínos, buscando avaliar o potencial protetor como vacina.

REFERÊNCIAS

- CHEN, Y. L.; WANG, S. N.; YANG, W. J.; CHEN, Y. J.; LIN, H.H.; SHIUAN D. Expression and Immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* Heat Shock Protein Antigen P42 by DNA Vaccination. **Infection and Immunity**, 2003, 71, p.1155-1160.
- FAGAN, P.K.; WALKER, M.; CHIUN, J.; EAMENS, G.J.; DJORDJEVIC, S.P. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microbial Pathogenesis**, 2000, 30, p.101-110.
- FANO, E.; PIJOAN, C.; DEE, S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. **Can J Res.**, 2005, 69, p.223-228.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Vet Microbiol**, 2004, 100, p.255–268.
- JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, 2002, 71, p.234.
- LIN, J. H.; WENG C. N.; LIAO C. W.; YEH K. S.; PAN M. J. Protective Effects of Oral Microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* Vaccine Prepared by Co-Spray Drying Method. **J. Vet. Med. Sci.**, 2003, 65, p.69-74.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. **Pneumonia enzoótica**. Clínica e Patologia Suína, 2ª ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, 1999, p.359.
- THACKER, E. L.; HALBUR, P. G.; ROSS, R. F.; THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **J Clin Microbiol**, 1999, 37, p.620–627.
- VASCONCELOS, A.T.R.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V.; et al. Swine and Poultry Pathogens: the Complete Genome Sequences of Two Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a Strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**. 2005, 187, p.5568-5577.

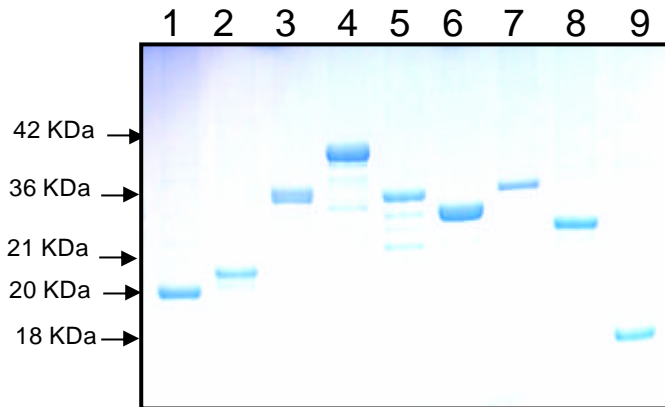


Figura 1. SDS-PAGE 12% de 9 proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade. Linha 1, P102 (20 kDa); Linha 2, P37AB* (21 kDa); Linha 3, P146(277) (36 kDa); Linha 4, P102AB* (42 kDa); Linha 5, P216ABC** (37 kDa); Linha 6, MHP0038 (35 kDa); Linha 7, P115 (41 kDa); Linha 8, P97-Like (35 kDa); Linha 9, P42 C-terminal (18 kDa). Os asteriscos indicam o número de TGA substituídos por TGG.

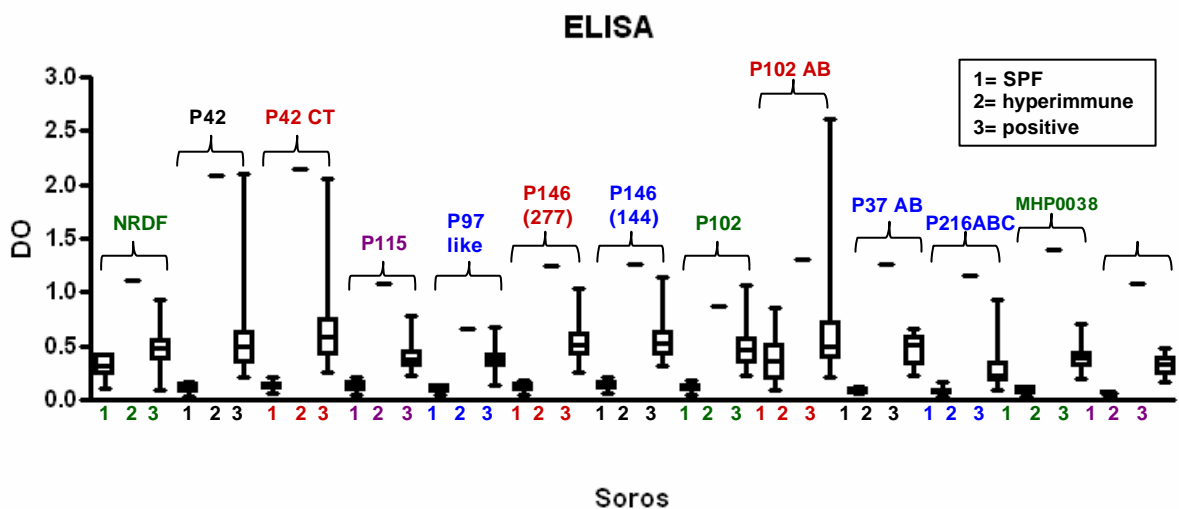


Figura 2. Reatividade determinado por ELISA de 13 proteínas recombinantes contra soro de suínos (diluídos 1:100). Anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:6000) foi usado como anticorpo secundário. O ponto de corte representa à média dos soros SPF + 2 desvio padrão. Todas as proteínas tiveram valores iguais ou superiores ao ponto de corte quando confrontadas com o soro hiperimune e os soros convalescentes. Os dados representam à média dos 10 soros SPF (1); valor do soro hiperimune (2); média dos 37 soros de suínos naturalmente infectados (3).

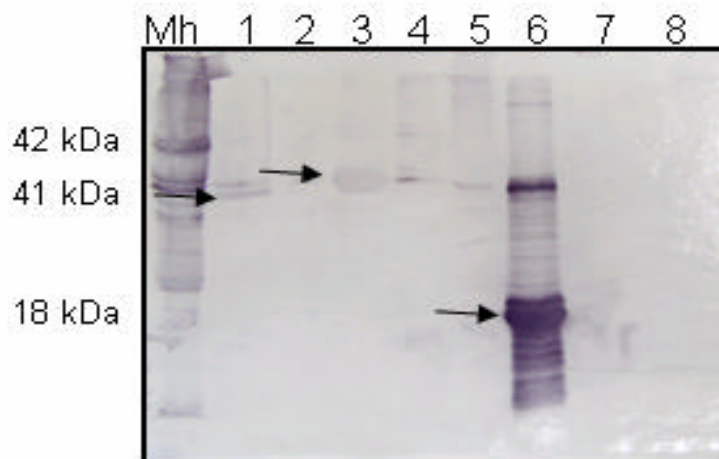


Figura 3. *Western blot* de 8 proteínas recombinantes separadas em 12% SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e confrontadas com *pool* de 5 soros de suínos naturalmente infectados (diluídos 1:100). Anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:6000) foi usado como anticorpo secundário. Mh, extrato de *M. hyopneumoniae* cepa 7448; Linha 1, P115 (41 kDa); Linha 2, P102 (20 kDa); Linha 3, P102AB* (42 kDa); Linha 4, P146(277) (36 kDa); Linha 5, P146(144) (17 kDa); Linha 6, P42 C-terminal (18 kDa); Linha 7, P37AB* (21 kDa). As setas indicam as proteínas recombinantes que reagiram contra os soros de suínos naturalmente infectados.