

## **PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae* VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA CONTRA A PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA**

**GALLI, Vanessa<sup>1</sup>; SIMIONATTO, Simone<sup>1</sup>; MARCHIORO, Silvana, B.<sup>1</sup>;  
SCEER, Betânia<sup>1</sup>; DELLAGOSTIN, Odir, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354 – Pelotas/RS, CEP 96010-900. vane.galli@bol.com.br

### **1. INTRODUÇÃO**

*Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico primário da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das doenças respiratórias mais comuns que acomete suínos no mundo. É caracterizado por alta morbidade e baixa mortalidade, levando à baixa conversão alimentar e retardo no crescimento dos suínos em todas as idades, causando consideráveis perdas econômicas, principalmente na região sul do Brasil (Sobestiansky *et. al.*, 1999; Ross, 1986). Este agente coloniza o epitélio ciliado respiratório, comprometendo a sua integridade e tornando-o suscetível a infecções secundárias e oportunistas (Thacker *et. al.*, 1999). A PES pode ser controlada com o uso de antibióticos e procedimentos de manejo animal, no entanto, a vacinação é considerada a forma mais eficiente de controle desta infecção (Ross *et. al.*, 1986). A vacina comumente utilizada consiste de células inteiras (bacterina) e apresenta elevado custo de produção, principalmente devido ao crescimento fastidioso deste agente. Além disso, a mesma não previne a colonização e não apresenta uma proteção satisfatória (Sobestiansky *et. al.*, 1999).

Neste contexto, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da 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 deste agente. Estes dados contribuem para a caracterização de novas proteínas antigênicas, as quais, além de serem potencialmente úteis para o desenvolvimento de testes imunodiagnóstico e/ou vacinação, podem contribuir para a elucidação dos fatores de virulência e de patogenicidade destes microrganismos (Wassenaar & Gaastra, 2001).

Potenciais antígenos vêm sendo testados em diferentes sistemas de vacinação, porém o repertório de antígenos caracterizados até o momento é bastante restrito. Destes, somente dois foram testados em ensaio de

imunoproteção em suínos, no entanto, somente uma proteção parcial foi obtida (Fagan *et. al.*, 2000; Shimoji *et. al.*, 2003). Neste âmbito, a identificação e caracterização imunológica de um número maior de proteínas antigênicas do agente podem minimizar estas limitações. Entretanto, a expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em *Escherichia 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. A substituição na seqüência do DNA do códon TGA para TGG, o qual codifica para o aminoácido triptofano em *E. coli*, possibilita a expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em sistemas heterólogos. Buscando contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas no controle da PES, este trabalho teve por objetivo a clonagem e purificação de seis proteínas de *M. hyopneumoniae*, visando o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra esta doença.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**2.1 Amplificação dos Alvos e Mutação Sítio-Dirigida:** Seis CDS (MHP0418, MHP0107, MHP0338, MHP0660, MHP0272 e MHP0372) de *M. hyopneumoniae* foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico com o auxílio da enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). As seqüências que continham códons TGA foram submetidas à mutagênese sítio-dirigida através da técnica de PCR-*overlapping* 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. Porém, 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 no vetor de expressão pAE 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.

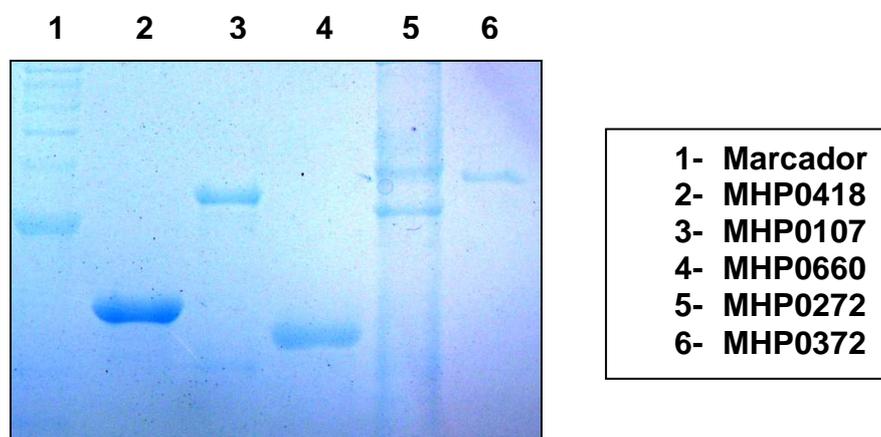
**2.3 Expressão e Purificação das proteínas recombinantes:** As proteínas foram expressas em *E. coli* BL21DE<sub>3</sub> Codon Plus RIL, e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema automatizado de purificação ÄKTA-Prime (GE Healthcare). A pureza das mesmas foi verificada em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a concentração determinada pelo kit BCA™ Protein Assay (Pierce).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seis alvos selecionados foram amplificados por PCR e clonados no vetor pAE. As CDS MHP0418 e MHP0338, submetidas à mutação sítio-dirigida,

apresentaram a alteração do códon TGA por TGG, resultado confirmado por seqüenciamento. Cinco proteínas foram expressas em *E. coli* BL21DE<sub>3</sub> Codon Plus RIL e purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel, sendo obtidas concentrações suficientes para uma posterior avaliação do potencial antigênico e imunogênico destas proteínas (Figura 1).

Os antígenos recombinantes purificados estão sendo utilizados na inoculação de camundongos BALB/c fêmeas. O título de anticorpos sistêmicos será monitorado por ELISA utilizando como antígeno as proteínas recombinantes. O soro dos camundongos será confrontado contra extratos de *M. hyopneumoniae* através da técnica de *Western blot* para avaliar a capacidade das mesmas em induzir uma resposta imune humoral que reconheça as proteínas nativas. As proteínas também serão avaliadas quanto ao reconhecimento por anticorpos produzidos durante a infecção natural, através das técnicas de *dot blot* e *Western blot*.



**Figura 1.** SDS-PAGE 15% das proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade.

#### 4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a estratégia de clonagem no vetor de expressão pAE foi eficiente uma vez que possibilitou a clonagem dos seis alvos *M. hyopneumoniae* selecionados. Cinco destes foram expressos em *E. coli*, possibilitando a purificação das proteínas recombinantes em quantidades suficientes para os estudos de imunogenicidade e antigenicidade. A realização deste estudo permitirá a caracterização de novos alvos potencialmente 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.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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, v.30, p. 101-110.

2. 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, H 71, p.234.
3. ROSS, R.F., LEMAN, A.D., STRAW, B., GLOCK, R.D., MENGELING, W.L., PENNY, R.H.C., SCHOLL, E. Diseases of Swine. **Mycoplasma Disease**. The Iowa State University Press, Ames, IA, 1986, p. 469–483.
4. SHIMOJI, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., NOSAKA, H., MORI, Y., 2003. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. **Vaccine**. v.21, p.532–537.
5. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. **Pneumonia enzoótica**. Clínica e Patologia Suína, 2ª ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, 1999, p.359.
6. THACKER, E. L., HALBUR, P. G., ROSS, R. F., Thanawongnuwech, R. & Thacker, B. J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **J Clin Microbiol**, 1999, v.37, p.620–627.
7. VASCONCELOS, A.T.R.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V. Swine and Poultry Pathogens: the Complete Genome Sequences of Two Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a Strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**. 2005, v.187, n.16, p. 5568-5577.
8. WASSENAAR, T.M., GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? **FEMS Microbiol. Lett.** 2001, v.201, p.1–7.