

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUIMERA DE ANTÍGENOS DE *Mycoplasma hyopneumoniae*

FISCH, Andressa¹; MARCHIORO, Silvana B.¹; GOMES, Charles K.¹; GALLI, Vanessa¹; DELLAGOSTIN, Odir¹; CONCEIÇÃO, Fabrício R.²

¹Laboratório de Biologia Molecular; ²Laboratório de Imunologia Aplicada – Centro de Biotecnologia/UFPel, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354 – Pelotas – RS, CEP 96010-900. dessafh@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), doença de impacto econômico significativo na criação de suínos em todo o mundo (THACKER *et al.*, 2006). O patógeno adere-se ao epitélio ciliado do trato respiratório, causando danos que favorecem o desenvolvimento de infecções secundárias (MAROIS *et al.*, 2010).

O controle desta enfermidade é feito através da vacinação associada à adequadas práticas de manejo. As vacinas utilizadas atualmente são bacterinas, e embora reduzam a queda dos indicadores produtivos, apresentam alto custo de produção e eficiência limitada (HAESEBROUCK *et al.*, 2004). A importância econômica da doença justifica os esforços para determinar novos métodos de imunização de suínos contra a PES. Potenciais antígenos estão sendo testados em diferentes sistemas de vacinação (CHEN *et al.*, 2003), no entanto, também têm conferido apenas proteção parcial, quando avaliados individualmente. A fusão de alguns antígenos, os quais já conferiram proteção parcial aos suínos quando avaliados individualmente, pode incrementar o controle da PES, em especial quando fusionados a um adjuvante da imunidade de mucosa. Uma vez que a infecção por *M. hyopneumoniae* ocorre na mucosa respiratória, uma adequada estimulação do sistema imune local é estratégica.

Este trabalho objetiva descrever o processo de clonagem, expressão, purificação e caracterização antigênica da fusão de três antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae* com a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* recombinante (rLTB), um potente adjuvante de mucosa.

2. METODOLOGIA

2.1. Clonagem do alvo

O gene sintético que codifica para a proteína quimérica LTB-R1-P42-Nrdf (FISCH *et al.*, 2009) foi clonado no vetor pAE, de expressão em *E. coli*. Os clones recombinantes foram selecionados através de uma extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio E foram propagados em caldo LB contendo 100µg mL⁻¹ de ampicilina (37°, 200rpm) e submetidos à extração de plasmídeos com o kit *GFXTM Micro Plasmid Prep* (GE Healthcare). A extração de plasmídeo foi checada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e a presença do inserto foi confirmada por digestão com enzimas de restrição.

2.2. Expressão e purificação da proteína quimérica

Os clones recombinantes foram utilizados para transformar por choque térmico (SAMBROOK, 2001) *E. coli* BL21DE₃ Codon Plus RIL, inoculada em meio LB contendo ampicilina e cloranfenicol e incubada (37°C, 200rpm) até atingir a fase

log de crescimento, determinada por espectrofotometria. A partir desse momento, a expressão da proteína foi induzida pela adição de 0,3M de IPTG, permanecendo em incubação por mais quatro horas. O extrato obtido após a centrifugação do cultivo foi ressuspenso em solução contendo 0,2 % de *N-Lauroylsarcosine*, sonificado e solubilizado durante 72 horas sob agitação a 4 °C. O material solubilizado foi centrifugado por uma hora a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado e a proteína purificada por cromatografia de afinidade em coluna de *Sepharose* (HisTrap™) carregada com níquel. A presença da proteína foi verificada por SDS-PAGE. O material purificado foi dialisado e concentrado em polietilenoglicol.

2.3. Caracterização por *Western blot*

A proteína quimérica e as proteínas recombinantes R1, P42, NrdF e LTB, previamente produzidas pela metodologia já citada, foram submetidas à SDS-PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (90min, 100v). As membranas foram bloqueadas com leite em pó a 5% (*overnight*, 4°C), e lavadas com PBS-T. Após, as membranas foram incubadas individualmente (2h, 37°C) com os seguintes soros e diluições: monoclonal anti-R1 (1:4000), policlonal anti-P42 (1:100), policlonal anti-NrdF (1:100) e policlonal anti-LTB (1:1000), produzidos em camundongos BALB/c. Após nova lavagem, as membranas foram incubadas com soro anti-mouse (1:6000, 1h, 37°C) conjugado com peroxidase. As bandas imunorreativas foram evidenciadas através da revelação com DAB e 0,5 % de peróxido de hidrogênio diluídos em TrisHCl 50 Mm

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína quimérica LTB-R1-P42-NrdF, constituída por três antígenos de *M. hyopneumoniae* com alta capacidade imunogênica, já avaliados em estudos prévios, associados à subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), um potente adjuvante de imunidade de mucosa, pode ser uma alternativa na busca de vacinas mais eficientes para o controle da PES. A LTB é uma molécula sinalizadora, capaz de modular a resposta do sistema imunológico, e sua ação como adjuvante da imunidade de mucosa está consolidada entre os pesquisadores (SIMMONS *et al.*, 2001a). Estudos demonstram que a LTB é um adjuvante capaz de induzir resposta imune celular, incluindo células T citotóxicas (SIMMONS *et al.*, 2001b), e humoral, estimulando resposta sistêmica e secretória de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados (FINGERUT, 2006; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006).

A codificação do gene sintético em vetor pAE permitiu a expressão da proteína em cultivo de *E. coli*, facilitando sua obtenção. O teste de solubilidade indicou que a proteína foi expressa na forma insolúvel, em corpúsculos de inclusão. A solubilização foi realizada com tampão contendo o composto solubilizante *N-Lauroylsarcosine*. O sobrenadante foi purificado através de cromatografia de afinidade e as alíquotas obtidas apresentaram, quando submetidas à eletroforese, banda correspondente à proteína quimérica (55 kD) (Fig.1) O material purificado foi dialisado em tampão contendo NaCl 200 mM e Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e concentrado em PEG.

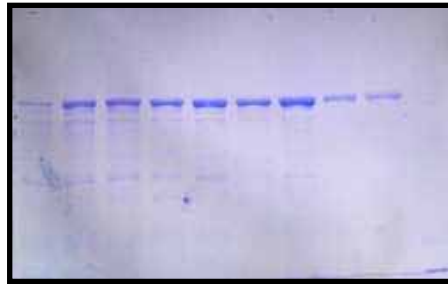


Figura 1: Gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie Blue* demonstrando a proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade.

A proteína quimérica teve sua antigenicidade avaliada através da técnica de *Western blot*. A incubação das membranas com os anti-soros, contra cada antígeno e contra o adjuvante LTB, demonstrou, na revelação, a ocorrência de reação específica antígeno-anticorpo entre o soro em questão e a proteína quimérica bem como com as proteínas não fusionadas (Fig.2). Isto evidenciou a identidade de cada subunidade da quimera, mostrando que a fusão conservou alguns epítomos imunogênicos destes antígenos.

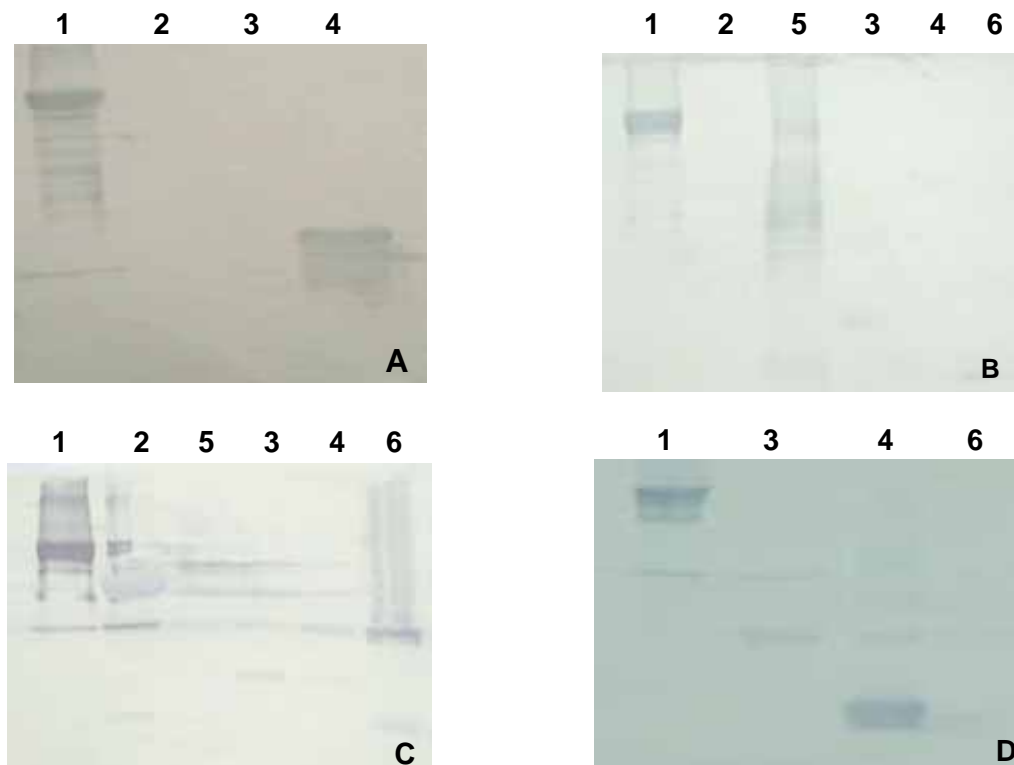


Figura 2: *Western blot* demonstrando as reações entre os soros e as proteínas: 1-quimera sintética, 2-P42, 3-Nrdf, 4-R1, 5-LTB, 6-extrato da cepa RIL de *E. coli* A - soro anti-R1. B – soro anti-LTB. C – soro anti-P42. D – soro anti-Nrdf.

4. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos, conclui-se que os procedimentos realizados para clonagem, expressão e purificação da proteína quimérica LTB-R1-P42-Nrdf foram eficientes. A proteína quimérica obtida demonstrou expressar os epítomos originais das proteínas recombinantes, reconhecidos por soros contendo

anticorpos contra as mesmas, sendo potencialmente capaz de estimular resposta imune contra estes antígenos de *M. hyopneumoniae*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v.71, n.3., p.1155-1160, 2003.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O.A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin with Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v.24, p.5734-5743, 2006.

FINGERUT, E.; GUTTER, B.; GOLDWAY, M.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. B subunit of E. coli enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination **Veterinarian Immunology Immunopathology**, v. 112, p. 253–263, 2006.

FISCH, A.; MARCHIORO, S.B.; GALLI, V.; SIMIONATTO, S.; GOMES, C.K.; DELLAGOSTIN, O.; CONCEIÇÃO, F.R. Design de um gene sintético para expressão de uma quimera de antígenos de Mycoplasma hyopneumoniae. **Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**. Pelotas, Rio Grande do Sul. 2009.

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**, v.100, p.255–268, 2004.

MAROIS, C.; DORY, D.; FABLET, C.; MADEC, F.; KOBISCH, M. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of Mycoplasma hyopneumoniae strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. **J Appl Microbiol**, v.108, n.5, p.1523–33, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.H. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SIMMONS, C.P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B.M.; WILLIAMS, N.A. et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scand J Immunol**, v.53, p.218-26, 2001a.

SIMMONS, C.P.; HUSSELL, T.; SPARER, T.; WALZL, G.; OPENSHAW, P.; DOUGAN, G. Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses. **Journal Immunology**, v.166, p.1106-1113, 2001b.

THACKER, E.L. Mycoplasmal diseases. In: Straw BE, Zimmermann J, D’Allaire S, Taylor DJ, editors. **Diseases of swine**. 9 ed. Ames: Iowa State University Press; p.700-713, 2006.