

Taylor Gonchoroski, Veridiana G. Virginio, Arnaldo Zaha & Henrique B. Ferreira (Orientador).

Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional - Centro de Biotecnologia - UFRGS

taylor@cbiot.ufrgs.br

• Introdução:

Mycoplasma hyopneumoniae causa a pneumonia enzoótica suína (PES), uma doença respiratória crônica de alta prevalência mundial (Ross, 1999). As vacinas utilizadas no combate a PES consistem em células bacterianas inativadas (bacterinas) que apresentam um custo final relativamente alto e conferem proteção parcial ao animal. Sendo assim, o desenvolvimento de vacinas recombinantes surge como uma alternativa promissora para o controle da PES. A partir do sequenciamento dos genomas das cepas 7448 e J (Vasconcelos *et al.*, 2005) (Figura 1) foi possível a identificação preliminar, através de análises *in silico*, de genes que codificam proteínas com potencial para utilização em vacinação. Baseado nessas análises prévias e em estudos proteômicos (Pinto *et al.*, 2007), foram selecionadas algumas proteínas para avaliação do seu potencial vacinal (MH2, MH3 e MH4), e a utilização de alguns dos antígenos evidenciados em vacinação contra PES foi objeto de patenteamento pelas redes Projeto Genoma Brasileiro (BRGene) & Rede Sul de Análise de Genomas e Biologia Estrutural (PIGS) (patente nº. PI0306775-0).

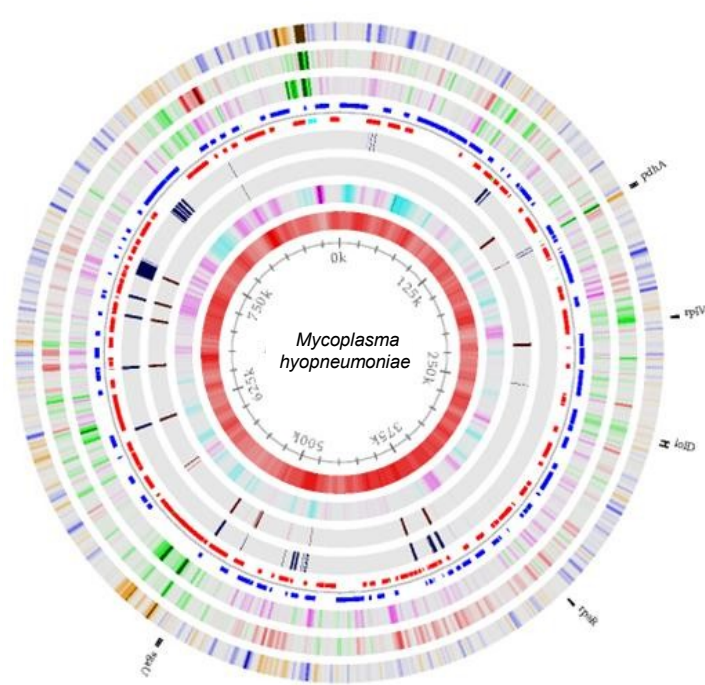


Figura 1: Representação de genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

• Objetivos:

Caracterização imunológica de proteínas recombinantes antigênicas de *M. hyopneumoniae* com potencial para utilização no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a PES. Será analisada a resposta imune em camundongos por antígenos purificados ou por construções de DNA recombinantes. Os antígenos e construções de DNA com maior potencial imunogênico para camundongos serão posteriormente utilizados na imunização de suínos, para avaliação da proteção proporcionada contra infecções por *M. hyopneumoniae*.

• Metodologia e Resultados:

Produção e purificação de proteínas antigênicas de *M. hyopneumoniae*:

As regiões das sequências codificadoras (CDSs) das proteínas recombinantes, previamente clonadas no vetor de expressão pGEX-4T3, foram definidas levando em consideração alguns critérios tais como a exclusão de códons TGA (códon que codifica triptofano em *M. hyopneumoniae*, e é um códon de terminação em *Escherichia coli*) e de regiões codificadoras de agrupamentos de aminoácidos hidrofóbicos. As condições de expressão e purificação foram primeiramente otimizadas para cada proteína recombinante. As porções proteicas de MH2, MH3 e MH4 foram produzidas em fusão com glutathione-S-transferase (GST) em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade. A proteína recombinante purificada foi obtida pela clivagem com trombina (Smith & Johnson, 1988). Duas proteínas recombinantes já foram purificadas. A MH2 foi melhor expressa na cepa de *E. coli* BL21 pLysE, e apresentou um rendimento final de 10 mg/L de cultivo. O total de antígeno purificado até o momento é de 34 mg (Figura 2). Já a MH3 foi melhor expressa em BL21 Star, e apresentou um rendimento final de 6,5 mg/L de cultivo. O total de antígeno purificado é de 46 mg (Figura 3). A proteína MH4 apresentou problemas na etapa de purificação.

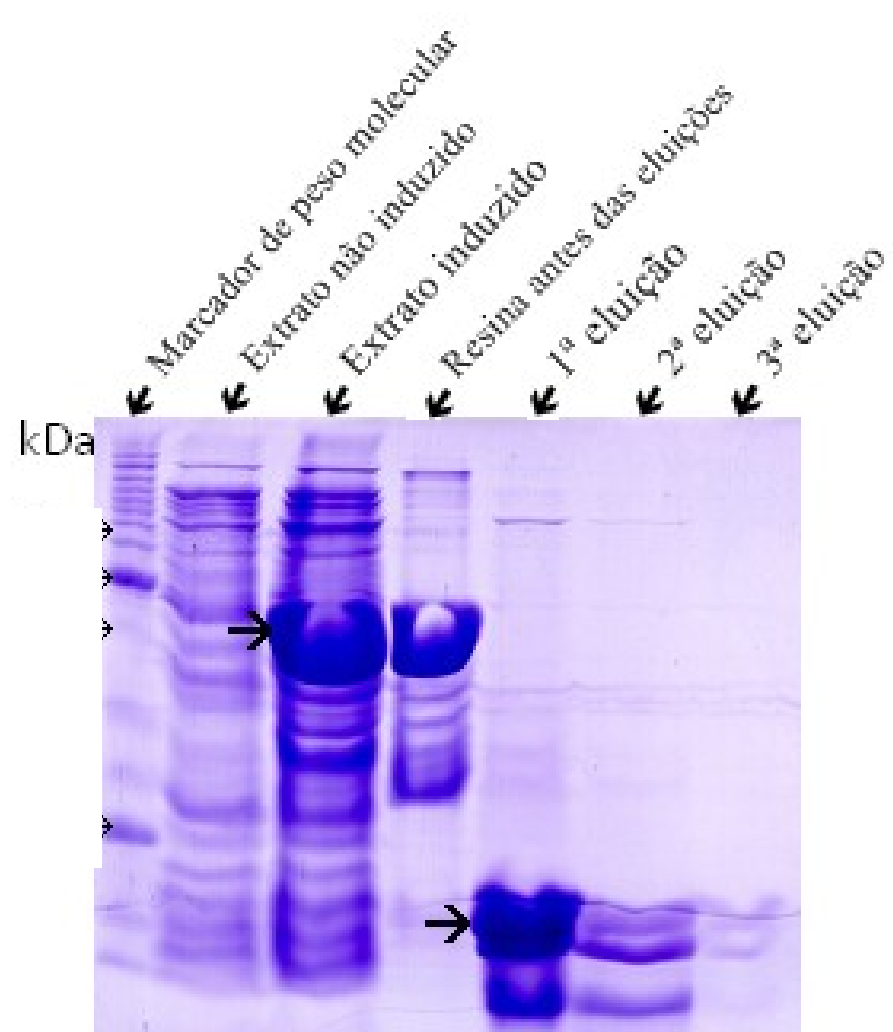


Figura 2: Análise eletroforética em SDS-PAGE 15% da MH2 purificada. As setas indicam a proteína de fusão, e a MH2 purificada. A indução da expressão foi feita com IPTG (0,1mM).

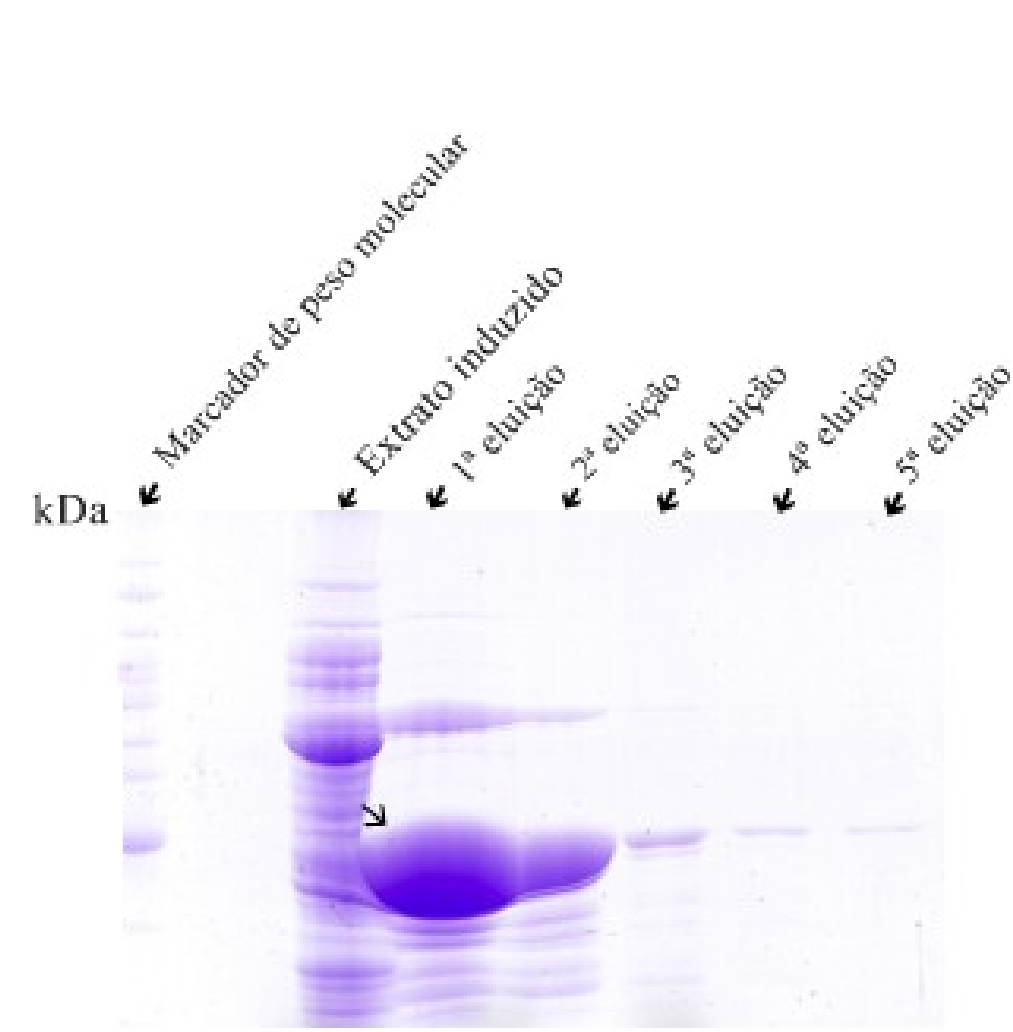


Figura 3: Análise eletroforética em SDS-PAGE 12% da MH3 purificada. As setas indicam a proteína de fusão, e a MH3 purificada. A indução da expressão foi feita com IPTG (0,1mM).

Apoio: CNPq-MAPA

Clonagem e expressão da MH4 em um sistema alternativo

A proteína MH4 apresentou problemas na etapa de clivagem com trombina, quando foi expressa em pGEX-4T3. A CDS foi então clonada no vetor pGEX4T1-TEV por recombinação homóloga *in vivo* utilizando a cepa KC8 (Parrish *et al.*, 2004). Os possíveis recombinantes foram analisados por PCR (Figura 4), utilizando iniciadores do vetor, e como molde, os plasmídeos extraídos de colônias bacterianas obtidas após a recombinação. Foram obtidos 3 possíveis clones. Testes de expressão preliminares foram feitos em 4 cepas de *E. coli* (Códon Plus R11, pLysE, Rosetta e RP) (Figura 5). A proteína está em fase de otimização do processo de purificação.

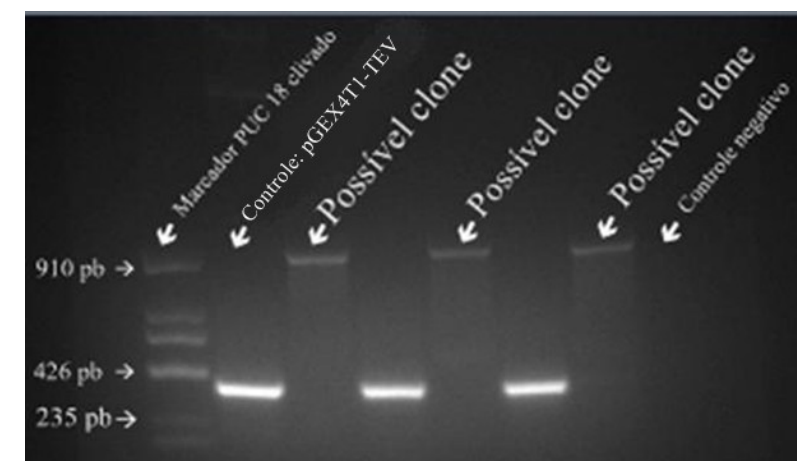


Figura 4: Análise eletroforética em gel de agarose 1,2% dos produtos de amplificação por PCR dos possíveis clones de MH4 em pGEX4T1-TEV. As setas que indicam possíveis clones mostram os produtos de amplificação por PCR dos plasmídeos obtidos após a recombinação *in vivo*, no tamanho esperado de 980 pb. O controle indicado na figura como pGEX4T1-TEV é o produto de amplificação apenas do vetor íntegro (395 pb). O marcador molecular é o pUC 18 clivado com DdeI e EcoRI.

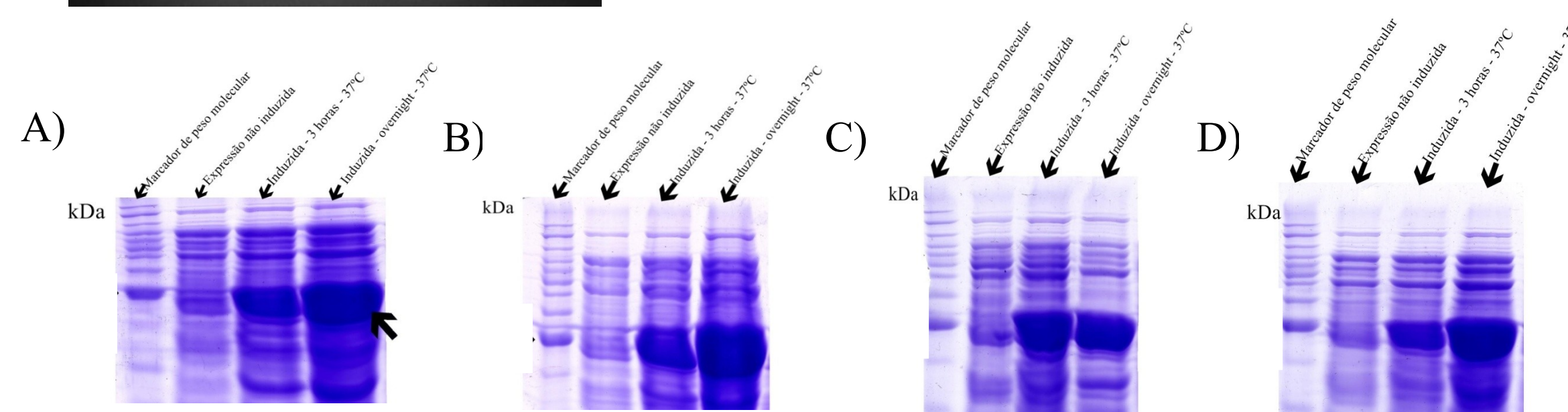


Figura 5: Análise eletroforética em SDS-PAGE 15% da expressão da MH4. Os géis (A-D) mostram a expressão da proteína recombinante nas 4 cepas de *E. coli* em diferentes tempos de indução com IPTG (01 mM). A) Códon Plus R11, B) PlysE, C) Rosetta e D) RP. A seta maior em A) indica a banda no tamanho esperado da proteína de fusão (MH4+GST).

Clonagem de CDSs codificadoras de antígenos de *M. hyopneumoniae* em vetores plasmidiais de expressão eucariótica:

As mesmas CDSs selecionadas para a expressão em *E. coli* foram clonadas em vetores plasmidiais para a expressão em células de mamíferos. O vetor utilizado foi o pcDNA3.1+ (Chen *et al.*, 2008) e a clonagem foi feita pelo método de recombinação *in vivo* em *E. coli* KC8. Os possíveis recombinantes foram analisados por PCR, como descrito no tópico de clonagem acima (Figura 6), e estão em fase de sequenciamento.

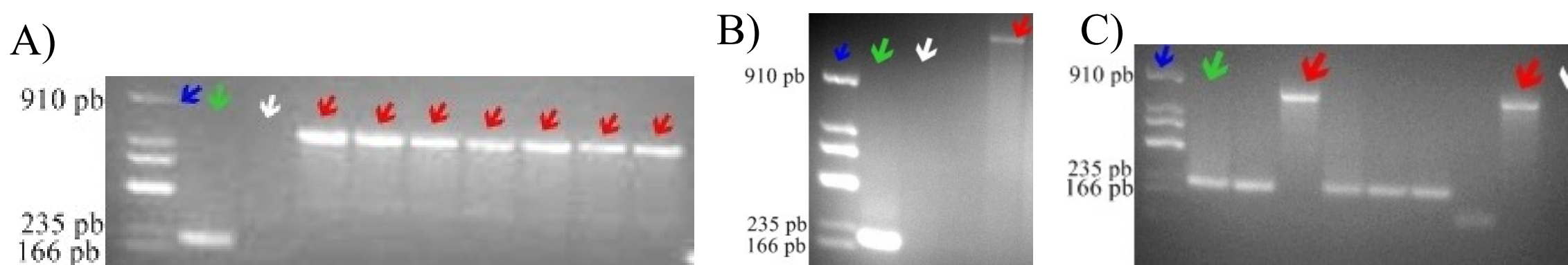


Figura 6: Análise eletroforética em gel de agarose 1,2% dos produtos de amplificação por PCR dos possíveis clones de MH2 (A), MH3 (B) e MH4 (C) em pcDNA3.1+. As setas vermelhas indicam os produtos de amplificação por PCR dos plasmídeos obtidos após a recombinação, nos tamanhos esperados (MH2: 670 pb; MH3: 1380 pb; MH4: 800 pb); as setas verdes indicam o controle positivo (produto de amplificação apenas do vetor pcDNA3.1+ íntegro (212 pb)); as setas brancas indicam o controle negativo; e as azuis indicam o marcador molecular pUC 18 clivado com DdeI e EcoRI.

Avaliação da resposta imune induzida por antígenos recombinantes:

Foram utilizados grupos de 5 camundongos BALB/c fêmeas com aproximadamente 12 semanas de idade (Figura 7). Os animais foram imunizados intraperitonealmente com 3 doses dos antígenos recombinantes purificados MH2 e MH3 (25 µg/animal) emulsionados em adjuvante de Freund. Bacterina (100 µl/animal), um grupo sem nenhum tratamento e um grupo apenas com adjuvante foram utilizados como controles. Amostras de sangue foram coletadas via retro-orbital de 15 em 15 dias (em cada imunização) para a detecção de anticorpos específicos no soro dos camundongos por ELISA (Ahmed *et al.*, 2009). Ao final das imunizações, os animais foram sacrificados, e os esplenócitos, cultivados com os antígenos recombinantes (10 µg/ml) em meio RPMI 1640 com 10% soro fetal bovino em placas de 24 poços (5 milhões de células/poço) (Figura 8). O cultivo foi feito por 72h a 37°C e a 5% de CO₂, e após esse período, os sobrenadantes de cultivo foram coletados para a avaliação da presença de citocinas através de kits de detecção por ELISA.



Figura 7: Camundongos BALB/c imunizados.



Figura 8: Preparação da placa para o cultivo de esplenócitos com os antígenos recombinantes.

• Perspectivas:

- Purificação do antígeno recombinante MH4;
- Avaliação da resposta imune induzida por antígenos recombinantes purificados em camundongos e suínos;
- Imunização e avaliação da resposta imune induzida pelas construções plasmidiais de expressão eucariótica em camundongos e suínos;
- Formulação de vacinas recombinantes ou de DNA contra PES.

Referências:

- Ross, D. Mycoplasma diseases. In: Straw, B., D'Allaire, S., Mengel, W. & Taylor, D. (Eds.), Diseases of Swine. Ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 495-510, 1999.
- Parrish, J. R.; Limjindaporn, T.; Hines, J. A.; Liu, J.; Liu, G. & Finley, R. L. Jr. High-Throughput Cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by *in Vivo* Recombination in *Escherichia coli*. *J. Proteome Res.* 3: 582-586, 2004.
- Ahmed, S. B.; Touhri, L.; Chitourou, Y.; Dellagi, K. & Bahloul, C. DNA based vaccination with cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania (Leishmania)* major antigens confers full protection in BALB/c mice. *Vaccine*, 27: 99-106, 2009.
- Vasconcelos, A. T.; Ferreira, H. B.; Bizano, C. V.; Bonatto, S. L.; Carvalho, M. O.; Pinto, P. M. et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J. Bacteriol.* 187: 5568-5577, 2005.
- Pinto, P. M.; Chemale, G.; Castro, L. A.; Costa, A. P. M.; Kieh, J. D.; Vainsten, M. H.; Zaha, A. & Ferreira, H. B. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Int. Microbiol.* 121: 83-93, 2007.
- Smith, D. B. & Johnson, K. S. Single-step purification polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67: 31-40, 1988.
- Chen, A. Y.; Fry, S. R.; Daggard, G. E. & Mukkur, T. K. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine*, 2008 26: 4372-4378, 2008.