

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DE UM PAR DE PROTEÍNAS
ORTÓLOGAS DE SUPERFÍCIE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E
*Mycoplasma flocculare***

Dissertação de Mestrado

Lauren Dorneles Dipp

Porto Alegre, fevereiro de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DE UM PAR DE PROTEÍNAS
ORTÓLOGAS DE SUPERFÍCIE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E
*Mycoplasma flocculare***

Lauren Dorneles Dipp

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, fevereiro de 2017

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela paciência, ajuda e dedicação ao longo do trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e do laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos pela ajuda durante os experimentos e pelo companheirismo.

À Fernanda e Jéssica por toda a ajuda, pela disponibilidade e pelas conversas descontraídas que tornaram os dias de trabalho menos árduos.

À Ana Laura, Guilherme e Jonas pelos momentos de desabafos, pelos *drinks*, pelos cafés pagos e pelas palavras de apoio nos momentos de dificuldade.

À minha família e ao meu namorado, Felipe, pela força e apoio para que eu continuasse até o final do mestrado.

À equipe da secretaria do PPGBCM, Gabriel, Luciano, Marcia, Raiza e Silvia na ajuda da parte acadêmica, pelos muitos cafés e lanches da tarde, pela companhia no almoço e pelos *happy hour*, fazendo com que eu tivesse um lugar para relaxar entre os tempos de experimentos.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Suinicultura no Brasil.....	12
1.2 Pneumonia Enzoótica Suína (PES).....	12
1.3 Gênero <i>Mycoplasma</i>	14
1.3 <i>M. hyopneumoniae</i> e <i>M. flocculare</i>	15
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	16
2.1 Justificativa.....	16
2.2 Objetivo geral	17
2.3 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Clonagem das sequências codificadoras das proteínas MHP7448_556 e MF_306 em vetor plasmidial de expressão.....	18
3.2 Transformações de linhagens de <i>E. coli</i> com os plasmídeos recombinantes pGEX-MHP556 e pGEX-MF306.....	19
3.3 Expressão das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST em diferentes linhagens de <i>E. coli</i>	19
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	20
3.5 Purificação de proteínas recombinantes expressas em <i>E. coli</i>	20
3.6 Imunização de camundongos.....	21
3.7 ELISA indireto para a avaliação da imunogenicidade	21
3.8 Immunoblot para a avaliação da antigenicidade	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Clonagem das CDSs <i>MHP556</i> e <i>MFC306</i>	23
4.2 Expressão das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST	23
4.3 Purificação das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST....	26

4.4	Avaliação da imunogenicidade da proteína recombinante MF306-GST.....	27
5.	DISCUSSÃO.....	30
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	35
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	ANEXO.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

SDC – seqüências de DNA codificadoras

D.O. – densidade óptica

g - gravidade

GST – glutationa-S-transferase

h– hora(s)

IPTG – isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

Kb – kilo bases

LB – Luria-Bertani

min– minuto(s)

mL– mililitro(s)

mM – milimolar

N - normal

PCR – reação em cadeia da polimerase

RPM – rotações por minuto

s– segundo(s)

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

V– volt(s)

μ g– micrograma(s)

μ L– microlitro(s)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Infiltração de macrófagos e neutrófilos no lúmen das vias aéreas.....	13
Figura 2: Colonização do epitélio traqueal ciliar por <i>M. hyopneumoniae</i>	14
Figura 3: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas MHP556 e MF306.....	17
Figura 4: Identificação das colônias recombinantes.....	23
Figura 5: Expressão da proteína recombinante MHP556-GST.....	24
Figura 6: Expressão da proteína recombinante MF306-GST.....	24
Figura 7: Expressão das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST com diminuição da temperatura de indução de expressão.....	25
Figura 8: Solubilização da proteína recombinante MHP556-GST.....	26
Figura 9: Solubilização da proteína recombinante MF306-GST.....	26
Figura 10: Purificação das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST.....	27
Figure 11: Resposta imune humoral total dos camundongos imunizados com MF306-GST.....	28
Figura 12: Imunodot para avaliação da antigenicidade das proteínas MHP556 e MF306.....	28
Figura 13: Immunoblot para avaliação da antigenicidade das proteínas MHP556 e MF306.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR de colônia.....	19
---	----

RESUMO

A bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína e se adere às células do epitélio ciliar pulmonar do hospedeiro para a colonização. Essa doença é responsável por perdas econômicas em muitos países devido à morbidade dos rebanhos. A bactéria *Mycoplasma flocculare* é encontrada principalmente na mucosa traqueal de suínos, como *M. hyopneumoniae*, mas é uma bactéria comensal. Ambas apresentam similaridades genéticas, como o compartilhamento de 90% das proteínas de superfície preditas e o perfil transcritômico dos genes que codificam adesinas, proteínas que proporcionam a aderência do micro-organismo, altamente semelhante. Contudo, análises genômicas e transcritômicas não foram capazes de explicar a diferença fenotípica entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* no hospedeiro. Considerando estudos realizados previamente, se hipotetiza que parte dessa diferença ocorra devido a discrepâncias na sequência de aminoácidos de proteínas de superfície ortólogas, uma vez que 85% dos pares de proteínas ortólogas destas espécies apresentam, pelo menos, um domínio diferencial. Tais domínios diferenciais podem determinar variação funcional e/ou variação na resposta imune induzida no suíno. Para caracterizar imunologicamente um par de proteínas ortólogas de superfície de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, MHP556 e MF306, respectivamente, as versões recombinantes dessas foram expressas em *Escherichia coli* BL21 pLysE. Os produtos recombinantes, MHP556-GST e MF306-GST, foram purificados e utilizados em ensaios de avaliação de imunogenicidade e antigenicidade. Foram demonstradas a antigenicidade das proteínas nativas MHP556 e MF306, além da imunogenicidade da proteína recombinante MF306-GST. A comparação desses resultados contribuirá para a elucidação da função dessas proteínas de superfície na interação patógeno-hospedeiro e da importância da presença de domínios diferenciais entre proteínas ortólogas na resposta imune desencadeada pelo hospedeiro.

ABSTRACT

The bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* is the etiological agent of swine enzootic pneumonia and attaches to the ciliary tracheal cells to colonize the host. This disease is responsible for economic losses in many countries due to the morbidity of pig herds. The bacteria *Mycoplasma flocculare* is also found mainly in the tracheal mucosal, as *M. hyopneumoniae*, but it is a commensal species. Both species have genetic similarities as they share 90% of their predicted surface proteins and the transcriptomic profiles of the genes encoding adhesins, proteins that enable the attachment in host tissue, very similar. Yet, genomic and transcriptional analysis does not explain the phenotypic difference between *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* within its host. Considering these previous studies, it was hypothesized that the difference in pathogenicity may be due, in part, to the amino acid sequence of the orthologous surface proteins, once that 85% of all orthologous surface proteins of both species show, at least, one differential domain. These differential domains may trigger functional modifications and/or immunological modifications by the host. To immunologically characterize a pair of orthologous surface proteins MHP556 and MF306, from *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*, respectively, recombinant versions were expressed in *Escherichia coli* BL21 pLysE. The recombinant products, MHP556-GST and MF306-GST, were purified and used in immunological and antigenicity assay. The antigenicity of the native proteins MHP556 and MF306 were established, and the immunogenicity of the recombinant protein MF306-GST as well. The comparison of the results of this study may help to elucidate the different functions of both surface proteins in the host-pathogen interaction and shed light about the importance of the presence of differential domains in orthologous proteins in the host immune response.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Suinicultura no Brasil

A suinicultura, ou criação de suínos, é uma atividade importante economicamente para o Brasil, o colocando como quarto maior criador de suínos no mundo (ABIPECS, 2016). Cerca de 15,2% dos produtos alimentares e de derivados da suinicultura total do país são destinados à exportação. A região Sul é a que mais se destaca nessas atividades, principalmente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Muitos dos rebanhos de suínos, no país e no mundo, são acometidos por doenças infecciosas como as micoplasmoses, entre elas pode-se destacar a pneumonia enzoótica suína.

1.2 Pneumonia Enzoótica Suína (PES)

A PES consiste numa doença infecciosa que afeta o trato respiratório de suínos, podendo ser transmitida, horizontalmente através de aerossóis expelidos por animais contaminados ou verticalmente, das mães contaminadas para os filhotes (Maes *et al.*, 2008). O agente causador da doença é a bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* e somente após a colonização do epitélio ciliar traqueal do hospedeiro por ela, ocorre o desenvolvimento dos sintomas (Li *et al.*, 2010). Animais acometidos apresentam tosse crônica, anorexia e retardo no crescimento, caracterizando uma alta morbidade e baixa mortalidade. Danos no tecido pulmonar ocorrem entre 14-28 dias, como observado em infecções experimentais (Villarreal *et al.*, 2011), além da infiltração de macrófagos e neutrófilos nas vias aéreas (Figura 1) (Vranckx *et al.*, 2012). A liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18 por macrófagos também são presentes em infecções com *M. hyopneumoniae*, como mostrado por Muneta *et al.* (2008). A citotoxicidade da bactéria para o hospedeiro já foi descrita e é caracterizada pela presença de lipídeos associados à membrana celular (LAMPs) (Bai *et al.*, 2013). As LAMPs induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO), induzindo o processo de apoptose em

macrófagos alveolares. Contribuindo assim para o enfraquecimento do sistema imune do hospedeiro e sobrevivência do patógeno.

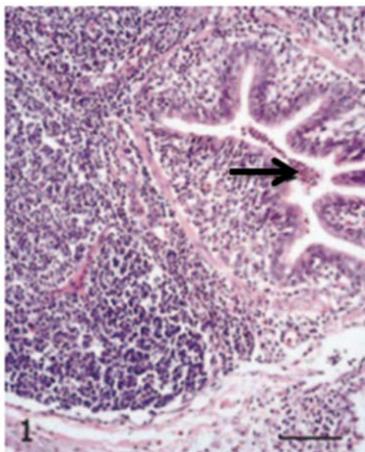


Figura 1: Infiltração de macrófagos e neutrófilos no lúmen das vias aéreas. As células do sistema imune estão indicadas pela seta. Barra de escala = 95 µm. Coloração por HE. Sarradell *et al.* (2003).

Além da infecção primária por *M. hyopneumoniae*, o surgimento de infecções secundárias é comum, levando ao agravamento do quadro clínico como o aparecimento de febre, prostração e dificuldade respiratória (Opriessnig *et al.*, 2011). A presença de patógenos oportunistas como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS), o vírus da influenza suína (H1N1), e as bactérias *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella* sp., *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, e *Arcanobacterium pyogenes* caracterizam o Complexo Respiratório Suíno (CRS)(Opriessnig *et al.*, 2011).

Diferentes métodos de diagnóstico são utilizados para monitorar o desenvolvimento da PES, dentre eles o cultivo do próprio patógeno a partir da biópsia de animais, considerado padrão-ouro (Sibila *et al.*, 2009). Todavia, o crescimento de colônias é lento e frequentemente ocorrem contaminações por outras duas espécies de micoplasmas também presentes no trato respiratório suíno. O acompanhamento sorológico dos animais através de ELISA também é utilizado. Kits disponíveis comercialmente são práticos, mas a detecção dos anticorpos varia de acordo com a linhagem de *M. hyopneumoniae*. Vacinas que possuem o patógeno inativado (bacterinas) (Thacker *et al.*, 2000) na sua

composição proporcionam uma proteção parcial, apresentando resultados satisfatórios na melhora das lesões pulmonares, não prevenindo a colonização do tecido do hospedeiro e nem a transmissão do patógeno. Fisch *et al.* (2016) mostrou que essa ineficácia ocorre devido à baixa quantidade de anticorpos produzidos quando imunizados, também sugerindo uma possível solução com a adição de antígenos recombinantes à formulação das vacinas.

1.3 Gênero *Mycoplasma*

O gênero *Mycoplasma*, pertence à classe Mollicutes que é caracterizada por apresentar micro-organismos sem membrana celular (Razin & Hayflick, 2010). Micoplasmas podem apresentar tamanhos muito pequenos, cerca de 0,3 a 0,8 μm de diâmetro, além de possuir espécies com genomas muito reduzidos, por exemplo *M. genitalium* (580 Kb). A análise genômica desse grupo revela baixa porcentagem de citosina (C) e guanina (G), além da economia de rotas bioquímicas através da redução do número de genes, produto do processo de evolução reductiva. Essa capacidade biosintética reduzida, principalmente quanto a produção de aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas, contribuiu para o desenvolvimento do modo de vida dependente de um hospedeiro (Grosjean *et al.*, 2014)

Micoplasmas estão distribuídos na natureza, podendo ser parasitas de uma ampla gama de seres como répteis, peixes, aves, artrópodes, plantas e mamíferos, incluindo o ser humano (Razin & Hayflick, 2010). Animais relevantes para a pecuária são hospedeiros freqüentes de diferentes espécies de micoplasmas, como se pode observar em criações de gado bovino, os quais são infectados por *M. bovis*, responsável por causar pneumonia, mastite e artrite (Nicholas & Ayling, 2003). Também, a criação de caprinos é usualmente hospedeira de *M. capricolum*, causando pleuropneumonia (Dupuy & Thiaucourt, 2014); e de suínos, hospedeiros de *M. hyopneumoniae*, patógeno responsável pela PES (Simionatto *et al.*, 2013), além de *M. hyorhinis* e *M. flocculare*.

As três espécies de micoplasmas encontradas no trato respiratório suíno compartilham entre si cerca de 382 sequências de DNA codificadoras (SDC),

sendo que *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* compartilham mais do que ambas as espécies comparadas com *M. hyorhinies* (Siqueira *et al.*, 2013).

1.3 *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*

A bactéria *M. flocculare*, assim como *M. hyopneumoniae*, apresenta capacidade de se aderir às células ciliares do epitélio respiratório suíno, contudo é um microrganismo comensal (Young *et al.*, 2000). A identificação de reação-cruzada dos anticorpos presentes nos soros de suínos com PES foi a primeira evidência de similaridade entre as duas espécies (Bereiter *et al.*, 1990). Essa reação foi posteriormente explicada por Stemke *et al.* (1992), através da homologia (95,6%) das sequências do rRNA 16S das duas espécies, comprovando proximidade filogenética.

O sequenciamento completo do genoma das duas espécies de micoplasmas apontou quantidades muito próximas de pares de base (cerca de 0,9 Mpb), além de baixo conteúdo (cerca de 28,5%) de C e G (Siqueira *et al.*, 2013). Do total de SDCs, 47,5%, para *M. flocculare*, e 44,4%, para *M. hyopneumoniae* são responsáveis por codificar proteínas de superfície, as quais apresentam importante papel na virulência do patógeno. Desse total de SDCs, 90% é compartilhado entre essas duas espécies, onde algumas já foram caracterizadas e são adesinas, como P97 (Minion, 1997); P210 e P85 (Wilton *et al.*, 2009); P27, P52 e P110 (Burnett *et al.*, 2006); e Mhp107 (Seymour *et al.*, 2011). Essas adesinas são consideradas possíveis fatores de virulência, pois além de auxiliarem na sobrevivência do patógeno, apresentaram sítios de ligação aos componentes de matriz extracelular do hospedeiro, como o plasminogênio (Raymond & Djordjevic, 2015) e a heparina (Jenkins *et al.*, 2006), por exemplo. Essa ligação promove a proliferação bacteriana e a inibição de moléculas efetoras do sistema imune. Durante o processo de colonização pela bactéria (Figura 2), há perda total da atividade das células ciliares devido ao emaranhamento, aglutinação e rompimento promovido pela ligação das adesinas aos receptores celulares (Park *et al.*, 2002).

Cerca de 1/3 do genoma de *M. hyopneumoniae* codifica proteínas de

superfície, dentre essas as adesinas. Desse total, 90% são compartilhadas com outra espécie de micoplasma, *M. flocculare* (Siqueira *et al.*, 2013).

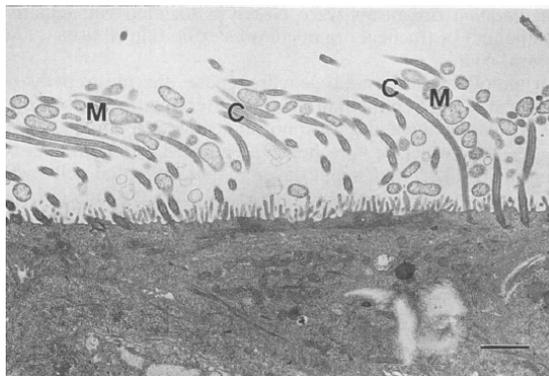


Figura 2: Colonização do epitélio traqueal ciliar (C) por *M. hyopneumoniae* (M). Microscopia mostrando a perda das células ciliares após cinco dias de colonização da bactéria. Barra de escala = 0,83 μ m. Adaptado de Debeyt & Ross(1994).

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

Proteínas de superfície estão diretamente expostas ao ambiente do hospedeiro, apresentando importante função na adesão bacteriana, evasão e/ou modulação do sistema imune, se tornando itens importantes para estudos de interação entre patógenos e hospedeiros (Rottem, 2003). No estudo de Siqueira *et al.* (2013), se identificou pares de proteínas de superfície ortólogas em *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, entre essas, ortólogos para as proteínas já citadas anteriormente: P97, P216 e P159. A presença desses ortólogos em espécies que apresentam comportamento diferente em relação ao hospedeiro sugere que os níveis de expressão e/ou às modificações pós-traducionais, além da presença de variações dessas proteínas, como a presença ou ausência de domínios funcionais estão envolvidos na diferença de virulência entre as espécies.

O estudo realizado por Leal *et al.* (2016) identificou 184 (85%) pares de proteínas ortólogas de superfícies entre essas duas espécies, sendo que 158 pares apresentavam no mínimo um domínio diferencial. Desse total, apenas 3

pares carregavam domínios diferenciais maiores (50 a 295 aminoácidos), além de se apresentarem na porção extracelular da proteína. No mesmo trabalho, a caracterização imunológica da porção do domínio diferencial de um dos pares, MHP7448_0612 e MF_00357, foi realizada, comprovando uma maior resposta celular para a proteína MHP7448_0612, de *M. hyopneumoniae*.

Nesta dissertação, foi feita a caracterização imunológica preliminar do par de proteínas de superfície ortólogas de superfície hipotéticas MHP556 e MF306. As CDSs *MHP556* e *MF306* codificam proteínas com 107 e 207 aminoácidos, respectivamente (NCBI – *M. hyopneumoniae*: NC_007295.1; *M. flocculare*: NZ_CP007585.1). Elas apresentam 98% e 68% de similaridade e identidade entre as suas sequências, diferindo principalmente na porção N-terminal, onde MF306 possui um domínio com 100 aminoácidos que é ausente em MHP556 (Leal *et al.*, 2016). Essa caracterização tem como objetivo principal elucidar as diferenças imunológicas relevantes para a interação patógeno-hospedeiro que podem estar relacionadas à patogenicidade de *M. hyopneumoniae*. Ainda, a caracterização desse par de ortólogos pode contribuir para esclarecer a questão ainda não respondida da diferença fenotípica, entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* para o hospedeiro suíno.

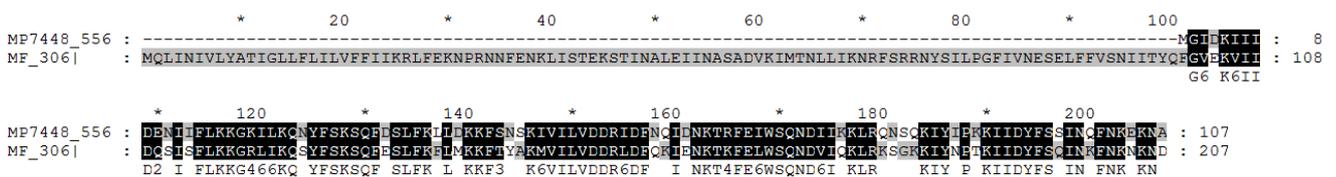


Figura 3: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas MHP556 e MF306. Alinhamento realizado com a ferramenta protein BLAST (NCBI). A primeira sequência de aminoácidos corresponde a proteína MHP556, enquanto a segunda corresponde a proteína MF306. Destacado em preto estão os aminoácidos idênticos entre as duas sequências.

2.2 Objetivo geral

Caracterizar imunologicamente as proteínas de superfície ortólogas MHP556 e MF306 de *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare*, respectivamente.

2.3 Objetivos específicos

- Expressar as proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST;
- Avaliar a antigenicidade das proteínas MHP556 e MF306 para suínos;
- Avaliar a imunogenicidade das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST em modelos murinos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem das sequências codificadoras das proteínas MHP7448_556 e MF_306 em vetor plasmidial de expressão

As proteínas hipotéticas MHP7748_556 (MHP556), de *M. hyopneumoniae*, e MFC_306 (MF306), de *M. flocculare*, previamente definidas como ortólogas com domínios diferenciais extracelulares por Leal *et al.* (2016), foram selecionadas para serem expressas. As respectivas CDSs, *MHP556* e *MFC306*, foram sintetizadas pela empresa GenScript (EUA) a fim de substituir os códons TGA, correspondentes ao aminoácido triptofano em micoplasmas, para o códon TGG que corresponde ao mesmo aminoácido em *Escherichia coli*. As CDSs clonadas foram fornecidas clonadas em vetor pUC57 e, posteriormente, subclonadas em vetor de expressão pGEX-4T-3 (GE Healthcare) por recombinação *in vivo* (Parrish *et al.*, 2004) em *E. coli* KC8. A subclonagem proporcionou a geração de plasmídeos recombinantes para expressão: pGEX-MHP556 e pGEX-MF306.

Para a identificação das colônias recombinantes resultantes da subclonagem, um PCR de colônia foi realizado utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1) para a região de homologia do vetor pGEX-4T-3, presentes no produto da amplificação. A PCR envolveu um mix com 10 µm de cada primer, 50 nm de MgCl₂, 10 mM de dNTP e água milli-Q para completar o volume total de 20 µL, para cada colônia recombinante. A reação foi feita utilizando Taq DNA polimerase (Invitrogen) e temperatura de extensão de 57°C.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR de colônia.

Nome	Sequência (5' → 3')
pGEX-Alt-Forward	CCTGGATGCGTTCCCAAAA
pGEX-Alt-Reverse	CGACACCCGCCAACACC

3.2 Transformações de linhagens de *E. coli* com os plasmídeos recombinantes pGEX-MHP556 e pGEX-MF306

Três diferentes linhagens de *E. coli*: BL21 Star (Invitrogen), BL21 pLysE (Invitrogen) e Codon Plus RIL (Agilent Technologies) foram transformadas por choque térmico com CaCl₂ (Sambrook & Russell, 2001) com os vetores plasmidiais recombinantes pGEX-MHP556 e pGEX-MF306. As células transformadas foram selecionadas em meio LB contendo 100 mg/ µL de ampicilina.

3.3 Expressão das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST em diferentes linhagens de *E. coli*

As mesmas linhagens de *E. coli* descritas na seção 3.2 e transformadas com os plasmídeos recombinantes foram cultivadas em 3 mL de meio LB com 100 mg/ µL de ampicilina e incubadas com agitação (200 rpm) a 37°C até atingir a D.O.₆₀₀ = 0,8. Após, o cultivo foi tratado para indução da expressão das proteínas recombinantes com 0,1 mM de IPTG segundo Smith & Johnson (1988) e incubados novamente, nas seguintes condições: por 3h a 37°C, por 16h a 37°C e por 3h a 26°C. Alíquotas de 1 mL eram então lisadas por sonicação em sonicador C601 (Sonicand Material Inc.) com 6 - 8 pulsos, amplitude de 40 e intervalos de 30 s. Todo o procedimento foi realizado com as alíquotas em gelo e as amostras preparadas para serem analisadas em SDS-PAGE 12%.

A solubilização de ambas as proteínas recombinantes foi realizada, primeiramente, em cultivos de 50 mL de meio LB com 100 mg/mL de ampicilina. Após a indução da expressão de cada proteína, como descrito anteriormente,

cada cultivo foi centrifugado a 7.000 rpm, por 6 min a 4°C. O precipitado resultante da centrifugação foi ressuspenso em tampão STE (10 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8) e tratado com 0,3% ou 0,5% de N-lauroilsarcosil (Millipore). Para a lise das células, o precipitado tratado com N-lauroilsarcosil foi sonificado, nas mesmas condições descritas anteriormente, e centrifugado novamente a 10.000 g, por 20 min a 4°C para a separação da fração solúvel da insolúvel. Amostras com 10 µL de cada fração foram preparadas para análise em SDS-PAGE 12%.

Cultivos em maior escala, 500 mL - 2 L, foram feitos nas mesmas condições padronizadas anteriormente para os procedimentos de purificação das proteínas MHP556-GST e MF306-GST.

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

A preparação dos géis para a SDS-PAGE foi feita segundo Laemmli (1970), para géis com concentração final de 12% de poliacrilamida.

As amostras do SDS-PAGE foram preparadas com 10 - 20 µL do produto de interesse a ser analisado, 6 µL de tampão de amostra (30 mM Tris-base; 35 mM SDS; 0,03 mM g azul de bromofenol; 54,3 mM glicerol; 32,1 mM de beta mercaptoetanol) e 4 µL de PBS 1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄ e pH 7,2 – 7,4) e fervidas a 100°C por 5 min. A migração das amostras foi realizada a 80 v por 30 min e em seguida, por 1 h 40 min por 120 v.

3.5 Purificação de proteínas recombinantes expressas em *E. coli*

A purificação das proteínas recombinantes fusionadas à glutathione-S-transferase (GST) foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare), conforme protocolo do fabricante da resina. Cada fração solúvel, correspondente a cada uma das proteínas recombinantes, permaneceu incubada por 16h com 2 mL de resina, a 4°C com agitação. Após a incubação, a resina foi separada da fração solúvel (precipitando para o fundo do recipiente) e depositada na coluna de cromatografia (Bio-Rad). A

eluição de cada proteína somente foi iniciada após a lavagem da resina com 20 mL de PBS 1x.

Dois métodos foram testados após a lavagem da resina: (1) incubação da resina por 1h e 30 min, a 25°C, em solução de glutatona reduzida (50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM de glutatona reduzida e 0,2 mM de NaCl, pH 9,0); ou (2) incubação da resina com 50 U de trombina, por aproximadamente 16h, a 25°C. Após cada incubação, as eluições foram feitas com (1) solução de glutatona reduzida ou (2) PBS 1x e o eluído analisado em SDS-PAGE 12%.

3.6 Imunização de camundongos

Vinte camundongos fêmeas, Balb/c, com 10 semanas de vida foram utilizados nos ensaios de imunização. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal com 25 µg de cada proteína de fusão purificada, 500 µg de adjuvante de Freund (Sigma) e PBS 1 x para totalizar doses de 200 µL por animal. Três grupos foram formados onde: 8 animais foram imunizados com a proteína MF306-GST, 6 animais foram imunizados somente com a proteína GST e 6 animais imunizados somente com o adjuvante de Freund. As coletas de sangue foram feitas a partir da punção da veia facial. Uma primeira coleta realizada 2 semanas antes da primeira imunização para a obtenção do soro pré-imune (PI). Um total de 4 imunizações foram feitas (1ª I, 15 DPI, 30 DPI e 45 DPI), com intervalos de 15 dias entre elas e com coleta de sangue, 1 semana após cada imunização, de cada animal. A manipulação e os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (projeto n° 25857).

3.7 ELISA indireto para a avaliação da imunogenicidade

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 0,4 µg/ poço de cada proteína recombinante purificada em tampão carbonato/ bicarbonato 0,1 M, segundo (Virginio *et al.*, 2014). Para a titulação, os soros dos animais PI, 15 DPI, 30 DPI e 45 DPI foram utilizados, sendo a diluição inicial de 1: 500 a 1:64.000.

Para a avaliação da imunogenicidade em cada animal, os soros foram utilizados na diluição de 1: 16.000 em solução blotto 5% (5% leite em pó desnatado, PBS). O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) (1:4.000). D.O. de cada amostra foi registrada a 490 nm após adição da solução de parada H₂SO₄ 1N (98% H₂SO₄, 2% H₂O). As análises estatísticas e as representações gráficas foram feitas utilizando GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

3.8 Imunoblot para a avaliação da antigenicidade

A antigenicidade das proteínas nativas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* foram avaliadas segundo Moitinho-Silva *et al.* (2012). Os soros de suínos infectados com *M. hyopneumoniae*, cedidos pela EMBRAPA (Concórdia – SC, Brasil), foram utilizados no imunodot e no imunoblot para analisar a reação frente às proteínas recombinantes.

Para o imunodot, 0,15 µg/ mL de cada proteína recombinante e de GST foram adicionados separadamente na membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), a qual foi incubada em solução blotto 5% por aproximadamente 16h, a 4°C. Um *pool* dos soros de suínos foi utilizado na diluição de 1:500 a 1:16.000, e incubado juntamente com a membrana a 25°C por 1h e 15 min. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de porco conjugado com peroxidase (Sigma)(1:10.000).

O imunoblot foi realizado com transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE 12% para membrana de a seco. A membrana e o gel foram incubados no Trans-Blot SD Semi-DryTransferCell (Bio-Rad) a 15 v por 1h com tampão de transferência gelado (60 mM glicina, 8 mM Tris-base, 20% metanol). Após, a membrana foi bloqueada com solução blotto 5% por 16h, a 4°C. A incubação com o *pool* de soros de suínos (1: 2.000) foi feita por 1h e 30 min, a 25°C. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de porco com peroxidase (Sigma) (1: 10.000). A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada usando o Pierce ECL Western Blotting Substrate (ThermoScientific).

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem das CDSs *MHP556* e *MFC306*

As CDSs *MHP556* e *MFC306* foram subclonadas em vetor pGEX-4T-3, resultando em 14 colônias de *E. coli* recombinantes. Desse total, 10 colônias recombinantes correspondiam a amplificação de *MHP556* e 3 colônias recombinantes correspondiam a amplificação de *MFC306*, ambas acrescidas de 50 pb correspondendo a amplificação da região de homologia ao vetor (pGEX-MHP556 e pGEX-MF306) (Figura 4). Os produtos da amplificação correspondem são de 432 pb (canaletas 1, 2, 5, 7, 8, 12, 18, 21, 25 e 27), para pGEX-MHP556 e de 582 pb (canaletas 15, 16 e 22) para pGEX-MF306. As colônias das canaletas 22 e 24 foram utilizadas para a confirmação por sequenciamento.

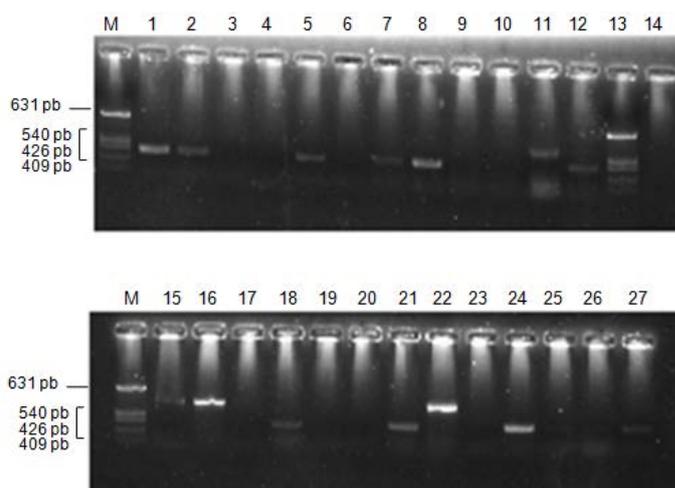


Figura 4: Identificação das colônias recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 1% com PCR de colônia para a identificação das colônias recombinantes com os CDSs *MHP556* (396 pb) e *MFC306* (546 pb) acrescidas da amplificação da região de homologia ao vetor (36 pb). O marcador de tamanho de fragmentos de DNA em pb está representado com a letra "M". As canaletas 1, 2, 5, 7, 8, 12, 18, 21, 25 e 27 apresentam bandas de aproximadamente 432 pb, correspondentes a amplificação de *MHP556* mais a região de homologia ao vetor (pGEX-MHP556). As canaletas 15, 16 e 22 apresentam bandas de aproximadamente 582 pb, correspondentes a amplificação de *MFC306* mais a região de homologia ao vetor (pGEX-MF306).

4.2 Expressão das proteínas recombinantes *MHP556*-GST e *MF306*-GST

Três linhagens de *E. coli*: BL21 Star, BL21 pLysE e BL21 Codon Plus RIL foram transformadas com os plasmídeos recombinantes pGEX-MHP556 e pGEX-MF306. A expressão das proteínas recombinantes com indução por IPTG foi

avaliada em 3 condições diferentes de temperatura e tempo. Nas colônias das 3 linhagens de *E. coli* foi observada a expressão de ambas as proteínas recombinantes do tamanho esperado: aproximadamente 41,5 kDa para MHP556-GST e aproximadamente 47,6 kDa para MF306-GST, onde 26 kDa pertencem a GST. A linhagem BL21 pLysE apresentou maior intensidade na banda de expressão das duas proteínas recombinantes, principalmente no tempo de indução de 16h, se comparado às outras duas linhagens (Figura 5 e 6).

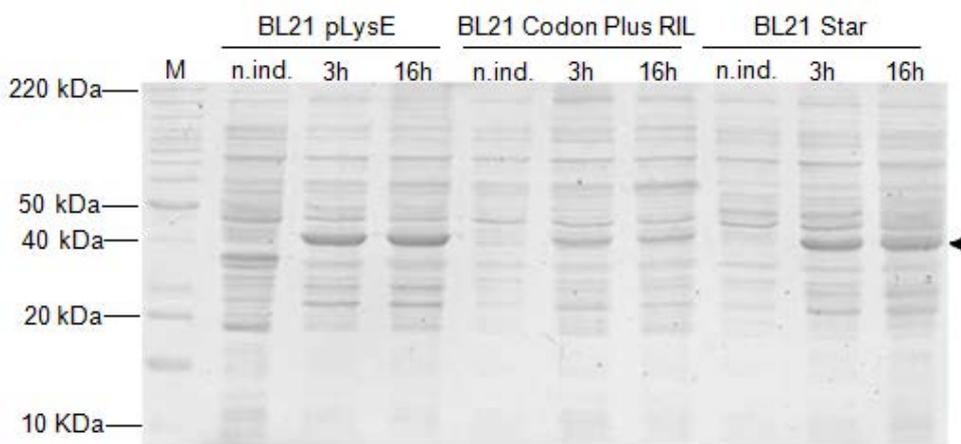


Figura 5: Expressão da proteína recombinante MHP556-GST. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% com extratos protéicos das 3 linhagens de *E. coli* transformadas com o plasmídeo recombinante pGEX-MHP556. O marcador de peso molecular, em kDa, está representado pela letra “M” e a banda de expressão da proteína recombinante (aprox. 41,5 kDa) MHP556-GST está indicada com uma seta. Para cada linhagem de *E. coli*, foram avaliados os extratos sem indução por IPTG (n.ind.), com indução por IPTG por 3h (3h) e com indução por IPTG por 16h (16h). O gel foi corado com coomassie blue.

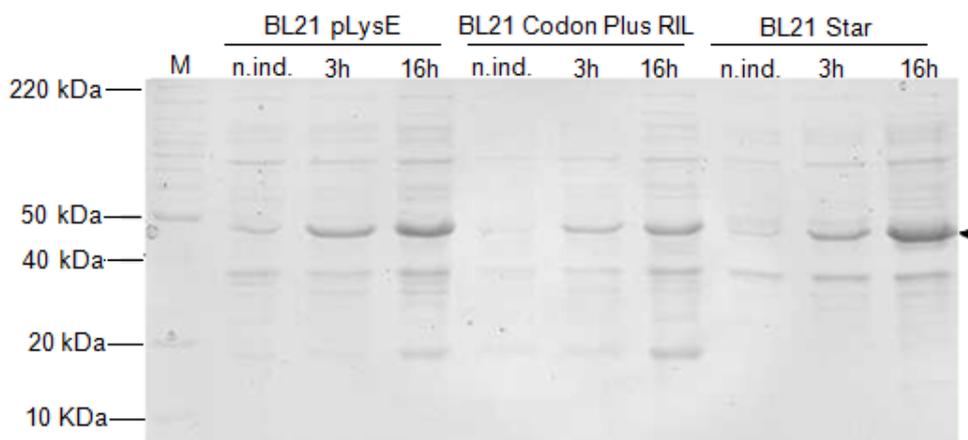


Figura 6: Expressão da proteína recombinante MF306-GST. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% com extratos protéicos das 3 linhagens de *E. coli* transformadas com o plasmídeo recombinante pGEX-MF306. O marcador de peso molecular, em kDa, está representado pela letra “M” e a banda de expressão da proteína recombinante (aprox. 47,6 kDa) MF306-GST está indicada com uma seta. Para cada linhagem de *E. coli*, foram avaliados os extratos sem indução por IPTG (n.ind.), com indução por IPTG por 3h (3h) e com indução por IPTG por 16h (16h). O gel foi corado com coomassie blue.

Seguindo a padronização da expressão das proteínas recombinantes, foi avaliado o efeito da redução de temperatura (de 37°C para 26°C) no tempo de 3h de indução de expressão (Figura 7) na etapa de purificação (item 4.3). A intensidade das bandas de expressão de MHP556-GST e de MF306-GST sofreu uma leve diminuição, se comparado com a expressão a 37°C por 16h.

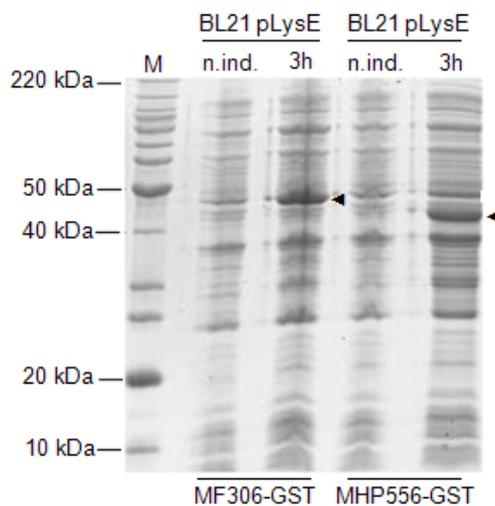


Figura 7: Expressão das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST com diminuição da temperatura de indução de expressão. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% com os extratos protéicos da linhagem de *E. coli* BL21 pLysE transformada com os plasmídeos recombinantes pGEXMHP556 e pGEXMF306. O marcador de peso molecular, em kDa, está representado pela letra “M” e as bandas de expressão das proteínas MHP556-GST (aprox. 41,5 kDa) e da proteína MF306-GST (aprox. 47,6 kDa) estão indicadas com setas. Foram avaliados os extratos sem indução por IPTG (n.ind.) e com indução por IPTG por 3h (3h). O gel foi corado com coomassie blue

Para a solubilização, foram testadas duas diferentes concentrações de N-lauoilsarcosil para ambas as proteínas recombinantes: 0,3% (Figura 8 A e 9 A) e 0,5% (Figura 8 B e 9 B). A solubilização das duas proteínas recombinantes foi maior com a concentração de 0,5% de N-lauoilsarcosil, proporcionando maior quantidade dessas proteínas na porção solúvel do cultivo celular.

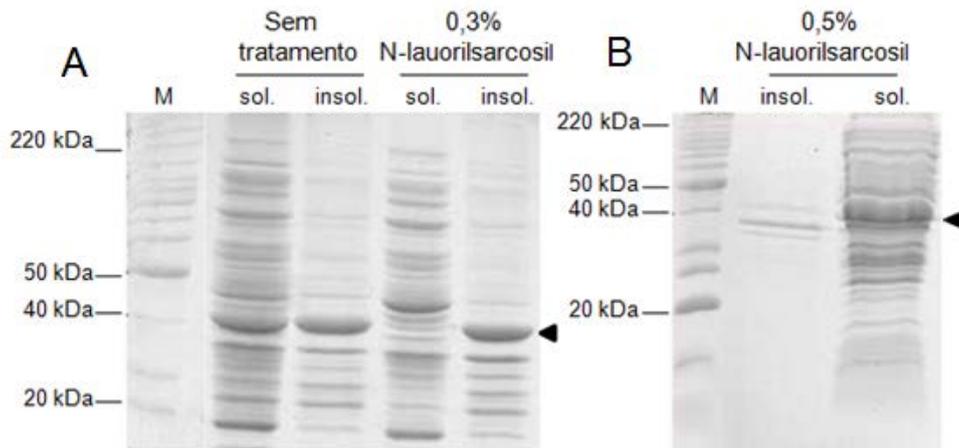


Figura 8: Solubilização da proteína recombinante MHP556-GST. Eletroforese em gel de pçiacrilamida (SDS-PAGE) 12% com as frações insolúvel (F. insol) e solúvel (F. sol) dos cultivos celulares de *E. coli* BL21 pLysE com expressão de MHP556-GST nas condições (A) sem tratamento com N-laurilsarcosil (Sem tratamento), com tratamento de 0,3% de N-laurilsarcosil (0,3% N-laurilsarcosil) e (B) com tratamento de 0,5% de N-laurilsarcosil. O marcador de peso molecular, em kDa, está representado pela letra "M" e as bandas correspondentes a proteína rMHP556 estão indicadas com uma seta. O gel foi corado com coomassie blue

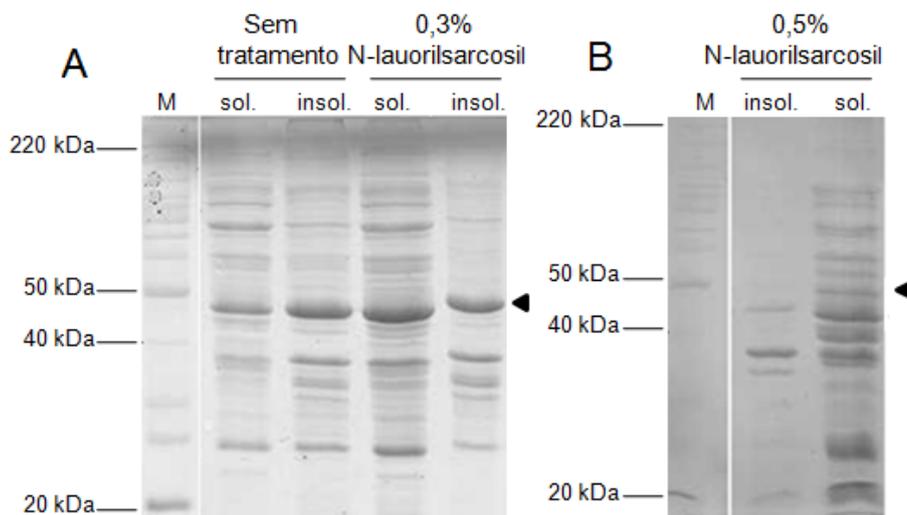


Figura 9: Solubilização da proteína recombinante MF306-GST. Eletroforese em gel de pçiacrilamida (SDS-PAGE) 12% com as frações insolúvel (F. insol) e solúvel (F. sol) dos cultivos celulares de *E. coli* BL21 pLysE com expressão de MF306-GST nas condições (A) sem tratamento com N-laurilsarcosil (Sem tratamento), com tratamento de 0,3% de N-laurilsarcosil (0,3% N-laurilsarcosil) e (B) com tratamento de 0,5% de N-laurilsarcosil. O marcador de peso molecular, em kDa, está representado pela letra "M" e as bandas correspondentes a proteína rMHP556 estão indicadas com uma seta. O gel foi corado com coomassie blue.

4.3 Purificação das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST

A fração solúvel dos extratos celulares de *E. coli* BL21 pLysE com indução da expressão das proteínas recombinantes por 3h a 26°C foi utilizada na etapa de purificação. Após clivagem das proteínas recombinantes da porção GST e eluição

com tampão de eluição, observou-se baixa quantidade de ambas as proteínas no eluído (dados não mostrados), se comparado ao nível de expressão observado após a solubilização.

Devido ao baixo rendimento observado para MHP556-GST e MF306-GST, foi analisada a purificação das proteínas sem a clivagem do GST, fazendo com que permanecesse na forma fusionada com a GST para que se obtivesse quantidades suficientes para os próximos experimentos. Foram feitas com tampão de eluição com glutatona reduzida. Foram recuperados aproximadamente 400 µg de GST-MHP556 e 3 mg de GST-MF306 (Figura 10) em 1 L de cultivo celular.

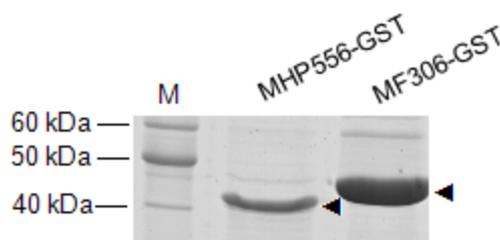


Figura 10: Purificação das proteínas recombinantes MHP556-GST e MF306-GST. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% com as proteínas recombinantes na forma fusionada purificadas. O marcador de peso molecular, em kDa, está representado pela letra “M” e as bandas correspondentes às proteínas recombinantes na forma fusionada estão indicadas com uma seta. O gel foi corado com coomassie blue

4.4 Avaliação da imunogenicidade da proteína recombinante MF306-GST

A resposta imune humoral apresentada pelos camundongos imunizados com MF306-GST foi avaliada através de ELISA indireto. Foram avaliados os soros PI e os coletados após as imunizações (15 PI, 30 PI e 45 PI). Inicialmente um *pool* dos soros foi avaliado com diluições seriadas de 1:500 até 1:64.000 (dados não mostrados), resultando na melhor diluição para a análise individual dos soros, a diluição de 1:16.000.

Na avaliação dos soros coletados de cada animal PI, 15 PI, 30 PI e 45 PI, comparados aos soros dos grupos controles (adjuvante de Freund e GST), houve uma resposta imune humoral significativa quando os animais foram imunizados com MF306-GST, principalmente observada nos soros 45 PI. Não houve quantidade significativa de anticorpos em resposta à porção GST presente na proteína recombinante. Esses resultados mostram que a proteína MF306-GST desencadeia uma resposta imune humoral, se mostrando imunogênica.

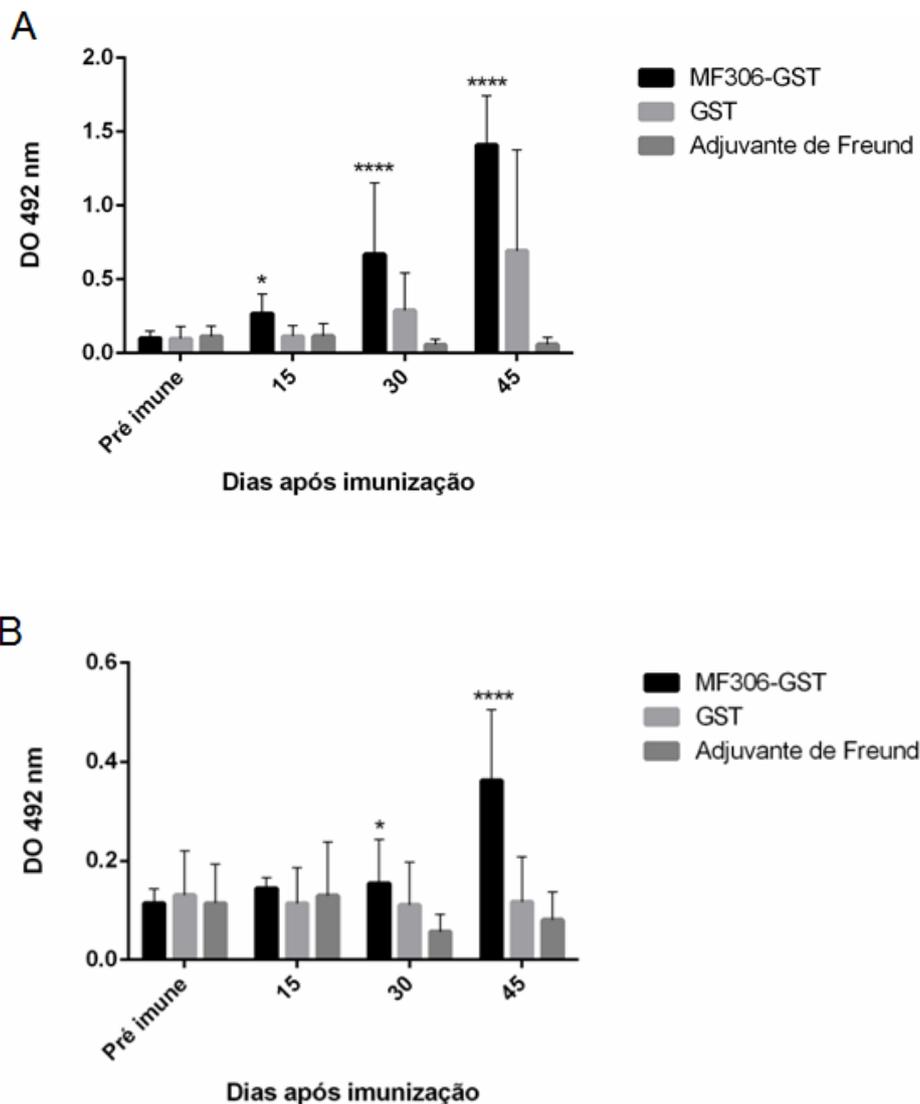


Figure 11: Resposta imune humoral total dos camundongos imunizados com MF306-GST. Camundongos imunizados com 25 µg/ dose de MF306-GST e 25 µg/ dose de GST para controle. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com MF306-GST (A) e com GST (B), ambos na concentração de 0,4 µg/ poço. Os soros dos animais foram coletados 15, 30 e 45 dias após a imunização e diluídos de 1:1.6000. O eixo y representa a densidade ótica (OD) a 492 nm de 8 animais no grupo imunizado com MF306-GST, 6 animais no grupo imunizado com GST (controle) e 6 animais no grupo que recebeu somente o adjuvante de Freund (controle). Os asteriscos indicam resultados significantes na resposta humoral (* p < 0,05; ****p<0,0001) se comparado aos controles negativos.

4.5 Avaliação da antigenicidade das proteínas nativas MHP556 e MF306

Inicialmente foi realizado um ensaio de imunodot com *pool* de soros de suínos experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae*. Foi avaliada a

reatividade desse *pool* de soros diluído seriadamente de 1: 500 até 1: 16.000 frente às proteínas MHP556-GST e MF306-GST, também frente à GST (controle negativo) (Figura 12). Observaram-se reações de diferentes intensidades entre os anticorpos presentes nos soros e as proteínas recombinantes. Frente à proteína MHP556-GST houve maior intensidade da reação nas diluições de 1: 500 até 1: 4.000, mostrando alta antigenicidade. A reatividade frente à proteína MF306-GST foi de menor intensidade, mas ainda observável até uma diluição de 1:4.000. Nenhuma reatividade do *pool* de soros foi observada frente à GST.

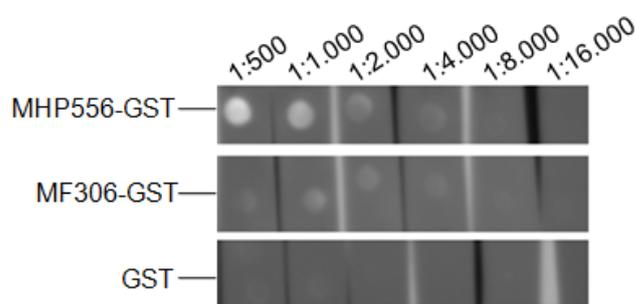


Figura 12: Dotblot para avaliação da antigenicidade das proteínas MHP556 e MF306. Dotblot realizado em membrana de nitrocelulose utilizando pool de soros de suínos experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae*. diluídos seriadamente, de 1:500 a 1:16.000. As proteínas MHP556-GST e MF306-GST, assim como a proteína GST (controle) foram pipetadas na membrana na concentração de 0,15 mg/ mL. O resultado do dotblot foi visualizado através de quimioluminescência.

O imunoblot, para a confirmação dos resultados observados no dotblot, com as proteínas MHP556-GST, MF306-GST e GST (controle) foi realizado com o *pool* de soros na diluição de 1: 2.000 (Figura 13). Após a adição do anticorpo secundário, foi possível visualizar reação somente entre os anticorpos presentes no *pool* de soros em frente à MHP556-GST, confirmando a antigenicidade da proteína nativa MHP556.

O resultado frente a proteína MF306-GST foi inconclusivo, possivelmente devido a problemas técnicos e à menor reatividade dos soros frente a essa proteína. O experimento deverá ser repetido, com a utilização do *pool* de soros em uma menor diluição.

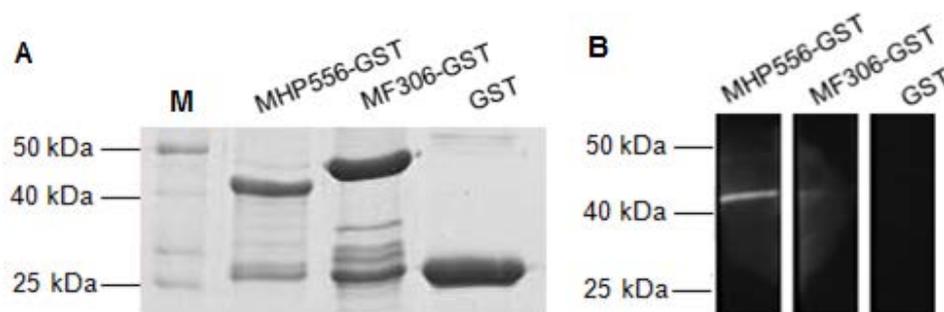


Figura 13: Imunoblot para avaliação da antigenicidade das proteínas MHP556 e MF306. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% correspondente à membrana de nitrocelulose com imunoblot (B) Imunoblot realizado utilizando pool de soros de suínos experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae* diluído de 1:2.000 frente às proteínas MHP-GST e MF306-GST, e GST como controle.

5. DISCUSSÃO

M. hyopneumoniae, agente etiológico da PES, e *M. flocculare*, bactéria comensal encontrada também no trato respiratório suíno, são duas espécies de microrganismos que apresentam grandes semelhanças genéticas e transcritômias. Elas compartilham aproximadamente 487 CDSs, sendo o total para *M. hyopneumoniae* de 692 CDSs e de 585 CDSs para *M. flocculare*. Desses totais, 44,4%, em *M. hyopneumoniae* e 47,5%, em *M. flocculare* codificam proteínas de superfície, sendo a maioria adesinas (Siqueira *et al.*, 2013). Proteínas de superfície estão diretamente em contato com células e outros componentes do sistema imune do hospedeiro, podendo desempenhar papéis importantes como fatores de virulência. A comparação de genes ortólogos de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* codificadores de proteínas com diferença em domínios extracelulares pode fornecer informações sobre patogenicidade e auxiliar na identificação de fatores de virulência, como observado por Leal *et al.* (2016). Este estudo avaliou a resposta imune induzida pelo par de proteínas ortólogas de superfície MHP7448_0612, de *M. hyopneumoniae* e MF_00357, de *M. flocculare*. Foi possível analisar uma resposta imune celular maior e mais duradoura desencadeada pelo domínio diferencial presente na proteína de *M. hyopneumoniae*. Além da análise imunológica desse par, 158 pares de proteínas ortólogas de superfície foram identificadas como possuindo pelo menos 1 domínio diferencial entre elas. Desse total, somente 9 pares apresentavam domínios diferenciais maiores que 50 aminoácidos e, dentre esses somente 3 possuem

domínios extracelulares. Um destes 3 pares de proteínas, MHP7448_0556 e MF_00306, foram selecionados para caracterização nesse estudo. As CDSs codificadoras das proteínas ortólogas de superfície hipotéticas MHP556 e MF306 foram subclonadas em vetor de expressão, expressas em *E. coli* e purificadas. As versões recombinantes foram utilizadas em ensaios de avaliação de imunogenicidade e de antigenicidade.

Os oligonucleotídeos iniciadores projetados permitiram a amplificação para posterior clonagem e expressão, em *E. coli*, das CDSs completas *MHP556* e *MFC306*. O método utilizado na clonagem por recombinação homóloga *in vivo* (Parrish *et al.*, 2004) foi escolhido porque proporciona maior rapidez e maior economia de reagentes se comparado aos métodos clássicos de clonagem com endonucleases de restrição e DNA-ligase. O vetor de expressão utilizado, pGEX-4T-3, permitiu níveis de expressão que proporcionaram rendimentos finais das proteínas recombinantes purificadas da ordem de 3 mg por litro de cultura, para MF306-GST, e 0,4 mg por litro de cultura, para MHP556-GST. Esses rendimentos foram relativamente baixos, se comparado com estudos prévios que expressam outras proteínas dos mesmos microrganismos no mesmo vetor de expressão (Moitinho-Silva *et al.*, 2012; Virginio *et al.*, 2014; Leal *et al.*, 2016).

A clonagem molecular e a expressão heteróloga são métodos comumente utilizados para a produção de proteínas recombinantes. Um dos microrganismos mais utilizados como hospedeiro neste tipo de abordagem experimental é a bactéria *E. coli*, devido à facilidade do seu cultivo e por constituir um sistema de biossíntese economicamente acessível (Nuc & Nuc, 2006). A expressão das versões recombinantes de MHP556 e de MF306, na forma de proteínas de fusão com a GST (MHP556-GST e MF306-GST, respectivamente) foi feita em *E. coli* BL21 pLysE, a qual apresentou maior e melhor nível de expressão de ambas as proteínas recombinantes, se comparada com as linhagens BL21 STAR e BL21 Codon Plus Ril também testadas. Todas as linhagens proporcionam as mesmas vantagens no momento da expressão em relação às proteínas recombinantes, como a ausência de proteases Lon e OmpT, para a minimização da degradação proteolítica, e possibilidade de utilização de sistema de controle de expressão baseado em promotor *lac* e indução com IPTG. No que se diz respeito à produção

de proteínas recombinantes de micoplasmas em microrganismos heterólogos, há um obstáculo a ser superado: o mesmo códon para o triptofano em micoplasmas corresponde a um códon de parada em *E. coli*. No presente trabalho, as CDSs com substituições dos códons de TGA para TGG foram produzidas sinteticamente.

A purificação de proteínas de superfície pode ser laboriosa devido ao caráter hidrofóbico dessas moléculas (Arnold & Linke, 2008). Para isso, geralmente é necessária uma etapa de solubilização, na qual são utilizados detergentes. A seleção do detergente deve levar sempre em conta a interferência nos procedimentos de purificação e da alteração a estrutura da proteína, que não devem ocorrer. As versões recombinantes MHP556-GST e MF306-GST estavam em proporções semelhantes na fração solúvel e insolúvel dos cultivos celulares, para aumentar a quantidade de ambas às proteínas na fração solúvel, uma etapa de solubilização utilizando 0,5% de N-lauroilsarcosil foi utilizada com sucesso. O estudo realizado por Lundbäck *et al.* (2003) mostrou que concentrações a partir de 0,54 mM de N-lauroilsarcosil interferem na atividade de ligação da GST com a matriz de glutationa-agarose. No presente trabalho foi utilizado aproximadamente 0,17 mM (0,5%) de N-lauroilsarcosil, o que se encontra bem abaixo da concentração potencialmente problemática. O N-lauroilsarcosil é um detergente aniônico que não afeta a estrutura da proteína e promove o rompimento de interações hidrofóbicas expostas dessas moléculas (Frankel *et al.*, 1991), o que desestrutura agregados protéicos insolúveis e impede a formação de agregados a partir de moléculas protéicas solubilizadas. Esses agregados protéicos são também chamados de corpos de inclusão, interferindo no rendimento durante a etapa de purificação (Lichty *et al.*, 2005). Os corpos de inclusão são agregados não-cristalinos e amorfos de proteínas, apresentando formas funcionais e não-funcionais (Palmer & Wingfield, 2012).

Muitos vetores de expressão foram construídos para simplificar a etapa de purificação de proteínas expressas heterologicamente em *E. coli*, todavia, muitas utilizam reagentes desnaturantes durante o procedimento, como por exemplo a cromatografia por afinidade em matriz de IgG-Sepharose (Goding, 1978). Esses reagentes podem alterar a antigenicidade e a atividade da proteína a ser

purificada. Os vetores de expressão da série pGEX, por outro lado, foram construídos de modo a proporcionarem altos níveis de expressão e purificação da proteína recombinante em condições não desnaturantes (Smith & Johnson, 1988). As proteínas recombinantes expressas a partir de sequências clonadas em vetores de expressão pGEX são expressas em fusão com a GST na sua extremidade N-terminal. A GST se liga por afinidade à glutatona immobilizada na matriz de agarose da resina, sendo essa ligação reversível com a adição de tampão contendo glutatona reduzida como competidora. O sistema ainda permite que a porção da proteína de fusão correspondente à GST seja removida por clivagem proteolítica.

A purificação das proteínas recombinantes MHP556 e MF306 expressas em vetor pGEX com clivagem por trombina para a liberação da GST apresentou rendimentos muito baixos, considerando-se as quantidades presentes na fração solúvel dos cultivos celulares após o tratamento com N-lauroilsarcosil. Houve baixa eficiência de clivagem por trombina das proteínas de fusão ou parte da proteína recombinante livre de GST ficou ainda presa à resina, não podendo ser eluída.

Para que se alcançassem melhores rendimentos para a realização dos ensaios imunológicos, a purificação das proteínas recombinantes foi feita sem a etapa de clivagem proteolítica para liberação da GST. Também, novas condições de indução de expressão (3h a 26°C) foram utilizadas, pois a diminuição da temperatura e o tempo reduzido de indução de expressão minimizam a formação de corpos de inclusão (Palmer & Wingfield, 2012). As proteínas de fusão recombinantes MHP556-GST e MF306-GST foram expressas e purificadas em quantidades suficientes para os ensaios de avaliação de antigenicidade. Todavia, somente a MF306-GST foi obtida na quantidade necessária para a imunização de camundongos, primeira etapa dos ensaios de avaliação de imunogenicidade. A utilização de proteínas de fusão em ensaios para avaliação de imunogenicidade e antigenicidade é viável e válida, desde que haja um controle negativo adicional, com a GST (Ferreira & Zaha, 1994; Moitinho-Silva *et al.*, 2012). Os resultados das avaliações imunológicas feitas com a MHP556-GST e a MF306-GST mostraram que não houve interferência significativa da GST, pois praticamente não houve

resposta do *pool* de soros de suínos experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae* contra ela nos imunodot; além de ter induzido uma resposta pelo menos 30% inferior à induzida pela MF306-GST, nos ensaios de imunização de camundongos.

A avaliação da resposta imune contra antígenos recombinantes em porcos é laboriosa e cara, além de requerer quantidades maiores de cada antígeno para a imunização dos animais (Simionatto *et al.*, 2012). A caracterização imunológica de MF306-GST com o controle GST foi feita através da imunização de camundongos com a proteína recombinante de fusão purificada e apresentou resultados semelhantes aos já observados em outros estudos, onde uma significativa resposta imune é observada a partir do dia 30 DPI (Leal *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2012). O modelo murino é válido para uma avaliação inicial da resposta imune desencadeada por antígenos que são potenciais fatores de virulência e/ou de potencial diagnóstico e/ou vacinal para suínos. A avaliação da imunogenicidade e antigenicidade fornece informações importantes para determinar se um antígeno é importantes na relação patógeno-hospedeiro.

Para a avaliação da antigenicidade das proteínas nativas MHP556 e MF306, as proteínas recombinantes correspondentes foram testadas frente a soros de suínos experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae*. Mesmo na forma fusionada, não foi observada interferência da GST nas reações entre as versões recombinantes e os anticorpos específicos presentes no *pool* de soros, confirmando mais uma vez que a utilização de proteínas da forma de fusão é válida para os ensaios imunológicos. A proteína recombinante MHP556-GST mostrou maior reatividade com os anticorpos IgG específicos no *pool* de soros e o potencial antigênico da MHP556 pode ser posteriormente confirmado por imunoblot. Para a MF306-GST, a reatividade dos soros frente a ela observada no ensaio de imunodot, com diluições do soro com reatividade em títulos entre 1: 500 e 1: 4.000, não pode ser confirmada no ensaio de imunoblot, quando uma diluição do *pool* de soros de 1: 2.000 foi utilizada. O caráter antigênico da MF306 para suínos deverá ainda ser confirmado por imunoblot, em futuros experimentos a serem realizados utilizando o *pool* de soros em menor diluição (de 1: 500 ou 1: 1.000). Com base nos resultados disponíveis até o momento, pode-se inferir

possivelmente que a proteína MHP566 é mais antigênica para suínos no contexto da infecção com *M. hyopneumoniae* do que é a proteína MF306 de *M. flocculare*. A antigenicidade de proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* já foi descrita em estudos anteriores, assim como a menor ou até mesmo ausente antigenicidade de proteínas de *M. flocculare* (Wilton *et al.*, 2009). O reconhecimento da MHP556 pelos anticorpos presentes no soro de suínos infectados com *M. hyopneumoniae* mostra que essa proteína está sendo expressa no momento da infecção e possivelmente contribuindo para a patogenicidade da bactéria.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi padronizada a expressão e a purificação das proteínas recombinantes de fusão MHP556-GST e MF306-GST. Os resultados dos ensaios imunológicos demonstraram o potencial antigênico possivelmente diferencial da proteína MHP556, uma proteína de superfície da bactéria *M. hyopneumoniae*, em relação a sua ortóloga com domínio diferencial MF306, de *M. flocculare*. Também foi possível demonstrar e avaliar a imunogenicidade para camundongos da proteína recombinante MF306-GST. Com a futura avaliação da imunogenicidade de MHP556-GST espera-se demonstrar a possível importância de um domínio diferencial em um par de proteínas ortólogas. Essa importância pode estar relacionada ao determinante antigênico, o que pode ser a chave para a diferença fenotípica em relação ao hospedeiro dessas duas espécies de micoplasmas tão semelhantes.

Assim, são perspectivas imediatas deste trabalho avaliar tanto a resposta imune humoral quanto a celular induzidas pela MHP556-GST e pela MF306-GST em modelo murino; e comparar as imunogenicidades de ambas as proteínas recombinantes e estabelecer possíveis correlações delas com o caráter patogênico de *M. hyopneumoniae* e comensal de *M. flocculare*. Além disso, considerando que a interação de proteínas de superfície de bactérias patogênicas com componentes de matriz celular pode promover a proliferação bacteriana e

auxiliar na disseminação do patógeno (Raymond & Djordjevic, 2015), pretende-se avaliar possíveis interações da MHP556 e da MF306 com o plasminogênio.

Os resultados presentes e os ainda a serem obtidos poderão contribuir para o melhor entendimento da relação de *M. hyopneumoniae* e o hospedeiro. Também poderão abrir caminho para a identificação e caracterização funcional de possíveis fatores de virulência. Esses fatores de virulência poderão ser alvos para o desenvolvimento de fármacos, além de auxiliarem na caracterização imunológica de novos antígenos com potencial uso em testes imunodiagnósticos e vacinas para a PES.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS, 2016. Relatório anual ABPA 2016. São Paulo.

Arnold, T., Linke, D., 2008. The use of detergents to purify membrane proteins. Curr. Protoc. Protein Sci. 1–30.

Bai, F., Ni, B., Liu, M., Feng, Z., Xiong, Q., Xiao, S., Shao, G., 2013. Veterinary Immunology and Immunopathology *Mycoplasma hyopneumoniae* -derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production , oxidative stress , and caspase-3 activation 155, 155–161.

Bereiter, M., Young, T.F., Joo, H.S., Ross, R.F., 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. Vet. Microbiol. 25, 177–192.

Burnett, T.A., Dinkla, K., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Uphoff, C., Srivastava, M., Cordwell, S.J., Geary, S., Liao, X., Minion, F.C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2006. P159 is a proteolytically processed , surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* : defined domains of P159 bind heparin and

promote adherence to eukaryote cells. *Mol. Microbiol.* 60, 669–686.

- Debeyt, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and Loss of Cilia Induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in Porcine Tracheal Organ Cultures 62, 5312–5318.
- Dupuy, V., Thiaucourt, F., 2014. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Strain 9231-Abomsa. *Genome Announc.* 2.
- Ferreira, H.B., Zaha, A., 1994. Expression and analysis of the diagnostic value of an *Echinococcus granulosus* antigen gene clone. *Int. J. Parasitol.* 24, 863–870. doi:10.1016/0020-7519(94)90012-4
- Fisch, A., Marchioro, S.B., Gomes, C.K., Galli, V., De Oliveira, N.R., Simionatto, S., Dellagostin, O.A., Mendonça, M., Moreira, Â.N., Conceição, F.R., 2016. Commercial bacterins did not induce detectable levels of antibodies in mice against *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens strongly recognized by swine immune system. *Trials Vaccinol.* 5, 32–37.
- Frankel, S., Sohn, R., Leinwand, L., 1991. The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Microbiology* 88, 1192–11.
- Goding, J.W., 1978. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods* 20, 241–253.
- Grosjean, H., Breton, M., Sirand-Pugnet, P., Tardy, F., Thiaucourt, F., Citti, C., Barré, A., Yoshizawa, S., Fourmy, D., de Crécy-Lagard, V., Blanchard, A., 2014. Predicting the Minimal Translation Apparatus: Lessons from the Reductive Evolution of Mollicutes. *PLoS Genet.* 10.
- Jenkins, C., Wilton, J.L., Minion, F.C., Falconer, L., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2006. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin

- bind heparin. *Infect. Immun.* 74, 481–487.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leal, F.M.D.A., Virginio, V.G., Martello, C.L., Paes, J.A., Borges, T.J., Jaeger, N., Bonorino, C., Ferreira, H.B., 2016. *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* differential domains from orthologous surface proteins induce distinct cellular immune responses in mice. *Vet. Microbiol.* 190, 50–7.
- Li, Y.Z., Ho, Y.P., Chen, S.T., Shiuan, D., 2010. Proteomic analysis of the interactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine tracheal ciliated cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 2248–2255.
- Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J., Tan, S., 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr. Purif.* 41, 98–105.
- Lundbäck, A., Haneskog, L., Andersson, L., Heijbel, A., Ingemarsson, L., Birse, D., 2003. Optimal solubilization screening strategies for GST-fusion membrane proteins. *Sci. News - Amersham Biosci.* 15, 10–12.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet. Microbiol.* 126,
- Minion, F.C., 1997. Cloning and Functional Analysis of the P97 Swine Cilium Adhesin Gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Bacteriol* 179, 1317–1323.
- Moitinho-Silva, L., Heineck, B.L., Reolon, L.A., Paes, J.A., Klein, C.S., Rebelatto, R., Schrank, I.S., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2012. *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: Expression and evaluation of its diagnostic potential. *Vet. Microbiol.* 154, 282–291.

- Muneta, Y., Minagawa, Y., Shimoji, Y., Ogawa, Y., Hikono, H., 2008. Immune Response of Gnotobiotic Piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Vet. Med. Sci. 70, 1065–1070.
- Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D., 2003. *Mycoplasma bovis*: disease , diagnosis , and control. Res. Vet. Sci. 74, 105–112.
- Nuc, K., Nuc, P., 2006. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. Postepy Biochem. 52, 448–56.
- Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. Anim. Heal. Res. Rev. 12, 133–148.
- Palmer, I., Wingfield, P.T., 2012. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. Curr Protoc Protein Sci 1–25.
- Park, S., Yibchok-anun, S., Cheng, H., Young, T.F., Thacker, E.L., Minion, F.C., Ross, R.F., Hsu, W.H., 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* Increases Intracellular Calcium Release in Porcine Ciliated Tracheal Cells 70, 2502–2506.
- Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J., Liu, G., Finley, R.L., 2004a. High-Throughput Cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in Vivo Recombination in *Escherichia coli*. J. Proteome Res. 3, 582–586.
- Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J., Liu, G., Finley, R.L., 2004b. High-Throughput Cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in Vivo Recombination in *Escherichia coli*. J. Proteome Res. 3, 582–586.
- Raymond, B.B.A., Djordjevic, S., 2015. Exploitation of plasmin (ogen) by bacterial pathogens of veterinary significance. Vet. Microbiol. 178, 1–13.

- Razin, S., Hayflick, L., 2010. Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. *Biologicals* 38, 183–190.
- Reolon, L.A., Martello, C.L., Schrank, I.S., 2014. Survey of Surface Proteins from the Pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain 7448 Using a Biotin Cell Surface Labeling Approach. *PLoS One* 9, 1–7.
- Rottem, S., 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* 83, 417–432.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3^a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.
- Seymour, L.M., Falconer, L., Deutscher, A.T., Minion, F.C., Padula, M.P., Dixon, N.E., Djordjevic, S.P., Walker, M.J., 2011. Mhp107 Is a Member of the Multifunctional Adhesin Family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 286, 10097–10104.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 181, 221–231.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Galli, V., Brum, C.B., Klein, C.S., Rebelatto, R., Silva, E.F., Borsuk, S., Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., 2012. Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 209–216.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., Dellagostin, O.A., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. *Vet. Microbiol.* 165, 234–242.
- Siqueira, F.M., Thompson, C.E., Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Reolon, L.,

- Almeida, L.G., da Fonsêca, M.M., de Souza, R., Prosdocimi, F., Schrank, I.S., Ferreira, H.B., de Vasconcelos, A.T.R., Zaha, A., 2013. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics* 14, 175.
- Smith, D.B., Johnson, K.S., 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31–40.
- Stemke, G.W., Laigret, F., Grau, O., Bove, J.M., 1992. Phylogenetic Relationships of Three Porcine Mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and Complete 16S rRNA Sequence of *M. flocculare*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 220–225.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Kuhn, M., Hawkins, P.A., Waters, W.R., 2000. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Am. J. Vet. Res* 6, 1384–1389.
- Villarreal, I., Maes, D., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2011. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine* 29, 1731–1735.
- Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Paes, J.A., Schuck, D.C., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2014. Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine enzootic pneumonia. *Vaccine* 32, 5832–5838.
- Vranckx, K., Maes, D., Marchioro, S.B., Villarreal, I., Chiers, K., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2012. Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent

Mycoplasma hyopneumoniae strain. BMC Vet. Res. 8, 24.

Wilton, J., Jenkins, C., Cordwell, S.J., Falconer, L., Minion, F.C., Oneal, D.C., Djordjevic, M.A., Connolly, A., Barchia, I., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2009. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed , cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol. Microbiol. 71, 566–582.

Young, T.F., Thacker, E.L., Erickson, B.Z., Ross, R.F., 2000. A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. Vet. Microbiol. 71, 269–279.

ANEXO

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

DIPP, LAUREN D.

1. Dados pessoais

Nome: Lauren Dorneles Dipp

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil – 14/11/1991

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Av. Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43421, sala 210.

Agronomia – Porto Alegre, RS

91501-970, RS – Brasil

Telefone profissional: (51) 3308-7769

E-mail: lauren.dippd@hotmail.com

2. Formação acadêmica/Titulação

2015 – atual: Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito Capes 6).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.

2010 – 2015: Graduação em Ciências Biológicas

Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

3. Estágios:

2010: Estágio voluntário no Laboratório de Bioquímica da UFRGS. Orientadora: Dra. Ângela Wyse. Projeto: Hiperprolinemia.

2010 – 2013: Bolsista CNPq no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da PUCRS. Orientador: Dr. Carlos Alexandre S. Ferreira. Projeto: Clonagem, Expressão e Caracterização de uma Proteína Rica em Glicinas do Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

2013: Estágio voluntário no Laboratório de Virologia (ICBS) da UFRGS. Orientadora: Ms. Thalita Arantes. Projeto: Detecção de Mimivírus em amostras ambientais.

2013: Estágio curricular no Laboratório de Microbiologia de Águas e Alimentos/DAP/IPB/LACEN da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

2014: Estágio curricular no Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul – Laboratório de Sorologia e Imunohematologia