

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA QUIMERA SINTÉTICA DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM *Pichia pastoris*

NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA¹; CHARLES KLAZER GOMES²; SÉRGIO JORGE²; SILVANA BEUTINGER MARCHIORO³; FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO²; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN⁴

¹ Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas– oliveira_natasha@hotmail.com

² Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – charlesklazer@hotmail.com

³ Faculdade de Ciências na Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados

⁴ Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas– odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória infecciosa crônica que afeta principalmente suínos em fase de crescimento e terminação (SIBILA, 2009). A PES promove redução nas taxas de conversão alimentar e retardo no crescimento dos suínos, causando consideráveis perdas econômicas à cadeia suinícola (SOBESTIANSKY et al., 1999). A vacinação é a forma mais efetiva de controlar a doença. As vacinas comercialmente disponíveis consistem em preparações com bactérias inteiras inativadas (bacterinas) que, embora reduzam o grau de lesão pulmonar, são incapazes de prevenir a infecção e estabelecimento do patógeno (THACKER et al., 1998).

Neste contexto, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da PES. Vacinas desenvolvidas utilizando a tecnologia do DNA recombinante são uma opção viável, vários antígenos de *M. hyopneumoniae* foram identificados como potenciais candidatos para serem incluídos em vacinas de subunidade (CHEN et al., 2003). Alguns destes antígenos incluem a região C-terminal da adesina P97 (P97R1), que desempenha um papel de aderência do patógeno ao trato respiratório do hospedeiro, a ribonucleotídeo redutase (NrdF) e a proteína de choque térmico P42 (MARCHIORO et al., 2014). Proteínas quiméricas transportando epítomos de diferentes agentes patogênicos, ligantes, ou sequências adjuvantes oferecem uma maior imunogenicidade aos antígenos recombinantes e podem induzir uma ampla resposta imune celular e/ou humoral (BERZOFSKY et al., 2001). Além disso, enterotoxinas bacterianas tem sido consideradas potentes adjuvantes de vias mucosa e parenteral (COX et al., 2006). Para a produção destes antígenos vacinais com alto rendimento e baixo custo, *P. pastoris* destaca-se como um sistema de expressão eucarioto que fornece potencial para a produção de proteínas recombinantes solúveis, corretamente enoveladas e com modificações pós-traducionais necessárias à sua funcionalidade (DALY; HEARN, 2005).

O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar em *P. pastoris* a proteína quimérica composta pelos antígenos P97R1, P42 e NrdF de *M. hyopneumoniae* fusionada à subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de uma vacina mais eficiente para o controle da PES.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do gene sintético: um gene sintético contendo os três antígenos de *M. hyopneumoniae* (P97R1, P42 e NrdF), associado a um adjuvante de mucosa (LTB) foi construído com base em sequências depositadas no GenBank. Ao gene consenso foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *KpnI* visando a clonagem direcional no vetor de expressão pPICZαB (Invitrogen) em *P. pastoris*. O gene foi sintetizado *in silico* e clonado no vetor pUC18 pela empresa Epoch Life Science (Texas, US).

2.2 Clonagem em *P. pastoris*: o vetor pUC18 contendo o gene da quimera e o vetor de expressão pPICZαB, foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *KpnI*. O gene da quimera liberado do vetor pUC18 foi extraído e clonado no vetor pPICZαB utilizando *E. coli* TOP 10. Os clones recombinantes foram selecionados e propagados em caldo LB contendo 100 µg/ml de zeocina. A presença do inserto foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *KpnI*. O plasmídeo recombinante foi propagado em *E. coli* TOP 10, purificado, linearizado com a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs) e precipitado. Células competentes de *P. pastoris* KM71H foram preparadas e transformadas por eletroporação (25 uF, 200 Ω, 2 kV) com 10 µg de DNA do plasmídeo recombinante e semeadas em meio YPDS contendo 100 µg/ml de zeocina a 28 °C por 4 dias.

2.3 Seleção dos recombinantes: as colônias obtidas foram repicadas em placas de cultivo de microrganismos de 96 cavidades com 800 µl de meio BMGY e incubadas em um agitador orbital (200 rpm, 28 °C) até atingirem a $DO_{600}=4$. As culturas foram centrifugadas e o *pellet* suspenso em 200 µl de BMMY contendo 0,5% de metanol. A cada 24 h, 0,5% de metanol foi adicionado, visando induzir a expressão da proteína recombinante e amostras do cultivo foram coletadas diariamente durante três dias. Os níveis de expressão foram analisados por *Dot blot* utilizando mAb anti-histidina (Sigma-Aldrich). Os clones com expressão positiva foram utilizados na expressão em larga escala, realizada nas mesmas condições descritas acima. Como a proteína não foi secretada para o meio de cultivo, a lise dos *pellets* foi realizada com pérolas de vidro e posterior sonicação, a fim de obter a proteína intracelular.

2.4 Caracterização por *Western blot*: os sobrenadantes, provenientes da lise dos *pellets* de quatro diferentes clones, foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%, eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose e bloqueada com 5% de leite desnatado em PBS a 37 °C durante 2 h. Após lavagem com PBS-T, a membrana foi incubada com mAb anti-histidina (Sigma-Aldrich) na diluição 1:5000 (37 °C, 1 h). Após nova lavagem, a membrana foi incubada com soro anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado com peroxidase na diluição 1:6000 (37 °C, 1 h). As bandas imunorreativas foram evidenciadas através da revelação com DAB e 0,5 % de peróxido de hidrogênio diluídos em Tris-HCl 50 mM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de vacinas recombinantes experimentais contra PES tem sido considerada uma abordagem importante buscando desenvolver uma vacina mais eficiente. A porção C-terminal da adesina P97 (P97R1) e a ribonucleotídeo redutase (NrdF) já demonstraram capacidade de conferir proteção parcial em

suínos quando avaliadas individualmente e a proteína de choque térmico P42 tem sido destacada como um imunógeno potencial em vários estudos. O gene sintético que codifica para a proteína quimérica, composta pela fusão dos antígenos P97R1, P42, NrdF e LTB foi eficientemente clonado no vetor de expressão pPICZαB em *P. pastoris* (Figura 1).

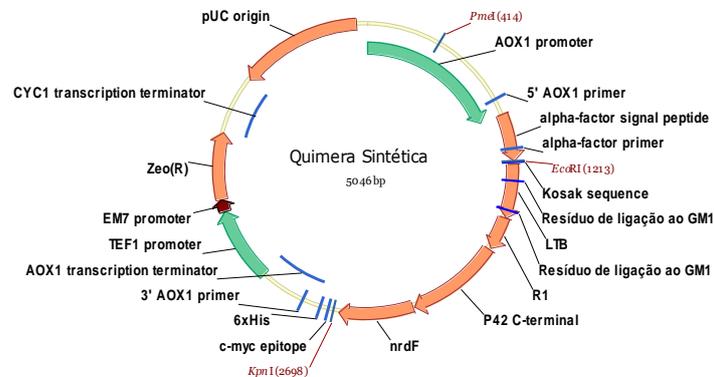


Figura 1. Mapa molecular demonstrando o gene sintético (*ltbr1p42nrdf*) fusionado ao vetor pPICZαB.

O vetor pPICZαB/LTBR1P42NrdF foi utilizado para transformar células TOP10 de *E. coli*, resultando em sete colônias, das quais três foram confirmadas como recombinantes resistentes. A transformação da cepa KM71H de *P. pastoris* com os plasmídeos recombinantes linearizados resultou em muitas colônias das quais cinco foram identificadas com expressão positiva por *Dot blot*. Os quatro clones com maior expressão foram utilizados em crescimento em larga escala e os cultivos expressos em meio líquido foram submetidos à lise celular. A proteína quimérica foi obtida do *pellet* e caracterizada por *Western blot* apresentando um tamanho aproximado de 70 kDa (Figura 2).

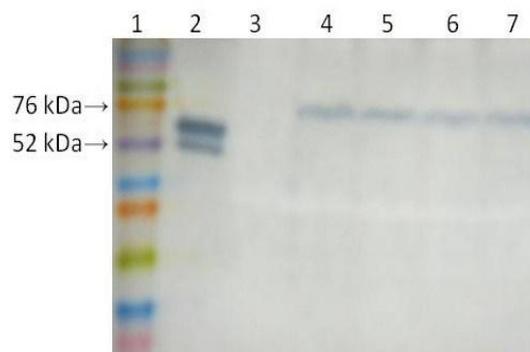


Figura 2. *Western blot* de clones de *P. pastoris* expressando a proteína quimérica (LTBR1P42NrdF), previamente selecionados por *Dot blot*. 1, Marcador de peso molecular; 2, controle positivo proteína de *M. hyopneumoniae*; 3, Controle negativo (cepa KM71H); 4-7, clones de *P. pastoris*.

4. CONCLUSÕES

A proteína quimera recombinante contendo os antígenos P97R1, P42 e NrdF de *M. hyopneumoniae* associados ao adjuvante de mucosa (LTB) foi clonada e expressa com sucesso em *P. pastoris*. Novos estudos serão conduzidos para otimizar as condições de expressão e purificação e a proteína

quimérica será avaliada quanto à capacidade de indução de resposta imune protetora em suínos visando o desenvolvimento de uma vacina mais eficiente contra PES.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERZOFSKY, J.A.; AHLERS, J.D.; BELYAKOV, I.M. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. **Nature Reviews Immunology**, Bethesda, v.1, p.209-219, 2001.

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

COX, E.; VERDONCK, F.; VANROMPAY, D.; GODDEERIS, B. Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. **Veterinary Research**, Heverlee, v.37, p.511-539, 2006.

DALY, R.; HEARN, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, Clayton, v.18, p.119–138, 2005.

MARCHIORO, S.B.; SÁCRISTAN, R.D.P.; MICHIELSA, A.; HAESBROUCK, F.; CONCEIÇÃO, F.R., DELLAGOSTIN, O.A.; MAES, D. Immune responses of a chimaeric protein vaccine containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and LTB against experimental *M. hyopneumoniae* infection in pigs. **Vaccine**, Merelbeke, v. 32, p.4689-4694, 2014.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* e infection. **The Veterinary Journal**, Bellaterra, v.181, n. 3, p.221– 231, 2009.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. Pneumonia enzoótica. In: **CLÍNICA E PATOLOGIA SUÍNA**. Goiânia: 2^a ed., Art 3 Impressos Especiais, 1999. p.359.

THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; BOETTCHER, T.B.; JAYAPPA, H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. **Swine Health and Production**, Ames, v.6, n.3, p.107–112, 1998.