

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE QUIMERA DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *M. hyopneumoniae* EM *Pichia pastoris*

- Maria L.L. Motta^{1*}, Charles K. Gomes², Marcelo S. Barbosa³, Silvana B. Marchioro⁴
1. Estudante de IC da Fac.de Biotecnologia, Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD
 2. Mestre pela Universidade Federal de Pelotas
 3. Mestre pela Universidade Federal da Grande Dourados
 4. FCS-UFGD - Departamento de Medicina / Orientador

Resumo:

A pneumonia enzoótica suína (PES), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, está entre as doenças infecciosas de maior impacto na suinocultura mundial, e o controle desta doença é feito utilizando vacinas importadas, as quais, possuem um elevado custo de produção e proporcionam uma proteção parcial.

Assim, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da PES. Este trabalho teve como objetivo a expressão de uma proteína quimera recombinante, compostas por três antígenos de *M. hyopneumoniae* (P42, R1 e NrdF) fusionados a um adjuvante de mucosa, em *Pichia pastoris*, visando a obtenção desta proteína, além de comparar este tipo de sistema de expressão com o da *E. coli*.

Para isto, foi realizada a expressão, purificação e a caracterização dos antígenos. Pode-se concluir que, obteve-se sucesso na expressão da proteína quimérica na levedura *P. pastoris*.

Palavras-chave: Proteína recombinante; *Pichia pastoris*; *M. hyopneumoniae*.

Apoio financeiro: CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFGD.

Introdução:

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das principais doenças respiratórias dos suínos, afetando animais no mundo todo, causando grandes perdas econômicas para a indústria suinícola. A vacinação é o método mais eficaz para o controle da PES. As vacinas comerciais disponíveis no mercado são bacterinas, produzidas a partir da bactéria inteira inativada e conferem apenas proteção parcial aos suínos. Além deste tipo de profilaxia existem

as proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* produzidas em *Escherichia coli*, que vem sendo testadas como potenciais alvos vacinais.

Algumas limitações são observadas na produção de proteínas recombinantes utilizando o sistema de expressão em procaríotos: frequentemente expressa proteínas não ativas devido a *misfolding* ou pela formação de corpúsculos de inclusão, resultando em baixo rendimento e eficácia da proteína purificada. A expressão de proteínas heterólogas baseadas na levedura metilotrófica *P. pastoris* tem se destacado por possuir algumas características interessantes, como custo, possibilidade de produção em escala industrial e a secreção da proteína alvo no do meio de cultivo. Não comprometendo, desta maneira, no *foldings* da proteína, mantendo sua conformação nativa e não alterando sua função.

Existem diversos antígenos de *M. hyopneumoniae* que vêm sendo avaliados como candidatos para a produção de uma vacina recombinante. Alguns destes incluem adesina P97, que desempenha o papel na adesão desse agente patogênico no trato respiratório do hospedeiro, a ribonucleotídeo redutase (NrdF) e a proteína de choque térmico P42. No entanto, a infecção por *M. hyopneumoniae* é causada na mucosa respiratória, e necessita-se de uma adequada estimulação do sistema imune associado à mucosa (MALT), o que vai depender da administração local dos antígenos, porém, quando são administrados desta forma não são imunogênicos devido a tolerância imunológica. Uma alternativa seria a utilização de adjuvantes de mucosa. Tendo isto em vista que a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) é um potente

adjuvante da imunidade de mucosa, sua utilização associada as proteínas recombinantes é estratégico para estimular este tipo de imunidade

Assim, este projeto visou a expressão de uma quimera, compostas por três antígenos de *M. hyopneumoniae* (P42, R1 e NrdF) fusionados a um adjuvante de mucosa (LTB), em *Pichia pastoris*, visando a obtenção desta proteína.

Metodologia:

Para a expressão de antígenos em *P. pastoris*, o gene de 1500 pb que codifica para expressão da proteína quimérica (LTB-R1-P42-NrdF) foi construído *in silico* e clonado no vetor pUC18 pela empresa Epoch Biolabs® (USA). O vetor pUC18 e os vetores de expressão em *P. pastoris*, pPICZαB e pPICZB (Invitrogen), foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI.

A confirmação da eficiência da digestão foi feita em gel de agarose 0,8%. O gene da quimera liberado do vetor pUC18 foi extraído com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O gene foi ligado aos vetores de expressão em *P. pastoris* com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). Os plasmídeos ligados foram linearizados com a enzima *Pme*I (New England Bio Labs, EUA). A enzima foi inativada a 65 °C e o DNA precipitado.

As células de *P. pastoris* KM71H competentes foram transformadas por eletroporação (25 uF, 200 Ω, 2 kV), com 10 µg de DNA do plasmídeo linear, conforme o protocolo EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) e semeadas em meio YPDS contendo 100 µg/ml de zeocina. o gene que codifica para a quimera de antígenos de *M. hyopneumoniae* foi clonado no vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZαB (Invitrogen). A *P. pastoris* X33 competente, foi utilizada para a transformação por eletroporação com o vetor recombinante, segundo protocolo descrito pela Invitrogen (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, Version G). A seleção das colônias recombinantes de *P. pastoris* (transformantes), com expressão positiva, foi realizada através de *Colony blot*.

Colônias com expressão positiva foram repicadas em caldo BMGY e incubadas em agitador orbital (200 rpm, 28 °C) até atingirem DO₆₀₀ = 4. Nesse momento, as culturas foram centrifugadas e o *pellet* ressuspensionado em BMMY contendo 0,5% de

metanol. A cada 24 h, 0,5% de metanol foi adicionado, visando induzir a expressão da proteína recombinante.

Na caracterização dos antígenos expressos em *P. pastoris* as amostras de sobrenadante foram coletadas a cada 24 h e analisou-se os níveis de expressão por *Dot* ou *Western Blot* com MAb anti-his-tag conjugado à peroxidase ou soro policlonal de camundongo vacinado (Sigma).

Para a purificação de antígenos em *P. pastoris*, um clone com expressão positiva foi utilizado na expressão em larga escala, realizada nas mesmas condições descritas acima. Após a indução, o sobrenadante contendo a proteína recombinante foi precipitado com sulfato de amônia, dialisado contra PBS e armazenado a -80 °C. As proteínas purificadas foram avaliadas por SDS-PAGE, ELISA e *Western blot*.

Resultados e Discussão:

O gene sintético que codifica para a proteína quimérica, composta pela fusão dos antígenos R1 (P97), P42, NrdF e LTB foi eficientemente clonado no vetor de expressão pPICZαB em *P. pastoris*.

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.

Conclusões:

Com base nos resultados obtidos concluiu-se que a 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*, demonstrando que é um forte candidato como sistema de produção de proteínas recombinantes. Novos estudos serão conduzidos para otimizar as condições de expressão e purificação. A proteína quimérica poderá ainda ser avaliada quanto à capacidade de indução de resposta imune protetora para imunizar suínos visando analisar seu potencial para compor uma vacina

mais eficiente contra PES.

Referências bibliográficas:

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

CEREGUINO, J.L.; CREGG, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24, 45-66.

CHEN, Y.L.; WANG, S.N.; YANG, W.J.; et al. 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infection and Immunity*, 71, 1155-1160.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O.A. 2006. 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*, 24, 5734-5743.

DALY, R. & HEARN, M.T.W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition : JMR*. 18(2). p. 119–138.

FAGAN P.K.; DJORDJEVIC S.P.; EAMENS G.J.; et al. 1996. Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. *Infection and Immunity*, 64, 1060-1064.

GELLISSEN, G., KUNZE, G., GAILLARDIN, C., CREGG, J.M., BERARDI, E., VEENHUIS, M. & VAN DER KLEI, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS yeast research*. 5(11). p. 1079–1096.

LI, P., ANUMANTHAN, A., GAO, X.G., ILANGOVAN, K., SUZARA, V., DÜZGÜNES, N. & RENUGOPALAKRISHNAN, V. (2007). Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (142). p. 105–124.

MCGHEE, J.R.; MESTECKY J.; DERTZBAUGH M.T.; et al. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*, 10, 75-88.

MILLAR, D.G.; HURST, T.R.; SNIDER, D.P. 2001. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infection and Immunity*, 69, 3476-3482.

RABERT, C., WEINACKER, D., PESSOA, A. & FARÍAS, J.G. (2013). Recombinant proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 44(2). p. 351–356.

SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S.B.; MAES, D.; DELLAGOSTIN, O.A. 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 165, 234-242

SIMMONS, C.P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; et al. 2001. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scand J Immunol*, 53, 218-26.

SHIMOJI, Y.; OISHI, E.; MUNETA, Y; et al. 2003. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine*, 21, 532-537.

VERWEIJ, W.R.; HAAN, L.; HOLTROP, M.; et al. 1998. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: Induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. *Vaccine*, 16, 3476-3482.

YAMANAKA, H.; ISHIBASHI, D.; YAMAGUCHI, N.; et al. 2006. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine*, 24, 2815-23.