

# Caracterização imunológica e funcional da frutose-1,6-bifosfato-aldolase de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Sofia Nóbrega de Moraes<sup>1</sup>, Henrique Bunselmeyer Ferreira<sup>2</sup> (\*)

<sup>1</sup>Graduanda em Biotecnologia – UFRGS

<sup>2</sup>Orientador, Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS

\*Este trabalho teve a contribuição da doutoranda Jéssica Andrade Paes, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM-UFRGS)

## Introdução

*Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES), uma doença responsável por grandes perdas econômicas na suinocultura (Maes *et al.*, 2008). Proteínas secretadas ou expostas na superfície celular da bactéria desempenham papel fundamental no desenvolvimento da doença, pois podem estar envolvidas com mecanismos de patogenicidade (Razin, 1999; Rottem, 2003). Quando secretadas, algumas proteínas citosólicas desempenham funções *moonlighting*, isto é, funções não relacionadas com seu papel tradicional dentro da célula (Wang & Jeffery, 2016). Estudos realizados com bactérias patogênicas, incluindo o gênero *Mycoplasma* spp., apontam que algumas enzimas da via glicolítica, como a frutose-1,6-bifosfato-aldolase (FBA), podem ser encontradas na superfície bacteriana ou na fração extracelular e apresentar nesse contexto funções alternativas relacionadas com aderência, infecção e invasão (Rebollo Couto *et al.*, 2012). O possível envolvimento da FBA com mecanismos de patogenicidade é evidenciado pela sua imunogenicidade em animais infectados com outras espécies de *Mycoplasma* spp. (Jores *et al.*, 2009) e pelas sua capacidade de ligação ao plasminogênio da matriz extracelular do hospedeiro e de ativação da conversão de plasminogênio em plasmina, facilitando os processos de motilidade, adesão e invasão celular. (Chaves *et al.*, 2015; e la Paz Santangelo *et al.*, 2011).

## Objetivos

O objetivo deste estudo é a caracterização imunológica e funcional da FBA de *Mycoplasma hyopneumoniae* (MhFBA), visando identificar possíveis funções *moonlighting*. Para tanto, serão avaliadas a antigenicidade e imunogenicidade de uma versão recombinante da MhFBA (rMhFBA) e serão realizados ensaios funcionais para avaliar a sua atividade enzimática e o seu potencial de ligação ao plasminogênio.

## Materiais e métodos

**1. Amplificação da sequência de DNA codificadora (CDS) do gene *fba-1*:** a amplificação da CDS do gene *fba-1* foi realizada em duas etapas através de PCR *overlap* (Ho *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1991) para a mutagênese sítio-dirigida de um códon de triptofano (TGA → TGG). Para isso foram utilizados quatro iniciadores: um par de iniciadores externos flaqueando a sequência a ser amplificada e um par de iniciadores internos mutagênicos com sobreposição de 19 pb entre os fragmentos adjacentes. Os iniciadores externos possuem em suas extremidades 5' sequências de 24 pb referentes às *tags* para recombinação que consistem em sequências homólogas ao vetor de expressão pGEX-TEV utilizado na clonagem. O sítio de mutação se localiza entre os iniciadores mutagênicos. (Figura 1). Na primeira etapa, foram realizadas duas reações simultâneas de amplificação utilizando o DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448 como molde. Na primeira reação foram utilizados os iniciadores F e Ri para gerar um amplicon de 598 pb, incluindo 574 pb referentes ao fragmento 5' da CDS de *fba-1* mais 24 pb da *tag*. Na segunda reação foram utilizados os iniciadores Fi e R para gerar um amplicon de 300 pb, incluindo os 276 pb referentes ao fragmento 3' da CDS de *fba-1* mais 24 pb da *tag*. Na reação da segunda etapa foram utilizados os iniciadores F e R para gerar um amplicon de 879 pb, incluindo 831 pb referentes à CDS de *fba-1* propriamente dita mais os 48 pb referentes às sequências das *tags*. O amplicon correspondente a CDS da MhFBA mutada foi purificado a partir do gel de agarose usando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE HealthCare).

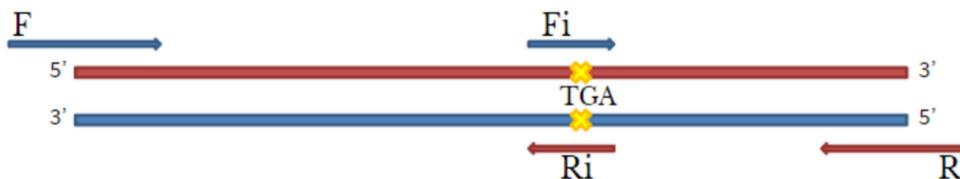


Figura 1: Esquema de representação da mutagênese sítio-dirigida para substituição do códon de triptofano por PCR *overlap*. F e R representam os iniciadores externos flaqueando a sequência a ser amplificada e contendo *tags* para recombinação. Fi e Ri representam os iniciadores internos mutagênicos com sobreposição de 19 pb entre os fragmentos adjacentes. O sítio de mutação se localiza entre os iniciadores mutagênicos e está indicado em amarelo.

**2. Clonagem no vetor pGEX-TEV:** Realizada através de recombinação homóloga *in vivo* na linhagem KC8 de *Escherichia coli* (Parrish *et al.*, 2004). Para isso o vetor pGEX-TEV foi clivado com as enzimas XhoI e EcoRI, gerando extremidades homólogas às *tags* de recombinação das extremidades do amplicon. Os possíveis clones foram identificados por PCR de colônia e serão confirmados por sequenciamento.

## Resultados

**1. Amplificação e mutagênese sítio-dirigida da CDS *fba-1*:** Integrantes da classe *Mollicutes*, incluindo *Mycoplasma* spp., não utilizam o código genético padrão. Nestas espécies o aminoácido triptofano é codificado pelo códon TGA, o qual codifica um códon de parada em outras espécies como *E. coli*, impedindo que esta bactéria seja utilizada como sistema de expressão heteróloga. Por esse motivo foi realizada a mutagênese sítio-dirigida de um códon de triptofano (TGA → TGG) presente na CDS através de PCR *overlap*. Na primeira etapa foram gerados produtos de PCR contendo as regiões 5' e 3' da CDS mutada da MhFBA (Figura 2). Devido a utilização de iniciadores mutagênicos parcialmente sobrepostos em sua amplificação, estes fragmentos possuem extremidades complementares capazes de se anelar e servir como iniciadores para a síntese da fita complementar, gerando a CDS mutada completa da MhFBA a partir da qual ocorrerá a amplificação na segunda etapa. Para isso, os fragmentos foram adicionados em proporção equimolar e utilizados como molde na terceira reação (Figura 3). Devido ao alto conteúdo de AT no genoma de *M. hyopneumoniae*, foram detectadas reações inespecíficas na terceira reação, motivo pelo qual o amplicon correspondente a CDS de *fba-1* foi purificado a partir da banda de gel (Figura 4).

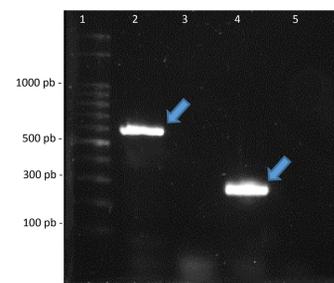


Figura 2: Amplificação das regiões 5' e 3' da CDS mutada de MhFBA. 1: marcador de 100 pb. 2: amplicon com 598 pb incluindo os 574 pb referentes ao fragmento 5' da CDS de *fba-1* mais os 24 pb da *tag* para recombinação. 3: controle negativo 4: amplicon de 300 pb incluindo os 276 pb do fragmento 3' da CDS de *fba-1* mais os 24 pb da *tag* para recombinação. 5: controle negativo.

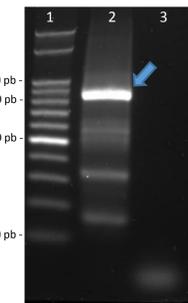


Figura 3: Amplificação da CDS da MhFBA com mutagênese sítio-dirigida para substituição do códon TGA por TGG. 1: marcador de 100 pb. 2: amplicon com 879 pb incluindo os 831 pb referentes a CDS mutada da MhFBA mais 48 pb referentes às *tags* para recombinação. 3: controle negativo.

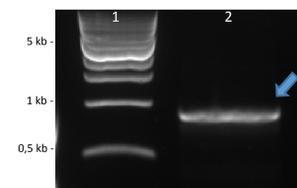


Figura 4: Resultado da purificação por GFX da CDS mutada da MhFBA. 1: marcador de 1 kb. 2: amplicon purificado com 879 pb incluindo os 831 pb referentes a CDS mutada da MhFBA mais 48 pb referentes às *tags* para recombinação.

**1. Clonagem no vetor pGEX-TEV:** O PCR de colônia foi realizado utilizando iniciadores complementares ao vetor pGEX-TEV. Foram identificados quatro possíveis clones (Figura 5) nos quais é possível observar duas bandas: uma com aproximadamente 1 kb referente ao possível clone pGEX:MhFBA e outra banda inespecífica com aproximadamente 5 kb. Na ausência do inserto foi amplificada uma sequência de aproximadamente 200 pb referente à sequência do vetor flanqueada pelos iniciadores. Os quatro possíveis clones serão confirmados por sequenciamento.

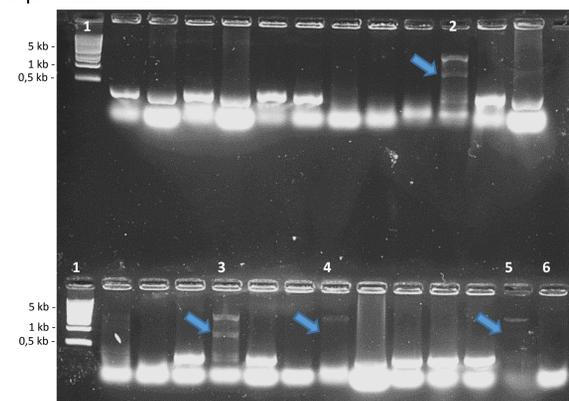


Figura 5: PCR de colônia utilizando iniciadores complementares ao vetor pGEX-TEV para identificar clones recombinantes. 1: marcador de 1 kb. 2: possível clone 1. 3: possível clone 2. 4: possível clone 3. 5: possível clone 4. 6: controle negativo.

## Perspectivas

- Padronização da expressão da rMhFBA em *E. coli*;
- Produção da rMhFBA purificada em quantidades suficientes para os ensaios imunológicos e funcionais;
- Avaliação da antigenicidade e da imunogenicidade da rMhFBA
- Avaliação da atividade enzimática da rMhFBA
- Ensaios de ligação ao plasminogênio

## Referências

- Maes, D. *et al.* (2008). *Vet Microbiol* 126, 297-309.  
Razin, S. (1999). *Biosci Rep* 19, 367-372.  
Rottem, S. (2003). *Physiol Rev* 83, 417-432.  
Wang, W. & Jeffery, C. J. (2016). *Mol Biosyst* 12, 1420-1431.  
Rebollo Couto, M. S. *et al.* (2012). *ISRN Vet Sci* 2012, 802308.  
Jores, J. *et al.* (2009). *Vet Immunol Immunopathol* 131, 238-245.  
Chaves, E. G. *et al.* (2015). *BMC Microbiol* 15, 53.  
de la Paz Santangelo *et al.* (2011). *J Biol Chem* 286, 40219-40231.  
Ho, S. N. *et al.* (1989). *Gene* 77, 51-59.  
Parrish, J. R. *et al.* (2004). *J Proteome Res* 3, 582-586.