

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Caracterização imunológica e funcional da
sinal-peptidase tipo I de *Mycoplasma hyopneumoniae***

Jéssica Andrade Paes

Porto Alegre, dezembro de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Caracterização imunológica e funcional da
sinal-peptidase tipo I de *Mycoplasma hyopneumoniae***

Jéssica Andrade Paes

Trabalho de conclusão de curso
submetido à COMGRAD do Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, dezembro de 2012.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com o apoio financeiro do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICO

Aos meus amados pais que sempre me incentivaram e fizeram parte desta conquista.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela grande vitória alcançada e por sempre encher meu coração de fé para superar todos os obstáculos encontrados ao longo desta jornada.

Ao professor Henrique Bunselmeyer Ferreira pela oportunidade de realizar minha iniciação científica no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional. Sou grata principalmente por todo apoio, dedicação, conhecimentos, incentivo e confiança empregados que foram fundamentais para a realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Arnaldo Zaha por todo incentivo e conhecimentos que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao M.Sc. Lucas Moitinho e a Dra. Veridiana Virginio por me introduzirem no mundo da biologia molecular, transmitindo conhecimentos que possibilitaram a realização deste trabalho. Obrigado por fazerem parte do meu grande sonho, por comemorar comigo cada novo resultado e por sempre me dar mais trabalho.

Aos meus pais, Eliane e Jessé, por todo carinho, compreensão e apoio que foram essenciais durante toda minha vida. Em especial, agradeço a minha mãe por toda disposição e pelas duas noites dormidas no laboratório.

Aos meus parceiros de almoço Martin, Veri, Aline e Karina Monteiro pelas boas risadas e reclamações da comida.

À minha grande amiga Thiely Ott que esteve presente por pouco tempo, mas que deixou muitas saudades. Obrigada por toda a compreensão, desabafos, chocolates e frituras compartilhadas.

Às minhas colegas e amigas Tathiane Reinaldo, Fernanda Capra e Priscila Poock pela parceria durante toda graduação.

Às doutorandas Karina Lorenzatto e Aline Teichmann por toda a ajuda prestada e a paciência para responder todas as dúvidas.

A todo o pessoal dos laboratórios 210, 206 e 204, por todas as risadas, empréstimos e dúvidas esclarecidas.

Aos meus colegas de iniciação científica Taylor Gonchoroski, Gabriela Paludo, Bruna Meneghetti, Matheus Barreto e Cristine Dutra por darem força e continuidade aos nossos “momentos criativos”.

Às minhas queridas colegas Rafaela Bonotto e Fernanda Leal por toda a ajuda prestada, pela parceria nas comilanças e por toda a paciência durante minhas crises.

Ao pessoal do 2DE, Karin e Kendi, pela compreensão, risadas e origamis.

A todos os professores e funcionários do Centro de Biotecnologia por proporcionarem o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família por toda a força, compreensão e carinho.

Aos meus amigos e irmãos na fé, em especial ao Adão, Sheila, Indira, Adilson Figueiredo, Priscila, Adilson do Carmo, Izete, Claudeci, Bete, Verônica, Estela, Isaque e tantos outros amigos queridos que sempre estão ao meu lado.

Ao Wesley, que esteve comigo nestes momentos finais e que me ajudou a superar todas as dificuldades com muito bom humor, tornando meus dias mais coloridos.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Suinocultura no Brasil.....</i>	13
1.2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae e a PES.....</i>	13
1.3 <i>Sistemas de exportação de proteínas em bactérias.....</i>	17
1.4 <i>Sinal-peptidase tipo I.....</i>	20
2. JUSTIFICATIVAS.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 <i>Clonagem da CDS sipS em vetores de expressão.....</i>	24
4.2 <i>Expressão e purificação da rMhSPase I.....</i>	24
4.3 <i>Imunizações de camundongos com a rMhSPase I purificada.....</i>	25
4.4 <i>Avaliação da resposta humoral induzida em camundongos pela imunização com a rMhSPase I.....</i>	25
4.5 <i>Remoção de endotoxinas presentes na rMhSPase I purificada...</i>	26
4.6 <i>Avaliação da resposta imune celular induzida em camundongos pela imunização com a rMhSPase I.....</i>	26
4.7 <i>Curvas de crescimento para o ensaio de complementação in vivo.....</i>	27
4.8 <i>Expressão da rMhSPase I em E. coli IT89 durante ensaio de complementação in vivo.....</i>	28
4.9 <i>Análises estatísticas.....</i>	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 <i>Expressão e purificação da rMhSPase I.....</i>	29
5.2 <i>Análise da resposta imune induzida em camundongos imunizados com a rMhSPase I purificada.....</i>	29
5.3 <i>Análise funcional da MhSPase I.....</i>	31
6. DISCUSSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

ABIPECS: Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína

CDRS: complexo de doenças respiratórias de suínos

CDS: sequência de DNA codificadora, do inglês *coding DNA sequence*

CNPISA: Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves

D.O.: densidade óptica

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*

ELISA-T: ELISA-Tween 20

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GST: glutationa-S-transferase

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG: imunoglobulina G

IL-10: interleucina-10

IL-4: interleucina-4

INF- γ : interferon-gama

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa: quilodalton

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LB: meio Lúria-Bertani

LPS: lipopolissacarídeos

MhSPase I: sinal-peptidase tipo I de *Mycoplasma hyopneumoniae*

OPD: do inglês, *O-phenylenediamine*

pb: pares de bases

PBS: do inglês, *phosphate buffer saline*

PBS-T: PBS-Tween 20

PCR: reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PES: pneumonia enzoótica suína

pH: potencial hidrogeniônico

PRCV: coronavírus respiratório suíno

PRRSV: vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos

PS: peptídeo-sinal

rMhSPase I: MhSPase I recombinante

RT: do inglês, *reverse transcription*

SDS-PAGE: do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB: soro fetal bovino

SIV: vírus da influenza suína

SPase: sinal peptidase

Lista de figuras

FIGURA 1: Microscopia eletrônica do corte do epitélio do bronquíolo de um porco inoculado com a linhagem MI-3 de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	15
FIGURA 2: Sistema geral de secreção de proteínas (sistema Sec).....	18
FIGURA 3: Proteínas componentes do sistema Sec identificadas em <i>M. hyopneumoniae</i> 7448.....	19
FIGURA 4: PS bacteriano típico.....	20
FIGURA 5: Expressão e purificação da rMhSPase I.....	29
FIGURA 6: Detecção de IgG anti-rMhSPase I no soro de camundongos imunizados por ELISA.....	30
FIGURA 7: Análise da atividade funcional da rMhSPase I através de ensaio de complementação <i>in vivo</i>	32
FIGURA 8: Gráficos obtidos no software ImageJ para a análise dos imunoblots de detecção da expressão rMhSPase I em <i>E. coli</i> IT89.....	33

Lista de tabelas

TABELA 1: Iniciadores utilizados para a clonagem da CDS <i>sipS</i> nos vetores de expressão pGEX 4T-3 e pEX50.....	24
TABELA 2: Produção de citocinas nos sobrenadantes de esplenócitos estimulados com a rMhSPase I.....	31

Resumo

Mycoplasma hyopneumoniae é um patógeno suíno economicamente significativo que se adere às células do epitélio respiratório causando a pneumonia enzoótica suína (PES). A adesão celular e outros processos importantes para infecção dependem de proteínas de membrana, cuja maioria é transportada pela via de exportação Sec-dependente. A sinal-peptidase tipo I (SPase I) é uma protease de membrana que atua na liberação de proteínas translocadas através da via Sec-dependente. Neste contexto, a SPase I possui participação crítica na exportação de proteínas que podem atuar nas relações patógeno-hospedeiro. O objetivo deste trabalho é caracterizar imunológica e funcionalmente a SPase I de *M. hyopneumoniae* (MhSPase I) a fim de analisar o seu potencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a PES. Para isso, a sequência de DNA codificadora da MhSPase I, *sipS*, foi clonada no vetor de expressão pGEX 4T-3 e expressa em *Escherichia coli*. A MhSPase I recombinante (rMhSPase I) foi purificada e utilizada em ensaios de imunização de camundongos. A rMhSPase I foi altamente imunogênica para camundongos, sendo que sua imunogenicidade foi avaliada por ELISA. A resposta imune celular induzida pela rMhSPase I foi caracterizada através da secreção de citocinas no cultivo de esplenócitos dos camundongos imunizados, sendo estimulados com a proteína recombinante. Este antígeno induziu uma forte resposta celular do tipo Th2, com altos níveis de secreção de interleucina-10. Paralelamente, a atividade funcional da rMhSPase I foi analisada através de ensaios de complementação *in vivo* em *E. coli* SPase I mutante. A partir deste ensaio, pode-se observar que a MhSPase I é capaz de complementar a atividade de SPase I de *E. coli*, garantindo a sobrevivência bacteriana, sendo uma proteína essencial para a viabilidade celular. Estes resultados demonstram que a rMhSPase I pode ser um bom alvo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a PES, uma vez que é capaz de induzir resposta imune e é fundamental para a sobrevivência bacteriana.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, MhSPase I, caracterização imunológica, atividade funcional, vacinas recombinantes.

Abstract

Mycoplasma hyopneumoniae is an economically significant swine pathogen that colonizes the respiratory epithelial cells causing the porcine enzootic pneumonia (PEP). Cell adhesion and other processes important for infection depend on membrane proteins, most of which are transported by the Sec-dependent pathway. Type I signal-peptidase (SPase I) is a membrane protease which acts in the release of translocated proteins through Sec-dependent pathway. In this context, SPase I is critical for protein export, which may act on pathogen-host relations. The aim of this work is the immunological and functional characterization of *M. hyopneumoniae* SPase I (MhSPase I), in order to analyze its potential for development of recombinant vaccines against PEP. For this, coding DNA sequence of MhSPase I, *sipS*, was cloned into the expression vector pGEX 4T-3 and expressed in *Escherichia coli*. Recombinant MhSPase I (rMhSPase I) was purified and used in immunization of mice. The immunogenicity of rMhSPase I was evaluated by ELISA, being highly immunogenic for mice. Cellular immune response induced was characterized through cytokine secretion by mice splenocytes in culture, stimulated with rMhSPase I. This antigen induced a strong Th2 cellular response, with high secretion levels of interleukin-10. In parallel, MhSPase I functional activity was analyzed by *in vivo* complementation assays in *E. coli* SPase I mutant. From this assay, was observed which MhSPase I is able to complement the SPase I activity of *E. coli*, allowing the bacterial survive, being essential for cell viability. These results demonstrate that MhSPase I may be a good target to development of recombinant vaccines against PEP, once is able to induce immune response and is fundamental for bacterial survive.

Key-words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, MhSPase I, immunological characterization, functional activity, recombinant vaccines.

1. Introdução

1.1 Suinocultura no Brasil

As atividades relacionadas à suinocultura ocupam lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio brasileiro, destacando-a como uma atividade de importância no âmbito econômico e social. Este setor gera cerca de 600 mil empregos, com 40 mil suinocultores e 3,4 milhões de toneladas de carne suína produzida (ABIPECS, 2011). O rebanho suíno brasileiro, estimado em 38,9 milhões de cabeças, possui a maior representação na região sul do país que abriga 47,9% do rebanho nacional (IBGE, 2010).

No Brasil, uma das principais causas de prejuízos dentro de uma granja de suínos é a ocorrência de doenças respiratórias. Um estudo realizado por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSEA-EMBRAPA, Concórdia, SC, Brasil) revelou o prejuízo de cerca de 80 milhões de reais devido às lesões pneumônicas (Sobestiansky *et al.*, 2001). A pneumonia enzoótica suína (PES) está entre as doenças que mais afetam a suinocultura mundialmente, uma vez que a bactéria causadora, *Mycoplasma hyopneumoniae*, é altamente prevalente em quase todas as áreas de produção de suínos (Thacker *et al.*, 2006). A PES é uma doença altamente contagiosa, sendo caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, tosse crônica e redução de crescimento (Thacker *et al.*, 2006), que gera grandes perdas econômicas para a suinocultura. Através da análise de lesões pulmonares de suínos, foi identificada a ocorrência de PES em 75,4% das carcaças em abatedouros das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, concentrando mais de 90% das criações de suínos do país. Além dos danos clínicos, as perdas econômicas são acentuadas pelos gastos com vacinação, antibióticos e manejo.

1.2 *Mycoplasma hyopneumoniae* e a PES

A bactéria *M. hyopneumoniae* pertence à classe Mollicutes, cujos representantes não possuem parede celular e apresentam genomas reduzidos,

que variam entre 580 Kb e 1,4 Mb (Barré *et al.*, 2004). As linhagens 7448 (patogênica) e J (não-patogênica) de *M. hyopneumoniae* apresentam genomas com 920,079 pb e 897,405 pb, respectivamente (Vasconcelos *et al.*, 2005). A redução do genoma destas bactérias pode ser decorrente de uma série de perdas gênicas, uma vez que se acredita que tenham evoluído a partir de bactérias gram-positivas com baixo conteúdo de G+C (Fadiel *et al.*, 2007). Entretanto, estas perdas não afetaram a capacidade de resposta metabólica e adaptação, sendo similares a espécies mais complexas (Yus *et al.*, 2009).

Como as bactérias da classe Mollicutes são geralmente parasitas, possuindo uma grande variedade de hospedeiros (Razin, 1992), o impacto econômico das doenças causadas despertou o interesse de vários estudos, principalmente com o gênero *Mycoplasma*. Devido ao genoma reduzido, os micoplasmas foram as primeiras bactérias a terem o genoma completamente sequenciado (Fraser *et al.*, 1995). Cinco linhagens de *M. hyopneumoniae* já tiveram seus genomas completamente sequenciados: quatro linhagens patogênicas (232, 7448, 7422 e 168) e uma não-patogênica (J) (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011). A partir da análise destes genomas de *M. hyopneumoniae* foi possível realizar uma série de estudos comparativos relacionados a proteínas potencialmente antigênicas e fatores de virulência (Ferreira & Castro, 2007; Pinto *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2009; Moitinho-Silva *et al.*, 2012).

M. hyopneumoniae é primariamente encontrado na superfície mucosa da traqueia, brônquios e bronquíolos (Blanchard *et al.*, 1992), sendo que a aderência da bactéria no epitélio ciliado do trato respiratório suíno é o pré-requisito para o início da infecção que gera a PES (Maes *et al.*, 2008) (Figura 1). A adesão da bactéria ao trato respiratório é mediada por moléculas de adesão encontradas na membrana plasmática (Zielinski & Ross, 1993), sendo que as proteínas envolvidas são chamadas de adesinas. A adesão ao epitélio ciliado resulta na perda dos cílios, predispondo os suínos a infecções secundárias que constituem o complexo de doenças respiratórias de suínos (CDRS). Este complexo pode envolver infecções concomitantes causadas por qualquer um dos vários patógenos respiratórios, de origem bacteriana ou viral, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), vírus da influenza suína (SIV), coronavírus respiratório suíno (PRCV); e as bactérias

Bordetella bronchiseptica, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, etc.

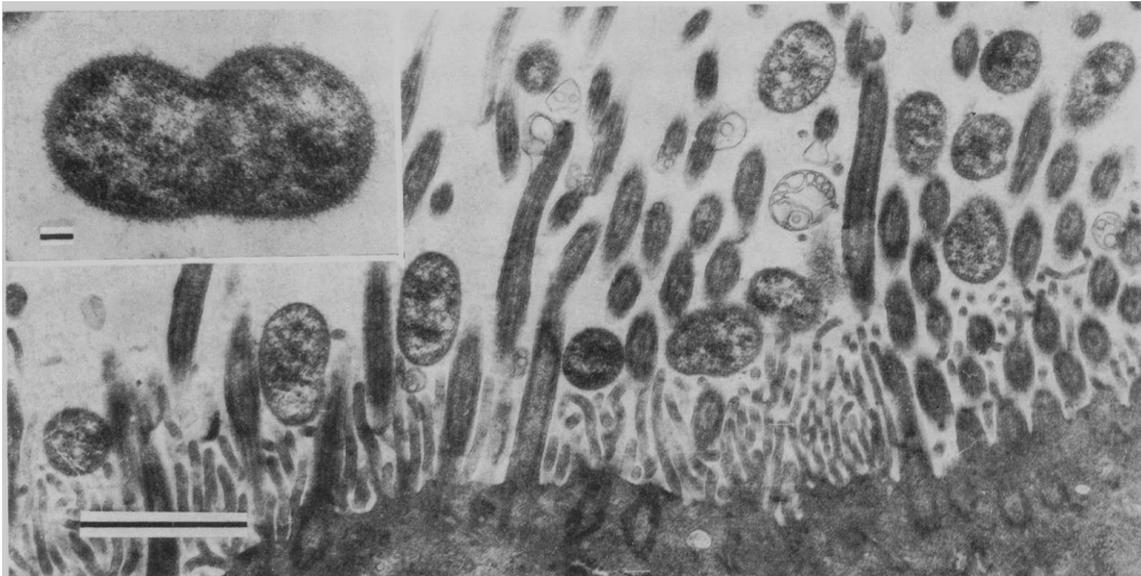


Figura 2: Microscopia eletrônica do corte do epitélio do bronquíolo de um porco inoculado com a linhagem MI-3 de *Mycoplasma hyopneumoniae*. A barra da escala representa 1 nm. (Tajima &Yagihashi, 1982).

Como tentativa de controle da doença, podem-se aperfeiçoar as práticas de alojamento dos suínos, como o sistema de produção, compra de animais, densidade de animais alojados, tamanho do rebanho, melhoria das condições de habitação e a prevenção de outras doenças (Maes *et al.*, 2008). Já o efetivo controle da PES requer primeiramente o diagnóstico e o monitoramento da doença, a redução da transmissão da infecção e o desenvolvimento de uma estratégia apropriada de vacinação (Sibila *et al.*, 2009), uma vez que o tratamento com apenas antibióticos não é suficiente (Chen *et al.*, 2003).

As vacinas utilizadas rotineiramente no combate a PES consistem basicamente de células bacterianas inativadas, também chamadas de bacterinas (Meyns *et al.*, 2006). Entretanto, a multiplicação de *M. hyopneumoniae in vitro* é lenta, e requer um meio de cultivo rico, o que torna o custo final da vacina bastante alto (Roos, 1999), dificultando seu uso em escala comercial. Além disso, sabe-se que a vacinação reduz a severidade da doença e a extensão das lesões, mas é incapaz de evitar a colonização do hospedeiro por *M. hyopneumoniae* (Carr, 2006; Maes *et al.* 2008).

A cultura de *M. hyopneumoniae* é considerada o padrão-ouro para a detecção do organismo em suínos infectados (Thacker, 2004). Entretanto, o isolamento da bactéria apresenta dificuldades devido a baixa taxa de crescimento, que varia entre 4 e 8 semanas. Além disso, a obtenção de culturas puras é dificultada pela contaminação com outras espécies de *Mycoplasma*. Neste contexto, o sorodiagnóstico e os métodos moleculares, como a PCR são ferramentas amplamente utilizadas para diagnosticar a presença/ausência de *M. hyopneumoniae* em suínos. Ainda que a utilização da PCR tenha se mostrado confiável para a detecção da bactéria (Sibila *et al.*, 2004), o sorodiagnóstico tem sido amplamente empregado para o monitoramento de *M. hyopneumoniae* em rebanhos (Sibila *et al.*, 2009). O ELISA é o método mais utilizado para o sorodiagnóstico da PES. Existem três ELISAs disponíveis para o diagnóstico de infecções por *M. hyopneumoniae*: ELISA de bloqueio monoclonal (Feld *et al.*, 1992), ELISA-Tween 20 (ELISA-T) (Nicolet *et al.*, 1980) e o HerdChek® (IDEXX, USA).

Atualmente, existem diversos estudos realizados a fim de aumentar a sensibilidade e a especificidade dos sorodiagnósticos, bem como desenvolver novas formulações vacinais contra a PES (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Okamba *et al.*, 2010; Simionatto *et al.*, 2010). A caracterização de proteínas potencialmente antigênicas é necessária para identificar bons alvos para a utilização em diagnóstico e vacinação. Devido às dificuldades de cultivo de *M. hyopneumoniae*, a maioria dos antígenos avaliados é obtida na forma recombinante. Assim, a clonagem de sequências de DNA codificadoras (CDS) de proteínas antigênicas de *M. hyopneumoniae* e a sua expressão em sistemas heterólogos surgem como uma alternativa importante tanto na busca por antígenos para utilização em imunodiagnóstico, como com potencial vacinal. Desta forma, cultivo de *M. hyopneumoniae* não é necessário e diferentes proteínas envolvidas na virulência do organismo podem ser analisadas individualmente. Resultados promissores têm sido obtidos em estudos analisando a potencialidade vacinal de antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae* (Fagan *et al.*, 2001; Shimoji *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2009). Nesse contexto, a vacinação de DNA pode, também, ser uma alternativa promissora, uma vez que a produção de vacinas de DNA é relativamente mais simples e apresenta um custo menor (Ahmed *et al.*, 2008).

1.3 Sistemas de exportação de proteínas em bactérias

Aproximadamente um terço de todas as proteínas bacterianas são exportadas para fora da célula ou estão na membrana plasmática (Auclair *et al.*, 2012). O sistema Sec é a principal rota de translocação pós-traducional de proteínas (Driessen & Nouwen, 2008). O sistema Sec é constituído, em procariotos, por um poro formado pelas proteínas SecY, SecE e SecG, que dão origem a um canal por onde a proteína-alvo é translocada. As proteínas SecA e SecB fazem o reconhecimento da proteína-alvo e a direcionam para o canal SecYEG (Rusch & Kendall, 2007).

As proteínas destinadas a localizações extra-citoplasmáticas são sintetizadas como preproteínas, que contêm uma sequência peptídica de curta extensão na extremidade amino-terminal chamada de peptídeo-sinal (PS) (Auclair *et al.*, 2012). A presença do PS distingue proteínas que devem ser exportadas daquelas que são citoplasmáticas, facilitando e direcionando a entrada das preproteínas na via de translocação (De Bona *et al.*, 2011). Tipicamente, o tetrâmero SecB interage com o PS da preproteína recém-sintetizada no citoplasma e a direciona para o complexo SecAYEG, na membrana plasmática. Em seguida, a preproteína interage com o dímero SecA que a direciona através do canal SecYEG, usando a energia proveniente da hidrólise de ATP para realizar a translocação (Paetzel *et al.*, 2000). Ao final da translocação, o PS é removido através de uma clivagem proteolítica catalisada pela enzima sinal-peptidase (SPase), liberando a proteína madura (De Bona *et al.*, 2011) (Figura 2). Sendo assim, o PS é importante para o direcionamento de proteínas, uma vez que carregam as informações necessárias para sua exportação (Paetzel *et al.*, 2002).

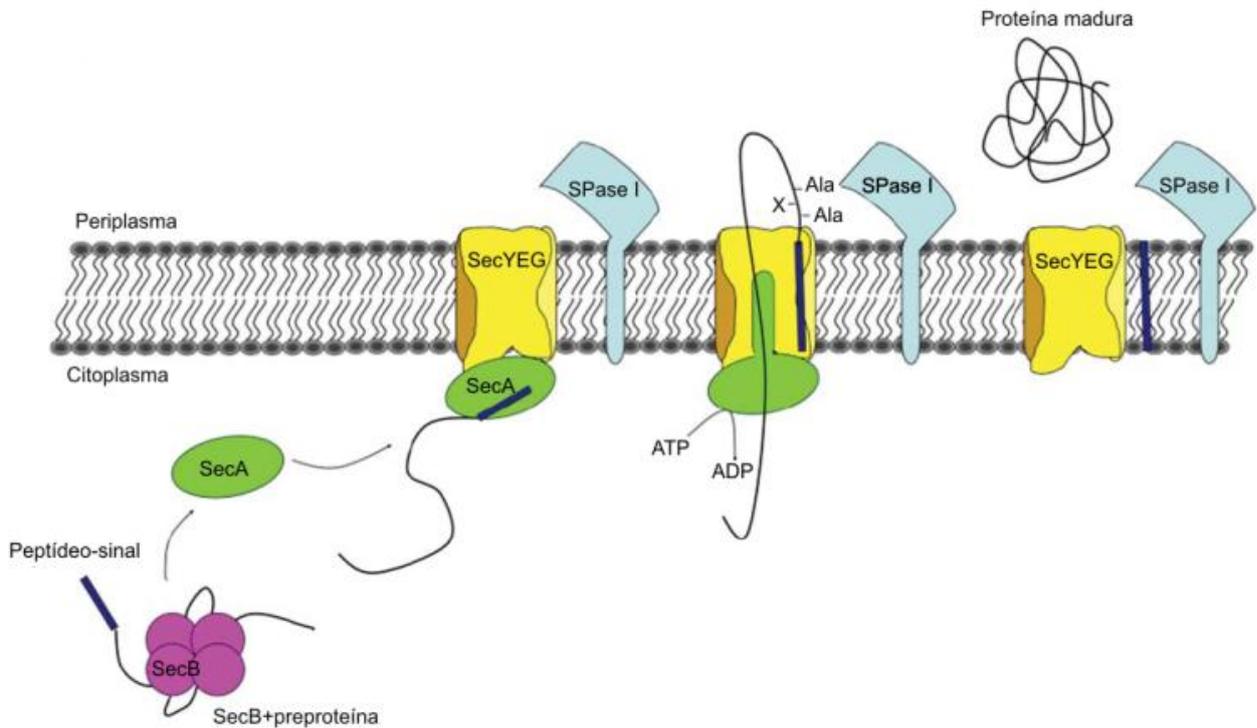


Figura 2: Sistema geral de secreção de proteínas (sistema Sec). Visão geral do sistema Sec. A maioria das proteínas bacterianas secretadas são exportadas pós-tradução através da membrana plasmática via sistema Sec. A preproteína é direcionada à membrana plasmática com o auxílio da chaperona SecB. A proteína SecA dirige a preproteína através do canal SecYEG, usando a energia proveniente da hidrólise de ATP. Uma vez que a proteína é translocada através da membrana, o PS é clivado pela SPase I, liberando a proteína madura. (adaptada de Auclair *et al.*, 2012).

A partir do sequenciamento do genoma de *M. hyopneumoniae* foi possível identificar os sistemas de exportação de proteínas presentes nesta bactéria. Utilizando o banco de dados da KEGG (Kanehisa *et al.*, 2010), *M. hyopneumoniae* apresenta alguns genes conservados que fazem parte do sistema geral de secreção (sistema Sec) (Figura 3). Entretanto, alguns genes codificadores de proteínas do sistema Sec não foram identificados, sendo que novos estudos são necessários para compreender o mecanismo de exportação de proteínas em *M. hyopneumoniae*.

Via Sec-dependente

Canal de translocação e proteínas associadas

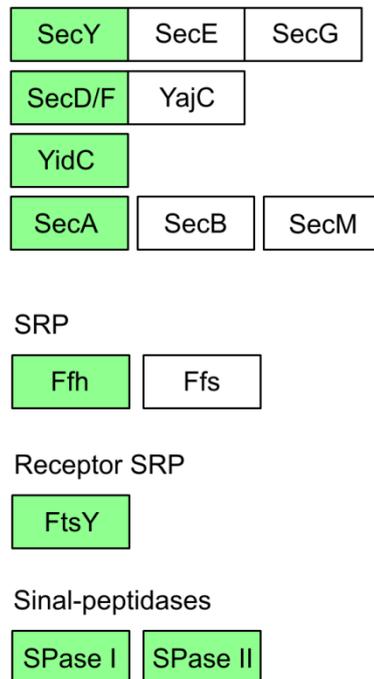


Figura 3: Proteínas componentes do sistema Sec identificadas em *M. hyopneumoniae* 7448. Em verde estão as proteínas cujos genes foram anotados no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, e em branco estão as moléculas ausentes nesta bactéria. Adaptada da KEGG (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mhp03060+MHP7448_0026).

Embora os PSs não apresentem homologia de sequência, eles possuem três domínios conservados: porção amino-terminal positivamente carregada (*n*), um domínio central hidrofóbico (*h*) e a porção carboxi-terminal hidrofílica (*c*), que contém o sítio de clivagem da SPase (Figura 4). O reconhecimento dos domínios *n* e *h* é necessário para a translocação, sendo que o domínio *c* especifica o sítio de clivagem (Von Heijne, 1990). As SPases reconhecem o final do domínio *c* que é caracterizado por aminoácidos neutros na porção -1 e que podem ser alifáticos na posição -3. Frequentemente são encontrados resíduos de alanina (A) nas regiões -1 e -3, sendo que tal característica determina a especificidade da SPase do tipo I (SPase I) como AXA.

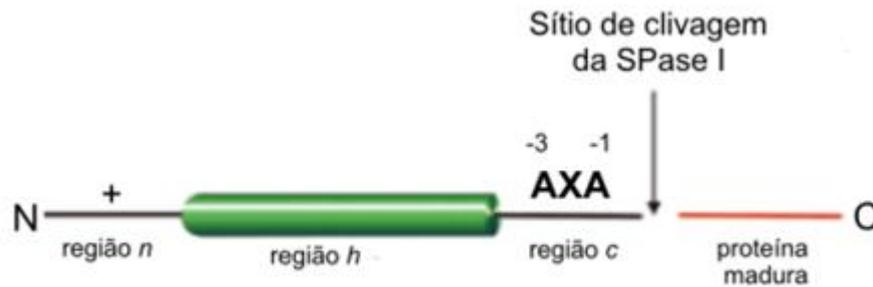


Figura 4: PS bacteriano típico.As regiões *n*, *h* e *c* de um PS característico e o sítio de clivagem da SPase I são ilustrados (adaptada de Paetzel *et al.*, 2002).

As SPases realizam a clivagem do PS sendo esta a última etapa da exportação da proteína-alvo, a qual é liberada na forma madura no fim do processo para o seu destino final (Rusch & Kendall, 2007). Em procariotos, existem dois tipos de SPases: tipo I (SPase I), que é responsável pela clivagem do PS da maioria das proteínas, e tipo II (SPase II), que é específica para lipoproteínas (Paetzel *et al.*, 2002).

1.4 Sinal-peptidase tipo I

A SPase I (EC 3.4.21.89) é uma serino-endopeptidase integral de membrana, que pertence à família S26 de serino-proteases (Rawlings & Barrett, 1994). O sítio catalítico desta proteína é uma díade composta por uma serina e uma lisina (tipo-P) ou uma serina e uma histidina (tipo-ER), sendo que ambas podem ser encontradas em procariotos e eucariotos (Van Roosmalen *et al.*, 2004). Além disso, a classificação da SPase I depende das sequências inseridas entre as porções conservadas, regiões transmembrana e do tamanho da proteína (Van Roosmalen *et al.*, 2004). Estas porções conservadas são observadas em alinhamentos de SPases I bacterianas, sendo que estas regiões estão divididas em caixas (*boxes*, do inglês) A-E (Paetzel *et al.*, 2002). A caixa A é caracterizada pelo segmento hidrofóbico que ancora o domínio catalítico à membrana. As caixas B e D contêm, respectivamente, os aminoácidos catalíticos serina e lisina. Na caixa C, estão localizados os aminoácidos envolvidos na ligação com o substrato (Paetzel *et al.*, 2002).

A atividade da SPase I *in vivo* é comumente monitorada através de ensaios de complementação *in vivo*, usando bactérias cuja SPase I é mutante

termossensível, sendo inativada em temperaturas não permissivas (Inada *et al.*, 1989). Além disso, a atividade da SPase I pode ser mensurada *in vivo* a partir do uso de inibidores específicos, como a arilomicina (Smith & Romesberg, 2012). A cinética enzimática da SPase I pode ser avaliada utilizando peptídeos sintéticos e/ou proteínas inteiras (Bockstael *et al.*, 2009a). O uso de peptídeos sintéticos como substrato para SPase I confere uma caracterização menos trabalhosa, garantindo dados completos referentes a atividade enzimática desta proteína (Paetzel *et al.*, 2002).

A partir de estudos que avaliam a atividade da SPase I, pode-se afirmar que esta proteína é essencial para a viabilidade das bactérias que possuem uma única CDS para essa enzima (Van Roosmalen *et al.*, 2004). Além disso, vários trabalhos têm descrito a SPase I como um possível fator de virulência para várias espécies, como *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Lammertynet *et al.*, 2004; Kavanaugh *et al.*, 2007; Bockstael *et al.*, 2009b), uma vez que esta proteína está envolvida com a exportação de proteínas importantes para os mecanismos de patogenicidade destas bactérias. Deste modo, estudos avaliando o potencial da SPase I para o uso em vacinas (Rafati *et al.*, 2006) e em antibióticos (Bockstael *et al.*, 2009b) têm sido realizados.

Em *M. hyopneumoniae* foram identificadas CDS correspondentes à SPase I (*sipS*) e à SPase II (*Isp*). Através de análises transcricionais por RT-PCR, foi possível afirmar que a CDS *sipS* está localizada em um operon, sendo co-transcrita com outras quatro CDS de *M. hyopneumoniae* 7448 (Moitinho-Silva *et al.*, 2012). Este operon é flanqueado pelas CDS *Isp* e MHP0025 (na linhagem 7448), que estão localizados na fita de DNA oposta.

2. Justificativas

A partir do sequenciamento das linhagens 232 (Minion *et al.*, 2004), J e 7448 (Vasconcelos *et al.*, 2005) de *M. hyopneumoniae* foi iniciado o trabalho de análise comparativa *in silico* das CDSs obtidas entre uma linhagem não-patogênica (J) e linhagens patogênicas (232 e 7448). Esta análise permitiu a identificação preliminar de genes que codificam proteínas determinantes de patogenicidade e/ou com potencial para utilização em vacinas (Ferreira & Castro, 2007). Várias destas proteínas tiveram sua expressão e antigenicidade confirmadas através de estudos proteômicos (Pinto *et al.*, 2007).

A SPase I de *M. hyopneumoniae* (MhSPase I) é uma proteína de superfície que constitui um potencial fator de virulência desta bactéria, uma vez que sua função pode estar relacionada com a exportação de proteínas relacionadas a patogenicidade e interação patógeno-hospedeiro, como proteínas de adesão, além de ser um componente essencial para a viabilidade da bactéria. Além disso, estudos recentes demonstraram a expressão diferencial da MhSPase I entre linhagens patogênicas e não-patogênicas de *M. hyopneumoniae*, sugerindo que esta proteína pode estar relacionada a patogenicidade da bactéria (Moitinho-Silva *et al.*, 2012). Neste contexto, a caracterização imunológica e funcional da MhSPase I é importante, visando à demonstração de sua imunogenicidade, indução de resposta imune celular e a confirmação de seu papel vital para a bactéria. Com isso, ela poderá ser validada como potencial componente de formulações vacinais recombinantes contra a PES.

3. Objetivos

Os objetivos gerais deste projeto são a caracterização funcional da SPase I de *M. hyopneumoniae* e a sua avaliação imunológica preliminar, de modo a definir seu potencial para utilização como componente de formulações vacinais recombinantes contra a PES.

3.1 Objetivos específicos

- a) Produção da MhSPase I recombinante em *Escherichia coli*.
- b) Avaliação da resposta imune humoral e celular induzida pela imunização com a MhSPase I recombinante em camundongos.
- c) Avaliação da funcionalidade da MhSPase I por ensaios de complementação heteróloga *in vivo*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Clonagens da CDS *sipS* em vetores de expressão

A CDS *sipS* de *M. hyopneumoniae* 7448 foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico usando os iniciadores descritos na Tabela 1. Estes iniciadores foram projetados com o programa Vector NTI, contendo uma porção homóloga aos sítios de clonagem do vetor pGEX 4T-3 (GE Healthcare) e pEX50 nas suas extremidades 5'. O vetor pGEX 4T-3 foi selecionado para a produção e purificação da MhSPase I recombinante (rMhSPase I). O vetor pEX50 é caracterizado pelo baixo-número-de-cópias, expressando as proteínas em nível fisiológico. Este vetor foi utilizado para os ensaios de complementação *in vivo*. Os amplicons resultantes foram clonados nos vetores pGEX 4T-3 e pEX50 por recombinação homóloga *in vivo* em *E. coli* KC8 (Parrish *et al.*, 2004). Os clones resultantes (pGEX4T-3:*sipS* e pEX50:*sipS*) foram confirmados por sequenciamento.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a clonagem da CDS *sipS* nos vetores de expressão pGEX 4T-3 e pEX50.

Nome	Sequência (5' - 3') ^a
pGEX: <i>sipS</i> 5'	TGGTTC CGCGTGGAT CCCCG ATGTTAAAATCTAAAACTTAAGTAAC
pGEX: <i>sipS</i> 3'	GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCATTAGGCCCAAACACCTTTAATATC
pEX50: <i>sipS</i> 5'	ACAATTT CACACAGGAAACAGCATATGTTAAAATCTAAAACTTAAG
pEX50: <i>sipS</i> 3'	ATCTGTG CGGTATTT CACAC CGTTAGGCCCAAACACCTTTAATATC

^a Letras em negrito nos iniciadores indicam as sequências homólogas aos sítios de clonagem dos vetores de expressão

4.2 Expressão e purificação da rMhSPase I

Os plasmídeos pGEX4T-3:*sipS* foram utilizados para expressar a rMhSPase I fusionada com glutathione-S-transferase (GST) em *E. coli* BL21 pLysE (Amersham Biosciences). Após a cultura de *E. coli* atingir a densidade

óptica (D.O.) de 0,5, foi feita a indução com IPTG 0,1 mM durante 6 h a 28°C sob agitação de 200 rpm. A solubilização da proteína foi feita com 0,5% de sarcosil (Mercado-Pimentel *et al.*, 2002). A rMhSPase I foi purificada por cromatografia de afinidade, com a resina de glutationa-Sepharose 4B (GE Healthcare), e a clivagem da proteína de fusão foi feita pela adição da enzima trombina (Sigma) na própria coluna, *overnight*, a 22°C. A eluição foi feita com PBS pH 7,4 com Triton X-100 0,5%. Os resultados foram analisados por eletroforese em SDS PAGE 12% e 15% corados com azul de Coomassie. A rMhSPase I purificada foi quantificada utilizando o kit Qubit Protein Assay (Invitrogen).

4.3 Imunizações de camundongos com a rMhSPase I purificada

Camundongos BALB/c fêmeas de 90 dias de idade foram divididos em dois grupos distintos (seis indivíduos por grupo), um de animais imunizados apenas com adjuvante de Freund (Sigma) e outro de animais imunizados com a rMhSPase I purificada. As imunizações foram feitas intraperitonealmente nos dias 0, 15 e 30, utilizando 25 µg da rMhSPase I purificada emulsionada adjuvante de Freund completo na primeira imunização e incompleto nas duas imunizações posteriores. O sangue dos animais foi coletado através da punção do plexo venoso retro-ocular, sendo feito a cada 15 dias após as imunizações para a separação do soro. Os animais foram sacrificados 60 dias após a primeira imunização.

4.4 Avaliação da resposta humoral induzida em camundongos pela imunização com a rMhSPase I

A resposta humoral induzida nos camundongos imunizados com a rMhSPase I foi avaliada por ELISA. Para isso foram adsorvidos 300 ng do antígeno purificado às placas de 96 poços em tampão de sensibilização carbonato-bicarbonato, pH 9,6. Os poços foram lavados com PBS-Tween (PBS-T) 0,05% e incubados por 1 h 30 min a 37°C com solução de bloqueio (BLOTTO) (5% de leite em pó desnatado dissolvido em tampão PBS 1X). Após 3 lavagens com PBS-T 0,05%, as placas foram incubadas por 1 h 30 min com

os soros policlonais anti-rMhSPase I, produzidos pela imunização dos camundongos, na diluição 1:20.000. Após três lavagens com PBS-T 0,05%, seguiu-se uma incubação por 1 h com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma), na diluição de 1:8000. Para a revelação, foram utilizados OPD (Sigma) e H₂O₂ e a reação enzimática foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 N. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 492 nm. Como controles negativos, foram utilizados os soros dos animais pré-ímmunes e os que foram imunizados somente com adjuvante de Freund. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

4.5 Remoção de endotoxinas presentes na rMhSPase I purificada

A remoção das endotoxinas copurificadas com a rMhSPase I padronizada utilizando as colunas Detoxi-Gel Endotoxin Removal (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência da remoção de endotoxinas foi maior em amostras livres de detergentes. Como a rMhSPase I é purificada utilizando 0,5% de Triton-X 100 para as eluições, foi necessário fazer a substituição da solução de eluição por PBS 1X. Para isso, foi utilizado um filtro Amicon Ultra Ultracel 3K (Millipore), sendo que a substituição da solução contendo detergente de 1 mg de rMhSPase I purificada foi feita após cinco centrifugações (3000 x g, 15 min). As proteínas retidas no filtro foram ressuspensas em PBS 1X, eliminando o detergente.

Para a remoção das endotoxinas, foi utilizado 1 mg de rMhSPase I purificada livre de Triton-X 100. As proteínas foram retiradas da coluna com cinco eluições de 1mL de água apirogênica (LAL Reagent Water, Lonza). As eluições foram analisadas por SDS-PAGE 15%. A eficiência da remoção das endotoxinas foi avaliada pelo Limulus Amebocyte Lysate (LAL) PYROGENT Plus (Lonza), de acordo com o fabricante.

4.6 Avaliação da resposta imune celular induzida em camundongos pela imunização com a rMhSPase I

Os camundongos imunizados foram sacrificados 60 dias após a primeira imunização, sendo que seus baços foram coletados assepticamente. Os baços

foram macerados em meio RPMI 1640 contendo 1% de soro fetal bovino (SFB) e os eritrócitos foram lisados com uma solução de cloreto de amônio (0,15 M NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA). Após a lise dos eritrócitos, os esplenócitos foram sedimentados por centrifugação, sendo ressuspensos em meio RPMI 1640 com 10% de SFB e 50 µM de 2-mercaptoetanol. A viabilidade dos esplenócitos foi avaliada utilizando Trypan Blue 0,4%, sendo que as células viáveis foram contadas utilizando a câmara de Neubauer. A cultura dos esplenócitos foi feita em placas de 24 poços contendo 5 milhões de células por poço em 0,5 mL de meio. As culturas foram estimuladas com 10 µg/mL de rMhSPase I antes e após o tratamento para a remoção das endotoxinas, sendo que Concanavalina A (5µg/mL) e a ausência de estímulo foram utilizadas como controle. O sobrenadante da cultura de esplenócitos foi coletado após 72 h de cultivo (37°C e CO₂ 5%), sendo analisados através de ELISA de captura para detecção de interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interferon-γ (INF-γ). O ELISA foi realizado utilizando o kit OptEIA™(BD Biosciences) de acordo com o fabricante. Os níveis das citocinas foram determinados através de curvas-padrão, sendo expressas em picogramas por mililitro.

4.7 Curvas de crescimento para o ensaio de complementação *in vivo*

A bactéria *E. coli* IT89 foi utilizada para os ensaios de complementação *in vivo* (Inada *et al.*, 1989; Bockstael *et al.*, 2009b). Esta linhagem apresenta uma mutação no gene *LepB*, que codifica a SPase I de *E. coli*, que confere um fenótipo termossensível à bactéria. Assim, a 28°C as bactérias apresentam crescimento normal, mas param de crescer a 42°C (temperatura não-permissiva). Estas bactérias foram transformadas com o plasmídeo pEX50 (controle) e com a pEX50:*sipS* utilizando TSB (Parrish *et al.*, 2004). A eficiência da complementação foi avaliada através de curvas de crescimento de *E. coli* IT89 a 42°C. Para isso, as bactérias foram cultivadas em 5 mL de LB contendo 1 mM de IPTG durante 48 h, a 27°C, 200 rpm. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em 5 mL de LB na presença (pEX50:*sipS*) e na ausência (pEX50 e pEX50:*sipS*) de 1mM de IPTG (Invitrogen). A D.O. dos cultivos foi mensurada em intervalos de 6 h durante 72 h. A curva de crescimento foi realizada em duplicata.

4.8 Expressão da rMhSPase I em *E. coli* IT89 durante ensaio de complementação *in vivo*

A expressão da rMhSPase I no ensaio de complementação *in vivo* foi analisada por imunoblot. Ao longo da curva de crescimento, foram coletadas amostras da cultura de *E. coli* IT89 em intervalos de 6 h. As amostras foram centrifugadas e as células foram ressuspensas em PBS 1X. A concentração das proteínas foi normalizada previamente através de densitometria de bandas em SDS-PAGE corados com nitrato de prata, utilizando o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

O imunoblot foi feito utilizando membrana de nitrocelulose, sendo que a transferência foi realizada com o sistema Trans-Blot® SD Semi-DryTransfer Cell (Bio-Rad). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com BLOTTO 5%, durante 16 h. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-T 0,1% e incubada durante 2 h com o soro policlonal anti-rMhSPase I, produzido em camundongos, na diluição de 1:25.000. A membrana, então, foi incubada durante 1 h com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma), na diluição de 1:8000. Ao fim, a reação antígeno-anticorpo foi revelada com o kit ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare), de acordo com o fabricante. O resultado do imunoblot também foi analisado por densitometria de bandas a fim de comparar a expressão da rMhSPase I ao longo da curva de crescimento.

4.9 Análises estatísticas

A produção de anticorpos e a secreção de citocinas induzida pela rMhSPase I foram comparadas com os grupos-controle utilizando a análise da variância a um critério de classificação (*one-way ANOVA*). Os testes foram realizados no software PAST versão 2.09. Os resultados foram considerados significativos quando o valor P foi $\leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Expressão e purificação da rMhSPase I

A rMhSPase I foi recuperada após a clivagem com trombina como um polipeptídeo com 18 KDa. Este tamanho está de acordo com o previsto para a MhSPase I livre da fusão com GST, incluindo mais três aminoácidos (Ser-Gly-Pro), que codificam o sítio de clivagem da trombina, localizados na região amino-terminal. O rendimento obtido é de 5,0 mg por litro de cultivo de *E. coli* BL21 pLysE. Os resultados foram analisados por SDS-PAGE 12%, para verificação da solubilidade e da indução (Figura 5A), e 15% para purificação (Figura 5B). Ambos foram corados com azul de Coomassie. No total, foram obtidos 30 mg da proteína purificada, quantidade suficiente para realizar as imunizações em camundongos e posteriormente em suínos.

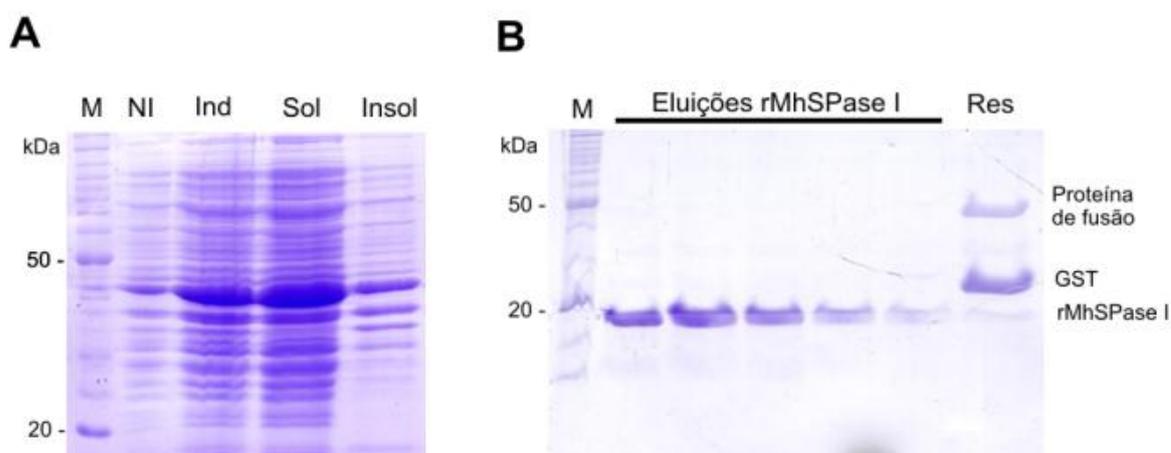


Figura 5: Expressão e purificação da rMhSPase I. **A)** SDS-PAGE 12 % da indução e solubilização da rMhSPase I fusionada com GST (44 KDa). **B)** SDS-PAGE 15% da purificação da rMhSPase I após a clivagem com trombina (18 KDa). Ainda permaneceram na resina a proteína de fusão, GST e rMhSPase I. **Legenda:** M – marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen); NI – não-induzido; Ind. – induzido; Sol. – fração solúvel; Insol. – insolúvel; R – resina Gluthatione-Sepharose 4B.

5.2 Análise da resposta imune induzida em camundongos imunizados com a rMhSPase I purificada

A resposta imune humoral induzida em camundongos pela imunização com a rMhSPase I foi analisada por ELISA. A Figura 6 mostra a produção de

IgG anti-rMhSPase I induzida ao longo das imunizações dos camundongos com a rMhSPase I. Uma alta produção de anticorpos foi detectada no soro dos camundongos imunizados com o antígeno a partir dos primeiros 15 dias. A produção de anticorpos anti-rMhSPase I foi considerada significativa, quando comparada com os demais grupos controle ($P < 0,05$). Estes resultados permitiram caracterizar a rMhSPase I como uma proteína efetivamente imunogênica para camundongos.

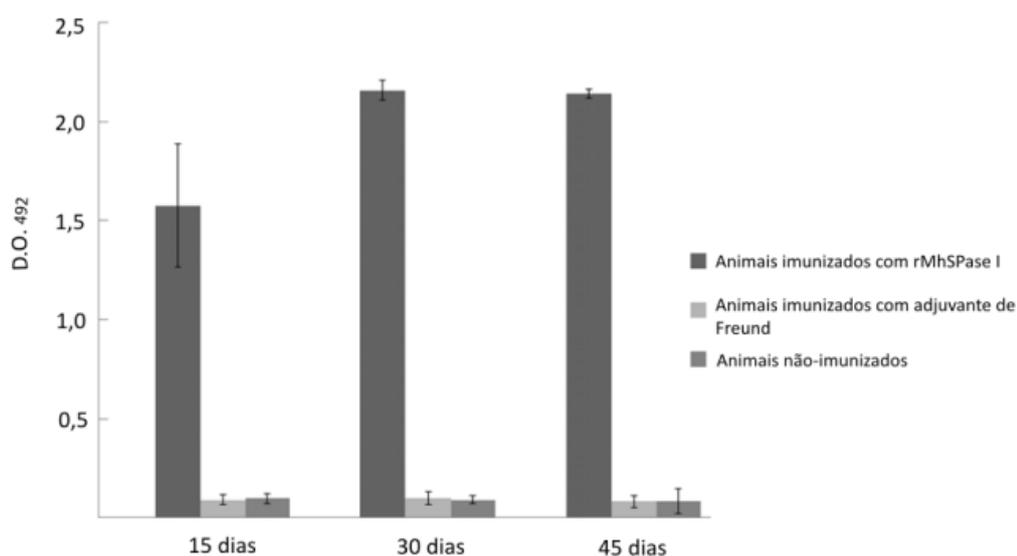


Figura 6: Detecção de IgG anti-rMhSPase I no soro de camundongos imunizados por ELISA. Os soros dos animais imunizados com a rMhSPase I apresentaram valores de D.O.₄₉₂ significativos quando comparados aos grupos-controle ($P < 0,05$), demonstrando a alta produção de IgG anti-rMhSPase I. As barras indicam a média dos valores de D.O.₄₉₂ obtidas nos três grupos de camundongos.

A resposta imune celular induzida pela rMhSPase I foi avaliada mediante ao perfil de citocinas produzidas pelos esplenócitos em cultivo dos camundongos imunizados. As células foram estimuladas com a rMhSPase I antes e após o tratamento para a remoção das endotoxinas. A eficiência da remoção das endotoxinas foi avaliada, sendo que mesmo após o tratamento ainda restaram 4 EU/mL (EU = unidades de endotoxina). Esta quantidade está dentro dos limites toleráveis para produtos administrados parenteralmente (5 EU/kg), segundo a FDA (Food and Drug Administration), nos Estados Unidos.

A presença das citocinas INF- γ , IL-4, IL-10 foi detectada nos cultivos de esplenócitos estimulados com a rMhSPase I antes e após o tratamento para a

remoção das endotoxinas. (Tabela 2). Pode-se observar a produção de INF- γ e IL-4 em níveis similares e não-significativos, enquanto altos níveis de IL-10 foram detectados quando comparados com o grupo imunizado apenas com adjuvante de Freund ($P < 0,05$). Estes resultados sugerem que a rMhSPase I induz uma resposta imune do tipo Th2.

Tabela 2: Produção de citocinas nos sobrenadantes de esplenócitos estimulados com a rMhSPase I. Grupos: **(1)** esplenócitos de camundongos imunizados com adjuvante de Freund e estimulados com rMhSPase I antes da remoção de endotoxinas; **(2)** esplenócitos de camundongos imunizados com adjuvante de Freund e estimulados com rMhSPase I após da remoção de endotoxinas; **(3)** esplenócitos de camundongos imunizados com rMhSPase I e estimulados com rMhSPase I antes da remoção de endotoxinas; **(4)** esplenócitos de camundongos imunizados com rMhSPase I e estimulados com rMhSPase I após da remoção de endotoxinas.

Grupos	Média \pm DP ($n = 6$)		
	INF- γ	IL-4	IL-10
1	444,3 \pm 220,3	453,4 \pm 320,1	8433,3 \pm 5847,71
2	458,16 \pm 444,9	313,7 \pm 148,1	4720 \pm 2973,13
3	1667 \pm 1035	830 \pm 376	21875 \pm 16224,5
4	579 \pm 652	562,6 \pm 406	10625 \pm 5925,1

A concentração de citocinas detectadas está representada em pg/mL.

5.3 Análise funcional da MhSPase I

A atividade funcional da rMhSPase I foi analisada através de ensaios de complementação *in vivo* em *E. coli* IT89 (Inada *et al.*, 1989). A fim de demonstrar a sobrevivência das bactérias através da atividade da rMhSPase I, células de *E. coli* IT89 foram transformadas com os vetores pEX50:*sipS* e com pEX50 (controle) e então submetidas a 42°C (temperatura não-permissiva) durante 72 h. A curva de crescimento obtida está representada na Figura 7A. Pode-se observar a morte das células apenas com o vetor pEX50 durante as primeiras 24 h, enquanto as células que expressam a rMhSPase I sobreviveram ao longo das 72 h.

A expressão da rMhSPase I foi demonstrada através de imunoblot (Figura 7B). A rMhSPase I foi detectada como uma proteína de 18 KDa nos extratos proteicos obtidos das culturas com pEX50:*sipS* induzidas com IPTG e

não-induzidas, não sendo detectada nas culturas com pEX50 (controle negativo). Neste ensaio, pode-se notar que a expressão da rMhSPase I foi maior na presença de 1mM de IPTG. Este resultado refletiu na curva de crescimento, uma vez que as culturas contendo IPTG apresentaram maior crescimento do que na ausência deste indutor.

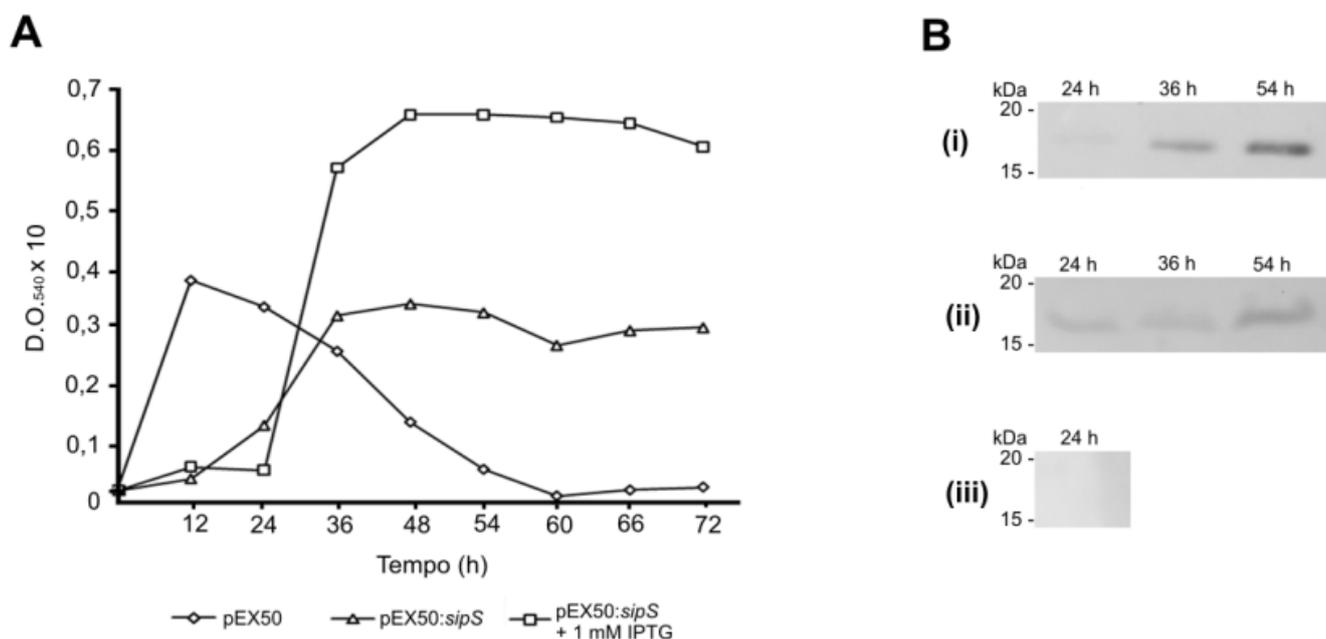


Figura 7: Análise da atividade funcional da rMhSPase I através de ensaio de complementação *in vivo*. (A) Curva de crescimento de *E. coli* IT89 em temperatura não-permissiva (42°C). O crescimento bacteriano foi monitorado na ausência e na presença de IPTG, durante 72 h. Todos os pontos são a média de duplicatas. (B) Expressão da rMhSPase I durante o ensaio de complementação *in vivo*. Amostras da cultura de *E. coli* IT89 foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (24 h, 36 h, 54 h) para extração de proteínas totais. Os extratos proteicos foram normalizados e fracionados em SDS-PAGE 15%, sendo analisados por imunoblot com soro anti-rMhSPase I produzido em camundongos. (i) Expressão da rMhSPase I nas culturas induzidas com 1 mM de IPTG, a 42 °C. (ii) Expressão da rMhSPase I na ausência de IPTG, a 42°C. (iii) Controle negativo, cultura de *E. coli* IT89 transformada o vetor pEX50.

A partir das análises de densitometria de bandas nos imunoblots, foi possível inferir que a rMhSPase I foi expressa 17 vezes mais após 54 h de cultivo contendo 1 mM de IPTG em relação às primeiras 24 h, e 4 vezes mais na ausência de IPTG (Figura 8). Estes resultados podem estar relacionados com o maior crescimento evidenciado nas culturas contendo IPTG, uma vez que a produção da rMhSPase I foi maior. Neste contexto, é possível afirmar

que a rMhSPase I suporta a temperatura não-permissiva e é capaz de processar as proteínas de *E. coli* necessárias para a viabilidade celular.

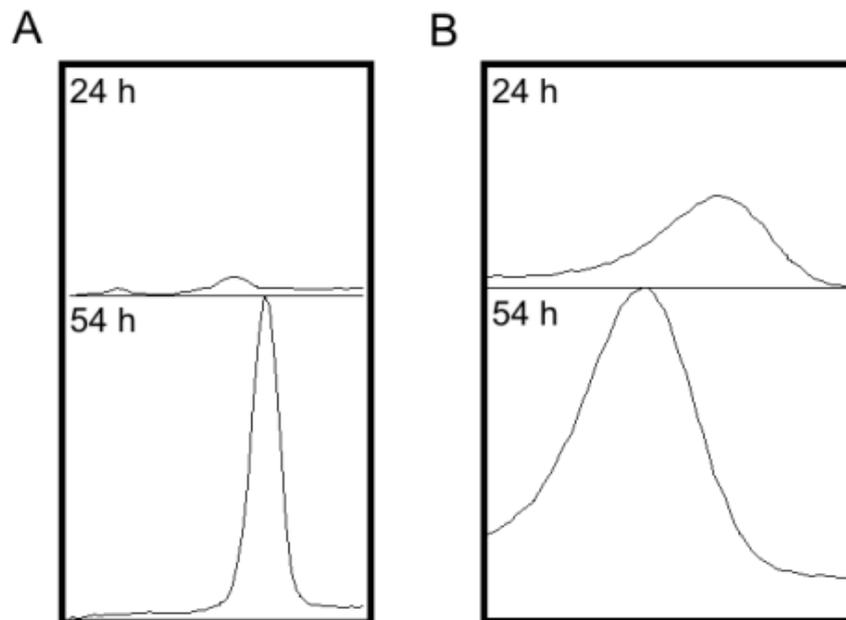


Figura 8: Gráficos obtidos no software ImageJ para a análise dos imunoblots de detecção da expressão rMhSPase I em *E. coli* IT89. (A) Picos correspondentes as bandas de rMhSPase I de 24 h e 54 h de cultivo contendo 1 mM de IPTG, indicando que a expressão da proteína aumentou 17,01 vezes. (B) Picos correspondentes as bandas de rMhSPase I de 24 h e 54 h de cultivo na ausência de IPTG, indicando que a expressão da proteína aumentou 4,2 vezes.

6. Discussão

A SPase I tem sido bem caracterizada em vários organismos (Paetzelet *al.*, 2000), incluindo procariotos (van Roosmalenet *al.*, 2004) e eucariotos (Rafatiet *al.*, 2006). A MhSPase I foi previamente estudada (Moitinho-Silva *et al.*, 2012), sendo que a sua expressão e antigenicidade foram caracterizadas. Os resultados obtidos por Moitinho-Silva *et al.* (2012) sugerem que a MhSPase I apresenta potencial para o uso em formulações vacinais contra a PES e para imunodiagnóstico.

A identificação e a caracterização de proteínas imunogênicas de *M. hyopneumoniae* é um passo importante para o desenvolvimento formulações vacinais recombinantes contra a PES (Simionattoet *al.*, 2012). Diversos estudos têm avaliado a imunogenicidade e o potencial vacinal de proteínas de *M. hyopneumoniae* (Chen *et al.*, 2008; Marchioroet *al.*, 2012; Simionattoet *al.*, 2012). Devido aos elevados custos e as dificuldades de manejo de suínos, as proteínas devem ser caracterizadas imunologicamente previamente em outros modelos animais, como camundongos. Neste contexto, a rMhSPase I foi caracterizada como uma proteína altamente imunogênica para camundongos, uma vez que há grande produção de IgG anti-rMhSPase I induzida por imunizações experimentais com a proteína purificada. A indução de uma forte resposta imune humoral pela rMhSPase I é um fator relevante para a avaliação do seu potencial vacinal.

Além disso, a análise da resposta imune celular induzida pela rMhSPase I em camundongos é importante para a sua caracterização imunológica preliminar. Entretanto, a rMhSPase I foi copurificada com LPS oriundos da parede celular de *E. coli* devido à sua hidrofobicidade. Os LPS são responsáveis pela organização e estabilidade da parede celular de bactérias Gram-negativas, como *E. coli* (Magalhães *et al.*, 2007). Os LPS também são conhecidos como endotoxinas, sendo que seu mecanismo de ação consiste na ativação da resposta imune celular (Rietschelet *al.*, 1994). Deste modo, a remoção das endotoxinas copurificadas com a rMhSPase I foi necessária para que os ensaios de avaliação da resposta imune celular induzida pudessem ser realizados. O tratamento para remoção de endotoxinas da rMhSPase I foi considerado eficiente, uma vez que as concentrações de citocinas produzidas

nos esplenócitos estimulados com a rMhSPase I antes e após o tratamento para a remoção das endotoxinas apresentou diferenças (Tabela 2). Como observado, ocorre uma redução na concentração de citocinas secretadas pelos esplenócitos estimulados com a rMhSPase I livre de endotoxinas. Este resultado sugere que parte da resposta desenvolvida pelo antígeno antes do tratamento é decorrente da contaminação por LPS. Deste modo, a resposta imune celular desenvolvida pela rMhSPase I pôde ser analisada livre de endotoxinas.

A análise da resposta imune celular induzida *in vitro* pela rMhSPase I em esplenócitos de camundongos mostrou que a proteína recombinante é capaz de induzir uma forte resposta do tipo Th2. Entretanto, diferentes antígenos de *M. hyopneumoniae* têm sido caracterizados como indutores de resposta do tipo Th1 (Chen *et al.*, 2008; Virginio *et al.*, dados não publicados). Contudo, vacinas constituídas por proteínas são conhecidas por induzir predominantemente respostas do tipo Th2, com pouca ou nenhuma resposta do tipo Th1 (Chen *et al.*, 2008). Neste contexto, este resultado pode estar relacionado com a alta produção de anticorpos induzida nas imunizações com a proteína purificada, uma vez que respostas do tipo Th2 induzem a ativação de linfócitos B. Além disso, os altos níveis de IL-10 secretados podem ser correlacionados com a produção de INF- γ em níveis relativamente menores, devido à redução da resposta do tipo Th1 desencadeada pela IL-10.

A avaliação preliminar das respostas imunes humoral e celular induzidas pela rMhSPase I em camundongos demonstram que esta proteína apresenta potencial para o desenvolvimento de vacinas contra a PES. Diversos estudos têm avaliado a utilização da SPase I como alvo de antibióticos (Bockstaele *et al.*, 2009a; Bockstaele *et al.*, 2009b; Smitha Rao *et al.*, 2011) e também para formulações vacinais (Rafati *et al.*, 2006), uma vez que esta proteína é essencial, substancialmente diferente das SPases eucarióticas e seu sítio catalítico está localizado na superfície celular. Predições de topologia da MhSPase I demonstram que mais de 70% da proteína está exposta na superfície celular, incluindo seu sítio catalítico, estando acessível a drogas e a anticorpos (Moitinho-Silva *et al.*, 2012). Neste contexto, análises da atividade funcional da rMhSPase I são importantes para avaliar a relevância desta

proteína para a viabilidade da bactéria, caracterizando-a como essencial para *M. hyopneumoniae* reforçando o seu potencial como um antígeno vacinal.

A atividade funcional da MhSPase I foi analisada através de ensaios de complementação *in vivo* utilizando uma linhagem mutante de *E. coli*. Neste ensaio, foi possível avaliar a importância da MhSPase I para a viabilidade celular, uma vez que na ausência da atividade da MhSPase I (em temperatura não-permissiva), não há crescimento bacteriano. O papel da rMhSPase I para a viabilidade da bactéria pode ser corroborada pela expressão da rMhSPase I durante o ensaio de complementação *in vivo*. Estes resultados podem ser observados no aumento da expressão da rMhSPase I ao longo do crescimento bacteriano, enquanto as bactérias que não expressaram a rMhSPase I não apresentaram crescimento. Entretanto, a complementação com a rMhSPase I foi considerada limitada, uma vez que a taxa de crescimento foi lenta comparado a outros ensaios realizados em *Staphylococcus aureus* (Cregget *al.*, 1996), *Legionellapneumophila* (Lammertynet *al.*, 2004) e *Staphylococcusepidermidis* (Bockstaelet *al.*, 2009b). Esta diferença na complementação pode ser explicada pela baixa similaridade (27%) entre a MhSPase I e a SPase I de *E. coli*, enquanto as outras bactérias citadas possuem cerca de 40%. Além disso, a distinção entre a superfície das bactérias pode ser relevante para o resultado obtido, uma vez que *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa enquanto *M. hyopneumoniae* não apresenta parede celular.

Em conclusão, a forma recombinante da MhSPase I é altamente imunogênica para camundongos e desenvolve uma resposta imune celular principalmente do tipo Th2, que reforça a produção de anticorpos anti-rMhSPase I. Além disso, a MhSPase I é uma proteína essencial para a viabilidade celular, uma vez que a ausência da atividade da SPase I é letal. Tais resultados ressaltam o potencial vacinal deste antígeno, que é capaz de induzir resposta imune humoral e celular e é fundamental para a sobrevivência da bactéria. Neste contexto, formulações vacinais contendo a rMhSPase I podem ser eficientes devido a alta produção de anticorpos anti-MhSPase I. Entretanto, a caracterização imunológica da rMhSPase I em suínos é necessária para avaliar seu potencial protetor contra a PES.

Futuramente, novos ensaios de imunização de camundongos serão realizados para caracterizar o potencial da rMhSPase I em construções de DNA que atuarão como vacinas de DNA. Estas construções serão desenvolvidas utilizando um vetor de expressão em eucariotos, que possibilitará a expressão da rMhSPase I nos animais vacinados. A proteína recombinante e a construção de DNA serão utilizadas em ensaios de imunização em suínos, a fim de analisar a resposta imune desenvolvida e o seu potencial protetor contra a PES. Para isso, também será necessário analisar novos adjuvantes que possam potencializar a resposta imune desenvolvida pela proteína recombinante. A atividade funcional da rMhSPase I também será avaliada através de ensaios de clivagem utilizando possíveis proteínas-alvo de exportação. Desta maneira, será demonstrada a atividade proteolítica desta enzima, além de determinar proteínas-alvo a serem exportadas, que podem atuar na relação patógeno-hospedeiro.

7. Referências bibliográficas

- ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, 2011. Visualizado em 3 de outubro de 2012. Disponível em: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatoriosassociados/ABIPECS_relatorio_2011_pt.pdf
- Ahmed, S.B.; Touihri, L.; Chtourou, Y.; Dellagi, K. & Bahloul, C., 2009. DNA based vaccination with cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania (Leishmania) major* antigens confers full protection in BALB/c mice. *Vaccine*, 27: 99-106.
- Auclair, S.M., Bhanu, M.K., Kendall, D.A., 2012. Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* 21, 13-25.
- Barré, A., de Daruvar, A., Blanchard, A., 2004. MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic Acids Res* 32, D307-310.
- Blanchard, B., Vena, M.M., Cavalier, A., Le Lannic, J., Gouranton, J., Kobisch, M., 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 30, 329-341.
- Bockstael, K., Geukens, N., Rao, C.V., Herdewijn, P., Anné, J., Van Aerschot, A., 2009a. An easy and fast method for the evaluation of *Staphylococcus epidermidis* type I signal peptidase inhibitors. *J Microbiol Methods* 78, 231-237.
- Bockstael, K., Geukens, N., Van Mellaert, L., Herdewijn, P., Anné, J., Van Aerschot, A., 2009b. Evaluation of the type I signal peptidase as antibacterial target for biofilm-associated infections of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 155, 3719-3729.
- Carr, J., 2006. The maintenance of health In: Kyriazakis, I.; Whittemore, T.C. *Whittemore's Science and Practice of Pig Production*. Oxford: Blackwell Publishing. 3. ed., pp 263-269.
- Chen, Y.L., Wang, S.N., Yang, W.J., Chen, Y.J., Lin, H.H., Shiuan, D., 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun* 71, 1155-1160.
- Chen, A.Y., Fry, S.R., Daggard, G.E., Mukkur, T.K., 2008. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine* 26, 4372-4378.
- Cregg, K.M., Wilding, I., Black, M.T., 1996. Molecular cloning and expression of the *spsB* gene encoding an essential type I signal peptidase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 178, 5712-5718.

- De Bona, P., Deshmukh, L., Gorbatyuk, V., Vinogradova, O., Kendall, D.A., 2012. Structural studies of a signal peptide in complex with signal peptidase I cytoplasmic domain: the stabilizing effect of membrane-mimetics on the acquired fold. *Proteins* 80, 807-817.
- Driessen, A.J., Nouwen, N., 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77, 643-667.
- Fadiel, A., Eichenbaum, K.D., El Semary, N., Epperson, B., 2007. Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution. *Front Biosci* 12, 2020-2028.
- Fagan, P.K., Walker, M.J., Chin, J., Eamens, G.J., Djordjevic, S.P., 2001. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for aNrdF specific secretory IgA response in the lungs. *MicrobPathog* 30, 101-110.
- Feld, N.C., Qvist, P., Ahrens, P., Friis, N.F., Meyling, A., 1992. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 30, 35-46.
- Ferreira, H.B. and Castro, L.A., 2007. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. *Genetics and Molecular Biology* 30, 245-255.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, R.D., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison, C.A., Venter, J.C., 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 397-403.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Visualizado em 3 de outubro de 2012. Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab15.pdf
- Inada, T., Court, D.L., Ito, K., Nakamura, Y., 1989. Conditionally lethal amber mutations in the leader peptidase gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171, 585-587.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M., Hirakawa, M., 2010. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 38, D355-360.
- Kavanaugh, J.S., Thoendel, M., Horswill, A.R., 2007. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol Microbiol* 65, 780-798.

- Lammertyn, E., Van Mellaert, L., Meyen, E., Lebeau, I., De Buck, E., Anné, J., Geukens, N., 2004. Molecular and functional characterization of type I signal peptidase from *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 150, 1475-1483.
- Liu, W., Feng, Z., Fang, L., Zhou, Z., Li, Q., Li, S., Luo, R., Wang, L., Chen, H., Shao, G., Xiao, S., 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J Bacteriol* 193, 1016-1017.
- Machado, C.X., Pinto, P.M., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2009. A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H₂O₂ detoxification. *Microbiology* 155, 3411-3419.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* 126, 297-309.
- Magalhães, P.O., Lopes, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C., Penna, T.C., Pessoa, A., 2007. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm PharmSci* 10, 388-404.
- Marchioro, S.B., Simionatto, S., Galli, V., Conceição, F.R., Brum, C.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Dellagostin, O.A., 2012. Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *VetMicrobiol* 155, 44-52.
- Mercado-Pimentel, M.E., Jordan, N.C., Aisemberg, G.O., 2002. Affinity purification of GST fusion proteins for immunohistochemical studies of gene expression. *Protein ExprPurif* 26, 260-265.
- Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D., 2006. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 24, 7081-7086.
- Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., Mahairas, G.G., 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* 186, 7123-7133.
- 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.
- Nicolet, J., Paroz, P., Bruggmann, S., 1980. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci* 29, 305-309.
- Ogawa, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Sano, A., Hikono, H., Shibahara, T., Yagi, Y., Shimoji, Y., 2009. Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine* 27, 4543-4550.

- Okamba, F.R., Arella, M., Music, N., Jia, J.J., Gottschalk, M., Gagnon, C.A., 2010. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine* 28, 4802-4809.
- Paetzel, M., Dalbey, R.E., Strynadka, N.C., 2000. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. *Pharmacol Ther* 87, 27-49.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C., Dalbey, R.E., 2002. Signal peptidases. *Chem Rev* 102, 4549-4580.
- Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J., Liu, G., Finley, R.L., 2004. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 3, 582-586.
- Pinto, P.M., Chemale, G., de Castro, L.A., Costa, A.P., Kich, J.D., Vainstein, M.H., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2007. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet Microbiol* 121, 83-93.
- Rafati, S., Ghaemimanesh, F., Zahedifard, F., 2006. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania major* infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine* 24, 3290-3297.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* 244, 19-61.
- Razin, S. 1992. *Mycoplasma* taxonomy and ecology, p. 3-22. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8, 217-225.
- Ross, D., 1999. Mycoplasmal diseases. In: Straw, B.; D'Allaire, S.; Mengel, W. & Taylor, D. (Eds.), *Diseases of Swine*. Ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 495-510.
- Rusch, S.L., Kendall, D.A., 2007. Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry* 46, 9665-9673.
- Shimoji, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Nosaka, H., Mori, Y., 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.

- Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Blanchard, P., Badiella, L., Le Dimna, M., Jestin, A., Domingo, M., 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 65, 88-92.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J* 181, 221-231.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Galli, V., Hartwig, D.D., Carlessi, R.M., Munari, F.M., Laurino, J.P., Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., 2010. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 69, 132-136.
- Smith, P.A., Romesberg, F.E., 2012. Mechanism of action of the arylomycin antibiotics and effects of signal peptidase I inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 5054-5060.
- SmithaRao, C.V., Anné, J., 2011. Bacterial type I signal peptidases as antibiotic targets. *Future Microbiol* 6, 1279-1296.
- Sobestiansky, J. Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias dos suínos: prevalência e impacto econômico em sistemas de produção dos estados de SC, RS e PR. Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPISA, 2001. p.6. (Comunicado Técnico 287).
- Thacker, E.L., 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim Health Res Rev* 5, 317-320.
- Thacker, E.L., 2006. Mycoplasmal diseases. In: Straw, B.; Zimmerman, J.; Dallaire, S. & Taylor, D. (Eds.), *Diseases of Swine*. Ed. Blackwell Publishing, pp. 701–717.
- vanRoosmalen, M.L., Geukens, N., Jongbloed, J.D., Tjalsma, H., Dubois, J.Y., Bron, S., van Dijk, J.M., Anné, J., 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694, 279-297.
- Vasconcelos, A.T., Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G., Almeida, R., Alves-Filho, L., Assunção, E.N., Azevedo, V.A., Bogo, M.R., Brigido, M.M., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Camargo, S.S., Carepo, M.S., Carraro, D.M., de Mattos Cascardo, J.C., Castro, L.A., Cavalcanti, G., Chemale, G., Collevatti, R.G., Cunha, C.W., Dallagiovanna, B., Dambrós, B.P., Dellagostin, O.A., Falcão, C., Fantinatti-Garboggini, F., Felipe, M.S., Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas, N.S., Frías, D., Grangeiro, T.B., Grisard, E.C., Guimarães, C.T., Hungria, M., Jardim, S.N., Krieger, M.A., Laurino, J.P., Lima, L.F., Lopes, M.I., Loreto, E.L., Madeira, H.M., Manfio, G.P., Maranhão, A.Q., Martinkovics, C.T., Medeiros, S.R., Moreira, M.A., Neiva, M., Ramalho-Neto, C.E., Nicolás, M.F., Oliveira, S.C., Paixão, R.F., Pedrosa, F.O., Pena, S.D., Pereira, M., Pereira-

Ferrari, L., Piffer, I., Pinto, L.S., Potrich, D.P., Salim, A.C., Santos, F.R., Schmitt, R., Schneider, M.P., Schrank, A., Schrank, I.S., Schuck, A.F., Seuanez, H.N., Silva, D.W., Silva, R., Silva, S.C., Soares, C.M., Souza, K.R., Souza, R.C., Staats, C.C., Steffens, M.B., Teixeira, S.M., Urmenyi, T.P., Vainstein, M.H., Zuccherato, L.W., Simpson, A.J., Zaha, A., 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol* 187, 5568-5577.

vonHeijne, G., 1990. Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol* 2, 604-608.

Yus, E., Maier, T., Michalodimitrakis, K., van Noort, V., Yamada, T., Chen, W.H., Wodke, J.A., Güell, M., Martínez, S., Bourgeois, R., Kühner, S., Raineri, E., Letunic, I., Kalinina, O.V., Rode, M., Herrmann, R., Gutiérrez-Gallego, R., Russell, R.B., Gavin, A.C., Bork, P., Serrano, L., 2009. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science* 326, 1263-1268.

Zielinski, G.C., Ross, R.F., 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am J Vet Res* 54, 1262-1269.