

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

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

Jéssica Andrade Paes

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

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, março de 2015.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICO

Aos meus pais, pelo apoio, carinho e compreensão durante toda minha vida.

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 e meu mestrado 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.

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.

Ao meu esposo, Wesley, por tornar meus dias mais coloridos e nunca me deixar desanimar.

À Dra. Veridiana Virginio, pela amizade e apoio além dos vínculos profissionais.

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

À professora Cristina Bonorino e ao doutorando Thiago J. Borges pela parceria e auxílio fundamental na realização dos ensaios imunológicos.

À Rafaela Bonotto, que me ajudou muito e sempre foi uma ótima parceira de “gordices”.

Ao professor Diego Bonatto e a professora Irene Schrank por fazerem parte da minha comissão de acompanhamento.

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

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

À Fernanda e ao Marcelo, por serem grandes amigos e companheiros, sempre nos ajudando e tornando nossos dias mais amenos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS	06
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	08
LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO	09
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e a pneumonia enzoótica suína	12
1.2 Fatores de virulência em <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	13
1.3 Sistemas de secreção de proteínas em bactérias e a sinal-peptidase I	14
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. RESULTADOS	19
3.1 CAPÍTULO 1 - Manuscrito “Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> type I signal peptidase”	20
3.2 CAPÍTULO 2 – Estudos funcionais da MhSPase I	42
3.2.1. Materiais e métodos	43
3.2.2. Resultados	46
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7. ANEXOS	59
Anexo I – Tabela suplementar	59
Anexo II – <i>Curriculum vitae</i> resumido	60

LISTA DE ABREVIATURAS

aa - aminoácido(s)

ANOVA - análise da variância

Asp - ácido aspártico

BN-PAGE - do inglês *blue native polyacrylamide gel electrophoresis*

C - citosina

CDRS - complexo de doenças respiratórias de suínos

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

CO₂ - dióxido de carbono

C-terminal - carboxiterminal

DAI - dias após a primeira imunização

DNA - ácido desoxirribonucleico

EcSPase I – sinal-peptidase I de *Escherichia coli*

ELISA - ensaio de imunoadsorção ligado à enzima, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*

EPM - enriquecido com proteínas de membrana (extrato proteico)

G - guanina

GST - glutationa-S-transferase

His - histidina

IFN- γ - interferon gama

IgG - Imunoglobulina G

IL-10 - interleucina-10

IL-4 - interleucina-4

IPTG - Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo, do inglês *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*,

kb – quilobase(s)

kDa – quilodalton(s)

LB - meio de cultura Luria-Bertani

LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*

LPS – lipopolissacarídeo(s)

Lys - lisina

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

nMHP620 - porção N-terminal da proteína hipotética MHP7448_0620 (aminoácidos 1-164) recombinante

nP146 - porção N-terminal da P146 (aminoácidos 1-210) recombinante

nPCR - *nested*-PCR

N-terminal – amino-terminal

OD - densidade óptica

OVA - ovoalbumina

PBS - tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffer saline*

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

PCV2 - Circovírus suíno do tipo 2, do inglês *Porcine Circovirus Type 2*

PES/PEP - pneumonia enzoótica suína ou *porcine enzootic pneumonia*

PM - proteínas de membrana (extrato proteico)

PRRSV - vírus da síndrome reprodutiva e respiratória de suínos, do inglês *porcine reproductive and respiratory syndrome vírus*

rDNA - DNA ribossômico

rMhSPase I - MhSPase I recombinante

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), do inglês *sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis*

Ser - serina

SPase I e II – sinal-peptidases I e II

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático de um peptídeo-sinal típico de uma preproteína.	15
Figura 2: Representação esquemática da via de secreção Sec-dependente de <i>Escherichia coli</i> .	16
Figura 3: Comparação entre o perfil de proteínas de extratos de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 analisados por SDS-PAGE 12%.	46
Figura 4: Expressão e solubilização dos substratos recombinantes analisadas por SDS-PAGE 12%.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem das CDS dos substratos da rMhSPase I	45
Tabela 2: Proteínas identificadas por LC-MS/MS em três diferentes extratos proteicos de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448.	47
Tabela S1: Análise do repertório de proteínas encontrado nos três diferentes extratos proteicos de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448.	59

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

Figure 1. Functional activity analysis of rMhSPase I through <i>in vivo</i> complementation assay.	31
Figure 2: MhSPase I and EcSPase I alignment.	32
Figure 3. Assessment of innate cellular immune response induced by rMhSPase I in mice.	33
Figure 4. IL-10 secretion induced by rMhSPase I in splenocytes cultures.	34
Figure 5. T cytotoxic lymphocytes population are reduced by rMhSPase I stimulation.	35

RESUMO

A bactéria *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. Este estudo tem como objetivo a caracterização funcional e imunológica da SPase I de *M. hyopneumoniae* (MhSPase I), a fim de demonstrar sua funcionalidade *in vivo* e *in vitro*, sua associação à complexos proteicos de membrana e também seu papel na indução de uma resposta imune. A atividade funcional da MhSPase I recombinante (rMhSPase I) *in vivo* foi demonstrada através de ensaios de complementação em uma linhagem de *Escherichia coli* SPase I mutante condicional (*E. coli* IT89). A rMhSPase foi capaz de complementar parcialmente a atividade da SPase I da linhagem mutante de *E. coli*, permitindo a sobrevivência bacteriana em condições não permissivas. Entre as proteínas preditas *in silico* como secretadas por *M. hyopneumoniae*, dois possíveis substratos da MhSPase I foram selecionados e expressos em *E. coli*, a fim de realizar ensaios de clivagem de peptídeo-sinal *in vitro*. A associação da MhSPase I à complexos proteicos de membrana foi analisada através de ensaios de interação entre a proteína recombinante purificada e extratos proteicos de *M. hyopneumoniae* enriquecidos com proteínas de membrana. As respostas imune inata e adaptativa induzidas pela rMhSPase em camundongos também foram avaliadas, sendo ambas caracterizadas como anti-inflamatórias. Estes resultados sugerem um potencial imunomodulador da MhSPase I, o qual pode ser importante para a proteção de *M. hyopneumoniae* durante o processo inflamatório induzido pela PES no trato respiratório suíno.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, MhSPase I, atividade funcional *in vivo*, resposta imune anti-inflamatória, potencial imunomodulador.

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 study is the functional and immunological characterization of the *M. hyopneumoniae* SPase I (MhSPase I), in order to demonstrate its *in vivo* and *in vitro* functionality, its participation into membrane protein complexes and also its role in immune responses induction. The *in vivo* functional activity of recombinant MhSPase I (rMhSPase I) was demonstrated through complementation assays with an *Escherichia coli* conditional SPase I mutant (*E. coli* IT89). The rMhSPase I was able to partially complement SPase I activity of *E. coli* IT89 in non-permissive conditions, allowing the bacterial to survive. Among the proteins *in silico* predict as secreted by *M. hyopneumoniae*, two possible substrates of MhSPase I were selected and expressed in *E. coli*, in order to perform the *in vitro* signal peptide cleavage assays. The association of MhSPase I with membrane protein complexes was analyzed through interaction assays between the rMhSPase I and protein extracts of *M. hyopneumoniae* enriched with membrane proteins. The innate and adaptive immune responses induced in mice by rMhSPase I were also assessed, being both characterized as anti-inflammatories. These results suggest an immunomodulatory potential of MhSPase I, which may protect *M. hyopneumoniae* from host inflammatory process induced by PEP.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, MhSPase I, *in vivo* functional activity, anti-inflammatory immune response, immunomodulatory potential.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Mycoplasma hyopneumoniae* e a pneumonia enzoótica suína

Micoplasmas são organismos pertencentes à classe Mollicutes, um grupo de bactérias que evoluíram a partir de um ancestral comum Gram-positivo com baixo conteúdo de GC (Citti & Blanchard, 2013). Contudo, esta evolução foi marcada por uma drástica redução de genoma, resultando na ausência de parede celular e em um número limitado de vias metabólicas (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007). A família Mycoplasmataceae inclui alguns dos menores organismos de vida livre, sendo que os micoplasmas foram as primeiras bactérias a terem seu o genoma completamente sequenciado, como *Mycoplasma genitalium* que contém 580 kb (Fraser *et al.*, 1995).

Mycoplasma hyopneumoniae é um patógeno hospedeiro-específico que infecta somente suínos, causando a pneumonia enzoótica suína (PES). Infecções por *M. hyopneumoniae* são altamente prevalentes em quase todas as áreas de produção de suínos, causando grandes prejuízos econômicos mundialmente (Thacker & Minion, 2010). A bactéria coloniza o trato respiratório suíno, sendo primariamente encontrado na superfície mucosa da traqueia, brônquios e bronquíolos. A aderência ao epitélio respiratório suíno e a estimulação de uma reação inflamatória prolongada causam danos às células epiteliais ciliadas e predispõe o animal a novas infecções, que aumentam a severidade da doença (Simionatto *et al.*, 2013). Além disso, coinfeções envolvendo patógenos respiratórios bacterianos ou virais, como *Pasteurella multocida*, PRRSV e PCV2, constituem o complexo de doenças respiratórias de suínos (CDRS).

O controle e a prevenção da PES são criticamente dependentes da disponibilidade de métodos de diagnóstico (Sibila *et al.*, 2009). O isolamento de *M. hyopneumoniae* de pulmões afetados para culturas bacteriológicas é considerado o método diagnóstico “padrão-ouro”, sendo mais sensível em estágios tardios da PES quando comparado com outros métodos (Sørensen *et al.*, 1997). Entretanto, a cultura de *M. hyopneumoniae* é fastidiosa (4-8 semanas para o isolamento da bactéria a partir de amostras de campo) e é frequentemente contaminada com *Mycoplasma flocculare* e *Mycoplasma hyorhinis*. Deste modo, o sorodiagnóstico e os métodos moleculares, como os baseados em PCR, são as ferramentas mais utilizadas para diagnosticar a presença/ausência de *M. hyopneumoniae* em suínos. A *nested*-PCR (nPCR) baseada em regiões espécie-específica do rDNA 16S de

M. hyopneumoniae é empregada para o diagnóstico da PES (Calsamiglia *et al.*, 1999), embora não seja aplicada comumente no Brasil. 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). Os métodos baseados em ELISA são frequentemente utilizados para o sorodiagnóstico da PES, sendo que os mais comuns são o ELISA de bloqueio monoclonal, que é realizado a partir de um anticorpo monoclonal que reage especificamente contra um epítopo de *M. hyopneumoniae* (Feld *et al.*, 1992), o ELISA-Tween 20 (ELISA-T), o qual é baseado em antígenos de *M. hyopneumoniae* purificados com o detergente Tween-20 (Nicolet *et al.*, 1980) e o HerdChek® (IDEXX, USA), que é disponível comercialmente.

A partir da confirmação do diagnóstico, o melhoramento das práticas de manejo dos animais é a primeira medida a ser tomada para controle da infecção por *M. hyopneumoniae*. Além disso, a PES pode ser controlada a partir da combinação de vários fatores, incluindo medidas de biossegurança e de armazenamento de animais, uso de antimicrobianos e vacinação. Tetraciclinas e macrolídeos são antimicrobianos usados frequentemente no tratamento de doenças de trato respiratório, incluindo a PES (Maes *et al.*, 2008). Suínos tratados com antimicrobianos efetivos tiveram menos sinais clínicos e lesões pulmonares, além de um número menor de infecções secundárias, contudo apenas proteção parcial é alcançada (Ciprián *et al.*, 2012). Neste contexto, a vacinação juntamente com boas práticas de manejo e higienização é a via mais eficiente para o combate à PES (Maes *et al.*, 2008). As vacinas comerciais são compostas por células bacterianas inativadas, as bacterinas, que possuem custo de produção elevado e conferem apenas proteção parcial (Villarreal *et al.*, 2011). Assim, o desenvolvimento de novas vacinas baseadas em subunidades proteicas recombinantes ou construções de DNA são alternativas promissoras para o controle da PES. Diversos estudos envolvendo a formulação de vacinas contra *M. hyopneumoniae* têm sido realizados recentemente, sendo baseadas na bactéria atenuada, subunidades proteicas recombinantes e construções de DNA recombinante (Feng *et al.*, 2013; Marchioro *et al.*, 2014; Virginio *et al.*, 2014; Woolley *et al.*, 2014).

1.2 Fatores de virulência em *Mycoplasma hyopneumoniae*

A virulência é um efeito da relação patógeno-hospedeiro, isto é, a capacidade de um patógeno causar uma doença depende do hospedeiro. Deste modo, organismos

avirulentos podem causar doenças em hospedeiros imunodeficientes e organismos virulentos podem não ser patogênicos em hospedeiros imunes (Casadevall & Pirofski, 2001). O conceito de virulência em relação ao patógeno considera que a distinção entre patogênico e não-patogênico é feita pela expressão ou não, respectivamente, de fatores de virulência, codificados por genes de virulência (Wassenaar & Gaastra, 2001).

Os mecanismos de patogenicidade já identificados de *M. hyopneumoniae*, como a adesão ao epitélio respiratório e a indução da resposta imune inflamatória no hospedeiro, resultando nas lesões pulmonares, permitem prever a existência de fatores de virulência, incluindo proteínas de adesão (adesinas), genes/proteínas envolvidos com a secreção ou tráfico entre patógeno-hospedeiro, ou envolvidos com a evasão e/ou modulação da resposta imune do hospedeiro (Ferreira & Castro, 2007). A identificação de possíveis genes de virulência de *M. hyopneumoniae* foi possível a partir do sequenciamento dos genomas de linhagens patogênicas (7448 e 232) e não-patogênica (J) de *M. hyopneumoniae* (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005), através da análise genômica comparativa entre estas linhagens. Entre os diferentes fatores de virulência preditos (Ferreira & Castro, 2007), as proteases se destacam por serem enzimas que podem estar atuando no processamento proteolítico de outros possíveis fatores de virulência, como as adesinas e os antígenos variáveis. Entre as proteases, as sequências de DNA codificadoras (CDS) correspondentes às sinal-peptidases dos tipos I e II (SPases I e II) foram identificadas nas linhagens de *M. hyopneumoniae* e preditas como fatores de virulência, uma vez que seus produtos podem estar relacionados com a patogenicidade

1.3 Sistema de secreção de proteínas em bactérias e a sinal-peptidase I

Aproximadamente 30% das proteínas bacterianas é destinado para a membrana ou para o meio extracelular (Driessen & Nouwen, 2008). A maioria destas proteínas atua na absorção de nutrientes, excreção, estrutura celular, comunicação, defesa e virulência, sendo transportadas pela via de secreção Sec-dependente. Esta rota é essencial para viabilidade bacteriana, universalmente conservada em bactérias, além de ser a rota primária de exportação de proteínas (Rao C V *et al.*, 2014).

As proteínas destinadas ao meio extracelular são geralmente sintetizadas como preproteínas, contendo uma pequena extensão N-terminal chamada peptídeo-sinal. A estrutura do peptídeo-sinal mostra uma pequena conservação de sequência de aminoácidos,

entretanto é dividida em três regiões distintas: domínio N-terminal, com 1 a 5 resíduos de aminoácidos positivamente carregados; o domínio H central, com 7-15 resíduos de aminoácidos predominantemente hidrofóbicos; e o domínio C-terminal contendo resíduos de aminoácidos neutros, porém polares, compondo o sítio de clivagem do peptídeo-sinal (Paetzel, 2014) (Figura 1).

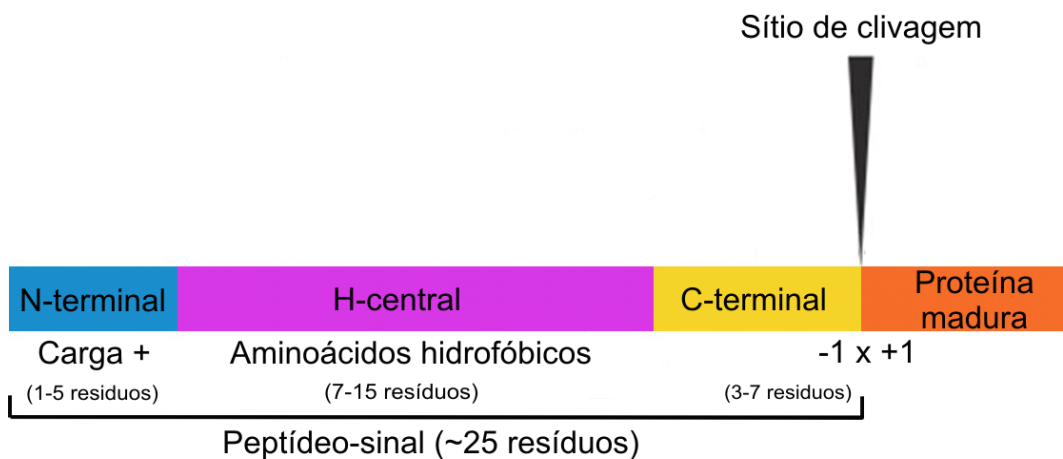


Figura 1: Diagrama esquemático de um peptídeo-sinal típico de uma preproteína. Os três domínios do PS estão representados em azul/magenta/amarelo, contendo o domínio N-terminal, o centro hidrofóbico e o domínio carboxiterminal, respectivamente. Neste último domínio, -1 e +1 representam os resíduos de aminoácidos do sítio de clivagem: -1 corresponde a Ala, Val, Ser, Gly, Thr, Cys ou Pro, enquanto +1 é geralmente Ala.

A secreção de pré-proteínas pela via Sec compreende três etapas: direcionamento da pré-proteína para a membrana; translocação da pré-proteína através da membrana; e a liberação da proteína madura para o ambiente externo (Gram-positivas) ou para o periplasma (Gram-negativas) (Rao C V *et al.*, 2014) (Figura 2). Inicialmente, as pré-proteínas recém-sintetizadas não estão enoveladas, sendo capazes de ser translocadas corretamente pelo canal de translocação, porém estão instáveis no citosol. A chaperona SecB é responsável pela estabilização das pré-proteínas não enoveladas e direciona a pré-proteína para a próxima etapa (Beckwith, 2013). A ATPase SecA direciona a pré-proteína trazida por SecB até o canal de translocação (SecYEG) através de ciclos de hidrólise de ATP. O complexo SecYEG é formado por três proteínas integrais de membrana (SecY, SecE e SecG) que juntas formam um canal que conduz a pré-proteína para fora da célula (Rao C V *et al.*, 2014). Durante ou logo após a translocação da pré-proteína, o peptídeo-

sinal é removido pela SPase I permitindo a liberação da proteína madura para seu destino final (Paetzel, 2014).

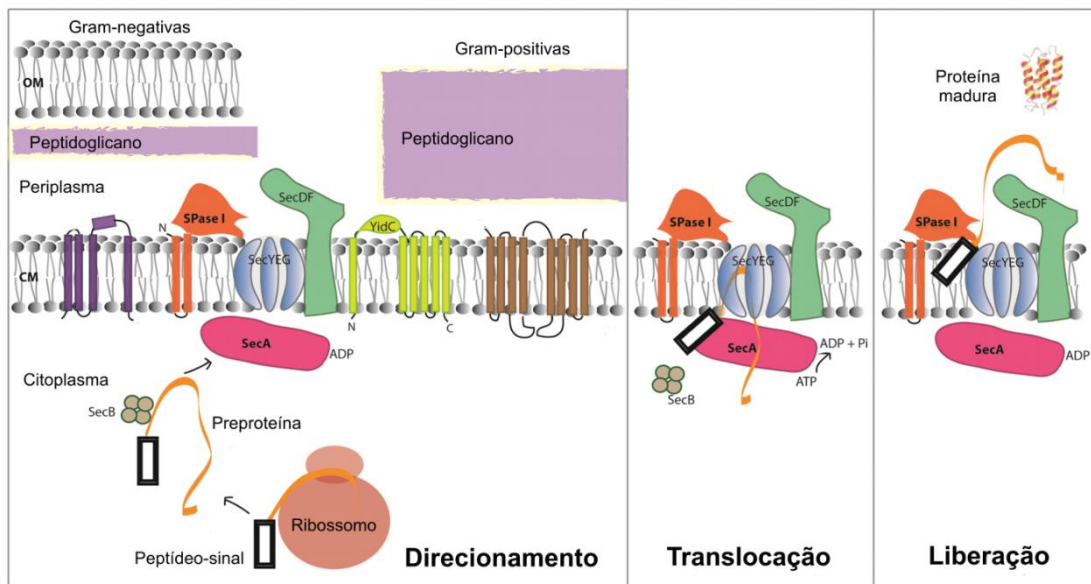


Figura 2: Representação esquemática da via de secreção Sec-dependente de *Escherichia coli*. As pré-proteínas recém-sintetizadas no ribossomo são direcionadas ao canal de translocação através da chaperona SecB, que estabiliza sua estrutura não-enovelada. A pré-proteína é translocada através do canal SecYEG através da hidrólise de ATP pela ATPase SecA. Ao final da translocação, a SPase I cliva o peptídeo-sinal liberando a proteína madura para o meio extracelular ou para o periplasma. Adaptada de Smitha Rao *et al.* (2014).

Além da via Sec, proteínas podem ser transportadas pela via Tat, a qual é capaz de exportar proteínas completamente enoveladas (Auclair *et al.*, 2012). Esta via é composta geralmente por três proteínas de membrana, TatA, TatB e TatC. As pré-proteínas exportadas por essa via contêm um peptídeo-sinal característico, apresentando um motivo com duas argininas (*twin-arginine*), que é reconhecido por TatB e TatC na membrana. Em seguida, TatA forma um canal de membrana com aproximadamente 450 a 750 kDa de tamanho. O peptídeo-sinal é clivado pela SPase I e permanece na membrana, enquanto a proteína madura completamente enovelada é liberada.

As SPases estão presentes em eucariotos, sendo localizadas no retículo endoplasmático, mitocôndrias e cloroplastos, e em procariotos, sendo classificadas como SPase I, II e IV (Auclair *et al.*, 2012). As SPases II e IV são responsáveis pela clivagem do peptídeo-sinal de lipoproteínas e pré-pilinas, respectivamente, enquanto a SPase I gera não-lipoproteínas maduras transportadas pela via Sec-dependente (Paetzel *et al.*, 2002).

A atividade proteolítica da SPase I foi primeiramente observada em *Escherichia coli* em 1978 (Chang *et al.*, 1978), logo após a descoberta dos peptídeos-sinal (Milstein *et al.*, 1972). A SPase I (EC 3.4.21.89) é parte do clã de serino proteases SF, pertencendo a família S26 que utiliza a díade catalítica Ser-Lys (Rawlings & Barrett, 1994). Esta característica difere a SPase I das SPases eucarióticas, que utilizam uma tríade catalítica Ser-His-Asp, sendo importante o desenvolvimento de antimicrobianos que resultem na inibição apenas da enzima bacteriana, sem causar dano ao hospedeiro (Auclair *et al.*, 2012). As SPases I de diferentes bactérias apresentam cinco regiões conservadas denominadas *boxes* A-E (Smitha Rao & Anné, 2011). O *box* A contém uma porção transmembrana; os *boxes* B e D contêm os resíduos catalíticos de serina e lisina, respectivamente; os *boxes* C e E apresentam resíduos importantes para o domínio de ligação ao substrato e o posicionamento dos resíduos catalíticos.

Embora os passos iniciais das vias de secreção de proteínas tenham sido bem estudados, a interação pré-proteína-SPase e a clivagem do peptídeo-sinal ainda não estão bem esclarecidas. Neste contexto, questões relacionadas à localização do peptídeo-sinal durante a clivagem e à interação entre a SPase I e os translocons Sec e/ou Tat ainda não foram respondidas.

Em *M. hyopneumoniae*, apenas os genes correspondentes a SecY, SecD/F, YidC e SecA foram anotados no genoma, sendo que os demais genes das proteínas componentes da via Sec não foram identificados (Vasconcelos *et al.*, 2005). Além disso, *M. hyopneumoniae* possui as sequências de DNA codificadoras das SPases I e II, *sipS* e *lsp*, respectivamente. A CDS *sipS* faz parte de um operon em *M. hyopneumoniae* 7448, coorientada com outras quatro CDS: *gatC*, *gatA*, *gatB* e *MHP0030* e sendo flanqueado por *MHP0025* e *lsp* localizados na fita oposta (Moitinho-Silva *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo é a caracterização funcional e imunológica da sinal-peptidase I de *M. hyopneumoniae* (MhSPase I), demonstrando a relevância desta proteína para a viabilidade bacteriana e seu papel imunomodulador, de forma a evidenciar o seu potencial como fator de virulência.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliação da funcionalidade da MhSPase I como uma SPase I *bona fide*
- b) Avaliação da resposta imune celular inata induzida pela MhSPase I em camundongos.
- c) Avaliação da resposta imune celular adaptativa induzida pela MhSPase I em camundongos.
- d) Produção de possíveis substratos recombinantes da MhSPase I para realização de ensaios de clivagem de peptídeo-sinal *in vitro*.
- e) Caracterização de complexos proteicos de membrana envolvendo a MhSPase I.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão divididos em dois capítulos. O primeiro capítulo, referente aos três primeiros objetivos específicos, está em forma de manuscrito a ser submetido à revista *Infection and Immunity*. O segundo capítulo, referente aos quarto e quinto objetivos específicos, apresenta resultados adicionais de abordagens experimentais com resultados ainda parciais.

CAPÍTULO 1

Manuscrito a ser submetido à revista *Infection and Immunity*.

Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase

Jéssica A. Paes, Veridiana G. Virginio, Thiago J. Borges, Cristina Bonorino,
Arnaldo Zaha, Henrique B. Ferreira

O manuscrito a seguir se encontra em fase final de redação e revisão dos coautores. Neste trabalho é descrito o potencial da MhSPase I como um fator de virulência de *M. hyopneumoniae*, demonstrando sua atividade funcional através de ensaios de complementação *in vivo* e também o papel desta proteína na modulação da resposta imune em camundongos.

A primeira autora é responsável pela execução de todos os experimentos, desde o delineamento experimental, análise de dados à redação do manuscrito. A Dra. Veridiana Virginio auxiliou no delineamento experimental e realização dos experimentos envolvendo animais. O M.Sc. Thiago Borges auxiliou no delineamento experimental dos ensaios imunológicos envolvendo citometria de fluxo, bem como o manuseio do citometro de fluxo e a posterior análise dos dados obtidos. A citometria de fluxo foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular sob a orientação da professora Cristina Bonorino. O professor Arnaldo Zaha contribuiu para o delineamento experimental e discussão dos resultados relacionados aos ensaios funcionais. O professor Henrique B. Ferreira orientou a execução deste estudo, incluindo o delineamento experimental, análise dos dados obtidos nos ensaios funcionais e imunológicos e discussão dos resultados.

Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase

Jéssica A. Paes¹, Veridiana G. Virginio¹, Thiago J. Borges², Cristina Bonorino², Arnaldo Zaha³, Henrique B. Ferreira^{1*}

¹Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil; ²Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil; ³Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Running Head: *M. hyopneumoniae* SPase I as an immunomodulator

*Address correspondence to Henrique B. Ferreira, henrique@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Mycoplasma hyopneumoniae is an economically significant swine pathogen that causes porcine enzootic pneumonia (PEP). Cell adhesion and other processes important for swine infection by *M. hyopneumoniae* depend on the bacterial membrane proteins, most of which are translocated to the extracellular environment by the Sec-dependent pathway. Type I signal peptidase (SPase I) is a membrane protease responsible for the release of the proteins exported by this pathway, and, therefore, potentially important for the establishment of the repertoire of *M. hyopneumoniae* proteins exposed to its host. In order to assess the *in vivo* functional activity of *M. hyopneumoniae* SPase I (MhSPase I) we performed complementation assays with an *Escherichia coli* conditional SPase I mutant (*E. coli* IT89). The recombinant MhSPase I (rMhSPase I) was able to partially complement SPase I activity of *E. coli* IT89 in a non-permissive temperature, allowing the bacterial to survive. The innate and adaptive immune responses induced in mice by rMhSPase I were also assessed and the observed cytokine secretion profiles and reduction of T cytotoxic lymphocytes population are indicative of an anti-inflammatory immune response. These data suggest an immunomodulatory potential for the MhSPase I, which may play a role in the evasion of *M. hyopneumoniae* from the host inflammatory response observed in PEP.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*; MhSPase I; immunomodulatory potential

Introduction

Mycoplasma hyopneumoniae is a prevalent swine respiratory pathogen that is a major cause of economic loss to pig producers (1). This bacterium colonizes the pig respiratory epithelium and causes a chronic disease, called porcine enzootic pneumonia (PEP), by damaging ciliated cells from trachea, bronchi and bronchioles. These damages also predispose infected animals to secondary infections and viral co-infections (2). The clinical signs associated with PEP are non-productive coughing, retarded growth and inefficient food conversion (3). Lesions associated with *M. hyopneumoniae* infection seem to be the result of an induced host immune reaction and inflammatory response, rather than caused by direct toxic effects of molecules produced by bacterial cells (4). However, protection mechanisms against inflammatory response are so far unknown in *M. hyopneumoniae*.

Cell adhesion and other important processes for infection depend on membrane proteins, most of which are translocated to the extracellular environment (5). The type I signal peptidase (SPase I) is a membrane-anchored serine endopeptidase responsible for the release of preproteins translocated by the general secretory pathway, the Sec-dependent pathway (6). Once a major portion of a preprotein is translocated, SPase I cleaves the signal peptide from the preprotein, allowing its release from the membrane and correct folding of the mature protein (5). Therefore, SPase I plays an important role in protein secretion, an essential process for cell viability (7), and may act on pathogen-host interactions, due its localization at cell surface. The SPase I gene, *sipS*, was identified in five strains of *M. hyopneumoniae* (8-11) and the encoded protein was predicted as a possible virulence factor due to its relevance for proteolytic processing and translocation of adhesins and antigenic proteins to the cell surface (12). Recent

studies demonstrated that *M. hyopneumoniae* SPase I (MhSPase I) is differentially expressed in three analyzed strains of *M. hyopneumoniae* and is highly antigenic and immunogenic in mice (13). SPase I has been described as essential for bacterial viability (14), being a potential target for the development of new antibacterial vaccines and drugs (7, 15).

In this work, MhSPase I was characterized regarding its function as a *bona fide* SPase I and as a potential immunomodulator. MhSPase I functionality as a SPase I was demonstrated *in vivo* by complementation assays in an *Escherichia coli* SPase I conditional mutant. In addition, immunological assays were performed to demonstrate its anti-inflammatory and immunomodulatory potential based on cellular immune response induced in murine model.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions

E. coli KC8 was used for cloning by *in vivo* homologous recombination (16). *E. coli* BL21 (Amersham Biosciences, Sweden) was used for recombinant MhSPase I (rMhSPase I) expression. These *E. coli* strains were grown in CircleGrowth® medium (MP Biomedicals, France), in the presence of ampicillin (50 µg ml⁻¹), when necessary. For functional complementation analysis, the *E. coli* strain IT89 (17), containing a temperature-sensitive mutation in the SPase I gene (*lepB*), was used; this strain was grown at 27°C in Luria Bertani (LB) medium, for maintenance, or at 42°C during complementation experiments.

Gene cloning, expression and purification of recombinant protein

The *sipS* coding DNA sequence (CDS) was cloned into the pEX50 vector (7) by *in vivo* homologous recombination (16). For this, *sipS* CDS was amplified using pEX50_*sipS* 5' and pEX50_*sipS* 3' primers, containing 24 and 22 nt sequences that are homologous to the pEX50 vector, in their 5' ends (in bold) (pEX50_*sipS*5': **ACAATTTACACAGGAAACAGCATATGTTAAAATCTAAAACTTAAG**; pEX50_*sipS*3': **ATCTGTGCGGTATTTACACCGTTAGGCCCAAACACCTTTAATATC**). The pEX50:*sipS* plasmid was transformed into *E. coli* IT89 for *in vivo* complementation assays.

The pGEX-4T-3:*sipS* plasmid was used for rhSPase I expression in *E. coli* and the recombinant protein was purified as previously described (13). For immunological assays, lipopolysaccharides (LPS) removal from rMhSPase I was performed using

Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

***In vivo* complementation assay**

E. coli IT89 was transformed with pEX50 (control) and pEX50:*sipS* plasmids by TSB protocols (16) and transformant cells were grown at the non-permissive temperature 42°C in the presence (1 mM) and absence of IPTG. The OD₅₄₀ was recorded at 6 h intervals for 72 h. The assay was performed in duplicate. rMhSPase I expression was demonstrated by immunoblot using total cell lysates of *E. coli* IT89 samples containing pEX50:*sipS* and pEX50, at 24, 36 and 54 h. rMhSPase I was detected with anti-rMhSPase I serum (13) at a 1:25,000 dilution and with an anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibody (Sigma, USA) (1:8000). Antigen-antibody reactions were detected with an ECL Plus kit (GE Healthcare, UK), at VersaDoc (BioRad, USA).

Sequence alignments and functional domain predictions

MhSPase I (YP_287426.1) and *E. coli* SPase I (EcSPase I; Swiss-Prot: P00803.2) deduced amino acid sequences were collected from NCBI and aligned using Clustal Omega version 1.2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and GeneDoc version 2.7. Catalytic sites were analyzed by NCBI Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) and transmembrane segments were identified using TMHMM Server version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). SPase I boxes B and D were identified as (18).

Assessment of innate cellular immune response induced by rMhSPase I in mice

Innate cellular immune response induced by rMhSPase I was assessed in draining lymph node cells from one female BALB/c mice stimulated with rMhSPase I. Twelve draining lymph nodes were aseptically removed and pooled into RPMI 1640 medium (Gibco) with collagenase D (Roche). After treatment, 10^6 cells were cultured into AIM-V medium (Life Technologies) during 24 h at 37°C (in 5% CO₂) into 96-wells plate, in triplicate. Cells were stimulated with 10 µg/ml of rMhSPase I LPS-free, ovalbumin (OVA), as positive control, and non-stimulated cells were used as negative control. In last 6 h of culture, cytokine secretion was inhibited by addition of 1 µL/10⁶ of BD GolgiPlug (BD Biosciences). The cells were divided into two groups and stained, one with anti-CD11c APC-Cy7, anti-F4/80 PE, anti-B220 PercP Cy5-5 and anti-IL-10 APC; and the other with anti-CD11c APC-Cy7, anti-F4/80 PE, anti-B220 PercP Cy5-5 and anti-IFN-γ APC (all purchase from BD Biosciences). Both stains were performed using Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience), according manufacturer's instructions (protocol B). All data were analyzed using FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software (TreeStar, San Carlos, CA).

Assessment of adaptive cellular immune response induced by rMhSPase I in mice

Adaptive cellular immune response induced by rMhSPase I was analyzed through cytokine detection by ELISA and flow cytometry, respectively. First, twelve-week-old female BALB/c mice (5 mice/group) were immunized intraperitoneally with three doses (at days 0, 15 and 30) of 25 µg of purified rMhSPase I emulsified in complete Freund's adjuvant (Sigma), for the first immunization, and incomplete Freund's adjuvant (Sigma) for the remaining immunizations. Non-immunized mice were used as negative control. Mice were sacrificed 60 days after first immunization (DAI) and their spleens were

aseptically removed and treated as described by Virginio *et al.* (19), being stimulated with 10 µg/ml of rMhSPase I. The detection of IFN- γ , IL-4 and IL-10 cytokines in splenocyte culture supernatants was performed using commercial mouse cytokine ELISA kits (BD Biosciences) according the manufacturer's instructions.

For flow cytometry experiments, eight-week-old female BALB/c mice (4 mice/group) were immunized intraperitoneally with two doses (at days 0 and 7) of 25 µg of purified rMhSPase I with 10 µg of LPS (Santa Cruz Biotechnology). Non-immunized mice were used as negative control. Mice were sacrificed 14 DAI and their spleens were aseptically removed and pooled into RPMI 1640 medium (Gibco) with collagenase D for 30 min. Splenocytes of mice immunized and non-immunized were plated, in triplicate into AIM-V medium (Life Technologies) at 96-wells plate, at a concentration of 10^6 cells/well and cultured during 24 h at 37°C in 5% CO₂. Cells were stimulated with 10 µg/ml of rMhSPase I LPS-free and non-stimulated cells were used as negative control. In last 6 h of culture, cytokine secretion was inhibited by addition of 1 µL/ 10^6 of BD GolgiPlug (BD Biosciences). The cells were divided into two groups and stained, one with anti-CD4 PercP-Cy5-5, anti-CD8 PE-Cy7, anti-CD19 APC-Cy7 and anti-IL-10 APC; and the other with anti-CD4 PercP-Cy5-5, anti-CD8 PE-Cy7, anti-CD19 APC-Cy7 and anti-IFN- γ APC (all purchase from BD Biosciences). Both stains were performed using Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience), according manufacturer's instructions (protocol B). All data were collected on FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (TreeStar, San Carlos, CA).

All of the animals procedures were previously approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and followed international guidelines for the ethical use of animals in science.

Statistical analyzes

All statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism 6 software. Comparisons between different experimental groups were made by One-way ANOVA. The Bartlett's test was used for the analysis of homogeneity of variances and the Tukey's post-test was used for multiple comparisons. Differences were considered significant when P -values ≤ 0.05 .

Results

MhSPase I complementation assay of *E. coli* IT89

For demonstration of MhSPase I functionality *in vivo*, a complementation assay was performed with rMhSPase I in *E. coli* IT89. Bacterial cells containing pEX50:*sipS* or pEX50 vectors were submitted to the non-permissive temperature and bacterial growth was monitored for 72 h (Fig. 1). The growth curves show that rMhSPase I (pEX50:*sipS*) supports growth of *E. coli* IT89 in the non-permissive temperature, complementing the EcSPase I activity, while cells with pEX50 vector died in the first 24 h (Fig. 1A). rMhSPase I expression along the growth curve was demonstrated by immunoblot (Fig. 1B). rMhSPase I was detected as a 18 kDa polypeptide in *E. coli* IT89 cells containing pEX50:*sipS* vector with and without IPTG induction, and was not detected in control (pEX50). After IPTG induction, rMhSPase I level was higher than without induction, and also reflects in *E. coli* growth. Comparing cell growth and rMhSPase I expression, induced *E. coli* cells showed higher growth than non-induced cells. Therefore, this assay demonstrated the MhSPase I capacity to partially rescue the SPase I loss of function phenotype of *E. coli* IT89 in a non-permissive temperature.

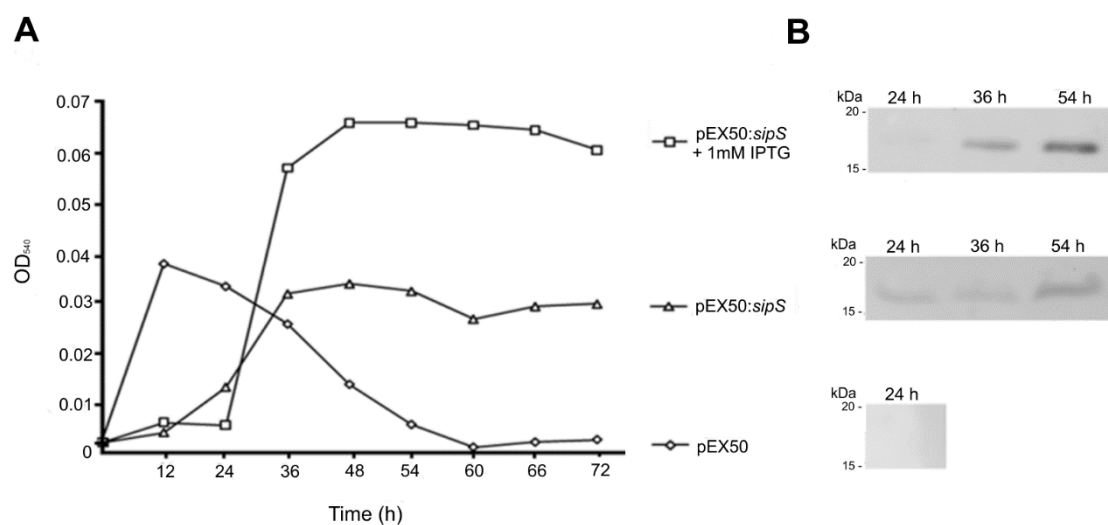


Figure 1. Functional activity analysis of rMhSPase I through *in vivo* complementation assay. (A) Growth curve of *E. coli* IT89 at non-permissive temperature (42°C), in presence and absence of IPTG. (B) rMhSPase I expression during *in vivo* complementation assay. *E. coli* IT89 culture samples were collected at different time intervals (24 h, 36 h, 54 h) for total protein extraction. Protein extracts were normalized and separated by SDS-PAGE 15% and then analyzed by immunoblot with anti-serum anti-rMhSPase. (□) rMhSPase I expression in *E. coli* IT89 culture induced by 1 mM IPTG, at 42°C. (▲) rMhSPase I expression in *E. coli* IT89 culture without IPTG, at 42°C. (◇) Negative control, *E. coli* IT89 pEX50 vector.

Amino acid sequence and functional domain comparisons between MhSPase I and EcSPase I

MhSPase I and EcSPase I alignments and domains prediction (Fig. 2) showed a conservation between boxes B and D, corresponding to Ser and Lys catalytic residues and with amino acid sequence according to (18). However, EcSPase I possess two transmembrane domains while MhSPase I has only one. Moreover, box C showed a low conservation and box E did not show similarity between amino acid sequences. Due to these results, MhSPase I and EcSPase I demonstrated 14% of identity and 23% of similarity.

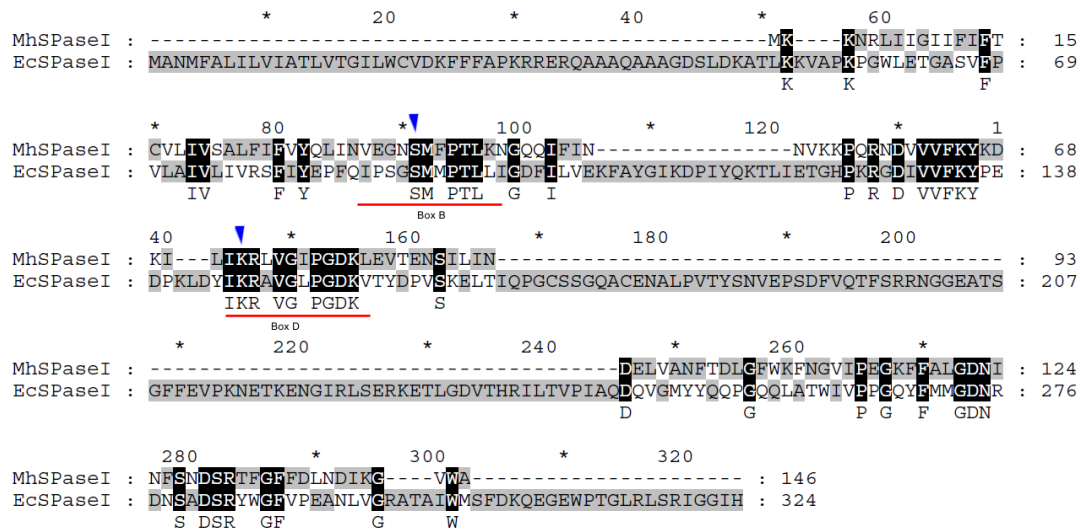


Figure 2: MhSPase I and EcSPase I alignment. Boxes B and D are red underlined and Ser-Lys catalytic residues are highlighted by blue arrows.

Innate cellular immune response induced by recombinant rMhSPase I in mice

Inflammatory and anti-inflammatory innate immune responses induced by rMhSPase I were evaluated through interferon gamma (IFN- γ) and interleukin-10 (IL-10) secretion by macrophages – F4/80+ cells, plasmacytoid dendritic cells (pDCs) – CD11c+B220+ and myeloid dendritic cells (mDCs) – CD11c+B220- from mice lymph nodes. Significant increase of macrophages secreting IL-10 was found in cultures stimulated with rMhSPase I (Fig. 3A). Furthermore, a significant decrease of mDCs secreting IFN- γ was also found (Fig. 3B). The increase of IL-10 levels concomitant with a decrease of IFN- γ levels suggests an anti-inflammatory innate immune response induced by rMhSPase stimulation. No significant differences in cell number were found among cell groups analyzed with and without stimulation by rMhSPase I.

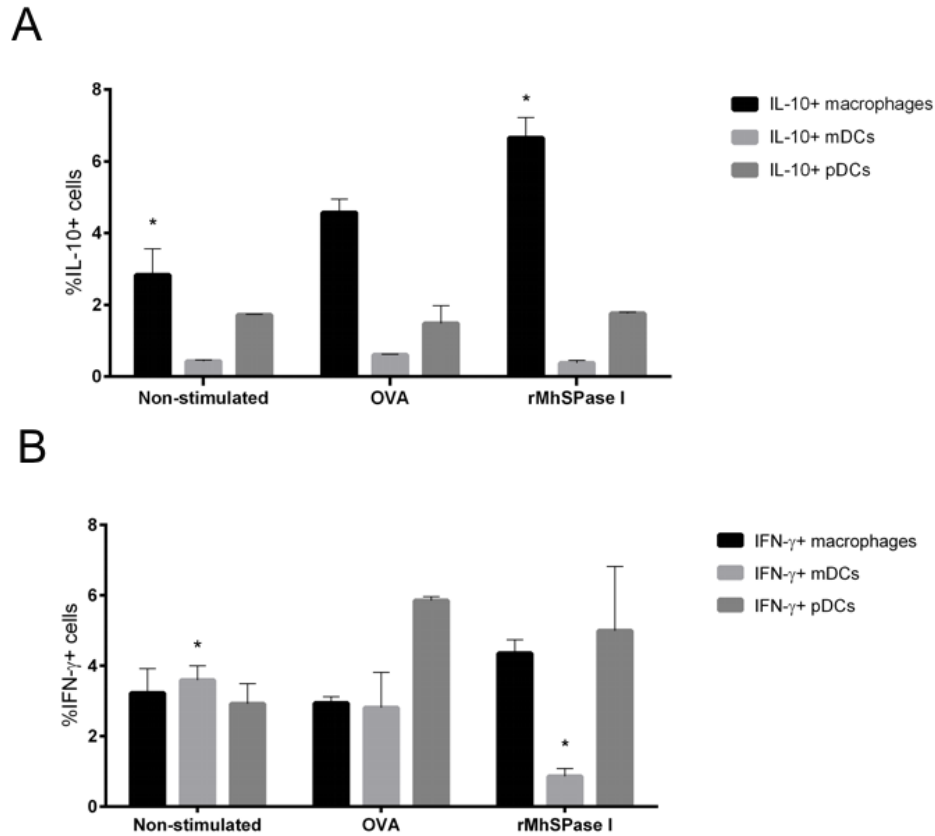


Figure 3. Assessment of innate cellular immune response induced by rMhSPase I in mice. Cells from drained lymph nodes were stimulated with rMhSPase I and (A) IL-10+ (B) IFN- γ + cells types were identified by flow cytometer. Significant increase of IL-10 + macrophages and reduction of IFN- γ + mDCs was observed upon rMhSPase stimulation, comparing with non-stimulated cells ($P=0.008$ and $P=0.001$, respectively).

Adaptive cellular immune response induced by recombinant rMhSPase I in mice

IFN- γ , IL-4 and IL-10 secretion in splenocytes supernatants cultures from mice immunized with rMhSPase I was assessed comparing with mice immunized with Freund's adjuvant (control group). No significant levels of IFN- γ and IL-4 were detected when compared with control group. However, IL-10 level was significant in splenocytes supernatants cultures from mice immunized and stimulated with rMhSPase I comparing with control group, with 632 ± 160.1 pg/ml and 254 ± 227.3 pg/ml, respectively ($P=0.0012$).

IFN- γ and IL-10 secretion by T helper (CD4⁺), T cytotoxic (CD8⁺) and B (CD19⁺) lymphocytes was analyzed in splenocytes stimulated with rMhSPase I from immunized mice. T helper and B lymphocytes showed a significant increase of IL-10 levels, when comparing non-immunized animals with animals immunized and stimulated with rMhSPase I (Fig. 4). No significant differences in IFN- γ levels were found among cell types analyzed (data not showed). Moreover, there was a significant reduction of T cytotoxic lymphocytes number in cultures of splenocytes of mice immunized and stimulated with rMhSPase I, comparing with non-immunized and stimulated group (Fig. 5). These data with IL-10 production by T helper and B lymphocytes also demonstrate an anti-inflammatory immune response induced by rMhSPase I and suggest a role in immune response modulation.

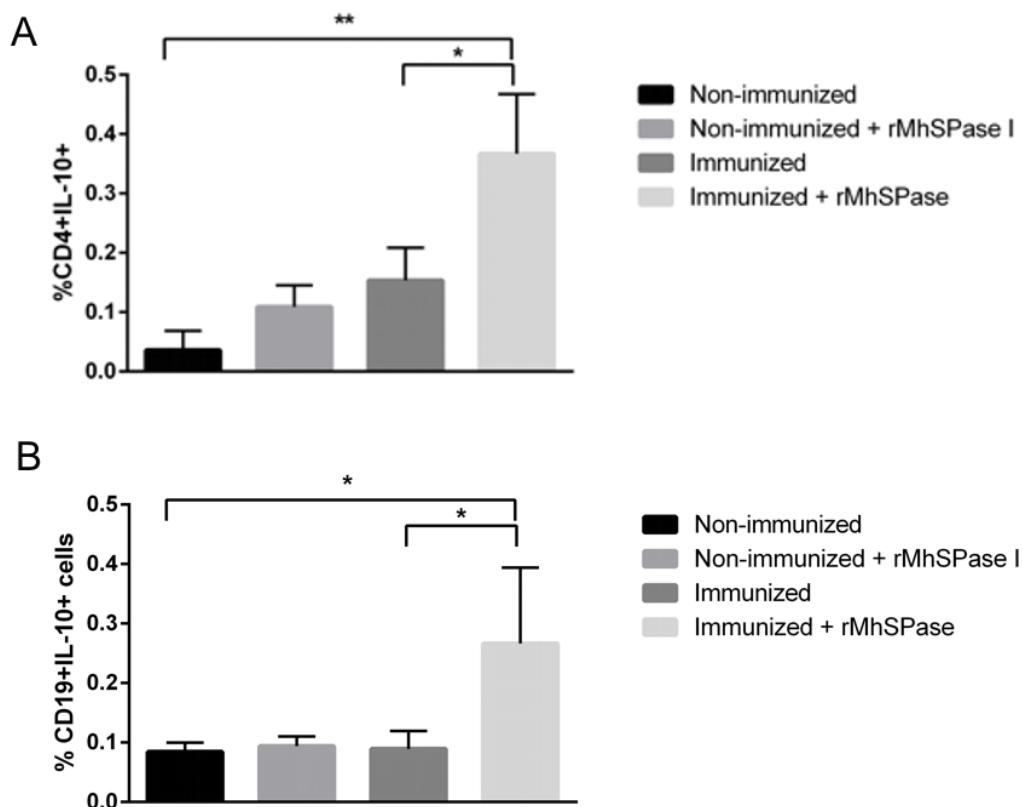


Figure 4. IL-10 secretion induced by rMhSPase I in splenocytes cultures. (A) T helper lymphocytes and (B) B lymphocytes from mice immunized with rMhSPase I secrete IL-10 upon rMhSPase I stimulation, comparing with non-immunized animals ($P=0.0009$ and $P=0.0102$, respectively).

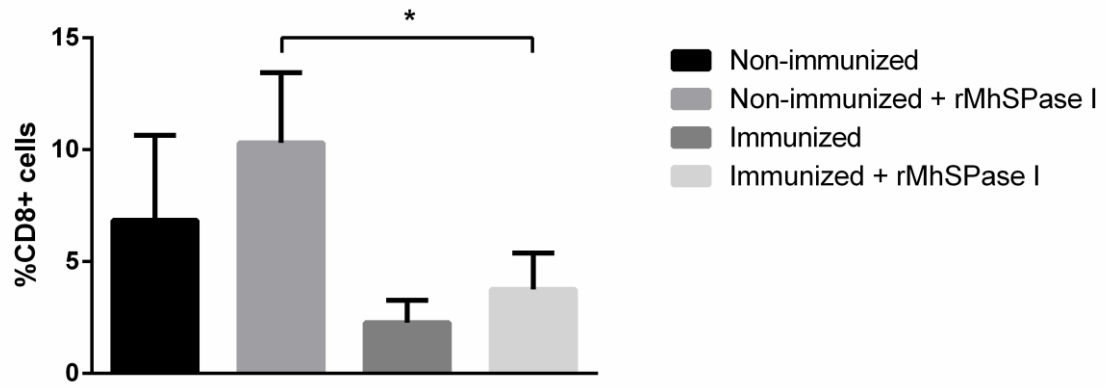


Figure 5. T cytotoxic lymphocytes population are reduced by rMhSPase I stimulation. Splens from mice immunized and stimulated with rMhSPase I show a reduction in the T cytotoxic lymphocytes population, comparing with non-immunized and stimulated animals ($P=0.0019$).

Discussion

In this present study we demonstrated that MhSPase I is able to partially complement the SPase I activity in *E. coli* IT89 and has an anti-inflammatory potential, suggesting a role in modulation of host immune response. SPase I have been described as a virulence factor in different organisms due its relevance for cell survival and processing of secreted virulence factors (7, 20-23).

Bacterial protein secretion is a highly orchestrated process that is essential for infection and virulence and SPase I displays a central role in this process due to signal peptide cleavage necessary to mature protein release (23). Absence of SPase I activity inhibits protein secretion and leads to preproteins accumulation, causing cell death (24). The *in vivo* functional activity of rMhSPase I was demonstrated by complementation assay. Although the growth rate was slow, rMhSPase I was able to partially complement the EcSPase I activity at non-permissive temperature. A possible explanation for this result could be the low identity between MhSPase I and EcSPase I amino acid sequences and also differences in the secretion systems in both species. Other studies involving complementation assays using *E. coli* IT89 were successful with SPase I from Gram-negative and Gram-positive bacteria (7, 25, 26). However, protein secretion mechanisms of *M. hyopneumoniae* are not well understood, once Sec-dependent machinery has several components not annotated in the genome (8-11) and this may imply on MhSPase I activity. This result demonstrated that MhSPase I acts as a SPase I *bona fide*, being able to cleave the signal peptides of secreted proteins of *E. coli* IT89, allowing the bacterial survival.

M. hyopneumoniae infections are characterized by production of pro-inflammatory cytokines that are responsible for lungs lesions and lymphoid hyperplasia (27).

However, some pathogenic mycoplasma species use their genetic machinery to alter surface antigens, thus diverting the host immune response and allowing for chronic infection (4). In this context, proteins able to modulate/evade immune system can be considered virulence factors (28). Production of IL-10 by macrophages, B and T helper lymphocytes suggests an anti-inflammatory immune response that may be protecting *M. hyopneumoniae* of pro-inflammatory cytokines. At innate immune response, IL-10-producing macrophages preferentially ingest early apoptotic cells, avoiding a high inflammatory response (29) and may protect *M. hyopneumoniae* from phagocytosis. Reduction in IFN- γ production by mDCs may be a consequence of IL-10 secretion by macrophages, negatively regulating IFN- γ levels. Adaptive immune response induced by rMhSPase I was characterized as Th2 type, once IL-10 secretion by T-helper lymphocytes may have inhibited IFN- γ secretion and modulated pro-inflammatory responses. B lymphocytes producing IL-10 also corroborates the high antigenicity and immunogenicity of rMhSPase I (13). In this context, the identification of IL-10 secretion by T and B lymphocytes confirms the IL-10 detection in splenocytes supernatant cultures from mice immunized with rMhSPase I. Furthermore, T cytotoxic cell population was reduced in splenocytes cultures of mice immunized and stimulated with rMhSPase, compared to animals without protein stimulus. These results are consistent with immunomodulation properties of pathogens (30) and may protect *M. hyopneumoniae* of high inflammatory response caused by PEP into pigs respiratory tract.

Therefore, MhSPase I may be considered a potential virulence factor of *M. hyopneumoniae*, once the functional activity of this protein was demonstrated as essential to cell viability of *E. coli* IT89 and possess immunomodulatory characteristic due to IL-10 secretion by important cell types for inflammatory responses. This

preliminary immunological characterization has to be analyzed in pigs to confirm the immunomodulatory properties of rMhSPase I. This protein may be explored as a potential candidate target for development of new drugs to treat PEP.

Acknowledgments

We thank Dr. K. Bockstael for *E. coli* IT89 strain and pEX50 plasmid. J. A. Paes was recipient of CNPq M. Sc. fellowship. T. J. Borges was recipient of CAPES PhD fellowship and V. G. Virginio was DT1/FAPERGS postdoctoral fellowship. This work was supported by FAPERGS.

References

1. **Maglennon GA, Cook BS, Matthews D, Deeney AS, Bossé JT, Langford PR, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, consortium BT.** 2013. Development of a self-replicating plasmid system for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* **44**:63.
2. **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.
3. **Thacker EL.** 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim Health Res Rev* **5**:317-320.
4. **Razin S, Yogev D, Naot Y.** 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1094-1156.
5. **Auclair SM, Bhanu MK, Kendall DA.** 2012. Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* **21**:13-25.
6. **Paetzel M.** 2014. Structure and mechanism of *Escherichia coli* type I signal peptidase. *Biochim Biophys Acta* **1843**:1497-1508.
7. **Bockstael K, Geukens N, Van Mellaert L, Herdewijn P, Anné J, Van Aerschot A.** 2009. Evaluation of the type I signal peptidase as antibacterial target for biofilm-associated infections of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **155**:3719-3729.
8. **Minion F, Lefkowitz E, Madsen M, Cleary B, Swartzell S, Mahairas G.** 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* **186**:7123-7133.
9. **Vasconcelos A, Ferreira H, Bizarro C, Bonatto S, Carvalho M, Pinto P, Almeida D, Almeida L, Almeida R, Alves-Filho L, Assunção E, Azevedo V, Bogo M, Brigido M, Brocchi M, Burity H, Camargo A, Camargo S, Carepo M, Carraro D, de Mattos Cascardo J, Castro L, Cavalcanti G, Chemale G, Collevatti R, Cunha C, Dallagiovanna B, Dambrós B, Dellagostin O, Falcão C, Fantinatti-Garboggini F, Felipe M, Fiorentin L, Franco G, Freitas N, Frías D, Grangeiro T, Grisard E, Guimarães C, Hungria M, Jardim S, Krieger M, Laurino J, Lima L, Lopes M, Loreto E, Madeira H, Manfio G, Maranhão A, Martinkovics C, et al.** 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.
10. **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.
11. **Siqueira FM, Thompson CE, Virginio VG, Gonchoroski T, Reolon L, Almeida LG, da Fonsêca MM, de Souza R, Prosdocimi F, Schrank IS, Ferreira HB, de Vasconcelos AT, Zaha A.** 2013. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics* **14**:175.
12. **Ferreira HB, Castro LA.** 2007. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis, vol 30, p 245-255. *Genetics and Molecular Microbiology, São Paulo*.
13. **Moitinho-Silva L, Heineck BL, Reolon LA, Paes JA, Klein CS, Rebelatto R, Schrank IS, Zaha A, Ferreira HB.** 2012. *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: expression and evaluation of its diagnostic potential. *Vet Microbiol* **154**:282-291.
14. **van Roosmalen ML, Geukens N, Jongbloed JD, Tjalsma H, Dubois JY, Bron S, van Dijk JM, Anné J.** 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**:279-297.
15. **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.
16. **Parrish J, Limjindaporn T, Hines J, Liu J, Liu G, Finley RJ.** 2004. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORfs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* **3**:582-586.
 17. **Inada T, Court DL, Ito K, Nakamura Y.** 1989. Conditionally lethal amber mutations in the leader peptidase gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**:585-587.
 18. **Smitha Rao CV, Anné J.** 2011. Bacterial type I signal peptidases as antibiotic targets. *Future Microbiol* **6**:1279-1296.
 19. **Virginio VG, Gonchoroski T, Paes JA, Schuck DC, Zaha A, Ferreira HB.** 2014. Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine enzootic pneumonia. *Vaccine* **32**:5832-5838.
 20. **Waite RD, Rose RS, Rangarajan M, Aduse-Opoku J, Hashim A, Curtis MA.** 2012. *Pseudomonas aeruginosa* possesses two putative type I signal peptidases, LepB and PA1303, each with distinct roles in physiology and virulence. *J Bacteriol* **194**:4521-4536.
 21. **Schallenger MA, Niessen S, Shao C, Fowler BJ, Romesberg FE.** 2012. Type I signal peptidase and protein secretion in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **194**:2677-2686.
 22. **Bonnemain C, Raynaud C, Réglier-Poupet H, Dubail I, Frehel C, Lety MA, Berche P, Charbit A.** 2004. Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **51**:1251-1266.
 23. **Powers ME, Smith PA, Roberts TC, Fowler BJ, King CC, Trauger SA, Siuzdak G, Romesberg FE.** 2011. Type I signal peptidase and protein secretion in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **193**:340-348.
 24. **Paetzel M, Karla A, Strynadka N, Dalbey R.** 2002. Signal peptidases. *Chem Rev* **102**:4549-4580.
 25. **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.
 26. **Chu HH, Hoang V, Kreutzmann P, Hofemeister B, Melzer M, Hofemeister J.** 2002. Identification and properties of type I-signal peptidases of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Eur J Biochem* **269**:458-469.
 27. **Rodríguez F, Ramírez GA, Sarradell J, Andrada M, Lorenzo H.** 2004. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol* **130**:306-312.
 28. **Wassenaar TM, Gaastra W.** 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* **201**:1-7.
 29. **Xu W, Roos A, Schlagwein N, Woltman AM, Daha MR, van Kooten C.** 2006. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* **107**:4930-4937.
 30. **Espinoza JA, Bohmwald K, Céspedes PF, Riedel CA, Bueno SM, Kalergis AM.** 2014. Modulation of host adaptive immunity by hRSV proteins. *Virulence* **5**.

CAPÍTULO 2

Estudos funcionais da MhSPase I

Neste capítulo são apresentados os experimentos e resultados parciais referentes a estudos funcionais da MhSPase I. Estão incluídos: (i) os ensaios para caracterização de complexos proteicos de membrana envolvendo a MhSPase I; e (ii) a produção de possíveis substratos recombinantes da MhSPase I para a realização de ensaios de clivagem *in vitro*.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Cultivos de *M. hyopneumoniae* e extração de proteínas

A bactéria *M. hyopneumoniae* 7448 foi cultivada em condições padrões, como descrito por Friis (1975). A extração de proteínas foi realizada conforme Pinto *et al.* (2009), com algumas modificações. Para obtenção de extratos proteicos enriquecidos com proteínas de membrana (EPM) foram utilizados 100 ml de cultura de *M. hyopneumoniae*, cultivados durante 48 horas. As células foram precipitadas por centrifugação a 4000 g durante 15 minutos e ressuspensas em 500 µl de PBS 1X pH 7,4 contendo 0,1% de Triton X-100, sendo lisadas por sonicação. O lisado foi submetido à centrifugação durante 20 minutos, a 10,000 g. Para os extratos constituídos por proteínas de membrana (PM), as células foram lisadas por sonicação em PBS 1X pH 7,4 e também foram centrifugadas nas mesmas condições. O *pellet* resultante foi tratado com 500 µl da solução contendo Triton X-100 para solubilização das proteínas de membrana. A concentração de proteínas foi dosada pelo kit Pierce™ Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific) em Nanodrop 2000.

1.2 Ensaio de interação proteína-proteína

O ensaio de interação proteína-proteína foi realizado por *crosslink* utilizando o kit Sulfo-SBED Biotin Label Transfer (Thermo Scientific), conforme as instruções do fabricante. O ensaio foi realizado com três réplicas biológicas (*pool* de seis extratos proteicos de *M. hyopneumoniae*) e duas réplicas técnicas (corridas no espectrômetro de massas). Inicialmente, 200 µg de rMhSPase I purificada foram marcadas com Sulfo-SBED (rMhSPase e GST, como controle). Em seguida, a proteína marcada foi adicionada a 2 mg de extrato EPM, sendo que a estabilização da interação acontece devido a exposição com luz ultravioleta (300-366 nm). A molécula de Sulfo-SBED marcando a rMhSPase I e as proteínas interagentes é clivada por redução com 50 mM DTT. Após a redução, as proteínas interagentes ficam marcadas com biotina (devido à molécula de Sulfo-SBED), sendo purificadas por cromatografia de afinidade com avidina (Pierce Monomeric Avidin Resin, Thermo Scientific).

1.3 Espectrometria de massas

A qualidade dos extratos proteicos de *M. hyopneumoniae* foi preliminarmente avaliada por cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Para isso, 50 µg dos extratos EPM, PM e lisado total foram tratados com RapiGest (Waters), segundo as orientações do fabricante, e digeridos com tripsina. Os peptídeos foram analisados usando Q-TOF Micro (Waters), da Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS), Centro de Biotecnologia, UFRGS, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os dados de MS foram analisados no MASCOT software (<http://www.matrixscience.com>, Matrix Science) para a identificação de proteínas, usando um banco local de *M. hyopneumoniae* 7448. As proteínas identificadas foram analisadas quando a localização subcelular utilizando o software PSORTb versão 3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>). As possíveis proteínas interagentes com a rMhSPase I purificadas foram tratadas e digeridas com tripsina e então submetidas à análise LC-MS/MS para identificação de peptídeos usando Q-TOF Premier (Waters), no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, São Paulo. Os dados de MS também foram analisados no MASCOT software contra um banco local de *M. hyopneumoniae* e também contra um banco um global (NCBI) obtidos no GenBank.

1.4 Predição de peptídeo-sinal

A identificação de possíveis substratos da MhSPase I foi baseada nos dados obtidos por Reolon *et al.* (2014) utilizando quatro softwares de predição de peptídeo-sinal: SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), SignalBlast (<http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html>) e PrediSi (<http://www.predisi.de/>). A seleção dos potenciais substratos foi baseada na identificação de peptídeo-sinal no mínimo em três softwares e ausência do aminoácido triptofano na região N-terminal. A extensão da porção N-terminal foi determinada pela presença do peptídeo-sinal e uma porção da proteína madura, evidenciando a diferença entre proteína com e sem peptídeo-sinal nos ensaios de clivagem.

1.5 Clonagem e expressão

As CDS correspondentes às porções N-terminais das proteínas selecionadas foram amplificadas a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448 por PCR, utilizando iniciadores específicos, que contém 20-24 nucleotídeos de homologia com o vetor pGEX 4T-3, nas suas extremidades 5' (Tabela 1), desenhados através do software Vector NTI (Invitrogen). Cada amplicon foi clonado no vetor pGEX 4T-3 (GE Healthcare) por recombinação homóloga *in vivo* em *E. coli* KC8 (Parrish *et al.*, 2004). Os clones resultantes foram utilizados para expressão das porções N-terminais das proteínas selecionadas em fusão com GST, sendo conectadas por um sítio de clivagem por trombina (Sigma). A expressão das porções N-terminais recombinantes das proteínas selecionadas foi padronizada em *E. coli* BL21 pLysE, sendo que a indução foi realizada com 0,1 mM de IPTG, por 3 h, 200 rpm a 37°C. Após a indução, as células foram lisadas por sonicação, utilizando 0,3-0,5% de sarcosil para solubilização. A purificação das proteínas recombinantes foi realizada através de cromatografia de afinidade na resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). A clivagem da proteína de fusão foi realizada por trombina, na própria coluna cromatográfica, durante 16 h. Diversas condições de eluição das proteínas recombinantes foram testadas para a purificação, como a adição de 0,5%-1,0% de Triton X-100 em PBS 1X; a eluição da proteína de fusão com 50 mM de glutathione reduzida; e a excisão da banda correspondente à proteína recombinante de SDS-PAGE. A rMhSPase I foi expressa e purificada como descrito no Capítulo 1.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem das CDS dos possíveis substratos da rMhSPase I.

Nome	Sequência (5'-3') ^a
pGEX_nP146 5'	TGGTCCGCGTGGATCCCCGATGGCTAAGAATAATAAGAATTCATTAT
pGEX_nP146 3'	GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAAATTGCCTCTTCTTGGTTTCC
pGEX_nMHP620 5'	TGGTCCGCGTGGATCCCCGATGAGGAAAATTAAGCGGCT
pGEX_nMHP620 3'	GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCATTTTAGACCCGACCAATCAAG

^a As sequências negritadas correspondem às regiões de homologia com vetor pGEX 4T-3.

2. RESULTADOS

2.1 Extração de proteínas de *M. hyopneumoniae* e caracterização de complexos proteicos de membrana envolvendo a MhSPase I

Os extratos proteicos de *M. hyopneumoniae* 7448 EPM e PM demonstraram rendimentos diferenciados (Figura 3). O primeiro obteve rendimento médio de 2 mg de proteína a cada 100 ml de cultura, enquanto o último obteve aproximadamente 0,3 mg/100 ml de cultura. A análise da qualidade dos extratos por LC-MS/MS identificou diversas proteínas preditas como de membrana celular em ambos os extratos e ainda no lisado total (Tabela 2 e Tabela S1). Devido ao melhor rendimento e a presença de proteínas de membrana em comum com os extratos PM, os ensaios de interação foram realizados com os extratos EPM. Entretanto, não houve identificação de peptídeos correspondentes a proteínas interagentes com rMhSPase I recuperadas através de *crosslink* utilizando Sulfo-SBED.

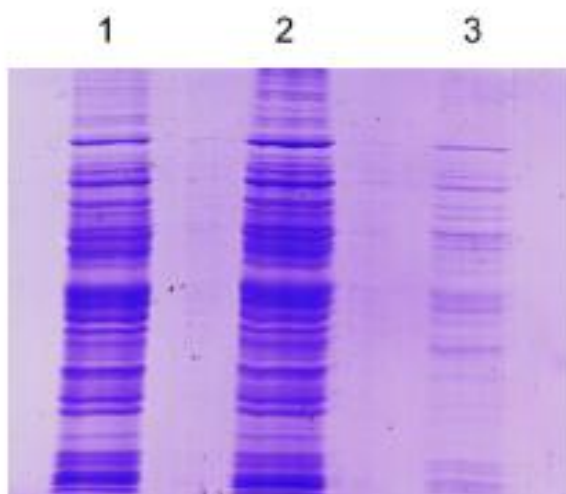


Figura 3: Comparação entre o perfil de proteínas de extratos de *M. hyopneumoniae* 7448 analisados por SDS-PAGE 12%. O mesmo volume (10 μ l) de cada extrato foi aplicado no SDS-PAGE para comparação dos rendimentos e padrão de bandas proteicas. 1- Lisado total; 2- extrato EPM; 3- extrato PM.

Tabela 2: Proteínas identificadas por LC-MS/MS em três diferentes extratos proteicos de *M. hyopneumoniae* 7448.

Lisado total	Extrato EPM	Extrato PM
<i>molecular chaperone DnaK</i>	<i>molecular chaperone DnaK</i>	<i>molecular chaperone DnaK</i>
<i>putative p216 surface protein</i>	<i>putative p216 surface protein</i>	<i>putative p216 surface protein</i>
<i>elongation factor Tu</i>	<i>elongation factor Tu</i>	
<i>protein P97</i>	<i>protein P97</i>	<i>protein P97</i>
<i>protein P102</i>	<i>protein P102</i>	<i>protein P102</i>
<i>adhesin like-protein P146</i>	<i>adhesin like-protein P146</i>	<i>adhesin like-protein P146</i>
<i>46K surface antigen precursor</i>	<i>46K surface antigen precursor</i>	<i>46K surface antigen precursor</i>
<i>pyruvate dehydrogenase</i>	<i>pyruvate dehydrogenase</i>	<i>pyruvate dehydrogenase</i>
<i>L-lactate dehydrogenase</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>
MHP7448_0662 hypothetical protein	MHP7448_0662 hypothetical protein	MHP7448_0662 hypothetical protein
<i>prolipoprotein p65</i>	<i>prolipoprotein p65</i>	<i>prolipoprotein p65</i>
<i>NADH oxidase</i>	<i>NADH oxidase</i>	
<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	
<i>thiol peroxidase</i>	<i>thiol peroxidase</i>	
<i>pyruvate dehydrogenase E1-alpha subunit</i>	<i>pyruvate dehydrogenase E1-alpha subunit</i>	
<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	
<i>thioredoxin</i>	<i>thioredoxin</i>	
PTS system transporter subunit IIB	PTS system transporter subunit IIB	
<i>Lppt protein</i>		<i>Lppt protein</i>
MHP7448_0009 protein	MHP7448_0009 protein	
hypothetical protein	hypothetical protein	
<i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>		
<i>p76 membrane protein precursor</i>	<i>p76 membrane protein precursor</i>	<i>p76 membrane protein precursor</i>
<i>adenine phosphoribosyltransferase</i>	<i>adenine phosphoribosyltransferase</i>	<i>adenine phosphoribosyltransferase</i>
	50S ribosomal protein L7/L12	
	phosphocarrier protein HPr	
	trigger factor	
	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase</i>	
		<i>ABC transporter xylose-binding lipoprotein</i>
		<i>MHP7448_0366 lipoprotein</i>
		<i>MHP7448_0373 hypothetical protein</i>
		<i>5'-nucleotidase precursor</i>

Proteínas destacadas em itálico foram preditas como proteínas de membrana pelo software PSORTb v. 3.0.2.

2.2 Seleção de possíveis substratos da MhSPase I e produção das proteínas recombinantes

Considerando os critérios de seleção, dois possíveis substratos da MhSPase I foram escolhidos para expressão das suas porções N-terminais: a adesina P146_{1-210aa} (nP146) e a proteína hipotética MHP7448_0620_{1-164aa} (nMHP620). A expressão das porções N-terminais recombinantes foi padronizada em *E. coli* (Figura 4), entretanto, a purificação das proteínas não foi bem sucedida, uma vez que as proteínas recombinantes não puderam ser eluídas da resina cromatográfica, impossibilitando a realização dos ensaios de clivagem de peptídeo-sinal.

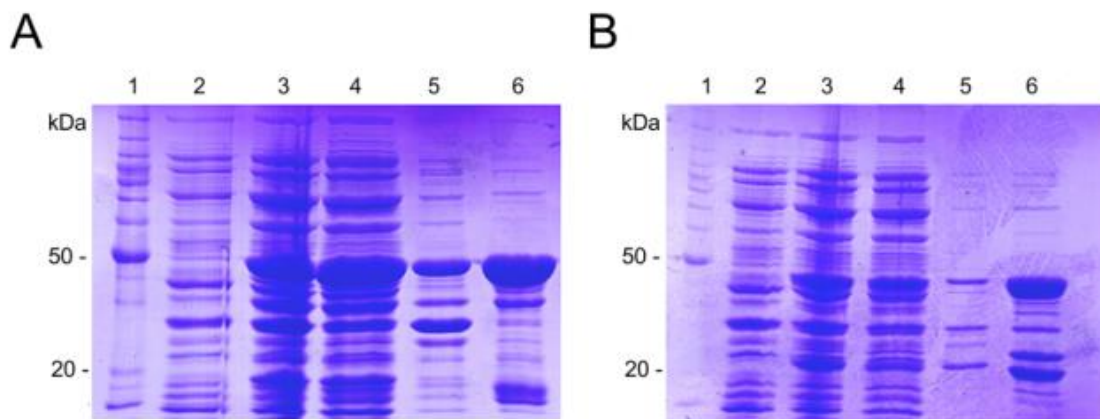


Figura 4: Expressão e solubilização dos substratos recombinantes analisadas por SDS-PAGE 12%. A expressão da nP146 (A) e da nMHP620 (B) foi padronizada com 0,1 mM de IPTG e as proteínas recombinantes foram solubilizadas com 0,5% e 0,3% de sarcosil, respectivamente. As proteínas de fusão nP146+GST e nMHP620 são observadas com 49 kDa e 44 kDa, respectivamente. **1-** Marcador de peso molecular BenchMark (Invitrogen); **2-** extrato de *E. coli* antes da indução com IPTG; **3-** extrato de *E. coli* após a indução com IPTG; **4-** fração solubilizada com sarcosil; **5-** fração insolúvel (*pellet* após a lise); **6-** proteínas de fusão ligadas à resina.

4. DISCUSSÃO

A SPase I tem sido bem caracterizada em vários organismos incluindo procariotos e eucariotos (Paetzel *et al.*, 2000; Rafati *et al.*, 2006; van Roosmalen *et al.*, 2004). Neste estudo, foram realizados ensaios funcionais e imunológicos com a MhSPase I, a fim de demonstrar sua atividade *in vivo* e *in vitro*, sua associação a complexos proteicos de membrana celular e sua capacidade de induzir uma resposta imune celular através da imunização de camundongos.

A secreção de proteínas bacterianas para o meio extracelular requer a clivagem de uma sequência sinalizadora, isto é, o peptídeo-sinal (Paetzel *et al.*, 2002). A SPase I desempenha um papel central neste processo, liberando a proteína madura para seu destino final após a clivagem do peptídeo-sinal. Assim, a ausência da atividade da SPase I inibe a secreção de proteínas, causando um acúmulo de pré-proteínas no citoplasma, levando à morte celular. A atividade da MhSPase I *in vivo* foi demonstrada através de ensaios de complementação em *E. coli* IT89. Esta linhagem contém uma mutação âmbar no gene *lepB*, que codifica a SPase I de *E. coli* (EcSPase I), conferindo um fenótipo termossensível à bactéria (Inada *et al.*, 1989). Assim, *E. coli* IT89 mostra o crescimento normal à 27°C, sendo dramaticamente afetado na temperatura não permissiva (42°C). O crescimento normal em temperatura não permissiva pode ser restaurado por complementação com um gene codificador de uma SPase I funcional. No nosso estudo, embora o crescimento de *E. coli* ter sido lento, a rMhSPase I foi capaz de complementar parcialmente a atividade da EcSPase I em temperatura não-permissiva. Esse resultado pode ser explicado devido à baixa identidade de sequências de aminoácidos entre a MhSPase I e a EcSPase I, além das diferenças dos sistemas de secreção em ambas espécies. Este ensaio tem sido realizado com sucesso utilizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Bockstael *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2002; Lammertyn *et al.*, 2004). Entretanto, os mecanismos de secreção de proteínas em *M. hyopneumoniae* não são bem compreendidos, uma vez que a maquinaria Sec-dependente apresenta vários componentes não anotados no genoma desta bactéria (Liu *et al.*, 2011; Minion *et al.*, 2004; Siqueira *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2005), podendo implicar na atividade da MhSPase I. Embora a complementação exercida pela rMhSPase I ser considerada parcial, este resultado demonstra que a MhSPase I tem função como uma

SPase I *bona fide*, sendo capaz de clivar os peptídeos-sinal das proteínas secretadas por *E. coli* IT89, permitindo a sobrevivência bacteriana em temperaturas não permissivas.

Considerando a associação da SPase I no complexo de membrana formado pela via Sec-dependente, a identificação de proteínas que interajam com a MhSPase I pode auxiliar na identificação dos demais componentes desta via que não foram anotados no genoma de *M. hyopneumoniae*. Entretanto os ensaios de interação por *crosslink* realizados com a rMhSPase I e extratos proteicos de *M. hyopneumoniae* enriquecidos com proteínas de membrana não foram bem sucedidos até o momento. Isto pode ser explicado devido à presença de detergente na amostra, necessária para o enriquecimento dos extratos com proteínas de membrana, mas que pode ter interferido nas interações proteína-proteína. Neste contexto, novas estratégias de extração de proteínas de membrana de *M. hyopneumoniae* e a utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes, como o *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (BN-PAGE) (Wittig *et al.*, 2006), estão sendo padronizadas para a identificação de proteínas interagentes com a MhSPase I. Além da busca por componentes da via Sec-dependente, estes ensaios podem demonstrar a interação entre a MhSPase I e seus possíveis substratos.

A secreção de proteínas em bactérias é um processo altamente organizado, sendo essencial para a virulência e infecção (Powers *et al.*, 2011). A identificação de proteínas de *M. hyopneumoniae* secretadas pela via Sec-dependente ressalta a importância da MhSPase I na patogenicidade desta bactéria, devido ao processamento proteolítico de possíveis fatores de virulência. Neste contexto, ensaios de clivagem de peptídeo-sinal pela rMhSPase I podem demonstrar a atividade enzimática desta proteína *in vitro*, bem como a ação desta enzima sobre outras proteínas relevantes para a patogenicidade de *M. hyopneumoniae*. Para a realização dos ensaios de clivagem, as porções N-terminais de duas proteínas de *M. hyopneumoniae* foram escolhidas baseadas na predição de peptídeo-sinal *in silico*. A P146 foi escolhida por ser uma adesina extensivamente processada por proteases, gerando novas possíveis adesinas (P50, P40 e P85) que podem contribuir para a virulência de *M. hyopneumoniae* (Bogema *et al.*, 2012). A MHP620 foi escolhida por ser uma proteína hipotética ainda não caracterizada, mas é predita para secreção. Apenas a porção N-terminal destas proteínas foi selecionada para expressão, a qual apresenta o peptídeo-sinal além de uma região da proteína madura de tamanho suficiente para realização dos ensaios de clivagem. A expressão e solubilização destas duas proteínas recombinantes foram

padronizadas com sucesso. Entretanto, a purificação destas proteínas ainda não foi bem sucedida devido a uma possível interação entre a proteína recombinante e a resina, requerendo padronização adicional. A dificuldade na purificação das proteínas recombinantes pode ser explicada pela alta hidrofobicidade do peptídeo-sinal. Alternativamente, uma porção maior destas proteínas e/ou novos possíveis substratos podem ser produzidos. Assim, uma vez disponibilizado um substrato recombinante purificado, serão realizados os ensaios de clivagem de peptídeo-sinal de proteínas recombinantes pela rMhSPase I.

As infecções causadas por *M. hyopneumoniae* são caracterizadas por lesões pulmonares e hiperplasia linfoide, as quais são geradas pela produção de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro em resposta à bactéria (Rodríguez *et al.*, 2004). Entretanto, alguns micoplasmas são capazes de usar suas maquinarias genéticas para alterar antígenos de superfície, modulando o sistema imune do hospedeiro e permitindo a infecção crônica (Razin *et al.*, 1998). Deste modo, proteínas capazes de modular a resposta imune podem ser consideradas fatores de virulência (Wassenaar & Gaastra, 2001). Neste estudo, as respostas imune celular inata e adaptativa induzidas pela rMhSPase I em camundongos foi demonstrada através do perfil de citocinas produzidas e secretadas por diferentes tipos celulares. Na resposta imune inata, macrófagos produtores de IL-10 são responsáveis pela ingestão preferencial de células apoptóticas iniciais, evitando uma alta resposta inflamatória (Xu *et al.*, 2006), e podendo proteger *M. hyopneumoniae* da fagocitose. Além disso, a redução da produção de IFN- γ por células dendríticas mieloides (mDCs) estimuladas com a rMhSPase I pode estar relacionada com a secreção de IL-10 por macrófagos, regulando negativamente os níveis de IFN- γ secretados. A resposta imune adaptativa foi caracterizada como do tipo Th2, uma vez que a secreção de IL-10 por linfócitos T auxiliares pode estar relacionada com os baixos níveis de IFN- γ , sugerindo a inibição da secreção desta citocina e modulação de respostas pró-inflamatórias. A produção de IL-10 por linfócitos B também corroboram a alta antigenicidade e imunogenicidade da rMhSPase I demonstrada por Moitinho-Silva *et al.* (2012). Neste contexto, a identificação da secreção de IL-10 por linfócitos T e B confirma os níveis significativos de IL-10 detectados nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados e estimulados com a rMhSPase I. Além disso, houve uma redução na população de linfócitos T citotóxicos nas culturas de esplenócitos de

camundongos imunizados e estimulados com a rMhSPase I comparada com as culturas de esplenócitos de animais sem estímulo. Deste modo, a produção de IL-10 por macrófagos, linfócitos B e linfócitos T auxiliares induzida pela rMhSPase I, juntamente com a redução da população de linfócitos T citotóxicos sugere uma resposta imune anti-inflamatória e são consistentes com as propriedades imunomodulatórias de patógenos (Espinoza *et al.*, 2014), sendo um possível mecanismo de proteção de *M. hyopneumoniae* contra respostas altamente inflamatórias causadas pela PES no trato respiratório suíno.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir deste estudo, a MhSPase I pode ser considerada um possível fator de virulência de *M. hyopneumoniae*, uma vez que sua atividade funcional foi demonstrada e também apresenta propriedades imunomoduladoras em camundongos devido a detecção de níveis significativos de IL-10 sendo produzida por diferentes tipos celulares importantes para resposta imune. Embora ainda não tenha sido possível a identificação de complexos de membrana envolvendo a MhSPase I e a realização dos ensaios de clivagem de peptídeo-sinal por esta enzima, os resultados deste estudo demonstraram um novo potencial para uma SPase I, isto é, a ação anti-inflamatória/imunomoduladora, pelo menos no modelo murino.

Como perspectivas imediatas deste estudo nós incluímos a padronização dos ensaios de interação proteína-proteína por BN-PAGE, a fim de identificar complexos de membrana envolvendo a MhSPase I, e também expressar e purificar novos substratos recombinantes da MhSPase I para realização de ensaios de clivagem de peptídeos-sinal *in vitro*. A partir destes experimentos adicionais, espera-se demonstrar o papel da MhSPase I na secreção de proteínas importantes para virulência de *M. hyopneumoniae*, como as adesinas. Além disso, o potencial anti-inflamatório/imunomodulador da rMhSPase I deve ser comprovado em suínos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aqui estão incluídas todas as referências bibliográficas citadas na Introdução, no Capítulo 2 e na Discussão. As referências bibliográficas do Capítulo 1 estão no próprio manuscrito e no formato adequado para submissão à revista *Infection and Immunity*.

Auclair, S. M., Bhanu, M. K. & Kendall, D. A. (2012). Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* **21**, 13-25.

Beckwith, J. (2013). The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol* **164**, 497-504.

Bockstael, K., Geukens, N., Van Mellaert, L., Herdewijn, P., Anné, J. & Van Aerschot, A. (2009). Evaluation of the type I signal peptidase as antibacterial target for biofilm-associated infections of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **155**, 3719-3729.

Bogema, D. R., Deutscher, A. T., Woolley, L. K. & other authors (2012). Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography. *MBio* **3**.

Calsamiglia, M., Pijoan, C. & Trigo, A. (1999). Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest* **11**, 246-251.

Casadevall, A. & Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* **184**, 337-344.

Chang, C. N., Blobel, G. & Model, P. (1978). Detection of prokaryotic signal peptidase in an *Escherichia coli* membrane fraction: endoproteolytic cleavage of nascent f1 pre-coat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 361-365.

Chu, H. H., Hoang, V., Kreutzmann, P., Hofemeister, B., Melzer, M. & Hofemeister, J. (2002). Identification and properties of type I-signal peptidases of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Eur J Biochem* **269**, 458-469.

Ciprián, A., Palacios, J. M., Quintanar, D., Batista, L., Colmenares, G., Cruz, T., Romero, A., Schnitzlein, W. & Mendoza, S. (2012). Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in swine in México. *Res Vet Sci* **92**, 191-196.

Citti, C. & Blanchard, A. (2013). Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol* **21**, 196-203.

Driessen, A. J. & Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* **77**, 643-667.

Espinoza, J. A., Bohmwald, K., Céspedes, P. F., Riedel, C. A., Bueno, S. M. & Kalergis, A. M. (2014). Modulation of host adaptive immunity by hRSV proteins. *Virulence* **5**.

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.

Feng, Z. X., Wei, Y. N., Li, G. L. & other authors (2013). Development and validation of an attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol vaccine. *Vet Microbiol* **167**, 417-424.

Ferreira, H. B. & Castro, L. A. (2007). A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis, pp. 245-255. São Paulo: Genetics and Molecular Microbiology.

Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O. & other authors (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-403.

Friis, N. F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* **27**, 337-339.

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.

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. & other authors (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J Bacteriol* **193**, 1016-1017.

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.

Marchioro, S. B., Fisch, A., Gomes, C. K., Jorge, S., Galli, V., Haesebrouck, F., Maes, D., Dellagostin, O. & Conceição, F. R. (2014). Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LTB. *Vet Microbiol* **173**, 166-171.

Milstein, C., Brownlee, G. G., Harrison, T. M. & Mathews, M. B. (1972). A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nat New Biol* **239**, 117-120.

Minion, F., Lefkowitz, E., Madsen, M., Cleary, B., Swartzell, S. & Mahairas, 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.

Paetzel, M., Dalbey, R. & Strynadka, N. (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. & Dalbey, R. (2002). Signal peptidases. *Chem Rev* **102**, 4549-4580.

Paetzel, M. (2014). Structure and mechanism of *Escherichia coli* type I signal peptidase. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1497-1508.

Parrish, J., Limjindaporn, T., Hines, J., Liu, J., Liu, G. & Finley, R. J. (2004). High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* **3**, 582-586.

Pinto, P., Klein, C., Zaha, A. & Ferreira, H. (2009). Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci* **7**, 45.

Powers, M. E., Smith, P. A., Roberts, T. C., Fowler, B. J., King, C. C., Trauger, S. A., Siuzdak, G. & Romesberg, F. E. (2011). Type I signal peptidase and protein secretion in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **193**, 340-348.

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.

Rao C V, S., De Waelheyns, E., Economou, A. & Anné, J. (2014). Antibiotic targeting of the bacterial secretory pathway. *Biochim Biophys Acta*.

- Rawlings, N. & Barrett, A. (1994).** Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* **244**, 19-61.
- Razin, S., Yagev, D. & Naot, Y. (1998).** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1094-1156.
- Reolon, L. A., Martello, C. L., Schrank, I. S. & Ferreira, H. B. (2014).** Survey of surface proteins from the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 using a biotin cell surface labeling approach. *PLoS One* **9**, e112596.
- Rodríguez, F., Ramírez, G. A., Sarradell, J., Andrada, M. & Lorenzo, H. (2004).** Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol* **130**, 306-312.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J. & Rosell, C. (2004).** Association between *Mycoplasma hyopneumoniae* at different respiratory sites and presence of histopathological lung lesions. *Vet Rec* **155**, 57-58.
- 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., Maes, D. & Dellagostin, O. A. (2013).** *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Vet Microbiol* **165**, 234-242.
- Siqueira, F. M., Thompson, C. E., Virginio, V. G. & other authors (2013).** New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics* **14**, 175.
- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A. & Blanchard, A. (2007).** Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol* **158**, 754-766.
- Smitha Rao, C. V. & Anné, J. (2011).** Bacterial type I signal peptidases as antibiotic targets. *Future Microbiol* **6**, 1279-1296.
- Sørensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A. A., Feld, N. C., Friis, N. F., Bille-Hansen, V., Jensen, N. E. & Pedersen, M. W. (1997).** *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet Microbiol* **54**, 23-34.
- Thacker, E. L. & Minion, F. C. (2010).** *Mycoplasmosis*, pp. 779-797. Ames, Iowa USA: In: Zimmerman, J. (Ed.), *Diseases of swine*. Iowa state university press.

van Roosmalen, 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., Ferreira, H., Bizarro, C. & other authors (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.

Villarreal, I., Meyns, T., Dewulf, J., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F. & Maes, D. (2011). The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *Vet J* **188**, 48-52.

Virginio, V. G., Gonchoroski, T., Paes, J. A., Schuck, D. C., Zaha, A. & Ferreira, H. B. (2014). Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine enzootic pneumonia. *Vaccine* **32**, 5832-5838.

Wassenaar, T. M. & Gaastra, W. (2001). Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* **201**, 1-7.

Wittig, I., Braun, H. P. & Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat Protoc* **1**, 418-428.

Woolley, L. K., Fell, S. A., Gonsalves, J. R. & other authors (2014). Evaluation of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* P97/P102 paralogs formulated with selected adjuvants as vaccines against mycoplasmal pneumonia in pigs. *Vaccine* **32**, 4333-4341.

Xu, W., Roos, A., Schlagwein, N., Woltman, A. M., Daha, M. R. & van Kooten, C. (2006). IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* **107**, 4930-4937.

ANEXO I

Tabela S1: Análise do repertório de proteínas encontrado nos três diferentes extratos proteicos de *M. hyopneumoniae* 7448.

Identificação	MASCOT score			emPAI		
	Lisado	EPM	PM	Lisado	EPM	PM
molecular chaperone DnaK	701	400	343	1,30	0,63	0,55
elongation factor Tu	336	164		0,66	0,54	
putative p216 surface protein	321	143	715	0,20	0,08	0,37
adhesin like-protein P146	279	71	320	0,09	0,04	0,24
protein P102	249	84	379	0,25	0,13	0,41
adenine phosphoribosyltransferase	235		40	2,20		0,18
protein P97	234	266	398	0,27	0,27	0,44
46K surface antigen precursor	232	257	298	0,42	0,42	0,42
p76 membrane protein precursor	202	104	425	0,11	0,15	0,41
pyruvate dehydrogenase	198	198	65	0,83	0,83	0,10
L-lactate dehydrogenase	185	251		0,74	0,91	
MHP7448_0662	179	47	164	0,10	0,05	0,19
prolipoprotein p65	173	81	75	0,09	0,15	0,09
dihydrolipoamide dehydrogenase	116	30		0,10	0,05	
thiol peroxidase	110	54		0,65	0,18	
pyruvate dehydrogenase E1-alpha subunit	101	112		0,16	0,35	
NADH oxidase	101	122		0,28	0,36	
thioredoxin	97	81		0,61	0,61	
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	97	67		0,29	0,09	
PTS system transporter subunit II	53			0,34		
Lppt protein	47		27	0,03		0,06
MHP7448_0009	36	15		0,04	0,04	
MHP7448_0197	14			0,22		
50S ribosomal protein L7/L12		72			0,26	
phosphocarrier protein HPr		31			0,36	
trigger factor		19			0,07	
dihydrolipoamide acetyltransferase		15			0,1	
ABC transporter xylose-binding lipoprotein			203			0,14
lipoprotein			25			0,08
nucleotidase precursor			21			0,05
MHP7448_0373			14			0,03

ANEXO II

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

Dados pessoais

Nome	Jéssica Andrade Paes
Nome em citações bibliográficas	Paes, J. A.; Paes, Jéssica A.; Paes, Jéssica Andrade
Sexo	Feminino
Endereço profissional	Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia Av. Bento Gonçalves, 9500; Bloco 4, prédio 43421, sala 210. Agronomia - CEP 91509-900 - Agronomia - Porto Alegre, RS - Brasil Telefone: (51) 3308.7769
E-mail	jhepaes@cbiot.ufrgs.br

Formação acadêmica/Titulação

2013-2015	Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil <i>Orientador:</i> Henrique Bunselmeyer Ferreira <i>Bolsista:</i> CNPq
2009-2013	Graduação em Ciências Biológicas Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil <i>Título:</i> Caracterização imunológica e funcional da sinal-peptidase I de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> <i>Orientador:</i> Henrique Bunselmeyer Ferreira <i>Bolsista:</i> CNPq

Idiomas

Inglês	Compreende bem, fala razoavelmente, lê bem, escreve bem
Espanhol	Compreende razoavelmente, fala pouco, lê razoavelmente, escreve pouco

Estágios

Estágio	Biologia molecular: Caracterização imunológica e funcional da sinal-
----------------	---

- voluntário 2009-2010** peptidase I de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira
- Iniciação tecnológica PIBITI-CNPq 2010-2013** **Biologia molecular:** Caracterização imunológica e funcional da sinal-peptidase I de *Mycoplasma hyopneumoniae* & Antígenos recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* para formulação de vacinas contra a pneumonia enzoótica suína. Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira

Prêmios e títulos

- 2011** **Talento Inovador**, XX Feira de Iniciação à Inovação e ao Desenvolvimento Tecnológico - UFRGS

Artigos completos publicados em periódicos

- 1.** VIRGINIO, VERIDIANA GOMES ; GONCHOROSKI, TAYLOR ; **PAES, JÉSSICA ANDRADE** ; SCHUCK, DESIRÉE CIGARAN ; ZAHA, ARNALDO ; FERREIRA, HENRIQUE BUNSELMAYER . Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine enzootic pneumonia. *Vaccine* (Guildford), v. 32, p. 5832-5838, 2014.
- 2.** MOITINHO-SILVA, LUCAS ; KONDO, MARCIA Y. ; OLIVEIRA, LILIAN C.G. ; OKAMOTO, DEBORA N. ; **PAES, JÉSSICA A.** ; MACHADO, MAURICIO F.M. ; VERONEZ, CAMILA L. ; MOTTA, GUACYARA ; ANDRADE, SHEILA S. ; JULIANO, MARIA A. ; FERREIRA, HENRIQUE B. ; JULIANO, LUIZ ; GOUVEA, IURI E. . *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro peptidase activities: Identification and cleavage of kallikrein-kinin system-like substrates. *Veterinary Microbiology* (Amsterdam. Print), v. 163, p. 264-273, 2013.
- 3.** MOITINHO-SILVA, L. ; HEINECK, B. ; REOLON, L. A. ; **PAES, J. A.** ; KLEIN, C. S. ; REBELATTO, R. ; SCHRANK, IRENE SILVEIRA ; ZAHA, A. ; FERREIRA, HB . *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: Expression and evaluation of its diagnostic potential. *Veterinary Microbiology* (Amsterdam. Print), v. 154, p. 282-291, 2012.

Resumos publicados em anais de congressos

- 1.** **PAES, J. A.** ; Bonotto, R. M. ; VIRGINIO, VG ; ZAHA, A. ; FERREIRA, HB . Functional characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase. In: 20th Congress of International Organization of Mycoplasmaology, 2014, Blumenau. Livro de resumos da 20th Congress of International Organization of Mycoplasmaology, 2014.

2. **PAES, J. A.** ; LEAL, F. M. A. ; Bonotto, R. M. ; VIRGINIO, VG ; Zaha, A. ; FERREIRA, HENRIQUE B. . Functional characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: an essential protein to bacterial cell viability. In: 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN. Livro de Resumos do 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
3. **PAES, J. A.** ; VIRGINIO, VG ; SILVA, L. M. ; Zaha, A. ; FERREIRA, HB . Expression and immunological characterization of a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* potential vaccine antigen. In: XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology V Extra Section of Clinical Immunology, 2012, Campos do Jordão. Livro de Resumos do XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2012.
4. VIRGINIO, VG ; Gonchoroski, T. ; **PAES, J. A.** ; Zaha, A. ; FERREIRA, HB . Evaluation of Immune Response to Recombinant Antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* with Potential for Use in Vaccination against Porcine Enzootic Pneumonia. In: XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology V Extra Section of Clinical Immunology, 2012, Campos do Jordão. Livro de resumos do XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology V Extra Section of Clinical Immunology, 2012.
5. **PAES, J. A.** ; SILVA, L. M. ; VIRGINIO, VG ; Zaha, A. ; FERREIRA, HB . Characterization of an Antigen with Potential for Immunodiagnosis and Vaccination against the Porcine Enzootic Pneumonia. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos da XL Reunião anual da SBBq, 2011.
6. **PAES, J. A.** ; SILVA, L. M. ; VIRGINIO, VG ; Zaha, A. ; FERREIRA, HB . Caracterização de um antígeno recombinante com potencial para utilização de vacina contra a pneumonia enzoótica suína. In: XXII Salão de Iniciação Científica, XIX Feira de Iniciação à Inovação e ao Desenvolvimento Tecnológico e V Salão UFRGS Jovem, 2010, Porto Alegre. Livro de Resumos do XXII Salão de Iniciação Científica, XIX Feira de Iniciação à Inovação e ao Desenvolvimento e V Salão UFRGS Jovem, 2010.