

Análise de proteínas hipotéticas e não caracterizadas de *Mycoplasma hyopneumoniae* para identificação de determinantes da pneumonia enzoótica suína

Bryan A. da R. Tavares; Henrique B. Ferreira (orientador).

Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

* Este trabalho também contou com a participação de doutoranda Jéssica Andrade Paes.

INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae, como outras micoplasmas, é um dos menores organismos autorreplicantes de vida celular independente, com ausência de parede celular e um genoma de tamanho reduzido¹. Habita o trato respiratório de suínos, sendo o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES).

Os genomas das linhagens 7448 (patogênica) e J (não patogênica) de *M. hyopneumoniae* foram sequenciados e analisados comparativamente por nosso grupo de pesquisa². Os repertórios de proteínas codificadas por estes genomas são bastante similares, sugerindo que a patogenicidade seja determinada por expressão diferencial, por domínios diferenciais entre proteínas ortólogas e/ou por modificações pós-traducionais diferenciais.

Há 681 seqüências de DNA codificadoras (CDSs) de proteínas no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448. Destas, 454 foram confirmadas experimentalmente como funcionais (com detecção experimental de produto proteico), sendo, 404 com função predita e 50 não anotadas funcionalmente. As outras 227 CDSs não tiveram ainda nem confirmação experimental nem função predita, sendo por isso tratadas como hipotéticas. Estes conjuntos de CDSs de proteínas de função desconhecida (50) ou hipotéticas (227), totalizando 277 CDSs de função desconhecida, podem incluir fatores de virulência ainda não caracterizados.

OBJETIVOS

Anotação funcional *in silico* do repertório de CDSs de função desconhecida no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, e identificação e caracterização de potenciais novos fatores de virulência.

MATERIAIS E MÉTODOS

As 277 CDS de função desconhecida do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 tiveram suas seqüências deduzidas de aminoácidos recuperadas da base de dados UniProt. As 277 CDSs de função desconhecida do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 tiveram suas seqüências deduzidas de aminoácidos recuperadas da base de dados UniProt (www.uniprot.org). Foram então realizadas análises *in silico* das através de diversos programas de bioinformática para anotação funcional e predições de localização subcelular e de associação com virulência (Figura 1).

A anotação funcional foi realizada utilizando duas diferentes estratégias: baseada em alinhamentos das seqüências de *M. hyopneumoniae* 7448 com seqüências ortólogas depositadas em diversos bancos de dados biológicos com seqüências proteicas não redundantes e buscas por domínios funcionais por diversos programas de predição.

Com base nas análises *in silico* foram selecionadas proteínas-alvo de interesse para expressão na forma recombinante e posterior caracterização funcional e imunológica.

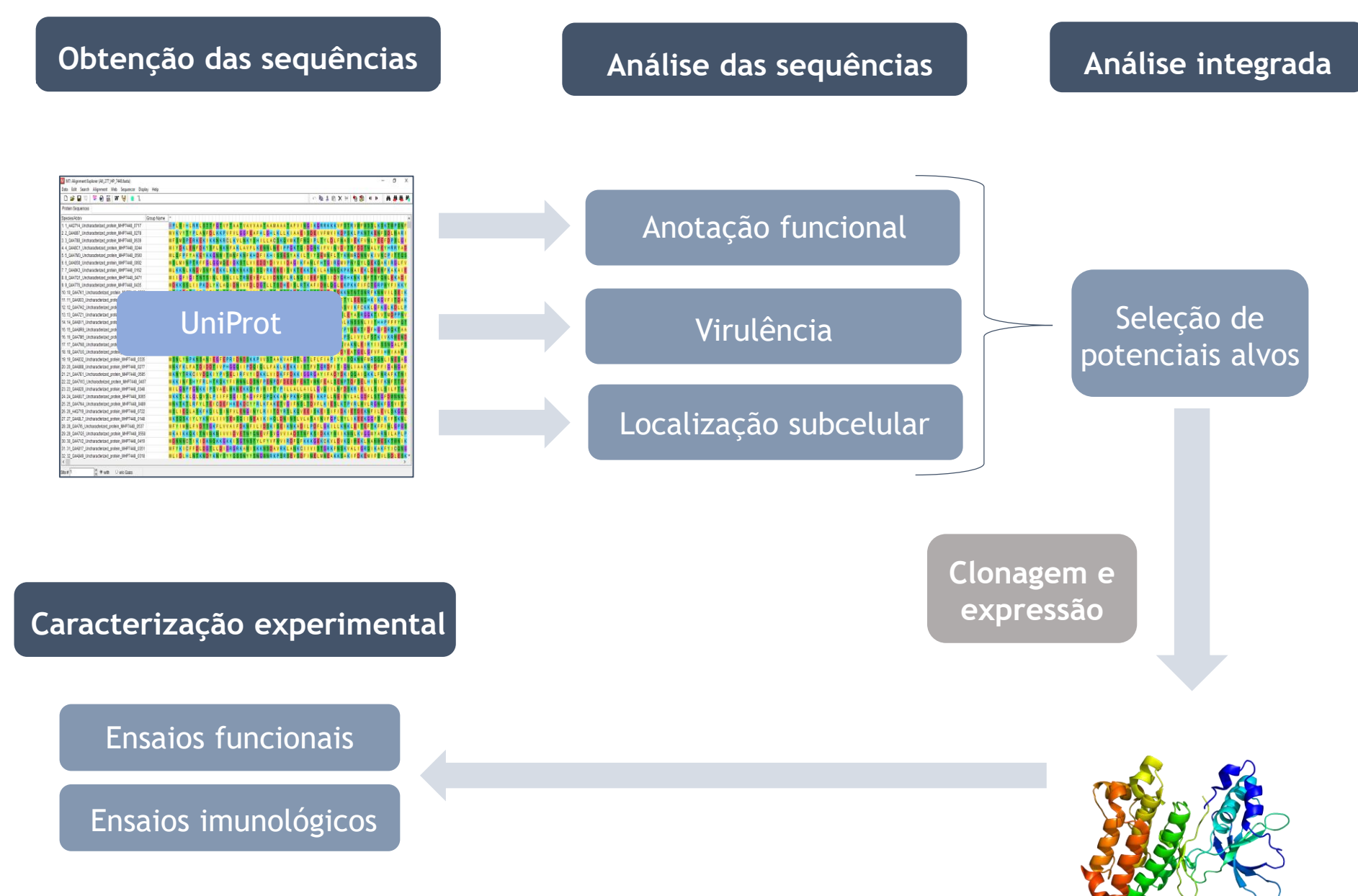


Figura 1 - Metodologia desenvolvida no projeto. Os programas utilizados para cada uma das predições *in silico* foram: para localização subcelular PSORTb, PSLpred, LOCTree, SignalP, SecretomeP, HMMTOP e TMHMM; para anotação funcional Blast2Go, SBASE, CATH, SUPERFAMILY, INTERPRO, SYSTERS, CDART, SMART e GPCRpred; e para virulência VirulentePred e a base de dados VFDB.

RESULTADOS

A anotação funcional deu suporte a 38% das 277 CDSs analisadas (Figura 2a). No total, possibilitou a anotação funcional de 105 CDSs, com 42 sendo preditas por ortologia, 42 por predição de domínios funcionais e 21 preditas por ambas as metodologias (Figura 3). Foram preditas 255 CDSs (92%) como associadas a virulência (Figura 2b), 85 das quais tiveram anotação funcional predita. As predições de localização subcelular cobriram 243 (88%) CDSs (Figura 2c), tendo apresentado uma quantidade semelhante de CDS em cada um dos compartimentos (intracelular, membrana plasmática e extracelular). Dentre as proteínas com sucesso na anotação funcional e associadas a virulência, 81 tiveram também predição de localização subcelular.

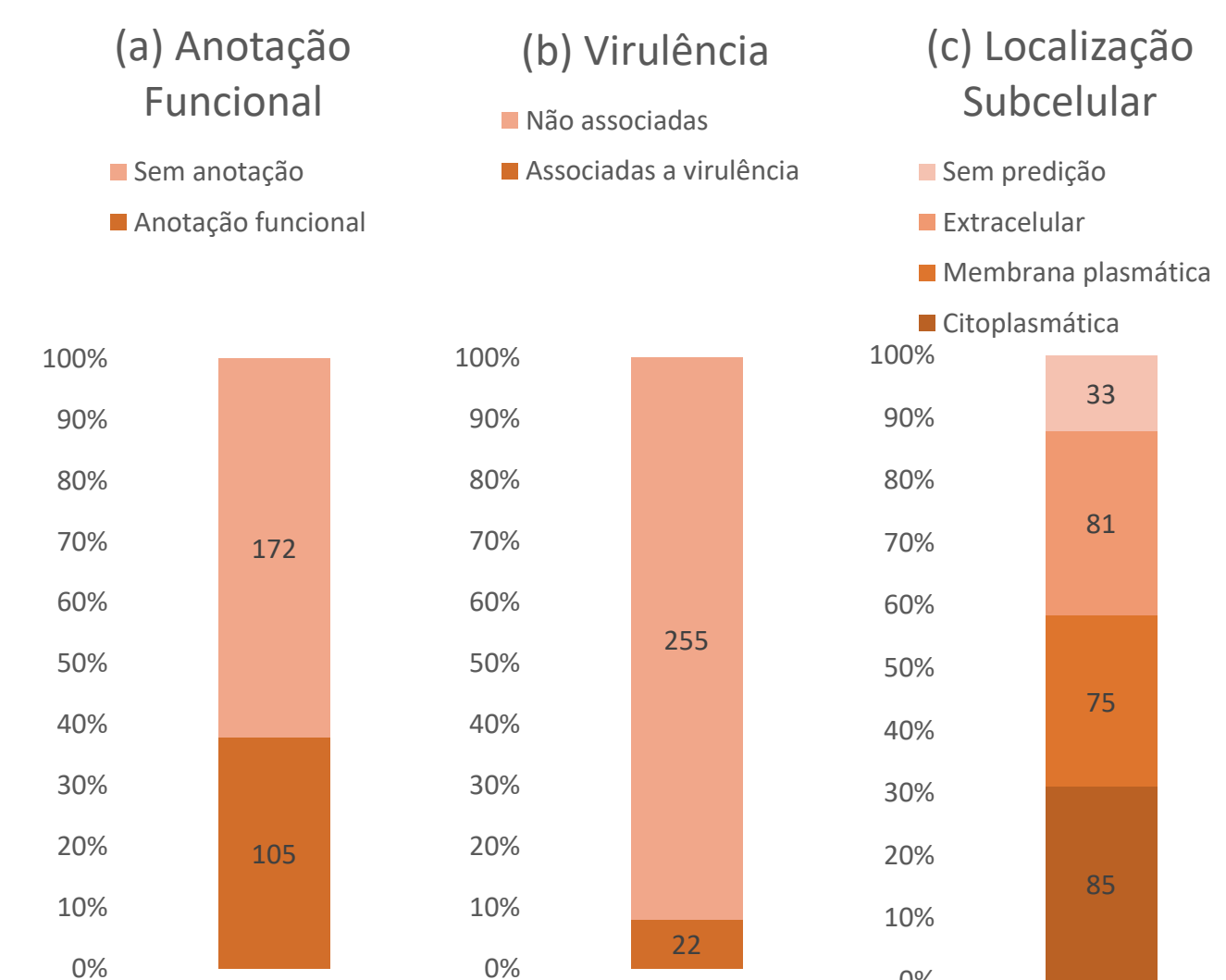


Figura 2 - Resultados das análises *in silico* de localização subcelular(a), anotação funcional (b) e associação a virulência(c).

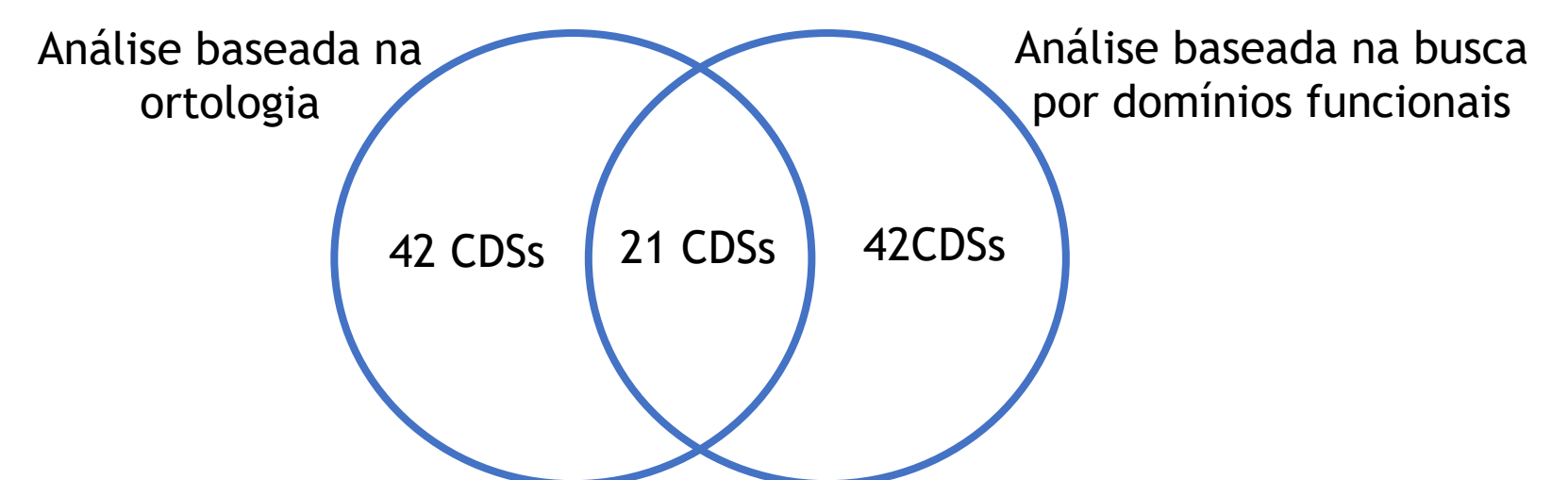


Figura 3 - Diagrama do resultado das análises de anotação funcional baseada em ortologia e em domínios.

Baseado nos resultados *in silico*, algumas CDSs potencialmente relacionadas a virulência foram selecionadas como de interesse para caracterização experimental. Foram inicialmente escolhidas duas CDSs associadas a processos de proteção contra oxirredução e com relevância para a redução do estresse oxidativo da célula, a CDS MHP7448_0321 predita como codificadora de uma álcool-desidrogenase (MhAD) citoplasmática, com 83 aminoácidos e uma massa molecular de 9,2 kDa, a CDS MHP7448_0148, codificadora de uma *heat shock protein* 33 (MhHSP33) citoplasmática com 411 aminoácidos e massa molecular de 46 kDa. A caracterização funcional envolverá clonagem e expressão heteróloga (em *Escherichia coli*) das CDSs selecionadas e ensaios funcionais *in vitro* e imunológicos com as proteínas recombinantes.

PERSPECTIVAS

- Clonagem das CDSs MHP7448_0321 e MHP7448_0148 e expressão da mhAD e da MhHSP33 em *Escherichia coli*.
- Ensaios de atividade *in vitro* da MhAD recombinante.
- Imunização de camundongos com a MhAD e a MhHSP33 recombinantes para caracterização imunológica destas proteínas.

REFERÊNCIAS

- MAES, D.; SIBILA, M.; KUHNERT, P.; SEGALÉS, J.; HAESBROUCK, F.; PIETERS, M. *Transbound Emerg Dis*, v 65, n. 1, p 110-124, May 2018. ISSN 1865-1682. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28834294>
- VASCONCELOS, A. T. et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol*, v. 187, n. 16, p. 5568-77, Aug 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16077101> >.