



ANÁLISE DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS E NÃO CARACTERIZADAS DE *Mycoplasma hyopneumoniae* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE DETERMINANTES DA PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA

Bryan A. da R. Tavares; Henrique B. Ferreira (orientador). * Este trabalho também contou com a participação de doutora Jéssica Andrade Paes Vieira. Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae, como outras micoplasmas, é um dos menores organismos auto-replicantes de vida livre, 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)².

Os genomas das linhagens 7448 (patogênica) e J (não patogênica) de *M. hyopneumoniae* foram analisados comparativamente e os repertórios de proteínas por eles codificadas são bastante similares, especialmente no que diz respeito a fatores de virulência conhecidos³. *Mycoplasma flocculare*, por sua vez, é uma espécie comensal que também habita o trato respiratório de suínos, e compartilha a maioria dos genes anotados como potenciais fatores de virulência com *M. hyopneumoniae*⁴. Isso sugere que a patogenidade seja determinada por expressão diferencial, por domínios diferenciais entre proteínas ortólogas e/ou por modificações pós-traducionais diferenciais^{5,6}. Dentre os potenciais fatores de virulência que são sobrerrepresentados em *M. hyopneumoniae* 7448 em relação a *M. hyopneumoniae* J e/ou *M. flocculare* destacam-se adesinas, proteases, proteínas de equilíbrio redox e transportadores de membrana.

Há ainda, no genoma de *M. hyopneumoniae*, uma grande proporção de sequências de DNA codificadoras (CDSs) de proteínas de função desconhecida. Esse conjunto de CDSs sugere a existência de um importante reservatório de potenciais fatores de virulência ainda não identificados nem caracterizados. Desta forma, são necessárias análises abrangentes para complementação da anotação funcional *in silico* dessas CDSs e predição de novos fatores de virulência.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I - Anotação funcional *in silico* do repertório de proteínas de função desconhecida de *M. hyopneumoniae* 7448;

II - Identificação de novos potenciais fatores de virulência da espécie;

III - Caracterização funcional e imunológica de pelo menos um novo fator de virulência de *M. hyopneumoniae* 7448.

MATERIAIS E MÉTODOS

As análises *in silico* foram baseadas no pipeline descrito por Shahbaaz, M. *et al.*⁷, no qual as sequências deduzidas de aminoácidos das CDSs de função desconhecida foram usadas para realização da anotação funcional e predição de associação a virulência. A anotação funcional foi realizada pela predição independente de localização subcelular, predição de domínios funcionais e identificação com ortólogos de função conhecida classificados de acordo com a ontologia genética (GO), conforme detalhado na Figura 1. A predição de associação à virulência foi realizada através dos programas VFDB⁸ e VirulentPred⁹, sendo que a proteína foi considerada como potencial fator de virulência quando ambos os programas a indicaram como associada à virulência.

As análises *in silico* partiram de 277 proteínas de *M. hyopneumoniae* anotadas como “uncharacterized protein” na base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Dentre estas, aquelas com anotação funcional e associação a virulência preditas foram selecionadas como CDS/proteínas-alvo de interesse para expressão na forma recombinante e posterior caracterização funcional e imunológica. Adicionalmente, critérios como (i) a predominância do caráter hidrofílico da proteína, (ii) a abundância diferencial entre proteínas ortólogas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, e (iii) a relação com função potencialmente vital para *M. hyopneumoniae* foram utilizados para a seleção do alvo para estudo. As propriedades físico-químicas das proteínas selecionadas foram preditas com EXPASY's PROTPARAM (<https://web.expasy.org/protparam/>), para determinação de dados como extensão da sequência primária de aminoácidos e massa molecular.

A CDS de uma das proteínas selecionadas foi então clonada no vetor pET_15b, para expressão heteróloga, como uma proteína recombinante com cauda de histidina amino-terminal, conforme Hao *et al.*¹⁰. Para expressão da proteína recombinante de interesse, foram testadas diferentes linhagens de *Escherichia coli* (*E. coli* BL21 Star (DE3), *E. coli* BL21 pLysE, *E. coli* BL21 CodonPlus Ril e *E. coli* BL21 CodonPlus RP) (GE Healthcare), bem como diferentes concentrações do agente indutor de expressão (IPTG), tempos de indução e temperatura. A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de Ni-agarose (GE Healthcare).

Anotação Funcional

Predição de localização subcelular

PSORTb³, PSLpred⁴ e LOCTree3⁵, HMMTOP⁶, TMHMM⁶ e Phobius⁷

Predição de domínios funcionais

CATH⁸, SUPERFAMILY⁹, INTERPRO¹, CDART¹ e SMART¹⁰

Identificação de ortólogos de função conhecida

BLAST2GO¹

Figura 2 - Detalhamento das análises *in silico* anotação funcional. a) <https://www.psорт.org/psortb/>; b) <http://crdd.osdd.net/raghava/pslpred/>; c) <https://roslab.org/services/loctree3/>; d) <http://www.enzim.hu/hmmtop/>; e) <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; f) <http://phobius.sbc.su.se/>; g) <http://www.cathdb.info/>; h) <http://www.supfam.org/>; i) <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; j) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>; k) <http://smart.embl-heidelberg.de/>; l) <https://www.blast2go.com/>

RESULTADOS

As análises *in silico* resultaram na predição de localização subcelular para 228 (82%) das proteínas analisadas, sendo que a maioria foi predita como localizada na fração citoplasmática (30% das 277). Além disso, foi possível identificar domínios funcionais para 104 proteínas, e a classificação funcional baseada em GO permitiu a identificação de processos biológicos e funções moleculares para 63 proteínas. Foram preditas como associadas à virulência 257 proteínas.

A Figura 2 representa as sobreposições de anotação funcional preditas para o conjunto de proteínas analisadas (277). No total, um conjunto de 86 proteínas preditas como associadas a virulência, com localização subcelular e função predita foi definido como alvo de estudo. Dentre estas proteínas, foram preditas funções importantes para a homeostase bacteriana e patogenidade, como hidrolases, transportadores e proteínas associadas ao processo de oxidação-redução e homeostase redox celular.

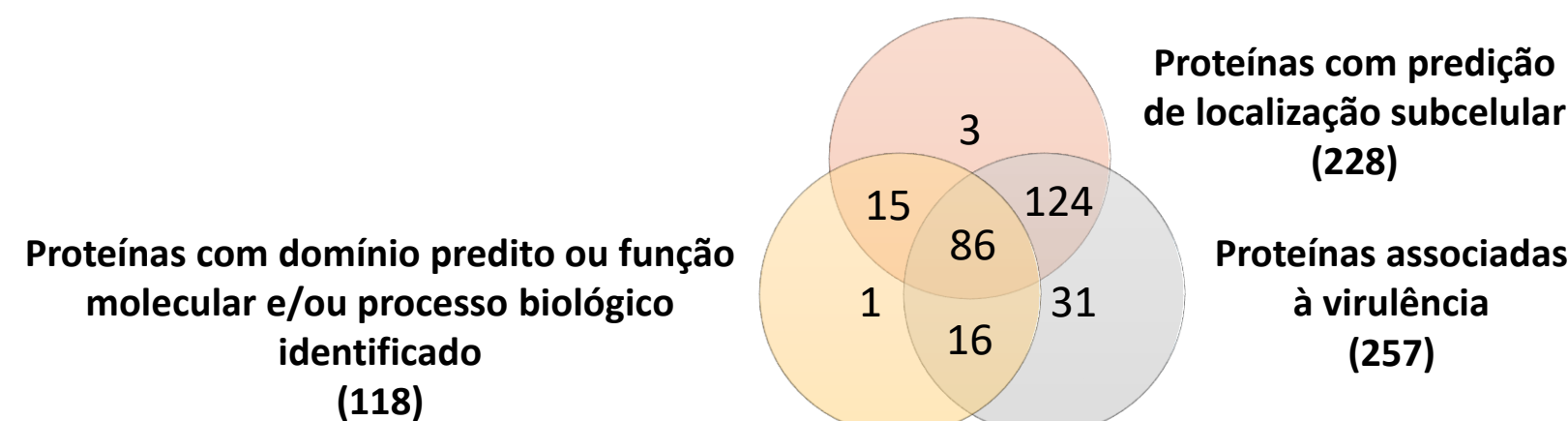


Figura 2 – Diagrama de Venn com o resultado da anotação funcional das proteínas de acordo com o número de proteínas para as quais foram possíveis as predições.

A partir do conjunto de proteínas com possíveis funções preditas, a proteína Mhp7448_0148 foi selecionada para caracterização funcional e imunológica. A expressão da proteína Mhp7448_0148 foi validada experimentalmente por LC-MS/MS por nosso grupo de pesquisa, sendo encontrada como sobrerrepresentada em *M. hyopneumoniae* em relação à sua ortóloga de *M. flocculare*⁶. Além disso, em condições de estresse oxidativo e térmico, esta proteína foi exclusivamente identificada nos repertórios proteicos de *M. hyopneumoniae* 7448 em comparação *M. hyopneumoniae* J¹¹. Estes resultados sugerem que essa proteína atue na proteção de *M. hyopneumoniae* 7448 em situações de estresse, contribuindo para a sobrevivência da bactéria e para o estabelecimento da infecção no hospedeiro suíno. A CDS Mhp7448_0148 é codificadora de uma proteína com 411 resíduos de aminoácidos e 47 kDa, a qual contém um domínio de “heat shock protein 33”, e tendo a localização subcelular na porção citoplasmática e extracelular.

Para produção da Mhp7448_0148 recombinante (rMhp_0148), a linhagem *E. coli* BL21 Star foi selecionada, utilizando 0,1 mM de IPTG, durante 3h à 28°C (Figura 3A). Nas condições padronizadas, a rMhp_0148 se mostrou ainda predominantemente insolúvel. A purificação da proteína recombinante foi então realizada a partir da fração insolúvel do extrato bacteriano, utilizando ureia para solubilização e lavagens com hidrócloro de guanidina. Visto que, nas condições-padrão utilizadas inicialmente a rMhp_0148 permanecia ligada à resina cromatográfica, a sua eluição foi realizada com PBS-SDS 0,1% a 100°C por 10 min (Figura 3B). Com isso, foram obtidas 0,2 mg da rMhp_0148 na forma pura a partir de 100 ml de cultivo.

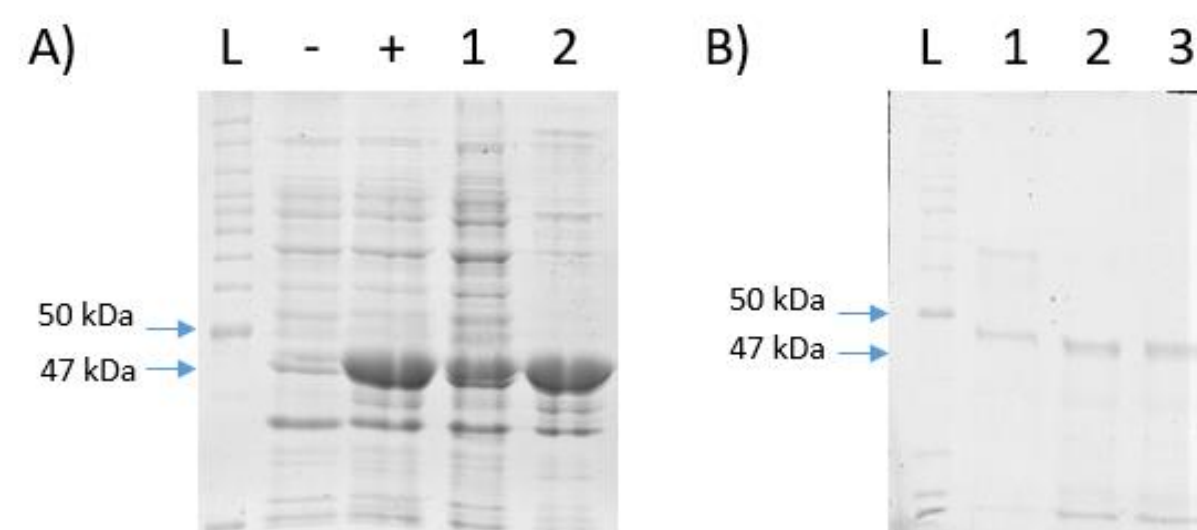


Figura 3 – A) Expressão da proteína recombinante em *E. coli* BL21 (DE3) Star. Marcador (L), não induzido (-), induzido (+), fração solúvel (1), fração insolúvel (2). B) Purificação da proteína recombinante por fervura da resina. Marcador (L), após submeter a amostra a 10 min a 100°C pela primeira vez (1), segunda (2) e terceira vez (3).

PERSPECTIVAS

- Produção da rMhp_Hsp33 em quantidades maiores, para os ensaios de caracterização imunológica.
- Avaliação da imunogenicidade da rMhp_0148 a partir da resposta imunológica humoral e celular induzida em camundongos.
- Avaliação da antigenicidade da rMhp_0148 com soros de suínos infectados com *M. hyopneumoniae*.
- Padronização de protocolos para produção da proteína recombinante na forma nativa, para ensaios funcionais.
- Padronização de ensaio para avaliação da possível atividade de chaperona da rMhp_0148.

REFERÊNCIAS

- MAES, D. *et al.* Update on Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis*, 2018.
- KAMMINGA, T. *et al.* Metabolic modeling of energy balances in Mycoplasma hyopneumoniae shows that pyruvate addition increases growth rate. *Biotechnol Bioeng*, 2017.
- VASCONCELOS, A. T. *et al.* Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of Mycoplasma hyopneumoniae and a strain of Mycoplasma flocculare. *Bacteriol*, 2005.
- SIQUEIRA, F. M. *et al.* New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics*, 2013.
- PINTO, P. M. *et al.* Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen Mycoplasma hyopneumoniae. *Proteome Sci*, 2009.
- PAES, J. A. *et al.* Comparative proteomics of two Mycoplasma hyopneumoniae strains and Mycoplasma flocculare identified potential porcine enzootic pneumonia determinants. *Virulence*, 2018.
- SHAHBAAZ, M. *et al.* In silico approaches for the identification of virulence candidates amongst hypothetical proteins of Mycoplasma pneumoniae 309. *Comput Biol Chem*, 2015.
- CHEN, L. *et al.* VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*, 2005.
- GARG, A.; GUPTA, D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. *BMC Bioinformatics*, 2008.
- HAO, Y. *et al.* Expression, purification, and in vitro characterization of kinase domain of NGCN2 from tobacco. *Protein Expr Purif*, 2019.
- PAES, J. A. *et al.* Differential responses to stress of two Mycoplasma hyopneumoniae strains. *J Proteomics*, 2019.