

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Caracterização estrutural e funcional de um homólogo à
exotoxina esfoliativa D de *Staphylococcus aureus*
envolvido na mastite subclínica de pequenos ruminantes**

Natayme Rocha Tartaglia

ORIENTADORA: **Dra. Núbia Seyffert**

COORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

Belo Horizonte

2014

Natayme Rocha Tartaglia

**Caracterização estrutural e funcional de um homólogo à
exotoxina esfoliativa D de *Staphylococcus aureus*
envolvido na mastite subclínica de pequenos ruminantes**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADORA: Dra. Núbia Seyffert

COORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Belo Horizonte

2014

DEDICATÓRIA

À minha mãe, pela parceria, apoio e suporte
incondicional

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)** e ao Instituto de Ciências Biológicas.

À **Dr^a Núbia Seyffert**, pela orientação e apoio na realização do presente trabalho.

Ao **Prof. Dr. Vasco Azevedo**, pelos ensinamentos, motivação, confiança e oportunidade em compor o grupo do Laboratório de Genética Celular e Molecular.

Ao **Dr. Yves Le Loir**, pelo apoio e colaboração no presente trabalho.

Aos componentes da **banca examinadora**, por aceitarem o convite.

À coordenação, professores e colegas do curso de **Pós-Graduação em Genética** do ICB/UFMG.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

Um agradecimento especial a **Karina Santana** e **Renata Faria**, pelos ensinamentos, apoio, parceria e risadas, dentro e fora do laboratório.

Aos meus colegas e amigos do **LGCM**, que sempre foram tão esclarecedores e solícitos, Thiago Castro, Dayana Ribeiro, Camila Prósperi, Pâmela Mancha, Bianca Souza, Flávia Rocha, Kátia Moraes, Rachid Aref, Alfonso Gala-García, Tessália Saraiva, Wanderson Marques, Mariana Santana, Anne Pinto, Sara Silva, Priscilla Bagano, Camila Azevedo, Meritxell Zurita, Marcela Pacheco, Fernanda Dorella, Rodrigo Dias, Tatiane Preisser, Vanessa Bastos.

Aos meus colegas e amigos **bioinformatas do LGCM**, sempre tão queridos, Letícia de Castro, Luis Guimarães, Carlos Diniz, Alberto Junior, Edgar Aguiar, Lucas Amorim, Diego Mariano, Thiago Sousa, Siomar Soares, Edson Folador, Flávia Figueira, Ulisses Pereira, Leandro Benevides, Marcus Canário, Syed Shah Hassan, Sandeep Tiwari, Syed Babar Jamal.

À **Fernanda Magalhães**, pelo apoio e dedicação ao grupo.

Ao **Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni** e ao **Ricardo Mariutti** do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) pela colaboração.

À **Tatiana Silveira** e **Suellen Batistoni** do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas pela imensa ajuda.

Ao **Vinícius França**, pelo apoio, compreensão e carinho.

Aos meus **grandes amigos**, Cinthia Vila Nova, Jamille Fernandes, Patrícia Benedet, Gustavo Costa e José Porto, que estão sempre comigo, alegrando minha vida independente da distância.

À minha **família**, minha mãe **Jailda**, meus irmãos Mário Junior e Jerilee, e minhas primas lindas Sabrina Tartaglia e Daniele Tartaglia.

À todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho. **Muito obrigada!**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações.....	xiv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Mastite.....	1
1.1.1. Considerações gerais.....	1
1.1.2. Patogênese.....	4
1.1.3. Epidemiologia.....	7
1.1.4. Diagnóstico e tratamento.....	8
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>.....	9
1.2.1. Aspectos microbiológicos gerais.....	9
1.2.2. Determinantes moleculares de virulência e patogenicidade.....	10
1.2.2.1. Adesão Celular e Toxinas estafilocócicas.....	14
1.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> na mastite.....	17
1.3. Ferramentas genéticas para a produção de proteínas heterólogas.....	19
1.3.1. Bactérias Lácticas.....	19
1.3.1.1. Aspectos microbiológicos gerais e utilizações biotecnológicas de <i>Lactococcus lactis</i>	19
1.3.1.2. Sistema de expressão e endereçamento celular de proteínas heterólogas.....	20
1.3.2. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>.....	21
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
3.2.1. Análises bioinformáticas.....	24
3.2.2. Clonagem molecular e expressão da proteína recombinante.....	24
3.2.2.1. Estratégia I.....	24
3.2.2.2. Estratégia II.....	24
3.2.3. Avaliação da proteína <i>in vivo</i>.....	24

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Ferramentas de bioinformática.....	25
4.2. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo.....	26
4.3. Eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida.....	27
4.4. Clonagem molecular e expressão da proteína recombinante.....	28
4.4.1. Estratégia I.....	28
4.4.1.1. Manipulação do DNA de <i>S. aureus</i>	28
4.4.1.1.1. Extração do DNA genômico.....	28
4.4.1.1.2. Construção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	29
4.4.1.1.3. Isolamento da <i>ORF</i> SAO46_1347.....	29
4.4.1.2. Clonagem no sistema pGEM-T Easy Vector.....	30
4.4.1.2.1. Preparação de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i> TOP10...30	
4.4.1.2.2. Transformação bacteriana em <i>E. coli</i>	30
4.4.1.2.3. Extração do DNA plasmídiano de <i>E. coli</i> em pequena escala.....	32
4.4.1.2.4. Confirmação da <i>ORF</i> O46_2740 no vetor pGEM-T Easy Vector.....	33
4.4.1.3. Subclonagem no sistema de expressão XIES.....	33
4.4.1.3.1. Digestão enzimática do vetor pXyIT:SEC:nuc.....	33
4.4.1.3.2. Purificação do fragmento de DNA correspondente ao pXyIT:SEC.....	34
4.4.1.3.3. Digestão enzimática do pGEM-TEasy Vector ligado a <i>ORF</i> O46_2740.....	34
4.4.1.3.4. Purificação do fragmento de DNA correspondente ao ETD-like digerido.....	35
4.4.1.3.5. Ligação do inserto O46_2740 no vetor pXyIT:SEC e transformação em <i>E. coli</i> TOP10.....	35
4.4.1.3.6. Confirmação dos clones recombinantes.....	36
4.4.1.3.7. Transformação em <i>L. lactis</i> NCDO2118.....	37
4.4.1.3.7.1. Células eletrocompetentes de <i>L. lactis</i> NCDO2128 e transformação com o plasmídeo pXyIT:SEC:ETD- like.....	37
4.4.1.3.7.2. Extração do DNA plasmídiano de <i>L. lactis</i> em pequena escala.....	37
4.4.1.3.7.3. Confirmação dos clones de <i>L. lactis</i> NCDO2128.....	38
4.4.1.4. Produção da proteína heteróloga ETD-like.....	38

4.4.1.4.1.	Indução da produção da proteína heteróloga em <i>L. lactis</i> NCDO2118 e extração de proteínas.....	38
4.4.1.4.2.	Extração de proteínas do sobrenadante de <i>S. aureus</i> O46 e O11.....	39
4.4.1.4.3.	<i>Western blotting</i>	39
4.4.2.	Estratégia II	40
4.4.2.1.	Síntese da <i>ORF</i> O46_1347 de <i>S. aureus</i> e preparação do vetor.....	40
4.4.2.2.	Transformação bacteriana nas linhagens de expressão.....	41
4.4.2.3.	Avaliação da expressão da ETD-like.....	41
4.4.2.3.1.	Indução da expressão gênica em pequena escala em <i>E. coli</i>	41
4.4.2.3.2.	Teste de solubilidade.....	41
4.4.2.4.	Indução da expressão gênica em larga escala em <i>E. coli</i> e tratamento das amostras.....	42
4.4.2.5.	Purificação da proteína ETD-like no sistema AKTAprime e diálise.....	43
4.4.2.6.	<i>Western blotting</i>	43
4.5.	Ensaio <i>in vivo</i>	43
5.	RESULTADOS	45
5.1.	Análises <i>in silico</i>	45
5.2.	Clonagem e expressão da proteína recombinante	52
5.2.1.	Estratégia I	52
5.2.1.1.	Clonagem molecular do inserto no sistema pGEM-T Easy Vector e confirmação dos clones recombinantes.....	52
5.2.1.2.	Clonagem molecular do inserto no sistema XIES e confirmação dos clones recombinantes.....	54
5.2.1.3.	Obtenção das linhagens de <i>L. lactis</i> recombinantes.....	57
5.2.2.	Estratégia II	58
5.2.2.1.	Comparação da expressão entre as linhagens de <i>E. coli</i>	58
5.2.2.2.	Purificação da proteína ETD-like no sistema AKTAprime.....	63
5.2.2.3.	Confirmação da expressão da ETD-like.....	67
5.3.	Avaliação da atividade esfoliativa da ETD-like recombinante <i>in vivo</i>	68
6.	DISCUSSÃO	70
7.	CONCLUSÕES	75
8.	PERSPECTIVAS	75

9. REFERÊNCIAS.....	76
10. ANEXOS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etiologia de infecções intramamárias subclínicas em ovinos.....	2
Figura 2. Esquema evidenciando um alvéolo mamário e um vaso sanguíneo adjacente.....	5
Figura 3. Representação esquemática do processo infeccioso no úbere.....	6
Figura 4. Fatores patogênicos de <i>S. aureus</i> , evidenciando o papel das proteínas estruturais e secretadas como fatores de virulência.....	11
Figura 5. Estrutura desmossomal.....	15
Figura 6. Estrutura molecular da Dsg1 na epiderme humana.....	16
Figura 7. Representação do vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	32
Figura 8. Representação esquemática do plasmídeo pXyIT:SEC:Nuc, sistema XIES para endereçamento extracelular de proteínas.....	34
Figura 9. Representação esquemática do plasmídeo pXyIT:SEC:ETD-like, sistema XIES para endereçamento extracelular de proteínas.....	36
Figura 10. Representação esquemática do vetor pD441-NH:136826, sintetizado pela empresa DNA2.0 com o inserto correspondente a ETD-like otimizado para expressão em <i>E. coli</i>	40
Figura 11. Alinhamento entre as sequências da ETD-like, ETD, ETB, ETA e Glutamil endopeptidases de <i>S. aureus</i>	46
Figura 12. Predição do peptídeo sinal da proteína ETD-like através do programa SignalP 4.1.....	47
Figura 13. Predição dos domínios transmembrânicos através do programa TMHMM2.0.....	48
Figura 14. Representação gráfica dos domínios identificados na ETD-like por InterProScan5.....	48
Figura 15. Modelo tridimensional da ETD-like obtida através do Modeller9.12 e visualizada pelo PyMol.....	49
Figura 16. Conformação do polipeptído ETD-like.....	50
Figura 17. Gráfico de Ramachandran obtida através do programa PROCHECK.....	51
Figura 18. Representação gráfica da estrutura secundária no modelo tridimensional construído e resíduos correspondentes.....	51
Figura 19. Análise da extração de DNA genômico das linhagens bacterianas de <i>S. aureus</i> O46 e O11 e avaliação do produto de amplificação por PCR da sequência correspondente a ETD-like.....	52
Figura 20. Avaliação do produto da PCR purificado e amplificação por PCR do inserto ETD-like utilizando como molde o DNA plasmidiano extraído de células <i>E. coli</i> TOP10 eletrocompetentes transformadas com o vetor pGEM:ETD-like.....	53

Figura 21. Confirmação da obtenção do clone por digestão enzimática do vetor pGEM:ETD-like com a enzima de restrição <i>EcoRI</i>	54
Figura 22. Digestões enzimáticas com <i>NsiI</i> e <i>XhoI</i> para purificação do inserto ETD-like e do vetor XIES.....	55
Figura 23. Amplificação por PCR da <i>ORF O46_2740</i> a partir de DNA plasmidiano extraído de células <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com o plasmídeo p <i>XylT</i> :SEC:ETD-like e digestão enzimática do DNA plasmidiano com as enzimas <i>NsiI</i> e <i>XhoI</i> , com liberação do inserto ETD-like.....	56
Figura 24. Sequenciamento da construção p <i>XylT</i> :SEC:ETD-like.....	56
Figura 25. Amplificação por PCR da <i>ORF O46_2740</i> a partir de DNA plasmidiano extraído de <i>L. lactis</i> NCDO2118 transformadas com o plasmídeo p <i>XylT</i> :SEC:ETD-like e digestão enzimática do DNA plasmidiano com as enzimas <i>NsiI</i> e <i>XhoI</i> , com liberação do inserto ETD-like.....	57
Figura 26. Avaliação da expressão da ETD-like em um dos clones obtidos da linhagem <i>L. lactis</i> NCDO2128 transformada com o vetor p <i>XylT</i> :SEC:ETD-like e o <i>Western blotting</i> correspondente.....	58
Figura 27. Avaliação da expressão da ETD-like nas linhagens de <i>E. coli</i> OverExpress™ C43, C43pLysS após 5h.....	59
Figura 28. Avaliação da expressão da ETD-like nas linhagens de <i>E. coli</i> OverExpress™ C41, C41pLysS.....	60
Figura 29. Avaliação da expressão da ETD-like na linhagem de <i>E. coli</i> BL21 Star™(DE3).....	60
Figura 30. Avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante ETD-like nas linhagens OverExpress™ C43(DE3)pLysS e BL21 Star™(DE3).....	61
Figura 31. Avaliação da solubilidade da proteína recombinante ETD-like após expressão nas linhagens C43(DE3)pLysS e BL21 Star™(DE3).....	62
Figura 32. Indução em larga escala da proteína ETD-like na linhagem C43(DE3)pLysS e da proteína PknG na BL21 Star™(DE3).....	63
Figura 33. Cromatografia de afinidade da proteína ETD-like (uréia 8M).....	64
Figura 34. Frações da purificação ETD-like.....	64
Figura 35. Verificação das amostras tratadas antes da etapa de purificação.....	65
Figura 36. Cromatografia de afinidade da proteína ETD-like (sem uréia).....	66
Figura 37. Cromatografia de afinidade da proteína PknG.....	66
Figura 38. Frações da purificação das proteínas ETD-like e PknG.....	67
Figura 39. Western blotting da ETD-like purificada.....	68
Figura 40. Avaliação <i>in vivo</i> da injeção subcutânea da ETD-like purificada em camundongos Balb/c neonatos.....	68

Figura 41. Neonato (24 horas) após 4 horas da injeção subcutânea de 80 µg da ETD-like purificada.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios utilizados na definição da intensidade dos sintomas da mastite.....	3
Tabela 2. Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados para a clonagem e expressão do ETD-like em <i>L. lactis</i> e <i>E. coli</i>	26
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores.....	29
Tabela 4. ProtParam - predição de parâmetros físico-químicos.....	45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

- °C - Grau Celsius
- Agr** - Regulador de Genes Acessórios
- Amp** - Ampicilina
- BHI** - Meio de Cultura Infusão de Cérebro e Coração
- BL** - Bactéria Láctica
- BLAST** - *Basic Local Alignment Search Tool*
- BSA** - Albumina sérica bovina
- CCS** - Contagem de células somáticas
- CDS** - Sequências codificadoras
- CFU** - Unidades Formadoras de Colônias
- Clf** - Fator de agregação
- Cm** - Cloranfenicol
- CMT** – Califórnia Mastite Teste (*California Mastitis Test*)
- D**- Ácido aspártico
- DNA** - Ácido Desoxirribonucléico
- dNTPs** - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- DO** - Densidade Óptica
- DP** - Desmoplaquina
- Dsc** - Desmocolina
- Dsg** - Desmogleína
- DTS** - Sequência de Endereçamento Nuclear
- DTT** - Ditioneitol
- EA** - Domínio extracelular de ancoramento (desmogleína)
- EC** - Repetições extracelulares de caderina (desmogleína)
- Edin-B** - *Epidermal Cell Differentiation Inhibitor-B*
- EDTA** - Ácido Etilenodiaminotetracético
- EMBL** - *European Molecular Biology Laboratory*
- EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
- ETs** - Toxinas esfoliativas
- FnBPs** - Proteínas de ligação a Fibronectina
- g** - Grama
- GRAS** - Geralmente reconhecido como seguro (*Generally Regarded As Safe*).
- H** - Histidina
- H** - Hora

H₂O - Água

hlg - Gene codificador da γ -hemolisina

IA - Domínio intracelular de ancoramento (desmogleína)

IgG - Imunoglobulina G

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IMI - Infecções intramamárias

IPTG - Isopropil- β -galactosídeo

Isd - Determinante de superfície regulado por ferro

kb - Quilobases

KCl - Cloreto de potássio

kDa - Quilodaltons

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

KHZ - Kiloherztz

kV - Kilovolt

L - Litro

LB - Meio de Cultura Luria-Bertani

LDH - Lactato desidrogenase

LPS - Lipopolissacarídeo

LTA - Ácido lipoteicóico

M - Molar

M17 - Sac-Gli - Meio de Cultura M17 Sacarose Glicose

mA - Miliamperagem

mg - Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MGE - Elementos genéticos móveis

MgSO₄ - Sulfato de Magnésio

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

min - minutos

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MAS - Alinhamento múltiplo de sequências

MSCRAMMs - Moléculas adesivas da matriz reconhecedoras de componentes da superfície

mTSS - Síndrome do choque tóxico menstrual

Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico

NaCl - Cloreto de Sódio

NAGase - N-acetil- β -D-glucosaminidase

NaH₂PO₄ - Fosfato monossódico
NaOH - Hidróxido de Sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng - Nanograma
NiSO₄ - Sulfato de níquel
NK - *Natural killers*
nm - Nanômetro
NMC - *National Mastitis Council*
nuc - Nuclease
ORF - Fase de leitura aberta (*Open reading frame*)
PACA - Provence-Alpes-Côte d'Azur
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
pb - Pares de Bases
PBS - Tampão fosfato salina
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PDB - *Protein Data Bank*
PEG3000 - Polietileno Glicol 3000
PFGE - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
Pg - Placoglobinas
PGN - Peptidoglicano
pH - Potencial Hidrogeniônico
PI - Ponto isoelétrico
PknG – Proteína quinase G
PKP - Placofilinas
PMNs - Neutrófilos polimorfonucleares
pmol - Picomol
PMSF - Fenil-metil sulfonil fluoreto
PVL – Leucocidina de Pantan-Valentine
q.s.p. - Quantidade suficiente para
RBS - Sítio de ligação do ribossomo
rpm - Rotação por minuto
s - Segundos
S - Serina
SAg - Superantígenos
SCN - *Staphylococcus spp.* coagulase negativa
SDS - Dodecilsulfato de Sódio
SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SE - Enterotoxinas

SERPA - Análises sorológicas do proteoma (*Serological proteome analysis*)

ShETs - Toxinas esfoliativas produzidas por *Staphylococcus hyicus*

SP - Peptídeo sinal

spa - Gene que codifica a proteína A

SSSS - Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica

TBE - Tris-Borato-EDTA

TCA - Ácido tricloroacético

TE-LYS - Tris-EDTA-Lisozima

TLR2 - Receptor *Toll-like 2*

TNF- α - Fator de necrose tumoral

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

TSST-1 - Toxina da Síndrome do Choque Tóxico

U - Unidades

UFC - Unidade Formadora de Colônia

Uniprot - *Universal Protein Resource*

V - Volts

W - Watts

XIES - *Xylose-Inducible Expression System*

μ F - Microfarad (capacitância)

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

μ m - Micrômetro

μ M - Micromolar

Ω - Ohm (resistência)

RESUMO

A mastite é a mais comum e cara doença que afeta o gado leiteiro, sendo o *Staphylococcus aureus* o micro-organismo mais frequentemente isolado de casos clínicos dessa infecção. A enfermidade é caracterizada pela inflamação da glândula mamária, com sintomas locais que podem resultar em infecção sistêmica. Uma melhor compreensão dos fatores envolvidos na patogenicidade, assim como da resposta do hospedeiro à infecção por esse micro-organismo, são pontos essenciais para o desenvolvimento eficiente e satisfatório de terapias que permitam prevenir e combater a mastite. Embora considerado um patógeno oportunista, certas linhagens de *S. aureus* são mais aptas a causar patologias do que outras, devido a grande variedade de fatores de virulência associados a eles. Sendo assim, através de análises sorológicas do proteoma (SERPA), que permitem a identificação de proteínas imunorreativas diferencialmente expressas, o perfil patogênico das linhagens *S. aureus* O46, característica de mastite subclínica, e *S. aureus* O11, característica de uma mastite gangrenosa, foi avaliado. Baseado nesses dados, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar uma proteína, codificada pela *ORF* O46_2740, imunoreativa somente na *S. aureus* O46 e homóloga a toxina esfoliativa D. Essa toxina é descrita como epidermiolítica e já foi associada a formação de impetigo bolhoso e síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS). O modelo tridimensional por homologia da *ORF* O46_2740 foi elaborado *in silico*, utilizando um molde ETB depositado em bancos de dados. Para a caracterização *in vivo*, construímos linhagens recombinantes de *L. lactis* na forma secretada, utilizando o sistema de expressão XIES, induzido por xilose. Os clones foram avaliados por imunodeteção e não foi possível confirmar a expressão nesse sistema. Como alternativa, a *ORF* foi sintetizada com códons preferenciais para *E. coli* e avaliado em cinco linhagens de expressão, o qual uma obteve melhor resultado. A ETD-like foi purificada e posteriormente confirmada por *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His. A fração solúvel foi dosada e aplicada no dorso de camundongos neonatos Balb/c para avaliação da formação de bolhas e esfoliação característica da toxina. Os resultados preliminares da avaliação *in vivo* apontam reações bolhosas, porém, novos ensaios são necessários para corroborar a atividade esfoliativa.

ABSTRACT

Mastitis is the most common and costly disease affecting dairy cattle, being *S. aureus* the most frequently isolated microorganism from clinical cases of this infection. This disease is characterized by inflammation of the mammary gland, with local symptoms that can result in systemic infection. A better understanding of the factors involved in pathogenicity, as well as the host response to infection by this microorganism, are key points for an efficient and satisfactory development of therapies to prevent and combat mastitis. Although considered an opportunistic pathogen, certain strains of *S. aureus* are more prone to cause pathologies than others, due to the variety of virulence factors associated to them. Through serological proteome analysis (SERPA) that enables the identification of differentially expressed immunoreactive proteins, the pathogenic profiles of *S. aureus* strains O46 - characteristic of subclinical mastitis - and O11 - characteristic of gangrenous mastitis - were evaluated. Based on these data, the aim of this study was to characterize a protein, encoded by the ORF O46_2740, immunoreactive only in *S. aureus* O46 and homologous to exfoliative toxin D. This protein is considered epidermolytic toxin and was associated to bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS). A three-dimensional homology model was designed *in silico* using an ETB mold deposited in databases. For *in vivo* characterization we obtained recombinant strains of *L. lactis* containing the ORF O46_2740 coupled with the XIES expression system, but Western blotting did not confirm the production of ETD-like protein. Alternatively, the ORF was introduced in *E. coli* under control of T5 promoter, and the expression of ETD-like was successfully confirmed by Western blotting. ETD-like was purified using anti-His monoclonal antibody and applied on the back of newborn Balb/c mice to evaluate its effects on the skin. Preliminary results of *in vivo* assessment indicated the formation of bullous reactions also caused by the epidermolytic activity of *S. aureus* ETD; however, no exfoliative activity was observed.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mastite

1.1.1. Considerações gerais

A mastite é uma inflamação da glândula mamária (Bradley, 2002), com sintomas locais e que ocasionalmente pode resultar em infecção sistêmica, em bovinos e pequenos ruminantes (Le Maréchal *et al.*, 2011). Os agentes etiológicos que causam a mastite são classificados como contagiosos ou ambientais, sendo que, as bactérias patogênicas contagiosas são organismos adaptados a sobreviver e multiplicar dentro do hospedeiro, em particular dentro da glândula mamária (Bradley, 2002; Dego *et al.*, 2002). Este grupo é composto por micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, vários micoplasmas e *Arcanobacterium spp.* Nas bactérias patogênicas ambientais, a sua presença na glândula mamária ocorre principalmente pela contaminação do úbere, sendo incluído nesse grupo micro-organismos como *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus spp* (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Entre os agentes etiológicos mais comuns na mastite, destacam-se *S. aureus*, *E. coli* e outras espécies do gênero *Streptococci*, como *S. agalactiae* (Keefe, 2012; Le Maréchal *et al.*, 2011b). Os diferentes micro-organismos envolvidos na infecção podem desencadear variáveis formas clínicas da mastite, assim como manifestações assintomáticas, denominadas subclínicas (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Em pequenos ruminantes, *S. aureus* é o principal agente associado à mastite clínica, enquanto *Staphylococcus ssp.* coagulase negativo (SCN) a mastite subclínica, com uma prevalência variando de 25 a 93% (Figura 1) (Le Maréchal *et al.*, 2011b; Bergonier *et al.*, 2003). Os critérios utilizados para a classificação da gravidade podem ser visualizados na Tabela 1. Essa variabilidade é identificada, por exemplo, dentro do mesmo rebanho leiteiro, onde é possível identificar animais sadios, assim como aqueles infectados em somente um quarto mamário, chegando aos quatro quartos mamários infectados (Barkema *et al.*, 1997; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Além do caráter infeccioso dessa patologia, trauma mecânico, térmico e químico podem também predispor à infecção da glândula mamária (Zhao e Lacasse, 2008).

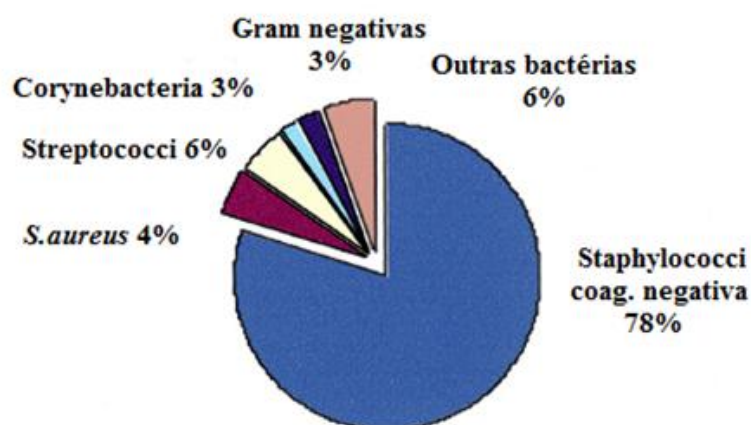


Figura 1: Etiologia de infecções intramamárias subclínicas em ovinos (adaptado Bergonier et al., 2003).

A mastite clínica, segundo o *National Mastitis Council* (NMC/2006), é caracterizada por anormalidades visíveis no leite, com floculação, coágulos e aparência aquefeita, ou no úbere, com calor, inchaço e sensibilidade ao toque. A mastite subclínica é tipicamente manifestada com uma elevação na contagem de células somáticas (CCS) (leucócitos, sendo predominantes neutrófilos, e células epiteliais) de leite obtido por um quarto afetado, sendo uma importante causa para o decréscimo na produção leiteira (Bradley, 2002; Oviedo-Boyso et al., 2007). O motivo de alguns casos permanecerem como subclínicos, enquanto outros evoluem para manifestações gangrenosas ainda não é conhecido (Vautor et al., 2009). Dentre os fatores que podem influenciar a susceptibilidade do hospedeiro a infecções intramamárias destacam-se: a paridade, a nutrição, o estágio de lactação, a produção de leite e a raça (Oviedo-Boyso et al., 2007). A gestação, o parto e a lactação afetam mecanismos de defesa do hospedeiro associados a mudanças no perfil hormonal e metabólico, assim como o estresse fisiológico, que proporcionam um aumento na prevalência de doenças no período periparturiente (Mallard et al., 1998; Wagter et al., 2000). A acumulação de fluídos dentro da glândula mamária de parturientes resulta em elevação de sua pressão e uma maior vulnerabilidade da glândula, causada pela dilatação do canal do úbere. Além disso, durante a ordenha, a camada de queratina é liberada e o esfíncter precisa de aproximadamente 2 horas para retornar ao estado contraído normal (Viguiet et al., 2009).

Tabela 1: Critérios utilizados na definição da intensidade dos sintomas da mastite.

Gravidade	Identificação IDF¹	CCS²	Sintomas locais	Sintomas gerais
Gangrenosa		↑↑	A glândula mamária torna-se vermelha, e em seguida, apresenta necrose tecidual. As veias que drenam o quarto gangrenoso apresentam trombose.	Rápido desenvolvimento, diarreia, claudicação, dificuldades de respiração, animais desidratados, com febre e anorexia
Clínica severa	Inflamação do úbere. Início súbito, com sintomas sistêmicos e graves.	↑↑	Inchaço, vermelhidão, calor e dor	Pulso rápido, depressão, fraqueza e perda de apetite
Piogênica		↑	Presença de nódulos, abscessos ou cicatrizes	Não
Clínica média	Anomalias visíveis no leite, geralmente coágulos ou flocos. Pouco ou nenhum sinal de inchaço na glândula mamária ou doença sistêmica.	↑	Pode apresentar uma úbere quente ou sensível, porém, pode haver sinais de inchaço	Não
Subclínica	A inflamação da glândula mamária não é visível e requer um teste de diagnóstico para a detecção	↑	Não	Não

Adaptado: Le Maréchal *et al.*, 2011c

¹: *International Dairy Federation: Suggested Interpretation of Mastitis Terminology. Bull Int Dairy Fed 1999, 338:3-20*

²: CCS: Contagem de células somáticas

Após o parto, a produção de leite dura aproximadamente 305 dias em vacas, 160 dias em ovinos, 280 dias em cabras e 245 dias em búfalos. A produção de leite varia no curso da lactação, sendo maior no período de 3-8 semanas após o nascimento (em vacas leiteiras) e diminui gradualmente. Posteriormente, o animal passa por um período seco, repouso que ocorre antes da próxima lactação (Le Maréchal, 2010).

De modo geral, com os efeitos da infecção têm-se a perda temporária ou permanente da produção de leite. Em vacas leiteiras, essa redução é observada pelo menos 1 semana antes da mastite clínica ser diagnosticada. Em ovinos, essa redução varia de 3%

a 10% e depende do patógeno causador e do caráter uni ou bilateral da mastite (Le Maréchal *et al.*, 2011b). As ovelhas saudáveis produzem 880mL de leite por dia enquanto as ovelhas com mastite unilateral produzem 803mL/dia e com mastite bilateral produzem 791mL/dia (Gonzalo *et al.*, 2002). Além disso, a qualidade do leite é afetada, uma vez que a redução no teor de gordura resulta em produtos lácteos com propriedades organolépticas menos favoráveis (Viguiet *et al.*, 2009). Em decorrência da infecção, ocorre um aumento nos níveis de proteínas do soro do leite (albumina sérica e IgG), além de sódio, e uma redução no nível de lactose (exceto em leite de cabras) (Le Maréchal *et al.*, 2011b).

1.1.2. Patogênese

Em geral, a mastite infecciosa é caracterizada por três estágios, que incluem a invasão do patógeno, a infecção e a inflamação (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). A principal forma de propagação ocorre através do contato entre animais infectados e não infectados, sendo o canal do úbere a única via de entrada para a glândula (Keefe, 2012). Normalmente, o canal do úbere é fechado por esfíncteres, que impedem a entrada dos agentes patogênicos, além da camada de queratinócitos, que fornecem uma adicional barreira física contra a migração de micro-organismos (Craven e Williams, 1985; Viguiet *et al.*, 2009). Nessa camada de queratina encontram-se ácidos graxos esterificados e não esterificados (ácido mirístico, ácido palmitoléico e ácido linoléico) que são bacteriostáticos, assim como proteínas catiônicas, que podem ligar-se eletrostaticamente a patógenos e alterar suas paredes celulares para uma maior susceptibilidade a pressão osmótica (Sordillo e Streicher, 2002).

Uma vez que as bactérias consigam penetrar na glândula mamária, elas colonizam a cisterna do úbere, onde se multiplicam e estabelecem o processo infeccioso. A segunda linha de defesa do hospedeiro está na ativação da resposta imune e conseqüentemente o aparecimento dos sintomas no animal (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Viguiet *et al.*, 2009).

A imunidade inata predomina na fase inicial da infecção, sendo mediada por macrófagos, neutrófilos, células *natural killers* (NK) e citocinas (Sordillo e Streicher, 2002). Estruturas da parede celular dos micro-organismos patogênicos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são reconhecidos pelos receptores *Toll-like* (TLRs) (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007), sendo o recetor TLR2 associado ao reconhecimento do ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicano (PGN) de bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* (Takeuchi *et al.*, 2000).

Durante uma fase precoce da infecção, ocorre uma migração de neutrófilos da corrente sanguínea para o leite, sendo que, se a infecção persistir, este infiltrado celular que inicialmente era constituído por 95% de neutrófilos, passa a apresentar células mononucleares, como linfócitos T e monócitos (Rainard e Riollot, 2006). Enquanto os macrófagos reconhecem o micro-organismo, eles produzem citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β), que estimulam a atividade bactericida dos neutrófilos (Figura 2) e também produzem prostaglandinas e leucotrienos, que elevam a reação inflamatória local (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

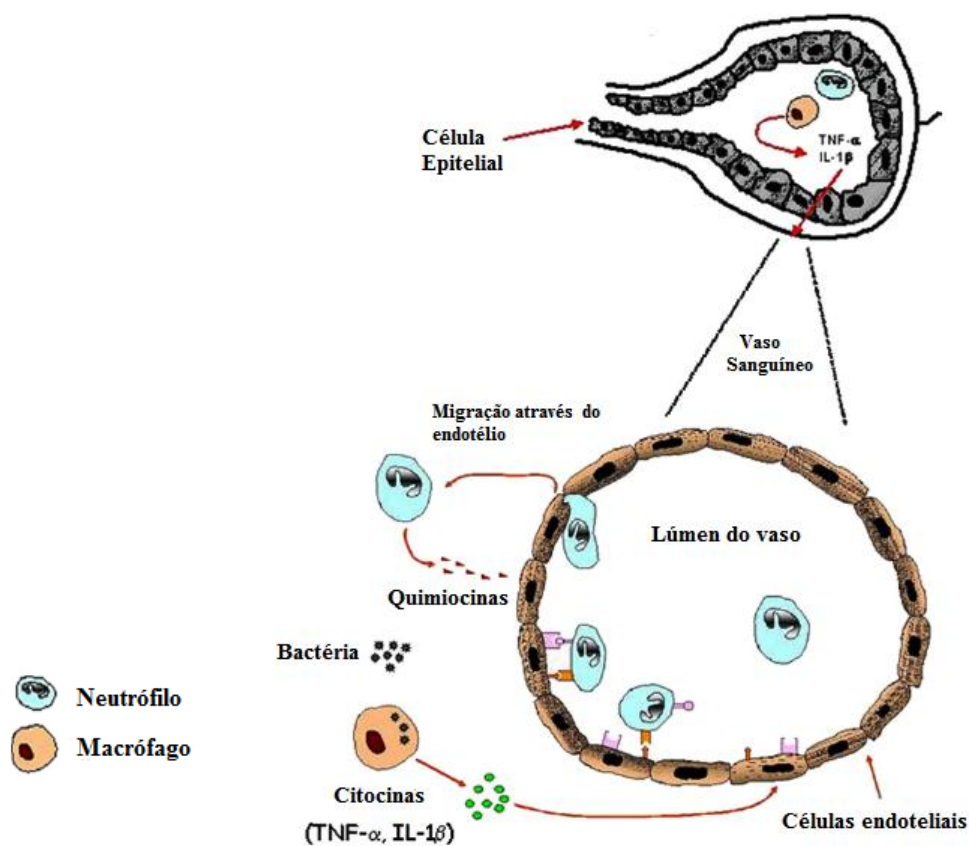


Figura 2: Esquema evidenciando um alvéolo mamário e um vaso sanguíneo adjacente. As células endoteliais dos vasos sanguíneos adjacentes aos alvéolos expressam moléculas de adesão em resposta a citocinas pró-inflamatórias, que facilitam o recrutamento de neutrófilos da corrente sanguínea para o local da infecção (adaptado Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

A migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) da corrente sanguínea para o tecido da glândula mamária ocorre devido à adesão dos micro-organismos nas células epiteliais, assim como em resposta as citocinas pró-inflamatórias (Figura 3) (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Rainard e Riollot, 2006).

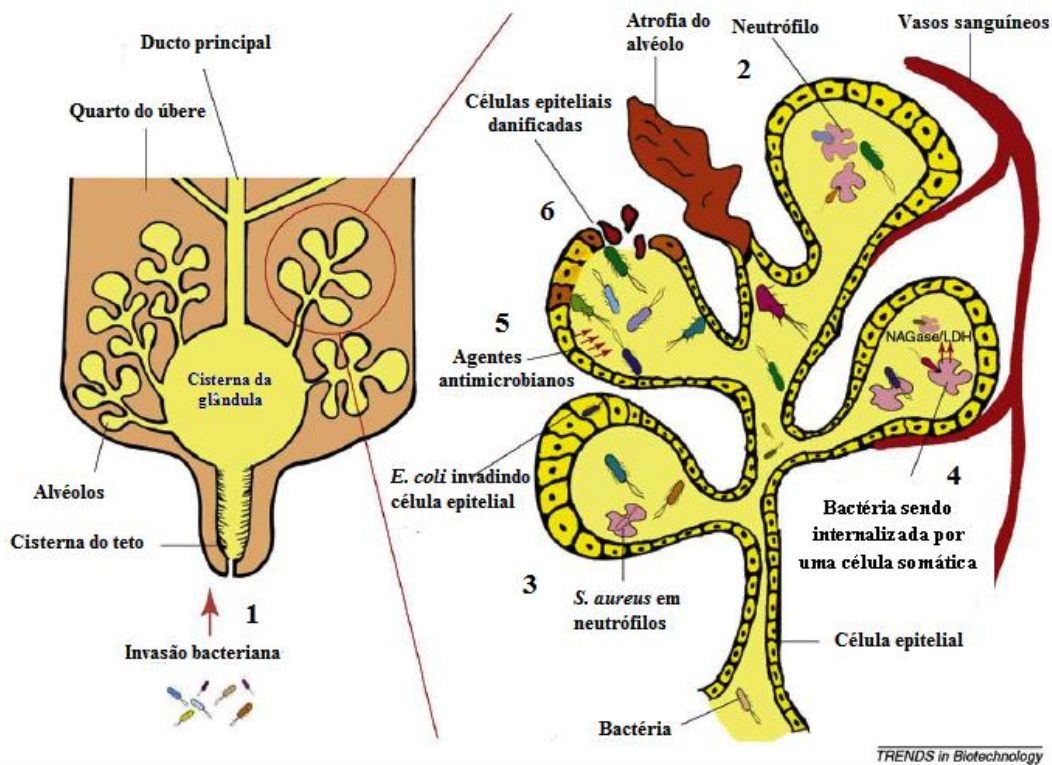


Figura 3: Representação esquemática do processo infeccioso no úbere. 1) Micro-organismos invadem a úbere pelo canal e multiplicam-se nas cisternas da glândula. 2) Recrutamento de neutrófilos. 3) Fagocitose e destruição dos micro-organismos invasores. 4) Internalização. 5) Células epiteliais secretam compostos antimicrobianos. 6) Células epiteliais que revestem os alvéolos são danificadas infecção (adaptado Viguiet *et al.*, 2009).

A elevação na CCS ($>2 \times 10^5$ células/mL) observado durante a mastite tem sua origem nessa migração transendotelial (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Os neutrófilos recrutados atuam fagocitando e destruindo os micro-organismos invasores, assim como na produção de espécies reativas de oxigênio, peptídeos bacterianos de baixo peso molecular e defensas, para a eliminação do patógeno (Sordillo e Streicher, 2002). Enzimas como a lactato desidrogenase (LDH) e a N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase) são utilizadas em estudos mamários como marcadores de dano tecidual (Figura 3) (Viguiet *et al.*, 2009). As células epiteliais mamárias são danificadas devido à presença de produtos celulares e extracelulares das bactérias patogênicas, assim como produtos oxidativos e enzimas lisossomais liberados pelos fagócitos e citocinas durante a resposta imune (Zhao e Lacasse, 2008). Com a persistência das bactérias invasoras, o infiltrado de neutrófilos passa a apresentar linfócitos T e B e monócitos. Os linfócitos podem reconhecer uma variedade de estruturas antigênicas através de receptores de membrana, sendo que durante a infecção da glândula mamária, os linfócitos T CD4+ prevalecem e são ativados ao interagirem com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II nas células apresentadoras de antígenos, como as células B ou macrófagos (Sordillo e Streicher, 2002). A principal

função dos linfócitos B é produzir anticorpos contra os patógenos invasores. Em contraste com os macrófagos e neutrófilos, os linfócitos B utilizam os receptores de membrana para reconhecerem patógenos específicos e, da mesma forma como as células dendríticas e macrófagos, atuam como células apresentadoras de antígenos (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Com a persistência da infecção, os níveis bacterianos na glândula aumentam a ponto de danificar o epitélio mamário (Zhao e Lacasse, 2008), levando a um inchaço interno não detectável ao exame externo. Os alvéolos tornam-se danificados com o tempo, com perda da integridade anatômica e conseqüentemente há uma quebra da barreira sangue-leite (Viguiet *et al.*, 2009). Alterações visíveis no leite e úbere começam a ocorrer, a glândula torna-se avermelhada e o leite coagulado e com aspecto aquoso, constituindo o começo dos sintomas clínicos (Zhao e Lacasse, 2008). A regulação negativa de genes implicados na síntese dos componentes do leite pode estar relacionada a ação direta dos agentes patogênicos, assim como por um aumento da produção de citocinas (Le Maréchal *et al.*, 2011b).

1.1.3. Epidemiologia

Os índices anuais de casos clínicos envolvendo mastite ovina são entre 5 a 11% (Mork *et al.*, 2005), porém, em uma pequena porcentagem de rebanhos a incidência pode exceder 30-50% dos animais, que leva a mortalidade, devido a manifestação gangrenosa, ou abate de até 70% do mesmo (Vautor *et al.*, 2009). Além disso, infecções intramamárias (IMI) subclínicas ocorrem entre 3% a 37% de ovelhas leiteiras na Europa (Vautor *et al.*, 2009). Segundo Peixoto *et al.* (2010) em rebanhos leiteiros no Brasil, a freqüência de mastite subclínica em pequenos ruminantes oscila no intervalo de 22% a 75%. A média do custo anual na França associada à mastite por *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis* e *E. coli* é estimada em US\$ 6400,00 em um rebanho de 100 vacas leiteiras (Le Maréchal *et al.*, 2011b). Nos EUA, as perdas anuais causadas por mastite envolvem US\$ 2 bilhões, sendo que um único quarto afetado pode reduzir de 10 a 12% a produção de leite em vacas afetadas, e no Reino Unido, prejuízos aos produtores de leite chegam a 300 milhões de euros (Akers e Nickerson, 2011; Viguiet *et al.*, 2009).

Estudos realizados no Brasil, e disponibilizados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), mostraram que quartos mamários com mastite subclínica produziram em média 25% a 42% menos leite do que quartos mamários normais (Brito *et al.*, 2007). No entanto, estudos moleculares de linhagens de *S. aureus* isoladas de fazendas leiteiras no Brasil ainda são limitados, e concentram-se exclusivamente em bovinos e caprinos (Aires-de-Sousa *et al.*, 2007).

1.1.4. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico precoce da mastite é de importância relevante, uma vez que os custos com a doença são elevados nos rebanhos (Viguiet *et al.*, 2009). As principais fontes de contaminação bacteriana do leite cru envolvem uma glândula mamária sem a correta higienização, assim como contaminação dos utensílios utilizados na ordenha e o seu armazenamento incorreto (Hayes *et al.*, 2001).

Segundo o NMC (2001), os princípios básicos a serem seguidos para o controle da enfermidade no rebanho envolvem o estabelecimento de metas para a saúde do úbere, de maneira a realizar uma ordenha adequada e manter um ambiente limpo, seco e confortável. Além disso, o apropriado manejo de animais com mastite clínica durante a lactação, assim como manejo eficaz da vaca seca e revisão periódica do programa de controle de mastite faz-se necessário. O processo de desinfecção do úbere nos intervalos de pré e pós-ordenha e a terapia da vaca seca reduzem a prevalência da infecção (Keefe, 2012).

Atualmente, os ensaios para diagnóstico frequentemente utilizados incluem a contagem de células somáticas, análise enzimática e o *California Mastitis Test* (CMT). A contagem de células somáticas é o critério mais amplamente aceito para mensurar a saúde e a qualidade do leite produzido em todos os principais países produtores de leite no mundo (Rysanek *et al.*, 2007). Na Europa, CCS acima de 200.000 células/mL são largamente utilizados como indicador de mastite (Viguiet *et al.*, 2009).

Ensaio colorimétricos e fluorimétricos tem sido desenvolvidos para mensurar as concentrações elevadas de enzimas no leite, como LDH e NAGase, durante a infecção (Viguiet *et al.*, 2009). A primeira é uma enzima citoplasmática estável, presente em todas as células. Ela é rapidamente liberada para o meio extracelular quando a membrana é danificada. Em contrapartida, a enzima NAGase é encontrada nos lisossomos de células epiteliais mamárias e são liberadas quando ocorre algum dano tecidual (Zhao e Lacasse, 2008).

O CMT é um ensaio que avalia indiretamente a quantidade de células somáticas em amostras de leite. O reagente CMT é composto por um detergente contendo um indicador de pH (púrpura de bromocresol). Esse detergente rompe a membrana das células somáticas e reage com o ácido nucléico, formando uma matriz similar a gel, que é proporcional ao número de leucócitos da amostra (Viguiet *et al.*, 2009). O teste de condutividade elétrica pode ser realizado durante a infecção, e avalia um aumento na condutância do leite em decorrência da elevação dos níveis de íons, como sódio, potássio, cálcio e cloreto de magnésio (Viguiet *et al.*, 2009). Por outro lado, o leite também pode ser avaliado em caneca

de fundo preto, chamada de prova de Tamis, para verificar a presença de coágulos, sangue ou aspecto aquefeito (Souto *et al.*, 2010).

Os índices de cura para infecções por *S. aureus* são variáveis, assumindo um intervalo para mastite subclínica entre 4–92% (Barkema *et al.*, 2006). O tratamento com antibióticos é recomendada para redução de infecções intramamárias no rebanho (da Silva *et al.*, 2004). Embora útil no tratamento da infecção, a antibioticoterapia não protege diretamente a glândula de ser danificada (Zhao e Lacasse, 2008). Além disso, utilização de antibióticos deve ser baseada no perfil de sensibilidade da linhagem, sendo que, para uma mastite clínica, onde a necessidade de tratamento é imediata, o conhecimento prévio dos padrões de sensibilidade das linhagens predominantes no rebanho é de extrema importância (Barkema *et al.*, 2006). Os antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina G, são amplamente utilizados para o tratamento de infecções intramamárias causadas por *S. aureus*, sendo que, outras classes como macrolídeos (eritromicina, espiramicina) e lincosamidas (pirilmicina) também são utilizadas para esse tipo de infecção (Barkema *et al.*, 2006; Haveri *et al.*, 2005; Tenhagen *et al.*, 2006). Segundo o NMC (2007), a terapia da vaca seca, que consiste na antibioticoterapia intramamária após a última ordenha da lactação, pode reduzir o número de infecções, assim como prevenir o surgimento de novos casos durante as primeiras semanas do período seco.

Como uma alternativa ao tratamento com medicamentos, a quase meio século têm-se buscado vacinas contra linhagens de *S. aureus* que causam mastite utilizando diversas abordagens, como bactérias atenuadas ou inativadas, extrato total de bactérias ou subunidade, porém, a descoberta de novos determinantes antigênicos ainda faz-se necessário (Wallemacq *et al.*, 2010).

Em rebanhos ovinos com produção em pequena escala de queijo com leite não pasteurizado, o abate como resultado de infecções intramamárias subclínicas causadas por *S. aureus* não é uma regra geral, porém, em casos de mastite gangrenosa, a morte da ovelha devido à infecção é comum. Se um animal sobrevive a doença aguda, a glândula afetada torna-se necrótica e gradualmente separa do tecido circundante (Vautor *et al.*, 2009).

1.2. *Staphylococcus aureus*

1.2.1. Aspectos microbiológicos gerais

O gênero *Staphylococcus*, que pertence à família Staphylococaceae, foi proposto em 1884 por Rosenbach e, atualmente inclui 49 espécies e 26 subespécies (Schleifer e Bell,

2010; Euzéby, 2014). Esse gênero é constituído por bactérias Gram-positivas que acometem humanos e outros mamíferos, sendo a espécie coagulase-positiva *S. aureus* o membro de maior interesse médico-veterinário. Este micro-organismo é o principal agente causador de infecções nosocomias em humanos (Ortega *et al.*, 2010; Ishii, 2006), sendo considerado um patógeno versátil capaz de causar uma ampla gama de doenças humanas (Gordon e Lowy, 2008), incluindo septicemia, endocardite, pneumonia, osteomielite, artrite séptica, bacteremia, infecções de pele, feridas entre outras (Crossley *et al.*, 1997; Feil *et al.*, 2003; Ishii, 2006).

Os estafilococos são imóveis, não formam esporos, são anaeróbios facultativos com diâmetro variando de 0,5 a 1,5µm e podem ser encontrados na forma individual ou em cachos. Os membros deste gênero são catalase-positivos e oxidase-negativos, tolerantes a altas concentrações de sal e apresentam resistência ao calor. O nome *S. aureus* faz referência a presença de colônias douradas, quando cultivadas em meio sólido, em comparação as colônias de linhagens SCN, que são pálidas, translúcidas e brancas (Harris *et al.*, 2002).

1.2.2. Determinantes moleculares de virulência e patogenicidade

Em 2001 foi o início da era genômica de *S. aureus*, com a publicação das sequências de dois genomas bacterianos (*S. aureus* N315 e Mu50) (Kuroda *et al.*, 2001). Devido ao grande impacto desse micro-organismo como patógeno, a literatura é concentrada basicamente na biologia da sua infecção, com ênfase na estrutura e função dos fatores de virulência, na interação patógeno-hospedeiro e nos mecanismos moleculares que estão envolvidos na resistência a antibióticos (Hecker *et al.*, 2010). A base para a colonização por *S. aureus* é complexa e parcialmente compreendida, envolvendo o contato inicial com o hospedeiro e a habilidade em aderir suas células e evadir da resposta imune (Gordon e Lowy, 2008). A versatilidade desse micro-organismo permite uma eficiente disseminação, sendo capaz de adaptar-se rapidamente a diferentes ambientes e condições (Cepeda *et al.*, 2005; Kniehl *et al.*, 2005).

Na microbiota humana, *S. aureus* coloniza de forma persistente as narinas de aproximadamente 20% da população. O processo infeccioso normalmente está associado a alguma doença, tratamentos agressivos ou procedimentos médicos invasivos, que permitem uma via de acesso para os micro-organismos (Gordon e Lowy, 2008; Kuroda *et al.*, 2001). São poucos os conhecimentos sobre a transição do estado de colonização assintomático para uma infecção invasiva, mesmo assim, sabe-se que indivíduos colonizados de forma

persistente apresentam o triplo de risco de desenvolver bacteremia por *S. aureus* e são mais frequentemente infectadas por suas próprias linhagens colonizadoras (Popov *et al.*, 2014).

Embora *S. aureus* seja considerado um patógeno oportunista, certas linhagens são mais propensas a causar patologias do que outras, devido a presença de fatores de virulência que elevam o acesso a sítios normalmente estéreis (Feil *et al.*, 2003). Esse padrão de genes de virulência, assim como polimorfismos genéticos presentes, podem ser usados para determinar o biovar e a avaliar a origem dos isolados (Spanu *et al.*, 2012).

Os fatores de virulência mais associados a esse micro-organismo, e que podem desempenhar um papel importante no estabelecimento e manutenção da infecção, incluem hemolisinas (α , β , γ e δ), leucocidinas (leucocidin Panton-Valentine (PVL), Luk E/D), enterotoxinas (SEs), toxinas esfoliativas (ETs), toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), proteína A e os fatores de agregação (Que, 2005; Crémieux *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2011; Sabouni *et al.*, 2014). Alguns desses fatores podem ser mais relevantes em determinadas patologias ou em estágios da patogênese (Kalorey *et al.*, 2007), sendo que podem ser classificados como produtos estruturais e secretados (Gordon e Lowy, 2008), conforme exibido na Figura 4.

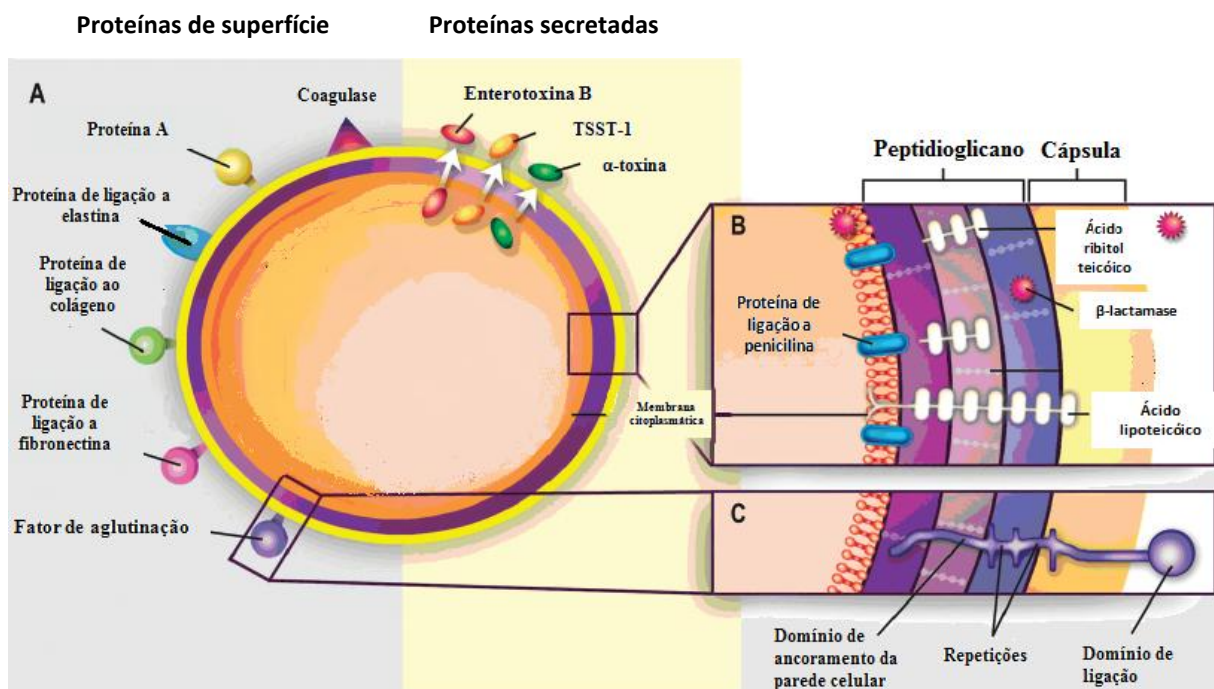


Figura 4: Fatores patogênicos de *S. aureus*, evidenciando o papel das proteínas estruturais e secretadas como fatores de virulência. A) Proteínas de superfície e secretadas. B e C) Corte transversal do envelope celular (adaptado Gordon e Lowy, 2008)

Ao estabelecer uma infecção, as proteínas de superfície do *S. aureus* possibilitam a adesão aos tecidos do hospedeiro, sendo a família de proteínas mais prevalente a

conhecida como moléculas adesivas da matriz reconhecedoras de componentes da superfície (MSCRAMMs, do inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Esses MSCRAMMs ligam-se a moléculas como colágeno, fibronectina e fibrinogênio (Gordon e Lowy, 2008) e podem mediar a internalização em células eucarióticas, direcionar os micro-organismos a diferentes sítios anatômicos, exoenzimas secretadas e toxinas que promovem dano tecidual (Que, 2005). Isso pode explicar a versatilidade das infecções por *S. aureus*, assim como a dificuldade em estudar a patogênese estafilocócica utilizando mutantes com a inativação de um único gene (Que, 2005).

Os fatores de aglutinação A e B (ClfA e ClfB) e as proteínas de ligação a fibronectina A e B (FnBPA e FnBPB) são as quatro principais adesinas de superfície e demonstraram, *in vitro*, alta especificidade a seus ligandos (Que *et al.*, 2001). FnBPA e FnBPB aderem aos componentes da matrix extracelular, tanto fibronectina e elastina, e são importantes para a colonização do hospedeiro (Baumstummier *et al.*, 2014). O papel das FnBPs na colonização da glândula mamária foi demonstrado quando mutantes incapazes de expressar essas adesinas reduziram a aderência em 40%, quando comparado a linhagem selvagem (Dziewanowska *et al.*, 1999). Dessa mesma forma, o gene *cna*, que codifica a proteína de ligação a colágeno, também foi descrito como um importante fator de virulência associado a adesão bacteriana (Zecconi e Scali, 2013). A proteína A, codificada pelo gene *spa*, é uma proteína de superfície que se liga a IgG, interferindo na resposta imune por evitar a fagocitose das células bacterianas (Votintseva *et al.*, 2014; Baumstummier *et al.*, 2014; Sorum *et al.*, 2013).

O sistema *agr* identificado como um sistema de *quorum-sensing* em *S. aureus*, possui como principal efetor o RNAlII, e controla a produção coordenada de fatores de virulência, entre eles a α -toxina (Bibalan *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2014). Essa exotoxina, também conhecida como α -hemolisina, atua na formação de poros na membrana eucariótica, podendo causar hemólise e dano tecidual (Gong *et al.*, 2014; Oscherwitz *et al.*, 2014).

O proteoma extracelular é composto por proteínas ativamente secretadas por diferentes vias e corresponde a um reservatório de fatores de virulência (Hecker *et al.*, 2010). As proteases produzidas por *S. aureus* podem ser classificadas em metaloproteases, cisteíno e serino proteases (Park *et al.*, 2011). De modo geral, acredita-se que as proteases extracelulares são capazes de danificar diretamente os tecidos do hospedeiro, degradando as proteínas da matrix extracelular e induzir a permeabilidade vascular (Park *et al.*, 2011).

Entre as exotoxinas produzidas por *S. aureus* que contribuem para a patogênese da mastite em ruminantes, algumas possuem a capacidade de matar células fagocíticas, como células polimorfonucleares (PMN) e monócitos. Essas leucotoxinas são bi-componentes,

constituídas por duas proteínas distintas (S/F), que atuam de forma sinérgica na formação de orifícios na membrana de fagócitos (Rainard *et al.*, 2003). PVL (LukS-PV/LukF-PV) é um exemplo de leucotoxina, sendo descritas também a γ -hemolisina (HlgA/HlgB e HlgC/HlgB), LukM (LukM/LukF'-PV) e a LukE/D (LukE/LukD) (Rainard *et al.*, 2003).

Além das exotoxinas mencionadas anteriormente, existe uma família denominada de superantígenos (SAg), baseado na ativação antígeno não-específica de células T, que compreendem as enterotoxinas estafilocóccas (SEs), sorotipos A-R, e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Tinelli *et al.*, 2014). A primeira corresponde a toxinas gastrointestinais potentes, resistentes a tratamentos térmicos e baixo pH, que mantêm sua atividade no trato digestivo após ingestão (Argudín *et al.*, 2010). Quando ingeridas, ocorrem quadros de intoxicação alimentar, com sintomas de início rápido e que podem incluir náuseas, vômitos e diarreia (Jorgensen *et al.*, 2005). A TSST-1 é associada ao desenvolvimento da síndrome do choque tóxico (TSS), principalmente não-menstrual, caracterizada por uma doença sistêmica aguda. Em mulheres, a TSS menstrual (mTSS) é causada por uma infecção vaginal não-invasiva de *S. aureus* produtora da TSST-1 (Kimber *et al.*, 2013).

Grande parte da maquinaria genética necessária para a especificidade e virulência desse micro-organismo por seus hospedeiros é adquirida através de transferência horizontal de genes. Elementos genéticos móveis (MGEs, do inglês *mobile genetic elements*), como transposons, plasmídeos e bacteriófagos, frequentemente evidenciam os genes necessários para a virulência seletiva desse micro-organismo (Lowy, 2011). Outro fator relevante para a fonte de variação intra e inter espécies na patogenicidade e resistência deve-se também a presença de ilhas de patogenicidade, que agrupam fatores de virulência já bem documentados, como a TSST-1, leucotoxinas e leucocidinas e exo e enterotoxinas em *S. aureus* (Popowicz *et al.*, 2006).

Além disso, *S. aureus* possui uma cápsula polissacarídica que participa da invasão do hospedeiro por possuir propriedades antifagocíticas, além do ácido teicóico na parede celular, que atua na adesão celular (Sutter *et al.*, 2011).

Como outros patógenos bacterianos, *S. aureus* é capaz de afetar preferencialmente determinados hospedeiros, sendo que, essa especificidade em infecções humanas pode estar envolvida na maneira como o *S. aureus* adquire o ferro do seu hospedeiro (Lowy, 2011; Pishchany *et al.*, 2010). Quando em condições limitadas de ferro, ocorre a indução dos determinantes de superfície regulados por ferro (Isd), importantes para a captação do grupo heme da hemoglobina (IsdD, IsdH) e o transporte através da parede celular (IsdA, IsdC) (Baumstummeler *et al.*, 2014).

Outra característica relevante das linhagens de *S. aureus* deve-se a capacidade de desenvolver rapidamente resistência a antimicrobianos, já que a utilização indiscriminada de

antibióticos resulta em um aumento na resistência de *S. aureus* em isolados clínicos (Fattom *et al.*, 2004). Além disso, as infecções causadas por *S. aureus* frequentemente apresentam recidivas, apesar do tratamento com antibióticos adequados. Possivelmente, isso ocorre devido à capacidade que esse micro-organismo apresenta em sobreviver dentro de células hospedeiras, invadindo uma variedade de fagócitos não profissionais *in vitro*, tais como células epiteliais, fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais. Após internalizado, *S. aureus* pode persistir, escapando das defesas dos hospedeiros e agentes antimicrobianos, multiplicar e disseminar de forma mais efetiva (Que, 2005).

1.2.2.1. Adesão Celular e Toxinas estafilocócicas

A principal função fisiológica da pele é formar uma barreira protetora que possa impedir a penetração de micro-organismos e reduzir a perda de água (Amagai *et al.*, 2002). As células da epiderme são fortemente ligadas em locais específicos chamados desmossomos (Ishii, 2003), que são junções intercelulares que mantêm forte adesão célula-célula e desempenham um papel fundamental na integridade mecânica de tecidos, como epiderme e coração (Garrod e Chidgey, 2008; Yin e Green, 2004). Eles atuam como âncoras para os filamentos intermediários e são compostos por três famílias de genes: (1) caderinas desmossômicas, incluindo as desmogleínas (Dsg) e as desmocollinas (Dsc); (2) proteínas armadillo incluindo placoglobinas (Pg) e placofilinas (PKP) e (3) plaquinas, incluindo desmoplaquina (DP), representado na figura 5 (Chidgey e Dawson, 2007; Dusek *et al.*, 2007). A família de caderinas desmossomais humana é composta por 4 isoformas da desmogleína (Dsg1-4) e 3 isoformas da desmocolina (Dsc1-3) (Dusek *et al.*, 2007).

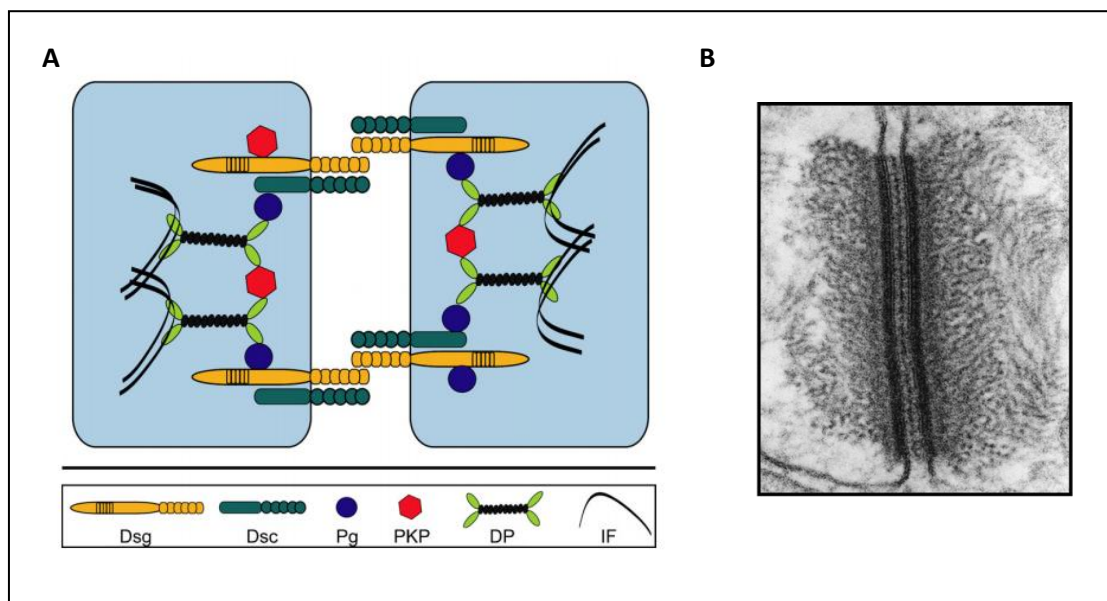


Figura 5: Estrutura desmossomal. A) Esquema resumindo os componentes moleculares de um desmossomo (Dsg: desmogleína; Dsc: desmocolina; Pg: placoglobinas; PKP: placofilina; DP: desmoplaquina; IF: filamentos intermediários). B) Imagem demonstrando as placas densas que flanqueiam as duas membranas plasmáticas opostas (adaptado Dusek *et al.*, 2007)

Em determinados tipos de infecções, como por exemplo, por *S. aureus*, é comum a perda de queratinócitos e da adesão célula-célula, levando a formação de bolhas (Nishifuji *et al.*, 2008). A Toxina Esfoliativa é um exemplo de exotoxina epidermolítica produzida por espécies de *Staphylococcus*, associadas à formação de bolhas em peles de humanos e animais (Ladhani *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2002). Foram demonstradas 3 isoformas das ETs (ETA, ETB e ETD), que são serino proteases glutamato-específicas que clivam uma ligação peptídica na região extracelular da Dsg1 de humanos e ratos (Kato *et al.*, 2011). Dsg1 é expressa por toda a epiderme, enquanto a Dsg3 na parte mais interna, correspondente a camada basal da epiderme (Nishifuji *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2002). *S. aureus* produtora da ETC, com 27kDa, foi isolada de um cavalo com flegmão, sendo capaz de demonstrar atividade esfoliativa em camundondos e pintos neonatos (Sato *et al.*, 1994). O gene que codifica ETA foi localizado no cromossomo, enquanto o ETB foi encontrado em DNA plasmidiano. Quando identificado a ETD, de um isolado clínico de *S. aureus*, Yamaguchi *et al.* (2002) classificaram a região como uma ilha de patogenicidade, com ao menos 3 loci possivelmente associados com a virulência desse micro-organismo, incluindo uma hipotética glutamil endopeptidase e o gene *edin-B*. Outro fator que contribuiu para a classificação dessa região como uma ilha de patogenicidade, deve-se ao fato de tanto a *etd*, como o *edin-B* serem genes encontrados exclusivamente em linhagens patogênicas, e não em linhagens laboratoriais de *S. aureus*.

ETA e ETB apresentam respectivamente 242 e 246 resíduos, em torno de 27kDa, e são homólogos (Nishifuji *et al.*, 2008; Rago *et al.*, 2000). Segundo seus modelos

cristalográficos (ETA e ETB), ocorrem dois domínios S1 e S2, cada um consistindo de seis folhas β antiparalelas que formam um barril β comum a todos os membros da família tripsina, e uma α -hélice C-terminal (Ladhani, 2003; Vath *et al.*, 1997, 1999). A tríade catalítica, que constitui o sítio ativo, é formado por uma histidina (H)-ácido aspártico (D)-serina (S) e encontra-se na interface entre os dois barris β (Amagai *et al.*, 2002; Ladhani, 2003). Além disso, apresentam uma α -hélice N-terminal altamente carregada, que quando ligada a Dsg1 na epiderme, resulta em mudança conformacional que permite o acesso ao domínio S1, que pode então ligar e clivar a Dsg1 entre o terceiro e quarto domínio extracelular após o ácido glutâmico (381) (Figura 6) (Ladhani, 2003; Ladhani *et al.*, 1999).

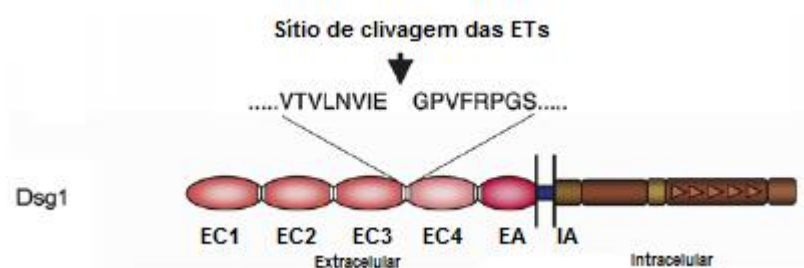


Figura 6: Estrutura molecular da Dsg1 na epiderme humana. A seta indica o sítio de clivagem das toxinas esfoliativas. EC1-4: repetições extracelulares de caderina; EA: âncora extracelular; IA: âncora intracelular (adaptado Nishifugi *et al.*, 2008)

O papel patogênico dessas toxinas foi demonstrado em 1971 por Melish e Glasgow, utilizando camundongos neonatos (Amagai *et al.*, 2002). A atividade esfoliativa pode ser testada monitorando o sinal de Nikolsky (descolamento epidérmico formando uma “bolha flácida”) quando camundongos neonatos são injetados com a toxina protéica ou com linhagens de *S. aureus* transportando o gene ET (Kato *et al.*, 2011; Melish e Glasgow, 1971). Quando avaliada a capacidade de induzir proliferação de células T, as ETs demonstraram ser 100 vezes menos potente que a TSST-1 e enterotoxinas (Monday *et al.*, 1999). A classificação de ETs como superantígenos parece ser ainda controversa, uma vez que análises histopatológicas não demonstraram recrutamento intenso de células T na epiderme, onde as bolhas são formadas (Nishifuji *et al.*, 2008).

As linhagens de *S. aureus* produtoras dessas toxinas estão envolvidas na Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (*Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome – SSSS*) ou Doença de Ritter (Melish e Glasgow, 1971). Essa patologia afeta principalmente recém-nascidos e crianças, com idade inferior a 5 anos, embora os adultos com doenças subjacentes também sejam suscetíveis (Ladhani *et al.*, 1999; Nishifuji *et al.*, 2008). As manifestações clínicas da SSSS envolvem febre, sensibilidade da pele e formação de eritema, seguidas pela separação da epiderme, que pode envolver toda a superfície da pele

em horas ou dias (Amagai *et al.*, 2002). Nessa forma clínica, o fluido obtido das bolhas é normalmente estéril e a linhagem infectante é recuperada em locais distantes, como pescoço e nariz do afetado (Yamasaki *et al.*, 2005). Nesses sítios, possivelmente ocorre absorção sistêmica das ETs, seguida pela difusão ao local alvo, caracterizando uma forma generalizada da doença (Yamasaki *et al.*, 2005). Crianças afetadas inicialmente apresentam máculas fracas que progridem o desprendimento epidérmico, que se assemelha a uma pele escaldada (Nishifuji *et al.*, 2008). A hipótese quanto a maior susceptibilidade de crianças à infecção deve-se a imaturidade do sistema imunológico, assim como uma depuração renal mais ineficiente da toxina (Ladhani, 2003). O impetigo bolhoso, a forma localizada da SSSS, é mais comum e pode ocorrer em qualquer idade, sendo que a linhagem infectante pode ser recuperada das bolhas (Yamasaki *et al.*, 2005). Quando avaliados os isolados das diferentes formas clínicas da doença, a presença do gene *eta* foi significativamente associado a formação de Impetigo bolhoso, enquanto *etb* foi associado a manifestação generalizada SSSS (Yamasaki *et al.*, 2005). Segundo Ladhani (2003), a ETD não é fortemente associada à SSSS, mas pode desempenhar um papel patogênico em infecções estafilocócicas ao perturbar a barreira epitelial da pele e permitir a invasão e disseminação nos tecidos locais.

1.2.3 *S. aureus* no contexto da mastite

Segundo Rivas *et al.* (2007), isolados de *S. aureus* de animais sintomáticos e de animais que não apresentam sintomatologia clínica são indistinguíveis. Uma melhor compreensão dos fatores de virulência desse micro-organismo é necessária para discriminar as diferenças entre linhagens envolvidas em quadros clínicos diversos (Vautor *et al.*, 2009). Diferenças no potencial virulento das linhagens de *S. aureus* de bovinos com IMI foram identificadas, porém fatores de virulência ou combinação de fatores que determinam uma mastite severa não foram especificadas (Vautor *et al.*, 2009; Haveri *et al.*, 2005). Exoproteínas como a α -toxina e LukM-F' foram relatadas em casos de mastite gangrenosa de origem estafilocócica (Le Maréchal *et al.*, 2011a). A relevância dessa abordagem deve-se ao fato de que os determinantes patogênicos que são associados à especificidade do micro-organismo pelo hospedeiro são alvos ideais para agentes terapêuticos (Sung *et al.*, 2008).

O gado leiteiro que apresenta mastite subclínica de origem estafilocócica é provavelmente a principal fonte de contaminação do leite cru (Jorgensen *et al.*, 2005). Além disso, a presença de *S. aureus* no leite pode representar um problema de saúde pública, pela produção de SEs, descritas em isolados de ruminantes leiteiros com infecção intramamária (Vimercati *et al.*, 2006). Quando comparados os isolados de bovinos, caprinos

e ovinos, foram encontradas diferenças significativas em seus genótipos com base em genes codificadores dessas enterotoxinas (Vimercati *et al.*, 2006).

Interessantemente, isolados geneticamente semelhantes de *S. aureus* determinam, dentro do mesmo rebanho, manifestações clínicas que variam de subclínica a gangrenosa. Com o objetivo de avaliar essas características, Vautor *et al.* (2009) isolaram a linhagem O46 característica de IMI subclínica, de fazendas leiteiras que produzem queijo em pequena escala com leite não pasteurizado no sul da França. No mesmo ano foi isolada a linhagem O11, responsável pela morte de uma ovelha com mastite gangrenosa. Esses isolados, quando comparados geneticamente, apresentaram em comum 3615 *open reading frames* (ORF) e não demonstraram diferenças nos genes envolvidos em processos celulares, síntese da parede celular, transporte ou metabolismo intermediário (Vautor *et al.*, 2009). Quando analisados por técnicas de tipagem molecular, como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e *spa typing*, caracterizaram-se por ser geneticamente próximas, assim como representativas das linhagens associadas a mastite em ovinos no sudeste da França (Le Maréchal *et al.*, 2011c). Quando realizada a infecção experimental em modelo murino, o isolado subclínico induziu uma maior elevação de IL-1 β e TNF- α nos lisados das glândulas mamárias, sugerindo uma resposta anti-estafilocócica mais eficaz (Le Maréchal *et al.*, 2011c).

A análise genômica revelou diferenças mínimas entre as linhagens O11 e O46, exceto pela presença de um profago B (42 CDS) no genoma da cepa O46 (Le Maréchal *et al.*, 2011a). A contribuição de profagos na patogênese é provavelmente multifatorial (Vautor *et al.*, 2009), sendo que, quando cromossomicamente integrados são conhecidos por desempenhar papel chave na patogenicidade e virulência de *S. aureus*, codificando toxinas específicas como Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV), enterotoxina estafilocócica A, assim como genes envolvidos na modulação do sistema imune do hospedeiro (Utter *et al.*, 2014). Além disso, já foi verificada a conversão fágica envolvendo a toxina esfoliativa A em uma linhagem de *S. aureus* isolada de mastite em vacas (Endo *et al.*, 2003). PVL (LukS-PV/LukF-PV) é um exemplo de leucotoxina associada inicialmente a patologias em humanos e posteriormente correlacionada a mastite em bovinos (Zecconi e Scali, 2013).

Um total de 103 genes truncados associados a pontos de mutação ou *indels* estavam presentes em uma das duas cepas (O46 e O11), sendo 36% classificados com função desconhecida (Le Maréchal *et al.*, 2011a). O gene *fnb*, que codifica uma proteína de ligação ao fibrinogênio B, não foi identificado no isolado gangrenoso (Vautor *et al.*, 2009). Segundo Vancraeynest *et al.* (2004), a presença de *fnbB* em isoladas de alta virulência é menor, quando comparado com isolados de baixa virulência. Interessantemente, a linhagem O11 foi encontrada na cavidade nasal de quatro ovelhas onze meses após o caso de mastite

gangrenosa, evidenciando o papel como reservatório de linhagens potencialmente virulentas (Vautor *et al.*, 2009).

Análises sorológicas do proteoma (SERPA, do inglês *serological proteome analysis*) é uma metodologia clássica baseada na separação por eletroforese bidimensional em gel (2-DE) e identificação por espectrometria de massa (Suzuki *et al.*, 2010). A utilização dessa metodologia por Seyffert *et al.* (2012) permitiu a obtenção de informações sobre proteínas antigênicas diferencialmente expressas na linhagem O46 de *S. aureus*, quando comparadas com ovinos infectados com a linhagem O11. Entre o conjunto de proteínas imunoreativas identificadas por soro coletado de animais colonizados na cavidade nasal e infectados, a maioria foi reconhecida por ambas linhagens, entre elas toxinas como a α -toxina, gama-hemolisina, leucodidina (LukF, LukS) (Seyffert *et al.*, 2012). Esse método permitiu apontar três proteínas imunoreativas específicas da linhagem O46 (Le Maréchal *et al.*, 2011c), sendo uma delas denominada O46_2740, que apresenta homologia com a toxina esfoliativa D (ETD) (Le Maréchal *et al.*, 2011c; Yamaguchi *et al.*, 2002). Interessantemente, no genoma da linhagem O11, a CDS O11_0490 corresponde a uma forma truncada da O46_2740, com a ausência de um dos aminoácidos do sítio ativo (Le Maréchal *et al.*, 2011c). A presença de genes truncados pode desempenhar papel importante nas diferenças fenotípicas observadas entre O11 e O46 (Le Maréchal *et al.*, 2011a). Quando a presença dessa proteína foi avaliada no exoproteoma de outras 10 linhagens de *S. aureus* isoladas de ovinos com mastite subclínica (n=5) e gangrenosa (n=5), a mesma foi detectada em todos os isolados subclínicos (1535, 1627, O117, O55, O82), sugerindo uma possível participação nessa manifestação clínica (Le Maréchal *et al.*, 2011c).

1.3. Ferramentas genéticas para a produção de proteínas heterólogas

1.3.1. Bactérias Lácticas

1.3.1.1. Aspectos microbiológicos gerais e utilizações biotecnológicas de *Lactococcus lactis*

As bactérias lácticas (BL) constituem um grupo heterogêneo de micro-organismos Gram-positivos e anaeróbios facultativos, sendo sua principal característica a capacidade de converter açúcares, principalmente glicose, em ácido láctico (via homofermentativa ou homoláctica) e ácido láctico e outros produtos (via heterofermentativa ou mista) (Carr *et al.*, 2002; Azevedo e Miyoshi, 2004). *Lactococcus lactis*, a mais bem caracterizada BL, é um micro-organismo amplamente utilizado na indústria alimentícia para a produção e

preservação de produtos lácteos fermentados, sendo considerada segura ou “GRAS” (*Generally Regarded As Safe*) (Bolotin *et al.*, 2001; Nouaille *et al.*, 2003).

Muitas ferramentas genéticas vêm sendo desenvolvidas para utilização em *L. lactis*, sendo que esta bactéria se destaca como um micro-organismo alternativo para a produção de proteínas de interesse biotecnológico (Langella e Le Loir, 1999). Nesse sentido, a capacidade de secretar moléculas apresenta certas vantagens em relação à sua produção intracelular, como a facilidade de purificação do produto final, a possibilidade de uma cultura celular contínua, assim como a redução da formação de agregados protéicos intracelulares (Langella e Le Loir, 1999; Azevedo e Miyoshi, 2004),

Atualmente, inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral foram produzidas utilizando *L. lactis* como sistema de expressão (Le Loir *et al.*, 2005; Nouaille *et al.*, 2003), incluindo algumas proteínas de *S. aureus*, como a Nuclease (*nuc*), *Staphylococcal clumping factor A* (*clfA*) e *Staphylococcal enterotoxin B* (*seb*) (Asensi *et al.*, 2013; Le Loir *et al.*, 1996; Que *et al.*, 2001).

Uma outra forma de utilização de *L. lactis* inclui a produção de proteínas de interesse diretamente dentro dos alimentos, como enzimas, com o intuito de modificar as propriedades organolépticas dos produtos. Além disso, *L. lactis* vem sendo utilizada na construção de vacinas vivas, para a produção e apresentação de antígenos (Azevedo e Miyoshi, 2004) e também para a entrega de vetores vacinais, ambos diretamente na superfície de mucosas (Innocentin *et al.*, 2009).

1.3.1.2. Sistema de expressão e endereçamento celular de proteínas heterólogas

Em 2004 foi desenvolvido um novo sistema de expressão gênica e endereçamento protéico para *L. lactis* (Miyoshi *et al.*, 2004). Esse sistema, que combina o promotor *PxyIT*, elementos genéticos como o sítio de fixação do ribossomo (RBS) e peptídeo sinal (SP) da proteína *Usp45* de *L. lactis* e o gene repórter *nuc* de *S. aureus*, foi denominado XIES (*Xylose-Inducible Expression System*). Além disso, foi capaz de direcionar proteínas heterólogas para o citoplasma ou meio extracelular (Miyoshi *et al.*, 2004). Esse sistema foi utilizado com a linhagem *L. lactis* NCDO2118 (*L. lactis* subsp. *lactis*), sendo capaz de produzir, em presença do indutor xilose, altos níveis da proteína modelo *Nuc* de *S. aureus*, tanto no citoplasma quanto no meio extracelular. Uma outra vantagem da utilização deste sistema de expressão é a capacidade de “ligar ou desligar” a expressão gênica pela simples adição de xilose ou glicose no meio, respectivamente (Luerce, 2009). O sistema apresenta ainda vantagens como a facilidade de manipulação, baixo custo e segurança, para uso humano e animal. Além disto, deve-se ressaltar ainda que *L. lactis* apresenta outras

propriedades que a tornam ideal para a produção de moléculas exógenas, como a ausência de endotoxinas ou qualquer outro produto metabólico tóxico (Bolotin *et al.*, 2001). Sabe-se que poucas proteínas são secretas por *L. lactis*, sendo a Usp45 a única secretada em quantidade suficiente para detecção em SDS-PAGE. Além disto, foi demonstrada a capacidade de *L. lactis* em secretar uma grande quantidade de proteínas heterólogas (Langella e Le Loir, 1999).

1.3.2. Expressão heteróloga em *Escherichia coli*

A bactéria Gram-negativa *E. coli* é o organismo mais frequentemente utilizado para a produção de proteínas heterólogas (Terpe, 2006), sendo capaz de produzir um elevado grau de proteína solúvel (Sorensen e Mortensen, 2005a). Além do rendimento, outras vantagens envolvem a vasta compreensão de sua genética, a rápida expressão da proteína de interesse, a grande facilidade e rapidez de cultivo, o grande número de vetores de clonagem e outras ferramentas genéticas disponíveis, além de possuir diversas linhagens mutantes disponíveis (Demain e Vaishnav, 2009; Terpe, 2006). Outros parâmetros que são considerados importantes envolvem uma eficiente transcrição e tradução, estabilidade do vetor de expressão utilizado e do transcrito, estabilidade proteolítica e enovelamento do produto (Jonasson *et al.*, 2002). Frequentemente, *E. coli* BL21 e seus derivados são utilizados para a expressão protéica de rotina. Os promotores utilizados em vetores de expressão em *E. coli* devem ser fortes e com um baixo nível de expressão basal (fortemente regulado), sendo sua indução simples e de baixo custo (Terpe, 2006).

De modo geral, as proteínas recombinantes superexpressas acumulam-se no citoplasma ou espaço periplasmático (Terpe, 2006). Desta forma, é comum a obtenção de agregados insolúveis da proteína, que perderam sua conformação e são biologicamente inativos, conhecidos como corpos de inclusão (Sorensen e Mortensen, 2005a). Geralmente não há maneiras de se prever se a proteína será solúvel ou insolúvel (Jonasson *et al.*, 2002). Uma alternativa é a sua solubilização e remodelamento, para obtenção de produtos finais funcionais e ativos (Terpe, 2006). Outra questão envolvendo a utilização de proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* é a presença de lipopolissacarídeo (LPS), uma molécula pirogênica em humanos e outros mamíferos (Terpe, 2006).

Após a expressão da proteína recombinante de interesse, passos de purificação são necessários para a recuperação da proteína altamente pura e biologicamente ativa (Jonasson *et al.*, 2002). Abordagens biotecnológicas são constatemente aprimoradas para superar obstáculos envolvidos na produção de proteínas recombinantes, de modo a obter preparações solúveis e funcionais (Sorensen e Mortensen, 2005a).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Em países com uma desenvolvida indústria de laticínios, a mastite é a mais comum e dispendiosa doença infecciosa que afeta as fazendas de gado leiteiro (Keefe, 2012). Em ambas as formas de mastite, com características clínica e subclínica, ocorrem um considerável impacto na saúde do animal. Com o dano aos tecidos alveolares da glândula mamária, e conseqüentemente, comprometimento de sua função, ocorre uma redução na produção de leite e deterioração na composição do mesmo, ocasionando perdas econômicas mundiais no mercado de laticínios (Shoshani *et al.*, 2000; Halasa *et al.*, 2009; Le Maréchal *et al.*, 2011b; Seyffert *et al.*, 2012). Na França, o leite de cabra e ovelhas é destinado principalmente a produção de queijo (Le Maréchal, 2010). No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção de leite de cabra é de cerca de 21 milhões de litros e envolve empresas de pequeno porte, sendo que, a ovinocultura leiteira apresenta potencial para a produção de queijos finos. A composição do leite pode ser afetada por uma variedade de fatores, como a raça do animal, idade, estágio de lactação e sua dieta, sendo o processo infeccioso na glândula mamária um contribuinte significativo para possíveis alterações na qualidade dos produtos laticínios produzidos (Le Maréchal *et al.*, 2011b). Com a elevação na contagem de células somáticas, ocorre uma redução do preço do leite e descarte após o tratamento com antibióticos. Além disso, são comuns elevações dos custos associados à vigilância da qualidade do leite e estado da infecção em todo o rebanho, assim como o abate precoce ou redução da vida produtiva do gado (Viguier *et al.*, 2009).

Estudos de epidemiologia molecular sugerem que algumas linhagens de *S. aureus* são mais propensas em causar infecções no gado (Tedeschi *et al.*, 2009), confirmando a necessidade de investigar fatores específicos em linhagens patogênicas que determinam uma infecção subclínica e de difícil diagnóstico. Uma compreensão abrangente da patogenicidade envolvendo a mastite é fundamental para o desenvolvimento de técnicas de detecção apropriada (Viguier *et al.*, 2009). Em adição ao impacto negativo na eficiência e qualidade da produção leiteira, a mastite é um assunto importante na sanidade e bem-estar animal (Keefe, 2012). A carne do animal também é desvalorizada, uma vez que o rendimento e a qualidade da carcaça é reduzida (Viguier *et al.*, 2009). Para os animais infectados, são necessários custos adicionais de tratamento, como quimioterápicos e cuidados veterinários, além do trabalho extra para criação do gado e aplicação de medidas preventivas (Viguier *et al.*, 2009).

Diante disso, e da ausência de tratamentos eficazes, uma melhor compreensão dos fatores envolvidos na patogenicidade do *S. aureus*, fatores de risco, assim como da resposta

do hospedeiro a infecção, são pontos essenciais para o desenvolvimento eficiente e satisfatório de terapias que permitam prevenir e combater a mastite (Le Maréchal *et al.*, 2009; Piccinini *et al.*, 2012). A partir desta abordagem, o Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM/UFMG), em parceria com o Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), tem identificado e caracterizado genes e proteínas associados a mastites em ovinos que possam atuar como marcadores dessas infecções, assim como na elucidação de fatores associados com a especificidade ao hospedeiro.

Quando comparado o perfil proteômico de isolados clínicos e subclínicos, o gene O46_2740, homólogo ao gene codificador da ETD (*etd*), foi super expresso somente em linhagens de ovinos com mastite subclínica (Le Maréchal *et al.*, 2011a). Interessantemente, a ETD é produzida por espécies de SCN, como *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus chromogenes*, e altamente prevalente em mastite subclínica em ovinos (Le Maréchal *et al.*, 2011a). Diante disso, e com a existência de poucas informações dessa proteína correlacionada a infecções mamárias, neste trabalho caracterizamos a ETD-like da linhagem O46, que pode estar associada à virulência de *S. aureus* em pequenos ruminantes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a proteína ETD codificada pela *ORF* O46_2740 da linhagem O46 de *S. aureus*, característica da mastite subclínica em pequenos ruminantes.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Análises de bioinformática

- Caracterizar a *ORF* O46_2740 (ETD-like) através de ferramentas de bioinformática;
- Construir um modelo tridimensional da ETD-like por homologia;

3.2.2 Clonagem molecular e expressão da proteína recombinante

3.2.2.1 Estratégia I

- Amplificar a *ORF* O46_2740 possivelmente codificador de uma ETD-like e clonar sua sequência no vetor pGEM T-Easy Vector;
- Sublonar a *ORF* O46_2740 no vetor de expressão p*XyIT*:SEC do sistema XIES;
- Obter linhagens de *E. coli* transformadas com o plasmídeo p*XyIT*:SEC:ETD-like;
- Obter linhagens de *L. lactis* produtoras da forma secretada da ETD-like;

3.2.2.2 Estratégia II

- Síntese da *ORF* O46_2740 codificadora da possível ETD-like;
- Transformar o plasmídeo pD441-NH:136826 sintético nas linhagens OverExpress™, e BL21 Star™;
- Avaliar a expressão da ETD-like nas linhagens selecionadas e purificar a proteína recombinante;

3.2.3 Avaliação da proteína *in vivo*

- Analisar a atividade esfoliativa da ETD-like recombinante através de ensaios *in vivo*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ferramentas de bioinformática

A linhagem *S. aureus* O46 foi isolada de um caso de mastite ovina subclínica, no sudeste da França, sendo que análises posteriores envolvendo seu genoma e proteoma permitiram a identificação de uma *ORF* O46_2740 descrita como homóloga a toxina esfoliativa D. Inicialmente foi utilizado o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), uma ferramenta de alinhamento e identificação de sequências por similaridade, disponível, por exemplo, no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e na base de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), que procura alinhamentos entre uma sequência fornecida (DNA ou proteína) e sequências depositadas. Com o programa de alinhamento ClustalW, as sequências de aminoácidos de uma ETB (58% de identidade), ETA (44% de identidade), ETD (60% de identidade) e as *Glutamyl Endopeptidase* das linhagens *S. aureus* N315 e *S. aureus* Mu50, ambas com 34% de identidade, foram alinhadas a possível ETD-like. O acesso foi realizado pelo EMBL – *European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), sendo que a edição do alinhamento foi realizada no Jalview (<http://www.jalview.org/>).

Para a avaliação de características físico-químicas, como número de aminoácidos, peso molecular estimado e ponto isoelétrico (pI) foi utilizado o *software on-line* ProtParam, disponibilizado pelo *ExPaSy Proteomics Server* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Com o objetivo de prever peptídeos sinais e localizar o sítio de clivagem do mesmo na sequência de aminoácidos foi utilizado o SignalP 4.1 Server disponibilizado *on-line* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Para avaliar a presença de domínios transmembrana na proteína ETD-like, foi utilizado o programa TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Para prever a qual família a proteína pertence, assim como domínios funcionais e seus sítios (Jones *et al.*, 2014), foi utilizado o InterProScan, ferramenta que combina vários bancos de dados, disponibilizada *online* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>).

O modelo teórico tridimensional da ETD-like foi construído baseado na homologia com sequências moldes da toxina esfoliativa B (1QTF e 1DT2), depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (Papageorgiou *et al.*, 2000; Vath *et al.*, 1999). A estrutura tridimensional hipotética, baseada no alinhamento entre sequências com maiores similaridades, foi construída utilizando o Modeller 9.12 (Fiser e Sali, 2003), sendo que a visualização em 3D das proteínas foi realizada com o programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*). A qualidade dos modelos gerados foi avaliada

pelo programa PROCHECK (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>), com a geração do gráfico de Ramachandran.

4.2 Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho, bem como suas características, encontram-se listados na Tabela 2. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB a 37°C sob agitação de 150rpm por 16h. As linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio M17 acrescido de 0,5% de glicose (M17-Gli) a 30°C sem agitação por 16h. Por outro lado, as linhagens de *S. aureus* foram cultivadas em meio BHI, a 37°C e sob agitação a 200rpm por 16h. Para o cultivo em meio sólido, os meios foram acrescidos de 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico. Quando necessário, os meios foram suplementados com ampicilina (100µg.mL⁻¹), canamicina (50µg.mL⁻¹) ou cloranfenicol (10µg.mL⁻¹).

Para o isolamento da *ORF O46_2740* em estudo, foi utilizada a linhagem bacteriana O46 de *S. aureus* isolada de mastite subclínica de pequenos ruminantes, fornecida cordialmente pelo Dr. Yves Le Loir do INRA, França.

Tabela 2: Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados para a clonagem e expressão do ETD-like em *L. lactis* e *E. coli*

Linhagens/ Plasmídeos	Características	Referências
Linhagens		
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺) deoR thi-1 supE44 λ ⁻ gyrA96 relA1	Invitrogen
<i>E. coli</i> TG1 pXylT:SEC:nuc	supE, hsd, Δ5, thi, Δ(lac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZΔ M15); Portadora do plasmídeo pXylT:SEC:nuc	Coleção ^a
<i>L. lactis</i> NCDO2118	<i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Coleção ^b
OverExpress™ C41 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Lucigen
OverExpress™ C41(DE3) pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cm ^R)	Lucigen
OverExpress™ C43(DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Lucigen
OverExpress™ C43(DE3)pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cm ^R)	Lucigen

BL21 Star™(DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131</i> (DE3)	Lucigen
<i>S. aureus</i> O46		Coleção ^c
<i>S. aureus</i> O11		Coleção ^c
Plasmídeos		
pUC19	(ori ColE1/Amp ^r) ^d	Invitrogen
pGEM T-Easy Vector	Vetor de clonagem ColE1/Amp ^r	Promega
pGEM: ETD-like	Vetor pGEM T-Easy Vector contendo a ORF codificadora da possível proteína ETD-like	Este trabalho
pXyIT:SEC:Nuc	pWV01/Cm ^r ; vetor de expressão contendo a sequência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 (SP _{Usp}) fusionada ao gene <i>nuc</i> , sob o controle do promotor P _{xyIT}	Miyoshi e cols., 2004
pXyIT:SEC:ETD-like	Vetor de expressão pXyIT:SEC: <i>nuc</i> no qual a ORF <i>nuc</i> foi substituída pela ORF O46-2740	Este trabalho
pD441-NH:136826		DNA 2.0

Cm^r: confere resistência à cloranfenicol

^a: Linhagem de *E. coli* pertencente à coleção de micro-organismos do LGCM/UFMG.

^b:Linhagem selvagem de *L. lactis* pertencente à coleção de micro-organismos do LGCM/UFMG.

^c: Linhagem selvagem de *S. aureus* pertencente à coleção de micro-organismos do INRA, França.

^d:ori ColE1: origem de replicação; Amp^r: gene que confere resistência à ampicilina

4.3 Eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida

Todos os produtos de amplificação e digestão enzimática foram homogeneizados ao tampão da amostra, em uma proporção de 1:1, e aplicados em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo (0,5ng.µL⁻¹) em tampão TBE 0,5X. As corridas foram realizadas a 100V por aproximadamente 1h e o DNA foi visualizado em um equipamento fotodocumentador (Kodak Digital Science TM DC40), o qual fotografa o gel sobre um transluminador de luz ultravioleta (UV) com um comprimento de onda de 320nm. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados através do marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder

(Invitrogen™). Quando necessário, os produtos foram purificados segundo as instruções especificadas no *Kit* comercial “Gfx™ PCR DNA Purification Kit” (GE).

A eletroforese em gel de poliácridamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001) e utilizando uma concentração de 12% para a eletroforese da proteína ETD-like e 10% para a proteína PKnG. Os precipitados das amostras foram ressuspensos em 40µL de tampão de amostra, sendo que 20µL do sobrenadante foram adicionados a 20µL do tampão de amostra, em seguida aquecidos a 100°C por 10min e 10µL aplicados em gel. Dessa mesma maneira, foram aplicados nos géis 6µL do marcador de proteínas PageRuler Prestained Protein ladder (Thermo Scientific). Para a visualização, o gel foi incubado sob agitação a temperatura ambiente por 3h na solução corante e, em seguida, descorado até que o padrão de bandas fosse visualizado.

4.4 Clonagem molecular e expressão da proteína recombinante

4.4.1 Estratégia I

4.4.1.1 Manipulação do DNA de *S. aureus*

4.4.1.1.1 Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico de *S. aureus* O46 foi realizada para o posterior isolamento da *ORF* de interesse. Inicialmente, o inóculo foi realizado com 1 colônia crescida em placa em 5ml de BHI conforme descrito no item 4.2. Confirmado o crescimento, o material foi centrifugado a 5000rpm, 4°C por 10min, sendo o sobrenadante descartado posteriormente. O precipitado foi ressuspense em 1mL de Tris 50mM, pH 8 e centrifugado a 10000rpm, 4°C por 3min. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspense em 450µL de TE. A lise mecânica das células foi realizada com o homogeneizador *Precellys®24-Dual*, sob agitação com *beads* de vidro a 6500rpm, por 2 ciclos de 15s, com intervalo de 15s entre eles. As amostras foram então centrifugadas a 13000rpm, 4°C por 20min, sendo o sobrenadante recuperado e acrescido de TE, atingindo um volume de 600µL. Foram adicionados 3µL de uma solução de RNase (Invitrogen) a 10mg/ml e incubado a 1h à 37°C, seguido de 12,3µL de proteinase K (Invitrogen) a 20mg/ml, com uma segunda incubação a 37°C por mais 1h. Foi acrescido a mistura, 700µL da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), e posterior inversão, assim como homogeneização em vórtex. As amostras foram centrifugadas por 10min, em temperatura ambiente à 12000rpm, onde o sobrenadante foi recuperado. Clorofórmio (v/v) foi adicionado

as amostras para a homogeneização em vórtex, e nova centrifugação por 10min a 12000rpm para recuperar o sobrenadante. Foram acrescentados 1 vol. de isopropanol e 1/10 vol. de uma solução de acetato de sódio 3M, pH 4,8. A solução foi homogeneizada por inversão e mantida à -20°C por 30min, posteriormente, centrifugada à 13000rpm por 15min e o sobrenadante em seguida foi desprezado. O precipitado foi lavado com etanol 80% e centrifugado por 10min a 13000rpm, sendo descartado o sobrenadante. O precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 10min e ressuspenso em 50µL de água estéril.

4.4.1.1.2 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizado com o auxílio do programa Vector NTI Advance™11, baseado na seqüência única de DNA da *ORF* SAO46_2740 codificante da possível proteína ETD-like (Tabela 3). Esse mesmo programa foi utilizado para avaliar a probabilidade de formação de grampos, homodímeros e heterodímeros, estruturas que podem prejudicar a eficiência de amplificação durante as reações de PCR. Aos oligonucleotídeos iniciadores externos (direto e reverso) foram adicionados sítios de restrição artificial, enzimas *NsiI* e *XhoI*, para posterior clonagem direcional no vetor de expressão em *L. lactis* (pXylT:SEC).

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores

Iniciadores	Sequência
Iniciador “ <i>forward</i> ” Sítio de restrição para a enzima <i>NsiI</i> está sublinhado	5'-GGGATGCATTAGAAATATACTGATGAAGAAATT-3'
Iniciador “ <i>reverse</i> ” Sítio de restrição para a enzima <i>XhoI</i> está sublinhado	5'-GGGCTCGAGACTATATAGGGGTGTTATTTAAAGG-3'

4.4.1.1.3 Isolamento da *ORF* SAO46_2740

Para isolamento da a *ORF* O46_2740 de *S. aureus* O46, a reação da cadeia em polimerase (PCR) foi realizada para um volume final de 50µL, sendo: 5µL de tampão de reação 10X, 1,5µL de dNTPs (0,3mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos), 1µL (100pmoles/µL) de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso), 1µL de MgSO₄ (50mM), 1µL (100ng/µL) de DNA genômico, 1U de Taq polimerase Platinum®*Pfx* (Invitrogen)

e água deionizada bidestilada para completar a reação. Cada reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 30 ciclos de três etapas (desnaturação a 95°C por 1min, hibridização a 60°C por 1min e extensão a 68°C por 2min). Após os 30 ciclos, a extensão final foi realizada por 7min a 68°C, amplificando um fragmento de 842pb.

4.4.1.2 Clonagem no sistema pGEM-T Easy Vector

4.4.1.2.1 Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10

Para a confecção de células de *E. coli* eletrocompetentes, 10µL de uma cultura de *E. coli* TOP10 foram inoculados em 5mL de meio LB sem antibiótico, e incubado conforme descrito no item 4.2. Subsequentemente, uma alíquota de 3mL desta cultura foi inoculada em 300mL de LB e incubada, sob as mesmas condições, até atingir uma densidade óptica a 600nm (DO_{600nm}) entre 0,2 e 0,3. A cultura foi resfriada no gelo por 30min e distribuída em seis tubos tipo *falcon* e centrifugados a 4000rpm, durante 20min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a lavagem e ressuspensão do sedimento celular realizados adicionando a cada tubo 40mL de uma solução estéril e gelada de glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais três vezes e após a última lavagem, o sedimento celular foi ressuspensão em 1mL da solução de glicerol 10%, sendo alíquotas de 100µL estocadas à -80°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota das células eletrocompetentes foi descongelada em gelo durante 5min. Em seguida, foi adicionado à alíquota 100ng do plasmídeo pUC19 (Amp^r) e transferido para cubetas de eletroporação 0,2 cm (BIO-RAD), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2500V, capacitância de 25µF e resistência de 200Ω, utilizando-se o eletroporador *GenePulser Xcell™* (BIO-RAD). Após o pulso, adicionou-se às células 1mL de meio LB para incubação a 37°C, sem agitação, por duas horas. Em seguida, as diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas em placas contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina (100µg/mL) e mantidas em estufa à 37°C durante 16h. Ao final, foram obtidas 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por micrograma de DNA.

4.4.1.2.2 Transformação bacteriana em *E. coli*

A sequência correspondente ao ETD-like foi clonada no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), utilizando as instruções do fabricante (Figura 7). Considerando que a amplificação foi realizada com uma taq DNA polimerase de alta finalidade (*Pfx*), a etapa de

A-tailing para a adição da 3'-deoxiadenosina terminal no produto da PCR precedeu a ligação. Para essa finalidade, 50ng do produto da amplificação purificado foi acrescido de 1µL de tampão de reação 10X, 0,1µL de dNTPs (concentração final de 0,2mM), 1µL de MgCl₂ (50mM), 1µL (5U/µL) de Taq polimerase *Platinum* (Invitrogen) e água deionizada bidestilada para completar 10µL de reação. O homogeneizado foi incubado a 70°C por 30min, seguido pela reação de ligação.

A reação de ligação foi realizada com 3µL do produto da amplificação após *A-tailing*, acrescido de 1µL do vetor pGEM T-Easy Vector, 1µL da T4 DNA ligase, assim como 5µL do seu tampão, seguindo de incubação por toda a noite a 4°C. As ligações foram dialisadas em filtros de nitrocelulose (Millipore) para eliminação de sais.

E. coli TOP10 (Invitrogen) competentes foram transformadas com o vetor recombinante pelo método de eletroporação (Sambrook e Russel, 2001). Alíquotas de 100µL de células competentes foram descongeladas em gelo e adicionadas aos 10µL da ligação dialisada para posterior eletrotransformação. O homogeneizado foi transferido para cubetas de eletroporação 0,2 cm (BIO-RAD), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2500V, capacitância de 25µF e resistência de 200Ω, utilizando-se o eletroporador *GenePulser Xcell*™ (BIO-RAD). Imediatamente após o pulso, adicionou-se às células 1mL de meio LB à 37°C e estas foram incubadas também à 37°C, sem agitação, por duas horas. A seleção do transformante foi realizada com plaqueamento em meio sólido LB com ampicilina (100µg.mL⁻¹). As colônias isoladas foram transferidas para tubos falcon de 50mL, contendo 5mL de meio LB suplementado com 100µg.mL⁻¹ de ampicilina. Os inóculos foram incubados a 37°C por aproximadamente 16h com agitação. Estoques foram realizados com glicerol 80% (1:1) e armazenados a -80° C.

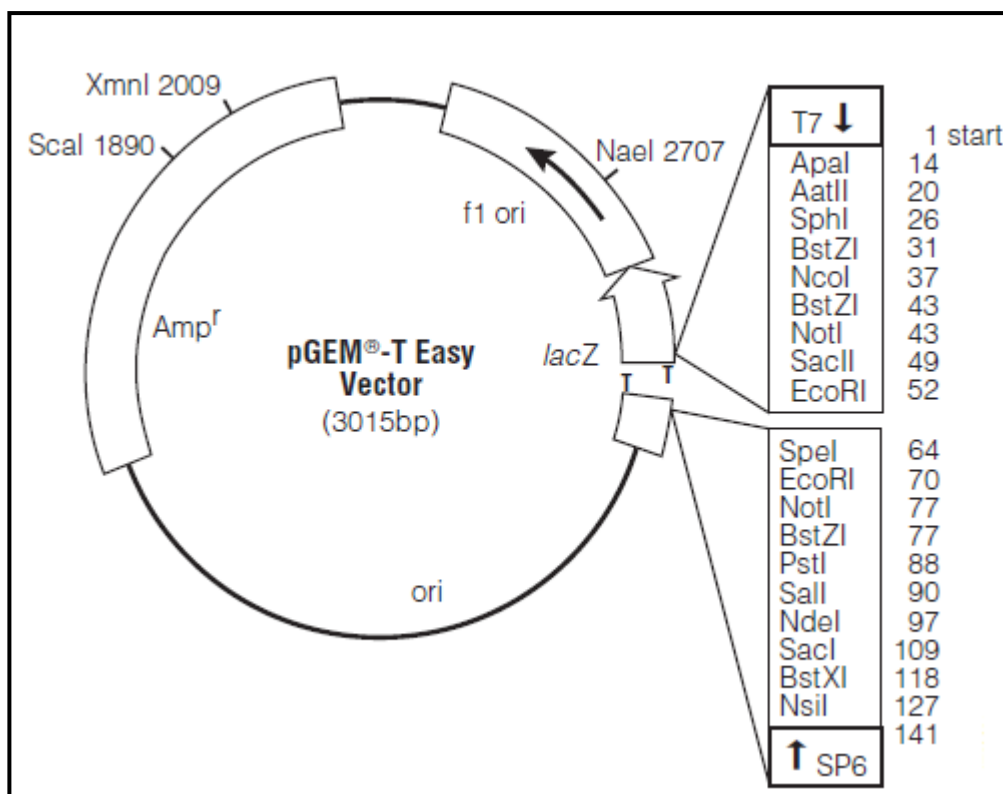


Figura 7: Representação do vetor de clonagem pGEM-T Easy. Amp^r: gene de resistência à ampicilina; ori: origem de replicação; lacZ: operon lac (Fonte: PROMEGA. www.promega.com)

4.4.1.2.3 Extração do DNA plasmidiano de *E. coli* em pequena escala

Alíquotas de 1,5mL de cada cultura foram transferidas para tubos de microcentrífuga (2mL) para a realização da extração de plasmídeo pelo método de lise alcalina. As amostras foram centrifugadas por um período de 5min, a 10.000rpm a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 200µL da solução I (50mM glicose; 10mM tris-HCl, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 200µL da solução II (1% SDS, 0,2M NaOH) e homogeneizados por inversão dos tubos. A RNase A (100µg.mL⁻¹) foi acrescida e deixada em temperatura ambiente por 5min, seguida pela adição de 200µL de solução III (3M acetato de sódio, pH 5,2). A mistura foi centrifugada a 10.000rpm por 15min e o sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos. Ao mesmo, adicionou-se 420µL de isopropanol gelado. Os tubos foram então incubados por 30min a -20°C e após esse período, foram centrifugados e o sobrenadante descartado. Posteriormente, o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado (- 20°C) e ressuspenso em 30µL de água ultrapura estéril. A presença e qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 1%.

4.4.1.2.4 Confirmação da *ORF O46-2740* no vetor pGEM-T Easy Vector

Para verificar a presença do inserto ETD-like e o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor pGEM-T Easy Vector, foi realizada uma amplificação por PCR. A reação foi realizada com um volume final de 30µL, sendo acrescentados 3µL de tampão de reação, 1µL de dNTPs (0,3mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos), 1µL (100pmoles/µL) de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso), 1µL de MgCl₂ (50mM), 1µL (100ng/µL) de DNA genômico, 1U de Taq polimerase *Platinum* (Invitrogen) e água deionizada bidestilada para completar a reação. As condições aplicadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 30 ciclos de três etapas (desnaturação a 95°C por 40s, hibridização a 60°C por 40s e extensão a 72°C por 1min). Após os 30 ciclos, a extensão final foi realizada em 5min a 72°C.

Além da confirmação por PCR, o plasmídeo pGEM-T Easy Vector ligado ao inserto ETD-like foi submetido a uma reação de digestão com a endonuclease *EcoRI* (Invitrogen). A reação apresentou um volume final de 20µL, sendo que foram acrescentados 2µL do tampão da enzima (10X), 1µL da *EcoRI* 10U/µL (Invitrogen), 1µL (1µg/µL de DNA plasmidial) e água deionizada bidestilada para completar os 20µL de reação, mantidos a 1h a 37°C. Após a reação, o produto da amplificação e a digestão foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos a resolução eletroforética sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

4.4.1.3 Subclonagem no sistema de expressão XIES

4.4.1.3.1 Digestão enzimática do vetor pXyIT:SEC:nuc

Para a realização da subclonagem do inserto ETD-like no vetor de expressão pXyIT:SEC:nuc (Figura 8), inicialmente o mesmo foi extraído das linhagens *E. coli* TG1 (pXyIT:SEC:nuc) utilizando o Kit *The Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme as especificações do fabricante. A reação de digestão enzimática contendo um volume final de 20µL foi realizada com a adição de 1µL de *NsiI* 10U/µL (Promega), 2µL do tampão da enzima (10X *buffer* D), BSA em uma concentração final de 0,1mg/ml, 1µg de plasmídeo pXyIT:SEC:nuc e água deionizada bidestilada para completar os 20µL de reação. A reação foi mantida em banho-maria 37°C por 1h, seguida pela inativação a 65°C por 15 min. Foram acrescentados 1µL da enzima de restrição *XhoI* 10U/µL (Invitrogen) e 2µL do tampão da enzima (*React 2*), sendo a mesma mantida por mais 1h em banho-maria a 37°C.

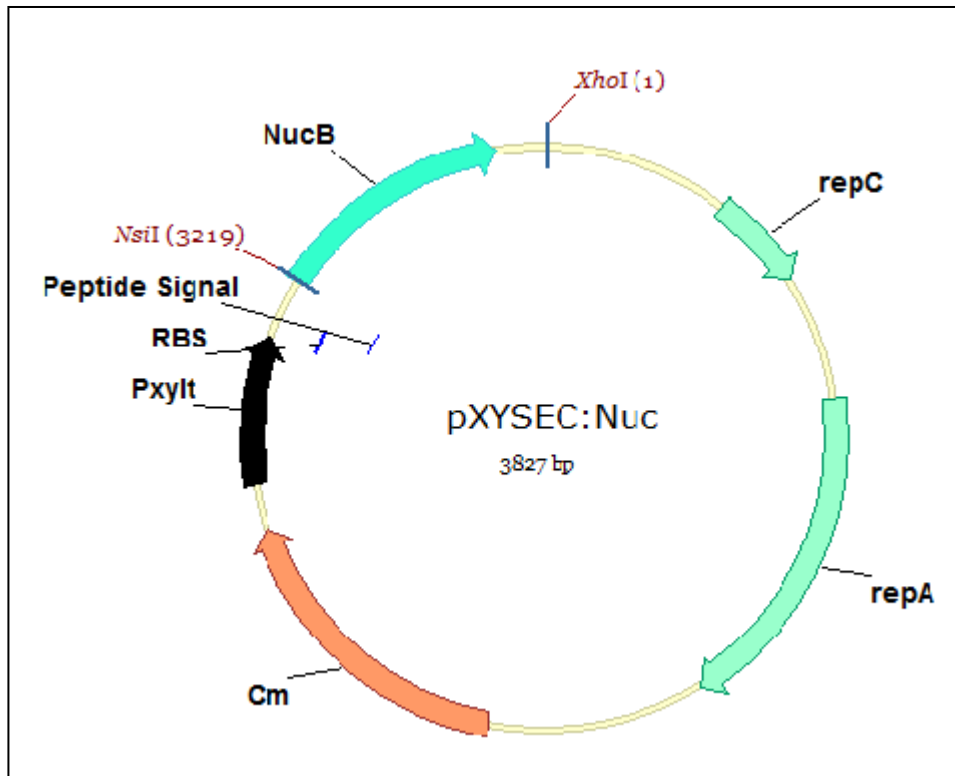


Figura 8: Representação esquemática do plasmídeo pXYIT:SEC:Nuc, sistema XIES para endereçamento extracelular de proteínas.

4.4.1.3.2 Purificação do fragmento de DNA correspondente ao pXYIT:SEC

Para a obtenção de uma elevada concentração de DNA plasmidiano, foi realizado inicialmente um Midiprep (QIAGEN Plasmid Midi Kit), segundo especificações do fabricante.

A reação de digestão, realizada conforme o item 4.4.1.3.1 teve todo o seu volume aplicado em gel de agarose a 1% para resolução eletroforética, conforme o item 4.3. Ao término da eletroforese, o fragmento de DNA (3214pb) correspondente ao vetor pXYIT:SEC, com a excisão de um fragmento de 613pb no qual estava inserido a seqüência codificadora da nuclease (*nuc*) de *S. aureus*, foram purificados com o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). A pureza do produto purificado foi verificada através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% (item 4.3).

4.4.1.3.3 Digestão enzimática do pGEM-T Easy Vector ligado a ORF O46-2740

Para a obtenção de uma elevada concentração de DNA plasmidiano, foi realizado inicialmente um Midiprep (QIAGEN Plasmid Midi Kit), segundo especificações do fabricante.

A ORF O46-2740 foi excisada do vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector através de digestão enzimática também com as enzimas *NsiI* (Promega) e *XhoI* (Invitrogen). Inicialmente 1µg do plasmídeo pGEM-T:ETD-like foi adicionado a 3µL do tampão de enzima (*React 2*), 1µL de *XhoI* (10U/mL) e água deionizada bidestilada para completar os 20µL de reação. Após o período de 1h de incubação em banho-maria a 37°C, a enzima foi inativada a 65°C por 10min. A reação foi dialisada em membrana de nitrocelulose (Millipore) e foram adicionados 3µL do tampão da enzima (*buffer D*), 1µL da enzima *NsiI* (10U/µL) e BSA em uma concentração final de 0,1mg/ml. A reação foi mantida em banho-maria a 37°C por 1h.

4.4.1.3.4 Purificação do fragmento de DNA correspondente ao ETD-like digerido

A reação de digestão descrita no item 4.4.1.3.3 teve todo o seu volume aplicado em gel de agarose a 1%. Ao término da eletroforese, o inserto foi purificado segundo as instruções especificadas no Kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). A pureza do produto purificado foi verificada através de resolução eletroforética conforme descrito no item 4.3.

4.4.1.3.5 Ligação do inserto O46_2740 no vetor pXyIT:SEC e transformação em *E. coli* TOP10

Os produtos digeridos e purificados (inserto e vetor) foram submetidos a uma reação de ligação. Cada reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Promega) a temperatura de 14°C durante 16h utilizando uma proporção equimolar de 10:1 (inserto/vetor). Uma alíquota de 10µL do produto de ligação pXyIT:SEC:ETD-like (Figura 9) foi utilizado para eletrotransformar 100µL de células *E. coli* TOP10 competentes, seguindo o protocolo descrito no item 4.4.1.2.2.

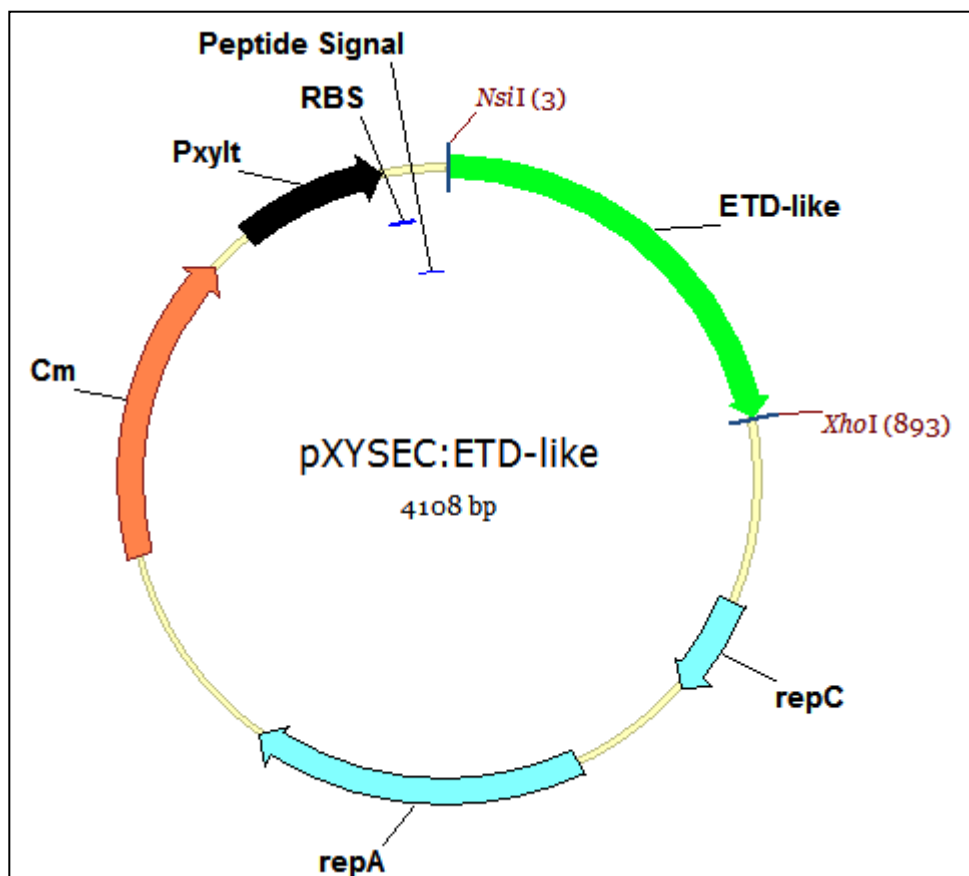


Figura 9: Representação esquemática do plasmídeo pXylt:SEC:ETD-like, sistema XIES para endereçamento extracelular de proteínas.

A seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 100 μ L, 200 μ L e precipitado da suspensão de células eletrotransformadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 10 μ g.mL⁻¹ de cloranfenicol (Cm). As placas foram mantidas em estufa à 37°C por aproximadamente 24h e após este período, foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes ao antibiótico. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a estocagem dos mesmos.

4.4.1.3.6 Confirmação dos clones recombinantes

A partir destas culturas, o DNA plasmidiano foi extraído de colônias selecionadas aleatoriamente, conforme descrito no item 4.4.1.2.3, e submetido a confirmação quanto a presença do inserto ETD-like por PCR e digestão enzimática com *NsiI* e *XhoI* (descrito nos itens 4.4.1.2.4 e 4.4.1.3.3). Após a reação, o produto da amplificação e a digestão foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos a resolução eletroforética sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

A seqüência nucleotídica do ETD-like, clonada em pXyIT:SEC, foi seqüenciada por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando polímero POP7 e o Kit BigDye® Terminator v3.1 (Life Technologies). Os iniciadores utilizados na reação correspondem aos aplicados na PCR (Tabela 3), sendo que as seqüências de DNA obtidas (direto e reverso) foram analisadas no programa Vector NTI Advance™ 11. A seqüência referência foi alinhada com as seqüências obtidas pelo sequenciamento (Sanger *et al.*, 1977), para posterior análise do cromatograma.

4.4.1.3.7 Transformação em *L. lactis* NCDO2118

4.4.1.3.7.1 Células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2128 e transformação com o plasmídeo pXyIT:SEC:ETD-like

A confecção de células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2118 foi realizada com o inóculo de uma colônia única dessa bactéria em meio M17-Sac-Gli conforme o item 4.2. Um segundo inóculo foi realizado com 100µL dessa primeira cultura nas mesmas condições. Uma alíquota de 1µL desta última cultura foi inoculada em 150mL de meio M17-Sac-Gli contendo glicina (1%). Uma vez que a cultura tenha alcançado uma DO_{600nm} em torno de 0,4-0,6, esta foi centrifugada a 5000rpm durante 20min a 4°C. O precipitado celular foi ressuspenso em 150mL de uma solução gelada constituída de sacarose 0,5M e glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais três vezes e, após a última lavagem, o precipitado foi ressuspenso em 1mL de uma solução constituída por PEG3000 30% e glicerol 10%. Alíquotas de 100µL dessas células foram estocadas a -80°C.

Uma alíquota contendo 1µg do plasmídes pXyIT:SEC:ETD-like, extraídos utilizando o Kit *The Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) a partir dos clones de *E. coli* previamente confirmados, foi usada para transformar as células de *L. lactis* NCDO2118. O processo de transformação das células foi o mesmo que o já descrito para *E. coli* (item 4.4.1.2.2), porém com as seguintes modificações: (i) utilização de 2,4kV de voltagem para o pulso, (ii) ressusensão das células transformadas em M17-Sac-Gli, e (iii) incubação sem agitação, a 30°C por 4h.

4.4.1.3.7.2 Extração do DNA plasmidiano de *L. lactis* em pequena escala

As colônias resultantes da transformação de *L. lactis* com o plasmídeo pXyIT:SEC:ETD-like foram coletadas e inoculadas em 5mL de meio M17-Gli suplementado

com $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol e incubado conforme descrito no item 4.3. Cada clone foi estocado em glicerol 80% e armazenado a -80°C . O protocolo utilizado para a extração dos plasmídeos foi o mesmo utilizado para *E. coli* (item 4.4.1.2.3), com uma única modificação: após a primeira centrifugação, o precipitado celular foi ressuspensão em $100\mu\text{L}$ de uma solução de TE-LYS e incubado por meia hora.

4.4.1.3.7.3 Confirmação dos clones de *L. lactis* NCDO2128

As colônias resultantes da transformação de *L. lactis* com o plasmídeo pXyIT:SEC:ETD-like foram inoculadas em meio M17-Gli suplementado com $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol conforme descrito no item 4.2. A partir destas culturas, o DNA plasmidiano extraído foi submetido a confirmação quanto a presença do inserto por PCR e digestão enzimática conforme descrito nos itens 4.4.1.2.4. e 4.4.1.3.3.

4.4.1.4 Produção da proteína heteróloga ETD-like

4.4.1.4.1 Indução da proteína heteróloga em *L. lactis* NCDO2118 e extração de proteínas

Uma alíquota de $10\mu\text{L}$ da cultura estoque dos clones confirmados de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:ETD-like) foram inoculados em meio M17-Gli com cloranfenicol ($10\mu\text{g}/\text{ml}$), conforme o item 4.2. Uma diluição de 1:50 dessa cultura foi realizada em 5mL do mesmo meio e incubada nas mesmas condições até atingir absorvância ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,2. Um terceiro inóculo foi realizado, sendo uma cultura induzida com xilose (1%), e uma não induzida acrescida de glicose que foi utilizada como controle negativo da indução. As culturas foram incubadas a 30°C sem agitação até atingir absorvância ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) entre 1 e 1,5, momento no qual as culturas foram colocadas no gelo e processadas para a extração de proteínas. Alíquotas de 2ml da cultura induzida e não induzida (como controle negativo) foram centrifugadas a 13000rpm, 4°C por 10min. Em seguida, o sobrenadante e o precipitado celular foram tratados separadamente.

O sobrenadante foi filtrado (Syringe Filter/ $0,45\mu\text{m}$) para posterior adição de $100\mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA) 100% gelado, $15\mu\text{L}$ ditioneitol (DTT) 10mM e $15\mu\text{L}$ de fenil-metil sulfonil fluoreto (PMSF) a 10mM. A solução foi incubada no gelo por 1h. Após incubação, o material foi centrifugado a 13000rpm, 4°C , por 20min e o precipitado protéico ressuspensão em NaOH 50mM. Ao final da extração, o tampão DTT-LB 2X foi adicionado na proporção de 1:1, aquecidas à 100°C por 5min para análise em SDS-PAGE.

O precipitado foi ressuspensão em TE-LYS (10mg/mL), com 1mM de PMSF e 10mM de DTT. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30min a 37°C, sendo posteriormente adicionado o SDS 20%. Ao final da extração, as amostras foram ressuspensas em tampão DTT-LB 2X na proporção de 1:1, aquecidas à 100°C por 5 minutos e estocadas à -20°C.

4.4.1.4.2 Extração de proteínas do sobrenadante de *S. aureus* O46 e O11

Uma colônia de cada linhagem (O46 e O11) foi inoculada em 5ml de meio BHI conforme descrito no item 4.2. Um segundo inóculo, com diluição de 1:1000, foi realizado em 50ml de BHI e incubado novamente a 37°C por toda a noite. Para a recuperação do sobrenadante, as culturas foram centrifugadas por 20min, 4°C, 4000rpm, sendo o mesmo posteriormente filtrado (Syringe Filter/0,22µm). Ao sobrenadante, foi adicionado 1/9 ml de TCA 100%, sendo que a precipitação ocorreu por um período de aproximadamente 6h. As amostras foram centrifugadas a 4°C, 4000rpm por 1h30min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 5mL de etanol 96% e centrifugação a 4000rpm por 10min, 4°C. Essa etapa foi repetida. A última centrifugação foi realizada com 1,5ml de etanol 96% e o precipitado recuperado em eppendorf. As amostras foram preservadas a -20°C.

4.4.1.4.3 Western blotting

As proteínas extraídas de *L. lactis* e das duas linhagens de *S. aureus* (O46 e O11) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o protocolo descrito no item 4.3.

Para o *Western blotting*, as proteínas obtidas do sobrenadante e do precipitado dos clones de *L. lactis* NCDO2128, assim como do sobrenadante de *S. aureus*, foram resolvidas por SDS-PAGE a 12%. A membrana PVDF (Amersham) foi previamente embebida em metanol e os papéis filtro foram umedecidos no tampão de transferência. A transferência das proteínas para a membrana PVDF foi realizada em sistema semi-seco (Thermo Scientific Owl) a 300mA, por aproximadamente 1h, sendo a avaliação da especificidade e a quantificação da expressão da ETD-like determinada posteriormente por imunodeteção. As membranas de PVDF foram incubadas por 30min em um agitador com 10mL da solução de bloqueio do *Western Breeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen), e lavadas com 20mL de água destilada durante 5min. Em seguida, a membrana foi incubada por 1h com anticorpo monoclonal anti-ETD-like. Após esse período, o anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina foi adicionado por 30min. A membrana foi lavada 3 vezes após cada incubação com anticorpo. A revelação foi realizada com a solução

cromógena de BCIP/NBT do *Western Breeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen).

4.4.2 Estratégia II

4.4.2.1 Síntese da *ORF 046_2740* de *S. aureus* e preparação do vetor

A sequência que codifica a possível ETD-like foi confeccionada pela empresa DNA 2.0 e otimizada com códons preferenciais para expressão em *E. coli*, linhagem hospedeira selecionada. Inicialmente, a sequência nucleotídica foi obtida no NCBI, sendo posteriormente retirado o peptídeo sinal. O plasmídeo sintético pD441-NH:136826 (Figura 10), foi eluído segundo as especificação do fabricante e apresenta a sequência nucleotídica de 749pb correspondente a ETD-like (AEUR01000016 em vermelho).

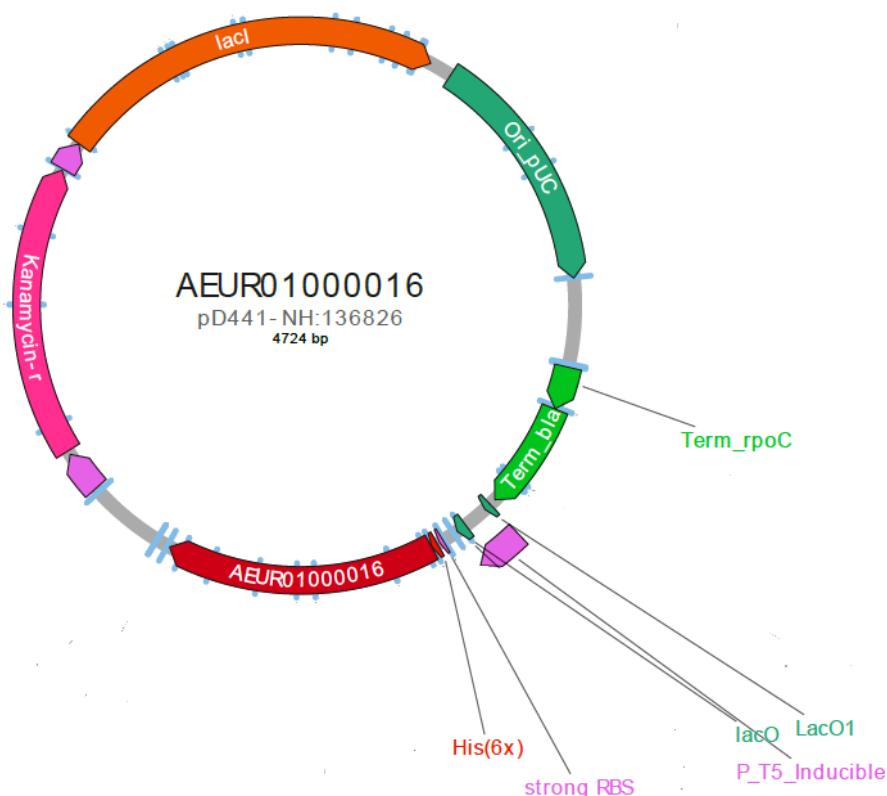


Figura 10: Representação esquemática do vetor pD441-NH:136826, sintetizado pela empresa DNA2.0 com o inserto correspondente a ETD-like otimizado para expressão em *E. coli*.

Na representação esquemática, a região em rosa escuro corresponde ao marcador de resistência a canamicina, em laranja o repressor Lac (lacI), em rosa claro o promotor T5, sendo que a origem de replicação pUC (*high_copy_origin*) e o operador lac (lacO) estão marcados em verde escuro.

4.4.2.2 Transformação bacteriana nas linhagens de expressão

As linhagens de *E. coli* OverExpress™ C43 (DE), C41(DE), C43 (DE)pLysS, C41(DE)pLysS, BL21 Star™(DE3) competentes, conforme o item 4.4.1.2.1 foram transformadas com o vetor recombinante pelo método de eletroporação descrito no item 4.4.1.2.2. A seleção dos transformantes foi realizada com plaqueamento em meio sólido LB suplementado com canamicina (50µg.mL⁻¹).

4.4.2.3 Avaliação da expressão da ETD-like

4.4.2.3.1 Indução da expressão gênica em pequena escala em *E. coli*

Inicialmente, foi realizado um pré-inóculo em 5mL de caldo LB acrescido de 5µL de canamicina (50µg/mL) e uma colônia selecionada em placa de cada linhagem testada. O inóculo foi realizado conforme descrito no item 4.2. No dia seguinte, 1mL de cada pré-inóculo foi inoculado em 10mL de meio LB suplementado com 10µL de canamicina (50µg/mL) e incubado a 37°C até atingir a densidade ótica de 0,5-0,6 (DO_{600nm}). Em seguida, 1mL da cultura foi transferido para um microtubo de 1,5mL e centrifugado por 2min a 14000rpm determinando o tempo 0 da amostra (não induzido). Posterior a isso, as culturas foram divididas em dois tubos, cada uma contendo 4,5mL, uma induzida a uma concentração final de 1mM/mL de isopropil-β-galactosídeo (IPTG) e a outra sem indução.

Para avaliar a cinética de expressão, foram coletadas em intervalos de 1h, 1mL de cada amostra, até completar um período de 5h. A cada coleta, essas amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 2min e o precipitado reservado a -20°C para posterior análise da expressão protéica.

4.4.2.3.2 Teste de solubilidade

Para avaliar a solubilidade da proteína em questão, as células C43pLysS e BL21 Star™(DE3), previamente transformadas com o vetor pD441-NH:136826, foram lisadas por sonicação em tampão PBS 1X em 3 ciclos de 30s à 30KHZ com intervalos de 10s entre os ciclos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 2min a 14000rpm e o

sobrenadante foi recuperado em outro microtubo. O teste foi visualizado em SDS-PAGE, conforme descrito no item 4.3.

4.4.2.4 Indução da expressão gênica em larga escala em *E. coli* e tratamento das amostras

O pré-inóculo foi realizado em 10mL de caldo LB adicionando 10 μ L de canamicina (50 μ g/mL) e uma colônia isolada em placa das linhagens, sendo a incubação realizada conforme item 4.2. No dia seguinte, 10mL de cada pré-inóculo foi inoculado em 1000mL de meio LB suplementado com 1000 μ L (50 μ g/mL) de canamicina. A incubação a 37°C foi realizada até a obtenção de uma densidade ótica de 0,5-0,6 (DO_{600nm}). Posteriormente, 1mL de cada cultura foi transferida para um microtubo de 1,5mL, seguida por centrifugação durante 2min a 14000rpm, correspondente ao tempo 0 da amostra (não induzido). Em seguida, a cultura foi induzida a uma concentração final de 1mM/mL de IPTG por um período de 5h. Para avaliação da indução após esse período, 1mL da cultura foi recuperada em um microtubo de 1,5mL e centrifugada por 2min a 14000rpm (tempo 5 da amostra induzida). As amostras correspondentes aos tempos 0 e 5 foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras (SDS-PAGE) conforme descrito no item 4.3. A cultura de 1L induzida foi centrifugada a 4000rpm, 4°C por 15min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado armazenado a – 20°C, para posterior tratamento e purificação.

O precipitado foi ressuspenso em 50mL de solução de lise. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram sonicadas em 3 ciclos de 30s com intervalos de 15s a uma amplitude de 62%. Posteriormente, foram centrifugadas por 20min a 4°C com 5000rpm, o sobrenadante e o precipitado foram separados e armazenados a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 50mL de solução de corrida (primeiro tratamento), vortexado e sonicado em 3 ciclos de 30s, com intervalos de 15s, a uma amplitude de 62%. As amostras foram centrifugadas novamente e o precipitado e sobrenadante foram novamente separados. Ao precipitado do primeiro tratamento, foram adicionados 50mL de tampão de corrida (segundo tratamento), vortexado e centrifugado por 1h a 5000rpm, juntamente com o sobrenadante do primeiro tratamento. O precipitado e sobrenadante foram separados, sendo que o sobrenadante do primeiro e do segundo tratamento foram filtrados com membrana de 0,45 μ m.

Paralelamente a indução em larga escala e tratamento da ETD-like, foi induzida a proteína quinase G (PknG, do inglês *protein kinase G*), sob as mesmas condições, para utilização como controle do ensaio *in vivo*. O gene *pknG* foi identificado em *C. pseudotuberculosis* FRC41 (Trost *et al.*, 2010), sendo que a proteína em questão foi

expressa na linhagem BL21 Star™(DE3), avaliada previamente em projetos paralelos pelo grupo de pesquisa.

4.4.2.5 Purificação da proteína ETD-like no sistema AKTAprime e diálise

A proteína foi purificada utilizando o sistema AKTA Prime (GE Healthcare), através de cromatografia por afinidade em coluna (HisTrap HP 1mL – GE Healthcare), carregada com 1mL de NiSO₄ (100mM). A cromatografia foi realizada com fluxo de 1mL/min, sob condições desnaturantes, sendo coletada as frações eluídas a cada 1mL. A coluna foi equilibrada com a solução de corrida, sendo inseridos um volume de aproximadamente 45mL do extrato protéico de cada amostra. Após aplicada a amostra, a coluna foi lavada com solução de corrida, sendo eluída da coluna com a solução de eluição. Posteriormente, a coluna e o aparelho foram lavados com H₂O e etanol 20%. Quando se fez necessário, a mesma metodologia sem o agente desnaturante (uréia 8M) foi realizada. Padronizada previamente quanto a solubilidade, a proteína PknG também foi expressa com a adição de uréia.

As frações protéicas obtidas com a purificação foram resolvidas por SDS-PAGE conforme descrito no item 4.3. As frações com a proteína ETD-like e PknG foram dialisadas em 4 litros de tampão PBS 1X cada, com uma membrana *Spectra/Por® Dialysis membrane tubing* por 24h, em câmara fria e sob agitação. As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford, utilizando BSA como padrão (Sambrook e Russel, 2001).

4.4.2.6 . Western blotting

Para o *Western blotting*, a proteína purificada foi resolvida por SDS-PAGE a 12% e, conforme descrito no item 4.4.1.4.3, utilizado o kit *Western Breeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection* (Invitrogen) para imunodeteção, sendo que, nessa etapa a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-histidina na diluição 1:2000 (Sigma).

4.5 Ensaio *in vivo*

A avaliação da atividade esfoliativa da ETD recombinante purificada foi realizada com a aplicação subcutânea de 20µg, 40µg e 80 µg da proteína em 100µL de PBS 1X no dorso de camundongos Balb/c neonatos (com 24h) (Amagai *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2002). Os animais foram observados por um período de 12 horas e fotodocumentados quando necessário. Como controle, 100µL de PBS 1X foram aplicados no dorso dos camundongos, assim como 20 µg da proteína PknG. Os animais foram fornecidos pelo Centro de

Bioterismo do ICB/UFMG, sendo os procedimentos realizados seguindo as normas do comitê de ética desta instituição de pesquisa (CETEA/UFMG), sob o número 0066/11.

5 RESULTADOS

5.1 Análises *in silico*

A *ORF O46_2740*, que codifica uma proteína homóloga a toxina esfoliativa (ETD) de *S. aureus*, foi descrita como imunoreativa em linhagens isoladas de ovinos com mastite subclínica na França (Le Maréchal et al., 2011c).

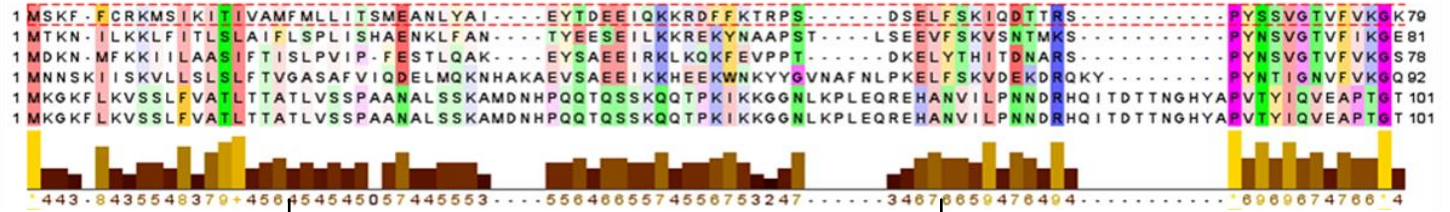
Inicialmente, para a caracterização *in silico* da possível ETD-like foi utilizado o programa ProtParam, que forneceu informações sobre as características físico-químicas da proteína, como a presença de 280 aminoácidos, peso molecular estimado de aproximadamente 31kDa, com peptídeo sinal, e ponto isoelétrico (pI) teórico de 8,8 (Tabela 4).

Quando a sequência nucleotídica da possível ETD-like foi avaliada por blast, adotando-se um *threshold* de 10 e limite de 50 *hits*, alinhou com 99% de identidade e um Evalue de 0 com a ETD da linhagem *S. aureus* M10/0061. Foram selecionadas para o alinhamento no ClustalW as sequências de aminoácidos correspondentes a uma ETB (58% de identidade), ETA (44% de identidade), Glutamyl Endopeptidase (*Staphylococcus aureus* N315) e Glutamyl Endopeptidase (*Staphylococcus aureus* Mu50), ambas com 34% de identidade, obtidas utilizando o banco de dados “UniProtKB/Swiss-Prot” e uma ETD (60% de identidade), com o banco de dados “UniProtKB”. Com o alinhamento múltiplo de sequências (MSA, do inglês *Multiple Sequence Alignment*), a identificação da tríade catalítica descrita por Park *et al.* (2011), típica de serino-proteases, pode ser observada (Figura 11). O alinhamento foi editado pela ferramenta Jalview, no qual os resíduos foram coloridos de acordo com suas propriedades físico-químicas. As colunas com resíduos mais conservados apresentam cores com tonalidade de maior intensidade, enquanto que os menos conservados são tonalidades mais claras.

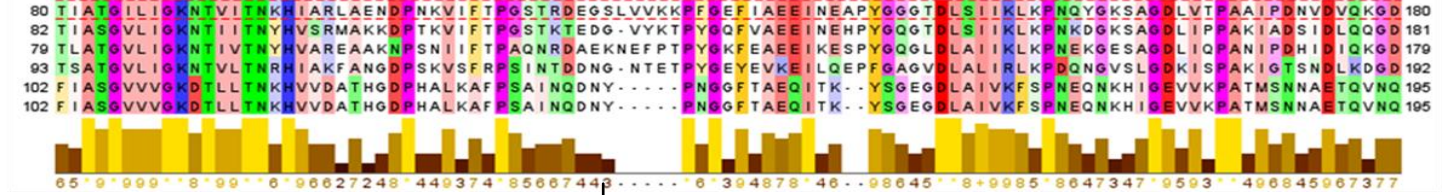
Tabela 4: ProtParam - predição de parâmetros físico-químicos

Proteína	Nº de aa	kDa	pI teórico	Fórmula molecular	Nº de átomos
ETD-like	280	30.873,1	8,88	$C_{1389}H_{2186}N_{360}O_{422}S_6$	4363

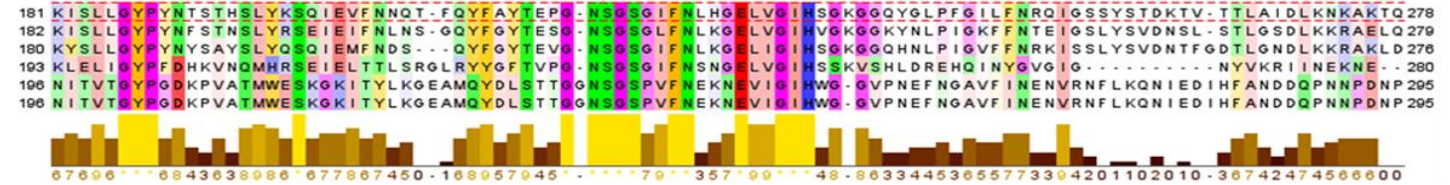
ETD-like_ *S. aureus* O46
 ETD_ *S. aureus*
 ETB_ *S. aureus*
 ETA_ *S. aureus*
 Glutamil endopeptidase_ *S. aureus* N315
 Glutamil endopeptidase_ *S. aureus* Mu50



ETD-like_ *S. aureus* O46
 ETD_ *S. aureus*
 ETB_ *S. aureus*
 ETA_ *S. aureus*
 Glutamil endopeptidase_ *S. aureus* N315
 Glutamil endopeptidase_ *S. aureus* Mu50



ETD-like_ *S. aureus* O46
 ETD_ *S. aureus*
 ETB_ *S. aureus*
 ETA_ *S. aureus*
 Glutamil endopeptidase_ *S. aureus* N315
 Glutamil endopeptidase_ *S. aureus* Mu50



ETD-like_ *S. aureus* O46
 ETD_ *S. aureus*
 ETB_ *S. aureus*
 ETA_ *S. aureus*
 Glutamil endopeptidase_ *S. aureus* N315
 Glutamil endopeptidase_ *S. aureus* Mu50

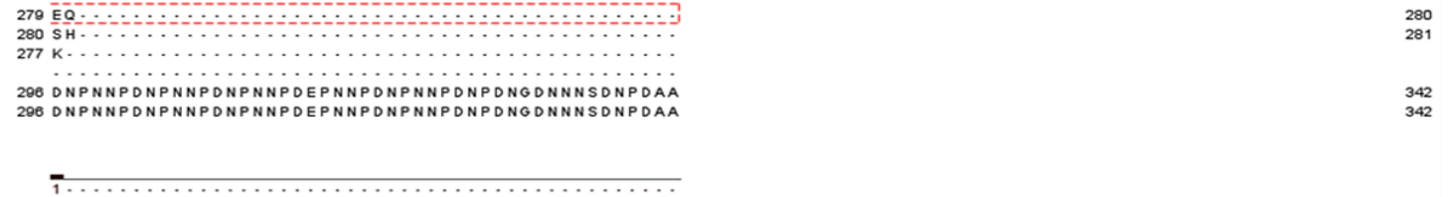


Figura 11: Alinhamento entre as sequências da ETD-like, ETD, ETB, ETA e Glutamil endopeptidases de *S. aureus*. As barras correspondem a conservação dos resíduos sendo 100% indicado por asterisco. As setas indicam os três aminoácidos do sítio catalítico.

A conservação entre os aminoácidos é indicada pelo gráfico de barras abaixo do alinhamento, sendo que a cor marrom representa menor conservação e a amarela uma maior conservação. Os asteriscos indicam 100% de conservação no resíduo.

A presença do peptídeo sinal na proteína foi avaliada através da utilização do programa SignalP4.1. Os resultados obtidos inferem a presença de um peptídeo sinal, sendo o sítio de clivagem entre os aminoácidos 32 e 33 (Figura 12).

No programa TMHMM2.0, a identificação de regiões hidrofóbicas internas na sequência de aminoácidos, inferem que as proteínas testadas apresentam domínios transmembrana. Esse programa permite prever a localização de uma possível região transmembrana, além da topologia das estruturas secundárias das proteínas, indicando domínios intra e extracelulares. Quando avaliada no mesmo, a ETD-like não apresentou domínios transmembrana internos (Figura 13). O peptídeo sinal apresenta uma região hidrofóbica que pode facilmente ser confundida com uma região transmembrana (Krogh *et al.*, 2001), e por isso foi retirado antes da avaliação com TMHMM2.0.

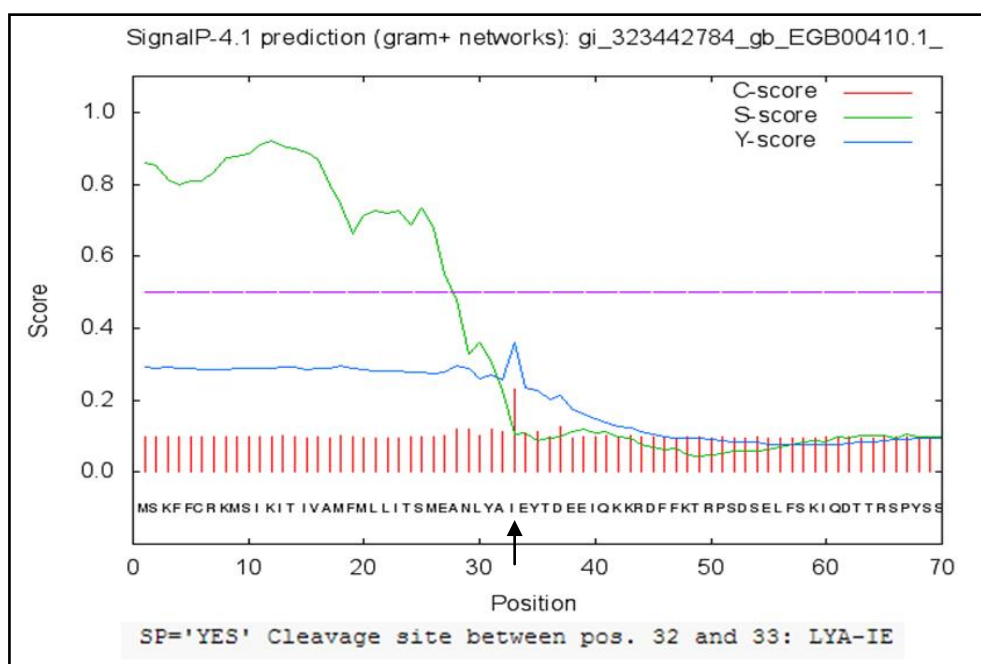


Figura 12: Predição do peptídeo sinal da proteína ETD-like através do programa SignalP 4.1. A seta indica o sítio de clivagem do peptídeo sinal, entre os aminoácidos 32 e 33.

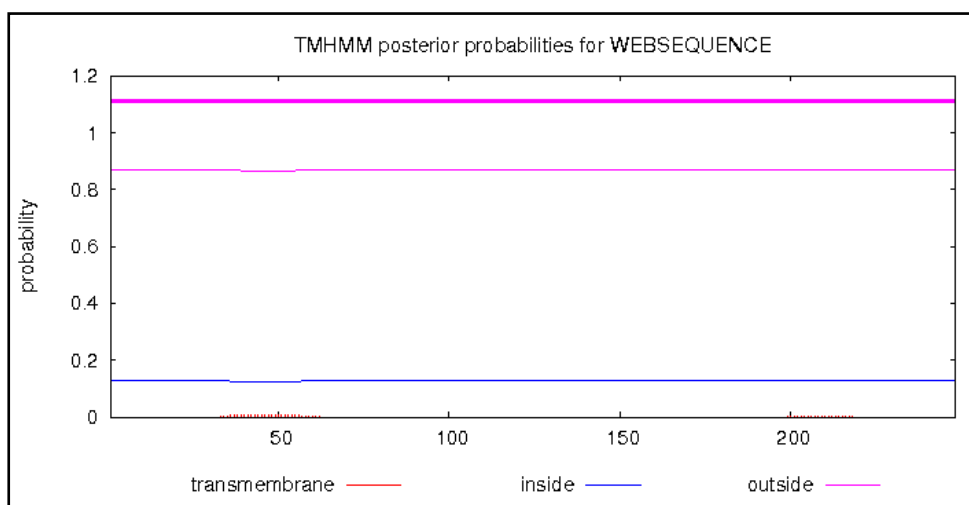


Figura 13: Predição dos domínios transmembrânicos através do programa TMHMM2.0. A ETD-like não possui domínios intracelulares e transmembrânicos.

Para classificar a proteína e avaliar seus domínios, a ferramenta de escolha foi o InterProScan. O resultado obtido pode ser observado na Figura 14, que sugere a classificação da proteína estudada como uma serino peptidase, pertencente à família S1 e subfamília S1B, segundo o banco de dados MEROPS *the Peptidase Database*.

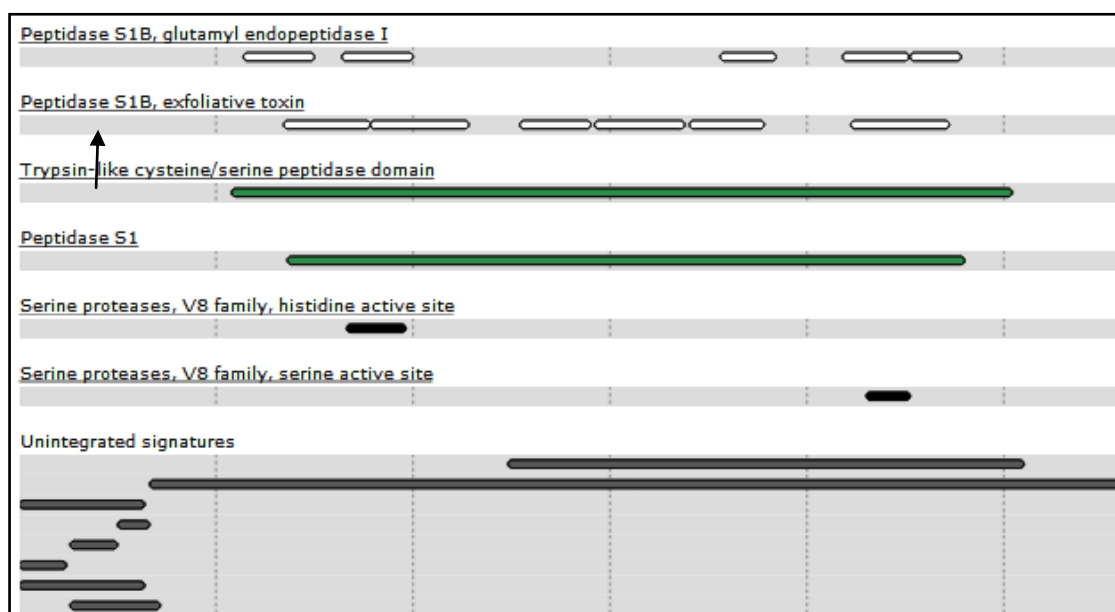


Figura 14: Representação gráfica dos domínios identificados na ETD-like por InterProScan5. A seta indica a subfamília S1B na qual a proteína foi classificada.

A estrutura tridimensional da ETD-like foi construída utilizando como moldes duas estruturas da ETB depositadas no *Protein Data Bank*, 1DT2 e 1QTF, ambas com 58% de identidade e 86% de cobertura.

É importante avaliar a qualidade de uma estrutura gerada, mesmo quando se está construindo um modelo baseado em uma estrutura já conhecida, sendo que, as duas medidas mais utilizadas para tal avaliação são a resolução e o fator R (Laskowski *et al.*, 1993). Segundo Laskowski *et al.* (1993) é comum obter modelos confiáveis com resolução igual ou superior a 2 Å, sendo o fator R uma medida mais incerta. No nosso estudo, o melhor modelo construído foi obtido utilizando o molde 1QTF, que apresenta uma resolução de 2.40Å, quando comparada com a 1DT2 (2.80 Å).

Com o programa PyMol, foi possível visualizar a estrutura tridimensional do modelo criado da proteína, destacando a sua superfície, assim como os três resíduos que constituem o sítio ativo, uma histidina (His95), um ácido aspártico (Asp145) e uma serina (Ser 217) (Figuras 15 e 16). A qualidade estereoquímica do modelo criado, assim como todos os seus resíduos, foi avaliada através do programa PROCHECK, com a partir do gráfico de Ramachandran (Figura 17).

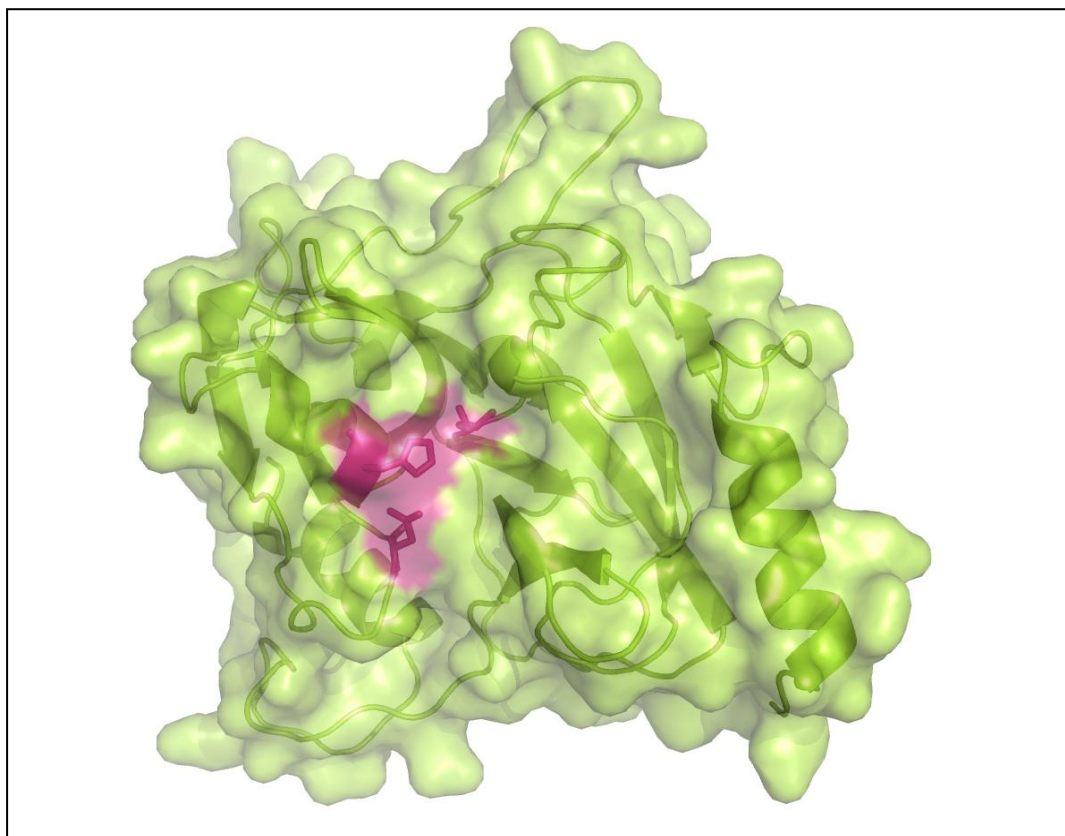


Figura 15: Modelo tridimensional da ETD-like obtida através do Modeller9.12 e visualizada pelo PyMol. Destaque para a região rosa, que constitui os três resíduos do sítio ativo do molde selecionado, uma histidina (H) no resíduo 95, um ácido aspártico (D) no resíduo 145 e uma serina (S) no resíduo 217.

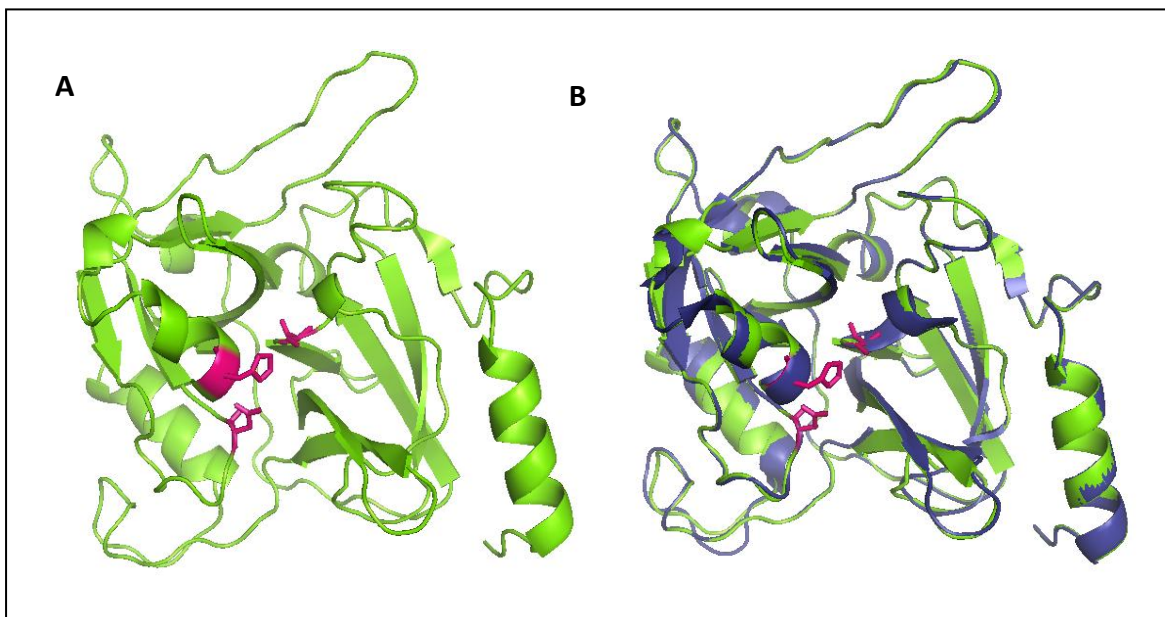


Figura 16: Conformação do polipeptídeo ETD-like. A) Modelo construído da proteína ETD-like da linhagem *S. aureus* O46. A região rosa constitui os três resíduos do sítio ativo. B) Sobreposição entre o modelo construído e o molde 1QTF (RMSD=0.123). Modelo construído em verde e molde em azul.

No gráfico de Ramachandran, os quadrados correspondem aos aminoácidos da proteína, sendo que as glicinas são representadas por triângulos. As regiões do gráfico em vermelho correspondem às áreas mais favoráveis energeticamente para a detecção de um resíduo, e no modelo apresentado, compreendem a 87,6% dos resíduos da ETD-like. Nenhum aminoácido foi encontrado em regiões energeticamente desfavoráveis (áreas em branco no gráfico). A região amarela escura corresponde a locais adicionalmente permitidas, com 12% dos resíduos, e as generosamente permitidas (pouco favoráveis), visíveis no gráfico em amarelo claro, contendo 0,5% dos resíduos da proteína em estudo (Figura 17). A correspondência entre os resíduos e a estrutura secundária, também obtida pela ferramenta PROCHECK pode ser visualizada na Figura 18. A análise do gráfico de Ramachandran garante a qualidade da estrutura obtida na modelagem. A modelagem por homologia demonstrou ser uma ferramenta adequada para a predição teórica da estrutura de proteínas.

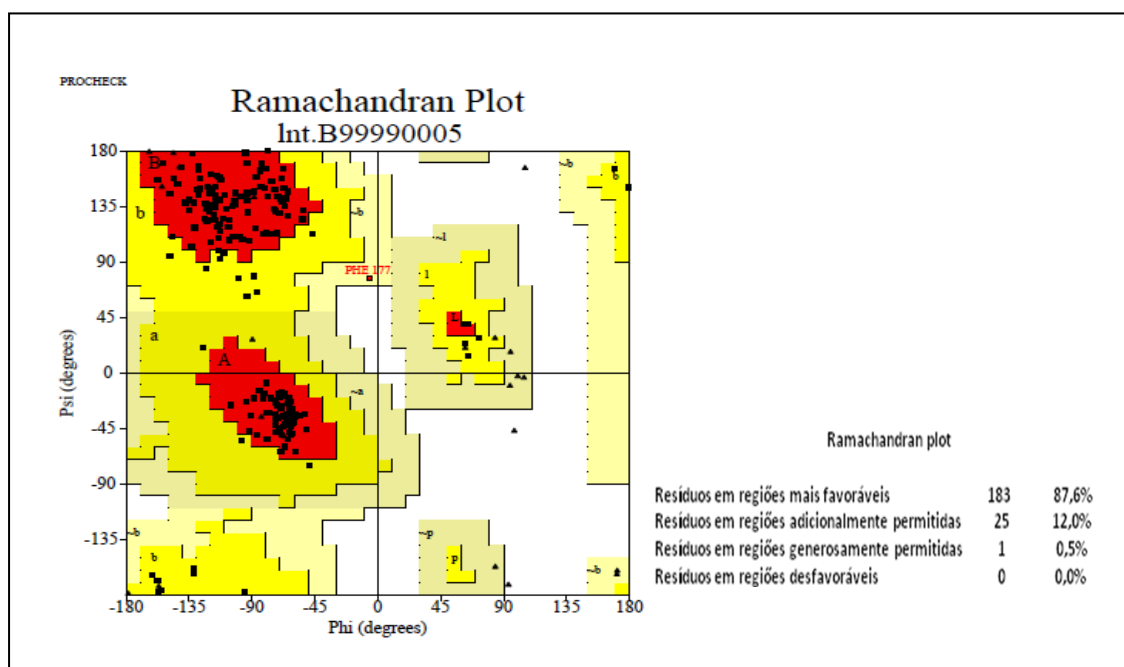


Figura 17: Gráfico de Ramachandran obtida através do programa PROCHECK. As regiões em vermelho correspondem a áreas mais energeticamente favoráveis, a região amarela escura a áreas adicionalmente permitidas, a amarela clara a região generosamente permitida, sendo a área branca não favorável para a identificação de resíduos.

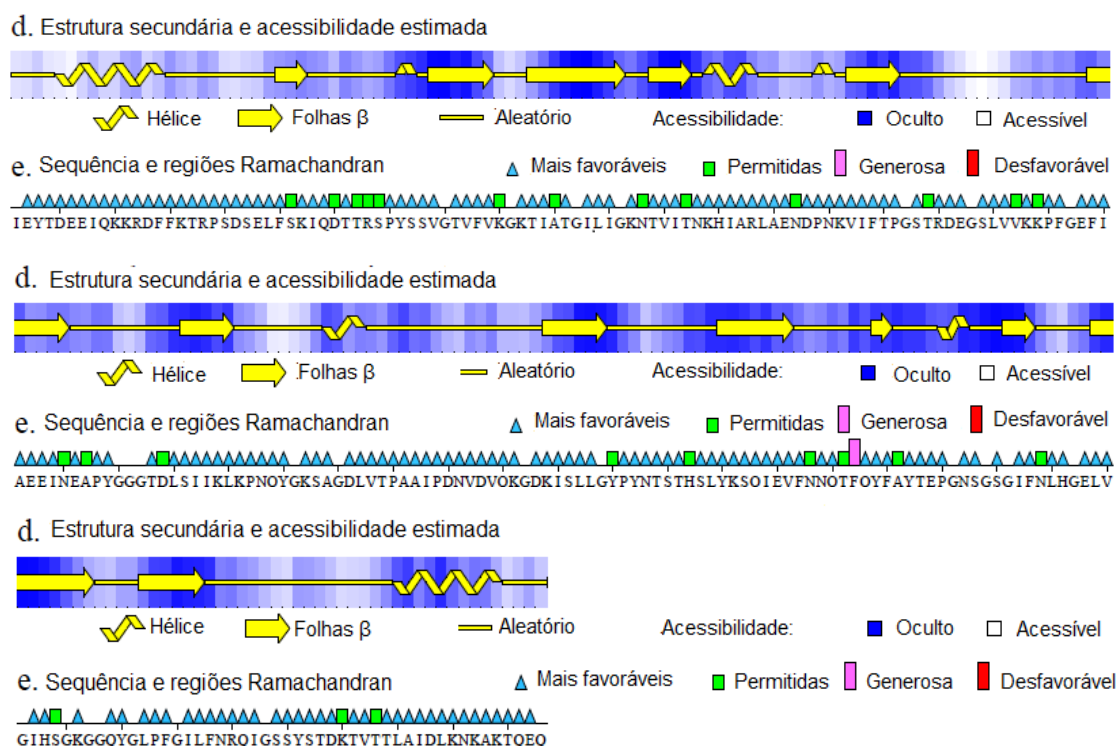


Figura 18: Representação gráfica da estrutura secundária no modelo tridimensional construído e resíduos correspondentes. As α -hélices e folhas β estão indicadas em amarelo. Os triângulos azuis correspondem a regiões mais energeticamente favoráveis, os quadrados em verde as regiões adicionalmente permitidas, os retângulos em rosa as regiões generosamente permitidas e os retângulos em vermelho regiões desfavoráveis.

5.2 Clonagem e expressão da proteína recombinante

5.2.1 Estratégia I

5.2.1.1 Clonagem molecular do inserto no sistema pGEM-T Easy Vector e confirmação dos clones recombinantes

O DNA genômico de *S. aureus* O46 e O11 foram extraídos com rendimento de aproximadamente 2900ng/μL e 2100ng/μL respectivamente. O DNA genômico da linhagem O46 foi utilizado como molde para a amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 890 pb referente ao gene O46_2740, que codifica a proteína em estudo. Sítios de restrição para as enzimas *Nsi*I e *Xho*I foram adicionados aos oligonucleotídeos iniciadores para que a *ORF* fosse clonado de forma direcional e em fase de leitura correta, no vetor de expressão p*XylT*:*SEC:nuc* de *L. lactis* (sistema XIES). O produto da amplificação foi observado em gel de agarose 1%, sendo verificada a eficiência da reação, assim como ausência de produtos inespecíficos (Figura 19).

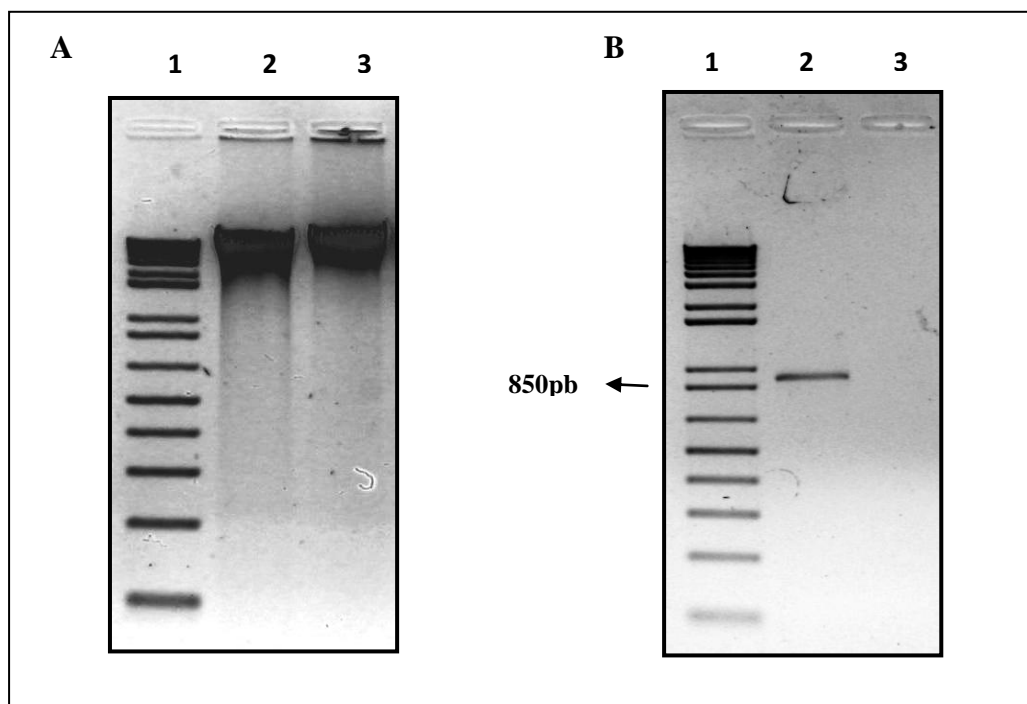


Figura 19: Análise da extração de DNA genômico das linhagens bacterianas de *S. aureus* O46 e O11 e avaliação do produto de amplificação por PCR da sequência correspondente a ETD-like. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **A) Extração de DNA genômico.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: DNA genômico da linhagem O46; Canaleta 3: DNA genômico da linhagem O11. **B) Amplificação por PCR.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto de amplificação do gene ETD-like; Canaleta 3: Controle negativo da reação.

O fragmento de interesse foi purificado (Figura 20A) para posterior ligação no vetor de clonagem pGEM T-Easy Vector, gerando o plasmídeo pGEM:ETD-like. Em seguida, esse plasmídeo foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 e sua confirmação foi efetuada após crescimento das colônias em placa suplementada com ampicilina e seleção aleatória das mesmas. O DNA plasmidiano foi extraído dessas culturas para ser utilizado como molde da reação de PCR, como primeira etapa para confirmação da obtenção do clone. O produto da amplificação pode ser observado na Figura 20B.

Seguindo a etapa de confirmação dos clones resistentes, dois deles foram selecionados aleatoriamente, e os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, que flanqueia o sítio de clonagem do inserto no vetor (Figura 21). Posterior a confirmação dos clones por PCR e digestão enzimática, a extração de DNA em média escala foi realizada para a obtenção do produto em maior concentração e pureza.

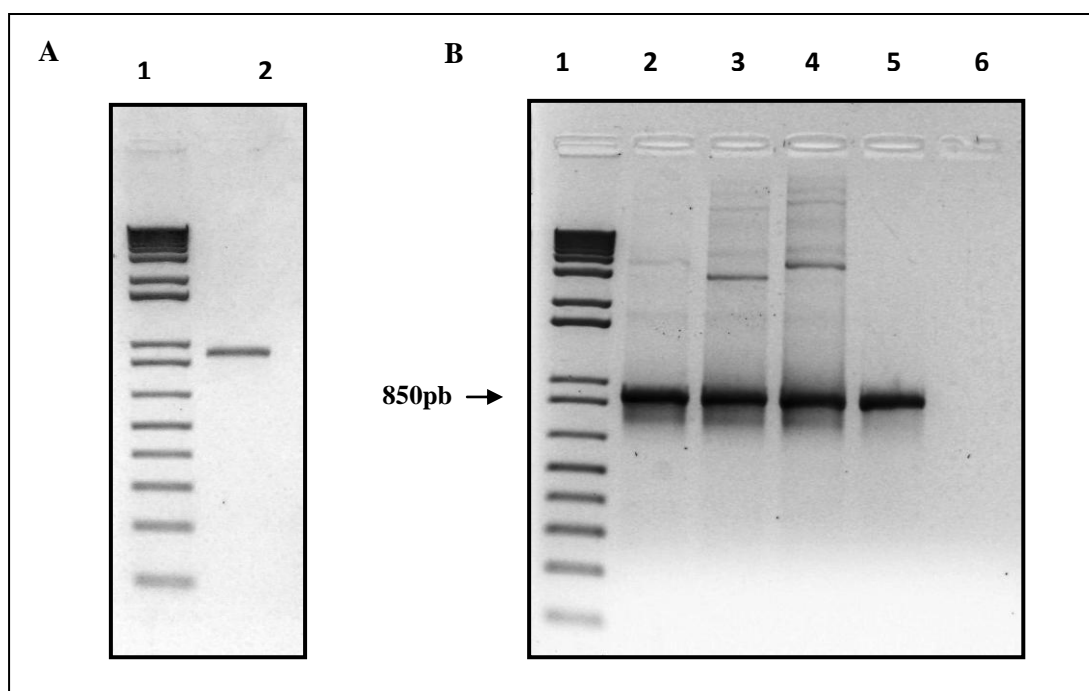


Figura 20: Avaliação do produto da PCR purificado e amplificação por PCR do inserto ETD-like utilizando como molde o DNA plasmidiano extraído de células *E. coli* TOP10 eletrocompetentes transformadas com o vetor pGEM:ETD-like. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **A) Purificação.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Purificação do produto da PCR. **B) Amplificação do PCR utilizando o vetor pGEM:ETD-like como molde.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 2, 3 e 4: Clones confirmados portadores do inserto ETD-like; Canaleta 5: Controle positivo utilizando como molde o DNA genômico de *S. aureus* O46; Canaleta 6: Controle negativo da reação.

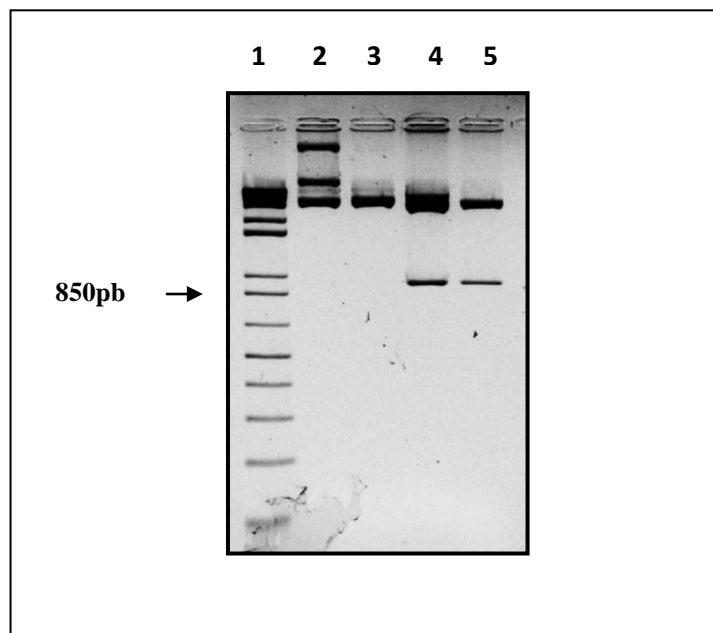


Figura 21: Confirmação da obtenção do clone por digestão enzimática do vetor pGEM:ETD-like com a enzima de restrição *EcoRI*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **A) Digestão enzimática com a enzima *EcoRI*.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 2 e 3: clones sem digerir; Canaletas 4 e 5: clones digeridos.

5.2.1.2 Clonagem molecular do inserto no sistema XIES e confirmação dos clones recombinantes

O sistema de expressão XIES (Miyoshi *et al.*, 2004) foi selecionado por ser capaz de endereçar corretamente proteínas heterólogas para o meio extracelular. Assim, para que a clonagem fosse realizada no vetor de expressão p*XyIT*:SEC:*nuc* (secretado), o mesmo foi digerido com as enzimas *NsiI* e *XhoI* para liberação da ORF *nuc* (613pb) e posterior purificação do fragmento p*XyIT*:SEC. Paralelamente, foi realizada a digestão enzimática do vetor pGEM:ETD-like e a purificação do inserto (Figura 22). Os fragmentos purificados (vetores e insertos) foram submetidos a uma reação de ligação.

O produto de ligação foi utilizado na transformação de células *E. coli* TOP10 eletrocompetentes. O processo de seleção das colônias transformadas com o plasmídeo ligado foi realizada em meio LB ágar suplementado com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol. Posterior à transformação, foram observadas colônias após aproximadamente 48 horas de incubação a 30°C, seguindo então as etapas de confirmação da clonagem. A extração de DNA plasmidiano foi realizada para posterior confirmação por PCR e digestão enzimática com *NsiI* e *XhoI* (Figura 23). A construção foi sequenciada por eletroforese capilar em

aparelho ABI3130 e analisada no Vector NTI Advance™11, para verificar a integridade da sequência nucleotídica (Figura 24).

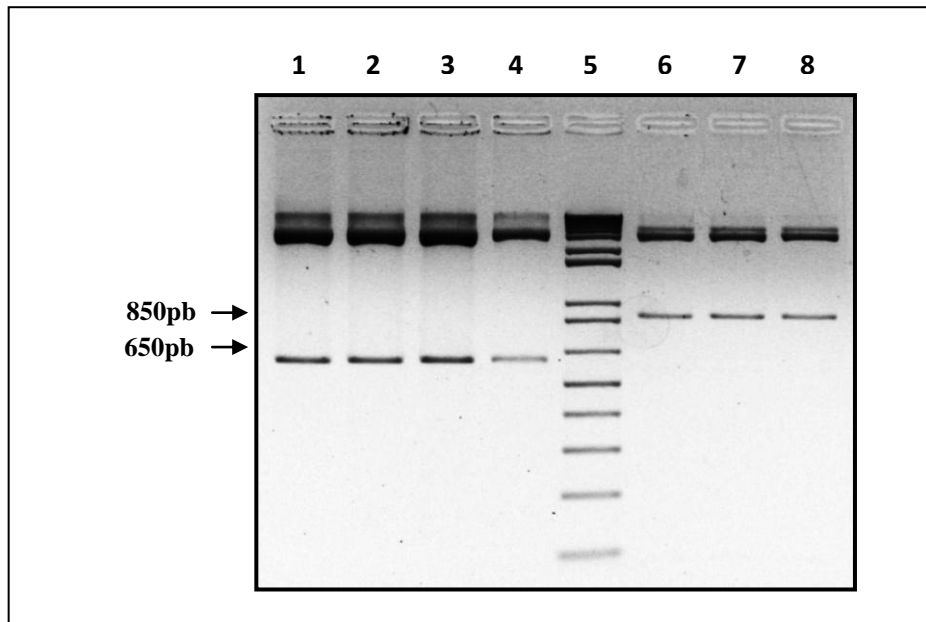


Figura 22: Digestões enzimáticas com *NsiI* e *XhoI* para purificação do inserto ETD-like e do vetor XIES. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **Digestões enzimáticas realizadas para purificação do inserto ETD-like e vetor XIES para posterior ligação.** Canaletas 1 a 4: Digestão enzimática do vetor XIES com a liberação do inserto correspondente a *nuc*; Canaleta 5: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 6 a 8: Digestão enzimática do vetor pGEM:ETD-like.

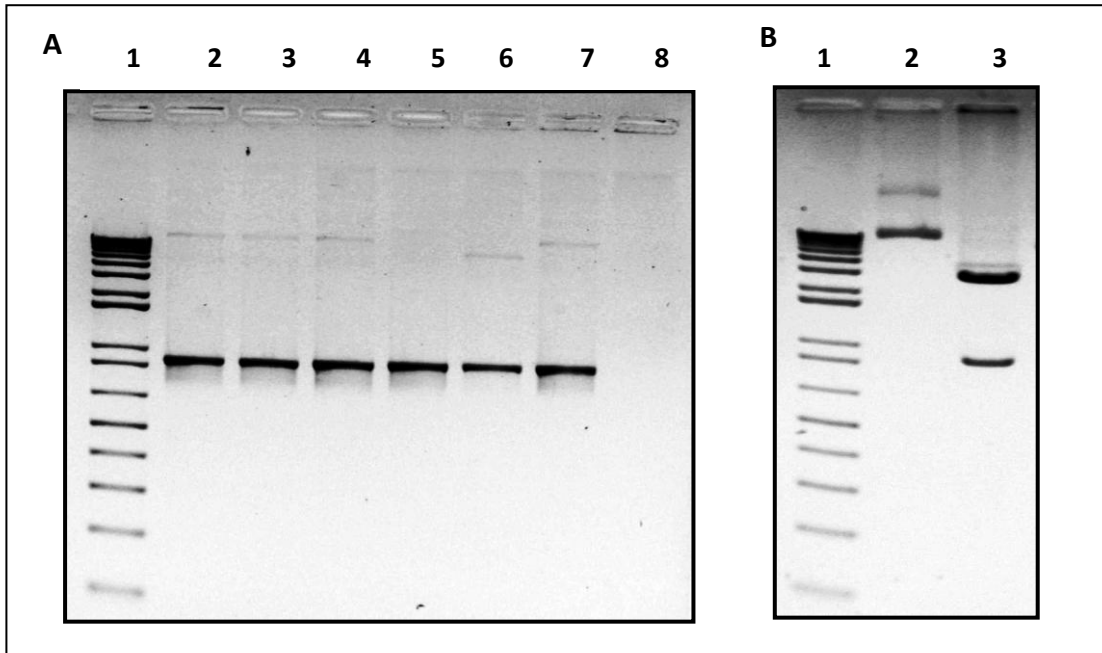


Figura 23: Amplificação por PCR do gene ETD-like a partir de DNA plasmidiano extraído de células *E. coli* TOP10 transformadas com o plasmídeo pXylT:SEC:ETD-like e digestão enzimática do DNA plasmidiano com as enzimas Nsil e XhoI, com liberação do inserto ETD-like. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **A) Amplificação por PCR do gene ETD-like utilizando como molde o DNA plasmidiano (pXylT:SEC:ETD-like) extraído das células *E. coli* TOP10 transformadas.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 2 a 7: Amplificação do gene ETD-like; Canaleta 8: controle negativo da reação. **B) Digestão enzimática do DNA plasmidiano com as enzimas Nsil e XhoI.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Plasmídeo pXylT:SEC:ETD-like sem digerir; Canaleta 3: Digestão enzimática de um clone selecionado aleatoriamente para confirmação.

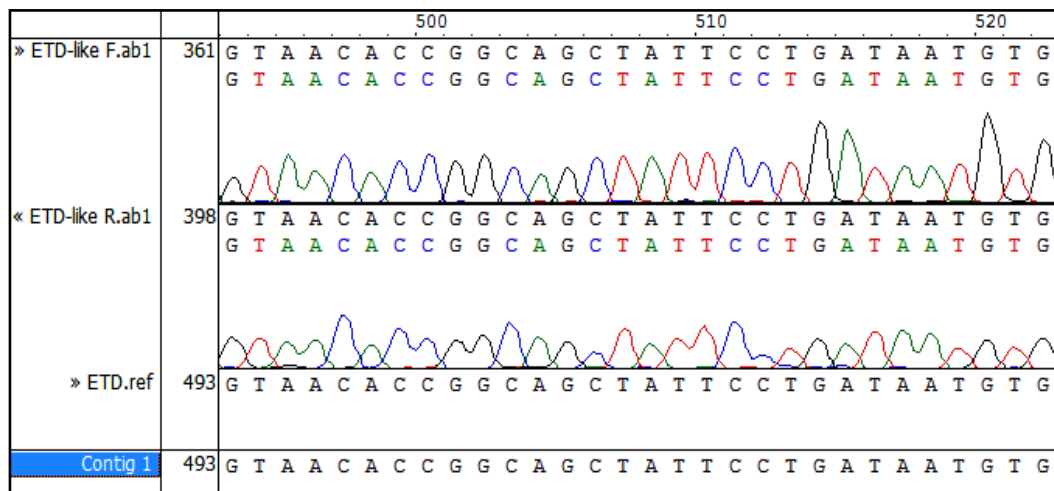


Figura 24: Sequenciamento da construção pXylT:SEC:ETD-like. Contig obtido com a ETD-like referência e correspondência dos picos no cromatograma. Cada cor indica um nucleotídeo: G-preto; T-vermelho; A-verde; C-azul.

5.2.1.3 Obtenção das linhagens de *L. lactis* recombinantes

Confirmada a construção pXyI/SEC:ETD-like em *E. coli*, a extração plasmidiana foi utilizada para transformação de células competentes da linhagem de *L. lactis* NCDO2118. Os clones foram selecionados aleatoriamente e nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, sem o plasmídeo. Posteriormente, os DNAs plasmidianos extraídos foram utilizados como molde em reações de PCR, utilizando os iniciadores específicos para amplificação da *ORF* O46_2740. Concomitantemente, o DNA plasmidiano extraído dos possíveis clones foram submetidos à digestão com as endonucleases de restrição *NsiI* e *XhoI* (Figura 25).

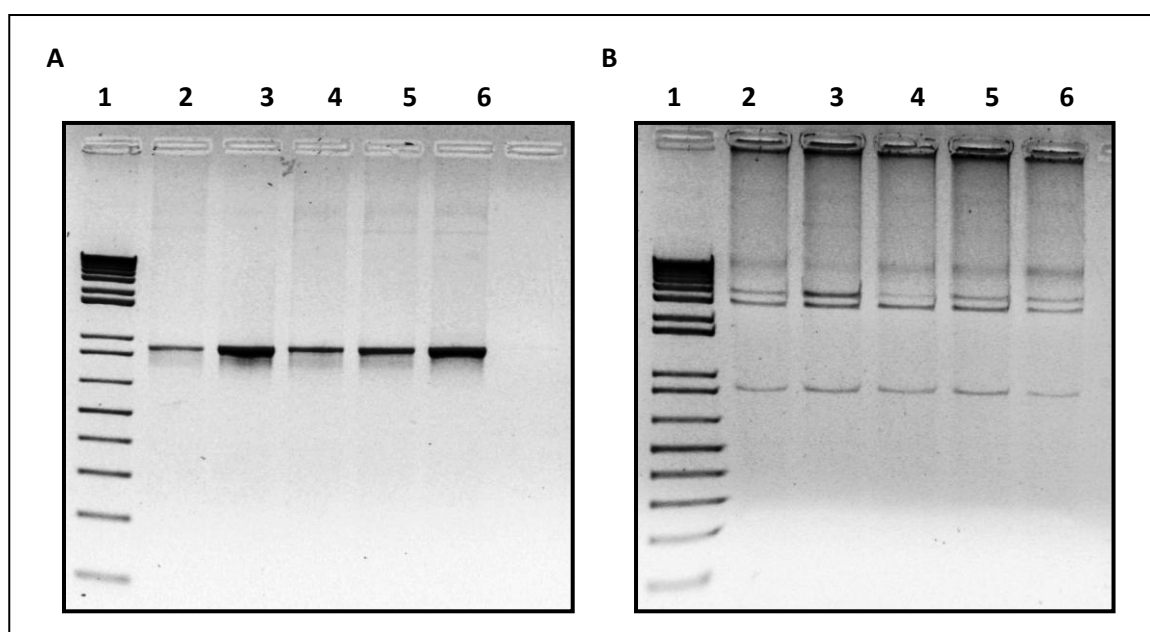


Figura 25: Amplificação por PCR do gene ETD-like a partir de DNA plasmidiano extraído de *L. lactis* NCDO2118 transformadas com o plasmídeo pXyI/SEC:ETD-like e digestão enzimática do DNA plasmidiano com as enzimas *NsiI* e *XhoI*, com liberação do inserto ETD-like. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **A) Amplificação por PCR do gene ETD-like utilizando como molde o DNA plasmidiano (pXyI/SEC:ETD-like) extraído das células de *L. lactis* NCDO2118 transformadas.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 2 a 6: Amplificação do gene ETD-like nos 5 clones selecionados aleatoriamente para confirmação; Canaleta 7: controle negativo da reação. **B) Digestão enzimática do DNA plasmidiano com as enzimas *NsiI* e *XhoI*.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 2 a 6: Digestão enzimática dos 5 clones selecionados aleatoriamente para confirmação.

Uma vez confirmada a construção em *L. lactis*, a etapa subsequente consistiu na verificação da expressão dos clones recombinantes. Com esse objetivo, foi realizada a extração de proteínas da fração total e sobrenadante dos clones induzidos e não induzidos. As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida 12% e posterior imunodeteção por *Western blotting* (Figura 26), utilizando um anticorpo específico para ETD, cordialmente cedido pelo INRA. A eficácia do anticorpo foi confirmada, uma vez que a banda com

aproximadamente 30kDa da extração do sobrenadante de O46, revelou a ETD-like. A extração do sobrenadante da linhagem O11 também detectou a proteína, como previamente descrito por Le Marechal *et al.* (2011a), além de uma reação inespecífica, com aproximadamente 55kDa. Todos os clones na linhagem de *L. lactis* NCDO2118 foram avaliados (dados não exibidos) e não foi possível confirmar a expressão da proteína ETD-like no sobrenadante e precipitado dos mesmos.

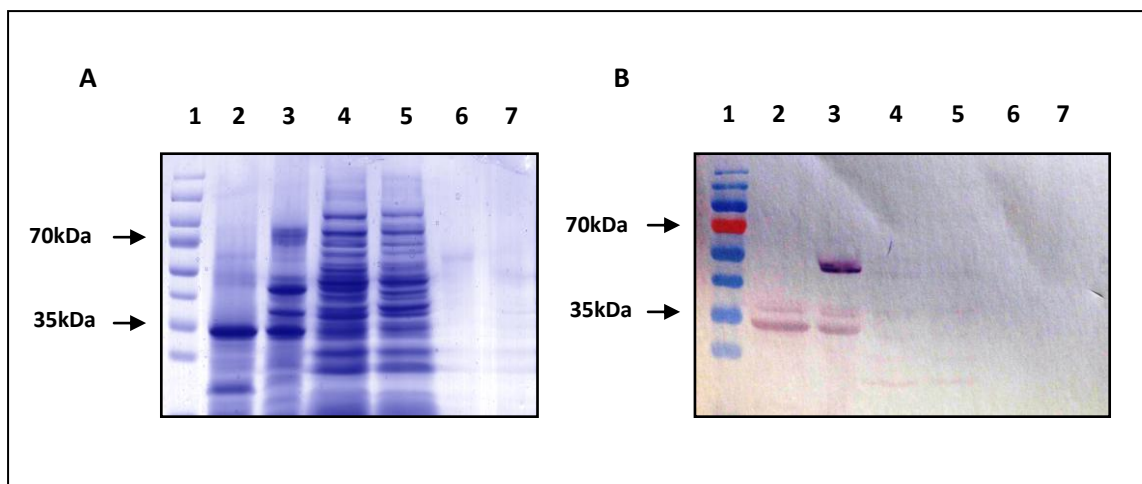


Figura 26: Avaliação da expressão da ETD-like em um dos clones obtidos da linhagem *L. lactis* NCDO 2128 transformada com o vetor pXylT:SEC:ETD-like e o Western blotting correspondente. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. **A) Extração de proteínas de um dos clones obtidos da linhagem *L. lactis* NCDO 2128 transformada com o vetor pXylT:SEC:ETD-like.** Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Extração de proteínas do sobrenadante de *S. aureus* O46. Coluna 3: Extração de proteínas do sobrenadante de *S. aureus* O11. Coluna 4: *Pellet* do clone não induzido. Coluna 5: *Pellet* do clone induzido. Coluna 6: Sobrenadante do clone não induzido. Coluna 7: Sobrenadante do clone induzido. **B) Western blotting.** Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Extração de proteínas do sobrenadante de *S. aureus* O46. Coluna 3: Extração de proteínas do sobrenadante de *S. aureus* O11. Coluna 4: *Pellet* do clone não induzido. Coluna 5: *Pellet* do clone induzido. Coluna 6: Sobrenadante do clone não induzido. Coluna 7: Sobrenadante do clone induzido.

5.2.2 Estratégia II

5.2.2.1 Comparação da expressão entre as linhagens de *E. coli*

A *ORF* O46-2740 foi sintetizada pela empresa DNA2.0, com códons preferenciais para sua expressão em *E. coli*. No vetor pD441-NH:136826, a *ORF* otimizada correspondente a proteína recombinante ETD-like está sob o controle do promotor de transcrição do bacteriófago T5, induzido por IPTG a uma concentração final de 1mM/mL.

A avaliação da expressão da proteína recombinante foi realizada nas cinco linhagens de expressão de *E. coli*, OverExpress™ C43 (DE), C41(DE), C43 (DE)pLysS,

C41(DE)pLysS, BL21 Star™(DE3), sendo que, as culturas induzidas foram comparadas com as culturas sem indução (Figuras 27, 28 e 29). Quando avaliadas em gel de poliácridamida 12% sob condições desnaturantes, as amostras das linhagens OverExpress™ C43(DE3)pLysS e BL21 Star™(DE3) apresentaram uma banda com aproximadamente o peso molecular de 30kDa, correspondente a proteína ETD-like sem o peptídeo sinal. Como observado, não houve expressão nas linhagens OverExpress™ C43(DE3), C41(DE3) e C41(DE3)pLysS.

A cinética de indução com IPTG (1mM/mL) foi realizada nas 2 linhagens, com avaliação antes da indução, denominado tempo 0, sendo coletadas amostras até a quinta hora de indução, denominado tempo 5 (Figura 30). O resultado obtido no gel demonstrou que o nível de expressão da proteína recombinante foi maior no tempo 5 (5h de indução), sendo o mesmo selecionado para a posterior indução em larga escala.

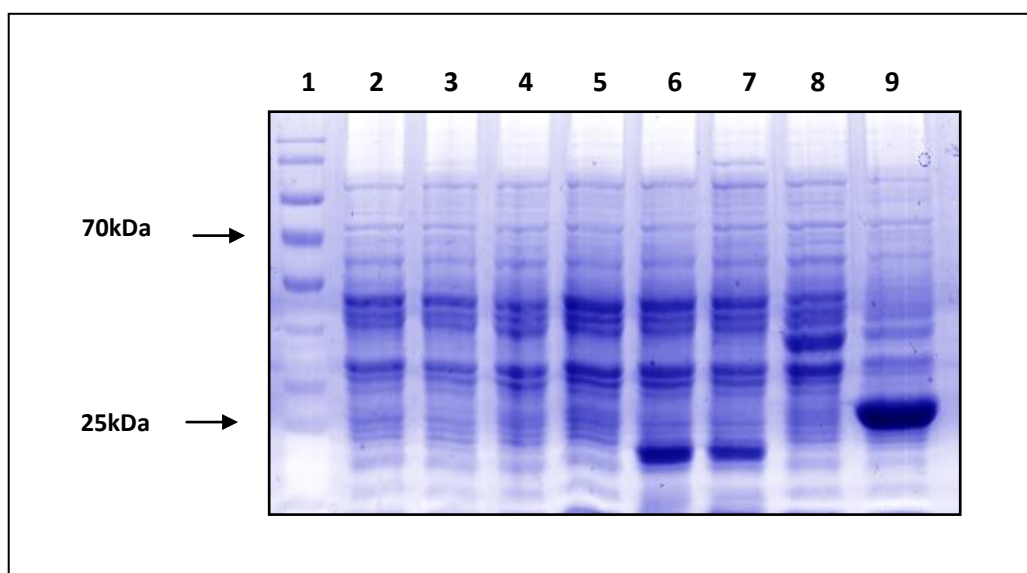


Figura 27: Avaliação da expressão da ETDlike nas linhagens de *E. coli* OverExpress™ C43, C43pLysS após 5h. Eletroforese em gel de poliácridamida 12%. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Linhagem C43 sem o plasmídeo pD441- NH:136826 não induzido. Coluna 3: Linhagem C43 sem o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido. Coluna 4: Linhagem C43 com o plasmídeo pD441- NH:136826 não induzido. Coluna 5: Linhagem C43 com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido. Coluna 6: Linhagem C43pLysS sem o plasmídeo pD441- NH:136826 não induzido. Coluna 7: Linhagem C43pLysS sem o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido. Coluna 8: Linhagem C43pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 não induzido. Coluna 9: Linhagem C43pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido.

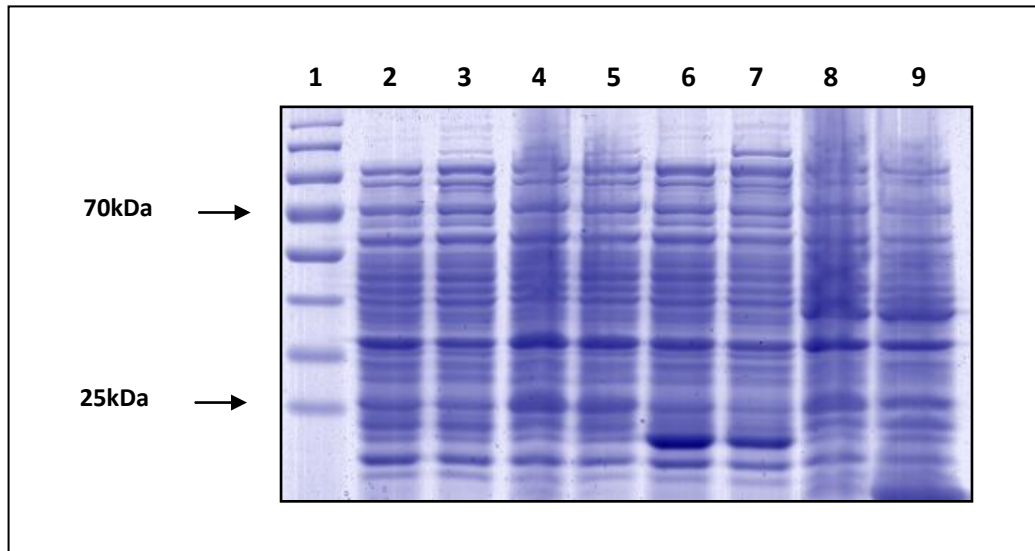


Figura 28: Avaliação da expressão da ETD-like nas linhagens de *E. coli* OverExpress™ C41, C41pLysS. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Linhagem C41 sem o plasmídeo pD441-NH:136826 não induzido. Coluna 3: Linhagem C41 sem o plasmídeo pD441-NH:136826 induzido. Coluna 4: Linhagem C41 com o plasmídeo pD441-NH:136826 não induzido. Coluna 5: Linhagem C41 com o plasmídeo pD441-NH:136826 induzido. Coluna 6: Linhagem C41pLysS sem o plasmídeo pD441-NH:136826 não induzido. Coluna 7: Linhagem C41pLysS sem o plasmídeo pD441-NH:136826 induzido. Coluna 8: Linhagem C41pLysS com o plasmídeo pD441-NH:136826 não induzido. Coluna 9: Linhagem C41pLysS com o plasmídeo pD441-NH:136826 induzido.

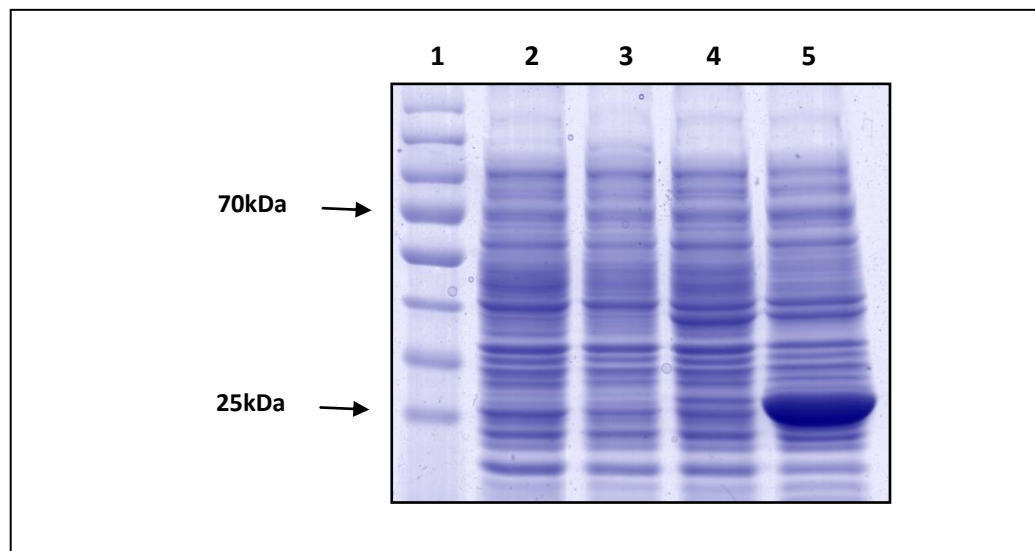


Figura 29: Avaliação da expressão da ETD-like na linhagem de *E. coli* BL21 Star™(DE3). Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Linhagem BL21 Star™(DE3) sem o plasmídeo pD441-NH:136826 não induzido. Coluna 3: Linhagem BL21 Star™(DE3) sem o plasmídeo pD441-NH:136826 induzido. Coluna 4: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441-NH:136826 não induzido. Coluna 5: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441-NH:136826 induzido.

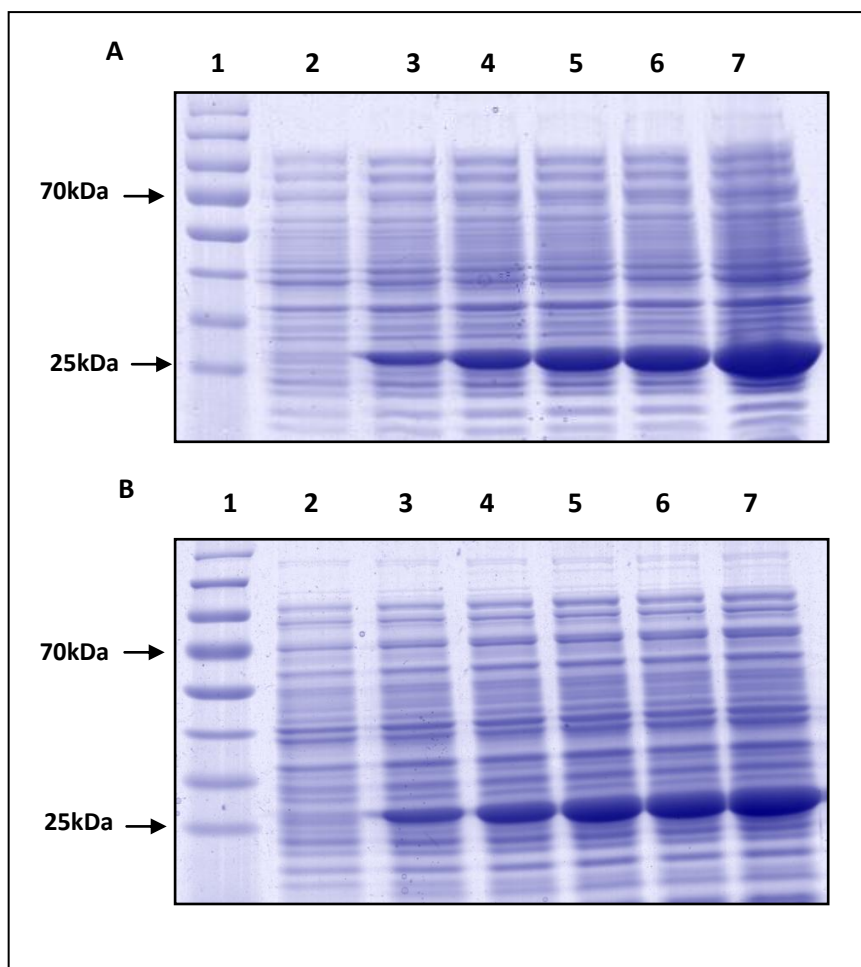


Figura 30: Avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante ETD-like nas linhagens OverExpress™ C43(DE3)pLysS e BL21 Star™(DE3). Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. **A) Cinética da expressão da proteína recombinante ETD-like na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS.** Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 não induzido no tempo 0. Coluna 3: Linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 1. Coluna 4: Linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 2. Coluna 5: Linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 3. Coluna 6: Linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 4. Coluna 7: Linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 5. **B) Cinética da expressão da proteína recombinante ETD-like na linhagem BL21 Star™(DE3).** Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441- NH:136826 não induzido no tempo 0. Coluna 3: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 1. Coluna 4: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 2. Coluna 5: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 3. Coluna 6: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 4. Coluna 7: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 5.

Após avaliação da expressão da proteína recombinante e sua cinética de indução, avaliamos a sua solubilidade. As células foram lisadas por sonicação, sendo o precipitado e o sobrenadante visualizados em SDS-PAGE 12%. Nas duas linhagens, a proteína foi principalmente encontrada na fração insolúvel (precipitado) dos extratos das bactérias induzidas por IPTG (Figura 31). Diante disso, a purificação da ETD-like foi realizada sob condições desnaturantes.

Considerando que a expressão obtida da ETD-like aparentemente foi maior na linhagem C43(DE3)pLysS, quando comparada a BL21 Star™(DE3), visualizado na Figura 30, a mesma foi selecionada para a expressão em larga escala.

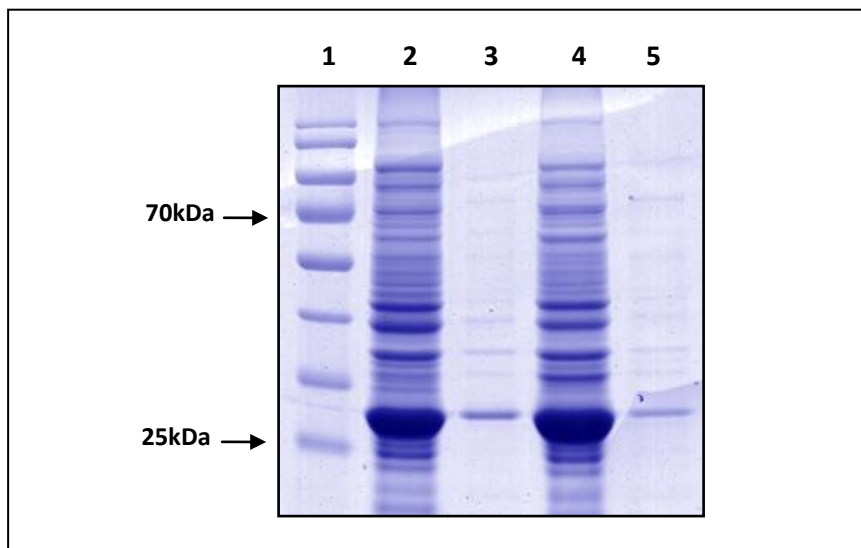


Figura 31: Avaliação da solubilidade da proteína recombinante ETD-like após expressão nas linhagens C43(DE3)pLysS e BL21 Star™(DE3). Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: precipitado da linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 5; Coluna 3: sobrenadante da linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 5; Coluna 4: precipitado da linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 5; Coluna 5: sobrenadante da linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD441- NH:136826 induzido no tempo 5.

Além disso, com o objetivo de avaliar *in vivo* a injeção subcutânea de outra proteína, além da ETD-like, e possíveis reações causadas no epitélio do neonato, uma proteína sem relação casual foi selecionada e purificada simultaneamente. Concomitantemente as induções da ETD-like, foram realizadas expressões da PknG, para posterior purificação. Essa proteína foi testada previamente pelo grupo de pesquisa, e apresenta aproximadamente 80kDa, também foi purificada em presença de uréia (8M).

Para confirmar a eficiência da indução em larga escala da ETD-like e da PknG utilizada posteriormente na purificação, alíquotas foram coletadas no tempo 0 e tempo 5, para avaliação por SDS-PAGE 12% e 10% (Figura 32). A indução foi satisfatória e permitiu a progressão para etapas de tratamento pré-purificação.

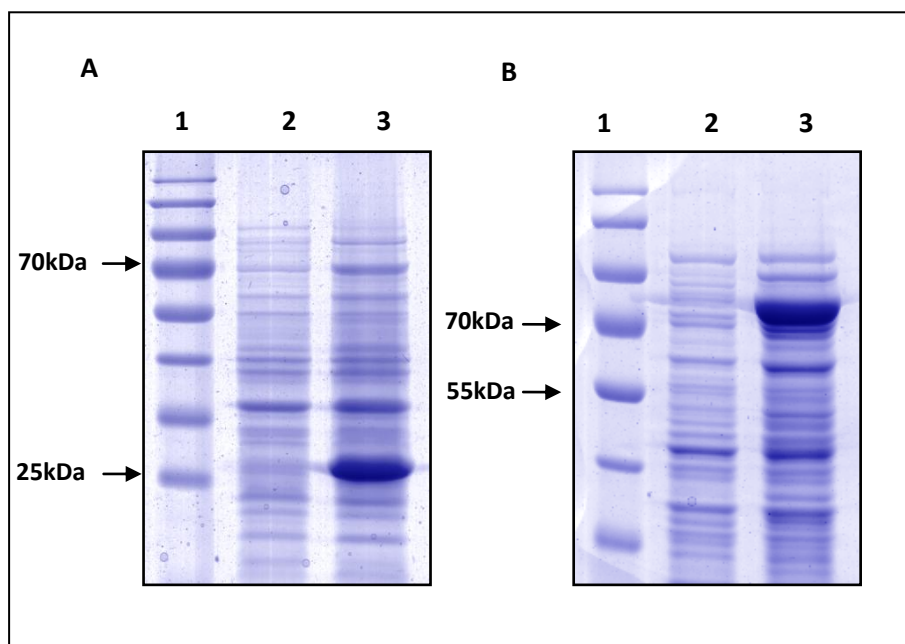


Figura 32: Indução em larga escala da proteína ETDlike na linhagem C43(DE3)pLysS e da proteína PknG na BL21 Star™(DE3). Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e 10%. **A) Indução em larga escala da proteína ETDlike na linhagem C43(DE3)pLysS.** Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441-NH:136826 não induzido no tempo 0; Coluna 3: Linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441-NH:136826 induzido no tempo 5. **B) Indução em larga escala da proteína proteína PknG na BL21 Star™(DE3).** Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Coluna 2: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD444-NH:131663 não induzido no tempo 0; Coluna 3: Linhagem BL21 Star™(DE3) com o plasmídeo pD444-NH:131663 induzido no tempo 5.

5.2.2.2 Purificação da proteína ETD-like no sistema AKTAprime

Uma vez confirmada às induções em larga escala, as amostras foram tratadas com as soluções de lise e com o tampão de corrida, contendo uréia (8M), como determinado pelo teste de solubilidade. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, sendo que, a eluição foi realizada com tampão fosfato em presença de 500mM de imidazol. A proteína ETD-like foi sintetizada com cauda de histidina, que possui afinidade pelo níquel presente na resina, e o imidazol que constitui o tampão, é capaz de competir com as proteínas ligadas ao níquel, de maneira que elas sejam deslocadas e recuperadas. No cromatograma exibida na Figura 34, é possível observar a etapa de eluição da amostra, com seu pico correspondente, assim como as frações do eluato que foram coletadas e avaliadas por SDS-PAGE 12% (Figura 34). Como a concentração da proteína obtida foi aparentemente inferior a esperada, e algumas bandas inespecíficas foram visualizadas, uma segunda indução em larga escala foi preparada e as amostras com solução de lise, e os

dois tratamentos com tampão contendo uréia 8M foram avaliados por gel de poliacrilamida, antes da etapa de purificação (Figura 35).

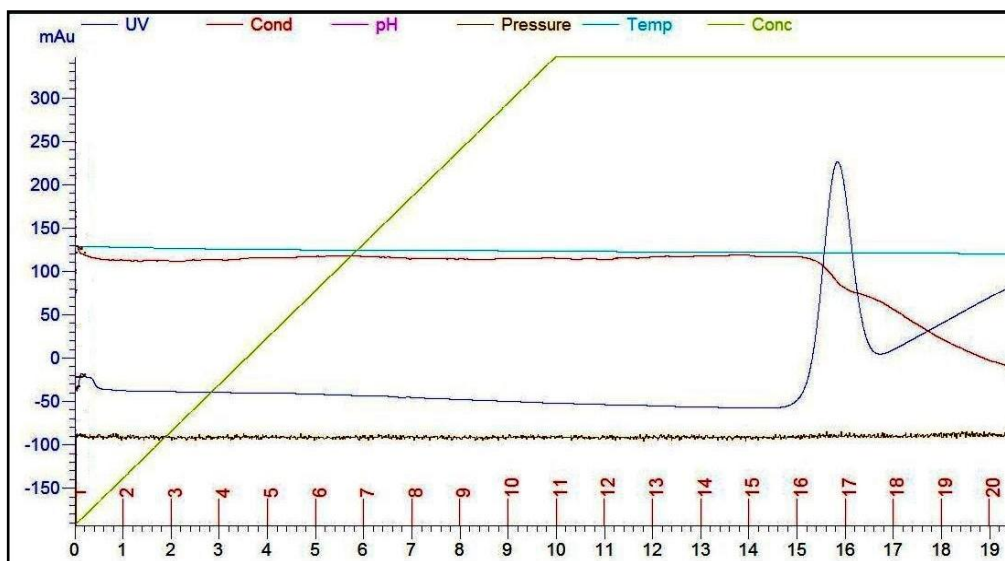


Figura 33: Cromatografia de afinidade da proteína ETD-like (uréia 8M). Purificação da proteína ETD-like utilizando a fração insolúvel com soluções contendo uréia 8M. O eluato foi recolhido nas frações correspondentes ao pico.

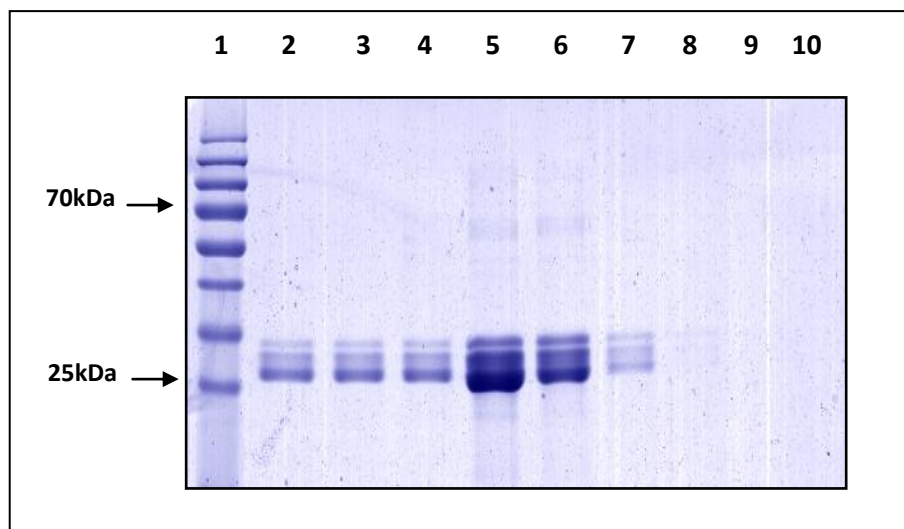


Figura 34: Frações da purificação ETD-like. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); Coluna 2 a 10: frações obtidas da purificação sob condições desnaturante (uréia 8M).

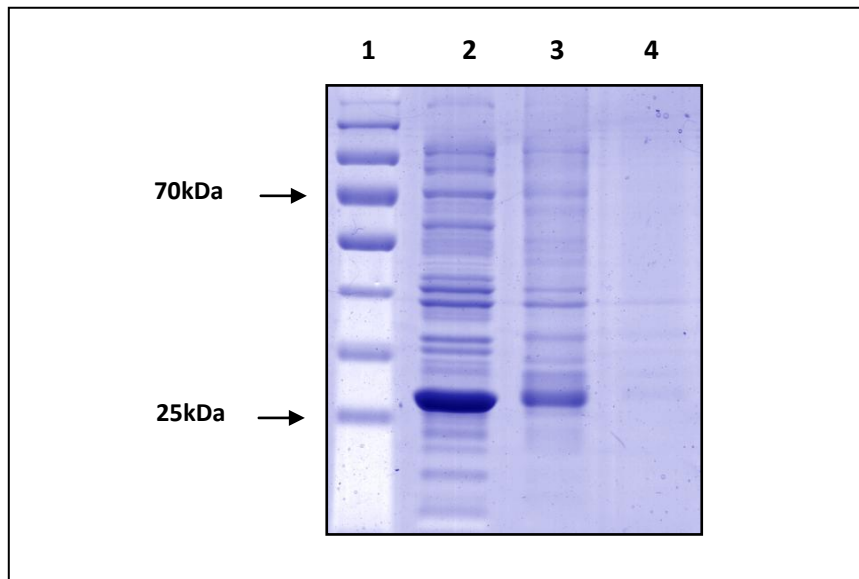


Figura 35: Verificação das amostras tratadas antes da etapa de purificação. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); Coluna 2: Indução em larga escala da linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 tratada com solução de lise, sem uréia; Coluna 3: Indução em larga escala da linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 tratada com solução de corrida, uréia 8M (1º tratamento); Coluna 4: : Indução em larga escala da linhagem C43(DE3)pLysS com o plasmídeo pD441- NH:136826 tratada com solução de corrida, uréia 8M (2º tratamento).

A proteína foi recuperada no sobrenadante, quando tratada com solução de lise sem uréia. Assim, a purificação anteriormente realizada em presença do agente desnaturante foi realizada novamente sem uréia (Figura 36). A purificação da PknG pode ser visualizada na Figura 37. As frações obtidas da purificação da ETD-like e PknG foram avaliadas por SDS-PAGE 12% (Figura 38).

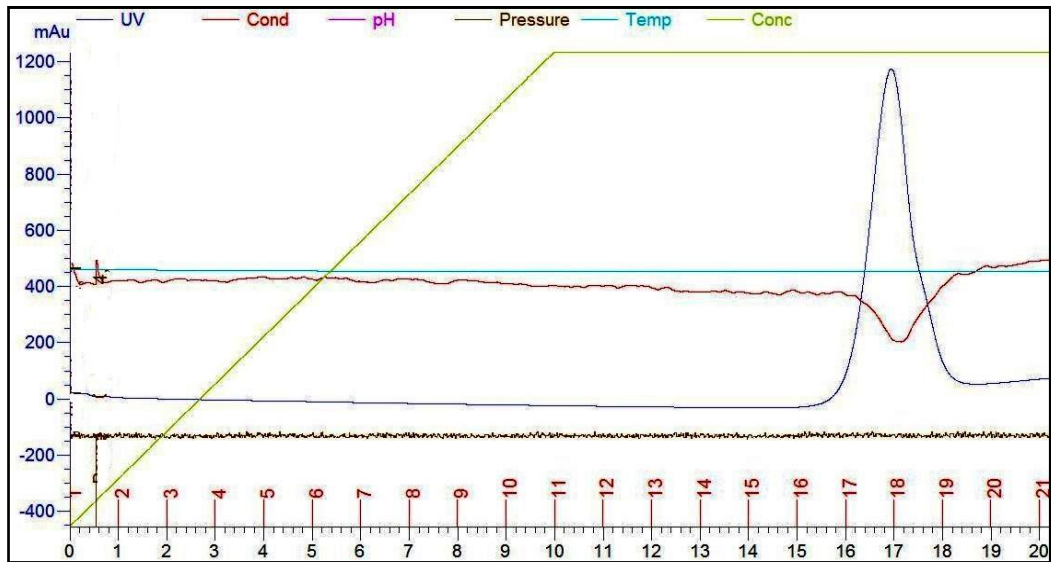


Figura 36: Cromatografia de afinidade da proteína ETD-like (sem uréia). Purificação da proteína ETD-like utilizando a fração solúvel com solução de corrida e eluição sem uréia. O eluato foi recolhido nas frações correspondentes ao pico.

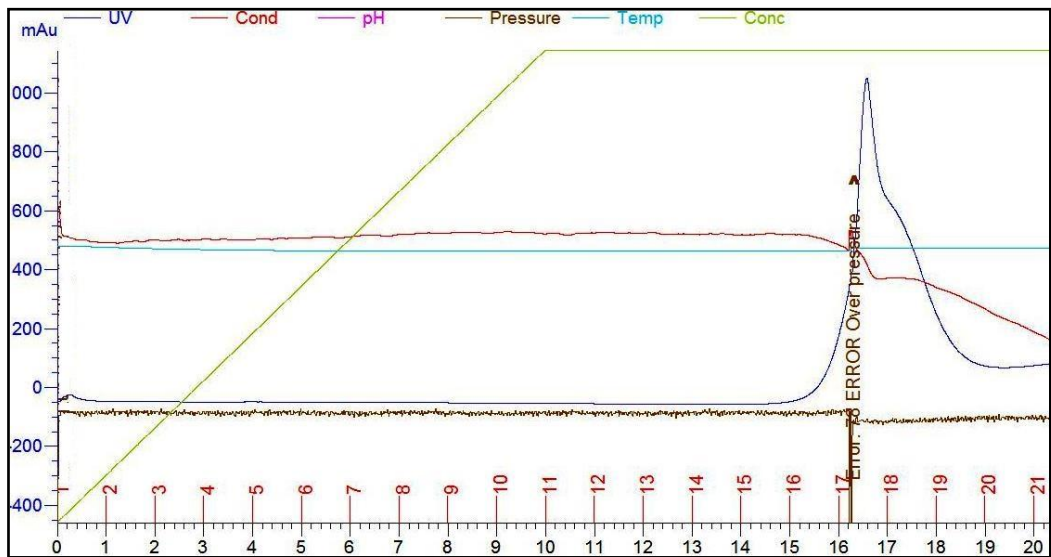


Figura 37: Cromatografia de afinidade da proteína PknG. Purificação da proteína PknG utilizando a fração insolúvel com solução de corrida e eluição com uréia 8M. O eluato foi recolhido nas frações correspondentes ao pico.

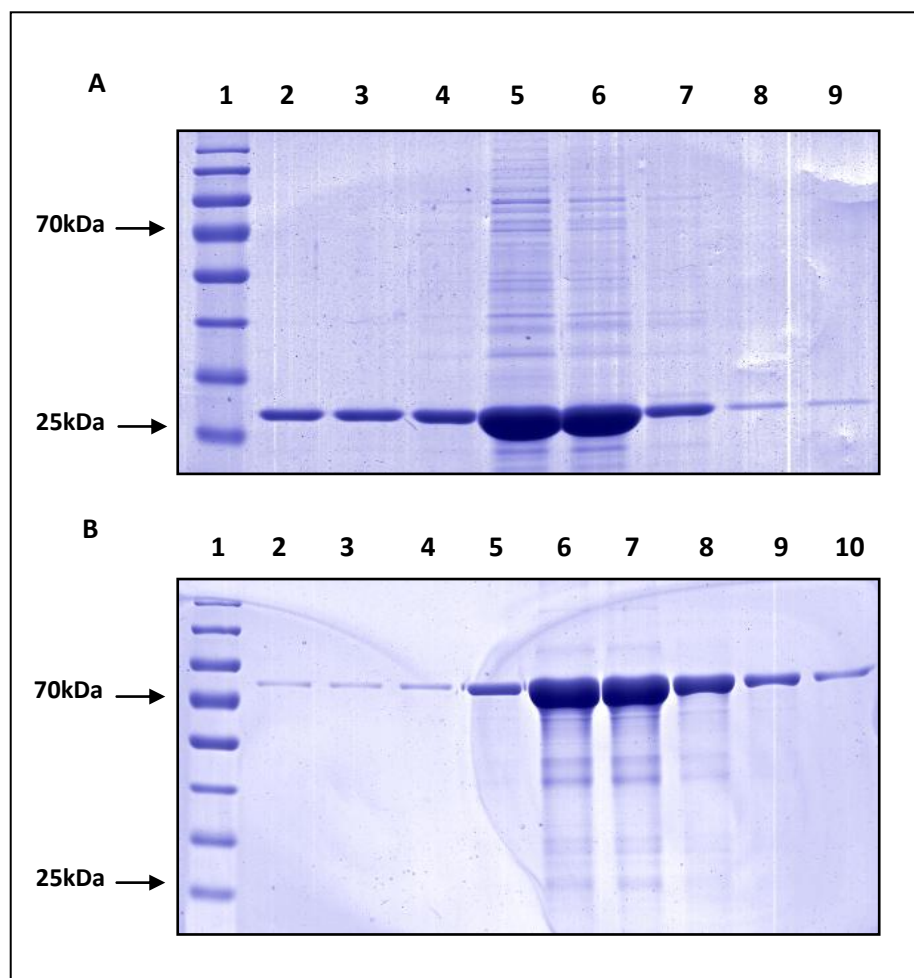


Figura 38: Frações da purificação das proteínas ETD-like e PknG. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e 10%. **A) Purificação da proteína ETD-like.** Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); Coluna 2 a 9: frações obtidas da purificação. **B) Purificação da proteína PknG.** Coluna 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); Coluna 2 a 10: frações obtidas da purificação.

O método cromatográfico de afinidade utilizado para purificar a ETD-like exibiu bons resultados. Infelizmente, após a etapa de diálise em PBS1X, para remoção do agente caotrópico, houve uma perda considerável da proteína recombinante devido à precipitação protéica. O sobrenadante das amostras foram quantificados, pelo método de Bradford, permitindo o cálculo de uma concentração final de aproximadamente 630µg/mL da ETD-like e 200µg/mL da PknG, onde a precipitação foi ainda mais intensa.

5.2.2.3 Confirmação da expressão da ETD-like

Após a etapa de purificação e diálise, uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% foi realizada, seguida por um *Western blotting* com anticorpo

monoclonal anti-histidina, com o objetivo de confirmar a proteína corresponde como a ETD-like recombinante. Conforme a Figura 39, o anticorpo reconheceu as histidinas na proteína em análise.

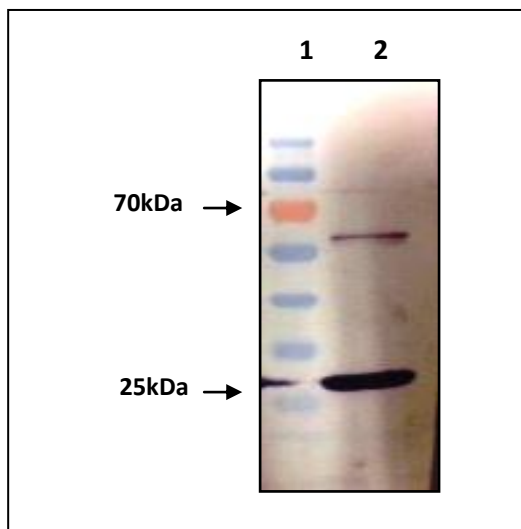


Figura 39: *Western blotting* da ETD-like purificada

5.3 Avaliação da atividade esfoliativa da ETD-like recombinante *in vivo*

Em camundongos Balb/c neonatos (24 horas), a injeção subcutânea de 20 μ g da proteína recombinante purificada apresentou uma leve formação de bolha após um período de 3h (Figura 40), além da bolha inicial obtida pela própria injeção subcutânea. Essa comparação foi realizada com o PBS e PknG injetados simultaneamente. Quando avaliado 40 μ g da ETD-like não foi observada qualquer reação no epitélio do animal em comparação ao PBS e PknG, o que demonstra uma certa ausência de linearidade na avaliação *in vivo*.



Figura 40: Avaliação *in vivo* da injeção subcutânea da ETD-like purificada em camundongos Balb/C neonatos. A) 100 μ L de PBS1X após 3 h. B) 20 μ g da PknG após 3 h. C) 20 μ g da ETD-like após 3h. A seta indica a bolha superficial formada.

Na tentativa de excluir as possíveis interferências que a precipitação, e consequentemente baixa concentração, e assumindo a possibilidade de uma proteína inativa, foi testada uma alíquota purificada com uma metodologia (anexo I) diferente da aplicada pelo nosso grupo. Essa ETD-like foi cordialmente cedida pelo Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni do Laboratório de Biologia Molecular (UNESP/ Campus São José do Rio Preto), que em parceria com o LGCM, trabalha na cristalografia da mesma, obtida pelo mesmo vetor pD441-NH:136826 expresso na mesma linhagem C43(DE3)pLysS. Quando injetado subcutaneamente 80µg da possível toxina esfoliativa D purificada, foi possível observar a formação de bolhas superficiais epidérmicas (Figura 41). Concentrações inferiores não exibiram qualquer sinal epidérmico. Os resultados preliminares *in vivo* ainda parecem inconclusivos quanto à atividade esfoliativa da proteína ETD-like.

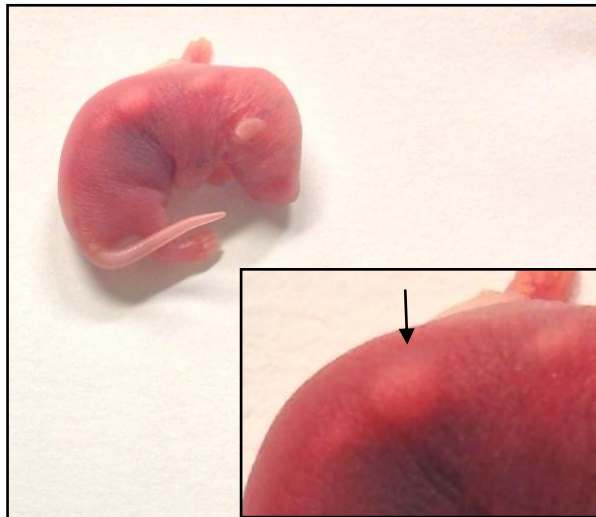


Figura 41: Neonato (24 horas) após 4 horas da injeção subcutânea de 80 µg da ETD-like purificada. A seta indica a bolha superficial formada.

6. DISCUSSÃO

Para um monitoramento de sucesso da mastite nos rebanhos, faz-se necessário a identificação e estudo de marcadores moleculares que permitam a detecção dos diferentes quadros clínicos da doença. Considerando a existência de linhagens de *S. aureus* mais virulentas e que a gravidade da manifestação clínica pode estar associada à produção de um único fator patogênico nessa linhagem, uma melhor caracterização desse microrganismo ainda é necessária (Le Maréchal *et al.*, 2011a). Em colaboração com o INRA/França, temos caracterizado genes e seus produtos que estão envolvidos nas diferentes manifestações da mastite, como a *ORF* SAO46_2740, que codifica uma possível ETD-like, encontrada na linhagem O46 isolada de animais com mastite subclínica. Essa proteína foi identificada através do SERPA, uma técnica promissora na identificação de proteínas imunorreativas produzidas por *S. aureus* em decorrência de infecções clínicas e subclínicas (Le Maréchal *et al.*, 2011c). A análise do genoma da *S. aureus* O46 revelou a presença de uma *ORF* que codifica uma proteína homóloga a toxina esfoliativa D, que está presente no contig16 da base 44.379 até a base 45.221, ainda não caracterizado.

A sequência de aminoácidos correspondente a ETD-like foi analisada neste estudo, sendo confirmada a presença do peptídeo sinal característico de proteínas secretadas, além de não possuir motivos transmembrânicos. Assim como as glutamil endopeptidases estafilocócicas e as proteases V8 de *S. aureus*, a ETD-like foi classificada como uma serino peptidase, pertencente a família S1 e subfamília S1B, segundo o banco de dados MEROPS. As sequências de aminoácidos da ETA, ETB e ETD são homólogas a outras serino peptidases tripsina-like, além da presença da tríade catalítica (resíduos de serina, histidina e aspartato) (Nishifuji *et al.*, 2008). As glutamil endopeptidases, também classificadas nessa família, apresentam homologia em suas sequências de aminoácidos (Park *et al.*, 2011) e segundo Nishifuji *et al.* (2008), as sequências de aminoácidos da ETA e ETB demonstram também ser homólogas a protease V8 de *S. aureus*, que preferencialmente cliva ligações peptídicas C-terminal de resíduos de Asp e Glu.

Quando a ETD-like foi submetida ao ClustalW, a tríade do sítio catalítico, característico da superfamília de serino proteases, também foi identificada (Park *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 1994).

Como a modelagem por homologia é uma ferramenta adequada para a predição teórica da estrutura de proteínas, construímos o modelo tridimensional da ETD-like. A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína fornece informações que podem ser utilizadas na determinação de relações estruturais e evolutivas. No gráfico de Ramachandran, gerado pelo PROCHEK, são correlacionados os ângulos torcionais da cadeia principal, Phi ϕ e Psi ψ , para cada resíduo. No modelo da ETD-like construído por

homologia, as α -hélices N-terminal e C-terminal podem ser claramente observadas nas Figuras 16 e 18, assim como a da tríade catalítica na interface dos dois barris, comum a essas toxinas (Ladhani, 2003). Semelhanças estruturais surgem devido aspectos físicos e químicos de proteínas, determinando suas estruturas secundárias e topologia (Teichmann *et al.*, 2001).

Posteriormente à caracterização *in silico* da ORF O46_2740, a clonagem molecular foi realizada utilizando o sistema de expressão XIES (Miyoshi *et al.*, 2004), para expressão em *L. lactis* e endereçamento de proteínas heterólogas para o meio extracelular. Através deste endereçamento, um rendimento até cinco vezes mais elevado foi observado em estudos anteriores no sistema secretado, quando comparado a produção heteróloga citoplasmática (Le Loir *et al.*, 2005). Além disso, a expressão em *L. lactis* corresponde uma alternativa menos dispendiosa e mais segura para o uso humano e animal, uma vez que não produz lipopolissacarídeos (LPS) como ocorre em *E. coli* (Le Loir *et al.*, 2005). Essas vantagens contribuíram para a seleção desse sistema de expressão no presente trabalho, mas não foi possível confirmar a expressão da proteína ETD-like. Segundo Terpe *et al.* (2006), a escolha da célula hospedeira e do sistema promotor para uma eficiente expressão da proteína heteróloga é complexo, e depende, muitas vezes da proteína alvo.

A era genômica oferece novas informações sobre possíveis bactérias hospedeiras, sendo que, a presença de endotoxinas e códons raramente utilizados constituem bons motivos para a mudança de hospedeiro (Terpe, 2006). De modo geral, todas as bactérias podem ser utilizadas para produção heteróloga de proteínas, mas informações sobre sua regulação, assim como ausência de vetores comerciais e sistemas promotores são as razões que limitam sua utilização (Terpe, 2006). Atualmente, os trabalhos de pesquisa estão concentrados em fatores de *L. lactis*, que podem afetar a produção e a secreção de proteínas heterólogas (Le Loir *et al.*, 2005). Mesmo com a utilização do vetor com sinal de exportação para o meio extracelular, as extrações de proteínas dos clones de *L. lactis* foram realizadas tanto do precipitado como do sobrenadante. Isso foi realizado para excluir a possibilidade de detecção da proteína no precipitado, uma vez que a mesma pode permanecer retida no interior da célula. Como uma alternativa a ausência de expressão em *L. lactis*, outras células hospedeiras também foram avaliadas (estratégia II).

Na segunda estratégia adotada para a expressão heteróloga da ETD-like, *E. coli* foi o organismo selecionado, sendo amplamente utilizado como sistema de expressão de proteínas recombinantes. Uma importante vantagem de sua utilização deve-se a quantidade de informações disponíveis sobre sua biologia celular, além da capacidade de produzir grande quantidade de proteína com baixo custo (Panda, 2003). Como um códon raro pode restringir ou especificar uma expressão apropriada (Saier, 1995), a ORF O46_2740 foi otimizada com códons preferenciais para expressão nesse sistema.

No vetor selecionado (pD441-NH), a proteína recombinante obtida estava fusionada a 6 resíduos de histidina na sua porção N-terminal, facilitando etapas posteriores de purificação por afinidade. Além disso, para a produção em *E. coli* de proteínas recombinantes em larga escala, na maioria das vezes utiliza-se um promotor forte, sendo o IPTG, um análogo não metabolizável da lactose, seu indutor mais comum (Panda, 2003; Sorensen e Mortensen, 2005b; Terpe, 2006), como selecionado para o vetor em questão. O promotor T5 foi descrito como eficaz para a expressão em *E. coli* de genes exógenos em altos níveis (Guo e Jia, 2014). Além disso, a transcrição basal na ausência do indutor é minimizada pela presença de um repressor apropriado (Sorensen e Mortensen, 2005b). O vetor pD441-NH possui como marcador de resistência o antibiótico canamicina, sendo que os marcadores mais comuns em plasmídeos de expressão recombinante conferem resistência também a ampicilina, cloranfenicol ou tetraciclina (Sorensen e Mortensen, 2005b).

Atualmente, as linhagens de expressão são desenvolvidas para superar a sobrecarga metabólica relacionada à expressão proteica elevada (Sorensen e Mortensen, 2005). A expressão da proteína recombinante foi avaliada em cinco linhagens de *E. coli* OverExpress™ C41(DE3) pLysS, OverExpress™ C41 (DE3), OverExpress™ C43(DE3), OverExpress™ C43(DE3)pLysS e BL21 Star™(DE3). As linhagens C41 (DE3) e C43(DE3) são mutantes que foram descritas como capazes de super expressar algumas proteínas globulares e de membrana, que não poderiam se produzidas em altos níveis pela linhagem parental BL21 (DE3) (Miroux e Walker, 1996; Sorensen e Mortensen, 2005a). Essas duas linhagens, derivadas da BL21 (DE), têm contribuído significativamente para expressão solúvel de difíceis proteínas recombinantes (Sorensen e Mortensen, 2005b). Além disso, algumas linhagens possuem o plasmídeo pLysS, que codifica uma lisozima que permite um controle mais rigoroso da expressão em nível basal (Miroux e Walker, 1996). A linhagem BL21 Star™(DE3) é portadora do gene *rne* mutado, que codifica uma enzima RNase E truncada, não possuindo a capacidade de degradar o RNAm, o que conseqüentemente eleva sua estabilidade (Cao *et al.*, 2013). Durante a avaliação da expressão das proteínas recombinantes, somente as linhagens C43(DE3)pLysS e BL21 Star™(DE3) apresentaram uma banda com aproximadamente 30kDa, correspondente a ETD-like. Os agregados, denominados corpos de inclusão, são um obstáculo principal para a produção de proteínas recombinantes de maneira solúvel e funcional. Segundo Panda (2003), muitos parâmetros influenciam o rendimento global de uma produção recombinante em larga escala em *E. coli*, como por exemplo, estabilidade do plasmídeo, concentração do indutor, tempo de indução, cinética e os processos posteriores que envolvem a recuperação da proteína. Essa agregação deve-se, por exemplo, a disponibilidade limitada de chaperonas, quando a expressão de proteína heteróloga é elevada (Carrió e Villaverde, 2002). De modo geral, os

procedimentos realizados após a formação de corpos de inclusão envolvem o re-novelamento da proteína ou modificações nos procedimentos referentes a expressão, de forma a obtenção de uma proteína solúvel (Sorensen e Mortensen, 2005a). Dentre os métodos utilizados para a solubilização dos corpos de inclusão, os mais requeridos incluem a utilização de agentes desnaturantes, como cloreto de guanidina e uréia (Clark, 2001). Nesse trabalho, o tratamento das amostras e a purificação através da cromatografia foram realizados com uréia 8M.

Concomitantemente as induções da ETD-like, foram realizadas expressões da PknG, para posterior purificação. Essa proteína foi selecionada aleatoriamente para a utilização como controle nos ensaios *in vivo*. A linhagem que apresentou melhor expressão foi a BL21 Star™(DE3) e o seu teste de solubilidade já havia sido previamente avaliado pelo nosso grupo de pesquisa. A PknG, é uma cinase presente no citoplasma de, por exemplo, *Corinebacterium glutamicum* e *Mycobacterium tuberculosis* e parece estar envolvida na modulação do metabolismo de glutamato (Koul *et al.*, 2001; Okai *et al.*, 2014).

As proteínas recombinantes produzidas demonstraram a formação de alguns precipitados após purificação e dialise, o que pode ter interferido na atividade nativa. Alterações envolvendo condições de crescimento e indução, são aspectos que podem ser testados futuramente para a otimização da produção da ETD-like de forma solúvel. Uma outra alternativa para a obtenção da proteína solúvel seria a sua co-expressão com chaperonas, de forma a facilitar o enovelamento e elevar a produção de proteínas ativas (Nishihara *et al.*, 2000), assim como avaliar uma diálise com gradiente de uréia, de forma a retirar o agente desnaturante lentamente.

Mesmo que em baixa concentração, o sobrenadante foi dosado e utilizado nos ensaios *in vivo*. Segundo Amagai *et al.* (2002), a formação de bolhas começa após 2-3h da aplicação, sendo que, nossos resultados foram inconclusivos quanto a atividade esfoliativa da proteína. Estudos anteriores para avaliar a atividade epidermiolítica de ETs em camundongos neonatos demonstraram uma reação epidérmica intensa de esfoliação com uma concentração de 20µg da proteína recombinante (Amagai *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2002). Quando essa reação local foi comparada com animais testados com a recombinante ETD-like desse trabalho, a reação bolhosa foi discreta e não houve esfoliação. Dsg1 é o alvo da ETA e ETB em casos clínicos de SSSS e impetigo bolhoso, resultando na formação de bolhas logo abaixo do estrato córneo, a principal barreira da pele, e permitindo a disseminação de bactérias que contornam essa barreira (Amagai *et al.*, 2002).

Por outro lado, em um estudo realizado com as toxinas produzidas por *Staphylococcus hyicus* (ShETs), semelhantes às toxinas esfoliativas de *S. aureus*, foi descrito o envolvimento destas na epidermite exsudativa em suínos (Ladhani, 2003). Os mecanismos moleculares das ShETs envolvidos na epidermite exsudativa suína e das ETs

nas doenças humanas como impetigo bolhoso e SSSS parecem ser semelhantes, com clivagem específica da Dsg1 por exotoxinas estafilocócicas (Nishifuji *et al.*, 2008).

Por outro lado, a ausência de linearidade na resposta epidérmica da ETD-like recombinante *in vivo* pode estar relacionada ao modelo animal utilizado, de difícil manipulação.

Quanto a formação de bolhas, estudos anteriores de atividade das toxinas reportaram que a ETD também induziu clivagem intraepidérmica, indistinguível da observada em ETA e ETB (Yamaguchi *et al.*, 2002). Embora a Dsg1 também possa ser expressa na epiderme profunda e membrana de mucosas, as bolhas não ocorrem nessas regiões devido a presença da Dsg3, que é coexpressa e pode compensar a perda de função da Dsg1 (Amagai *et al.*, 2002). Além disso, quando avaliada no contexto da mastite de origem estafilocócica, a presença de uma proteína com propriedades esfoliativas que facilita a invasão percutânea de bactérias no hospedeiro na camada mais superficial da epiderme, pode estar envolvida nos mecanismos que elevam a contagem de células somáticas observadas na infecção. Estudos futuros ainda serão necessários para determinar os mecanismos exatos de ação da ETD-like de *S. aureus* linhagem O46 na mastite ovina.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Estudos *in silico* permitiram revelar que a possível proteína ETD-like, apresentou alta identidade com a proteína ETD, revelando a presença da tríade catalítica e conformação similar a outras toxinas esfoliativas;
- As linhagens recombinantes de *L. lactis* NCDO2118 (pXy/T:SEC:ETD-like) não foram capazes de produzir a possível ETD-like;
- A possível ETD-like foi expressa nas linhagens C43(DE3)pLysS e BL21 Star™(DE3) e purificada por cromatografia de afinidade;
- A possível ETD-like induziu a formação de bolhas superficiais nos testes preliminares realizados *in vivo*;

8. PERSPECTIVAS

- Otimização da etapa de purificação da proteína recombinante, de modo a obtê-la na forma solúvel e funcional;
- Nova avaliação *in vivo*;
- Histologia e imunofluorescência na pele do animal com a formação de bolhas e deslocamento epidérmico;
- Avaliação da clivagem da Dsg1 pela ETD-like *in vitro*.

9. REFERÊNCIAS

- Aires-de-Sousa, M., Parente, C.E.S.R., Vieira-da-Motta, O., Bonna, I.C.F., Silva, D.A., and de Lencastre, H. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3845–3849.
- Akers, R.M., and Nickerson, S.C. (2011). Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 275–289.
- Amagai, M., Yamaguchi, T., Hanakawa, Y., Nishifuji, K., Sugai, M., and Stanley, J.R. (2002). Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *J. Invest. Dermatol.* 118, 845–850.
- Argudín, M.Á., Mendoza, M.C., and Rodicio, M.R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* 2, 1751–1773.
- Asensi, G.F., de Sales, N.F.F., Dutra, F.F., Feijó, D.F., Bozza, M.T., Ulrich, R.G., Miyoshi, A., de Moraes, K., Azevedo, V.A. de C., Silva, J.T., et al. (2013). Oral immunization with *Lactococcus lactis* secreting attenuated recombinant staphylococcal enterotoxin B induces a protective immune response in a murine model. *Microb. Cell Factories* 12, 32.
- Azevedo, V. e Miyoshi, A. (2004) Novas utilizações biotecnológicas e terapêuticas das bactérias do ácido láctico, cap 40 (p. 801-818) *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu (1114p).
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Galligan, D.T., Beiboer, M.L., and Brand, A. (1997). Estimation of Interdependence Among Quarters of the Bovine Udder with Subclinical Mastitis and Implications for Analysis. *J. Dairy Sci.* 80, 1592–1599.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., and Zadoks, R.N. (2006). Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89, 1877–1895.
- Baumstummeler, A., Lehmann, D., Janjic, N., and Ochsner, U.A. (2014). Specific capture and detection of *Staphylococcus aureus* with high-affinity modified aptamers to cell surface components. *Lett. Appl. Microbiol.*
- Bergonier, D., de Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., and Berthelot, X. (2003). Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34, 689–716.
- Bibalan, M.H., Shakeri, F., Javid, N., Ghaemi, A., and Ghaemi, E.A. (2014). Accessory Gene Regulator Types of *Staphylococcus aureus* Isolated in Gorgan, North of Iran. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* 8, DC07–09.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., and Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11, 731–753.
- Bradley, A. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 164, 116–128.

- Brito, M.P. et al. (2007). EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Agronegócio do Leite). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 20 abr. 2014.
- Cao, Y., Xian, M., Zou, H., and Zhang, H. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of xylonate. *PLoS One* 8, e67305.
- Carr, F.J., Chill, D., and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 281–370.
- Carrió, M.M., and Villaverde, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* 96, 3–12.
- Cepeda, J.A., Whitehouse, T., Cooper, B., Hails, J., Jones, K., Kwaku, F., Taylor, L., Hayman, S., Cookson, B., Shaw, S., et al. (2005). Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. *Lancet* 365, 295–304.
- Chidgey, M., and Dawson, C. (2007). Desmosomes: a role in cancer? *Br. J. Cancer* 96, 1783–1787.
- Clark, E.D. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 202–207.
- Craven, N., and Williams, M.R. (1985). Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 10, 71–127.
- Crémieux, A.-C., Dumitrescu, O., Lina, G., Vallee, C., Côté, J.-F., Muffat-Joly, M., Lilin, T., Etienne, J., Vandenesch, F., and Saleh-Mghir, A. (2009). Panton-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PLoS One* 4, e7204.
- Crossley, K.B., Archer GL editors (1997). *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill-Livingstone.
- Dego, O.K., van Dijk, J.E., and Nederbragt, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 24, 181–198.
- Demain, A.L., and Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27, 297–306.
- Dusek, R.L., Godsel, L.M., and Green, K.J. (2007). Discriminating roles of desmosomal cadherins: Beyond desmosomal adhesion. *J. Dermatol. Sci.* 45, 7–21.
- Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R., and Bohach, G.A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67, 4673–4678.
- Endo, Y., Yamada, T., Matsunaga, K., Hayakawa, Y., Kaidoh, T., and Takeuchi, S. (2003). Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* 96, 81–90.

- Euzéby, J.P.(1997). List of Bacterial Names with Standing in nomenclature. Int. J. Syst. Bacteriol., Last full update June, 18 2014. Disponível em: www.bacterio.net. Acesso em: 21 jun. 2014
- Fattom, A.I., Horwith, G., Fuller, S., Propst, M., and Naso, R. (2004). Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. *Vaccine* 22, 880–887.
- Feil, E.J., Cooper, J.E., Grundmann, H., Robinson, D.A., Enright, M.C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B.G., et al. (2003). How Clonal Is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 185, 3307–3316.
- Fiser, A., and Sali, A. (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol.* 374, 461–491.
- Garrod, D., and Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 572–587.
- Gong, J., Li, D., Yan, J., Liu, Y., Li, D., Dong, J., Gao, Y., Sun, T., and Yang, G. (2014). The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine intracranial abscesses model. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.*
- Gonzalo, C., Ariznabarreta, A., Carriedo, J.A., and San Primitivo, F. (2002). Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 85, 1460–1467.
- Gordon, R.J., and Lowy, F.D. (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin. Infect. Dis.* 46, S350–S359.
- Guo, J., and Jia, R. (2014). A novel inducible expression system for the functional study of toxic gene in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1527–1531.
- Halasa, T., Nielsen, M., Huirne, R.B.M., and Hogeveen, H. (2009). Stochastic bio-economic model of bovine intramammary infection. *Livest. Sci.* 124, 295–305.
- Harris, L.G., Foster, S.J., and Richards, R.G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur. Cell. Mater.* 4, 39–60.
- Haveri, M., Taponen, S., Vuopio-Varkila, J., Salmenlinna, S., and Pyörälä, S. (2005). Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J. Clin. Microbiol.* 43, 959–961.
- Hayes, M.C., Ralyea, R.D., Murphy, S.C., Carey, N.R., Scarlett, J.M., and Boor, K.J. (2001). Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. *J. Dairy Sci.* 84, 292–298.
- Hecker, M., Becher, D., Fuchs, S., and Engelmann, S. (2010). A proteomic view of cell physiology and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 76–87.
- Innocentin, S., Guimarães, V., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Chatel, J.-M., and Lefèvre, F. (2009). *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4870–4878.

- Ishii, K. (2003). Greater diversity of desmosomal cadherins. *J. Invest. Dermatol.* 120, ix–x.
- Ishii, Y. (2006). Identification of biochemically atypical *Staphylococcus aureus* clinical isolates with three automated identification systems. *J. Med. Microbiol.* 55, 387–392.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.-A., and Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 91–105.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., et al. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 1236–1240.
- Jørgensen, H.J., Mørk, T., and Rørvik, L.M. (2005). The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 88, 3810–3817.
- Kalorey, D.R., Shanmugam, Y., Kurkure, N.V., Chousalkar, K.K., and Barbuddhe, S.B. (2007). PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. *J. Vet. Sci.* 8, 151–154.
- Kato, F., Kadomoto, N., Iwamoto, Y., Bunai, K., Komatsuzawa, H., and Sugai, M. (2011). Regulatory Mechanism for Exfoliative Toxin Production in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79, 1660–1670.
- Keefe, G. (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28, 203–216.
- Kimber, I., Nookala, S., Davis, C.C., Gerberick, G.F., Tucker, H., Foertsch, L.M., Dearman, R.J., Parsonnet, J., Goering, R.V., Modern, P., et al. (2013). Toxic shock syndrome: characterization of human immune responses to TSST-1 and evidence for sensitivity thresholds. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 134, 49–63.
- Kniewl, E., Becker, A., and Forster, D.H. (2005). Bed, bath and beyond: pitfalls in prompt eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in healthcare workers. *J. Hosp. Infect.* 59, 180–187.
- Koul, A., Choidas, A., Tyagi, A.K., Drlica, K., Singh, Y., and Ullrich, A. (2001). Serine/threonine protein kinases PknF and PknG of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization and localization. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 2307–2314.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., et al. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225–1240.
- Ladhani, S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 181–189.
- Ladhani, S., Joannou, C.L., Lochrie, D.P., Evans, R.W., and Poston, S.M. (1999). Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 224–242.

Langella, P., and Le Loir, Y. (1999). Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* *32*, 191–198.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* *26*, 283–291.

Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S.D., and Langella, P. (1996). Direct screening of recombinants in gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *J. Bacteriol.* *178*, 4333.

Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S.C., Freitas, D.A., Miyoshi, A., Bermúdez-Humarán, L.G., Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Leclercq, S., Gabriel, J.E., et al. (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb. Cell Factories* *4*, 2.

Lowy, F.D. (2011). How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. *N. Engl. J. Med.* *364*, 1987–1990.

Mallard, B.A., Dekkers, J.C., Ireland, M.J., Leslie, K.E., Sharif, S., Vankampen, C.L., Wagter, L., and Wilkie, B.N. (1998). Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.* *81*, 585–595.

Le Maréchal, C., Jan, G., Even, S., McCulloch, J.A., Azevedo, V., Thiéry, R., Vautor, E., and Le Loir, Y. (2009). Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes. *J. Microbiol. Methods* *79*, 131–136.

Le Maréchal, C. (2010). *S. aureus* et mammites : identification de facteurs staphylococciques impliqués dans la sévérité des mammites ovines. tese (doutorado). l'institut superieur des sciences agronomiques, agro-alimentaires, horticoles et du paysage, INRA-agrocampus ouest.

Le Maréchal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., Azevedo, V., François, P., Schrenzel, J., van de Guchte, M., et al. (2011a). Molecular Basis of Virulence in *Staphylococcus aureus* Mastitis. *PLoS ONE* *6*, e27354.

Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., and Le Loir, Y. (2011b). Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Sci. Technol.* *91*, 247–282.

Le Maréchal, C., Jardin, J., Jan, G., Even, S., Pulido, C., Guibert, J.-M., Hernandez, D., François, P., Schrenzel, J., Demon, D., et al. (2011c). *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. *Vet. Res.* *42*, 35.

Luerce, T. D. (2009) Construção de linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da quimosina bovina: desenvolvimento tecnológico do processo de obtenção da proteína recombinante e suas implicações biotecnológicas [dissertação de mestrado]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais.

Melish, M.E., and Glasgow, L.A. (1971). Staphylococcal scalded skin syndrome: the expanded clinical syndrome. *J. Pediatr.* *78*, 958–967.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Caprinos e ovinos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 15 jul. 2014.

Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289–298.

Miyoshi, A., Jamet, E., Commissaire, J., Renault, P., Langella, P., and Azevedo, V. (2004). A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 205–212.

Monday, S.R., Vath, G.M., Ferens, W.A., Deobald, C., Rago, J.V., Gahr, P.J., Monie, D.D., Landolo, J.J., Chapes, S.K., Davis, W.C., et al. (1999). Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 4550–4559.

Mork, T., Tollersrud, T., Kvite, B., Jørgensen, H.J., and Waage, S. (2005). Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. *Vet. Microbiol.* 106, 265–273.

National Mastitis Council. (2001). National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program. Disponível em: <http://www.nmconline.org/docs/NMC10steps.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2014.

National mastitis Council. (2006). Dry Cow Therapy. Disponível em: <http://nmconline.org/drycow.htm>. Acesso em: 10 jun. 2014.

National Mastitis Council. (2007). The prevalence of mastitis in small ruminants and the effect of mastitis on small ruminant production. Disponível em: <http://nmconline.org/articles/smallruminants.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2014.

Nishifuji, K., Sugai, M., and Amagai, M. (2008). Staphylococcal exfoliative toxins: “molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J. Dermatol. Sci.* 49, 21–31.

Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T. (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 884–889.

Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Langella, P., and Azevedo, V. (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res. GMR* 2, 102–111.

Okai, N., Takahashi, C., Hatada, K., Ogino, C., and Kondo, A. (2014). Disruption of *pknG* enhances production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase. *AMB Express* 4, 20.

Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., and Gálvez, A. (2010). Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins* 2, 2117–2131.

Oscherwitz, J., Muñoz-Planillo, R., Yu, F., Núñez, G., and Cease, K.B. (2014). In vivo mapping of a protective linear neutralizing epitope at the N-terminus of alpha hemolysin from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Immunol.* 60, 62–71.

- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J.J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., Bravo-Patiño, A., and Baizabal-Aguirre, V.M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* *54*, 399–409.
- Panda, A.K. (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *85*, 43–93.
- Papageorgiou, A.C., Plano, L.R., Collins, C.M., and Acharya, K.R. (2000). Structural similarities and differences in *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins A and B as revealed by their crystal structures. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *9*, 610–618.
- Park, J.W., Park, J.E., Park, J.K., and Lee, J.S. (2011). Purification and biochemical characterization of a novel glutamyl endopeptidase secreted by a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Med.* *27*, 637–645.
- Peixoto, R. M., Mota, R. A.; Costa, M. M. (2010). Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* *30*(9):754-762
- Piccinini, R., Tassi, R., Daprà, V., Pilla, R., Fenner, J., Carter, B., and Anjum, M.F. (2012). Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J. Dairy Res.* *79*, 249–255.
- Pishchany, G., McCoy, A.L., Torres, V.J., Krause, J.C., Crowe, J.E., Fabry, M.E., and Skaar, E.P. (2010). Specificity for Human Hemoglobin Enhances *Staphylococcus aureus* Infection. *Cell Host Microbe* *8*, 544–550.
- Popov, L., Kovalski, J., Grandi, G., Bagnoli, F., and Amieva, M.R. (2014). Three-Dimensional Human Skin Models to Understand *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Infection. *Front. Immunol.* *5*.
- Popowicz, G.M., Dubin, G., Stec-Niemczyk, J., Czarny, A., Dubin, A., Potempa, J., and Holak, T.A. (2006). Functional and structural characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* *358*, 270–279.
- Que, Y.-A. (2005). Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J. Exp. Med.* *201*, 1627–1635.
- Que, Y.-A., Francois, P., Haefliger, J.-A., Entenza, J.-M., Vaudaux, P., and Moreillon, P. (2001). Reassessing the Role of *Staphylococcus aureus* Clumping Factor and Fibronectin-Binding Protein by Expression in *Lactococcus lactis*. *Infect. Immun.* *69*, 6296–6302.
- Rago, J.V., Vath, G.M., Tripp, T.J., Bohach, G.A., Ohlendorf, D.H., and Schlievert, P.M. (2000). Staphylococcal exfoliative toxins cleave alpha- and beta-melanocyte-stimulating hormones. *Infect. Immun.* *68*, 2366–2368.
- Rainard, P., and Riollet, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* *37*, 369–400.
- Rainard, P., Corrales, J.-C., Barrio, M.B., Cochard, T., and Poutrel, B. (2003). Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF⁺-PV leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *10*, 272–277.
- Rivas, A.L., Schwager, S.J., González, R.N., Quimby, F.W., and Anderson, K.L. (2007). Multifactorial relationships between intramammary invasion by *Staphylococcus aureus* and bovine leukocyte markers. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Vét.* *71*, 135–144.

- Rysanek, D., Babak, V., Zouharova, M. (2007). Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. *Veterinarni Medicina*, 52,(6): 223–230.
- Sabouni, F., Mahmoudi, S., Bahador, A., Pourakbari, B., Sadeghi, R.H., Ashtiani, M.T.H., Nikmanesh, B., and Mamishi, S. (2014). Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolates in an Iranian Referral Children's Hospital. *Osong Public Health Res. Perspect.* 5, 96–100.
- Saier, M.H. (1995). Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett.* 362, 1–4.
- Sambrook, J.; Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning – A laboratory Manual*. ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulso, A.R. (1977) dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *proc natl acad sci usa.* v.74:5463-5467.
- Sato, H., Matsumori, Y., Tanabe, T., Saito, H., Shimizu, A., and Kawano, J. (1994). A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. *Infect. Immun.* 62, 3780–3785.
- Schleifer, K.H. and Bell, J.A. (2009): Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 3 *The Firmicutes*, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, p. 392.
- Seyffert, N., Le Maréchal, C., Jardin, J., McCulloch, J.A., Rosado, F.R., Miyoshi, A., Even, S., Jan, G., Berkova, N., Vautor, E., et al. (2012). *Staphylococcus aureus* proteins differentially recognized by the ovine immune response in mastitis or nasal carriage. *Vet. Microbiol.* 157, 439–447.
- Shoshani, E., Leitner, G., Hanochi, B., Saran, A., Shpigel, N.Y., and Berman, A. (2000). Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. *J. Dairy Res.* 67, 155–169.
- Da Silva, E.R., Siqueira, A.P., Martins, J.C.D., Ferreira, W.P.B., and da Silva, N. (2004). Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Rumin. Res.* 55, 45–49.
- Sordillo, L.M., and Streicher, K.L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 135–146.
- Sorensen, H.P., and Mortensen, K.K. (2005a). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* 4, 1.
- Sorensen, H.P., and Mortensen, K.K. (2005b). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 115, 113–128.
- Sorum, M., Sangvik, M., Stegger, M., Olsen, R.S., Johannessen, M., Skov, R., and Sollid, J.U.E. (2013). *Staphylococcus aureus* mutants lacking cell wall-bound protein A found in isolates from bacteraemia, MRSA infection and a healthy nasal carrier. *Pathog. Dis.* 67, 19–24.
- Souto, L.I.M., Minagawa, C.Y., Telles, E.O., Garbuglio, M.A., Amaku, M., Melville, P.A., Dias, R.A., Sakata, S.T., and Benites, N.R. (2010). Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. *J. Dairy Res.* 77, 63–70.

- Spanu, V., Spanu, C., Viridis, S., Cossu, F., Scarano, C., and De Santis, E.P.L. (2012). Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* *153*, 53–57.
- Sung, J.M.-L., Lloyd, D.H., and Lindsay, J.A. (2008). *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* *154*, 1949–1959.
- Sutter, D.E., Summers, A.M., Keys, C.E., Taylor, K.L., Frasc, C.E., Braun, L.E., Fattom, A.I., and Bash, M.C. (2011). Capsular serotype of *Staphylococcus aureus* in the era of community-acquired MRSA. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *63*, 16–24.
- Suzuki, A., Iizuka, A., Komiyama, M., Takikawa, M., Kume, A., Tai, S., Ohshita, C., Kurusu, A., Nakamura, Y., Yamamoto, A., et al. (2010). Identification of melanoma antigens using a Serological Proteome Approach (SERPA). *Cancer Genomics Proteomics* *7*, 17–23.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., and Akira, S. (2000). Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 5392–5396.
- Tedeschi, G., Taverna, F., Negri, A., Piccinini, R., Nonnis, S., Ronchi, S., and Zecconi, A. (2009). Serological proteome analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from sub-clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* *134*, 388–391.
- Teichmann, S.A., Murzin, A.G., and Chothia, C. (2001). Determination of protein function, evolution and interactions by structural genomics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *11*, 354–363.
- Tenhagen, B.-A., Köster, G., Wallmann, J., and Heuwieser, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* *89*, 2542–2551.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *72*, 211–222.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4673–4680.
- Tinelli, M., Monaco, M., Maffezzini, E., Cerri, M.C., Piazza, M., Minoli, L., Anesi, A., and Pantosti, A. (2014). *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 endocarditis with muscular metastatic abscesses. *New Microbiol.* *37*, 113–118.
- Trost, E.; Ott, L.; Schneider, J.; Schröder, J.; Jaenicke, S.; Goesmann, A.; Husemann, P.; Stoye, J.; Dorella, F.A.; Rocha, F.S.; Soares, S.C.; D'afonseca, V.; Miyoshi, A.; Ruiz, J.; Silva, A.; Azevedo, V.; Burkovski, A.; Guiso, N.; Join-lambert, O.F.; Kayal, S.; Tauch, A.(2010). The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, v.11, p.728.
- Utter, B., Deutsch, D.R., Schuch, R., Winer, B.Y., Verratti, K., Bishop-Lilly, K., Sozhamannan, S., and Fischetti, V.A. (2014). Beyond the Chromosome: The Prevalence of Unique Extra-Chromosomal Bacteriophages with Integrated Virulence Genes in Pathogenic *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* *9*, e100502.

- Vancraeynest, D., Hermans, K., and Haesebrouck, F. (2004). Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet. Microbiol.* 103, 241–247.
- Vath, G.M., Earhart, C.A., Rago, J.V., Kim, M.H., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., and Ohlendorf, D.H. (1997). The structure of the superantigen exfoliative toxin A suggests a novel regulation as a serine protease. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 1559–1566.
- Vath, G.M., Earhart, C.A., Monie, D.D., Iandolo, J.J., Schlievert, P.M., and Ohlendorf, D.H. (1999). The crystal structure of exfoliative toxin B: a superantigen with enzymatic activity. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 10239–10246.
- Vautor, E., Cockfield, J., Le Marechal, C., Le Loir, Y., Chevalier, M., Robinson, D.A., Thiery, R., and Lindsay, J. (2009). Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Vet. Res.* 56.
- Viguié, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., and O’Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27, 486–493.
- Vimercati, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Pisoni, G., Boettcher, P.J., Stella, A., Vicenzoni, G., and Moroni, P. (2006). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats and sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxins genes. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 423–428.
- Votintseva, A.A., Fung, R., Miller, R.R., Knox, K., Godwin, H., Wyllie, D.H., Bowden, R., Crook, D.W., and Walker, A.S. (2014). Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiol.* 14, 63.
- Wagter, L.C., Mallard, B.A., Wilkie, B.N., Leslie, K.E., Boettcher, P.J., and Dekkers, J.C. (2000). A quantitative approach to classifying Holstein cows based on antibody responsiveness and its relationship to peripartum mastitis occurrence. *J. Dairy Sci.* 83, 488–498.
- Wallemaçq, H., Girard, B., Lekeux, P., Bureau, F. (2010) La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. *Ann. Méd. Vét.*, 154, 16-29
- Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Amagai, M., and Sugai, M. (2002). Identification of the *Staphylococcus aureus* etd Pathogenicity Island Which Encodes a Novel Exfoliative Toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect. Immun.* 70, 5835–5845.
- Yamasaki, O., Yamaguchi, T., Sugai, M., Chapuis-Cellier, C., Arnaud, F., Vandenesch, F., Etienne, J., and Lina, G. (2005). Clinical Manifestations of Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome Depend on Serotypes of Exfoliative Toxins. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1890–1893.
- Yin, T., and Green, K.J. (2004). Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 665–677.
- Zecconi, A., and Scali, F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol. Lett.* 150, 12–22.
- Zhao, X., and Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.* 86, 57–65.

10. ANEXOS

Anexo I – Preparo de meios e soluções;

Anexo II – Protocolo de purificação da ETD-like (UNESP);

ANEXO I

Preparo de meios e soluções

Preparo de meios e soluções

Luria-Bertani (LB): 25g/L de meio LB (Difco) em água destilada. Para preparo de meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico (Difco). O meio foi esterilizado por autoclavação (121°C por 15 minutos).

M17 Sacarose Glicose (M17-Sac-Gli): 42g/L de M17 (Fluka Analytical® Sigma) em água destilada, sacarose 0,5 M e glicose 0,5%. O meio M17 e a solução de sacarose foram esterilizados separadamente por autoclavação. A glicose 50% foi esterilizada com o auxílio de um filtro de 0,22 µm (Corning). Em capela de fluxo laminar, o meio M17, a solução de sacarose e 5mL de glicose 50% foram homogeneizados.

M17 Glicose (M17-Gli): Meio M17 acrescido de Glicose 0,5% estéril.

BHI (Brain Heart Infusion): 37g/L de meio BHI (Himedia®) em água destilada. O meio foi esterilizado por autoclavação.

Xilose (p/v): Xilose 25% dissolvida em água. A solução foi então filtrada em fluxo laminar com filtro de 0,22 µm (Corning), aliqüotada e acondicionada a 4°C.

Cloranfenicol: Preparada uma solução a 10mg/mL de cloranfenicol dissolvidos em etanol absoluto PA e esterilizada, com o auxílio de um filtro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar.

Ampicilina: Preparada uma solução a 100mg/mL de ampicilina em água ultrapura e esterilizada, com auxílio de um filtro de 0,22µm, em capela de fluxo laminar.

Canamicina: Preparada uma solução a 50mg/mL de canamicina dissolvidos água ultrapura e esterilizada, com auxílio de um filtro de 0,22µm, em capela de fluxo laminar.

Brometo de Etídio: Preparada uma solução a 5mg/ml, sendo a concentração utilizada de 0,1-0,5µg/mL. Conservado ao abrigo da luz.

Etanol: Preparada uma solução a 70% em água destilada. Armazenado a 4°C.

Glicerol: Glicerol a 80% em água destilada. Esterilizado em autoclave.

Tampão de Amostra (5X): Glicerol a 50%, azul de bromofenol a 0,20% e TBE a 2,5X. Estocar a 4°C.

Tampão de Amostra SDS-PAGE: 0,0625M de Tris-HCl (pH 6.8), SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.0005%, β -mercaptoetanol 2,5%.

Tampão Tris-glicina: 25mM de Tris, 250mM glicina e 0,1% SDS.

TBE 0,5X: 45 mM tris, 45 mM ácido bórico, 1mM EDTA. Homogeneizado e verificado o pH (entre 8,0 e 8,5).

TCA (p/v): Preparada uma solução 100% de TCA dissolvidos em água pura, com o auxílio do vórtex. A solução foi estocada a 4°C.

DTT: Preparada em solução estoque de DTT (1M) e acetato de sódio (0,01M) para um volume final de 10mL. A solução foi armazenada -20°C.

DTT-LB 2X: Para a preparação do tampão da amostra, 1mL da solução de DTT (1M) foi homogeneizado com o tampão (100mM tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,2% azul de bromofenol).

TE: Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM (pH 8).

TES-lisozima: 500 μ L de TE 10X, 100mg de lisozima e água destilada q.s.p 10 mL.

PMSF: Preparada uma solução estoque a 100mM em isopropanol.

Fosfato 8X: Na₂HPO₄ 80mM, NaH₂PO₄ 80mM e NaCl 800mM dissolvidos em água destilada q.s.p 500mL.

Imidazol 1M: Preparada uma solução a 1M de imidazol em água destilada.

PBS 1X: Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 17 mM, NaCl 1,4 mM, KCl 27 mM.

Solução de lise (tratamento): Fosfato 1X e imidazol 10mM.

Solução de corrida (purificação): Fosfato 1X, uréia 8M e imidazol 40mM.

Solução de eluição (purificação): Fosfato 1X, uréia 8M, imidazol 500mM.

Solução corante SDS-PAGE: Metanol 50%, ácido acético 10%, e *Comassie Brilliant Blue* G-250 0.25%.

Solução descorante SDS-PAGE: Metanol 30%, ácido acético 10% e H₂O.

ANEXO II

Protocolo de purificação da ETD-like (UNESP)

Protocolo de purificação da ETD-like (UNESP/ Campus São José do Rio Preto)

Inicialmente, um pré-inóculo foi realizado com 1 colônia crescida em placa em 5ml de LB suplementado com canamicina, conforme descrito no item 4.3. No dia seguinte, 5mL do pré-inóculo foi transferido para 1L de meio líquido LB, suplementado com canamicina ($50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e mantido sob agitação até atingir a densidade ótica de $\text{OD}_{600\text{nm}}$ entre 0,5 e 0,65 (espectrofotômetro - Spectronic Genesys). A indução foi realizada com 0,2 mM de IPTG a 25°C , por 10h. Alíquotas foram coletadas para análise por SDS-PAGE 12%, conforme descrito no item 4.3.

A purificação foi realizada em coluna de afinidade utilizando resina de níquel (ProBond), conforme instruções do fabricante (Invitrogen). O meio foi centrifugado por 30min, 9.000rpm a 4°C , sendo o precipitado ressuspenso e estocado por 1h em 20mL de tampão de lise (50 mM tampão HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8) contendo 0,5mg/mL de lisozima. Em seguida, a solução foi sonicada com pulsos de 15s a 300 W para lise celular, e centrifugada por 30min a 17.000rpm a 10°C . A sobrenadante foi recuperado para a purificação da proteína de interesse.

Primeiramente, a resina (Ni-NTA) foi equilibrada com o mesmo tampão de lise, sendo que em seguida, o sobrenadante do lisado celular foi transferido para a coluna de purificação (coluna de gravidade, Bio-Rad) para que as proteínas (His-tag) fossem adsorvidas. Após a adsorção, a resina foi lavada utilizando tampão de lavagem (20mM NaH_2PO_4 , 500mM NaCl, 30 mM imidazol, 2% glicerol e 1mM PMFS, pH 7.4) para remover contaminantes adsorvidos inespecificamente na resina de níquel. As proteínas foram então eluídas utilizando tampão de eluição (20 mM tris, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol , pH 7.4).

Utilizando sistema AKTA purifier foi realizada uma nova purificação por troca iônica, utilizando coluna mono-S, e em seguida, uma purificação de gel filtração, sendo a separação por massa molecular. As proteínas foram concentradas utilizando concentradores millipore e analisadas em SDS-PAGE 12%, conforme descrito no item 4.3.