

SELEÇÃO DE ALVO PARA A PRODUÇÃO DE MAbS ESPECÍFICOS CONTRA *Salmonella enterica* subsp *enterica* UTILIZANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

BAMPI, Suely Ribeiro^{1,3,4}; LOPES, Caroline de Paula^{2,3}; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo³; SILVA, Wladimir Padilha²; MOREIRA, Ângela Nunes^{3,4}

¹ Bolsista CNPq, Faculdade de Nutrição, UFPel; ² DCTA, UFPel; ³ CDTEC/ Biotecnologia, UFPel

⁴ Faculdade de Nutrição, UFPel. suely_rbampi@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Infecções alimentares ocasionadas por bactérias do gênero *Salmonella* acarretam importantes perdas econômicas e são consideradas significativos problemas de saúde pública (SHINOHARA et. al. 2008).

A metodologia convencional para a detecção de *Salmonella* em alimentos, recomendada pelo BAM (1998), é laboriosa e onerosa (FERRETTI et al., 2001). Desse modo, métodos rápidos específicos para a detecção desse patógeno tem sido cada vez mais pesquisados. Dentre esses métodos, destacam-se aqueles baseados na reação antígeno-anticorpo. A maioria desses métodos utilizam anticorpos monoclonais (MAbs) que apresentam alta afinidade pelo antígeno selecionado e não promovem reações inespecíficas com outros antígenos (BOENISCH, 2001).

Anticorpos monoclonais reconhecem apenas um único epítipo em um patógeno, o que aumenta a sua especificidade. Entretanto, a sensibilidade do anticorpo pode ser afetada se ele não for capaz de reconhecer variantes do mesmo antígeno, se o antígeno não for expresso ou se o epítipo em questão for expresso em pouca quantidade na superfície do patógeno (CAMPBELL, 1991). MAbs contra antígenos estruturais característicos de salmonelas tem apresentado resultados significativos quando comparados com a metodologia convencional (MOREIRA, 2009). Entretanto, alguns desses MAbs não são capazes de detectar a maioria dos sorotipos de salmonelas conhecidos.

Assim, a identificação de novos epítipos para a produção de MAbs específicos e sensíveis têm se tornado um desafio nos últimos tempos. Nesse contexto a utilização de ferramentas de bioinformática, através das quais se pode armazenar, analisar e apresentar dados biológicos e moleculares, apresenta-se como uma alternativa para a obtenção de novos alvos (CHEN, 2011). Esses alvos devem, preferencialmente, ser proteínas de membrana externa, presentes na maioria dos sorovares, ou pelo menos, nos mais comuns associados a surtos, expressas em grande quantidade, que façam parte da constituição da bactéria, apresentem características antigênicas, e sejam específicas para o gênero, evitando assim reações inespecíficas com outros patógenos que possam estar presentes no alimento.

Sendo assim, o presente trabalho objetivou a busca por novos alvos de *Salmonella* para a produção de MAbs, ou seja, a identificação de proteínas de membrana externa (OMP) imunogênicas, expressas em grande quantidade na superfície da bactéria, constitutivas e específicas, através da análise *in silico*, utilizando programas de bioinformática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção de alvos em banco de dados

Para a escolha de um novo alvo para a produção de MAbs específicos para *Salmonella*, inicialmente foi utilizado o programa PSORTdb (SIGRIST et al., 2011). Essa ferramenta de bioinformática utiliza algoritmos para prever a localização celular de proteínas de qualquer genoma depositado em seu banco de dados. Assim, pode-se identificar proteínas de membrana externa (OMPs), as quais são as mais desejadas para o desenvolvimento de MAbs. Nesse programa foram realizadas análises dos genomas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis e de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, sorovares esses, mais comumente envolvidos em surtos de salmoneloses.

Todas as sequências de prováveis proteínas de interesse selecionadas pelo PSORTdb foram comparadas com as sequências de salmonelas e de outros microrganismos depositadas no banco de dados do NCBI através de alinhamento utilizando o programa BLASTp (2011). No alinhamento, as sequências protéicas foram comparadas e as proteínas que apresentavam baixa similaridade com sequências de salmonelas e/ou apresentavam alta similaridade com sequências de outras enterobactérias foram excluídas.

2.2 Análise das proteínas

A análise das proteínas pré-selecionadas foi realizada a partir de uma revisão bibliográfica e programas de bioinformática, visando à seleção daquelas com as melhores características para serem utilizadas como alvo.

Foi utilizada a ferramenta Pfam (FINN et al., 2010), para a identificação de famílias de proteínas e domínios protéicos através de múltiplos alinhamentos de sequências, e o programa DOLOP (MADAN et al., 2003), um banco de dados de lipoproteínas bacterianas, visando identificar essas proteínas, pois elas desempenham um papel fundamental na virulência da bactéria. E, para a obtenção de uma maior confiabilidade na seleção da proteína de interesse, os alvos pré-selecionados também foram submetidos aos programas PROSITE (YU et al., 2010), um banco de dados para predição de domínios e família das proteínas por similaridade, e TMHMM (CBS, 2010), uma ferramenta de predição de hélices transmembranas em proteínas.

2.3 Construção de primers

Para a amplificação do gene escolhido foram desenhados *primers* a partir da sequência gênica depositada no GenBank da proteína escolhida com a utilização do programa VectorNTI 9.0 (Invitrogen, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas 190 prováveis OMPs. Entretanto, apenas três demonstraram potencial para serem utilizadas como alvo por apresentarem alta similaridade entre a maioria dos sorovares de *Salmonella* ou com os mais envolvidos em surtos e baixa similaridade com as sequências dos enteropatógenos mais comuns em alimentos. São elas as proteínas Host colonization factor (ShdA), Cell adherence-invasion protein (InvH) e AIDA transporter-like protein (AIDA).

A proteína ShdA (número de acesso no NCBI [207857923](#)) está envolvida no transporte de outras proteínas, não é considerada uma lipoproteína e não apresenta nenhuma região transmembrana identificada. A AIDA (número de acesso no NCBI [16765833](#)) também é uma proteína transportadora, não é considerada uma lipoproteína e não apresenta região transmembrana. Já a proteína InvH (número de

acesso no NCBI [207858162](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/207858162)) é considerada uma lipoproteína de membrana externa que apresenta uma pequena região transmembrana (Pfam, 2010; DOLOP, 2003; PROSITE, 2010; TMHMM, 2010).

Sendo assim, a proteína Cell adherence-invasion protein (InvH), codificada pelo gene *invH*, foi a escolhida como alvo por ser uma lipoproteína localizada na membrana externa e por apresentar todos os pré-requisitos desejados, tornando-se assim um relevante epítopo para o desenvolvimento dos MAbs contra *Salmonella*.

As sequências dos *primers* para amplificação do gene *invH* de *S. Enteritidis*, desenhados a partir da sequência depositada no GenBank (número de acesso [207858162](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/207858162)) com a utilização do programa VectorNTI 9.0 (Invitrogen, 2003), são apresentadas na Tabela 1. Na sequência dos *primers*, foram incluídos sítios de clivagem para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente, visando a clonagem direcional do gene.

Tabela 1. Sequências dos *primers* para a amplificação do gene *invH* de *S. Enteritidis* e clonagem em plasmídeos de expressão em eucariotos (pcDNA3) e de expressão em *E. coli* (pAE).

| | Sequências dos primers |
|-----------------------------------|---|
| Para clonagem no plasmídeo pAE | For: CGGGATCCCAGGTGCCCTCCCTT (<i>Bam</i> HI) Rev: CGGAATTC TTATAAGGATTGCAGTC (<i>Eco</i> RI + Stop) |
| Para clonagem no plasmídeo pcDNA3 | For: CGGGATCCGAAATGGCCCAGGTGCCCTC (<i>Bam</i> HI + Kosak) Rev: CGGAATTC TTATAAGGATTGCAGTC (<i>Eco</i> RI + Stop) |

4 CONCLUSÃO

Para a obtenção de anticorpos monoclonais (MAbs) contra *Salmonella*, a proteína Cell adherence-invasion protein (InvH) foi a selecionada para ser utilizada como alvo por ser uma proteína de membrana externa, estar presente nos principais sorovares do gênero *Salmonella* envolvidos em surtos, apresentar baixa identidade com proteínas de outros microrganismos e ter apresentado as melhores características para ser utilizada como alvo. Dessa forma, o gene *invH* será amplificado por PCR e clonado em plasmídeos de expressão em eucariotos (pcDNA3), para imunização genética, e de expressão em *E. coli* (pAE), para a expressão da proteína recombinante que será utilizada no “screening” dos MAbs.

5 REFERÊNCIAS

BAM/FDA. **Bacteriological Analytical anual/ Food and Drug Administration**, 8th, Arlington: Association of Official Analytical Chemists. 1998.

BOENISCH, T. (Ed.) **Immunochemical Staining Methods**, 3ª ed., Califórnia: Dako, 2001.

CAMPBELL, A.M.; **Monoclonal and immunosensor technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991

CBS, Center for biological sequence analysis, TMHMM Server v. 2.0 - Prediction of transmembrane helices in proteins <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> - acesso em fevereiro de 2010.

CHEN, P. Advances of Bioinformatics Tools Applied in Virus Epitopes Prediction. **Virologica Sinica**. Verlag Berlin Heidelberg.,v. 26: 1-7. Feb. 2011.

FERRETI, R.; MANNAZZU, L.; COCOLIN, I.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based Method for Detection of *Salmonella* spp. In food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 977-978. 2001.

GALÁM, J.E.; WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature** - Vol 444j30 November 2006.

DAEFLER, S.; RUSSEL, M. The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. **Molecular Microbiology** (1998) 28(6), 1367–1380.

MADAN, M.B., LEENA, M.P., TAMIL, A.S., MADERA, M., GOUGH, J. and SANKARAN, K. (2003) An updated version of DOLOP with functional assignments to predicted lipoproteins, **Journal of Bacteriology**, in press.

MOREIRA A.N., CONCEIÇÃO F.R., CONCEIÇÃO R.C.S., DIAS C.N., CARVALHAL J.B., DELLAGOSTIN O.A.; ALEIXO J.A.G. IMS using in-house monoclonal antibody-coated magnetic beads associated to PCR assay for detection os *Salmonella Typhimurium* im raw meats, **Journal of Food Safety** v.29,p. 59–72, 2009.

SHINOHARA N.K.S., BARROS V.B., JIMENEZ S.M.C., MACHADO E.C.L., DUTRA R.A.F., LIMA FILHO J.L. *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. **Ciência & saúde coletiva** vol.13 n°5 Rio de Janeiro Setembro/Outubro de 2008.

SUKHAN, A.; KUBORI, T.; WILSON, J.; GALÁN, J. E. Genetic Analysis of Assembly of the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Type III Secretion-Associated Needle Complex.; **Journal of Bacteriology**, p. 1159–1167; Feb. 2001.

SIGRIST C.J.A., CERUTTI L, CASTRO E, LANGENDIJK-GENEVAUX PS, BULLIARD V, BAIROCH A, HULO N. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. **Nucleic Acids Res.** 38(Database issue)161-6 (2010).

FINN, R.D; MISTRY, J.; TATE, J.; COGGIL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J.E.; GAVIN, O.L.; GUNESEKARAN, P.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E.L.; EDDY, S.R.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database, **Bateman Nucleic Acids Research** (2010) Database Issue 38:D211-222

YU, N.Y., LAIRD, M.R., SPENCER, C, and BRINKMAN, F.S.L. (2011) PSORTdb--an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. **Nucleic Acids Research.** 39:D241-244.

*Vector NTI Advance*TM 9.0; Invitrogen life science software. Copyright © 2003.