

## Seleção, caracterização e clonagem dos genes fljB e groEL agonistas dos receptores de reconhecimento de padrão do sistema imune inato das aves<sup>1</sup>

Bruno A. Soares<sup>2\*</sup>, Solange A. Ságio<sup>3</sup>, Ana P. Peconick<sup>4</sup>, Priscilla R. Barrios<sup>4</sup>, Antônio Chalfun-Júnior<sup>3</sup>, Geraldo M. Costa<sup>4</sup>, Joziana M.P. Barçante<sup>4</sup> e Nelson R.S. Martins<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Soares B.A., Ságio S.A., Peconick A.P., Barrios P.R., Chalfun-Júnior A., Costa G.M., Barçante J.M. & Martins N.R.S. 2014. [Selection, characterization and cloning of the fljB and groEL genes agonists of the innate immune system pattern recognition receptors of birds.] Seleção, caracterização e clonagem dos genes fljB e groEL agonistas dos receptores de reconhecimento de padrão do sistema imune inato das aves. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(3):217-223. Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Campus UFLA, Lavras, MG 37200-000, Brazil. E-mail: brunoantunes.soares@yahoo.com.br

The recombinant production of innate immune system pattern recognition receptor agonists has provided a new tool for the production of immunostimulants for animals. The molecular pattern associated with the pathogen (PAMP), flagellin, coded by the fljB gene from *Salmonella* Typhimurium, and the molecular pattern associated to the damage (DAMP), HSP60, coded by the groEL gene from *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) of the innate immune system of birds. In the present study, we performed the cloning of genetic fragments of the genes fljB, from *S. Typhimurium*, and groEL from *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* inserted in expression vector pET100/D-TOPO and transformed in *E. coli* TO10 cells. The clones were evaluated by colony PCR, plasmidial DNA PCR and genome sequencing in order to confirm the presence of these genes. In the colony PCR, we identified the presence of genes groEL (*S. Enteritidis*), groEL (*S. Typhimurium*) and fljB (*S. Typhimurium*) in 80%, 60% and 80% of the transformed colonies, respectively. The cloning system adopted allowed the production of HSP60 genetic fragment clones and flagellin of *Salmonella* strains, allowing the posterior use of these clones in gene expression trials, with the future potential of being used as non-specific immunostimulants for birds.

INDEX TERMS: Recombinant protein, PAMP, flagellin, DAMP, HSP60, birds.

**RESUMO.-** A produção recombinante de agonistas dos receptores do reconhecimento de padrão do sistema imune inato tem fornecido uma nova ferramenta para a produção

de imunoestimulantes para animais. O padrão molecular associado ao patógeno (PAMP), flagelina, codificado pelo gene fljB de *Salmonella* Typhimurium e o padrão molecular associado ao dano (DAMP) HSP60, codificado pelo gene groEL da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) do sistema imune inato das aves. No presente estudo, foi feita a clonagem de fragmentos genéticos dos genes fljB de *S. Typhimurium* e groEL de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* inseridos no vetor de expressão pET100/D-TOPO e transformados em células de *E. coli* TOP10. Os clones foram avaliados pela PCR de colônia, PCR de DNA plasmidial e sequenciamento genômico para a confirmação da presença desses genes. Na PCR de colônia, foram identificadas em 80%, 60% e 80% das colônias transformadas, a presença dos genes groEL

<sup>1</sup> Recebido em 27 de setembro de 2013.

Aceito em 7 de janeiro de 2014.

<sup>2</sup> Laboratório de Doenças das Aves, Escola de Veterinária (EV), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mails: nrsmartins@gmail.com; \*Corresponding author: brunoantunes.soares@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Laboratório de Fisiologia Molecular Vegetal (LFV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus UFLA, Lavras, MG 37200-000, Brasil. E-mails: solsagio@gmail.com, chalfunjunior@dbi.ufla.br

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMV), UFLA, Campus UFLA, Lavras, MG 37200-000. E-mails: anapeconick@dmv.ufla.br, prbarrios@dmv.ufla.br, gmcosta@dmv.ufla.br

(*S. Enteritidis*), groEL (*S. Typhimurium*) e fljB (*S. Typhimurium*) respectivamente. O sistema de clonagem adotado possibilitou a produção de clones dos fragmentos genéticos da HSP60 e flagelina das cepas de *Salmonella*, permitindo a utilização posterior desses clones em ensaios de expressão gênica, com potencial futuro de serem utilizados como imunostimulante inespecífico das aves.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Proteína recombinante, PAMP, flagelina, DAMP, HSP60, aves.

## INTRODUÇÃO

A avicultura industrial representa importante setor da produção de alimentos com impacto social e econômico no mundo. A sanidade dos plantéis avícolas é essencial para o abastecimento e a segurança alimentar dos mercados consumidores. Além disso, alguns patógenos aviários como o vírus da influenza aviária, *Salmonella* e *Campylobacter* causam infecções zoonóticas (Kaiser 2010). Um dos métodos empregados na prevenção de enfermidades nas aves, a vacinação, é considerada uma das melhores estratégias com custo-benefício, para aumentar a saúde dos animais (Aucouturier et al. 2001). Entretanto, alguns relatos da utilização de determinados tipos de vacinas aviárias evidenciaram a seleção de patógenos com maiores virulências, como o vírus da doença de Marek (Gimeno 2008, Nair 2005). Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novos e melhores produtos imunostimulantes que visam modular respostas protetoras eficazes nas aves.

O sistema imunológico das aves pode ser dividido em sistema inato e adaptativo (Kaiser 2010). O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa do hospedeiro dado a capacidade de induzir uma resposta rápida e menos específica quando em contato com agentes invasores (Miyaji et al. 2011). O reconhecimento dos patógenos na imunidade inata é mediado pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs) (Juul-Madsen et al. 2008). Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) compartilhados entre diferentes microrganismos infecciosos, e padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) que são ligantes endógenos, muitas vezes referidos como “sinais de perigo” liberados durante o dano tecidual ocorrido em sítios infecciosos e de necrose celular (Tapping 2009, Drexler & Foxwell 2010, Moser & Leo 2010, Takeuchi & Akira 2010). Uma das principais famílias dos RRP é a dos receptores *Toll-like* (TLRs) que exercem a função de discriminar os diferentes patógenos, principalmente pelo reconhecimento de PAMPs, e estão envolvidos em um sistema de sinalização que é conservado em mamíferos, aves, insetos e plantas (Means et al. 2000). Os DAMPs são detectados por diversos RRP que ainda não são bem especificados (Pockley 2001), embora alguns estudos referenciem o reconhecimento dessas moléculas por alguns TLRs (Stewart & Young 2004, Bianchi 2007).

Bactérias patogênicas flagelares expressam a flagelina para promover motilidade, colonização e invasão da mucosa (Bonifield & Hughes 2003). A flagelina exibe algumas características de PAMPs, incluindo sequência conservada,

componente importante para o microrganismo, larga distribuição entre bactérias e capacidade de induzir o TLR5 (Hayashi et al. 2001, Berin et al. 2002, Zeng et al. 2003, Ramos et al. 2004).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são expressas constitutivamente em todas as células de mamíferos, aves, plantas e em microrganismo, e são classificadas como chaperoninas moleculares (Wallin et al. 2002). HSPs microbianas possuem perfil imunostimulante baseado no reconhecimento por receptores endocíticos, na internalização das células apresentadoras de antígenos, e na apresentação por via de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Wallin et al. 2002, Tobian et al. 2004). Outro fator apontado por alguns trabalhos é a capacidade de HSPs induzir a maturação fenotípica e funcional das células apresentadoras de antígenos (APCs) (Somersan et al. 2001, Noessner et al. 2002, Wallian et al. 2002).

Diversos experimentos confirmam o potencial de flagelina (Pino et al. 2005, Huleatt et al. 2007, Skountzov et al. 2010) e HSPs (Harmala et al. 2006, Paliwal et al. 2008, Paliwal et al. 2011) produzidas de forma recombinante na capacidade de atuar como imunostimulantes do sistema imune dos mamíferos. Com isso, objetivou-se, com este trabalho selecionar, caracterizar e clonar transgenes codificadores de agonistas dos receptores de reconhecimento de padrões do sistema imune inato em aves, visando posterior utilização como imunostimulante na produção avícola.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Análise *in silico*.** As análises *in silico*, ou estudos de bioinformática, constituíram na pesquisa de genes ou fragmentos genéticos de agonistas para receptores de reconhecimento do sistema imune inato de aves e mamíferos depositados em bancos de dados da National Center for Biotechnology Information - NCBI (2012). Trabalhou-se com as sequências nucleotídicas dos agonistas flagelina e da HSP60 presentes em bactérias. Foram feitas análises de similaridade, utilizando-se o BLAST ou Basic Local Alinhament Sequence Tool (Altschul et al. 1990) e o site de alinhamento JustBio (<http://www.justbio.com>) entre diferentes espécies de bactérias para determinação de porções mais conservadas entre as cepas e seleção do fragmento para produção de forma recombinante.

**Cultivo bacteriano.** Os agonistas de escolha foram relatados em diversos patógenos microbianos, sendo que para esse experimento foram utilizadas cepas de *Salmonella Typhimurium* (ST) e *Salmonella Enteritidis* (SE). Foi utilizado como meio de crescimento o meio *brain heart infusion* (Merck), BHI, preparado conforme as recomendações do fabricante.

**Desenho, síntese e utilização de iniciadores.** Os iniciadores (*forward* e *reverse*) para flanquear as regiões do gene responsável por codificar a flagelina, gene *fljB*, foram retirados da literatura (Quadro 1). Em seguida, foi realizada a verificação dos iniciadores quanto à capacidade de reconhecer a sequência do gene alvo utilizando-se BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) (Altschul et al. 1990). Os pares de iniciadores para o gene codificador da HSP60, gene *groEL*, sequência de número de acesso no NCBI JQ433685.1, foram desenhados no software *PrimerQuest* (Quadro 1).

O desenho dos iniciadores *forward* para a inserção dos fragmentos genéticos no vetor de clonagem pET100-D/TOPO® (*In-vitrogen*) foi realizado conforme as especificações do fabricante (Quadro 2). Foi realizada a modificação dos iniciadores *forward*

**Quadro 1. Iniciadores para o gene fljB da *Salmonella Typhimurium* e gene groEL de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis***

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)	Referência
fljB	Forward	ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC	526	Lim et al. (2003)
	Reverse	TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG		
groEL	Forward	TGAAAGGCCAGA ACGAAGACCAG	209	Desenhado nesse trabalho
	Reverse	TTTGGTTGGGTCCAGGATACCCAT		

**Quadro 2. Iniciadores forward de PCR com extremidades coesivas para inserção dos fragmentos genéticos no vetor de clonagem**

Gene	Sequência no sentido 5' - 3'
fljB	CACCATGACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC
groEL	CACCATGTGAAAGGCCAGAACGAAGACCAGA

estabelecidos anteriormente, com adição *upstream* da sequência CACC na extremidade 5' do iniciador. Além dessa modificação, foi adicionada após a sequência CACC uma sequência ATG responsável na ligação do ribossomo no processo de tradução. Os iniciadores reverse não foram modificados devido a não complementariedade da sequência GTGG livre do vetor.

**Extração do DNA total.** Num primeiro momento foi extraído o DNA total das bactérias *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* para posterior amplificação dos fragmentos de genes selecionados. Para a extração do DNA total das amostras foi utilizado o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (*Promega*), seguindo as recomendações do fabricante.

A integridade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1,2% corado com Gel Red™ 1x. As concentrações (ng/μl) também foram determinadas no espectrofotômetro NanoVue™ plus.

**Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).** Os fragmentos de DNA desejados foram amplificados por PCR utilizando-se o DNA purificado anteriormente. Para cada gene de cada cepa bacteriana, foi padronizada uma reação de PCR.

**Amplificação do gene fljB de *Salmonella Typhimurium*.** A reação foi constituída de 2,5μl de tampão de PCR 10X (100 Mm Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl); 3,0mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 50ng do DNA; 1,6 U da Taq DNA Polimerase; 0,5μM dos iniciadores *forward* e *reverse*; 14,7μl de água deionizada autoclavada para completar um volume final de 25μl.

As condições para a reação foram: um passo de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, anelamento de 65°C por 1 min, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 min.

**Amplificação do gene groEL de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*.** A reação foi constituída de 2,5 μl de tampão de PCR 10X (100 Mm Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl); 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 120ng do DNA; 1,6 U da Taq DNA Polimerase; 0,5μM dos iniciadores *forward* e *reverse*; 13,7μl de Água MiliQ autoclavada para completar um volume final de 25μl.

As condições para a reação foram: um passo de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento de 62°C por 1 min, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 min.

**Eletroforese em gel de agarose.** As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, corado com Gel Red™ 1X, conforme recomendações do fabricante, em cuba de eletroforese horizontal, tendo TBE (Tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M) como tampão de corrida. Com o auxílio de padrão de peso molecular com os tamanhos de 50, 150, 300, 500, 750 e 1000 pb (PCR Marker®, *Promega*) foram identificadas as bandas de interesse.

### Clonagem de fragmentos com extremidades coesivas.

A clonagem do DNA foi realizada por meio do vetor pET100/D-TOPO® (*Invitrogen*), que possui o promotor T7 que permite alto nível de expressão para proteínas recombinantes em *E. coli* competentes. No sistema TOPO® os produtos de PCR são direcionalmente clonados pela adição de quatro bases no primer *forward* (CACC) que hibridiza com as bases da saliência livre do vetor de clonagem (GTGG) estabilizando o produto de PCR para o direcionamento da clonagem na orientação correta.

O primeiro passo da clonagem foi o da produção de produtos de PCR com extremidades coesivas pela reação de PCR com uma DNA polimerase com atividade revisora, a Pfx50™ (*Invitrogen*). Posteriormente foi realizada a ligação do produto de PCR com extremidade coesiva ao vetor de clonagem pET100/D-TOPO® (*Invitrogen*) seguindo as recomendações do fabricante.

Em seguida, realizou-se a reação de transformação da clonagem em células de *E. coli* competentes TOP10 (*Invitrogen*) pelo método de transformação química seguindo as especificações do fabricante. Alíquotas de 100 e 200 μl de cada reação de transformação da clonagem foram semeadas em placas pré-aquecidas de LB (*Merck*) com ampicilina (50μg/ml), e foram incubadas durante a noite a 37°C.

Para a análise dos transformantes, foram escolhidas dez colônias do crescimento anterior. As colônias individuais foram retiradas da placa, depositadas em um tubo de (0,2 ml) para PCR e em seguida cultivadas em 3 ml de LB líquido com ampicilina (50μg/ml) em estufa a 37°C a 200rpm por 24 h.

As reações de PCR de colônia foram padronizadas conforme as reações de PCR estabelecidas inicialmente na identificação dos fragmentos genéticos nas cepas bacterianas.

A próxima etapa consistiu na extração do DNA plasmidial do cultivo bacteriano. Foi utilizado o kit *PureLink™ HQ Mini Kit Plasmid Purification* (*Invitrogen*) seguindo as recomendações do fabricante. Após a obtenção do DNA plasmidial, foram realizadas a determinação das concentrações (ng/μl) do DNA plasmidial no espectrofotômetro NanoVue™ plus, e outra PCR com esse DNA para confirmar as amostras positivas para o vetor com o inserto dos fragmentos genéticos desejados.

**Sequenciamento.** Os fragmentos dos genes amplificados na PCR e visualizadas na eletroforese em gel de agarose foram purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*®) de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente, esses fragmentos foram submetidos ao sequenciamento genético no sequenciador automático capilar ABI310 (*Applied Biosystems*) pelo método enzimático descrito por Sanger et al. (1977) no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras de DNA plasmidial foram sequenciadas com o mesmo método.

As reações de sequenciamento foram estudadas e analisadas por programas computacionais. O programa Seqman do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.) foi utilizado para comparar os esferogramas com as sequências nucleotídicas e exclusão dos vetores e incorporações incorretas. O software BioEdit® versão 7. 2. 3 (Hall 2013) e o site JustBio (<http://www.justbio.com>) forneceram as ferramentas para realizar o alinhamento das sequências nucleotídicas com dedução dos aminoácidos correspondentes. Foram feitas buscas por similaridade, utilizando-se BLAST (Altschul et al., 1990), com sequências armazenadas no GenBank™.

As sequências geradas foram comparadas com as sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no banco de dados do NCBI (2012) e com a sequência do vetor de clonagem disponível pelo fornecedor (*Invitrogen*). Os algoritmos BLASTn e BLASTx (*Basic Alignment Search Tool* - BLAST 2012) do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool*) disponibilizado pelo NCBI foram utilizados para a busca de similaridade entre os nucleotídeos.

## RESULTADOS

### Análise *in silico* das sequências dos agonistas

Inicialmente, a pesquisa realizada no NCBI para o agonista flagelina e HSP60 gerou no total 34218 e 19375 sequências genéticas, respectivamente. Com o objetivo de cultivar espécies do gênero *Salmonella* para as etapas subsequentes do ensaio experimental, foram selecionadas das 23 sequências do gene *fljB* da *Salmonella* Typhimurium e das 860 sequências da HSP60 do gênero *Salmonella*, as sequências de número de acesso NC\_016860.1, AM933172.1 e JQ433685.1, respectivamente para os genes *fljB* (526pb), *groEL* (*S. Enteritidis*, 1461 pb) e *groEL* (*S. Typhimurium*, 1647 pb). Utilizou-se a sequência consenso, com 100% de identidade, dos gene *fljB* e dos genes *groEL* para avaliação e construção de iniciadores. A similaridade da sequência do gene *groEL* (209 pb) entre as duas cepas bacterianas utilizadas foi de 99,03%, o que permitiu a utilização dos mesmos iniciadores para amplificar fragmentos desse gene com as duas diferentes amostras de DNA genômico na PCR.

### PCR para genes agonistas de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*

O tamanho dos fragmentos amplificados do gene *groEL* de *S. Enteritidis*, gene *groEL* e *fljB* de *S. Typhimurium* foram 209pb, 209pb e 526 pb respectivamente (Fig.1). Esses resultados da PCR corroboram com a alta especificidade dos iniciadores para a amplificação desses genes. O alinhamento das sequências obtidas no presente estudo com sequências depositadas em bancos de dados públicos confirmaram a identidade dos *amplicons* com os genes *groEL* e *fljB*.

### Produção de produtos de PCR com extremidades coesivas para inserção no vetor de clonagem pET100/D-TOPO

Posteriormente, na reação de produção de produtos de PCR com extremidades coesivas para inserção no vetor de clonagem pET100/D-TOPO, o resultado da eletroforese em gel de agarose mostrou as bandas esperadas com os ta-

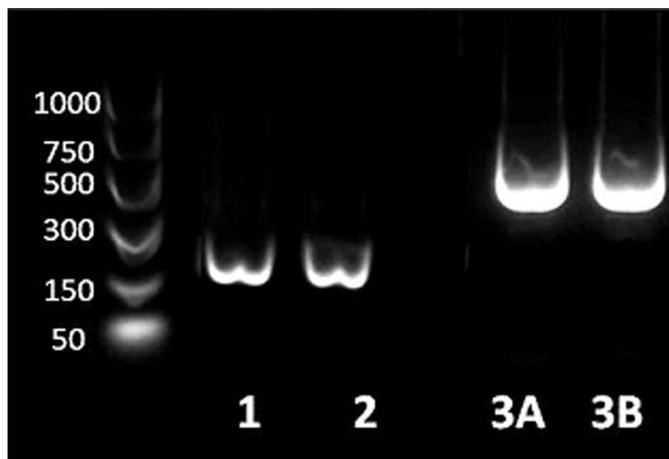


Fig.1. Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR dos genes agonistas. À esquerda, o marcador molecular de 50 a 1000 pb; (1) gene *groEL* de *Salmonella* Enteritidis (209 pb); (2) gene *groEL* de *S. Typhimurium* (209 pb); (3) gene *fljB* de *S. Typhimurium* (526 pb).

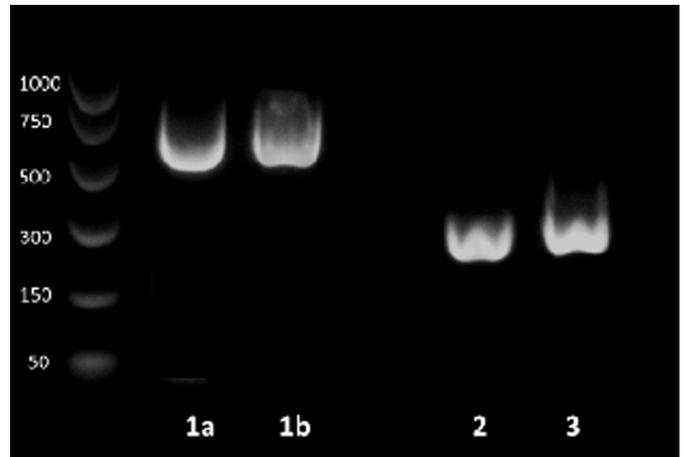


Fig.2. Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR com extremidades coesivas para inserção no vetor de clonagem. À esquerda o marcador molecular de 50 a 1000 pb; (1a e 1b) gene *fljB* (533 pb); (2) gene *groEL* de *Salmonella* Typhimurium (216 pb); (3) gene *groEL* de *S. Enteritidis* (216 pb).



Fig.3. Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR das colônias que receberam o vetor de clonagem com o inserto dos fragmentos dos genes. À esquerda o marcador molecular de 50 a 1000 pb; (1-10) gene *groEL* (216 pb) de *S. Enteritidis*; (11 a 19) gene *groEL* (216 pb) de *Salmonella* Typhimurium. (+) colônias com o inserto desejado; (-) colônias descartadas do estudo.

manhos próximos aos dos genes, gene *fljB* de *S. Typhimurium* com 533pb e genes *groEL* das duas cepas com 216pb (Fig.2).

### Confirmação da presença do inserto em colônias de *Escherichia coli* competentes pela PCR de colônia e sequenciamento genético

Foi detectado o crescimento de colônias de *E. coli* TOP10 no meio sólido, após a reação de transformação da clonagem pelo método de transformação química. O total de 10 colônias desse crescimento foi escolhido aleatoriamente para cada fragmento genético, e analisadas quanto à presença do inserto pela técnica da PCR de colônia. Foram identificadas em 80%, 60% e 80% das colônias transformadas, a presença dos genes *groEL* (*S. Enteritidis*), *groEL* (*S. Typhimurium*) e *fljB* (*S. Typhimurium*) respectivamente (Fig.3). As amostras que amplificaram bandas inespecíficas, com tamanhos diferentes do esperado, provavelmente por uma inserção incorreta ou duplicada do transgene, foram descartadas dos procedimentos científicos seguintes.

As colônias positivas na técnica de PCR de colônia foram submetidas ao crescimento em meio líquido, e posteriormente o DNA plasmidial extraído dessas colônias foram

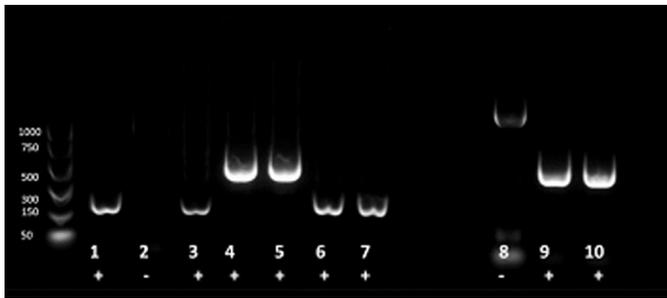


Fig.4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com o DNA plasmidial proveniente do cultivo de colônias positivas na PCR de colônia. À esquerda o marcador molecular de 50 a 1000 pb; (1-3) gene groEL (526 pb) de *Salmonella* Enteritidis; (4, 5, 9 e 10) gene fljB de *S. Typhimurium*; (6-8) gene groEL de *S. Typhimurium*. (+): amostras com amplicons dos tamanhos esperados; (-) ausência de amplicons ou amplicons inespecíficos.

avaliadas quanto à presença do inserto clonado pela PCR.

Apenas as amostras de DNA plasmidial que apresentaram a visualização das bandas dos amplicons com os tamanhos esperados na eletroforese em gel de agarose, foram submetidas ao sequenciamento genômico (Fig.4). O sequenciamento confirmou a presença dos fragmentos genéticos na direção correta, das amostras de DNA plasmidial.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente trabalho, o PAMP flagelina de *S. Typhimurium*, codificada pelo gene fljB, foi escolhida devido seu potencial de ativação de um membro do grupo dos TLRs, o TLR5 (Ramos et al. 2004, Metcalfe et al. 2010, Putten et al. 2010). Com o objetivo de trabalhar com agonistas com atividades DAMP que possuem capacidade de ativar receptores ainda não especificados na literatura, foi escolhida a HSP60 das cepas *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, ambas codificadas pelo gene groEL (Ensgraber & Loos 1992, Nair et al. 2002, Rainczak et al. 2011).

A proteína de choque térmico, codificadas pelo gene groEL apresenta em sua sequência regiões que são altamente conservadas quando analisadas numa mesma espécie (Karu et al. 2003, Rebecca et al. 2002). No presente experimento, a avaliação *in silico* confirmou uma região de alta similaridade entre esse DAMP da *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, o que justificou a utilização de um mesmo iniciador para amplificação dessas sequências genéticas na PCR. Esses achados corroboram com o estudo realizado por Hu et al. (2010) que avaliaram a presença de regiões conservadas nas sequências do gene groEL de diferentes sorovares de *Salmonella*.

Diversos trabalhos que têm por ferramenta a clonagem de genes imunostimulantes fizeram a produção de produtos de PCR para inserção nos plasmídeos de clonagem, adequando às especificidades dos vetores utilizados (Skountzou et al. 2010, Paliwal et al. 2011, Rainczak et al. 2011). Esse é o primeiro trabalho com a adoção do pET100/D-TOPO para clonagem de genes bacterianos agonistas do sistema imune inato das aves. A utilização deste vetor deve-se a capacidade de atuar em ensaios de clonagem e de expressão heteróloga, o que viabiliza a utilização dos produtos

clonados na geração de proteínas recombinantes.

Os iniciadores utilizados por Dilmaghani et al. (2011) para o gene fljB foram os mesmos adotados no presente estudo. Desta forma, a visualização dos produtos de PCR do gene fljB na eletroforese em gel de agarose com os mesmos tamanhos encontrados por esses autores, confirmaram a presença desse gene nas amostras provenientes de *S. Typhimurium*. Rainczak et al. (2011) adotaram iniciadores para o gene groEL da *S. Enteritidis* que produziram amplicons de 1600 pb para posterior inserção em vetores de clonagem. A produção de amplicons de 209 pares de bases para esses genes de ambas as cepas foi devido à possibilidade de utilizar esses clones para procedimentos de expressão heteróloga dos fragmentos genéticos de tamanhos reduzidos e futuramente avaliar o potencial de pequenos peptídeos recombinantes estimularem o sistema imune inato das aves.

Mazur et al. (2010) realizaram a clonagem do antígeno p24 do capsídeo do vírus da imunodeficiência felina com adoção do pET100/D-TOPO. Esses pesquisadores adotaram as mesmas especificações utilizadas nesse presente trabalho para a geração de produtos de PCR com extremidades coesivas, como a adição CACC nos iniciadores *forward* e utilização da DNA polimerase de alta fidelidade, que posteriormente permitiu a inserção desses fragmentos na orientação correta nos plasmídeos. Como referido por Mazur et al. (2010), a adoção desse sistema de clonagem é viável para a produção de proteínas recombinantes uma vez que os plasmídeos confirmados com as sequências podem ser inseridas em *E. coli* de expressão por metodologia simples e custo viável. Portanto, no presente trabalho, foi utilizado esse sistema visando objetivos futuros de gerar produtos imunobiológicos que possam ser produzidos de forma recombinante em escala industrial.

Na PCR de colônia, o número de colônias com a presença dos fragmentos genéticos foi considerado suficiente para as etapas subsequentes de cultivo e extração de DNA plasmidial. Esses resultados demonstraram a eficiência das células de *E. coli* competentes TOP10 nos processos de transformação e replicação dos plasmídeos. Resultados similares foram encontrados por Goudarzi et al. (2009) que clonaram o gene fliC codificador da flagelina e utilizaram células de *E. coli* competentes TOP10 no sistema de clonagem.

A confirmação das colônias com os fragmentos genéticos foi feita pela técnica de PCR de colônia, conforme realizado por Zhi-Hua et al. (2006) que clonaram um gene codificante de um tipo de HSP. Seron et al. (2004) utilizaram o mesmo sistema de clonagem do presente estudo para o gene da anidrase carbônica, entretanto a confirmação da presença do gene nos clones foi realizada pelo sequenciamento direto das colônias. No presente trabalho, com o objetivo de selecionar com maior segurança as amostras de DNA plasmidial com o vetor e o inserto, foram realizadas a PCR com o DNA plasmidial e o sequenciamento genético dessas.

Diante dos resultados obtidos, o processo de clonagem dos fragmentos genéticos agonistas dos RRP's provenientes de ambas as cepas resultou em amostras de DNA plas-

midial com os vetores e insertos na direção correta para a introdução em células de *Escherichia coli* de expressão. A possibilidade de utilizar esse ensaio experimental para promover a expressão desses genes e avaliação da resposta imune aviária, mediada pela inoculação desses peptídeos são baseadas nos testes *in vitro* e *in vivo* para genes imunostimulantes em mamíferos.

O gene groEL de *S. Typhi* foi clonado e expresso em hospedeiro heterólogo por Paliwal et al. (2008). Tais pesquisadores adotaram metodologia de cultivo bacteriano, obtenção de DNA genômico e clonagem similares ao do presente trabalho. Posteriormente à expressão da HSP60, foi realizada a inoculação dessa proteína isolada, e em conjunto com um desafio bacteriano em camundongos. A administração individual desse DAMP recombinante levou a produção de maiores níveis de interleucinas e respostas humorais, o que demonstrou a possibilidade dessas proteínas atuarem tanto como moléculas de reconhecimento das respostas imunes inatas e como antígenos bacterianos capazes de gerar respostas imunes adaptativas. Posteriormente, a co-administração da HSP60 com *S. Typhimurium* detectou o aumento da produção dos títulos de anticorpos da classe IgG, além dos níveis mais elevados de IL-4 e IFN- $\gamma$ . Esses achados endossam os estudos da utilização de HSPs recombinantes como candidatos imunostimulantes inespecíficos e vacinais.

Diversas pesquisas reforçam o potencial imunostimulante da flagelina. A inoculação *in vivo* desse PAMP, endereçada a sítios como o trato respiratório, resultou no recrutamento de citocinas e moléculas inflamatórias para esses locais (Honko & Mizel 2004). O trabalho desenvolvido por Skountzou et al. (2010) mostrou a eficiência da flagelina recombinante codificada pelo gene fliC de *S. Typhimurium* no estímulo das respostas imunológicas em camundongos. Nesse estudo, a clonagem do gene fliC em vetores apropriados, permitiu a expressão em células bacterianas de *E. coli* e purificação dessas proteínas para inoculação intranasal associadas com uma vacina inativada para gripe aviária. Resultados superiores foram encontrados em comparação ao grupo de animais que não receberam a administração de flagelina, como aumento da porcentagem de células inatas recrutadas, maior expressão de TLR5, aumento de citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e das respostas imunes humorais, além da indução da resposta imune celular com perfil Th2.

A inoculação *in vivo* do gene fliC em aves foi testada recentemente por Chung et al. (2012) que administraram a flagelina recombinante concomitante com a vacina inativada da gripe aviária, e obtiveram respostas semelhantes aos resultados obtidos por Skountzou et al. (2010) em camundongos, além da otimização das respostas imunes humorais de mucosa e a detecção inesperada da expressão dos TLR3 em células mononucleares periféricas.

Existem poucos trabalhos que esclarecem as atividades imunostimulantes do outro gene responsável por condicionar a flagelina, o fljB. Pino et al. (2005) evidenciaram que o gene fljB recombinante, co-administrado com antígenos provenientes de *Streptococcus mutans* em camundongos, levaram as células apresentadoras de antígenos a apresentarem maior expressão de moléculas coestimulatórias

(B7-1 e B7-2), que contribuíram no aumento das respostas do tipo Th1 e Th2. Também foi demonstrado que esse gene flagelar tem a capacidade de aumentar tanto as respostas imunitárias humorais sistêmicas como de mucosa, favorecendo sua aplicabilidade como adjuvante.

Em consonância com a tecnologia do DNA recombinante, as etapas procedidas nesse experimento, como a análise *in silico* dos genes e a clonagem são cruciais para a expressão dessas proteínas e avaliação da resposta imune no hospedeiro. O foco desse ensaio foi iniciar a produção recombinante do PAMP fljB e do DAMP HSP60, uma vez que não existem trabalhos visando esse objetivo com genes provenientes do gênero *Salmonella* e como alvo o sistema imune inato das aves. Desta forma, concluímos que o sistema de clonagem utilizado neste experimento foi capaz de gerar clones aos fragmentos genéticos das HSP60 e flagelina, o que permite utilizar esse sistema de clonagem na expressão heteróloga desses genes agonistas.

**Agradecimentos.** À Fundação de Apoio e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) pelo financiamento do projeto de pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Laboratório de Fisiologia Molecular Vegetal pela estrutura disponibilizada para execução do experimento.

## REFERÊNCIAS

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Bio.* 215:403-410.
- Aucouturier J., Dupuis L. & Ganne V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19:2666-2672.
- BLAST 2012. Basic alignment search tool. BLAST assembled refseq genomes. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>> Acesso em 10 dez. 2012.
- Berin M.C., Darfeuille-Michaud A., Egan L.J., Miyamoto Y. & Kagnoff M.F. 2002. Role of EHEC O157: H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappa B and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell Microbiol.* 4:635-648.
- Bianchi M.E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukocyte Biol.* 81:1-5.
- Bonifield H.R. & Hughes K.T. 2003. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J. Bacteriol.* 185:3567-3574.
- Chung H.C., Cheng L.T., Hung L.H., Tsai P.C., Skountzou I., Wang B., Compans R.W. & Lien Y.Y. 2012. *Salmonella flagellin* enhances mucosal immunity of avian influenza vaccine in chickens. *Vet. Microbiol.* 157:69-77.
- Dilmaghani M., Ahmadi M., Zahraei Salehi T. & Talebi A. 2011. The analysis of groEL gene in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium isolated from avians by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism method. *Vet. Res. Commun.* 35:133-143.
- Drexler S.K. & Foxwell B.M. 2010. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:506-518.
- Engraber M. & Loos M. 1992. A 66 Kilodalton heat-shock protein of salmonella-typhimurium is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect. Immun.* 60:3072-3078.
- Gimeno I.M. 2008. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine* 26:31-41.
- Goudarzi G., Sattari M., Roudkenar M.H., Montajabi-Niyat M., Zavaram-Hosseini A. & Mosavi-Hosseini k. 2009. Cloning, expression, purification, and characterization of recombinant flagellin isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Lett.* 31:1353-1360.
- Hall T. 2013. BioEdit. Disponível em <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>> Acesso em 23 jan. 2013.

- Harmala L.A.E., Ingulli E.G., Curtsinger J.M., Lucido M.M., Schmidt C.S., Weigel B.J., Blazar B.R., Mescher M.F. & Pennell C.A. 2002. The adjuvant effects of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8(+) T cells in vivo. *J. Immunol.* 169:5622-5629.
- Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M. & Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
- Honko A.N. & Mizel S.B. 2004. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect. Immun.* 72:6676-6679.
- Hu Y., Lei L., Weijia L. & Xiaoguang C. 2010. Sequence analysis of the groEL gene and its potential application in identification of pathogenic bacteria. *African J. Microbiol. Res.* 4:1733-1741.
- Huleatt J.W., Jacobs A.R., Tang J., Desai P., Kopp E.B., Huang Y., Song L., Naakaar V. & Powell T.J. 2007. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* 25:763-775.
- Juul-Madsen H.R., Viertlboeck B., Smith A.L. & Göbel T.W.F. 2008. Avian innate immune responses, p. 129-158. In: Davison F., Kaspers B. & Schat K.A. (Eds), *Avian Immunology*. Academic Press, London.
- Kaiser P. 2010. Advances in avian immunology-prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.* 39:309-324.
- Karuna P., Yasuyuki N., Timothy D.R., Artem C., Jeffrey K., Caixia S., Colleen C.N. & Robert C.B. 2003. Molecular Analysis of the Multiple GroEL Proteins of *Chlamydiae*. *J. Bacteriol.* 185:1958-1966.
- Lim Y.H., Hirose K., Izumiya H., Arakawa E., Takahashi H., Terajima J., Itoh K., Tamura K., Kim S.I. & Watanabe H. 2003. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Japan. J. Infect. Dis.* 56:151-155.
- Mazur C., Reis J.K.P., Leite R.C., Danelli M.G.M., Hagiwara M.K., de Góes A.C.M.A. & Medeiros M.A. 2010. Evaluation of a recombinant p24 antigen for the detection of feline immunodeficiency virus-specific antibodies. *Pesq. Vet. Bras.* 30:877-880.
- Means T.K., Golenbock D.T. & Fenton M.J. 2000. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sciences* 68:241-258.
- Metcalf H.J., Best A., Kanellos T., La Ragione R.M. & Werling D. 2010. Flagellin expression enhances *Salmonella* accumulation in TLR5-positive macrophages. *Develop. Comp. Immunol.* 34:797-804.
- Miyaji E.N., Carvalho E., Oliveira M.L.S., Raw I. & Ho P.L. 2011. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44:500-513.
- Moser M. & Leo O. 2010. Key concepts in immunology. *Vaccine* 28:2-13.
- Nair S., Lin T.K., Pang T. & Altwegg M. 2002. Characterization of *Salmonella* serovars by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40:2346-2351.
- Nair V. 2005. Evolution of Marek's disease: a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet. Journal* 170:175-183.
- NCBI 2012. National Center for Biotechnology Information. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em 10 dez. 2012.
- Noessner E., Gastpar R., Milani V., Brandl A., Hutzler P.J., Kuppner M.C., Roos M., Kremmer E., Asea A., Calderwood S.K. & Issels R.D. 2002. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J. Immunol.* 169:5424-5432.
- Paliwal P.K., Bansal A., Sagi S.S., Mustoori S. & Govindaswamy I. 2008. Cloning, expression and characterization of heat shock protein 60 (groEL) of *Salmonella enterica* serovar Typhi and its role in protective immunity against lethal *Salmonella* infection in mice. *Clin. Immunol.* 126:89-96.
- Paliwal P.K., Bansal A., Sagi S.S. & Sairam M. 2011. Intraperitoneal immunization of recombinant HSP70 (DnaK) of *Salmonella* Typhi induces a predominant Th2 response and protective immunity in mice against lethal *Salmonella* infection. *Vaccine* 29:6532-6539.
- Pino O., Martin M. & Michalek S.M. 2005. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infect. Immun.* 73:6763-6770.
- Pockley A.G. 2001. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Rev. Mol. Med.* 23:1-21.
- Putten J.P.M. van, Bouwman L.I. & De Zoete M.R. 2010. Unraveling bacterial interactions with Toll-like receptors. *Immunol. Lett.* 128:8-11.
- Rainczak K., Bajzert J., Galli J., Selera A., Wieliczko A., Borkowski J. & Stefaniak T. 2011. Optimization of *Salmonella* Enteritidis recombinant heat shock protein 60 production. *Pol. J. Vet. Sci.* 14:145-146.
- Ramos H.C., Rumbo M. & Sirard J.C. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 12:507-517.
- Rebecca S., Wong Y. & Chow A.W. 2002. Identification of enteric Pathogens by heat shock protein 60kDa (GroEL) gene sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 107-111.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104-108.
- Seron T.J., Hill J. & Linser P.J. 2004. A GPI-linked carbonic anhydrase expressed in the larval mosquito midgut. *J. Exp. Biol.* 207:4559-4572.
- Skountzou I., Martin Mdel P., Wang B., Ye L., Koutsonanos D., Weldon W., Jacob J. & Compans R.W. 2010. *Salmonella* flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 28:4103-4112.
- Somersan S., Larsson M., Fonteneau J.F., Basu S., Srivastava P. & Bhardwaj N. 2001. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 167:4844-4852.
- Stewart G.R. & Young D.B. 2004. Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 16:506-510.
- Takeuchi O. & Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
- Tapping R.I. 2009. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors. *Sem. Immunol.* 21:175-184.
- Tobian A.A., Canaday D.H., Boom W.H. & Harding C.V. 2004. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J. Immunol.* 172:5277-5286.
- Wallin R.P.A., Lundqvist A., Moré S.H., Von Bonin A., Kiessling R. & Ljunggren H.G. 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 23:130-135.
- Zeng H., Carlson A.Q., Guo Y., Yu Y., Collier-Hyams L.S., Madara J.L., Gewirtz A.T. & Neish A.S. 2003. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J. Immunol.* 171:3668-3674.
- Zhi-Hua L., Yang Q. & Nie Y. 2006. Cloning and expression of *Hsp22.4* gene from *Chaetomium globosum*. *J. Forestry Res.* 17:259-262.