



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA



BRUNO DUARTE BERTULOSO

SELEÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A PROTEÍNAS TOTAIS DE
Ralstonia solanacearum **A PARTIR DE UMA BIBLIOTECA**
COMBINATORIAL DE ANTICORPOS APRESENTADOS NA
SUPERFÍCIE DE FAGOS FILAMENTOSOS

ALEGRE/ES
2010

Todos os anticorpos têm uma estrutura central comum de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada e as duas cadeias pesadas são unidas mutuamente por ponte dissulfeto. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas contêm uma série repetitiva de unidades homólogas, que se enovelam independentemente em um motivo globular comum denominado domínio de imunoglobulina. Entretanto quando comparadas entre diferentes imunoglobulinas, as seqüências destas cadeias variam amplamente. Tanto nas cadeias pesadas quanto nas leves, essa variabilidade é mais pronunciada no domínio N-terminal, enquanto as seqüências dos outros domínios permanecem relativamente constantes. Por este motivo o domínio N-terminal numa cadeia polipeptídica pesada ou leve é denominado região variável (Fv), abreviada para VH e VL, respectivamente. O Fv apresenta uma estrutura constituída de folhas β pregueadas intercaladas por uma volta (*loop*). Seis destas voltas participam com quase a totalidade dos pontos de contato com o antígeno. Os outros domínios são denominados de região constante (CH e CL), sendo as regiões CH da cadeia pesada constituídos de 3 ou mais domínios denominados CH1, CH2, etc. (FERREIRA; TEIXEIRA, 2005).

Dentro de uma imunoglobulina, as cadeias pesadas e leves são paralelas e este par de domínios forma um sítio de ligação de antígenos. A especificidade antigênica de determinada proteína é condicionada pelas seqüências combinadas de seus domínios VH e VL e por este motivo varia amplamente entre as imunoglobulinas. A molécula de anticorpo pode ser subdividida em porções Fc e Fab, onde Fc é constituída dos domínios constantes e Fab constituída dos domínios VH-CH1 e VL-CL, responsáveis pela ligação com os antígenos e, portanto denominado sítio combinatorial para o antígeno (CALICH; VAZ, 2001). As três áreas altamente divergentes dentro das regiões V são chamadas também de regiões hipervariáveis e são mantidas no local por regiões estruturais, mais conservadas. Em uma imunoglobulina, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada ocupam conjuntamente um espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação para o antígeno. Como estas seqüências formam uma superfície complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, as regiões hipervariáveis são também chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) (FERREIRA; TEIXEIRA, 2005).

1.4. Fagos filamentosos

Os fagos filamentosos possuem como material genético DNA fita simples. A infecção viral ocorre via pilus sexual de células bacterianas Gram-negativas que apresentam o gene para a fimbria codificada pelo Plasmídeo F'. As partículas virais são liberadas por extrusão do DNA reunido às proteínas estruturais formadoras da partícula viral através da membrana, sem lisar a célula ou impedir sua divisão (SMITH; SCOTT, 1993), possibilitando a separação de partícula virais do conteúdo intracelular, eliminando reações cruzadas com proteínas celulares. A figura 2 mostra a organização estrutural de uma partícula viral do bacteriófago M13, o capsídeo do fago é composto por cinco tipos diferentes de proteínas (PIII, PVI, PVII, PVIII, PIX). A PVIII é a principal componente da partícula viral com aproximadamente 3700 cópias por fago, formando o corpo cilíndrico do vírus. A proteína PIII está presente em cinco cópias e tem papel fundamental na reprodução viral, pois é ela a responsável pela ligação do fago ao pilus sexual da célula bacteriana. Tanto a proteína PIII quanto a PVIII são utilizadas para a apresentação dos fragmentos de anticorpos recombinantes fusionadas.

SMITH (1985) demonstrou a possibilidade de inserção de genes entre os domínios da PIII sem interferir na sua função, ou seja, na infectividade do vírus. As imunoglobulinas são amplamente utilizadas como proteínas de fusão a fagos filamentosos, mas a utilização da molécula inteira é praticamente impossível pelo tamanho de seu arcabouço. Moléculas menores como scFv ou Fab são perfeitamente aceitas como proteínas de fusão a fagos filamentosos.

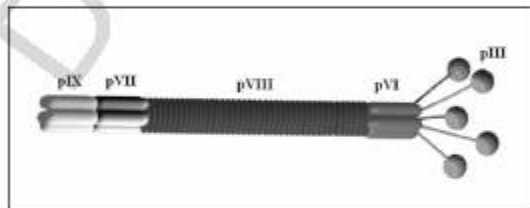


Figura 2: Representação esquemática de um bacteriófago filamentoso com suas proteínas constituintes (Fonte: www.abdseroec.com/uploads/hual-fig2.gif)

1.5. Vetores para expressão de Fab

A utilização de vetores (fagomídeos) é uma alternativa prática ao uso e manipulação do DNA viral para expressão de anticorpos recombinantes. Fagomídeos basicamente são plasmídeos que possuem além da origem de replicação de bactérias (*E. coli*), a origem de replicação viral, o gene de fusão (*PIII* ou *PVIII*), sítio de inserção do fragmento codificante do anticorpo ou qualquer outra proteína de interesse e genes de resistência a antibióticos para seleção em meio apropriado. Como os fagomídeos não possuem todas as proteínas necessárias para o encapsidamento da partícula viral, fagos auxiliares (*helper*) contendo todos os genes dos bacteriófagos filamentosos são utilizados nas culturas de células transformadas com o fagomídeo, permitindo o resgate da partícula viral (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002). Durante a infecção viral o DNA proveniente dos fagomídeos é preferencialmente revestido pelas proteínas estruturais, pois os fagos *helper* possuem mutações na origem de replicação, dificultando sua reprodução e empacotamento de seu próprio material genético (BARBAS et al., 2001).

1.6. Seleção dos anticorpos contra proteínas totais de *R. solanaceum* (*biopanning*)

A seleção de biblioteca de *Phage display* geralmente está associada a uma seleção por afinidade (ou *biopanning*), processo durante o qual a população de fagos é exposta a molécula-alvo com o objetivo de se capturar fagos ligados (HOOGEMBOOM, 1998). Por meio de sucessivas rodadas de ligação, lavagem, eluição e amplificação, a população de fagos, originalmente muito diversa, torna-se enriquecida em fagos com maior chance de ligação à molécula alvo, como observado na figura 3 (MAGDESIAN, 2008). Com o genótipo de cada proteína contida no respectivo fago, basta isolar o fago de interesse e decodificar sua sequência genômica.

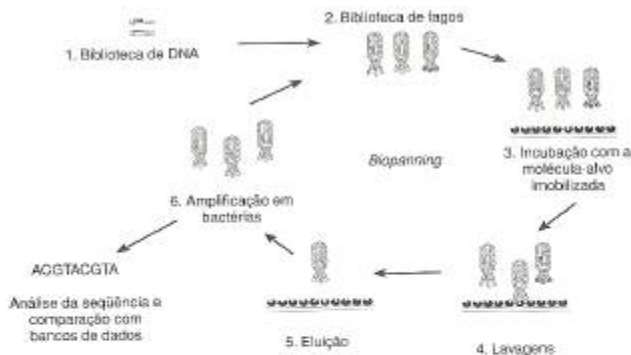


Figura 3 Etapas do processo de seleção de ligantes por varredura de biblioteca de *Phage display*. DNA = ácido desoxirribonucléico (MAGDESIAN, 2008)

2. JUSTIFICATIVA

A expansão da área plantada principalmente para regiões quentes e úmidas aliadas a ciclos sucessivos de cultura e a falta de programas de melhoramento genético, têm favorecido o aparecimento de várias doenças em viveiros e campo (ALFENAS; MAFIA, 2003). A murcha bacteriana causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (SMITH, 1896; YABUUCHI *et al.*, 1995) é considerada uma das principais doenças em diferentes cultivares, devido a danos causados a planta, sua característica sistêmica durante a infecção e o vasto número de hospedeiro. Pela sua característica cosmopolita não se tem hoje um controle efetivo da doença (ALFENAS *et al.*, 2004). Neste sentido, uma alternativa, seria o "controle imunológico", com a expressão, em células vegetais, de fragmentos de anticorpos monoclonais recombinantes específicos às proteínas bacterianas. Uma grande variabilidade de anticorpos podem ser gerados e selecionados contra vários alvos protéicos da bactéria aumentando a chance de controle. Considerando que o genoma completo do patógeno já foi sequenciado (DENNY, 2000), um estudo molecular, com auxílio de técnicas de bioinformática, poderá possibilitar a caracterização antígenos alvos no combate à murcha bacteriana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais:

Selecionar anticorpos recombinantes reativos a bactéria *Ralstonia solanacearum*, patógeno da murcha bacteriana, a partir de uma biblioteca combinatorial de anticorpos (Fab) apresentados na superfície de fagos filamentosos.

3.2. Objetivos específicos:

1. Selecionar fragmentos de anticorpos (Fab) específicos à proteínas totais de *Ralstonia solanacearum*.
2. Caracterizar os clones selecionados quanto à capacidade de ligação aos antígenos presentes na bactéria *Ralstonia solanacearum*.
3. Avaliar por sequenciamento e bioinformática os clones selecionados.

4. METODOLOGIA

4.1. Local de Realização.

O experimento foi executado no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia/MG, sob a supervisão do professor Luiz Ricardo Goulart.

4.2. Linhagem bacteriana

A linhagem de *Escherichia coli* utilizada durante a realização deste trabalho para produção de partículas virais, transformação e amplificação de Fagomídeos foi: XL1-Blue *supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, relA1 lac, [F' ProAB lac^R lacIqZΔM15, Tn10(tet^r)*].

4.3. Vetor

O vetor utilizado foi o pComb3X que possui a seqüência codificadora para parte da proteína PIII de bacteriófagos filamentosos. Este vetor apresenta um códon de parada âmbar, não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras como a XL1-Blue ou ER2537, mas reconhecido por cepas de bactérias não supressoras como a TOP 10F['] permitindo assim tanto a expressão de proteínas fusionadas à proteína PIII do fago, quanto proteínas de fusão livre da proteína PIII. Possui uma região com seis histidinas, logo após o sítio de clonagem do gene, para purificação em coluna de níquel e uma região codificadora de resíduos que constituem o epítipo de uma hemaglutinina (HA) que possibilita sua detecção utilizando um anticorpo anti-HA (SCOTT; BARBAS, 2000) (Figura 4)



Figura 4: Mapa do cassete de expressão do plasmídeo pComb3x após a clonagem do Fab. O vetor possui internamente após o gene do anticorpo, região com seis histidinas (H6) para purificação em coluna de níquel ou para a detecção com Ab monoclonal anti-His Tag e uma região contendo resíduos de hemaglobina (HA) que possibilitam a detecção do Fab com a utilização de um anticorpo anti-hemaglutinina e o códon âmbar (TAG) que permite a produção do anticorpo livre da proteína III do bacteriófago, na forma solúvel em algumas linhagem bacterianas não supressoras

4.4 Seleção de partículas virais (Fab) ligantes a proteínas totais de *R. solanacearum* em solução

Foi utilizada uma biblioteca de anticorpos Fab, doada pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU), expressa em bacteriófago filamentosos, construída a partir do repertório de imunoglobulinas humanas. Esta biblioteca possui uma alta variabilidade e permite sua utilização para reconhecimento de outros antígenos e conseqüentemente a possibilidade de reconhecimento de antígenos totais de *R. solanacearum*. Sua complexidade inicial foi determinada em torno de 10^8 unidades formadoras de colônia (ufc/mL), construída a partir da amplificação de fragmentos gênicos das cadeias leve (VLCL) e pesada (VHCH1) de anticorpos humanos

MAGNESIAN, M. H.; ULRICH, H. U.; NERY, A.A.; MARTINS, A. H. B.; JULIANO, M.A; JULIANO, L.; FERREIRA, S. T. peptide blocks of the inhibition of neural nicotinic acetylcholine receptors by Abeta. **J. boil. Chem.**, v.280,n35, p 31085-31090, 2005.

MARANHÃO, A. Q. Utilização de bibliotecas apresentadas em fagos para seleção de anticorpos ligantes a ácidos nucleicos. **Tese de Doutorado**. UnB, Brasília DF, p. 167, 2001

MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWARD, A. C. Bacterial wilt of Groundnut. Patancheru: Internacional CropsResearch Institute for the Semi-Arid Tropics, 1994, 28p. (Information Bulletin, 35)

OLEA-POPELKA, F.C., MCLEAN, M., HORSMAN, J., D., ALMQUIST, K., RANDLE, J. CHRISTOPHER HALL, J. Increasing Expression of an Anti-Picloram Single-Chain Variable Fragment (ScFv) Antibody and Resistance to Picloram in Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum*). **J Agric. Food Chem.** 53. 6683-6690. 2005.

ORECCHIA, M., NO`LKE, G., SALDARELLI, P., DELL'ORCO, M., UHDE-HOLZEM, K., SACK, M., MARTELLI, G., FISCHER, R., SCHILLBERG S. Generation and characterization of a recombinant antibody fragment that binds to the coat protein of grapevine leafroll-associated virus 3. **Arch Virol.** 2008.

RAPOPORT, B., PORTOLONO, S., McLachlan, S.M. Combinatorial libraries: new insights into human organ specific autoantibodies. **Immunology today**, v. 16, p. 43-49, 1995.

ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to surfaces plant. Annual **Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 225-243, 1992.

SAILE, E.; McGARVEY, J. A.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1264-1271, 1997.

SALDARELLI, P., KELLER, H., DELL'ORCO, M., SCHOTS, A., ELICIO, V., MINAFRA, A. Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B. **J. Virol. Methods.** 124(1-2): 191-195. 2005.

SANTOS F. A. A.; SOUZA G. R. L.; ALMEIDA J. F.; PRUDENCIO C. R.; ORTEGA J.M.; SILVA A. B.; GOULART L. R. Sequenciamento de ESTs (Expressed Sequence Tags) do *Schistosoma mansoni* – Projeto Genoma Mineiro FAPEMIG-CNPq. **Horizonte Científico**, v.1, p.1-23. 2006.