

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Katharyne Chinaia

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE**  
**LIPOPROTEÍNAS DA SUPERFÍCIE DE *STREPTOCOCCUS***  
***PNEUMONIAE***

Santo André, SP

2023

KATHARYNE CHINAIA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS DA SUPERFÍCIE  
DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) da  
Universidade Federal do ABC como requisito para  
obtenção do grau de bacharel em Biotecnologia

**Orientadora:** Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira

**Supervisora:** Dra. Ana Paula de Mattos Arêas Dau

Santo André, SP

2023

## RESUMO

As infecções do trato respiratório inferior causam mortes no mundo inteiro, sendo o *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) o agente etiológico mais significativo, responsável pela morte anual de cerca de 400.000 crianças menores de 5 anos. As vacinas conjugadas conferem proteção limitada aos sorotipos presentes nas formulações. Nosso grupo de pesquisa tem estudado vacinas compostas por antígenos proteicos que possam conferir proteção independente de sorotipos. As vesículas extracelulares (EVs) são originárias da membrana bacteriana, apresentam tamanhos equivalentes a nanopartículas e carregam lipoproteínas e proteínas de superfície que são importantes na virulência da bactéria, características que sugerem o seu potencial como antígeno vacinal. A imunização de camundongos com EVs produzidas a partir linhagem de pneumococo R6 (não encapsulada) foi capaz de proteger contra infecção invasiva por pneumococo dos sorotipos 3 e 1 e contra a colonização nasal pelo sorotipo 6B. Os soros dos animais imunizados com EVs apresentaram reatividade com duas bandas de aproximadamente 50kDa e 38kDa, em ensaios de western-blot. Dados de espectrometria de massa das EVs, e dados de outros grupos de pesquisa sugerem que se tratam de duas lipoproteínas, MalX e PrsA. Assim, o presente projeto teve como objetivo clonar, expressar e purificar estas duas proteínas para a produção de anticorpos e a caracterização das EVs. As sequências dos genes foram amplificadas por PCR utilizando DNA da linhagem de pneumococo D39 como molde, foram confirmadas por sequenciamento de DNA e os fragmentos foram clonados no vetor de expressão em *E. coli* pAE. Após a expressão em *E. coli* BL-21 (DE3) Star-pLysS, as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade a níquel e as frações de interesse foram analisadas em SDS-PAGE e dialisadas. Camundongos BALB/c foram imunizados por via intraperitoneal com as proteínas recombinantes combinadas a hidróxido de alumínio como adjuvante. Os soros foram coletados e analisados por ELISA e Western-blot. Ensaios com os soros dos animais imunizados foram realizados para avaliar a ligação dos anticorpos à superfície de pneumococo. Os resultados obtidos têm contribuído para a caracterização das EVs estudadas em nosso laboratório. As proteínas MalX e PrsA estão sendo testadas atualmente como candidatas para composição de uma formulação vacinal em camundongos.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*; Vesículas Extracelulares; Proteínas recombinantes; Vacinas.

## ABSTRACT

Lower respiratory tract infections cause deaths worldwide, with *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) being the most significant etiological agent, responsible for the annual deaths of about 400,000 children under 5 years of age. Conjugate vaccines offer limited protection to the serotypes present in the formulations. Our research group has been studying vaccines composed of protein antigens that may confer protection independent of serotypes. Extracellular vesicles (EVs) originate from the bacterial membrane, are equivalent in size to nanoparticles and carry lipoproteins and surface proteins that are important in the virulence of the bacteria, characteristics that suggest their potential as a vaccine antigen. Immunization of mice with EVs produced from the pneumococcal strain R6 (non-encapsulated) protected the animals against invasive infection by pneumococcal serotypes 3 and 1 and against nasal colonization by serotype 6B. Sera from animals immunized with EVs showed reactivity with two bands of approximately 50kDa and 38kDa in western-blot assays. Mass spectrometry data on EVs, and data from other research groups, suggest that they are two lipoproteins, MalX and PrsA. Thus, the present project aimed to clone, express and purify these two proteins for the production of antibodies and the characterization of EVs. Both genes were amplified by PCR using genomic DNA from the pneumococcal strain D39 as a template. The identity of the PCR fragments was confirmed by DNA sequencing and the fragments were cloned into the *E. coli* pAE expression vector. After expression in *E. coli* BL-21 (DE3) Star-pLysS, the proteins were purified by nickel affinity chromatography and the fractions of interest were analyzed on SDS-PAGE and dialyzed. BALB/c mice were immunized intraperitoneally with the recombinant proteins combined with aluminum hydroxide as an adjuvant. Sera were collected and analyzed by ELISA and Western-blot. Assays with sera from immunized animals were carried out to evaluate the binding of antibodies to the pneumococcal surface. The results obtained have contributed to the characterization of the EVs studied in our laboratory. The MalX and PrsA proteins are currently being tested as candidates for the composition of a vaccine in mice.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*; Extracellular Vesicles; Recombinant proteins; Vaccines.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Número de mortes causadas por pneumococo em 2019, no mundo todo, por faixa etária e por gênero	11
<b>Figura 2.</b> Análises em gel de agarose 1% de fragmentos de DNA purificados após PCR	25
<b>Figura 3.</b> Análise de restrição do vetor pGEM-T- <i>malX</i>	26
<b>Figura 4.</b> Análise de restrição do vetor pGEM-T- <i>malX</i> SP	26
<b>Figura 5A.</b> Análise de restrição do vetor pGEM-T- <i>prsA</i>	27
<b>Figura 5B.</b> Análise de restrição do vetor pGEM-T- <i>prsA</i> SP	27
<b>Figura 6.</b> Análise de restrição dos vetores pGEM-T- <i>malX</i> , pGEM-T- <i>malX</i> SP, pGEM-T- <i>prsA</i> e pGEM-T- <i>prsA</i> SP	28
<b>Figura 7.</b> Análise de restrição do vetor pAE	29
<b>Figura 8A.</b> Análise de restrição do vetor pAE- <i>malX</i>	29
<b>Figura 8B.</b> Análise de restrição do vetor pAE- <i>malX</i> SP	30
<b>Figura 8C.</b> Análise de restrição do vetor pAE- <i>prsA</i>	30
<b>Figura 8D.</b> Análise de restrição do vetor pAE- <i>prsA</i> SP	30
<b>Figura 9.</b> Análise de expressão de MalX (A) e PrsA (B) por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%	31
<b>Figura 10A.</b> Análise da purificação da proteína recombinante MalX por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% (segundo pico de eluição)	32
<b>Figura 10B.</b> Análise da purificação da proteína recombinante MalX por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% (primeiro pico da eluição)	32
<b>Figura 11.</b> Análise da purificação da proteína recombinante PrsA por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%.	33
<b>Figura 12.</b> Análise de reconhecimento da cauda de histidina presente nas proteínas recombinantes por western-blot.	33
<b>Figura 13.</b> Indução de IgG anti-MalX1 em camundongos BALB/c	34
<b>Figura 14.</b> Indução de IgG anti-MalX2 em camundongos BALB/c	34
<b>Figura 15.</b> Indução de IgG anti-PrsA em camundongos BALB/c	35
<b>Figura 16.</b> Reconhecimento das proteínas MalX1 e MalX2 pelo soro anti-MalX1.	35

<b>Figura 17.</b> Reconhecimento das proteínas MalX1 e MalX2 pelo soro anti-MalX2	<b>36</b>
<b>Figura 18.</b> Análise de reconhecimento da proteína recombinante MalX pelos soros dos animais imunizados	<b>36</b>
<b>Figura 19.</b> Análise de reconhecimento da proteína recombinante PrsA pelos soros dos animais imunizados	<b>37</b>
<b>Figura 20.</b> Análise da presença de MalX em diferentes linhagens de pneumococo	<b>38</b>
<b>Figura 21.</b> Análise da presença de PrsA em diferentes linhagens de pneumococo	<b>38</b>
<b>Figura 22.</b> Análise da ligação de anticorpos à superfície de pneumococo por citometria de fluxo	<b>39</b>
<b>Figura 23.</b> Análise da ligação de anticorpos à superfície de pneumococo por citometria de fluxo	<b>40</b>
<b>Figura 24.</b> Análise de reconhecimento das proteínas recombinantes, MalX e PrsA, pelos soros dos animais imunizados com EVs de pneumococo.	<b>41</b>
<b>Figura 25.</b> Indução de IgG anti-MalX e anti-PrsA em camundongos BALB/c imunizados com EV WT e EV PspAKO	<b>42</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sorotipos contidos nas vacinas pneumocócicas conjugadas	<b>13</b>
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR dos genes <i>malX</i> e <i>prsA</i>	<b>17</b>
<b>Tabela 3.</b> Programa de ciclos de PCR para amplificação dos genes <i>malX</i> e <i>malX</i> SP	<b>17</b>
<b>Tabela 4.</b> Programa de ciclos de PCR para amplificação do gene <i>prsA</i>	<b>18</b>
<b>Tabela 5.</b> Programa de ciclos de PCR para amplificação do gene <i>prsA</i> SP	<b>18</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovino
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>D.O.</b>	Densidade Óptica
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>EVs</b>	Vesículas Extracelulares
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>g</b>	Força centrífuga relativa
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-galactosídeo
<b>kB</b>	Quilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Meio de cultivo Luria-Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MalX</b>	Maltooligosaccharide ABC transporter solute-binding lipoprotein
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>m/v</b>	Massa por volume
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanômetro
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrômetro
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>OPD</b>	Orto-fenilenodiamina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão Salina-Fosfato
<b>PBS-T</b>	Tampão Salina-Fosfato contendo tween 20
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>MM</b>	Marcador de Massa Molecular
<b>PspA</b>	Proteína A de superfície pneumocócica



<b>PspC</b>	Proteína C de superfície pneumocócica
<b>PrsA</b>	Foldase protein PrsA
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SPF</b>	Livres de agentes patogênicos específicos
<b>THY</b>	Meio de cultivo Todd Hewitt com adição de extrato de levedura
<b>v/v</b>	Volume por volume

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>10</b>
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
1.2. Epidemiologia	11
1.3. Vacinas	12
1.4. Vesículas Extracelulares de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
<b>2. Objetivos</b>	<b>15</b>
2.1. Objetivos gerais	15
2.2. Objetivos específicos	15
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>16</b>
3.1. Linhagens bacterianas	16
3.2. Amplificação das sequências de <i>malX</i> e <i>prsA</i> por PCR	16
3.3. Transformação de <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ e obtenção de DNA plasmidial	18
3.4. Construção de vetores pGEM-T- <i>malX</i> e pGEM-T- <i>prsA</i>	19
3.5. Construção de vetores pAE- <i>malX</i> e pAE- <i>prsA</i>	19
3.6. Expressão e purificação das proteínas recombinantes MalX e PrsA	20
3.7. Imunização dos animais	22
3.7.1. Produção de soro policlonal anti-MalX e anti-PrsA	22
3.8. Análise da resposta imune	22
3.8.1. Determinação do título de anticorpos anti-MalX ou anti-PrsA e da presença de anticorpos contra esta proteínas em soros de camundongos imunizados com EVs por ELISA	22
3.8.2. Western-blot	23
3.9. Análise da ligação de anticorpos à superfície de <i>S. pneumoniae</i>	24
3.10. Análises estatísticas	24
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>25</b>
4.1. Amplificação dos genes <i>malX</i> e <i>prsA</i> por PCR	25
4.2. Construção dos vetores recombinantes pGEM-T- <i>malX</i> e pGEM-T- <i>prsA</i>	25
4.3. Construção dos vetores recombinantes pAE- <i>malX</i> e pAE- <i>prsA</i>	28
4.4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes MalX e PrsA	31
4.5. Análise da resposta imune	34
4.5.1. Produção dos soros policlonais contra MalX e PrsA	34
4.6. Avaliação da presença dos antígenos MalX e PrsA em diferentes linhagens de pneumococo	37
4.7. Análise da ligação de anticorpos à superfície de <i>S. pneumoniae</i>	39
4.8. Avaliação da reatividade de soros de camundongos imunizados com EVs de pneumococo contra as proteínas MalX e PrsA	40
<b>5. Conclusões</b>	<b>43</b>
<b>6. Referências</b>	<b>44</b>
<b>7. Anexos</b>	<b>47</b>

## 1. Introdução

### 1.1. *Streptococcus pneumoniae*

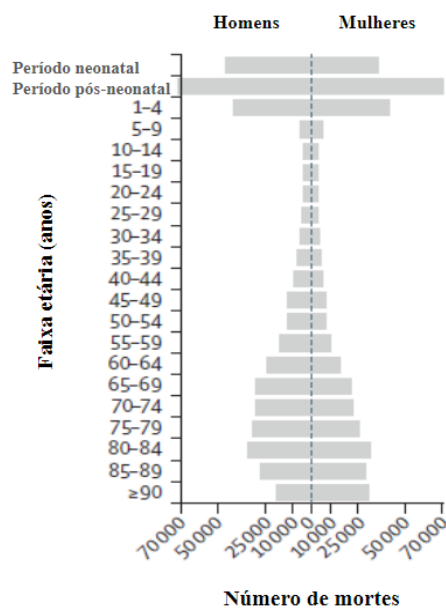
*Streptococcus pneumoniae*, também conhecido como pneumococo, é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e geralmente encontrada como diplococos. O pneumococo é capaz de colonizar a nasofaringe de indivíduos saudáveis, podendo ser assintomático, sendo transmitido para novos hospedeiros por aerossol, contato direto com secreções do trato respiratório de indivíduos infectados e por contato com objetos contaminados por biofilmes [1,2]. A colonização atinge todas as faixas etárias, mas é mais frequente em crianças, podendo inclusive haver colonização simultânea por mais de um sorotipo [3,4]. Ocasionalmente, em situações de baixa imunidade ou de inflamações prévias como infecções por influenza, o pneumococo pode invadir sítios normalmente estéreis, causando doenças como pneumonia, septicemia e meningite [5].

A patogenicidade do pneumococo é atribuída a diversos fatores de virulência que atuam no sistema imune do hospedeiro afetando seus mecanismos de defesa, tais como toxinas, como a pneumolisina, capaz de formar poros na membrana de células do hospedeiro, causando lise celular, além de proteínas de superfície, como PspA (Proteína A da superfície de pneumococo) que ao impedir a fixação de complemento age impedindo a opsonização e a fagocitose, e PspC (Proteína C da Superfície de pneumococo), que contribui para a colonização da bactéria ao se ligar ao receptor de imunoglobulina e ao Fator H do hospedeiro e evita a opsonização ao prevenir a formação de C3b [2]. Entretanto, o principal fator de virulência é a cápsula polissacarídica, que facilita o escape do sistema imune, inibindo a fagocitose da bactéria. A cápsula polissacarídica é a camada mais externa do pneumococo e pode representar cerca de metade do volume da célula bacteriana. Essa estrutura pode ter até 400 nm de espessura e é composta por sequências de 2 a 8 resíduos de sacarídeos em unidades repetidas e outras moléculas como piruvato, fosfocolina e glicerol [6,7]. A maioria apresenta carga negativa, devido à presença de ácidos urônicos, piruvato ou fosfato, enquanto outras não são carregadas ou são zwitteriônicas. É possível que a carga aniônica da cápsula seja capaz de repelir o muco, prejudicando o transporte mucociliar, e por repulsão eletrostática de repelir os fagócitos, levando a redução da fagocitose. As propriedades antigênicas e características da estrutura química das cápsulas, como a ordem e ligação entre os resíduos de sacarídeos, definem o sorotipo de cada linhagem pneumocócica, de tal forma que, linhagens com composição capsular semelhante podem se diferenciar por diferenças nas ligações entre resíduos. Para ilustrar, os sorotipos 19A e 19F apresentam a mesma unidade de

repetição, porém, os monômeros são polimerizados de maneira distinta [6,8]. Assim, a variação na composição da cápsula caracteriza cerca de 100 sorotipos já descritos, apresentando níveis diferentes de patogenicidade, padrões de reconhecimento pelo sistema imune e resistência à antibióticos [1].

## 1.2. Epidemiologia

O pneumococo é um importante agente etiológico de infecções no trato respiratório inferior no mundo todo, sua capacidade de infectar está relacionada ao estado de desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro e dessa forma, as doenças pneumocócicas são mais prevalentes em crianças, idosos e imunodeprimidos. Idosos apresentam uma diminuição na eficiência do sistema imunológico, enquanto que crianças abaixo de 5 anos exibem um sistema imune imaturo, ainda em desenvolvimento, e por isso são considerados grupos de risco [2]. Dados de 2019 apontam que *S. pneumoniae* foi responsável por causar aproximadamente 829.000 mortes contando com todas as faixas etárias no mundo todo, sendo que 225.000 mortes foram de crianças menores de 4 anos. Além disso, o pneumococo foi a principal causa de mortes por infecções no trato respiratório inferior ao redor do mundo, com cerca de 653.000 mortes. A Figura 1 mostra a distribuição global de mortes causadas por *S. pneumoniae* por faixa etária e por gênero em 2019, sendo possível observar que crianças até 4 anos e idosos apresentaram maior número de mortes em relação aos outros grupos etários analisados [9].



**Figura 1.** Número de mortes causadas por pneumococo em 2019, no mundo todo, por faixa etária e por gênero (Adaptado de IKUTA *et al.*, 2022)

### 1.3. Vacinas

As vacinas conjugadas polissacarídeo-proteína (PCV10 (GSK) e PCV13 (Wyeth/Pfizer)) são atualmente as principais ferramentas no combate às doenças pneumocócicas. Estas vacinas são aplicadas em crianças de diferentes países, sendo eficazes contra a colonização e doença invasiva pelos sorotipos contidos na formulação [10,11]. A proteção se dá pela indução de anticorpos contra os polissacarídeos capsulares, capazes de opsonizar as bactérias, direcionando-as para a fagocitose [12]. Entretanto, mais de 100 sorotipos de pneumococo, com variações na composição antigênica das cápsulas, foram descritos até o momento [13] apresentando pouca ou nenhuma reatividade cruzada entre eles. Há, portanto, uma limitação na eficácia das vacinas PCV10 e PCV13 que pode ser maior ou menor, dependendo da prevalência dos sorotipos nos diferentes países. Em adição a isso, após a introdução das vacinas conjugadas em diferentes populações, foi observado um aumento de doenças invasivas por sorotipos não incluídos nas formulações vacinais, o que pode levar à diminuição da eficácia após um período de uso [14]. Desde março de 2010, a vacina PCV10 foi incluída no Programa Nacional de Imunizações (PNI). A administração para as crianças de até 5 anos de idade é composta por 3 doses, aos 2, 4 e 6 meses de idade. Estudos de vigilância epidemiológica têm sido realizados para acompanhar a eficácia desta vacina e a possível substituição dos sorotipos prevalentes [15-17].

Dados publicados pelo SIREVA (Sistema Regional de Vacunas) mostraram uma redução de 45% no isolamento de pneumococo em doenças invasivas em crianças, entre os anos de 2006 e 2017, em países da América latina e Caribe que introduziram as vacinas conjugadas. Essa redução está relacionada à diminuição dos sorotipos vacinais. Por outro lado, os países da região, incluindo o Brasil, apresentaram um aumento no isolamento de sorotipos não vacinais. Nos países que adotaram a PCV10, como o Brasil, os principais aumentos foram relacionados aos sorotipos 3 e o 19A, entre outros, enquanto que nos países que adotaram a PCV13, o sorotipo 3 aparece como de grande importância, além de outros [18]. É importante ressaltar que o sorotipo 3 está contido na vacina PCV13, mas diversos estudos mostraram o escape deste sorotipo à imunidade induzida pela vacinação [19-21]. Além disso, o estudo do SIREVA observou um aumento na diversidade de sorotipos isolados de doenças invasivas nos anos mais recentes, o que pode ser preocupante para a propostas de novas vacinas compostas por polissacarídeo [18]. Em 2018, Brandileone e colaboradores analisaram casos de doenças invasivas causadas por pneumococo em indivíduos de diversas faixas etárias. Os resultados mostraram que as doenças pneumocócicas, incluindo meningite, causadas por sorotipos vacinais apresentaram uma redução ao redor de 50%, após a

introdução da PCV10 no PNI. Por outro lado, foram observados aumentos no número de doenças causadas por sorotipos não-vacinais em crianças, adultos e idosos, sendo os mais prevalentes, os sorotipos 6C, 3, e 19A [22]. Esses estudos mostram que é de extrema importância a continuidade da vigilância epidemiológica para a avaliação do aumento de doenças pelos sorotipos não presentes nas vacinas [10,14]. Recentemente, foram licenciadas nos Estados Unidos e Canadá as vacinas PCV15 (Merck) e PCV20 (Pfizer). A continuidade dos programas de vigilância epidemiológica será importante para a avaliação da ocorrência de substituição de sorotipos para estas vacinas. A Tabela 1 apresenta os sorotipos contidos nas formulações das vacinas pneumocócicas conjugadas disponíveis atualmente.

**Tabela 1.** Sorotipos contidos nas vacinas pneumocócicas conjugadas [11].

<b>Vacina</b>	<b>Sorotipos</b>
PCV10	1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F
PCV13	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F
PCV15	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F
PCV20	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15 B/C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F

Os carboidratos, como os polissacarídeos capsulares, apresentam imunogenicidade limitada já que não são reconhecidos pelas células T do sistema imune, ou seja, geram uma resposta independente de células T, que é caracterizada pela baixa capacidade de gerar resposta de memória. No entanto, a conjugação dessas moléculas com proteínas, como no caso das vacinas conjugadas, passa a conferir a estes antígenos resposta dependentes de células T, com ativação de resposta de memória [23]. Ainda assim, uma vez que as vacinas atuais não cobrem todos os sorotipos, diferentes grupos têm estudado formulações compostas por antígenos proteicos para o desenvolvimento de novas vacinas que confirmem proteção independente de sorotipos e ampla cobertura de isolados.

#### **1.4. Vesículas Extracelulares de pneumococo**

Vesículas extracelulares (EVs) são produzidas ativamente por bactérias Gram-negativas (neste caso, denominadas Outer Membrane Vesicles –OMVs) e Gram-positivas e apresentam funções de adaptação ao meio externo, liberação de fatores

microbianos e escape do sistema imune. A produção de EVs por pneumococos é ainda pouco estudada, mas as suas características biológicas e imunomoduladoras já foram reportadas por alguns grupos. Estas vesículas são formadas a partir da membrana celular e apresentam tamanhos equivalentes a nanopartículas, com morfologias variadas. Na sua composição, são enriquecidas em lipoproteínas e ácidos graxos de cadeia curta [24, 25], mas também carregam fatores de virulência importantes como PspA, PspC e pneumolisina [24, 26]. Estudos *in vitro* mostraram que EVs não são tóxicas para linhagens celulares epiteliais e imunes como macrófagos e células dendríticas de humanos e camundongos. Além disso, são rapidamente internalizadas por células dendríticas, estimulando a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e IL-8, além do aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias como CD86 e MHCII [25-27]. Estas propriedades incentivaram alguns grupos a testar o potencial das EVs de pneumococo como candidatas vacinais. Em 2021, nosso grupo iniciou uma colaboração com a Dra. N. Luísa Hiller, da Carnegie Mellon University em Pittsburg, USA. O objetivo inicial desta colaboração é a avaliação da imunogenicidade e do potencial protetor de EVs produzidas a partir da linhagem de pneumococo não encapsulada R6 (EVs R6 WT) e de sua derivada mutante defectiva para expressão de PspA (EVs R6 PspA KO). As vesículas produzidas no laboratório da Dra. Luísa têm sido enviadas para o nosso laboratório para os ensaios em camundongos para avaliação do seu potencial como antígeno vacinal. Os resultados obtidos até o momento mostram que a imunização com EVs R6 WT, por via subcutânea protege camundongos contra desafios letais com linhagens de pneumococos dos sorotipos 3 e 1, indicando um bom potencial para proteção independente de sorotipos. Ainda, a imunização nasal de camundongos com as EVs R6 PspA KO levou à redução da colonização nasal com pneumococo do sorotipo 6B (dados não publicados).

Uma publicação recente mostrou que vesículas derivadas de pneumococo cultivados em placas, denominadas partículas de membrana (equivalentes a vesículas extracelulares de pneumococo cultivado em meio líquido), são capazes de conferir proteção contra pneumococo, independente de sorotipo, em camundongos. Os autores identificaram as lipoproteínas MalX (Maltose/maltodextrin ABC transporter) e PrsA (também conhecida como PpmA) como importantes para a proteção observada [28]. O gene *malX* codifica uma lipoproteína que tem função no transporte de maltose para metabolismo pela bactéria [29], enquanto que *prsA* codifica uma lipoproteína que atua como cis-trans prolil-isomerase que facilita a secreção de proteínas, atuando como uma foldase. Mutantes de pneumococo defectivos para expressão de MalX apresentaram menor capacidade de colonizar os pulmões de camundongos e a imunização destes animais com a proteína recombinante aumentou o

tempo de sobrevivência após um desafio letal com a bactéria [30]. Da mesma forma, o potencial protetor de PrsA (nomeado no artigo pelos autores como PpmA) foi evidenciado pela redução da virulência de bactérias defectivas para esta proteína em modelo de desafio nasal com pneumococo [31]. As duas proteínas foram identificadas por espectrometria de massa, como componentes das EVs derivadas da linhagem TIGR4 [28]. Em nossos experimentos, os soros dos camundongos imunizados com EVs derivadas da linhagem R6, reagem por Western-blot com duas bandas que coincidem com a massa molecular destas lipoproteínas. Desta forma, propomos neste projeto, a clonagem, expressão e purificação das proteínas MalX e PrsA de pneumococo para avaliação do papel destas proteínas nas EVs da linhagem R6 de pneumococo.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivos gerais

Produzir as lipoproteínas MalX e PrsA de *Streptococcus pneumoniae* para caracterizar a expressão e a imunogenicidade dessas moléculas nas vesículas extracelulares (EVs) derivadas da linhagem R6 de pneumococo, bem como analisar a reatividade dos anticorpos produzidos contra diferentes linhagens de pneumococo e avaliá-los como possíveis candidatos ao desenvolvimento de vacinas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Clonagem dos genes codificadores das proteínas MalX e PrsA;
- Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*;
- Purificação das proteínas recombinantes;
- Produção de soro policlonal anti-MalX e anti-PrsA em camundongos;
- Quantificação de anticorpos anti-MalX e anti-PrsA nos soros dos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes;
- Análise de reatividade do soro de animais imunizados com EVs contra as proteínas recombinantes;
- Análise da reatividade dos soros anti-MalX e anti-PrsA contra diferentes linhagens de pneumococo;
- Análise da ligação dos anti-MalX e anti-PrsA na superfície de pneumococo



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Linhagens bacterianas

A linhagem de pneumococo D39 (sorotipo 2) foi utilizada para amplificação dos genes *malX* e *prsA* por PCR. As linhagens EF3030 (sorotipo 19F), 603 (sorotipo 6B), 6303 (sorotipo 3), 6301 (sorotipo 1), A66.1 (sorotipo 3), R6 (não encapsulada) e Rx1 (não encapsulada) foram utilizadas nos ensaios de Western-blot e de ligação à superfície bacteriana. As bactérias foram descongeladas sempre em placas de ágar sangue e cultivadas a 37°C em meio THY (Todd Hewitt contendo 0,5% de extrato de levedura). Estoques foram mantidos a -80°C em meio THY.

A linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$  competente foi utilizada para as etapas de clonagens e preparação de plasmídeos. As bactérias foram cultivadas em LB (Luria Bertani) - ágar (1.8% ágar), contendo o antibiótico ampicilina (100  $\mu$ g/mL), a 37°C durante a noite. As colônias resistentes foram isoladas e inoculadas em meio LB líquido, contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL), a 37° C sob agitação, com os tubos semi-rosqueados. A linhagem de *E.coli* BL21(DE3) Star PlysS foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes. Os cultivos foram realizados conforme descrito para *E. coli* DH5 $\alpha$ .

#### 3.2. Amplificação das sequências de *malX* e *prsA* por PCR

As sequências de *malX* e *prsA* foram amplificadas por PCR utilizando o DNA genômico da linhagem D39 de *Streptococcus pneumoniae*. Colônias da bactéria foram transferidas para meio THY ajustando para D.O.<sub>600</sub> = 0,1. O cultivo foi mantido em estufa a 37°C até atingir D.O.<sub>600</sub> = 0,4. Logo em seguida, foi feita a centrifugação à 3200 g durante 10 minutos. O pellet obtido foi ressuspensionado em meio THY e transferido para microtubos, sendo novamente centrifugado a 3300 g durante 5 minutos para obtenção do pellet. Para a obtenção do extrato contendo o DNA genômico foi realizada a lise celular, em que o pellet foi ressuspensionado em 100  $\mu$ L de água milliQ estéril e incubado a 94° C durante 2 minutos. Os estoques foram armazenados a -20°C.

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir das sequências dos genes da linhagem R6, disponibilizados no GenBank (NCBI, número de acesso AE007317.1), sendo que para cada gene foi obtida a sequência que codifica as proteínas maduras [*malX* –, spr1918 e *prsA* – spr0884 (Anexo 1)] e as sequências contendo os peptídeos sinal (*malX* SP e *prsA* SP), como mostra a Tabela 2. Foram incluídos sítios de restrição (EcoR I e Xho I) apropriados para

clonagem no vetor de expressão pAE [32], com o objetivo de gerar proteínas de fusão com a cauda de histidina codificada no vetor.

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR dos genes *malX* e *prsA*.

Gene	Sentido	Sequência
<i>malX</i>	Forward	5' <u>CTCGAG</u> GGGAAGCAAACTGCTGATAAGCCT 3'
<i>malX SP</i>	Forward	5' <u>CTCGAG</u> CCTTTTGGTAGCTTGCGGAAGCAAA 3'
<i>malX</i>	Reverse	5' <u>GAATTC</u> TATTACCAAATTTTGTGGTTGAT 3'
<i>prsA</i>	Forward	5' <u>CTCGAG</u> TCGAAAGGGTCAGAAGGAGCAGAC 3'
<i>prsA SP</i>	Forward	5' <u>CTCGAG</u> ATGAAGAAAAATTATTGGCAGGT 3'
<i>prsA</i>	Reverse	5' <u>GAATTC</u> CCTATTCGTTTGATGTACTACTGCT 3'

Os sítios de restrição de EcoRI e XhoI estão sublinhados

As reações de PCR foram realizadas com ciclos diferentes para cada gene, conforme descrito na Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5. Os produtos das reações de PCR foram diluídos em tampão de corrida contendo Ficoll® e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1X [Tris Base, ácido acético glacial, EDTA 0,5M pH 8,0] e brometo de etídio a 0,0016%), contendo o marcador de massa molecular 1kB plus DNA ladder para referência. Após verificação pela exposição em luz UV, os produtos da PCR foram purificados com o QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

**Tabela 3.** Programa de ciclos de PCR para amplificação dos genes *malX* e *malX SP*

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	1 minuto	35
Anelamento	45°C	1 minuto	35
Extensão	68°C	1 minuto e 30 segundos	35
Extensão final	68°C	7 minutos	1

**Tabela 4.** Programa de ciclos de PCR para amplificação do gene *prsA*

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	1 minuto	35
Anelamento	50°C	1 minuto	35
Extensão	68°C	1 minuto e 30 segundos	35
Extensão final	68°C	7 minutos	1

**Tabela 5.** Programa de ciclos de PCR para amplificação do gene *prsA SP*

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	1 minuto	30
Anelamento	48°C	1 minuto	30
Extensão	68°C	1 minuto e 30 segundos	30
Extensão final	68°C	7 minutos	1

### 3.3. Transformação de *E.coli* DH5 $\alpha$ e *E. coli* (DE3) BL 21Star pLysS e obtenção de DNA plasmidial

A linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$  ou *E. coli* (DE3) BL 21 Star pLysS competente foi transformada pelo método de choque térmico. Aliquotas de 50  $\mu$ L de bactérias foram incubadas juntamente com as reações de ligação ou com os vetores construídos durante 20 minutos em gelo, seguido do choque térmico a 42°C por 2 minutos e por fim, a incubação em gelo novamente por 5 minutos. Logo em seguida, foram adicionados 350  $\mu$ L de meio LB líquido e as amostras foram incubadas em estufa a 37°C durante 1 hora. Após esse período, a transformação foi plaqueada em meio LB ágar contendo ampicilina e as placas foram incubadas a 37°C por 18h. Colônias resistentes ao antibiótico foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina e incubadas a 37°C conforme descrito no item 3.1. Para a obtenção de DNA plasmidial as amostras foram preparadas com o kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

### 3.4. Construção de vetores pGEM-T-*malX* e pGEM-T-*prsA*

Os fragmentos de *malX* e *prsA* obtidos por PCR foram ligados ao plasmídeo pGEM-T easy (Promega – Anexo 2), de acordo com as instruções do fabricante, a reação foi incubada à 4°C, por aproximadamente 18h. Em seguida, a reação de ligação foi adicionada à alíquota de 50 µL de bactérias *E. coli* DH5α para transformação, conforme descrito no item 3.3. Para a seleção de colônias contendo o vetor recombinante, foi adicionado 50 µL de X-gal (20 mg/mL) às placas LB-ágar contendo ampicilina, e após a secagem completa, foi feito o plaqueamento da transformação bacteriana. As placas foram incubadas em estufa a 37° C, durante 18 horas. As colônias que apresentavam coloração branca (recombinantes) foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina conforme descrito no item 3.1.

Após a transformação, o DNA plasmidial foi obtido pelo QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). Os DNAs obtidos foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição EcoR I e Xho I e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os plasmídeos que apresentaram fragmentos com os tamanhos esperados foram submetidos ao sequenciamento para verificação das sequências. As sequências de *malX* e *prsA* foram analisadas no programa BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e alinhadas com a sequência dos genes já conhecidas. Após a confirmação das sequências, os vetores recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição EcoR I e Xho I para o isolamento dos fragmentos de interesse e submetidos à eletroforese, com posterior purificação das bandas correspondentes no gel utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), sendo denominados de pGEM-T-*malX* e pGEM-T-*prsA*.

### 3.5. Construção de vetores pAE-*malX* e pAE-*prsA*

Após a confirmação das sequências corretas, conforme descrito no item 3.4, foi realizado o preparo do vetor de expressão pAE (Anexo 3) para a clonagem dos genes de interesse. O vetor pAE vazio, disponibilizado pelo laboratório, foi produzido por miniprep após transformação de bactérias DH5α, conforme descrito no item 3.3, com o intuito de obter estoque. As amostras obtidas de pAE vazio foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente, foram submetidas à digestão por enzimas de restrição com os sítios adequados (EcoR I e Xho I) para acomodar as sequências de interesse. Para verificar se a digestão ocorreu corretamente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. O vetor digerido foi purificado com o kit QIAquick Gel Extraction. Em seguida, foi feito o preparo da reação de ligação dos genes *malX* e *prsA* ao vetor pAE digeridos com

EcoR I e Xho I. A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante, sendo incubada a 4°C durante a noite.

Bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas com as reações de ligação e as colônias resistentes foram selecionadas para cultivo em meio LB líquido, conforme descrito no item 3.3. As amostras foram submetidas ao QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) para a obtenção de DNA plasmidial de pAE-*malX* e pAE-*prsA*. Os DNAs obtidos foram digeridos com as enzimas de restrição para verificar a presença do inserto e analisados em eletroforese em gel de agarose a 1%.

### 3.6. Expressão e purificação das proteínas recombinantes MalX e PrsA

Bactérias *E. coli* BL-21 (DE3) Star pLysS competentes foram transformadas por choque térmico com os vetores de expressão pAE-*malX* e pAE-*prsA*, conforme descrito no item 3.3. A transformação foi plaqueada em meio LB ágar contendo 100 $\mu$ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C, por aproximadamente 18h para a obtenção de colônias resistentes. As colônias resistentes foram selecionadas e inoculadas em meio LB líquido contendo 100 $\mu$ g/mL de ampicilina (LB-amp) e os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação, com os tubos semi-rosqueados, por aproximadamente 18h.

Os cultivos foram diluídos na proporção de 1:30 em 5 mL de meio LB-amp e mantidos em estufa a 37°C sob agitação, até atingir D.O.<sub>600nm</sub>=0,6. Alíquotas foram coletadas e armazenadas para análise das amostras antes da indução de expressão proteica. Em seguida, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 1,2 mM de IPTG ao meio e as amostras foram cultivadas em estufa a 37°C, com agitação, durante 3 horas. Logo após, foram retiradas alíquotas de cada clone para análise da expressão após indução. As amostras não induzidas e induzidas foram centrifugadas a 3300 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em tampão de amostra 1X contendo SDS (diluído a partir do SDS 5X - Tris pH 6,8, SDS, Azul de bromofenol e Glicerol 50% v/v). As bactérias foram lisadas por agitação em vórtex e passagem em seringas de 1 mL. As amostras foram aquecidas a 94°C durante 5 minutos e analisadas em gel poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%. Os géis foram corados com corante Comassie Blue.

Após a análise, um clone positivo para a expressão de cada proteína foi selecionado para produção em maior escala. Nesta etapa, os cultivos foram realizados em 500 mL de meio LB-amp líquido até atingir D.O.<sub>600nm</sub>=0,6 e a expressão foi induzida com IPTG por 3 horas, conforme descrito anteriormente. Em seguida, o cultivo foi centrifugado a 2789 g por

10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 50 mL de tampão de equilíbrio (Tris HCl pH 8,0 50mM, NaCl 150mM, Imidazol 5mM). As amostras foram armazenadas a -20°C.

Para a etapa de purificação, as amostras foram descongeladas e lisadas por pressão em homogeneizador PANDA (GEA Niro Soavi) com 4 ciclos de passagem sob pressão de aproximadamente 1000 bar, para obtenção do extrato proteico. As amostras foram centrifugadas a 10°C, 12857 g durante 30 minutos, em seguida foram filtradas em filtros de 0,45 µm. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade a níquel em colunas His-Trap HP de 5 mL carregadas com Ni<sup>2+</sup> (Cytiva).

Inicialmente, foi feita a lavagem da coluna com água destilada e filtrada para a remoção de conservantes e a coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio contendo 5mM imidazol em volume de 5 vezes o volume da coluna (todas as soluções foram previamente filtradas em sistema de filtração à vácuo). Após esse processo, as amostras foram adicionadas na coluna para a adsorção das proteínas à resina. Em seguida, foi feita a lavagem da coluna com 25 mL de tampão de equilíbrio contendo 20mM imidazol. A eluição das proteínas recombinantes foi feita em equipamento AKTA Prime Plus (GE Healthcare) em gradiente crescente de concentração de imidazol (de 20 a 500mM). As frações de interesse foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 12% e dialisadas em tampão de diálise (Tris HCl 10mM pH 8,0, NaCl 20mM, Glicina 0,1%), a 4°C sob agitação, por aproximadamente 24h, com uma troca de tampão. A quantificação das proteínas obtidas foi determinada pelo método de Bradford (Protein Assay kit- Bio-Rad) utilizando uma curva de BSA (albumina de soro bovino) como padrão.

A remoção do excesso de LPS contaminante foi feita pelo tratamento das amostras com 2% Triton-X 114. As proteínas foram incubadas com 2% Triton-X 114 em gelo, sob agitação, durante 30 minutos. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 10 minutos e centrifugadas na mesma temperatura, a 16100 g durante 20 minutos; a fase aquosa foi coletada. Para remoção do Triton-X 114 residual, as amostras foram tratadas com Bio-Beads SM-2 Adsorbent (Bio-rad®). A hidratação das *beads* foi realizada pela adição de 4 mL de PBS apirogênico em 200 µL de *beads*, agitação por inversão (5x) e manutenção em repouso para decantação. O PBS foi retirado e as *beads* separadas. As *beads* foram adicionadas em 2 mL das amostras de proteínas e incubadas em gelo sob agitação, durante 7 horas. Posteriormente, as amostras foram mantidas em repouso na vertical para decantação das *beads*, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C.

### 3.7. Imunização dos animais

O protocolo para obtenção do soro imune em camundongos foi submetido previamente à Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan (processo CEUAIB 1657030921 – Anexo 4). Camundongos BALB/c SPF, fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### 3.7.1. Produção de soro policlonal anti-MalX e anti-PrsA

Para a obtenção de soro imune foram utilizados 6 camundongos BALB/c por grupo (MalX e PrsA). Os animais foram imunizados via intraperitoneal com 5 µg de cada proteína combinada com hidróxido de alumínio como adjuvante (50 µg de Al<sup>3+</sup>). Os animais receberam 4 doses com intervalos de 7 dias entre cada uma.

O sangue foi coletado antes da primeira imunização (Pré imune), após a 3<sup>a</sup> (S3) e a 4<sup>a</sup> dose (S4) de imunização, por punção retroorbital, com os camundongos previamente anestesiados com colírio de cloridrato de proximetacaína 5%. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 1 hora e a 4°C por 30 minutos. Os soros foram separados por centrifugação a 4°C, 400 g durante 15 minutos e reunidos em pools de cada grupo e armazenados a -20°C para avaliação da resposta imune.

### 3.8. Análise da resposta imune

#### 3.8.1. Determinação do título de anticorpos anti-MalX ou anti-PrsA nos soros imunes e da presença de anticorpos contra estas proteínas em soros de camundongos imunizados com EVs por ELISA

As proteínas recombinantes (1µg/mL) foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50mM, NaHCO<sub>3</sub> 50mM, pH 9,6) e utilizadas para sensibilizar placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 4°C por aproximadamente 18h para sensibilização. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS + tween 20 0,1%) e bloqueadas com solução de bloqueio (PBS + 10% leite desnatado) a 37°C durante 1 hora. Logo após, as placas foram lavadas três vezes novamente com PBS-T e foram realizadas diluições seriadas dos soros anti-MalX, anti-PrsA (iniciando em 1:20) ou soros de camundongos imunizados com EVs (iniciando em 1:20) de pneumococo em PBS + BSA 1%. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora, seguido de mais um ciclo de lavagens. Em sequência, anticorpo anti-IgG de camundongos conjugado a peroxidase (Sigma Aldrich) foi adicionado às placas na diluição de 1:10000 em PBS + BSA 1% e as placas foram incubadas a 37°C por 1 hora. Por fim, as placas foram lavadas novamente e foi adicionada a solução de

revelação (10 mg de OPD em 20 mL de tampão citrato fosfato [citrato de sódio 100 mM e fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 300 mM, ajustado para pH 5,0] contendo 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), mantidas sob abrigo de luz e após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4M. Posteriormente, a absorbância foi lida em comprimento de onda de 492nm. Os gráficos de indução de anticorpos foram construídos no software Prism GraphPad e os títulos foram determinados pela maior diluição que produziu absorbância igual a 0,1.

### **3.8.2. Western-blot**

Para analisar o reconhecimento das proteínas recombinantes pelos anticorpos anti-MalX e anti-PrsA foram realizados ensaios de western-blot. Foram preparadas amostras de 500 ng das proteínas recombinantes, MalX e PrsA, em tampão SDS 1X. As amostras foram aquecidas a 94°C durante 5 minutos e aplicadas em gel de SDS-PAGE 10%. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento semi-dry Bio Rad com tampão de transferência (tampão tris-glicina [0,3 % (m/V) Tris base, 1,9 % (m/V) glicina e 0,1 % (m/V) SDS], 20% de etanol) a 12V durante 50 minutos. A confirmação da transferência foi feita pela coloração da membrana utilizando solução Ponceau (Sigma Aldrich). A membrana foi lavada 3 vezes, 10 minutos cada lavagem, com PBS-T (PBS + tween 20 0,05%) e incubada a 4°C por aproximadamente 18h com solução de bloqueio (PBS-T + 10% de leite desnatado). A membrana foi lavada novamente e incubada com os soros dos animais imunizados (após 4ª dose - S4) na diluição de 1:500 em solução de 2% leite em PBS-T, durante 2 horas sob agitação. Após mais um ciclo de lavagens, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongos conjugado a peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição de 1:10000 em solução PBS-T + 2% leite, durante 1 hora sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada e a revelada por quimioluminescência com o kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva) de acordo com as informações do fabricante.

Para a análise das proteínas purificadas o procedimento foi semelhante, sendo que o anticorpo anti-His (Invitrogen) na diluição de 1:4000 foi utilizado no lugar dos soros de animais imunizados.

Para avaliar a presença das proteínas MalX e PrsA em diferentes linhagens de pneumococo, foram obtidos extratos proteicos das linhagens EF3030 (sorotipo 19F), 603 (sorotipo 6B), 6303 (sorotipo 3), 6301 (sorotipo 1), D39 (sorotipo 2), A66.1 (sorotipo 3) e R6 (não encapsulada). As bactérias foram inoculadas em 10 mL de meio THY (Todd Hewitt contendo 0,5% de extrato de levedura),  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}=0,1$  e os cultivos foram realizados em estufa a 37°C, até atingir  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}=0,4$ . O cultivo foi centrifugado a 2648 g por 10 minutos.



O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 10 mL de PBS, sendo transferido 1 mL dessa suspensão para microtubos. A suspensão foi centrifugada a 1300 g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensionadas em 1 mL de tampão de lise para pneumococo (0,01% SDS, 0,1% deoxicolato de sódio e citrato de sódio 150mM), sendo incubadas a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13400 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. Posteriormente, os extratos proteicos foram quantificados pelo método de Bradford (Protein Assay kit-Bio-Rad) utilizando uma curva de BSA como padrão. O ensaio de western blot foi realizado conforme descrito anteriormente, utilizando 1 µg dos extratos proteicos de pneumococo e 150 ng das proteínas MalX e PrsA recombinantes.

### **3.9. Análise da ligação de anticorpos à superfície de pneumococo**

As linhagens EF3030, D39, 0603 e Rx1 de pneumococo foram inoculadas em 10 mL de meio THY com  $D.O_{600nm}=0,1$ , e cultivadas sem agitação a 37°C até  $D.O_{600nm}=0,4$ . Os cultivos foram centrifugados a 3200 g, durante 10 minutos a 20°C, os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuspensionados em 10 mL de PBS-BSA 1% e centrifugado novamente. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensionados novamente em 10 mL de PBS-BSA 1%. Em alíquotas de 95 µL ou 99 µL das suspensões bacterianas foram adicionados 5 µL ou 1 µL dos soros dos animais imunizados (reunidos em pool). As amostras foram incubadas em estufa 37°C durante 30 minutos. Logo após, foi feita a lavagem pela adição de 800 µL de PBS-BSA 1% e centrifugação a 3300 g durante 4 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e esse processo foi repetido. Em seguida, os pellets foram incubados com 100 µL de anticorpo anti-IgG de camundongos conjugado a FITC (Sigma Aldrich) na diluição de 1:100 em PBS-BSA 1% em gelo, ao abrigo de luz, por 30 minutos. Após novas lavagens com PBS-BSA 1%, os pellets foram ressuspensionados em 200 µL de solução BD Cytifix™ para fixação e as amostras foram armazenadas a 4°C, ao abrigo de luz, até a leitura. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo em aparelho FACS Canto II (BD Biosciences) com contagem de 10000 eventos. Os dados foram analisados no software FlowJo V10 (Tree Star).

### **3.10. Análises estatísticas**

Os gráficos de títulos de anticorpos foram construídos pelo programa Prism GraphPad 6. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste One-way ANOVA com Pós teste de

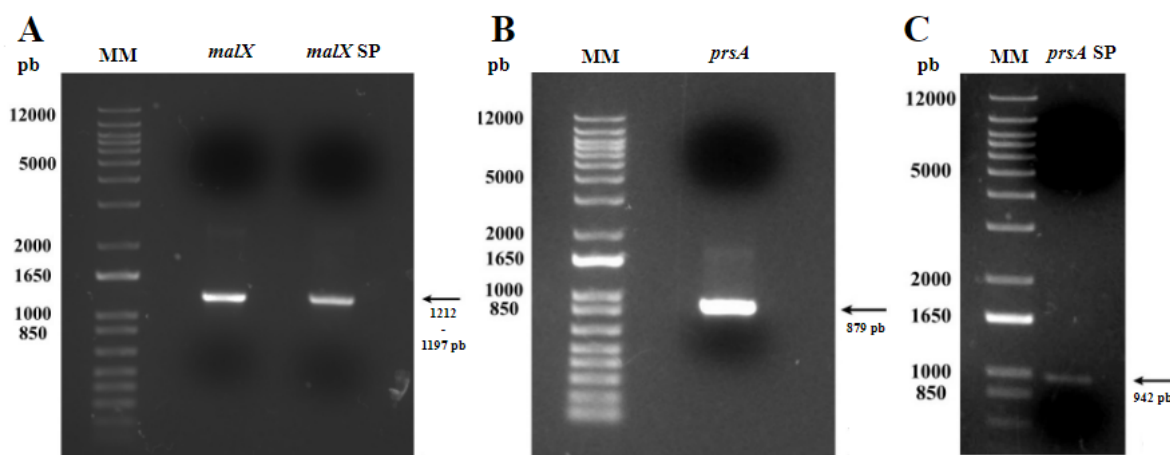
Tuckey para comparação entre os grupos. Em todos os casos as diferenças foram consideradas significativas quando as comparações indicaram  $P < 0,05$ .

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Amplificação dos genes *malX* e *prsA* por PCR

Com o objetivo de evitar possíveis dificuldades de expressão das proteínas recombinantes, devido a eventual acúmulo das proteínas nas membranas bacterianas, decidiu-se clonar as sequências contendo (*malX* SP, *prsA* SP) ou não (*malX*, *prsA*) os peptídeos sinais.

As sequências codificadoras de MalX e PrsA foram amplificadas utilizando como molde o DNA genômico da cepa D39 de *Streptococcus pneumoniae*. A Figura 2 mostra o resultado das reações de PCR com bandas dos tamanhos esperados de 1197 pb para *malX*, 1212 pb para *malX* SP, 879 pb para *prsA* e 942 pb para *prsA* SP após a purificação.



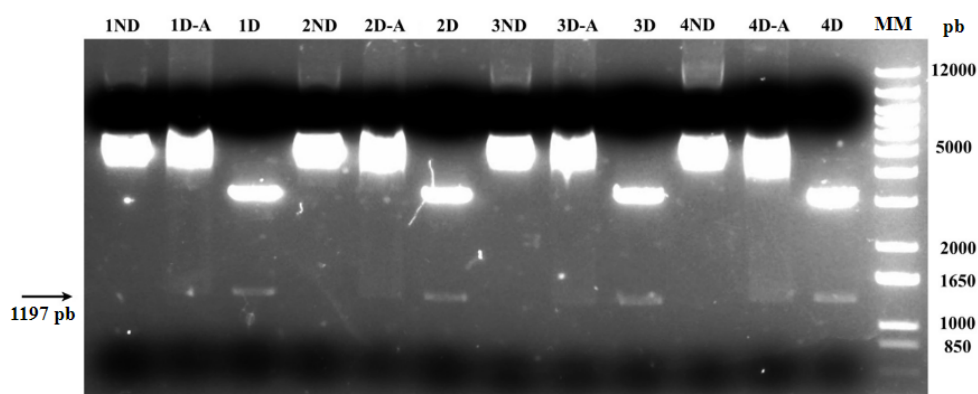
**Figura 2.** Análises em gel de agarose 1% de fragmentos de DNA purificados após PCR. A) Fragmentos purificados de *malX* (sequência do gene que codifica a proteína madura) e de *malX* SP (sequência do gene que codifica a proteína com peptídeo sinal). As bandas indicadas pela seta se referem aos genes de interesse, com tamanhos de, aproximadamente, 1197 e 1212 pb, respectivamente. B) Fragmento purificado de *prsA* (sequência do gene que codifica a proteína madura). A banda indicada pela seta se refere ao gene de *prsA*, com tamanho de, 879 pb. C) Fragmento purificado de *prsA* SP (sequência genética da proteína contendo com a região do peptídeo sinal). A banda indicada pela seta se refere ao gene de *prsA* SP, com tamanho de 942 pb. MM: Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.

### 4.2. Construção dos vetores recombinantes pGEM-T-*malX* e pGEM-T-*prsA*

Os produtos purificados da PCR foram ligados no vetor pGEM-T easy (Promega) e bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas com a reação de ligação. As colônias resistentes foram selecionadas e o DNA plasmidial foi extraído. Os plasmídeos foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição EcoR I e Xho I.

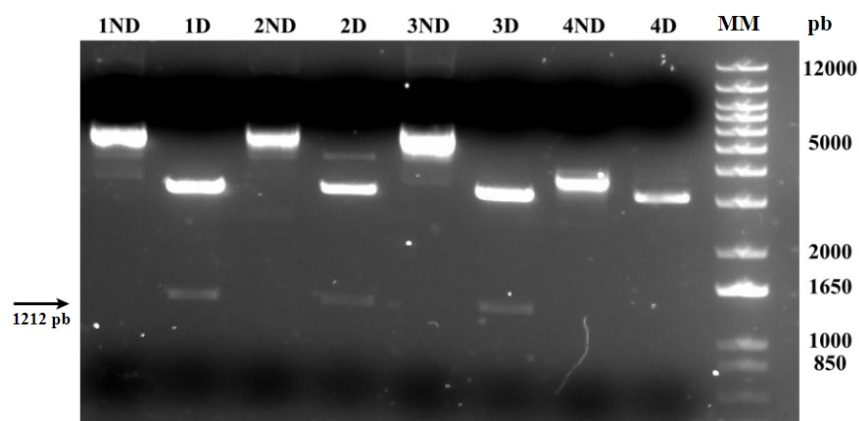
Foram selecionadas 6 colônias resistentes de *malX* e a clonagem foi verificada, em um primeiro momento, por análise de digestão com a enzima EcoR I, sendo analisadas por

eletroforese em gel de agarose 1%. Como observamos dificuldades iniciais em obtermos as construções corretas, resolvemos utilizar duas marcas de enzima EcoR I disponíveis no laboratório. Os resultados para a digestão com EcoR I podem ser observados na Figura 3, mostrando que os clones 1, 2, 3, 4 (Indicados com D após cada número) apresentaram fragmentos com o tamanho esperado de aproximadamente 1197 pb, indicados pela seta. Por outro lado, as digestões dos mesmos plasmídeos realizadas com a enzima EcoR I Anza11 (Thermo Scientific) (indicados com D-A após cada número), não funcionaram, comprovando o problema com esta enzima. Dessa forma, a utilização desta enzima foi descartada.



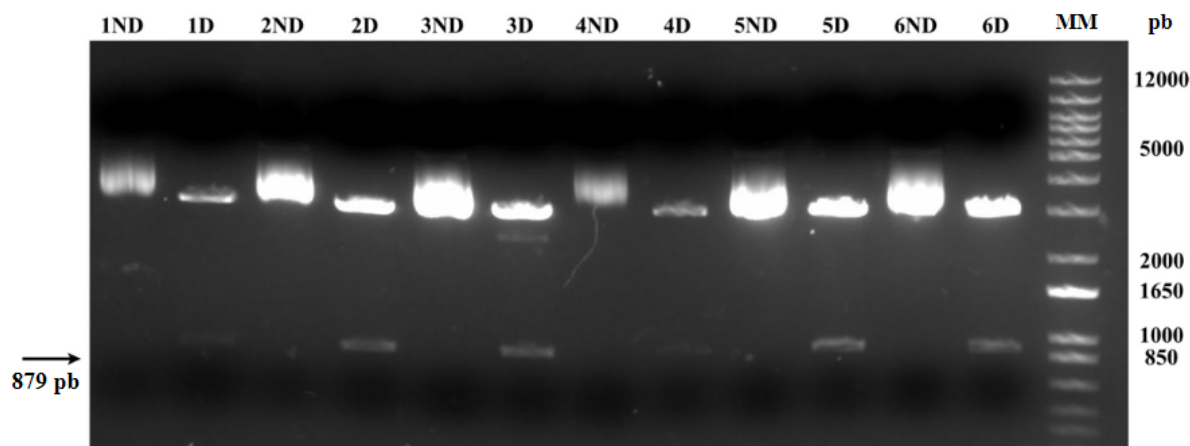
**Figura 3.** Análise de restrição com EcoR I dos clones 1 a 4 da construção do vetor pGEM-T-*malX*. Os plasmídeos foram digeridos e analisados em gel de agarose 1%. Para cada clone foi aplicado amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido (D). Os clones D-A se referem aos plasmídeos digeridos com Anza11 EcoR I. A seta indica as bandas com o tamanho de aproximadamente 1197 pb. MM = Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.

Em relação aos vetores pGEM-T-*malX* SP foram selecionadas 4 colônias resistentes a ampicilina. Na Figura 4 pode-se observar os resultados das reações de digestão, que mostram que apenas os clones 1, 2 e 3 apresentaram as bandas com o tamanho esperado.

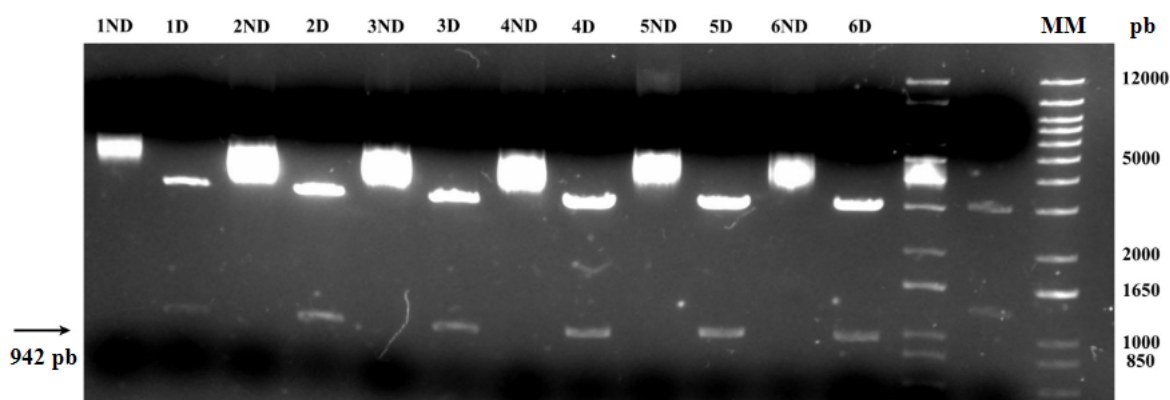


**Figura 4.** Análise de restrição com EcoR I dos clones 1 a 4 da construção do vetor pGEM-T-*malX* SP. Os plasmídeos foram digeridos e analisados em gel de agarose 1%. Para cada clone foi aplicado amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido (D). A seta indica as bandas com o tamanho de aproximadamente 1212 pb. MM = Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.

Tanto para as construções pGEM-T-*prsA* e pGEM-T-*prsA* SP, foram selecionadas 6 colônias resistentes, sendo submetidas a análises de restrição com as enzimas EcoR I e Xho I. Na Figura 5A (pGEM-T-*prsA*) e na Figura 5B (pGEM-T-*prsA* SP) observa-se que todos os clones apresentaram o tamanho esperado de 879 pb e 942 pb, respectivamente.



**Figura 5A.** Análise de restrição com EcoR I dos clones 1 a 6 da construção do vetor pGEM-T-*prsA*. Os plasmídeos foram digeridos e analisados em gel de agarose 1%. Para cada clone foi aplicado amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido (D). A seta indica as bandas com o tamanho de aproximadamente 879 pb. MM = Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.



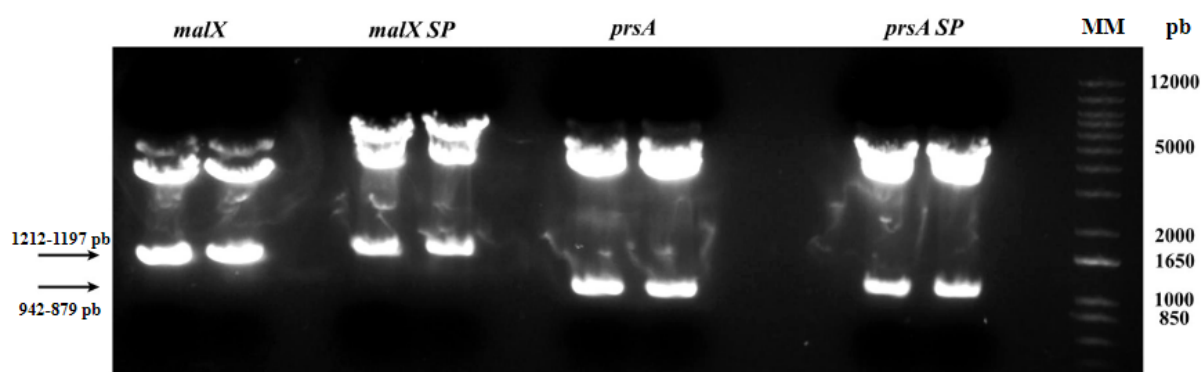
**Figura 5B.** Análise de restrição com EcoR I dos clones 1 a 6 da construção do vetor pGEM-T-*prsA* SP. Os plasmídeos foram digeridos e analisados em gel de agarose 1%. Para cada clone foi aplicado amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido (D). A seta indica as bandas com o tamanho de aproximadamente 942 pb. MM = Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.

Os clones que apresentaram os insertos com tamanhos esperados foram submetidos ao sequenciamento a fim de se verificar a sequência correta dos genes de interesse. Ao obter as sequências, as mesmas foram analisadas no programa BLASTN em um alinhamento contra as sequências depositadas, em que foi possível observar 100% de identidade para os clones abaixo:

- *malX*: clones 3 e 6;

- *malX* SP: clones 1 e 2;
- *prsA*: clones 1 e 5;
- *prsA* SP: clones 2 e 6

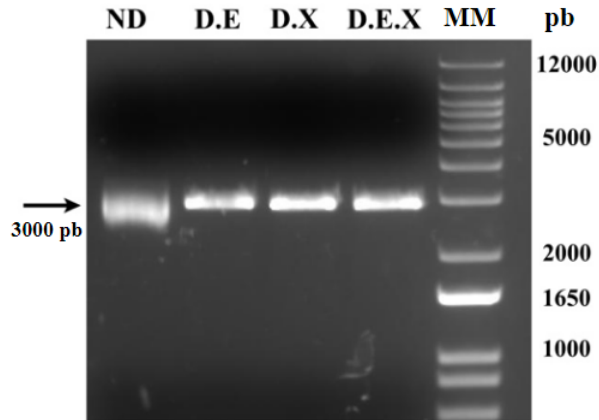
Para as etapas seguintes foram escolhidos os clones *malX*: clone 3; *prsA*: clone 5; *malX* SP: clone 1 e *prsA* SP: clone 2. Assim, para a clonagem em vetor de expressão, os vetores recombinantes de pGEM-T easy foram digeridos com ambas as enzimas de restrição (EcoR I e Xho I) para o isolamento dos fragmentos, e submetidos à eletroforese. Conforme observado na Figura 6 todos os clones selecionados apresentaram os insertos com tamanho esperado para os genes em questão. As bandas foram purificadas utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).



**Figura 6.** Análise de restrição com EcoR I e Xho I dos clones selecionados para os vetores pGEM-T-*malX*, pGEMT-*malX* SP, pGEMT-*prsA* e pGEMT-*prsA* SP. Os plasmídeos foram digeridos e analisados em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas com o tamanho de 1197 pb, 1272 pb, 879 pb e 942 pb. MM = Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.

#### 4.3. Construção dos vetores recombinantes pAE-*malX* e pAE-*prsA*

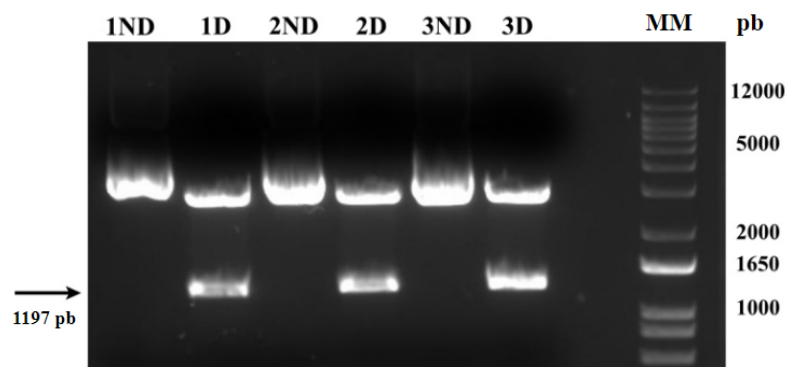
Para a construção dos vetores pAE-*malX* e pAE-*prsA*, foi feita a análise de digestão do vetor pAE com as enzimas de restrição EcoR I e Xho I separadamente (D.E ou D.X) ou combinadas (D.E.X), com o intuito de garantir que ambas as enzimas estavam funcionando adequadamente nas condições testadas, uma vez que não há liberação de fragmentos visíveis pela eletroforese. Na Figura 7 é possível observar um resultado satisfatório, em que nas três colunas contendo plasmídeo digerido, o vetor pAE foi linearizado em comparação ao vetor não digerido.



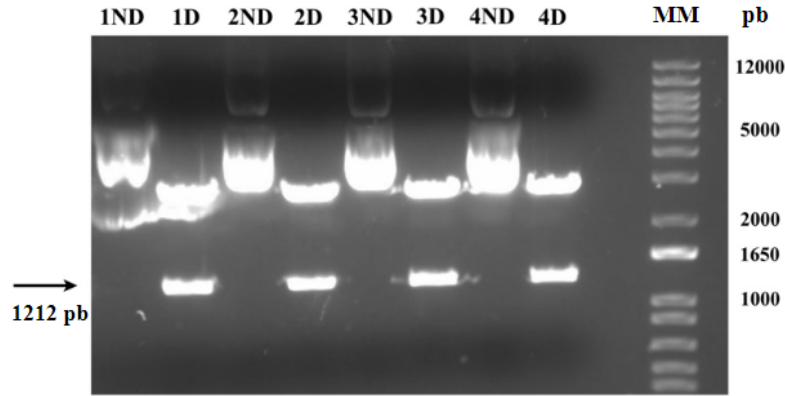
**Figura 7.** Análise de restrição com EcoR I e Xho I do vetor pAE. Os plasmídeos foram digeridos e analisados em gel de agarose 1%. Foi aplicada amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido com EcoR I (D.E), em seguida digerido com Xho I (D.X) e por fim, o plasmídeo digerido com ambas as enzimas, EcoR I e Xho I (D.E.X). A seta indica as bandas com o tamanho esperado de aproximadamente 3000 pb. MM = Marcador de Massa Molecular 1kB plus DNA ladder.

Após esse processo, uma nova digestão foi realizada para se obter um volume maior do vetor pAE digerido com EcoR I e Xho I, sendo submetido à eletroforese e a banda obtida foi purificada. O fragmento pAE-EcoR I+Xho I foi ligado, de acordo com item 3.5, aos fragmentos de *malX* e *prsA* (maduros ou com peptídeo sinal) digeridos conforme item 4.2. As reações de ligação foram transformadas em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  e os clones resistentes gerados foram selecionados. O DNA plasmidial foi obtido com o kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen), sendo denominados pAE-*malX*, pAE-*malX* SP, pAE-*prsA* e pAE-*prsA* SP.

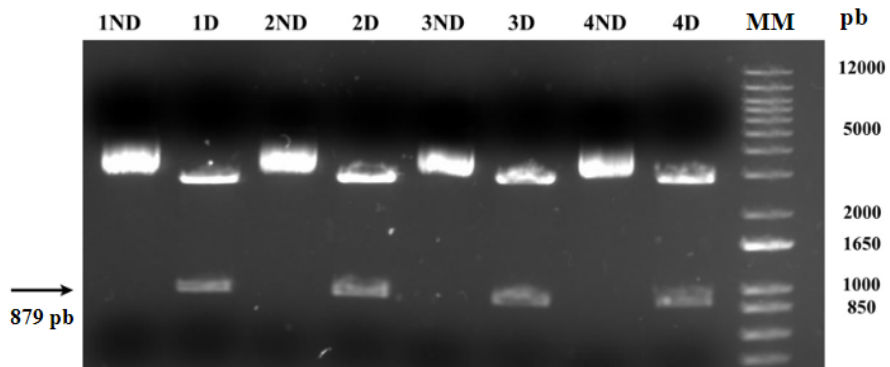
Para confirmar a ligação dos insertos ao vetor, foi realizada a análise de digestão com as enzimas EcoR I e Xho I. Os resultados podem ser visualizados na Figura 8A, Figura 8B, Figura 8C e Figura 8D.



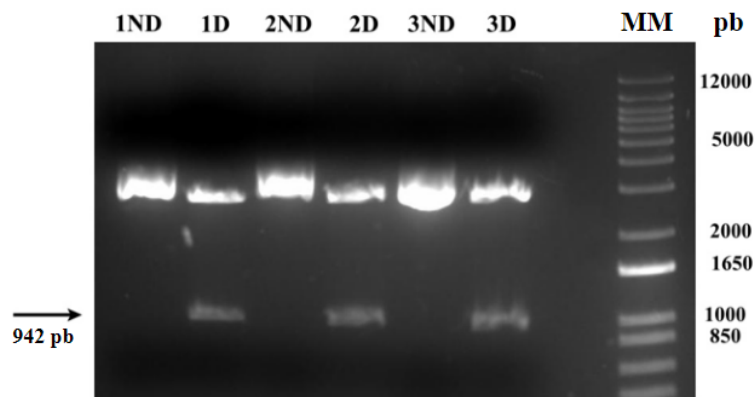
**Figura 8A.** Análise de restrição dos clones 1 a 3 da construção vetor pAE-*malX*. Os plasmídeos foram digeridos com EcoR I e Xho I e analisados em gel de agarose 1%. Foi aplicado amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido com (D). A seta indica as bandas com o tamanho esperado de aproximadamente 1197 pb. MM = Marcador de Massa Molecular 1kB plus DNA ladder.



**Figura 8B.** Análise de restrição dos clones 1 a 4 da construção vetor pAE-malX SP. Os plasmídeos foram digeridos com EcoR I e Xho I e analisados em gel de agarose 1%. Foi aplicado amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido com (D). A seta indica as bandas com o tamanho esperado de aproximadamente 1212 pb. MM = Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.



**Figura 8C.** Análise de restrição dos clones 1 a 4 da construção vetor pAE-*prsA*. Os plasmídeos foram digeridos com EcoR I e Xho I e analisados em gel de agarose 1%. Foi aplicado amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido com (D). A seta indica as bandas com o tamanho esperado de aproximadamente 879 pb. MM = Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.

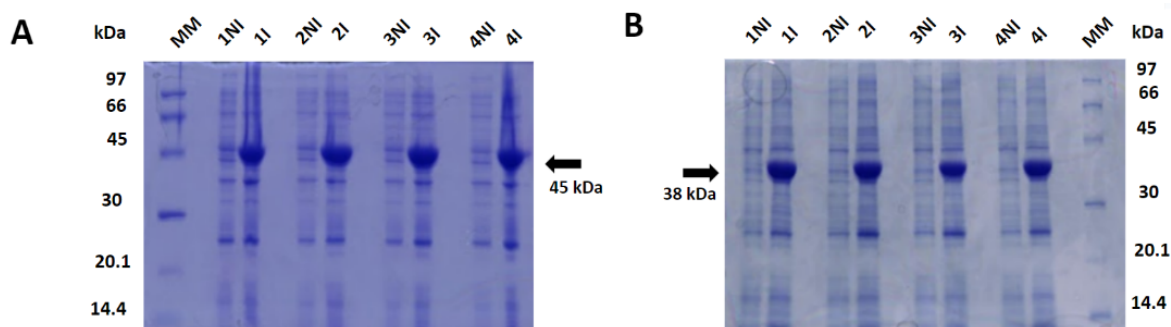


**Figura 8D.** Análise de restrição dos clones 1 a 3 da construção vetor pAE-*prsA* SP. Os plasmídeos foram digeridos com EcoR I e Xho I e analisados em gel de agarose 1%. Foi aplicado amostra controle de plasmídeo não digerido (ND), seguido do plasmídeo digerido com (D). A seta indica as bandas com o tamanho esperado de aproximadamente 942 pb. MM = Marcador de Massa Molecular, 1kB plus DNA ladder.

#### 4.4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes MalX e PrsA

Uma vez que foram obtidos todos os plasmídeos propostos inicialmente, decidiu-se testar inicialmente a expressão das proteínas recombinantes sem os peptídeos sinal, evitando possível toxicidade às bactérias.

Os vetores pAE-*malX* e pAE-*prsA*, foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS conforme descrito no item 3.6. Foram selecionados 4 clones positivos e inoculados em meio LB-amp. Após atingir  $D.O_{600nm}=0,6$ , foi adicionado IPTG para induzir a produção das proteínas recombinantes. As proteínas MalX e PrsA possuem massa molecular teórica de 45kDa e 38kDa, respectivamente. A Figura 9 apresenta a análise da expressão das proteínas realizada em gel de SDS-PAGE 12% dos clones não induzidos (NI) e induzidos (I). Foram observadas bandas de tamanho esperado de aproximadamente 45kDa nos 4 clones induzidos de MalX como mostrado pela seta, e as mesmas não foram observadas nas amostras não induzidas (Figura 9A). O gel de análise dos clones transformados com pAE-*prsA* revelaram bandas com o tamanho esperado de aproximadamente 38kDa nos 4 clones induzidos, como mostrado pela seta, já nas amostras não induzidas as mesmas bandas não são visualizadas (Figura 9B).

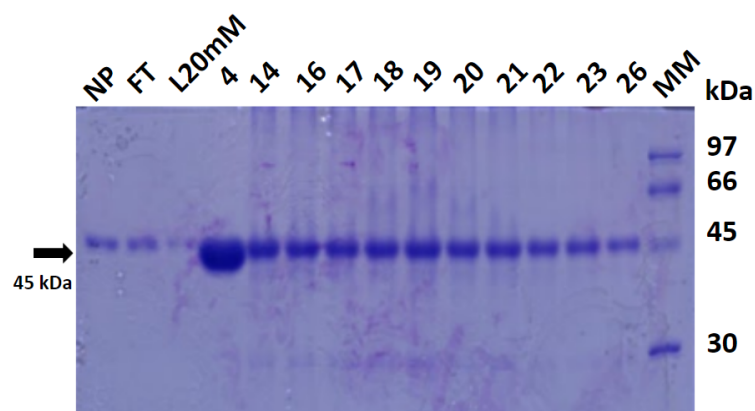


**Figura 9.** Análise de expressão de MalX (A) e PrsA (B) por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%. Clones não induzidos (NI) e induzidos (I). MM = Marcador de Massa Molecular, LMW (Cytiva).

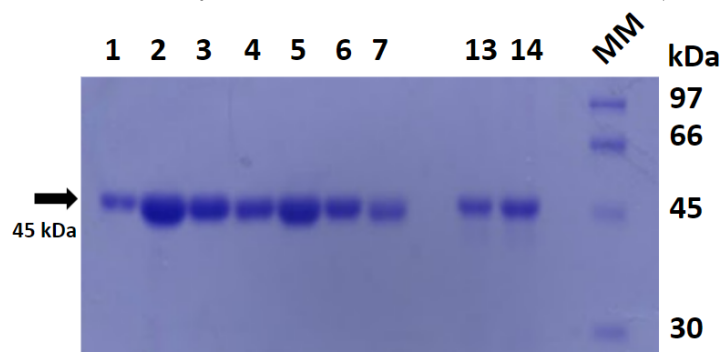
Para a purificação das proteínas recombinantes foi feito o cultivo em 500 mL de meio LB-amp a partir dos clones obtidos na etapa anterior. Para MalX foi selecionado o clone 3 e para PrsA o clone 1. Após atingir  $D.O_{600nm}=0,6$ , a expressão foi induzida pela adição de IPTG e o cultivo foi incubado por 3h. Após esse processo, foi feita a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade. O vetor pAE permite a expressão da proteína heteróloga com uma cauda de 6 resíduos de histidina (6XHis) na porção N-terminal, de modo a possibilitar a adsorção das proteínas em resina carregada com  $Ni^{2+}$ . As proteínas foram purificadas em colunas His-Trap carregadas com  $Ni^{2+}$  e eluídas em equipamento AKTA Prime Plus por meio de gradiente crescente de concentração de imidazol. As frações de interesse foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE 12%. A purificação da proteína



MalX apresentou dois picos de eluição separados e bem definidos (Anexo 5). A análise de algumas amostras selecionadas foi realizada em gel de SDS-PAGE 12% e pode ser observada nas Figuras 10A e 10B. Pode-se observar uma banda de concentração maior de proteína na Figura 10A, amostra 4, proveniente do pico 1. Esta amostra não apresentou contaminantes visíveis no SDS-PAGE. Por outro lado, as amostras 14 a 26 apresentadas na Figura 10A, provenientes do pico 2, apresentaram menor concentração e algumas bandas contaminantes podem ser observadas. Outras amostras do pico 1 (1 a 7) podem ser observadas na Figura 10B e apresentam bandas únicas, com ausência de contaminantes visíveis no gel. Em ambos os casos, as bandas observadas, como apontadas pela seta, apresentam a massa molecular esperada para MalX, de aproximadamente 45kDa.



**Figura 10A.** Análise da purificação da proteína recombinante MalX por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% SP = Extrato antes da purificação; FT = Extrato não adsorvido à coluna (Flow-through); L20mM = Lavagem com 20mM imidazol; Gradientes de eluição e MM = Marcador de Massa Molecular, LMW (Cytiva).

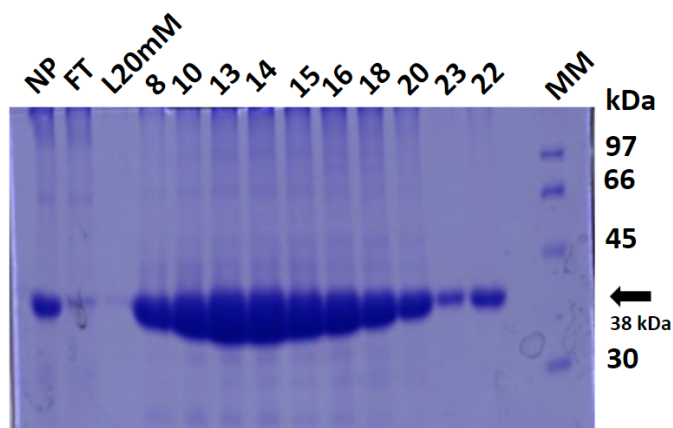


**Figura 10B.** Análise da purificação da proteína recombinante MalX por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% SP = Extrato antes da purificação; FT = Extrato não adsorvido à coluna (Flow-through); L20mM = Lavagem com 20mM imidazol; Gradientes de eluição e MM = Marcador de Massa Molecular, LMW (Cytiva).

Considerando os dois picos de eluição da proteína MalX foi possível obter um rendimento de aproximadamente 22,4 mg de proteína recombinante por litro de cultivo.

A purificação da proteína PrsA apresentou apenas um pico de eluição muito bem definido (Anexo 6), a análise das frações pode ser observada na Figura 11. Como indicado pela seta, as bandas obtidas representam a massa molecular esperada de aproximadamente

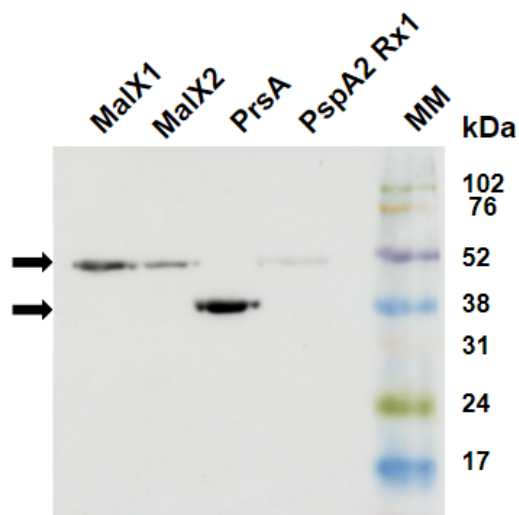
38kDa. Grandes quantidades da proteína PrsA foram obtidas. Entretanto, algumas bandas contaminantes puderam ser observadas nas amostras.



**Figura 11.** Análise da purificação da proteína recombinante PrsA por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%. SP = Extrato antes da purificação; FT = Extrato não adsorvido à coluna (Flow-through); L20mM = Lavagem com 20mM imidazol; Gradientes de eluição e MM = Marcador de Massa Molecular, LMW, (Cytiva).

A partir dos dados obtidos pela purificação da proteína PrsA, foi possível inferir que o rendimento foi de aproximadamente 128 mg de proteína recombinante por litro de cultivo.

As proteínas purificadas foram analisadas quanto à presença da cauda de histidina através de western-blot utilizando anticorpo anti-HisTag (Invitrogen). Na Figura 12 é possível observar que todas as proteínas purificadas foram reconhecidas pelo anticorpo, indicando que apresentam cauda de histidina, inclusive as proteínas MalX1 (proveniente do pico 1) e MalX2 (proveniente do pico 2), fornecendo indícios de que os dois picos observados na cromatografia contêm a proteína MalX.



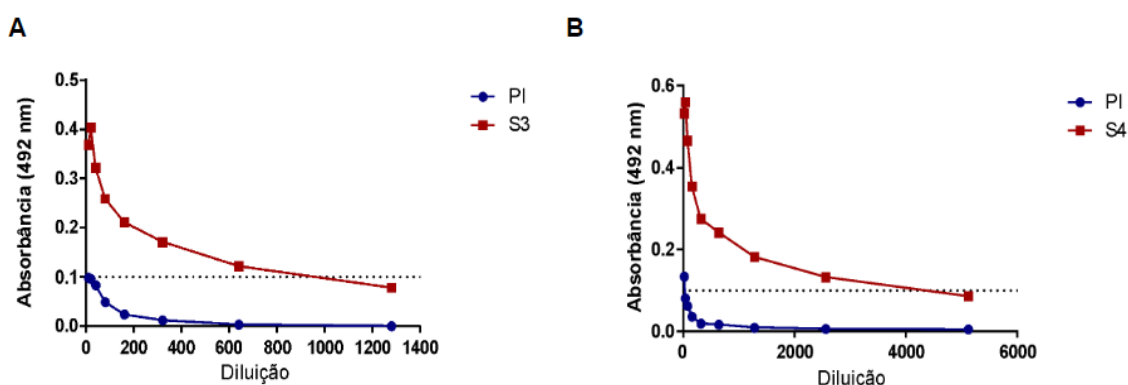
**Figura 12.** Análise de reconhecimento da cauda de histidina presente nas proteínas recombinantes por western-blot. Membrana incubada com anticorpo anti-histag (Invitrogen). As setas indicam as bandas de aproximadamente 45kDa e 38kDa, referentes a MalX e PrsA respectivamente. Como controle positivo foi utilizada a proteína, PspA2 Rx1 que contém cauda de histidina; MM = Marcador de Massa Molecular (Amershan ECL Rainbow Marker - Full Range [Cytiva]).

#### 4.5. Análise da resposta imune

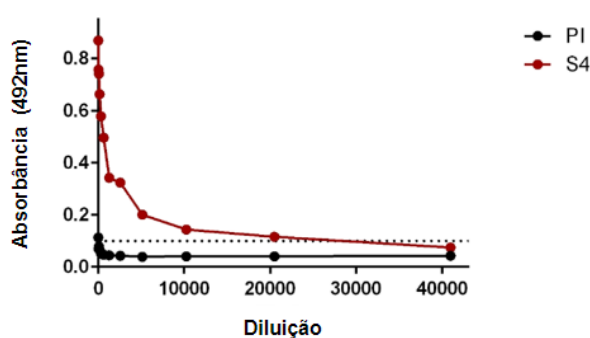
Os animais foram imunizados conforme descrito no item 3.7. Para a proteína MalX, devido a obtenção de dois picos na eluição que apresentaram a mesma massa molecular, dois grupos de animais foram imunizados com MalX1 (primeira eluição) e MalX2 (segunda eluição).

##### 4.5.1. Produção dos soros policlonais contra MalX e PrsA

Os camundongos foram imunizados conforme descrito no item 3.7, e após a 3ª (S3) e a 4ª dose (S4) o sangue foi coletado e os soros (em pools de cada grupo) foram analisados por ELISA para quantificação de anticorpos IgG. Os soros dos animais imunizados com MalX 1 após a 3ª dose apresentaram a indução de IgG específica contra a proteína (Figura 13A), com aumento do título após a 4ª imunização (Figura 13B). O título do soro anti-MalX1 após a 4ª dose foi de aproximadamente 1:4.000. O soro dos animais imunizados com MalX2 foi coletado apenas após a 4ª dose e a análise por ELISA apresentou a indução de IgG com título de aproximadamente 1:20.500 (Figura 14). Esses altos níveis de anticorpos podem estar relacionados à produção de anticorpos contra contaminações presentes na amostra de MalX2 além da própria proteína, conforme observado na Figura 10A.

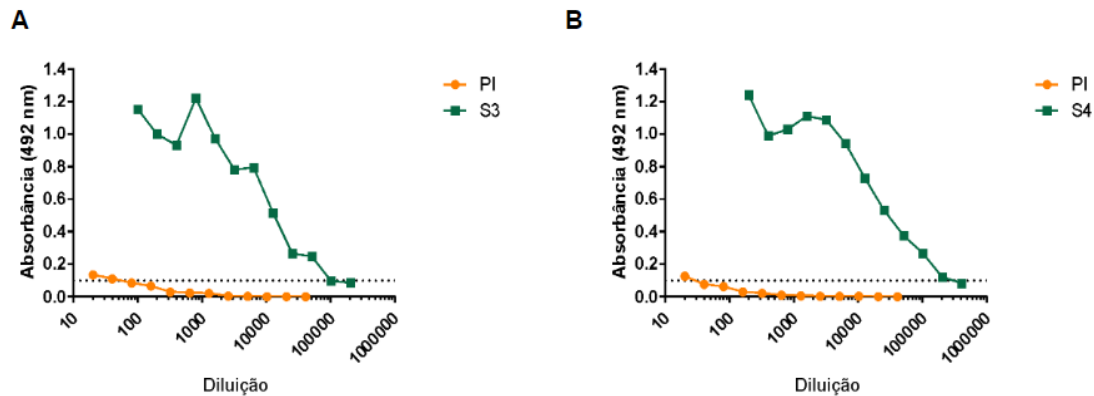


**Figura 13.** Indução de IgG anti-MalX1 em camundongos BALB/c imunizados com MalX1 recombinante combinada a hidróxido de alumínio como adjuvante. Os soros pré-imune (PI), após 3 doses (S3) e após 4 doses (S4) foram avaliados por ELISA. Níveis de anticorpos após 3 doses (A) e níveis de anticorpos após 4 doses (B).



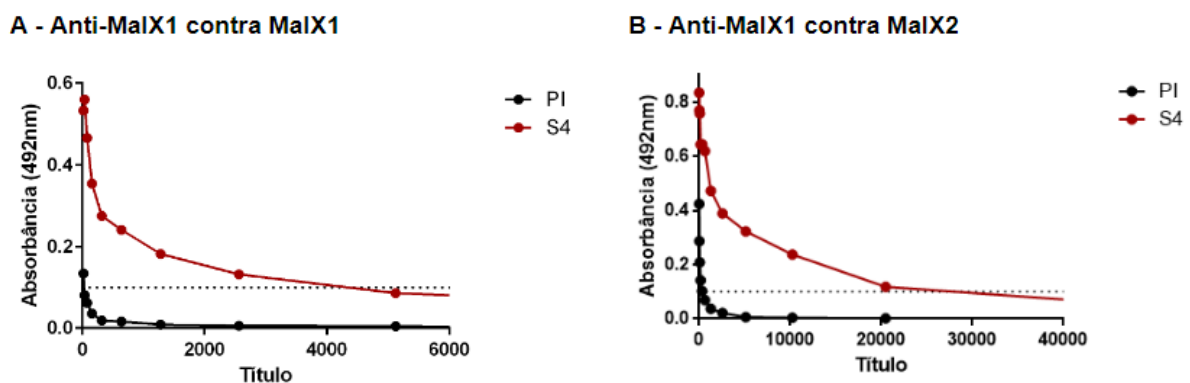
**Figura 14.** Indução de IgG anti-MalX2 em camundongos BALB/c imunizados com MalX2 recombinante combinada a hidróxido de alumínio como adjuvante. Os soros pré-imune (PI) e após 4 doses (S4) foram avaliados por ELISA.

A imunização dos camundongos com a proteína PrsA, levou à produção de altos títulos de IgG contra a proteína, chegando em aproximadamente 1:100.000 após a 4ª dose (Figura 15).

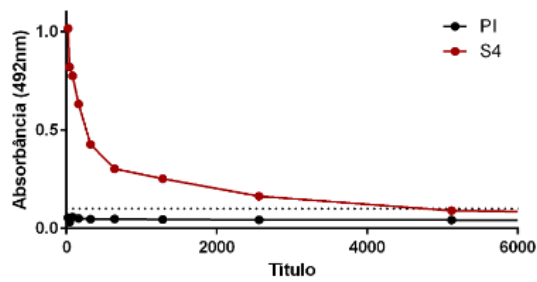
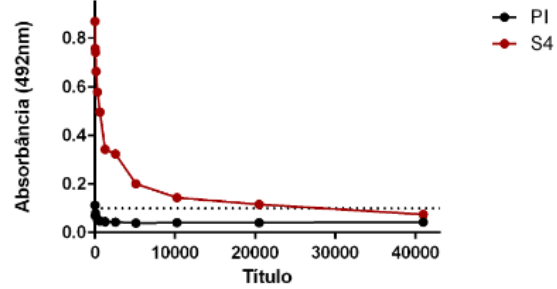


**Figura 15.** Indução de IgG anti-PrsA em camundongos BALB/c imunizados com PrsA recombinante combinada a hidróxido de alumínio como adjuvante. Os soros pré-imune (PI), após 3 doses (S3) e após 4 doses (S4) foram avaliados por ELISA. Níveis de anticorpos após 3 doses (A) e níveis de anticorpos após 4 doses (B).

Placas de ELISA sensibilizadas com MalX1 e MalX2 foram incubadas com o soro anti-MalX2 e anti-MalX1, respectivamente, para avaliar se os anticorpos reconhecem a duas proteínas de forma cruzada, como uma forma de confirmar se os dois picos contêm a mesma proteína. Os resultados demonstraram que ambos os soros reconhecem as proteínas cruzadamente, indicando que as duas amostras correspondem a MalX (Figuras 16 e 17).

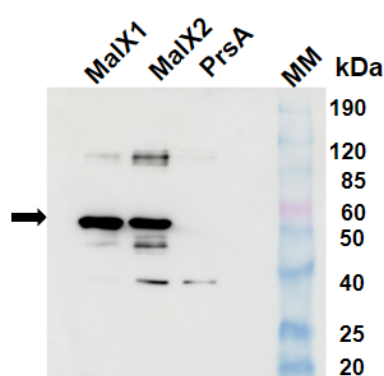
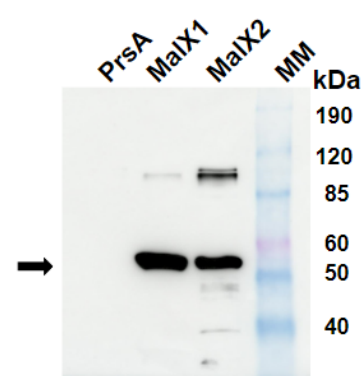


**Figura 16.** Reconhecimento das proteínas MalX1 e MalX2 pelo soro anti-MalX1. Os soros pré-imune (PI) e após 4 doses (S4) foram avaliados por ELISA. Níveis de anticorpos contra a proteína MalX1 (A) e níveis de anticorpos contra a proteína MalX2 (B).

**A - Anti-MalX2 contra MalX1****B - Anti-MalX2 contra MalX2**

**Figura 17.** Reconhecimento das proteínas MalX1 e MalX2 pelo soro anti-MalX2. Os soros pré-imune (PI) e após 4 doses (S4) foram avaliados por ELISA. Níveis de anticorpos contra a proteína MalX1 (A) e níveis de anticorpos contra a proteína MalX2 (B).

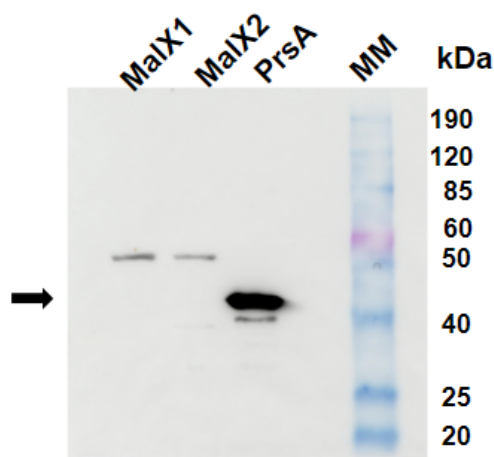
A reatividade dos soros contra MalX e PrsA foi também analisada por ensaios de Western-blot. Foram aplicados 500 ng de cada proteína recombinante em gel de SDS-PAGE 10% para transferência em membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com o soro anti-MalX e anti-PrsA. A Figura 18A mostra a membrana que foi incubada com soro anti-MalX1, e nesse caso, como indicado pela seta, tanto MalX1 quanto MalX2 foram reconhecidas pelo soro. Da mesma forma, a membrana incubada com o soro anti-MalX2, apresentou o reconhecimento das bandas referentes a MalX1 e a MalX2 (Figura 18B). Alguns contaminantes são observados, principalmente na amostra MalX2, conforme já observado no gel corado por Comassie Blue, sugerindo que os animais produziram anticorpos contra eles, assim como discutido nos ensaios de ELISA com o soro anti-MalX2. Da mesma forma, o soro anti-MalX1 reconheceu as bandas contaminantes presentes na amostra de MalX2 (Figura 18A), demonstrando que, apesar de contaminações não serem visíveis na Figura 10B, possivelmente estavam presentes na amostra de MalX1 e os camundongos produziram anticorpos contra elas.

**A - Anti-MalX1****B - Anti-MalX2**

**Figura 18.** Análise de reconhecimento das proteínas recombinantes pelos soros dos animais imunizados por western-blot. Membrana incubada com soro anti-MalX1 (A) e membrana incubada com soro anti-MalX2 (B). MM = Marcador de Massa Molecular (BenchMark Pre-stained Protein Ladder [Invitrogen]).

Posteriormente, para confirmar a sequência proteica e assim determinar se as duas proteínas são as mesmas, MalX1 e MalX2 foram submetidas à espectrometria de massas com colaboração do Dr. Daniel Pimenta (Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan). Até o presente momento foi possível obter o resultado da análise de MalX1, que confirmou a identidade de MalX de pneumococo.

O soro anti-PrsA apresentou forte reatividade contra a proteína recombinante PrsA, como apontado pela seta na Figura 19. Duas bandas foram reconhecidas nas amostras de MalX1 e MalX2, podendo ser um reconhecimento inespecífico de contaminantes nas amostras.

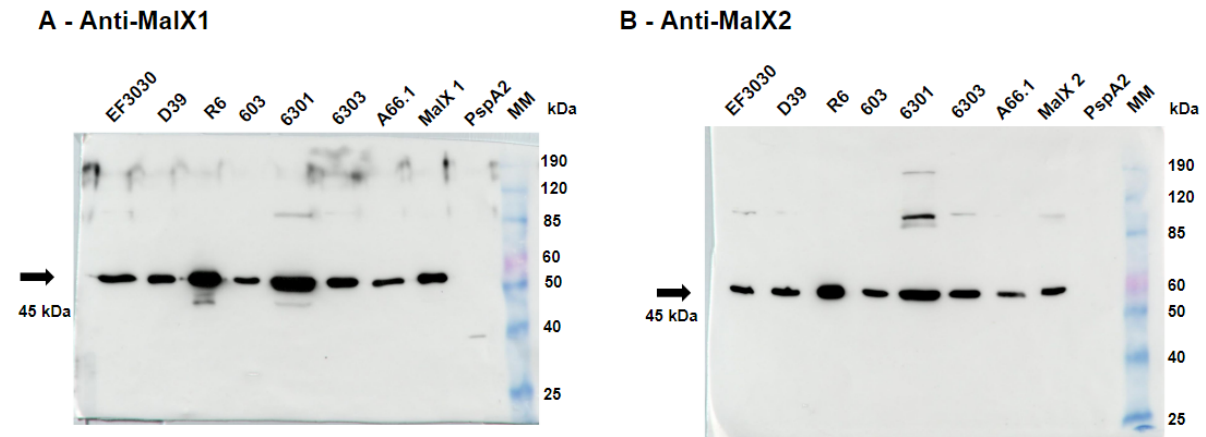


**Figura 19.** Análise de reconhecimento da proteína recombinante PrsA pelos soros dos animais imunizados por western-blot. Membrana incubada com soro anti-PrsA. A seta indica a banda de tamanho aproximado de 38kDa referente a PrsA. MM = Marcador de Massa Molecular (BenchMark Pre-stained Protein Ladder [Invitrogen]).

#### 4.6. Avaliação da presença dos antígenos MalX e PrsA em diferentes linhagens de pneumococo

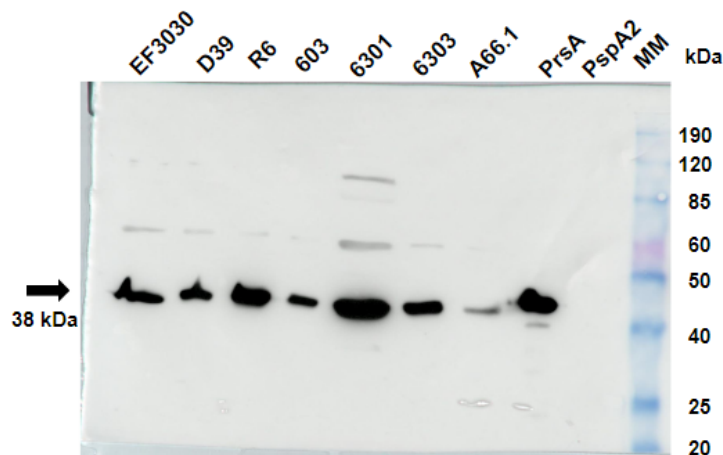
Após a confirmação da reatividade dos soros produzidos, eles foram utilizados para análise da conservação das proteínas MalX e PrsA em extratos de diferentes linhagens de pneumococo. As proteínas recombinantes MalX e PrsA foram utilizadas como controles positivos e a proteína PspA2 foi utilizada como controle negativo. Os extratos e proteínas foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% e transferidos para membrana de nitrocelulose que foi sondada com os diferentes soros. Os soros anti-MalX1 (Figura 12A) e anti-MalX2 (Figura 12B) reconheceram especificamente bandas nos extratos de pneumococo de mesma massa molecular que as proteínas recombinantes. Esses resultados mostram que o antígeno MalX está presente em todas as linhagens analisadas, de forma conservada. Além disso, nota-se, nos dois experimentos, que os soros anti-MalX1 e anti-MalX2 reconhecem bandas de mesma massa molecular, mais um indício de que as proteínas das duas amostras provenientes dos diferentes picos da cromatografia contêm MalX. Nenhum dos soros

apresentou reatividade contra PspA2, um fator de virulência de pneumococo não relacionado (Figuras 20A e B).



**Figura 20.** Análise de reconhecimento da proteína MalX em diferentes linhagens de pneumococo pelos soros dos animais imunizados por western-blot. Membrana incubada com soro anti-MalX1 (A) e membrana incubada com soro anti-MalX2 (B). As setas indicam as bandas referentes a MalX. MM = Marcador de Massa Molecular (BenchMark Pre-stained Protein Ladder [Invitrogen]).

Na Figura 21 é apresentado o resultado do Western-blot utilizando o soro anti-PrsA. Observa-se o reconhecimento de bandas específicas em todos os extratos de pneumococo, com mesma massa molecular que a proteína PrsA recombinante. Este resultado também confirma a conservação do antígeno PrsA nos isolados de pneumococo. Novamente, o soro não reconheceu a proteína PspA2, confirmando a especificidade.



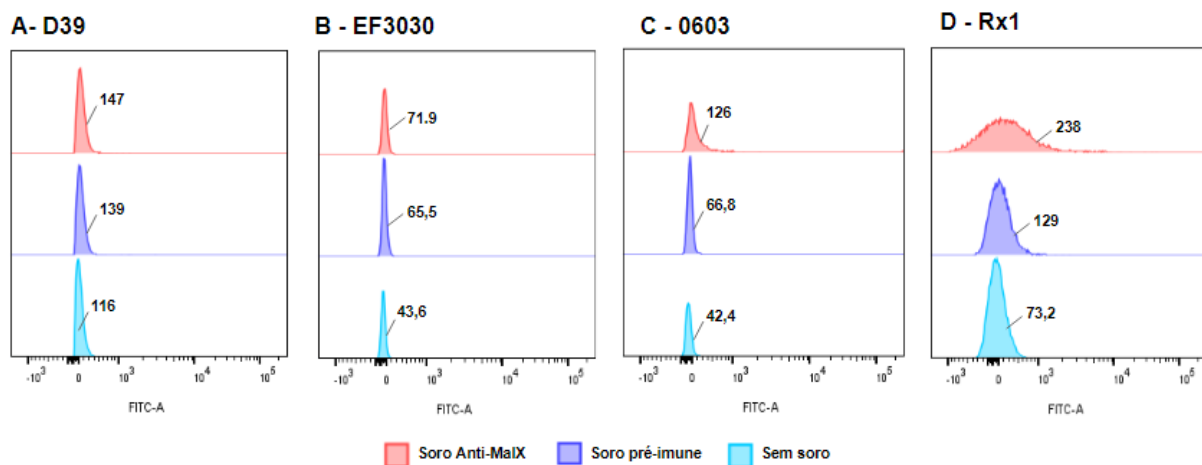
**Figura 21.** Análise de reconhecimento da proteína PrsA em diferentes linhagens de pneumococo pelos soros dos animais imunizados por western-blot. Membrana incubada com soro anti-PrsA. A seta indica as bandas referentes a PrsA. MM = Marcador de Massa Molecular (BenchMark Pre-stained Protein Ladder [Invitrogen]).

A conservação dos genes codificantes de MalX e PrsA, já havia sido realizada por outro grupo que a alinhou das sequências gênicas de *malX* e *prsA* da cepa TIGR4 em genomas de diferentes linhagens de pneumococo, por meio de ferramentas de bioinformática.

Os resultados indicaram que há similaridade de *prsA* com cerca de 99% dos genomas analisados, apresentando 98% de identidade. Da mesma forma, a sequência de *malX* foi similar em 98,5% dos genomas presentes no banco de dados, com 98% de identidade [28]. Logo, os resultados obtidos no presente projeto corroboram com o estudo e indicam que *malX* e *prsA* são conservadas entre as diversas linhagens de pneumococo.

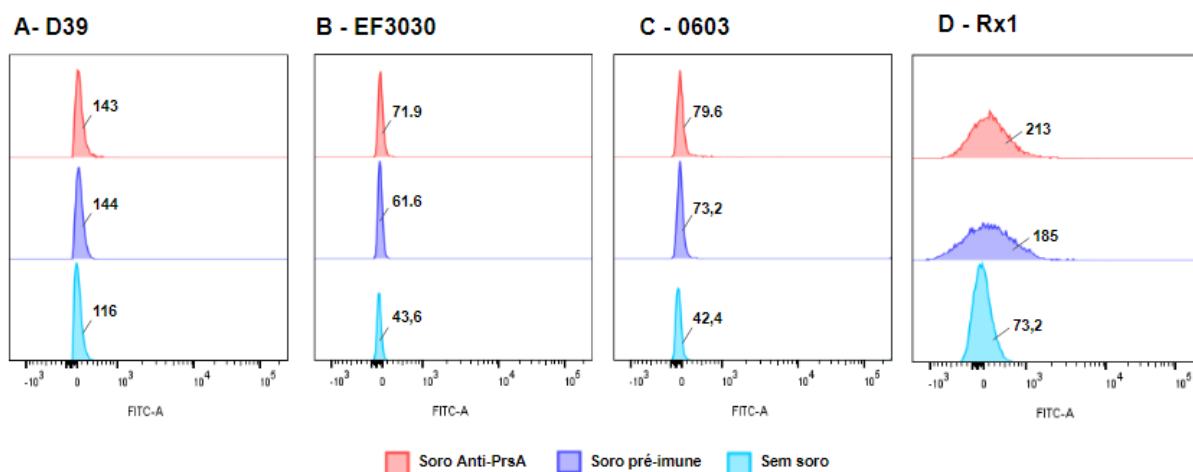
#### 4.7. Análise da ligação de anticorpos à superfície de pneumococo.

Uma vez que os anticorpos foram capazes de reconhecer as proteínas MalX e PrsA expressas pelos pneumococos, decidimos avaliar a ligação dos anticorpos à superfície das bactérias, uma vez que estes dois antígenos são lipoproteínas presentes nas membranas. Para isso, foi realizado um ensaio de ligação de anticorpos à superfície de pneumococo, utilizando um anticorpo secundário conjugado a FITC e análise por citometria de fluxo. A mediana da intensidade de fluorescência das curvas foi comparada. As linhagens de pneumococo utilizadas foram D39, EF3030, 0603 e Rx1. Soros pré-imune e apenas as bactérias sem soro foram utilizados como controles negativos. Os resultados demonstraram que anticorpos anti-MalX (Figura 22) e anti-PrsA (Figura 23) não foram capazes de se ligar à superfície das linhagens D39, EF3030 e 0603, indicando, portanto, que MalX e PrsA não estão expostas na superfície dessas bactérias. No entanto, é possível observar na Figura 22D que os anticorpos anti-MalX foram capazes de se ligarem à superfície da linhagem Rx1, esta que não apresenta cápsula. Portanto, é possível que a cápsula polissacarídica das bactérias atrapalhe a exposição dos antígenos, impedindo a ligação do anticorpo. Por outro lado, anticorpos anti-PrsA não foram capazes de se ligarem à superfície da linhagem Rx1 (Figura 23D), sendo necessária a realização de novos ensaios para melhor avaliação.



**Figura 22.** Análise da ligação de anticorpos à superfície de pneumococo por citometria de fluxo. Soro de animais imunizados com MalX1 foram testados nas linhagens D39 (A), EF3030 (B), 0603 (C) e Rx1 (D). Controle negativo: bactéria sem soro ou soro pré-imune. Os números indicam a mediana de intensidade de fluorescência para as curvas.





**Figura 23.** Análise da ligação de anticorpos à superfície de pneumococo por citometria de fluxo. Soro de animais imunizados com PrsA foram testados nas linhagens D39 (A), EF3030 (B), 0603 (C) e Rx1 (D). Controle negativo: bactéria sem soro ou soro pré-imune. Os números indicam a mediana de intensidade de fluorescência para as curvas.

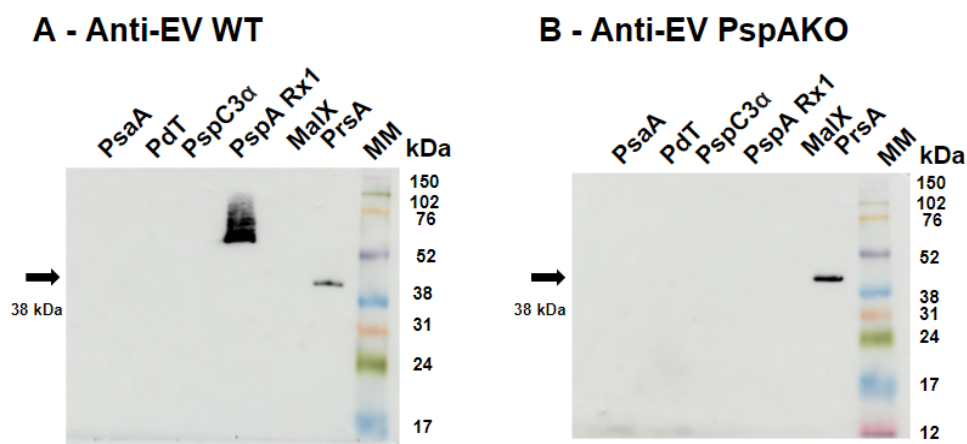
Estudo feito por Abeyta e colaboradores demonstrou que diferenças na composição da cápsula polissacarídica de pneumococo alteram a exposição dos componentes da superfície bacteriana, e dessa forma, afetam a ligação de anticorpos aos antígenos e a deposição de C3b [33]. De fato, antígenos como PsaA ou PpmA (PrsA), apesar de terem papel protetor em algumas formulações não estão expostos à superfície bacteriana, sendo escondidos pela cápsula polissacarídica [34]. Esses dados corroboram com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que os anticorpos anti-MalX foram capazes de se ligar somente à superfície da linhagem de pneumococo defectiva para a expressão de cápsula (Rx1).

#### 4.8. Avaliação da reatividade de soros de camundongos imunizados com EVs de pneumococo contra as proteínas MalX e PrsA

Em estudo feito por Narciso e colaboradores, foi proposto que PspA, por ser altamente imunogênica, poderia ocultar a resposta imunológica contra outros antígenos proteicos. Nesse trabalho, ao imunizar camundongos com partículas de membranas defectivas para a expressão de PspA (derivadas da linhagem TIGR4), os autores observaram proteção de 80%, 60% e 100% em desafios contra pneumococo de sorotipo 4, 3 e 1, respectivamente. As proteínas reconhecidas pelos soros dos animais em lisados de TIGR4 em ensaios de western-blot, foram analisadas por imunoprecipitação associada à espectrometria de massas, revelando maiores pontuações para as lipoproteínas MalX e PrsA, enquanto que para o soro dos animais imunizados com as partículas de membrana da linhagem de TIGR4 selvagem a proteína com pontuação predominante foi PspA, sendo reconhecido também MalX, porém com menor pontuação. Além disso, ao comparar a sobrevivências do animais imunizados

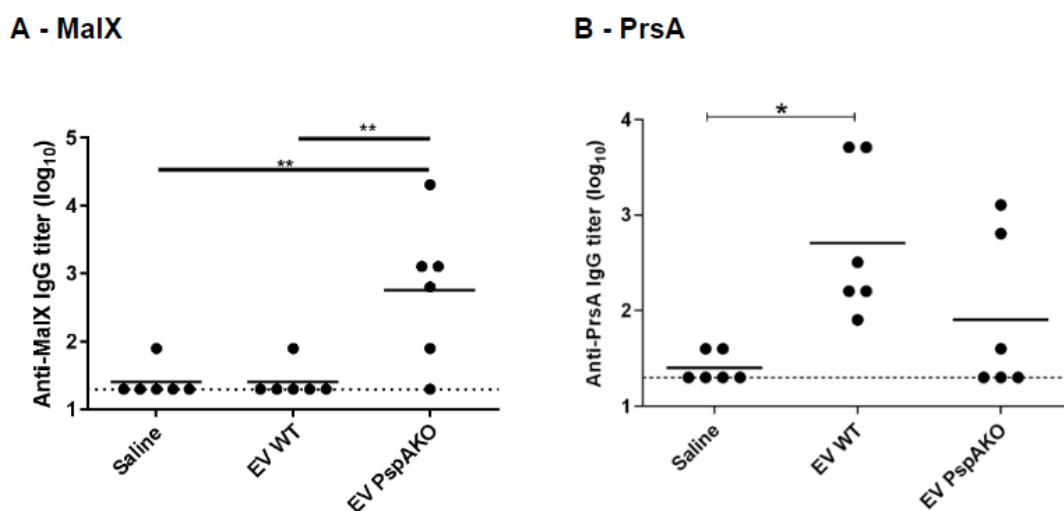
com partículas de membrana selvagem com animais imunizados com três mutantes defectivos para as proteínas estudadas (PspA e MalX, PspA e PrsA, MalX e PrsA) foi observada uma diminuição na proteção de animais imunizados com partículas mutantes, indicando que as duas lipoproteínas, MalX e PrsA, seriam importantes antígenos para a proteção contra infecção pneumocócica [28]. Dessa forma, as proteínas MalX (MalX1) e PrsA produzidas neste projeto foram testadas quanto à reatividade com soros de camundongos imunizados com vesículas extracelulares (EVs) derivadas da linhagem de pneumococo R6 selvagem (EV WT) e com EVs derivadas da linhagem de pneumococo knockout para a proteína PspA (EV PspAKO). Este experimento foi realizado em colaboração com a aluna de doutorado, Giovanna de Brito Carneiro. Diferentes proteínas recombinantes de pneumococo, como PsaA (Antígeno A da Superfície de pneumococo), PdT (Pneumolisina detoxificada), PspC3a (região N-terminal de PspC – Proteína C da superfície de pneumococo do grupo 3), PspA Rx1 (região N-terminal de PspA da linhagem Rx1, clado 2), MalX e PrsA foram transferidos para membranas de nitrocelulose, estas foram incubadas com soro anti-EV WT e soro anti-EV PspAKO). Na Figura 24 é possível notar, como indicado pelas setas, que ambos os soros foram capazes de reconhecer a proteína PrsA, demonstrando que esta proteína está presente nas EVs e é imunogênica nestas preparações.

Além de PrsA, apenas PspA foi reconhecido pelo soro anti-EVWT entre as proteínas analisadas. Não houve reconhecimento da proteína MalX. Este resultado pode indicar que a proteína MalX não está presente nas EVs derivadas da linhagem R6 de pneumococo ou é pouco imunogênica, não havendo anticorpos que a reconheçam no soro dos animais imunizados.



**Figura 24.** Análise de reconhecimento das proteínas recombinantes, MalX e PrsA, pelos soros dos animais imunizados com EVs de pneumococo, por western-blot. Membrana incubada com soro anti-EV WT (A) e membrana incubada com soro anti-EV PspAKO (B). As setas indicam a banda de tamanho aproximado de 38kDa referente a PrsA. MM = Marcador de Massa Molecular (Amershan ECL Rainbow Marker - Full Range [Cytiva]).

Assim como nos ensaios de western-blot, soro de animais imunizados com EV WT e EV PspAKO foram analisados quanto à reatividade contra as proteínas recombinantes por ELISA. Na Figura 25A é possível notar que o soro anti-EV PspAKO apresentou níveis significativos de IgG contra MalX em comparação aos soros dos camundongos inoculados com salina ou EV WT. Este resultado diverge do observado por Western-blot e deve ser confirmado. Por outro lado, na Figura 25B observa-se que animais imunizados tanto com EV WT como com EV PspAKO apresentaram anticorpos que reconhecem a proteína PrsA, sendo significativamente mais altos no grupo imunizado com EV WT.



**Figura 25.** Indução de IgG anti-MalX e anti-PrsA em camundongos BALB/c imunizados com EV WT e EV PspAKO. Níveis de anticorpos IgG contra a proteína recombinante MalX (A) e níveis de anticorpos IgG contra a proteína recombinante PrsA (B). Os símbolos circulares indicam os soros individuais.

Apesar das diferenças entre os resultados obtidos dos ensaios de western-blot e ELISA em relação à MalX, dados da literatura obtidos de análises proteômicas e de western-blot demonstraram que EVs de diferentes isolados e sorotipos de pneumococo, incluindo a linhagem R6, apresentam MalX em sua composição [24,35]. Além disso, o soro de animais imunizados com MalX recombinante e o soro de amostras de pacientes infectados com pneumococo foram capazes de reconhecer MalX em ensaios de western-blot contra EVs derivadas de diferentes linhagens de pneumococo [24]. Similarmente, soro de animais imunizados com partículas de membrana, provenientes da linhagem TIGR4 de pneumococo, reagiram com bandas de tamanhos equivalentes aos de MalX e PrsA em ensaios de western-blot contra lisados de TIGR4, sendo a identidade das proteínas confirmada posteriormente por espectrometria de massas [28]. Dessa forma, os resultados apresentados na Figura 25 estão de acordo com os dados encontrados em outros estudos.

## 5. Conclusões

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que a expressão e a purificação das proteínas MalX e PrsA ocorreram de forma satisfatória e eficiente. Análises dos soros dos animais imunizados com as proteínas recombinantes evidenciaram que MalX e PrsA são capazes de induzir altos títulos de anticorpos IgG anti-MalX e anti-PrsA e de reconhecer essas proteínas. Da mesma forma, as análises de western-blot dos soros contra os extratos proteicos demonstraram que as proteínas MalX e PrsA estão presentes em diferentes linhagens de pneumococo, confirmando que são conservadas e dessa forma, podem ser bons candidatos para a formulação de vacinas que induzam resposta imune contra diferentes sorotipos de pneumococo. Os ensaios de ligação indicaram que a cápsula polissacarídica do pneumococo afeta a acessibilidade dos anticorpos à proteína MalX presentes na superfície da bactéria. Além disso, os soros dos animais imunizados com EVs derivadas da linhagem R6 reagiram com PrsA em ensaios de western-blot, e com PrsA ou MalX em ensaios de ELISA, indicando a presença e imunogenicidade dessas proteínas na EVs. Desse modo, os resultados obtidos irão contribuir, em estudos futuros, para a avaliação de MalX e PrsA como candidatos vacinais contra infecções causadas por *S. pneumoniae*, assim como para a caracterização das vesículas extracelulares de pneumococo.

## 6. Referências

1. KIM, Jae Soo *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of streptococcus pneumoniae isolated from clinical samples in the past 8 years in Korea. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1-9, 2021.
2. BROOKS, Lavidia RK; MIAS, George I. Streptococcus pneumoniae's virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1366, 2018.
3. ADEGBOLA, Richard A. *et al.* Carriage of Streptococcus pneumoniae and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e103293, 2014.
4. TURNER, Paul *et al.* Improved detection of nasopharyngeal cocolonization by multiple pneumococcal serotypes by use of latex agglutination or molecular serotyping by microarray. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1784-1789, 2011.
5. KLEIN, Jerome O. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. **Reviews of infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. 246-253, 1981.
6. GENO, K. Aaron *et al.* Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 871-899, 2015.
7. PATON, James C.; TRAPPETTI, Claudia. Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec.gpp3-0019-2018, 2019.
8. SU, Tong *et al.* Decoding capsule synthesis in Streptococcus pneumoniae. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 4, p. fuaa067, 2021.
9. IKUTA, Kevin S. *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221-2248, 2022.
10. MIYAJI, Eliane Namie *et al.* Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 3303-3326, 2013.
11. FELDMAN, Charles; ANDERSON, Ronald. Recent advances in the epidemiology and prevention of Streptococcus pneumoniae infections. **F1000Research**, v. 9, 2020.
12. WEISER, Jeffrey N.; FERREIRA, Daniela M.; PATON, James C. Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 355-367, 2018.
13. GANAIE, Feroze *et al.* A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral streptococcus. **MBio**, v. 11, n. 3, p. 10.1128/mbio.00937-20, 2020.

14. WEINBERGER, Daniel M.; MALLEY, Richard; LIPSITCH, Marc. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **The Lancet**, v. 378, n. 9807, p. 1962-1973, 2011.
15. DOS SANTOS, Silvia R. *et al.* Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine**, v. 31, n. 51, p. 6150-6154, 2013.
16. ANDRADE, Ana Lucia *et al.* Direct effect of 10-valent conjugate pneumococcal vaccination on pneumococcal carriage in children Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98128, 2014.
17. DOMINGUES, Carla Magda Allan S. *et al.* Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **The lancet Respiratory medicine**, v. 2, n. 6, p. 464-471, 2014.
18. AGUDELO, Clara Inés *et al.* The direct effect of pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in children in the Latin American and Caribbean region (SIREVA 2006–17): a multicentre, retrospective observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 405-417, 2021.
19. CHOI, Eun Hwa *et al.* Capsular polysaccharide (CPS) release by serotype 3 pneumococcal strains reduces the protective effect of anti-type 3 CPS antibodies. **Clinical and Vaccine immunology**, v. 23, n. 2, p. 162-167, 2016.
20. SILVA-COSTA, Catarina *et al.* Pediatric complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in 13-valent pneumococcal conjugate vaccinees, Portugal, 2010–2015. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 7, p. 1307, 2018.
21. GROVES, Natalie *et al.* Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in England and Wales: a major vaccine evader. **Genes**, v. 10, n. 11, p. 845, 2019.
22. BRANDILEONE, Maria-Cristina C. *et al.* Distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and 5 years after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**, v. 36, n. 19, p. 2559-2566, 2018.
23. JHA, Vibha; JANOFF, Edward N. Complementary role of CD4+ T cells in response to pneumococcal polysaccharide vaccines in humans. **Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 18, 2019.
24. OLAYA-ABRIL, Alfonso *et al.* Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of proteomics**, v. 106, p. 46-60, 2014.
25. MEHANNY, Mina *et al.* Streptococcal extracellular membrane vesicles are rapidly internalized by immune cells and alter their cytokine release. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 80, 2020.
26. CODEMO, Mario *et al.* Immunomodulatory effects of pneumococcal extracellular vesicles on cellular and humoral host defenses. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e00559-18, 2018.

27. YERNENI, Saigopalakrishna S. et al. Pneumococcal extracellular vesicles modulate host immunity. **MBio**, v. 12, n. 4, p. 10.1128/mbio.01657-21, 2021.
28. NARCISO, Ana Rita *et al.* Membrane particles evoke a serotype-independent cross-protection against pneumococcal infection that is dependent on the conserved lipoproteins MalX and PrsA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 23, p. e2122386119, 2022.
29. NIETO, Concepción; ESPINOSA, Manuel; PUYET, Antonio. The maltose/maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae*: differential promoter regulation by the transcriptional repressor MalR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 49, p. 30860-30865, 1997.
30. OGUNNIYI, Abiodun D. et al. Identification of genes that contribute to the pathogenesis of invasive pneumococcal disease by in vivo transcriptomic analysis. **Infection and immunity**, v. 80, n. 9, p. 3268-3278, 2012.
31. OVERWEG, Karin et al. The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae* is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4180-4188, 2000.
32. RAMOS, C. R. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 1103-1109, 2004.
33. ABEYTA, Melanie; HARDY, Gail G.; YOTHER, Janet. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 218-225, 2003.
34. GOR, Dennis O. et al. Relationship between surface accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 3, p. 1304-1312, 2005.
35. CHOI, Chi-Won *et al.* Potential usefulness of *Streptococcus pneumoniae* extracellular membrane vesicles as antibacterial vaccines. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1 - Sequência dos genes codificantes das proteínas MalX e PrsA

#### Sequência do gene *malX* - *Streptococcus pneumoniae* R6

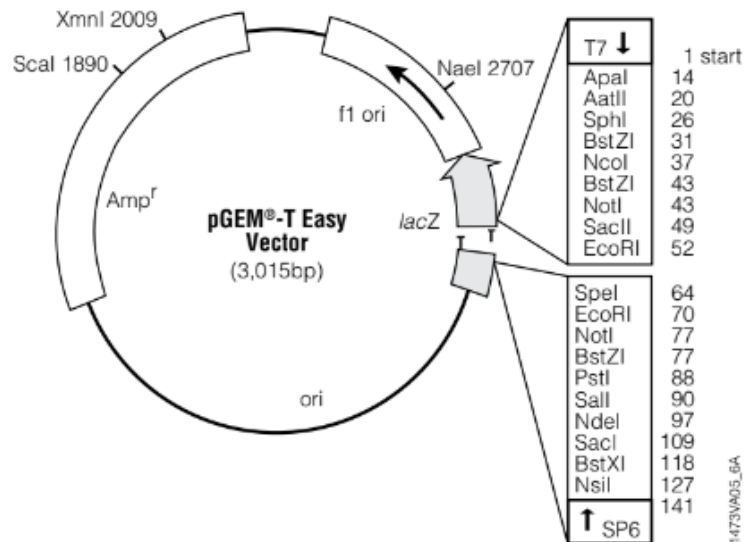
>ATGTCATCTAAATTTATGAAGAGCACTGCGGTGCTTGGAACTGTTACTTGTAGCTTGGCTTTTGGTAGCTTGCAGAAAGCAAACTGCTGATAA  
GCCTGCTGATTCTGGTTCATCTGAAGTCAAAGAAGCTCACTGTATATGTAGACGAGGGATATAAGAGCTATATTGAAGAGGTTGCTAAAGCTTATGAA  
AAAGAAGCTGGAGTAAAAGTCACTCTTAAAAGCTGGTATGCTCTAGGAGGTCTTGATAAACTTTCTCTTGACAACCAATCTGGTAATGTCCCTGAT  
GTTATGATGGCTCCATACGACCGTGTAGGTAGCCTTGGTTCTGACGGACAACCTTCAGAAAGTAAATGAGCGATGGTGCTAAAACAGACGACAC  
AACTAAATCTCTGTAAACAGCTGCTAATGGTAAAGTTTACGGTGTCTCTGCCGTTATCGAGTCACTTGTATGTACTACAACAAAGACTTGGTGAAA  
GATGCTCCAAAAACATTTGCTGACTTGGAAAACCTTGCTAAAGATAGCAAATACGCATTGCTGGTGAAGATGGTAAAACACTACTGCCTTCTAGCT  
GACTGGACAAACTTCTACTATACATATGGACTTCTTGGCCGTAACGGTGTCTACGCTTTTGGCCAAAACGGTAAAGACGCTAAAGACATCGGTCTT  
GCAAACGACGGTCTATCGCAGGTATCAACTACGCTAAATCTTGGTACGAAAAATGGCCTAAAGGTATGCAAGATACAGAAGGTGCTGGAAAACCT  
AATCCAACTCAATCCAAGAAGGTAAAACAGCTGCTATCATCGACGGACCTTGGAAAAGCTCAAGCCTTTAAAGATGCTAAAGTAAACTACGGAG  
TTGCAACTATCCAACTCTCCAAATGGAAAAGAATATGCTGCATTGCTGGTGGTAAAGCTTGGGTCATTCTCAAGCCGTTAAGAACCTTGAAG  
CTTCTCAAAAATTTGAGACTTCTTGTGCAACTGAACAACAAAAAGTATTATATGATAAGACTAACGAAATCCCAGCTAATACTGAGGCTCGTTC  
ATACGCTGAAGGTAAAACAGTATGAGTTGACAACAGCTGTTATCAAACAGTTCAGAAACACTCAACCACTGCCAAACATCTCTCAAATGTCTGCAG  
TTTGGGATCCAGCGAAAAATATGCTCTTTGATGCTGTAAGTGGTCAAAAAGATGCTAAAACAGCTGCTAACGATGCTGTAACATTGATCAAAGAAA  
CAATCAAACAAAAATTTGGTGAATAA

#### Sequência do gene *prsA* - *Streptococcus pneumoniae* R6

>ATGAAGAAAAAATTATTGGCAGGTGCCATCACACTATTATCAGTAGCAACTTTAGCAGCTTGTTCGAAAGGGTCAAGAGGAGCAGACCTTATCAG  
CATGAAAGGGGATGTCATCACAGAACATCAATTTTATGAGCAAGTGAAAAACAACCTTCAGCCCAACAAGTCTTGTAAATATGACCATCCAAA  
AAGTTTTTGAAAAACAATATGGCTCAGAGCTTGATGATAAAGAGGTTGATGATACTATTGCCGAAGAAAAAAAACAATATGGCGAAAACTACCAA  
CGTGTCTTGTACAAGCAGGTATGACTCTTGAACACGTAAAGCTCAAATTCGTACAAGTAAATTAGTTGAGTTGGCAGTTAAGAAGGTAGCAGA  
AGCTGAATTGACAGATGAAGCCTATAAGAAAGCCTTTGATGAGTACACTCCAGATGTAACGGCTCAAATCATCCGCTTAATAATGAAGATAAGGC  
CAAAGAAGTTCTCGAAAAAGCCAAGGCAGAAGGTGCTGATTTGCTCAATTAGCCAAAGATAATTCAACTGATGAAAAACAAAAGAAAATGGT  
GGAGAAATTACCTTTGATTCTGCTTCAACAGAAGTACCTGAGCAAGTCAAAAAGCCGCTTTCGCTTTAGATGTGGATGGTGTCTGATGTGATT  
ACAGCAACTGGCACACAAGCCTACAGTAGCCAATATTACATTGTAACACTCACTAAGAAAAACAGAAAAATCATCTAATATTGATGACTACAAAGAA  
AAATTAACAACTGTTATCTTGACTCAAAAACAAAATGATTCACATTTGTTCAAAGCATTATCGGAAAAGAATTGCAAGCAGCCAATATCAAGGTT  
AAGGACCAAGCCTCCAAAATATCTTTACCCAATATATCGGTGGTGGAGATTCAAGCTCAAGCAGTAGTACATCAAACGAATAG

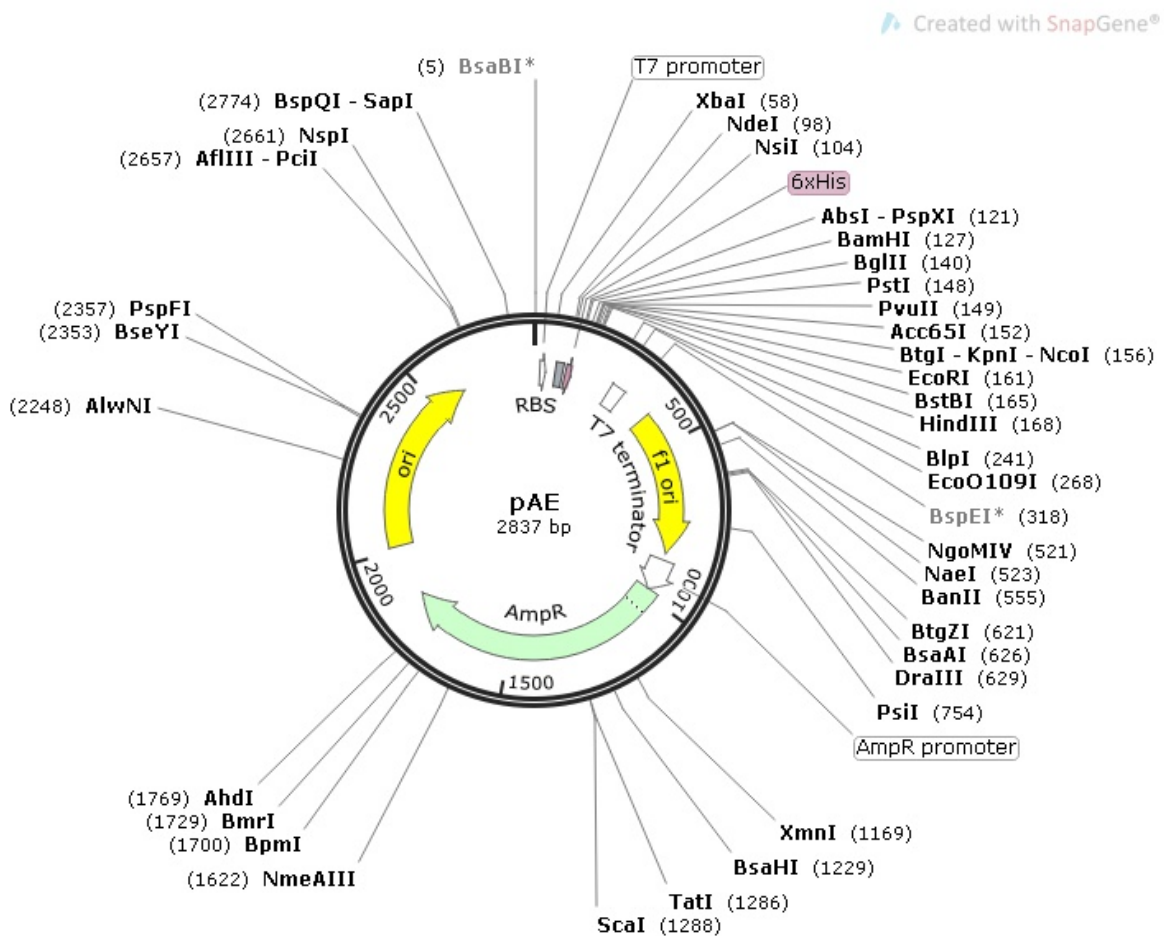


## ANEXO 2 - Mapa do vetor pGEM-T easy (Promega)



Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM-T easy com sítios de restrição. Fonte: Manual do fabricante (Promega).

### ANEXO 3 - Mapa do vetor pAE



Representação esquemática do vetor de expressão pAE com sítios de restrição. Figura construída com o software SnapGene.

## ANEXO 4 - Certificado Comitê de Ética Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan



### Comissão de Ética no Uso de Animais

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Vesículas Extracelulares de Streptococcus pneumoniae como adjuvantes para antígenos proteicos", protocolada sob o CEUA nº 1657030921 (ID 002424), sob a responsabilidade de **Maria Leonor Sarno de Oliveira e equipe; Giovanna de Brito Carneiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 22/09/2021.

We certify that the proposal "Streptococcus pneumoniae Extracellular Vesicles as adjuvants to protein antigens", utilizing 126 Isogenics mice (126 females), protocol number CEUA 1657030921 (ID 002424), under the responsibility of **Maria Leonor Sarno de Oliveira and team; Giovanna de Brito Carneiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 09/22/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 10/2021 a 03/2025 Área: **Biotecnologia**

Origem:	Biotério Externo	sexo:	Fêmeas	idade:	6 a 8 semanas	N:	126
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 24 g		
Linhagem:	BALB/c						

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Bacteriologia 2

São Paulo, 09 de junho de 2022

Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

Nancy Oguiura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

**CERTIFICADO : EMENDA** v07/03/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 07/03/2023) da proposta intitulada "Vesículas Extracelulares de Streptococcus pneumoniae como adjuvantes para antígenos proteicos", CEUA nº 1657030921 (ID 032420), sob a responsabilidade de **Maria Leonor Sarno de Oliveira e equipe; Katharyne Chinaia; Giovanna de Brito Carneiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilho Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo (CEUAIB) em 01/04/2023.

Término previsto: 03/2025

Origem: Biotério Externo

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 6 a 8 semanas

Quantidade  
solicitada: 12

Linhagem: BALB/c

Peso: 20 a 24 g

**ANIMAIS UTILIZADOS**

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos isogênicos	Fêmeas	138	0

São Paulo, 20 de abril de 2023



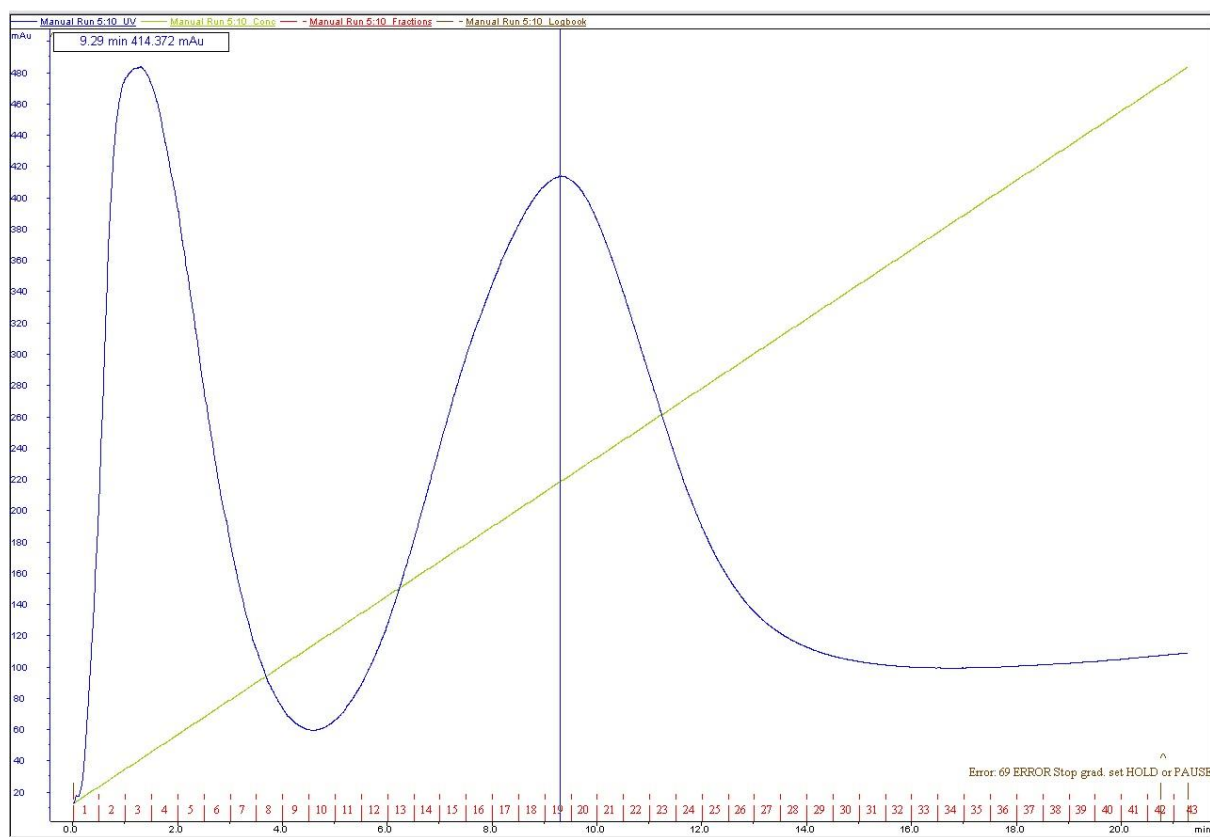
Luís Roberto de Camargo Gonçalves  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo

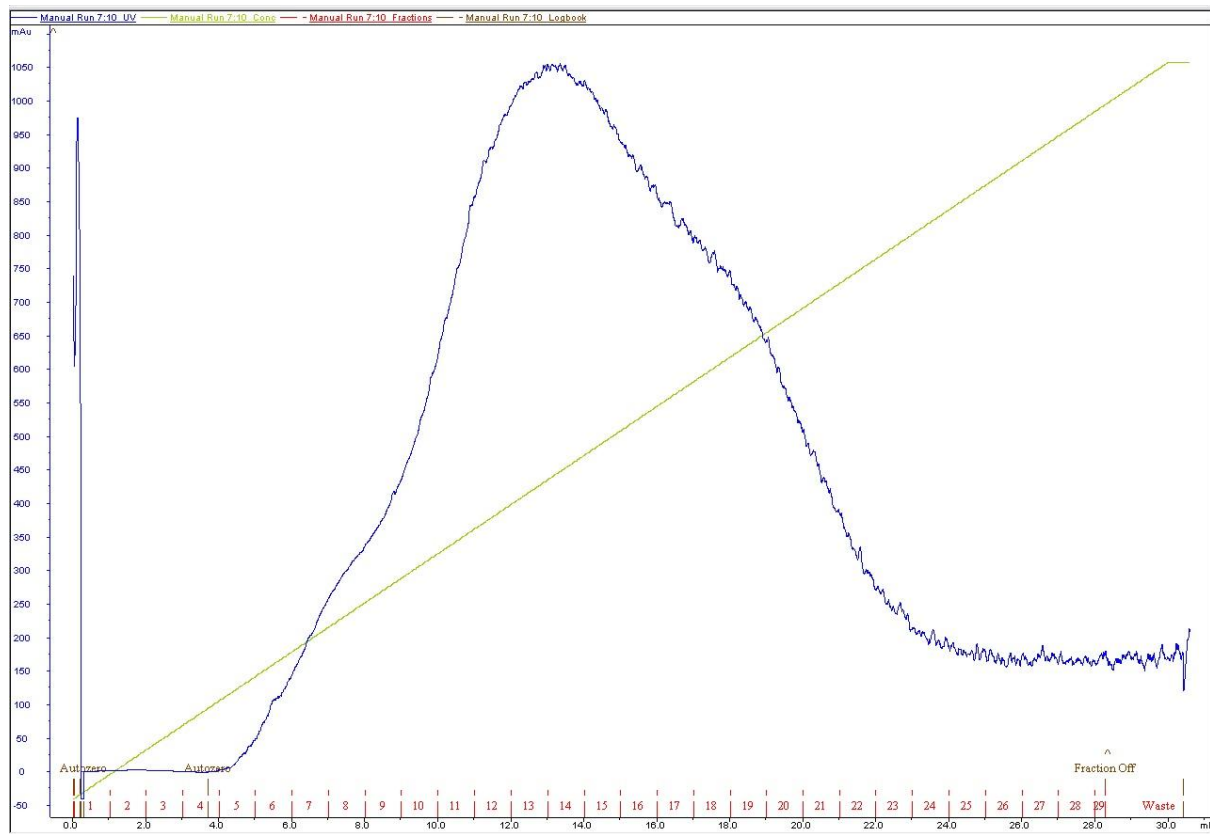


## ANEXO 5 - Cromatograma da eluição de MalX no equipamento AKTA Prime Plus



Cromatograma da purificação da proteína recombinante MalX. O eixo Y indica a absorbância a 280 nm e o eixo X indica as frações coletadas durante a eluição. A curva em azul representa a leitura de absorbância e a linha em verde representa o gradiente de concentração de imidazol.

## ANEXO 6 - Cromatograma da eluição de PrsA em equipamento AKTA Prime Plus



Cromatograma da purificação da proteína recombinante PrsA. O eixo Y indica a absorbância a 280 nm e o eixo X indica as frações coletadas durante a eluição. A curva em azul representa a absorbância e a linha em verde representa o gradiente de concentração de imidazol.