

MAYSA SANTOS BARBOSA

**Proteínas de superfície de *Mycoplasma agalactiae* atuam como adesinas,
interagem com proteínas do hospedeiro e ativam vias de dano ao DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Versão corrigida

São Paulo
2021

RESUMO

BARBOSA, M. S. **Proteínas de superfície de *Mycoplasma agalactiae* atuam como adesinas, interagem com proteínas do hospedeiro e ativam vias de dano ao DNA.** 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Agalaxia contagiosa (AC) afeta pequenos ruminantes, é classificada pela *World Organisation for Animal Health* (OIE) como doença de notificação obrigatória devido ao impacto econômico significativo sobre a produção de ovinos e caprinos. *Mycoplasma agalactiae* é o principal causador dessa doença e apesar do progresso nos estudos sobre métodos diagnósticos, terapêuticos e de prevenção, as estratégias ainda permanecem ineficientes no controle da AC. O presente estudo teve como objetivo caracterizar funcionalmente proteínas de membrana de *M. agalactiae* como adesinas e avaliar a interação destas com moléculas e células do hospedeiro. Três proteínas de *M. agalactiae* (P40 - controle positivo -, MAG_1560 e MAG_6130), caracterizadas *in silico* como proteínas da membrana antigênicas, foram expressas em *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) *One Shot* e purificadas em uma coluna de afinidade. Posteriormente, coelhos foram imunizados com proteínas recombinantes para a produção de anticorpos policlonais. A localização das proteínas no micro-organismo foi avaliada por *colony blotting* e *western blotting* após fracionamento da fase TX-114. Para avaliar se as proteínas recombinantes são adesinas, foram realizados ensaios de adesão à células HeLa e estromais mamárias primárias de ovelhas (*sheep primary mammary stromal cells* - MSC). Os resultados obtidos confirmaram MAG_1560 e MAG_6130 como lipoproteínas, como a citoadesina P40. As proteínas P40, MAG_1560 e MAG_6130 também demonstraram citotoxicidade ao diminuir a viabilidade celular e aumentar a expressão de genes relacionados às vias de reparo do DNA e genes pró-apoptóticos. Para avaliar a interação destas proteínas com moléculas do hospedeiro realizou-se ensaio de adesão ao plasminogênio, fibrinogênio, lactoferrina e fibronectina. Além disso, este estudo demonstrou que as proteínas MAG_6130 e MAG_1560 tem capacidade de aderir às células eucarióticas e a adesão dessas proteínas às células pode ser inibida por anti-soro específico por ao menos uma metodologia. Além disso, P40 interage significativamente com plasminogênio, e em geral, P40, MAG_6130 e MAG_1560 exibiram ligação significativa à lactoferrina, fibrinogênio e fibronectina, uma característica que poderia potencialmente apoiar o patógeno na colonização do hospedeiro, migração de tecido e evasão imune. Ainda assim, mais estudos serão necessários para estabelecer mais claramente a relação entre P40, MAG_1560 e MAG_6130 e seus efeitos no hospedeiro. Dessa forma, demonstra-se que essas proteínas estão envolvidas na citoadesão e

contribuem para a patogenicidade bacteriana das células hospedeiras. Entretanto, ainda não está claro como essas proteínas ativam o sistema imune e qual a via de reparo de DNA é ativada. Os resultados deste estudo contribuem na melhor compreensão da função das moléculas de superfície em micoplasmas e o papel destas durante a infecção.

Palavras-chaves: *Mollicutes*. Proteínas de membrana. Adesão. Matriz extracelular. Dano ao DNA.

ABSTRACT

BARBOSA, M. S. **Surface proteins from *Mycoplasma agalactiae* act as adhesins, interact with host proteins and activate DNA damage pathways.** 2021. 114 p. Thesis (Ph.D. thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Contagious agalaxia (CA) affects small ruminants and is classified by the World Organization for Animal Health (OIE) as a notifiable disease due to its significant economic impact on livestock. *Mycoplasma agalactiae* is the main cause of this disease and despite the progress in studies on diagnostic, therapeutic and prevention methods, strategies still remain ineffective in controlling CA. The present study aimed to functionally characterize *M. agalactiae* membrane proteins as adhesins and evaluate their interaction with host molecules and cells. Three *M. agalactiae* proteins (P40 - positive control -, MAG_1560 and MAG_6130), characterized *in silico* as antigenic membrane proteins, were expressed in *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) *One Shot* and purified on affinity column. Subsequently, rabbits were immunized with recombinant proteins to produce polyclonal antibodies. The location of proteins in the microorganism was evaluated by colony blotting and western blotting after fractionation of the TX-114 phase. To assess whether the recombinant proteins are adhesins, adhesion assays to HeLa cells and sheep primary mammary stromal cells (MSC) were performed. The results obtained confirmed MAG_1560 and MAG_6130 as lipoproteins, such as the cytoadhesin P40. Proteins P40, MAG_1560 and MAG_6130 also demonstrated cytotoxicity by decreasing cell viability and increasing the expression of genes related to DNA repair pathways and pro-apoptotic genes. In order to assess whether these proteins interact with host molecules, adhesion to plasminogen, fibrinogen, lactoferrin and fibronectin was evaluated. Furthermore, this study demonstrated that MAG_6130 and MAG_1560 proteins have the ability to adhere to eukaryotic cells and the adhesion of these proteins to cells can be inhibited by specific antiserum using at least one methodology. P40 interacts significantly with plasminogen, and in general, P40, MAG_6130 and MAG_1560 exhibited significant binding to lactoferrin, fibrinogen and fibronectin, a feature that could potentially support the pathogen in host colonization, tissue migration and immune evasion. However, more studies are needed to more clearly establish the relationship between P40, MAG_1560 and MAG_6130 and their effects on hosts. Thus, it is shown that these proteins are involved in cytoadhesion and contribute to the bacterial pathogenicity of host cells, however, it is still unclear how these proteins activate the immune system and what is the induced DNA repair pathway. With the results of this study, we hope to

better understand the function of surface molecules in mycoplasmas and their role during infection.

Keywords: *Mollicutes*. Membrane proteins. Adhesion. Extracellular matrix. DNA damage.