

*Desenvolvimento de vacinas recombinantes contra *Vibrio* spp.
usando um canal da membrana externa como alvo*

Rafaela Seabra

2021

*Desenvolvimento de vacinas recombinantes contra *Vibrio spp.*
usando um canal da membrana externa como alvo*

Rafaela Seabra

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Ricardo S. Vieira Pires [nome] e
coorientação da Doutora Clélia Neves

2021

Título: Desenvolvimento de vacinas recombinantes contra *Vibrio spp.* usando um canal da membrana externa como alvo.

Copyright © Rafaela Videira Seabra

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2020

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

The present work was performed in the Structural Biotechnology Group of the Center for Neuroscience and Cell Biology (UC-Biotech - CNC), headed and under scientific guidance of Doctor Ricardo S. Vieira-Pires.

This work was co-funded by Portuguese national funds via the Foundation for Science and Technology (FCT) and by the European Social Fund (ESF) through Human Potential Operational Programme (POPH) under grant IF/00123/2013 and the European Regional Development Fund (ERDF) through Operational Programme for Competitiveness and Internationalisation (COMPETE 2020) under the projects POCI-01-0145-FEDER030550 (PTDC/BTM-SAL/30550/2017; BYDRUG), UIDB/04539/2020 and UIDP/04539/2020 (CIBB). Private funds from the company HBT - Saúde e Biotecnologia Lda (Portugal) also supported the work.

Funding:



Abstract

Vibrio is a genus of Gram-negative bacteria that are ubiquitous in aquatic ecosystems. Vibriosis is a deadly haemorrhagic septicaemic disease and is among the most common diseases leading to massive mortality of culture marine organisms and a well-known cause of severe economic losses in aquaculture industry.

The use of antibiotics has been a common practice also in aquaculture industry, but the global demand for reduction of their use due to Antimicrobial Resistance (AMR) is promoting the quest for alternative control measures. Vaccination is among these control strategies for Vibriosis.

Bacterial secretion systems are responsible in particular for expelling cytotoxic components, namely antibiotics, and play a critical role in the antimicrobial resistance phenomena. In the present work we make use of the outer-membrane channel-tunnel protein TolC, a component of type-I secretion systems, as target protein for recombinant vaccine design. TolCs of different *Vibrio* fish pathogens, were identified and their extracellular loop regions were designed, expressed and purified as recombinant epitopes and further characterized in terms stability and yield. We successfully designed, cloned and purified 8 recombinant epitopes corresponding to the extracellular Loop-1 (L1) and Loop-2 (L2) of the following *Vibrio* fish pathogens: *V.anguillarum* (VAU), *V.parahaemolyticus* (VPK), *V.vulnificus* (VVL) and *V.harveyi* (VHR). All of them presented different aminoacid compositions, ultimately working as unique signatures for each organism.

These novel recombinant products will be the basis for the formulation of vaccines for active immunization of fish hosts, or even for production of antibodies for passive immunization. Additionally, antibodies derived from these vaccines can be used for *Vibrio* fish pathogens' monitoring and diagnostics.

Keywords: Tolc; recombinant vaccines, IgY antibodies, aquaculture

Resumo

Vibrio é um género de bactérias Gram-negativas ubíquas nos ecossistemas aquáticos. A Vibriose é uma doença hemorrágica septicémica mortal e está entre as doenças mais comuns que levam à mortalidade em massa de organismos marinhos de cultivo, sendo uma causa bem conhecida de graves perdas económicas na indústria de aquacultura.

O uso de antibióticos tem sido uma prática comum também nesta indústria da aquacultura, mas a demanda global pela redução do seu uso devido ao fenómeno da resistência aos antimicrobianos tem promovido o desenvolvimento de medidas alternativas de control. A vacinação está entre essas estratégias de control da Vibriose.

Os sistemas de secreção bacteriana são responsáveis em particular pela expulsão de componentes citotóxicos, nomeadamente antibióticos, e desempenham um papel crítico nos fenómenos de resistência aos antimicrobianos. No presente trabalho, utilizámos a proteína canal-túnel TolC da membrana externa, um componente dos sistemas de secreção do tipo I, como proteína alvo para o desenho de vacinas recombinantes. As proteínas TolCs de diferentes patógenos *Vibrio* de peixes foram identificadas e suas regiões extracelulares foram desenhadas expressas e purificadas como epítomos recombinantes e posteriormente caracterizadas em termos de estabilidade e rendimento de produção. Foram desenhados, clonamos e purificamos com sucesso 8 epítomos recombinantes correspondentes aos Loop-1 (L1) e Loop-2 (L2) extracelular dos seguintes patógenos *Vibrio* de peixes: *V.anguillarum* (VAU), *V.paraahaemolyticus* (VPK), *V.vulnificus* (VVL) e *V.harveyi* (VHR). Todos eles apresentavam diferentes composições de aminoácidos, acabando por funcionar como assinaturas únicas para cada organismo.

Esses novos produtos recombinantes serão a base para a formulação de vacinas para imunização ativa de peixes hospedeiros, ou mesmo para produção de anticorpos para procedimentos de imunização passiva. Além disso, os anticorpos derivados dessas vacinas podem ser usados para monitorização e diagnóstico patógenos *Vibrio* de peixes.

Palavras-chave: TolC; vacinas recombinantes; anticorpos IgY ; aquacultura

Índice de matérias

1. Introdução	1
1.1 O género <i>Vibrio</i> : Diversidade e Abundância	3
1.2 Vibrioses: fatores que determinam o seu aparecimento	5
1.2.1 Impacto de vibrioses: na indústria da aquacultura e segurança alimentar	6
1.2.2 Fatores de virulência de <i>Vibrio spp.</i>	8
1.2.2.1 Sistema de secreção bacterianos	11
1.2.2.2 TolC – a proteína canal da membrana externa	13
1.3 Tecnologia IgY	15
1.3.1 Aplicação da tecnologia IgY em organismos marinhos: alternativa aos antibióticos	18
1.4 Objetivo	19
2 Metodologia	21
2.1 Análise bioinformática e desenho racional dos epítomos	21
2.2 Síntese de dados	23
2.3 Clonagem dos epítomos recombinantes	23
2.4 Expressão Proteica	28
2.5 Purificação	29
2.5.1 Cromatografia de troca iónica	29
2.5.2 Cromatografia de Exclusão Molecular	30
3 Resultados e Discussão	31
3.1 Clonagem dos epítomos extracelulares de TolC de diferentes espécies de <i>Vibrio spp.</i>	31
3.2 Expressão heteróloga dos epítomos recombinantes de <i>Vibrio spp.</i>	36
3.3 Purificação dos epítomos recombinantes de <i>Vibrio spp.</i>	38
4 Conclusão	48
5 Bibliografia	49

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação estatística das capturas, produção de aquacultura e consumo de peixe.

Figura 1.2 - Tipos de sistemas de secreção.

Figura 1.3 - Estrutura cristalográfica de E.coli (PDB:1TQQ).

Figura 1.4 - Estruturas cristalográficas da proteína TolC de diferentes bactérias Gram-negativas.

Figura 1.5 - Aspectos gerais relacionados com a tecnologia IgY

Figura 2.1 - Alinhamento de 135 sequências da espécie de *Vibrio* spp.

Figura 2.2 - Estirpes com sequências primárias homólogas às espécies de *Vibrio* spp. selecionadas neste trabalho.

Figura 2.3 - Representação esquemática dos métodos de clonagem utilizados neste trabalho.

Figura 3.1 - Análise em gel de agarose da etapa de linearização das construções codificantes de epítomos de *Vibrio*.

Figura 3.2 - Análise e seleção em gel de agarose de colónias positivas para *V.anguillarum* e *V.parahaemolyticus*.

Figura 3.3 - Confirmação por sequenciação de DNA plasmídico das colónias de *V.anguillarum* e *V.parahaemolyticus*.

Figura 3.4 - Análise da sobreexpressão dos epítomos recombinantes de *V.anguillarum* e *V.parahaemolyticus*.

Figura 3.5 - Cromatografia de troca iónica dos epítomos *V.anguillarum*.

Figura 3.6 - Cromatografia de troca iónica dos epítomos de *V.parahaemolyticus*.

Figura 3.7 - Cromatografia de exclusão molecular dos epítomos de *V.anguillarum* e *V.parahaemolyticus*.

Figura 3.8 - Cromatografia de exclusão molecular dos oito epítomos de *Vibrio spp.* em estudo.

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Exemplos de alguns fatores de virulência de *Vibrio spp.* Tabela.

Tabela 2.1 - Síntese de *Vibrios spp.* selecionados para o trabalho.

Tabela 2.2 - Metodologias de clonagem utilizadas.

Tabela 2.3 - Composição dos tampões usados nas cromatografias na etapa de purificação.

Tabela 3.1 - Análise comparativa das propriedades dos oito epítomos de *Vibrio spp.* em estudo.

1. Introdução

As atividades de pesca correspondem ao ato de captura de organismos marinhos selvagens e tem sido uma atividade central para o consumo humano ao longo de várias gerações. Contudo, devido à captura intensiva, o pico de captura anual foi excedido e os recursos marinhos têm se tornado cada vez menos sustentáveis.

A indústria de aquacultura tem trazido o maior contributo a uma sustentabilidade ao nível de recursos alimentares. Esta indústria corresponde ao cultivo de peixe, marisco e plantas aquáticas e diz respeito ao setor de produção alimentar que cresceu mais rápido, tendo aumentado 6x durante os anos de 2000-2016 (FAO, 2018). Segundo FAO, 2020 a produção de aquacultura continua a crescer a uma taxa média de 7,5% por ano desde 1970. Desde 2000 ao 2017, a indústria de aquacultura cresceu aproximadamente 150% (Möller et al., 2020). Estima-se que a produção total de peixe aumente de 179 milhões de toneladas, como foi observado, em 2018 para 204 milhões de toneladas em 2030.

As estatísticas refletem um contínuo aumento tanto na produção de organismos provenientes de aquacultura como no consumo de pescado provenientes da mesma, comparativamente à pesca (Figura 1.1). Sendo assim, a indústria da aquacultura continua a ser o suporte no crescimento da produção global, auxiliando as atividades de pesca e mantendo o equilíbrio do ecossistema. Desta maneira, com o passar dos anos vamos estar mais dependentes da indústria de aquacultura do que da pesca, de maneira que no ano de 2030 o consumo de organismos provenientes de aquacultura corresponda a 59% e o que provêm das pescas será de 41% (Figura 1.1) (FAO, 2020). Esta dependência já é verificada com o aumento de aquaculturas com regimes de cultivo intensivo, facilitando o aparecimento e propagação de agentes patogénicos, isto leva à necessidade de desenvolver ferramentas que auxiliem o aumento desta indústria de maneira a garantir segurança para os consumidores.

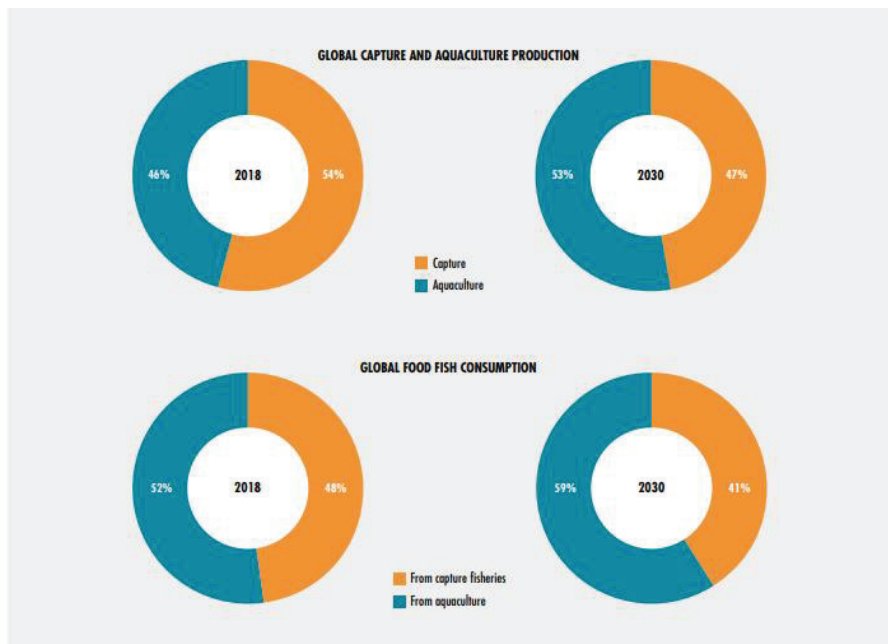


Figura 1.1 - Representação estatística das capturas, produção de aquacultura e consumo de peixe. Previsões estatísticas da captura global e produção por parte da aquacultura desde o ano de 2018 até 2030. Estimando-se que a produção de organismos provenientes de aquacultura aumentará 13% até 2030, enquanto que a captura de organismos selvagens diminuirá 13% no mesmo período de tempo. Relativamente às estatísticas referentes ao consumo de peixe, estima-se que haja um aumento no consumo de organismos provenientes de aquacultura de 7% e uma diminuição proporcional no consumo de peixes capturados. (Imagem retirada de FAO, 2020).

O cultivo de organismos marinhos tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento económico e social em todo o mundo (Novriadi, 2016). A tentativa de expansão, para satisfazer os consumidores, tem trazido uma intensificação extrema desta atividade que trás diversos desafios biológicos, operacionais e ambientais como a promoção do desenvolvimento e proliferação de doenças, escape de peixes, manutenção da saúde dos peixes e dos consumidores (Holmen et. al., 2017). Contudo, atualmente, a população está mais consciente do tipo de alimentação que consome, das características de produção e apresenta maior preocupação com aspetos ambientais. Neste sentido a aquacultura é um meio termo entre o desejo da expansão e conseqüente otimização desta indústria a diversos níveis. Para além do desafio do controlo de doenças em aquaculturas, o surgimento de mais patógenos no ambiente selvagem também tem sido verificado, isto devido a atividades humanas e as alterações climáticas. Desta maneira é de uma relevância extrema compreender os microrganismos marinhos e conhecer melhor a sua

biologia e posteriormente o seu impacto de maneira a criar estratégias eficazes na gestão das aquaculturas assegurando aos consumidores uma segurança alimentar de excelência.

Os microrganismos apresentam uma elevada importância no que diz respeito à manutenção e sustentabilidade de qualquer ecossistema, traduzindo-se num valor indiscutível em ciclos biogeoquímicos no ambiente marinho, envolvendo a cadeia alimentar, ou seja, ciclo de nutrientes, na decomposição de matéria orgânica e no fluxo de carbono no ecossistema marinho (Das & Mangwani, 2015), para além disso apresentam uma capacidade extraordinária de se adaptarem a alterações ambientais.

Nos 71% da superfície da Terra cobertos por água, existe uma elevada diversidade de organismos vivos, não só na superfície das águas mas também em profundidades abissais, águas rasas, desde regiões costeiras a regiões *offshore* e regiões com características gerais e em regiões com condições extremas, como fontes hidrotermais (Das et. al., 2006). Da diversidade existente no ambiente marinho 90% da biomassa de todos os seres vivos no oceano é constituído por células microbianas (O'Dor, 2004), estimando-se que estes representem metade da biomassa terrestre (Whitman et. al., 1998).

O termo microrganismos abrange uma diversidade de organismos, dentro dos quais se incluem, bactérias, vírus, fungos, protistas e que entre eles apresentam elevada diversidade em características morfológicas, ecológicas e fisiológicas (Das et. al., 2006) (Baharum & Mohd Azinuddin Ahmad Mokhtar, 2010). Dentro destes, as bactérias e vírus são os mais comumente associados a doenças em diversas espécies de animais vertebrados e invertebrados bem como plantas marinhas.

1.1 O género *Vibrio*: Diversidade e Abundância

Existem fortes evidências de que os organismos bacterianos marinhos, para além de desempenharem um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos do ecossistema, estão também fortemente envolvidos na cadeia alimentar em sistemas de aquacultura podendo por isso afetar a saúde dos organismos em cultura e eventualmente a saúde dos

consumidores finais (Thompson et. al., 2003). O género *Vibrio* integra patógenos bacterianos que apresentam uma alta taxa de presença em contexto de aquacultura. Para além disso, nos últimos anos devido ao aumento da temperatura da água do mar e mudanças climáticas, a incidência de doenças causadas por *Vibrio* tem aumentado significativamente, representando uma ameaça tanto para aquacultura como para a saúde humana (Huang et. al., 2021). Devido a isto tem sido um dos géneros mais estudados e investigados.

O género *Vibrio* pertence à família *Vibrionaceae* e até aos dias de hoje já foram encontradas e reportadas pelo menos 110 espécies de *Vibrio spp.* (Kokashvili et al., 2015) (Huang et. al., 2021). São bactérias Gram-negativas e considerados organismos quimiotróficos, caracterizando-se como não produtores de endósporos e produtores da sua energia através da respiração celular, anaeróbia facultativa (Frans et. al., 2011). Estes organismos apresentam a forma de bastonetes, tipo vírgula, dão origem a colónias redondas com coloração creme (Frans et al., 2011) e podem ou não ter capacidade de mobilidade, sendo que os que apresentam mobilidade apresentam flagelos polares (Osunla & Okoh, 2017)(Echazarreta & Klose, 2019);

Vibrio é um microrganismo autóctone em diversos ambientes aquáticos e tem um papel importante na manutenção dos mesmos (Osunla & Okoh, 2017). É encontrado em ambientes estuarinos, marinhos e de água doce (Barbieri et. al., 1999) . O género *Vibrio* constitui 60% das bactérias heterotróficas do ambiente aquático totais e pertence a um grupo de organismos halófilos, excluindo *V. cholerae*, visto que podem proliferar em ambientes com elevadas concentrações de sal (30-35 ppt)(Annie Selva Sonia & Lipton, 2012);(Pridgeon & Klesius, 2012). Por outro lado estão também associados a ambientes de temperaturas mais elevadas, sendo organismos termófilos, apresentando crescimento ótimo a temperaturas entre os 25 e 30 °C, embora com maior virulência a temperaturas que rondem os 15 °C (Panagiotis Angelidis, 2015). Considera-se uma população dinâmica que normalmente é afetada pelo clima e fatores sazonais, e desta maneira a sua presença e permanência é sazonal, principalmente devido às oscilações na temperatura da água (Maeda et. al., 2003; Huang et. al., 2021).

Segundo estudo de Verschuere et. al., 2000, este género apresenta capacidade para criar relações simbióticas, com estirpes (e.g *Vibrio pelagius*, *Vibrio alginolyticus*) capazes de

estimular a reprodução e taxas de crescimento de alguns organismos (e.g. moluscos e rotíferos), contribuindo por exemplo para o mecanismo de defesa em Artémias contra infecções causadas por outras bactérias (Sawabe et. al., 2013). Contudo no género *Vibrio*, existem também estirpes virulentas que são responsáveis por sérios problemas em organismos marinhos. Efetivamente, a família *Vibriocinae*, que integra género *Vibrio*, contém patógenos zoóticos e epizoóticos, ou seja, que afetam humanos e organismos do ambiente marinho.

O género *Vibrio* apresenta uma grande diversidade na comunidade bacteriana marinha, refletindo a sua enorme versatilidade metabólica, genética e ecológica. Devido a isto, é reconhecido como um importante género dentro das bactérias marinhas heterotróficas, pois contribuirá para elucidar a correlação existente entre a evolução genómica e adaptação ecológica (Sawabe et. al., 2013). Apesar de existirem elevadas diferenças fenotípicas e genotípicas entre espécies, a elevada homologia a nível fenotípico e genotípico entre estirpes de *Vibrio*, por exemplo entre os organismos que têm como ancestral comum *Vibrio harvei*, dificulta a sua diferenciação quando detetadas (Darshanee Ruwandeepika et. al., 2012); (Froelich et. al., 2019). Por esta razão é necessário um contínuo desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a deteção e identificação do patógeno com elevada especificidade de forma a avaliar subsequentes ações profiláticas e/ou terapêuticas.

1.2 Vibrioses: fatores que determinam o seu aparecimento

No ambiente marinho existem um conjunto de fatores químicos, físicos e biológicos que contribuem para a abundância e diversidade da comunidade de bactérias do género *Vibrio*. Para além do ambiente marinho, estes fatores também têm influência no desenvolvimento e proliferação de patógenos bacterianos do género *Vibrio* em culturas de peixes e organismos invertebrados, que suprimem a imunidade de potenciais organismos hospedeiros, aumentando a suscetibilidade destes à doença. (Haenen et. al., 2014). Dentro do sistema de cultivo temos fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a qualidade da água e conseqüentemente a saúde dos peixes podendo deixá-los mais vulneráveis a patógenos. Estes fatores incluem a qualidade da água (temperatura, transparência, OD, pH, amónia, salinidade, coliformes, presença de pesticidas ou fármacos), uma

alimentação pouco rica (composição da dieta pobre em aminoácidos, ácidos gordos essenciais, vitaminas ou minerais) (Oliva-Teles, 2012)(Frans et. al., 2011), o estado fisiológico individual do hospedeiro (e.g. ciclo de vida do hospedeiro), a densidade populacional e ainda a presença de outros microrganismos que afetaram a vulnerabilidade destes a apanharem infeções (Almeida et. al., 2009) (Frans et. al., 2011)(Alfiansah et. al., 2018).

O mecanismo de defesa em peixes tem como primeira linha de defesa algumas barreiras físicas e químicas, gerando imediatamente uma resposta contra o patógeno. Uma das defesas é a renovação constante do muco da pele que apresenta péptidos, proteases, lectinas e lisozimas com propriedades antibacterianas. Posteriormente a segunda linha de defesa já envolve o sistema imunitário adquirido, gerando uma resposta imune específica contra o patógeno (Frans et. al., 2011). O mesmo não se verifica em larvas de peixe, que não apresentam capacidade de gerar uma resposta imune específica, sendo organismos mais vulneráveis à infeção por parte de patógenos e posteriormente à morte (Frans et. al., 2011).

A resposta imune de invertebrados, como por exemplo camarões, apresenta algumas semelhanças ás defesa de larvas de peixes, de maneira que, também não apresentam sistema imune adquirido, tendo como primeira linha de defesa o exoesqueleto, que é formado por carbonato de cálcio, carboidratos e proteínas. Contudo, a hemolinfa destes organismos é constituída por hemócitos que consistem em hialinócitos, granulócitos e semi-granulócitos.(Amatul-Samahah et. al., 2020) e estes componentes vão se especializando, de maneira a darem uma melhor resposta como defesa ao patógeno. Contudo, ainda não há muitas evidências da existência de sistema imune adquirido por parte destes organismos.

1.2.1 Impacto de vibrioses: na indústria da aquacultura e segurança alimentar

Nos últimos anos, devido à mudanças climáticas e conseqüentemente ao aumento da temperatura dos oceanos, o aumento intensivo das culturas de peixes na indústria de aquacultura e algumas atividades humanas levou a um aumento de incidências de *Vibrios*,

representando um impacto no desenvolvimento social e económico e consequentemente na saúde humana (Le Roux et. al., 2015) (Huang et. al., 2021). Contudo, a falta de notificação obrigatória de doenças causadas por *Vibrio* torna difícil fazer estimativas mais precisas acerca das infeções existentes na Europa associadas a estes patógenos. Porém, existem dados económicos que nos elucidam das perdas que esta indústria pode sofrer. Efetivamente, as perdas económicas associadas a doenças em aquacultura no mundo inteiro segundo (Novriadi, 2016), são de cerca de 7 mil milhões de euros (US \$9 mil milhões) por ano. A estas perdas económicas podem estar associadas doenças bacterianas de diversas espécies de microrganismos associados ao ambiente marinho.

Todavia, a vibriose é considerada a causa mais conhecida por estar associada às enormes perdas em culturas de peixes e crustáceos (Austin, & Austin, 2007). O impacto desta família de patógenos nesta indústria não se reflete apenas ao nível económico. De fato, o problema coloca-se também a nível da segurança alimentar (Amaro & Biosca, 1996) em particular, pois o género *Vibrio* está associado ao zoonoses. Desta maneira, esta família de bactérias contém importantes patógenos zoonóticos com capacidade de infetar humanos, tais como, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, enquanto que os patógenos direcionados a organismos aquáticos são tipicamente *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbelli*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* (Penduka et. al., 2011)(Silveira et. al., 2016)(Darshane Ruwandeepika et. al., 2012). Das principais espécies relatadas em aquaculturas destacam-se: *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V.harveyi* e *ordalli*.

Os sintomas clínicos manifestados por animais aquáticos infetados reflete-se através de septicemia hemorrágica e em muitos casos leva à morte do organismo (Austin & Austin, 2007);(Darshane Ruwandeepika et. al., 2012). No caso da ingestão por parte dos consumidores de um microrganismos pertencente a este género, que normalmente ocorre através de alimentos provenientes do mar contaminados, poderá resultar em diarreia, gastroenterite e até morte (Kustusch et. al., 2012). Assim sendo, é de extrema importância garantir a saúde e segurança alimentar dos consumidores, nomeadamente de produtos derivados de aquacultura.

Segundo Roger CHONG, 2011, 66,7% das doenças relatadas em grupos de *Epinephelus* spp. são vibrioses, afetando todas as etapas de crescimento com uma taxa de mortalidade até 50%. Em culturas de camarões, Flegel, 2012 verificou que 20% das perdas nestas culturas são devido a vibrioses, representando uma ameaça constante para estes produtores. Na malásia e em países vizinhos com um clima tropical com temperaturas de 28° C o ano todo, a prevalência de vibrioses em aquaculturas é elevada levando à perda de animais e conseqüentemente económicos (Ina-Salwany et. al., 2019).

A identificação da espécie de *Vibrio spp* em cultura é crucial para a utilização da estratégia mais eficaz de controlar a vibriose em causa. No entanto, devido à elevada homologia fenotípica e genotípica entre espécies, as ferramentas de identificação, como caracterização fenotípica e detecção molecular, apresentam algumas limitações. Desta maneira, o controlo das vibrioses em aquacultura atualmente não é altamente viável de modo que leva à necessidade de administração em excesso de antibióticos. Ainda assim, é de salientar que hoje em dia já há algumas aquaculturas que recorrem à tentativa de soluções mais sustentáveis, tais como, técnicas de “água verde”, desinfetantes, plantas medicinais, pre-bióticos e bacteriófagos (Ina-Salwany et. al., 2019).

Efetivamente, para caracterizarmos de forma eficaz um largo espetro de infeções causadas por *Vibrio* é necessário desenvolver novas ferramentas de detecção e identificação dos patógenos emergentes de maneira a haver maior controlo tanto em espécies de cultivo como selvagens, principalmente devido à existência de bactérias zoóticas nesta família. Uma vasta comunidade científica na Europa tem-se focado no desenvolvimento destas ferramentas com o objetivo de reduzir significativamente o número infeções por *Vibrio* e as suas conseqüências ambientais, económicas e para a saúde pública (Le Roux et. al., 2015). Desta maneira, este trabalho poderá oferecer uma alternativa que poderá ser usada e ambas as abordagens, tanto na etapa de identificação como para tentar controlar ou até como terapia passiva conjunta.

1.2.2 Fatores de virulência de *Vibrio spp*.

Efetivamente os microrganismos como as bactérias, recorrem a diversos fatores que medeiam a sua patogenicidade, comumente conhecidos como fatores de virulência

bacteriana (Silveira et. al., 2016). Estes permitem ultrapassar as defesas e barreiras intrínsecas, nomeadamente do sistema imunitário, dos organismos marinhos e estabelecer a infeção.

Atualmente estão descritos diversos mecanismos que determinam a infeção por *Vibrio*, mas muitas questões científicas continuam por responder. Dentro dos fatores de virulência descritos para *Vibrio* podemos destacar aqueles com maior relevância e impacto em aquacultura e com eventual repercussão na saúde humana, 1) os sistemas de aquisição de ferro; 2) produção de componentes intra e extracelulares com atividade hemolítica e proteolítica; 3) Mobilidade e Quimiotaxia; 4) Fatores de adesão 5) a síntese de diversos sistemas de secreção de proteínas e outras moléculas (Vieira, 2009; Frans et. al., 2011; Silveira et. al., 2016; L. Li et. al., 2019). Importante referir que certos fatores de virulência são mais transversais entre espécies que outros. Na tabela 1.1 estão alguns exemplos de genes e proteínas envolvidas em alguns dos fatores descritos anteriormente.

Tabela 1.1 - Exemplos de alguns fatores de virulência de *Vibrio spp.* Na tabela seguinte estão representados exemplos de fatores de virulência e a sua função ou efeito no hospedeiro.

Fator de virulência	Efeito/ Função	Referência
Vibrioferrina	<i>V. parahaemolyticus</i> produz vibrioferrina, que pertence à família de sideróforos do tipo hidroxicarboxilato e transporta a mesma carregada para o interior das células através dos recetores e do sistema de transporte ABC.	(Tanabe et al., 2012)
EmpA (metaloprotease)	Protease extracelular que provoca danos nos tecidos dos hospedeiros e a sua regulação é afetada por três fatores (expressão dependente durante fase estacionária; muco gastrointestinal e <i>quorum-sensing</i>)	(Denkin & Nelson, 2004)
VVH (Hemolisina)	Toxina que pertencente à família HlyA e que é secretada para o ambiente extracelular por <i>V.vulnificus</i> .	(G. Li & Wang, 2019)

Flagelina A	Remoção de uma zona conservada da flagelina A resulta numa diminuição da virulência.	(O'Toole et al., 1996)
Exopolissacarídeos (EPS)	Formação de polissacarídeos extracelulares tem representa elevada importância na capacidade de adesão do patógeno ao hospedeiro. Forma uma camada protetora em redor da bactéria e aumenta a sua força de adesão à superfície do hospedeiro.	(L. Li et al., 2019); (Liu et al., 2020)

No processo de infeção a mobilidade mediada por os flagelos está conectada com processos que envolvem a quimiotaxia, formação de biofilmes, colonização e consequentemente virulência das bactérias. Visto que, a quimiotaxia corresponde ao aproximar ou afastar de um ambiente quimicamente favorável e que posteriormente ajuda ao desenvolvimento da colonização dos hospedeiros (Echazarreta & Klose, 2019)(DeLoney-Marino et. al., 2003) apresenta também importância nas primeiras etapas de infeção do patógeno.

No que diz respeito à colonização, as proteínas extracelulares representam um fator de virulência muito comum entre espécies de *Vibrio spp.* Uma das mais conhecidas e relatadas é uma enzima extracelular, metaloprotease (EmpA) que na maioria dos casos está envolvida na degradação da matriz extracelular do hospedeiro, contribuindo assim para o desenvolvimento da infeção através da degradação do muco e posterior colonização (Frans et. al., 2011); (Osei et. al., 2018).

O crescimento e proliferação das bactérias nos seus hospedeiros envolve processos multifatoriais. Desta maneira a secreção de toxinas por parte dos microrganismos é comum, como por exemplo, hemolisinas, que são exotoxinas que provocam a lise celular dos eritrócitos (Frans et. al., 2011). As diversas hemolisinas produzidas por *Vibrio spp.* são muito semelhantes, contudo apresentam algumas diferenças. Desta maneira existem 4 famílias de hemolisinas, *thermostable direct haemolysin* (TDH), *El Tor haemolysin* (HlyA), *the thermolabile haemolysin*, (TLH), *thermostable haemolysin* (δ -VPH)(X. H. Zhang & Austin, 2005).

Envolvendo estratégias de sobrevivência por parte dos microrganismos os sistemas de aquisição de ferro desempenham um papel fulcral. O facto da presença de ferro livre no ambiente hospedeiro ser limitada, levou os microrganismos invasores desenvolverem mecanismos para aquisição de ferro como o transporte de ferro dos portadores de ferro dos mamíferos (e.g transferrina, lactoferrina) e síntese de moléculas de baixo peso molecular e com elevada afinidade para iões de ferro pouco solúveis, chamados de sideróforos (Y. Li & Ma, 2017), isto porque, a maioria do ferro do hospedeiro está ligado a fatores como as transferrina e lactoferrina, ou a sua biodisponibilidade em ambientes aeróbios é baixa porque forma hidroxidoferricos insolúveis. Consequentemente estes siderofóros formam um complexo que é transportado para dentro das células hospedeiras (Cordero et. al., 2012); (Y. Li & Ma, 2017);(Chatterjee & O'Brian, 2018).

Todo o processo de infeção desta família bacteriana envolve uma série de fatores que através de toda a literatura dá para entender que estão altamente interligados, ou seja, pra além de não agirem isoladamente, fatores abordados anteriormente são desencadeados em prol de outros. O caso da secreção de toxinas e diversas moléculas e também a aquisição de ferro, estão automaticamente envolvidos num sistema de secreção. Desta maneira, muitos dos fatores de virulência necessitam de um sistema de secreção que envolve um complexo de proteínas e por isso poderá representar um ponto interessante no que diz respeito à produção de alternativas terapêutica, profiláticas e de diagnóstico, visto que são transversais a todas as *Vibrio spp.*

1.2.2.1 Sistema de secreção bacterianos

Os sistemas de secreção são complexos proteicos que medeiam a interação/comunicação do patógeno com o ambiente envolvente, e são de extrema importância na sua adaptação e sobrevivência. Os sistemas de secreção estão envolvidos na virulência destes patógenos sendo complexos proteicos altamente especializados que promovem tipicamente efluxo (secreção) de um vasto espectro de substratos, incluindo moléculas pequenas, proteínas e DNA. Dependendo do sistema de secreção em questão, o substrato secretado por estes sistemas tem três destinos possíveis, 1) mantem-se associado à membrana interna; 2) é secretado para o meio extracelular; ou 3) é injetado no lúmen (citoplasma /periplasma) da célula hospedeira (Costa et. al., 2015). Estão descritos na figura 1.2 cinco sistemas de

secreção distintos em bactérias, que promovem a passagem de substratos através da membrana interna e externa: sistemas de secreção do Tipo 1 a 6 (Type 1-6 Secretion Systems: T1SS, T2SS, T3SS, T4SS, T6SS).

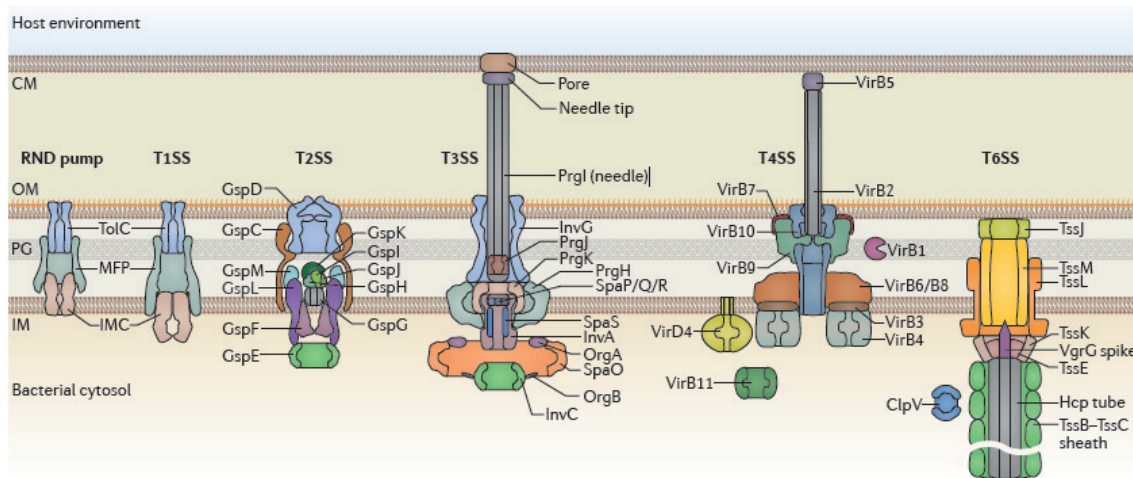


Figura 1.2 - Tipos de sistemas de secreção: Organização estrutural dos sistemas de secreção bacterianos de Gram-negativas que promovem a passagem de substratos através da membrana interna e externa: sistemas de secreção do Tipo 1 a 6 (Type 1-6 Secretion Systems: T1SS, T2SS, T3SS, T4SS, T6SS). Imagem retirada de (Costa et. al., 2015).

Relativamente ao sistema Tipo I (T1SS), é um complexo proteico constituído por três componentes principais e que atravessa a dupla membrana da bactéria (membrana interna, IM e membrana externa, OM), ligando citosol ao ambiente extracelular. É um sistema que apresenta semelhanças ao sistema de efluxo de multidrogas da família RND (Resistance–Nodulation–Division).

Em bactérias Gram-negativas os sistemas secreção T1SS, também chamados de sistemas de efluxo, são constituídos por três tipos de proteínas: 1) uma bomba de efluxo, que é uma proteína embebida na membrana interna (também designada de componente da membrana interna, IMC) e que é responsável por transportar ativamente (com uso de energia) substratos do meio intracelular para a zona periplasmática; 2) uma proteína periplasmática dita de fusão (MFP, *membrane fusion protein*), por ser responsável por garantir a interação entre a bomba de efluxo e o canal da membrana externa e que por sua vez promove movimentos peristálticos facilitadores da extrusão dos componentes através do sistema; e finalmente 3) uma proteína canal-túnel (channel-tunnel), designada de TolC, que é uma proteína com uma parte embebida na membrana externa (OM) e outra

parte no espaço periplasmático em contacto direto com a proteína periplasmática de fusão (Kanonenberg et. al., 2013; Costa et. al., 2015; Symmons et. al., 2009). Os sistemas de secreção T1SS formam uma estrutura em túnel que tem a capacidade de transferir diretamente o substrato do citosol para o ambiente extracelular. Esta ação é ativada através do reconhecimento de células recetoras do hospedeiro, adesinas, complexos proteicos também considerados fatores de virulência destes patógenos. A geração de energia destes sistemas é obtida através da hidrólise de ATP, que ocorre ao nível da bomba de efluxo na membrana interna. Estes sistemas são responsáveis pela secreção de diversos substratos proteicos do meio intracelular para o meio extracelular. Os T1SS estão associados com o desencadear de virulência no hospedeiro e aquisição de nutrientes, enquanto que as RND estão associadas à resistência de compostos antibacterianos (e.g. antibióticos)(Sawabe et. al., 2013).

1.2.2.2 TolC – a proteína canal da membrana externa

A proteína canal da membrana externa – canal TolC - faz conexão entre a zona periplasmática e o meio extracelular e é reconhecido como um componente chave na resistência a antibióticos em bactérias Gram-negativas, dado a sua capacidade de mediar a extrusão de substância citotóxicas, promovendo a sobrevivência da bactéria (Koronakis, 2003). Este canal proteico apresenta-se nativamente como um homotrímero formado por três monómeros, cada um contendo 428 aminoácidos. O canal apresenta duas regiões ou domínios estruturalmente distintos: 1) uma região embebida na membrana externa formando um canal de conformação barril β e 2) um túnel em conformação α -hélice na região periplasmática associado ao MFP.

A estrutura cristalográfica do TolC mostra que a abertura do canal na extremidade extracelular é desencadeado por movimentos de torção das hélices (Koronakis et. al., 2000;Pei et. al., 2011;Andersen, 2003). Efetivamente, uma das regiões estratégicas e principal foco de interesse na estrutura do canal TolC, é a sua região extracelular, constituída por dois loops peptídicos expostos no exterior (Figura 1.3).

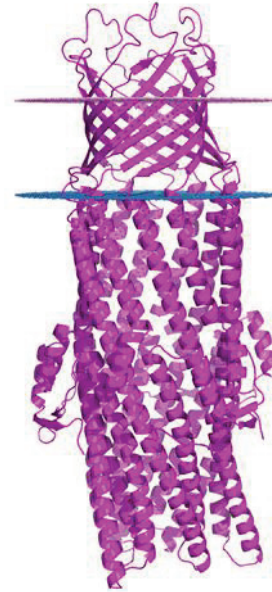
A**B**

Figura 1.3 - Estrutura cristalográfica de *E.coli* (PDB:1TQQ), A: vista extracelular, os epítomos expostos na membrana exterior; B: vista superior, complexo proteico do canal de membrana TolC. Imagem original: Grupo de Biotecnologia Estrutural, CNC.

Esta é a única região acessível do canal através do exterior, e nela ocorrem mudanças conformacionais que se acredita serem responsáveis pela abertura e fecho do canal, promovendo ou bloqueando o efluxo de substrato (Andersen, 2003).

O canal TolC é conservado em inúmeras Gram-negativas conhecidas, sendo curiosamente mantida a sua conformação de homotrímero, tal como conhecida para o TolC canônico de *E.coli* (PDB ID:1TQQ, (Higgins et. al., 2004; Koronakis et. al., 2000). Isto torna-se evidente através da comparação global das estruturas cristalográficas (Figura 3.3) de canais de membrana externa de Gram-negativas como: OprM de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 3D5K, (Phan et. al., 2010), VceC de *Vibrio cholerae* (PDB ID: 1YC9, (Federici et. al., 2005), CmeC de *Campylobacter jejuni* (PDB ID: 4MT4, (Su et al., 2014), ST50 de *Salmonella enterica Typhi* (PDB ID: 5BUN, (Guan et. al., 2015) e o MtrE de *Neisseria gonorrhoeae* (PDB ID: 4MT0, (Lei et. al., 2014). Estudos a decorrer no nosso laboratório (não publicados) através da análise extensiva por alinhamentos de sequência primária e de estrutura tridimensional de mais de 600 canais de membrana externa de sete famílias de Gram-negativas, revelam uma grande variedade de sequências que convergem numa conformação homotrimérica mais consistente, mas que apresentam

por exemplo assinaturas únicas nos seus loops extracelulares. Este será um aspeto a abordar no presente trabalho.

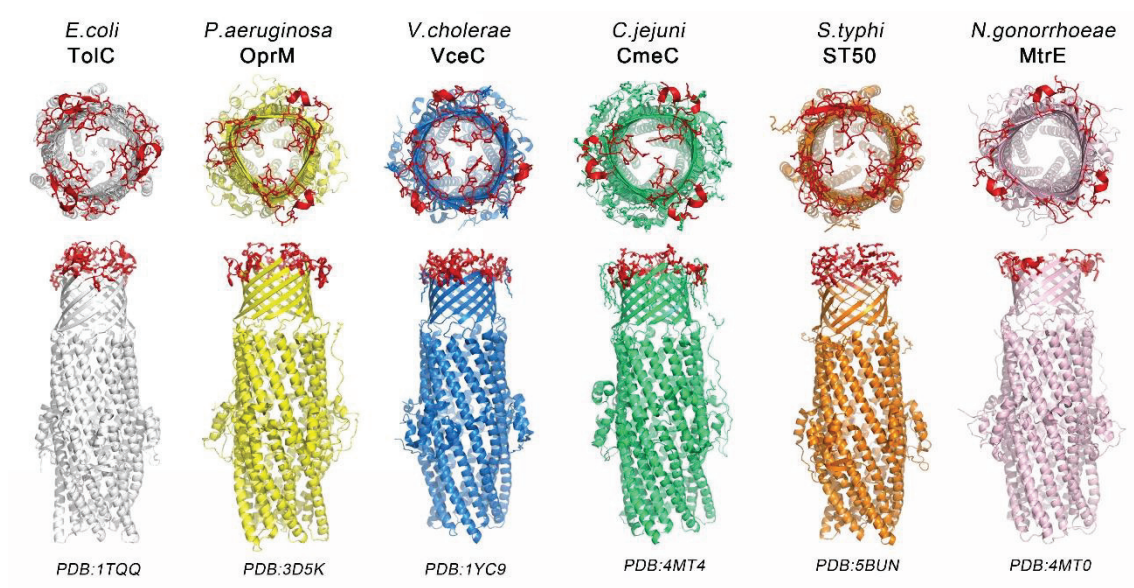


Figura 1.4 - Estruturas cristalográficas da proteína TolC de diferentes bactérias Gram-negativas. Vista superior do canal e visão de fora do canal. Comparação da semelhança na conformação homotrimérica com o canal TolC de *Escherichia coli* (*E. coli*) com os canais TolC das restantes bactérias Gram-negativas. Imagem original: Grupo de Biotecnologia Estrutural, CNC.

1.2 Tecnologia IgY

A maioria dos anticorpos produzidos para posteriores aplicações médicas ou terapêuticas têm origem em mamíferos, especialmente em ratos, coelhos e cabras (X. Li et. al., 2015). Contudo a produção de anticorpos de mamíferos pode ser desafiante no sentido de que alguns antígenos induzem fracas respostas imunológicas ou até, em alguns casos, não apresentam de todo imunogenicidade. Para além disso, o processo de produção dos anticorpos de mamíferos envolve dor e stress nos animais em questão, desde a etapa de imunização à recolha de sangue (Thompson et. al., 2003). De maneira a minimizar estes contras, a pesquisa para o uso de modelos em aves para a obtenção de anticorpos tem sido estudada desde os anos 90, sendo que desde o ano de 1996 a tecnologia IgY tem sido aceite como alternativa ao uso de anticorpos de mamíferos (Schade et. al., 2005). A tecnologia IgY consiste na produção e utilização de anticorpos provenientes de aves.

Normalmente tende a haver uma confusão no que diz respeito às vantagens e limitações desta tecnologia porque no fundo os aspetos biológicos e técnicos irão estar sempre relacionados. Desta maneira, vou citar alguns dos aspetos abrangidos por a tecnologia IgY descritas no livro de (Zhang et. al.,2021)(Figura 4.1). Como dimensão principal temos 1) Ética e bem-estar dos animais. Esta tecnologia utiliza métodos não invasivos, visto que os anticorpos são recolhidos da gema do ovo. 2) Quantidade de anticorpo, que no caso das galinhas, produzem uma quantidade elevada de anticorpos quando comparado com outros animais, o que leva à necessidade de menos animais para a produção dos anticorpos. A percentagem de IgY específica produzida corresponde de 1-10% da quantidade total de anticorpos (Pereira et. al., 2020; Thommes et. al., 1990; X. Li et. al., 2015); 3) Divergência filogenética, que pode ser usada como uma vantagem, havendo uma baixa homologia e elevada imunogenicidade entre aves e mamíferos. Desta maneira, as galinhas têm a capacidade de produzir anticorpos de proteínas de mamíferos altamente conservadas sendo necessário menos antigénio para a sua produção. 4) Organização genética dos reportórios de aves imunizadas; 5) Estrutura Molecular de IgY (Zhang et. al.,2021).

A quantidade de anticorpos obtidos não é linear em todas as situações e poderá variar consoante os diversos fatores desde a quantidade de antigénio administrada, à sua imunogenicidade, o peso da molécula e a idade da ave. (A. Polson, 1980); (Grando et. al., 2017) (BARUA et. al., 2000). Para além disso inevitavelmente irá haver uma variabilidade intrínseca devido ao uso de múltiplos animais. A maior limitação desta tecnologia está na falta de eficiência de ligação do domínio Fc da molécula IgY às proteínas A, G (..) usadas em purificações de anticorpos de mamíferos.

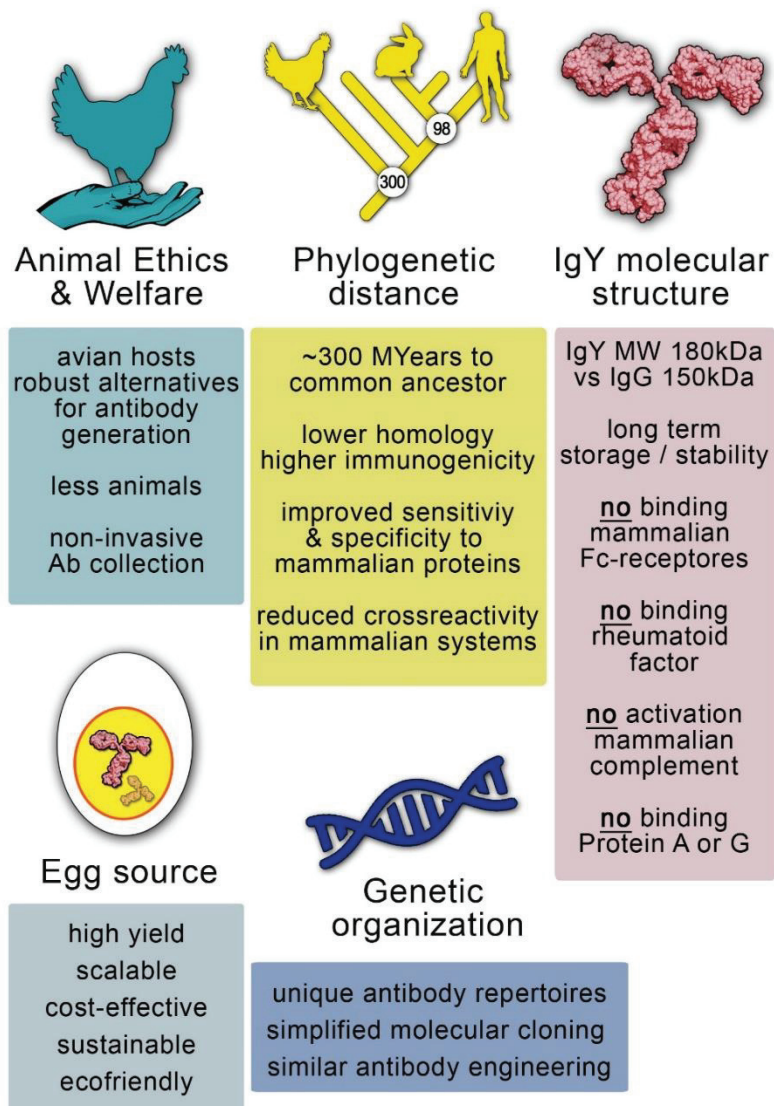


Figura 1.5 - Aspectos gerais relacionados com a tecnologia IgY. Vantagens transversais à tecnologia IgY como a organização genética do anticorpo das aves; a estrutura molecular do anticorpo IgY; a distância filogenética das aves para mamíferos; a segurança e ética animal associada à tecnologia e as vantagens associadas à obtenção do anticorpo da gema de ovo. Imagem retirada de (Zhang et. al.,2021).

Os aspectos principais na produção de anticorpos de aves são questões éticas e do bem-estar do animal; distância filogenética dos hospedeiros; Quantidade de anticorpo obtido; estrutura molecular dos anticorpos IgY; organização genética dos reportórios de aves imunizadas são tudo aspectos que têm tornado esta tecnologia como uma promissora alternativa às soluções convencionais de pesquisa, diagnóstico e para fins terapêuticos.

O pico/perfil (titer) dos anticorpos obtido é influenciado por diversas variantes desde 1) o antígeno usado à dose utilizada; 2) o adjuvante usado na imunização; 3) a via de aplicação; 4) frequência de inoculação e a idade e estado de desenvolvimento das aves (Schade et. al., 2005) (Chalghoumi et. al., 2009).

Os antígenos usados para a obtenção de anticorpos IgY pode ser através de um complexo de antígenos (vírus, bactérias e parasitas) ou como antígenos singulares (proteínas, polissacarídeos, peptídeos e ácidos nucleicos).

A aplicação e uso destes anticorpos abrange diversos campos de investigação e diversas estratégias possíveis tanto de um ponto de vista de prevenção, terapêutico ou de diagnóstico.

1.3.1 Aplicação da tecnologia IgY em organismos marinhos: alternativa aos antibióticos

Os anticorpos IgY têm sido extensivamente usados tanto em medicina humana como veterinária na área da saúde com finalidades como imuno-diagnóstico, imunoterapia, neutralização de toxinas de animais venenosos e bactérias e na área da alimentação. (Kollberg et. al., 2003) (Schade et. al., 2005). Cada vez mais esta tecnologia tem mostrado muito interesse na indústria de aquacultura para tratar diversas doenças infecciosas em animais aquáticos.

A indústria de aquacultura foi uma das que mostrou um crescimento mais rápido num pequeno espaço de tempo e mostra-se muito útil para se manter a sustentabilidade e equilíbrio nos ecossistemas marinhos. Desta maneira, um vasto espectro de organismos começou a ser cultivado intensivamente e o aumento do cultivo por aquacultura destes organismos tem trazido problemas de sustentabilidade, saúde e desenvolvimento desta indústria. Atualmente a tecnologia IgY é usada nos países nórdicos e Japão como estratégia terapêutica de maneira a controlar diversas doenças virais e bacterianas.

No cultivo do salmão temos uma doença viral extremamente conhecida por causar enormes perdas económicas e elevada mortalidade em camarões, causada por o vírus *white spot syndrome*. O facto de os camarões não terem um sistema imune específico faz com que não possam ser vacinados e a imunização deles seria ineficaz. Contudo, através da tecnologia IgY este vírus pode ser neutralizado por anticorpos de aves específicos e posteriormente utilizados para imunoterapia (Baloch et. al., 2014). No campo de vibrioses, *V. harveyi* recentemente começou a causar mortalidades em massa em *Japanese pufferfish*, desta maneira, através de imunização passiva, a tecnologia IgY obteve anticorpos de galinha imunizadas com a bactéria inativa que posteriormente podem ser administrados através da dieta dos peixes, injeção ou imersão (M. Zhang et. al., 2021). Uma outra aplicação desta tecnologia em organismos aquáticos foi o uso de anticorpos IgY microencapsulados com o antígeno da bactéria *Yersinia ruckeri*, que por sua vez afeta toda a indústria de salmonídeos (Lee et. al., 2000).

Já foi comprovada a nível comercial a eficácia desta tecnologia em doenças de organismos marinhos, tais como “white spot Syndrome”, vibriose, edwardsiellose e doença entérica da boca vermelha, para além disso tem sido também usada em diagnósticos e preservação de alimentos marinhos.

O aumento e prevalência de doenças bacterianas foi verificado com o aumento do uso de antibióticos, o que retrata a tecnologia IgY como uma ótima alternativa. Segundo Maldonado et. al., 2012, foi verificada uma resistência aos antibióticos pertencentes ao grupo quinolonas como, oxitetraciclina, ácido oxolínico e florfenicol, antibióticos usados em larga escala no cultivo de salmão no Chile e que normalmente são usados para tratar doenças causadas por *Flavobacterium psychrophilum* e *Yersinia ruckeri* e *Vibrio*. Para além disso, um estudo recente onde envolveu 70 Vibrios pertencentes a 9 espécies, que foram identificadas e isoladas de uma aquacultura no Sul da China, revelaram uma prevalência de resistência a diversos antibióticos, tais como, vancomicina, amoxicilina, midecamicina e furazolidona (Deng et. al., 2020).

Desta maneira, o desenvolvimento da tecnologia IgY no âmbito de aquacultura auxilia no combate à resistência dos antibióticos bem como o uso do fator de virulência, o canal de membrana TolC como alvo.

A obtenção de anticorpos IgY, leva à necessidade de imunizar as aves com o antígeno pretendido. Desta maneira, esta imunização pode ser feita através de diversos tipos de vacinas desde inativadas, atenuadas, de DNA, recombinantes, toxoides. Em termos da contribuição ambiental, social e económico, a vacinação mostra ser uma alternativa mais sustentável do que os antibióticos. No entanto, no âmbito de tratar diversas doenças que afetam diversos organismos em aquacultura, o uso isolado de vacinas não é eficaz para todos os organismos.

Contudo, a produção de vacinas recombinantes é crucial para a determinação estrutural de alvos biofarmacêuticos (Overton, 2014). As vacinas de proteínas recombinantes, consistem na síntese de subunidades proteicas ou em peptídeos sintéticos altamente purificados em células hospedeiras. (Nascimento & Leite, 2012) (Perrie *et. al.*, 2008).

1.4 Objetivo

A proteína do canal TolC de membrana externa, ao ser responsável por secretar compostos tóxicos e antibióticos desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de resistência bacteriana por parte de diversos microrganismos. Desta maneira, os epítomos localizados na região extracelular deste canal TolC são um potencial alvo para o desenvolvimento de anticorpos IgY de maneira a obstruir ou modular a atividade deste canal. Posto isto, os anticorpos poderão ser utilizados em diversas abordagens, desde terapias conjuntas ou complementares e estratégias profiláticas ou de diagnóstico, alinhando-se assim no combate ao fenómeno da resistência aos antibióticos.

Neste trabalho foram desenvolvidas vacinas contra o canal TolC, tendo como base peptídeos recombinantes derivados das zonas específicas expostas à superfície (região extracelular) deste canal de membrana externa bacteriana. Mais concretamente foram desenhados, clonados, expressos em sistemas de expressão heteróloga e finalmente purificados, 2 péptidos (ou epítomos) de 10 espécies distintas de *Vibrio spp.* Estes

peptídeos recombinantes serão a base para a formulação de vacinas para a imunização de aves e subsequente obtenção de anticorpos IgY contra os diferentes canais TolC de *Vibrio spp.*

2 Metodologia

2.1 Análise bioinformática e desenho racional dos epítomos

A identificação e seleção das sequências primárias das proteínas correspondentes aos homólogos do canal TolC de *E.coli*, foi feita com recurso à base de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>). Foi utilizada a ferramenta de Blast, para identificação dos homólogos *Vibrio* do canal TolC *E.coli*. Foram obtidas 52 sequências que foram alinhadas com recurso à ferramenta online Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). O resultado de alinhamento das múltiplas sequências encontra-se na Figura 5.1, após processamento dos dados no software Jalview (<https://www.jalview.org/>); na figura são apresentadas apenas as regiões correspondentes aos dois epítomos extracelulares, que são as regiões alvo para o desenho racional destes epítomos e versão recombinante.

Foram selecionados para este trabalho os organismos *Vibrio* com reconhecido impacto em vibrioses de espécies marinhas, nomeadamente: *V.harveyi* (vhr), *V.parahaemolyticus* (vpk), *V.parahaemolyticus* (vpb), *V.vulnificus* (vvl) e *V.anguillarum* (vau).

As sequências primárias de proteína correspondentes aos homólogos TolC destes *Vibrio* foram utilizadas para a obtenção das suas previsões de estrutura tridimensional, com recurso à ferramenta online Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). Por fim, foi utilizada a ferramenta online mTM-align () para obtenção de um múltiplo alinhamento estrutural de forma a permitir uma comparação efetiva entre as várias estruturas (previstas) de *Vibrio* e a estrutura cristalográfica canónica do TolC de *E.coli* (PDB ID: 1TQQ). Esta análise permitiu identificar e desenhar de forma mais fiável versões recombinantes das regiões extracelulares dos diferentes homólogos de TolC de *Vibrio*, com potencial para a indução de resposta imunitária e subsequente *targeting* do canal (Tabela 2.1).

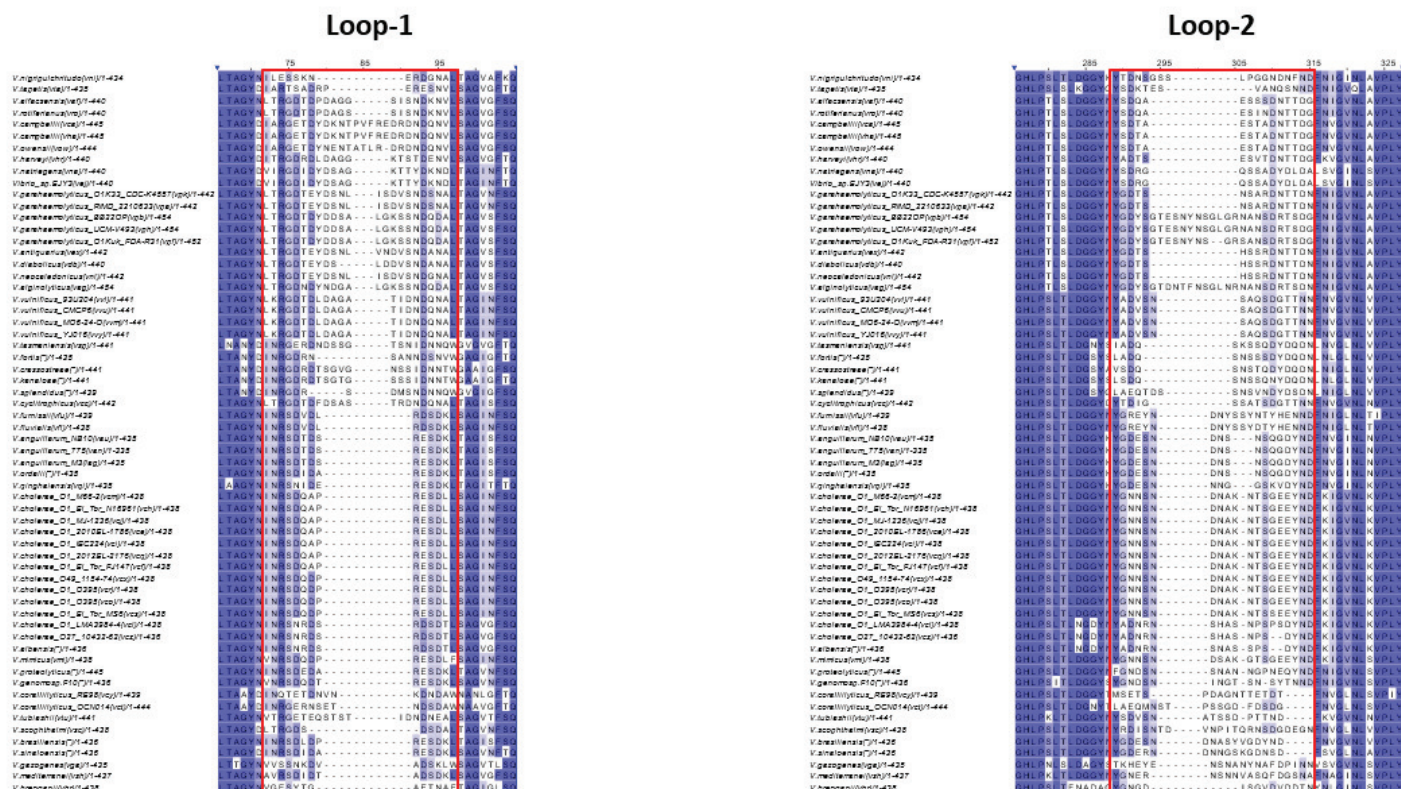


Figura 2.1 - Alinhamento de seqüências de homólogos do canal TolC de *Vibrio spp.*

Alinhamento de múltiplas seqüências de homólogos do canal TolC de *Vibrio spp.* Homólogos identificados através da ferramenta Blast na plataforma KEGG, utilizando a seqüência do canal TolC de *E.coli* (Uniprot ID: P02930) como *query*, e lançando procura na base de dados de organismos do gênero *Vibrio*. São apresentadas apenas as regiões que contêm os loops extracelulares L1 e L2, com os mesmos destacados com moldura a vermelho. A imagem resulta de um alinhamento através da ferramenta Clustal do programa Jalview. A cor azul evidencia a percentagem de identidade em cada posição (mais intensa maior % identidade).

Tabela 2.1 - Síntese de *Vibrios spp.* selecionados para o trabalho. Associado a cada espécie de *Vibrio* (identificado pelo identificador KEGG de 3-4 letras) há dois loops (ou epítotos) (Loop-1, L1, e Loop-2, L2); posteriormente estão representadas as seqüências de aminoácidos de cada um dos loops. As extremidades de todas as seqüências são iguais, isto é a seqüência codificante foi desenhada para introduzir um *linker* de dois aminoácidos (GS-) no terminal anímico e um codão stop (*) em terminal carboxílico. Na última coluna da tabela é apresentada a extensão cada um dos epítotos de cada espécie de *Vibrio*.

Organismo (KEGG id)	Epítoto/Loop	Seqüência aa	Tamanho (aa)
<i>V.harveyi</i> (vhr)	1 (64-92)	GSITRGDRDL DAGGKTSTDENVL*	21
	2 (284-298)	GSYADTSESVTDNTTDG*	15
<i>V.parahaemolyticus</i> (vpk)	1 (72-94)	GSLTRGDTEYDSNLISDVSNDSNAL*	23

<i>V. parahaemolyticus</i> (vpb)	2 (286-300)	GSYGDTSNSARDNTTNDN*	15
	1 (71-94)	GSNLTRGDTDYDDSSALGKSSNDQDAL*	24
<i>V. vulnificus</i> (vvl)	2 (286-312)	GSYGDYSGTESNYNSGLGRNANSRDRTSDG*	27
	1 (72-92)	GSLKRGDTDLGATIDNDQNAL*	21
<i>V. anguillarum</i> (vau)	2 (284-299)	GSYADVSNSAQSDGTTNN*	16
	1 (72-85)	GSINRSDTDSRESKDL*	14
	2 (277-293)	GSYADVSNSAQSDGTTNN*	17

2.2 Síntese de dados

A análise bioinformática permitiu visualizar o grau de homologia das sequências primárias das regiões extracelulares de ambos os epítomos das espécies do gênero *Vibrio*. Desta maneira, após a listagem das espécies de *Vibrio* selecionadas para trabalhar incluíram-se as espécies para as quais existem um elevado grau de homologia na sequência primária. Em suma, para além dos 10 epítomos purificados, havia 16 sequência primárias associadas a estas, como demonstra a figura 2.2.

L1		L2	
LTRGDTEYDSNLISDVSNDSNAL	VPK	YGDTNSARDNTTNDN	VPK
LTRGDTEYDSNLISDVSNDSNAL	VPA	YGDTNSARDNTTNDN	VPA
NLTRGDTDYDDSSALGKSSNDQDAL	VPB	YGDYSGTESNYNSGLGRNANSRDRTSDG	VPB
NLTRGDTDYDDSSALGKSSNDQDAL	VPF	YGDYSGTESNYNSGLGRNANSRDRTSDG	VPH
NLTRGDTDYDDSSALGKSSNDQDAL	VPH		
LKRGDTDLGATIDNDQNAL	VVL	YADVSNSAQSDGTTNN	VVL
LKRGDTDLGATIDNDQNAL	VVU	YADVSNSAQSDGTTNN	VVU
LKRGDTDLGATIDNDQNAL	VVM	YADVSNSAQSDGTTNN	VVM
LKRGDTDLGATIDNDQNAL	VVY	YADVSNSAQSDGTTNN	VVY
INRSDTDSRESKDL	VAU	YGDESNDNSNSQG DYND	VAU
INRSDTDSRESKDL	LAG	YGDESNDNSNSQG DYND	LAG

Figura 2.2 - Estirpes com sequências primárias homólogas às espécies de *Vibrio spp.* selecionadas neste trabalho. Análise feita através do software Jalview.

2.3 Clonagem dos epítomos recombinantes

Para o desenvolvimento das versões recombinantes dos vários epítomos de *Vibrio*, foram utilizadas nomeadamente quatro metodologias de clonagem distintas, que se encontram

sumariadas na Tabela 2.2. Os epítomos foram todos clonados em vetores pCoofy, EMBL, (Scholz et al., 2013), vetores otimizados para a etapa de expressão heteróloga.

Tabela 2.2 - Metodologias de clonagem utilizadas. Os princípios da metodologia de clonagem usados são descritos sumariamente e são identificados os epítomos para os quais foram utilizados.

	<u>Metodologia de clonagem</u>	<u>Princípio do método de clonagem</u>	<u>Epítomos</u>
MÉTODO A	SLIC (Site Ligation Independent Cloning)	Baseia-se na recombinação homóloga do vetor e fragmento (c/ 15-25 bp) em ambas as extremidades.	<i>VPK 1; VAU 2</i>
MÉTODO B	Epítopo completo num primer <i>reverse</i>	Utilização de um primer forward com extensão total do epítopo e extremidade 5' igual ao vetor usado. Ligação blunt entre vetor e fragmento.	<i>VHR 2; VPK 2; VVL 2; VAU 1</i>
MÉTODO C	Reconstituição do epítopo através de 2 primers	Utilização de 2 primer, um reverse e um forward, em que as terminações deles recostiuem a sequência do epítopo.	<i>VHR 1; VVL1</i>
Método D	Extensão de epítopo	Utilização de primer forward e reverse em que extremidades 5' e 3' do fragmento são iguais ao vetor usado. Primer adicional utilizado para estender epítopo.	<i>VPB 1; VPB2</i>

O esquema de cada método de clonagem utilizado está representado na Figura 2.3. Para o desenho racional dos primers a utilizar, houve duas regiões chave nos vetores *pCoofy* utilizados. Estas duas regiões encontravam-se no terminal do gene da proteína AB1 sentido 5'-3' e a outra região encontrava-se no terminal 3'-5' do gene *ccdb* (ANEXO V). De maneira a termos uma visão hipotética do vetor final com o epítopo recombinante e facilitar o desenho dos primers utilizou-se o software Vector NTI.

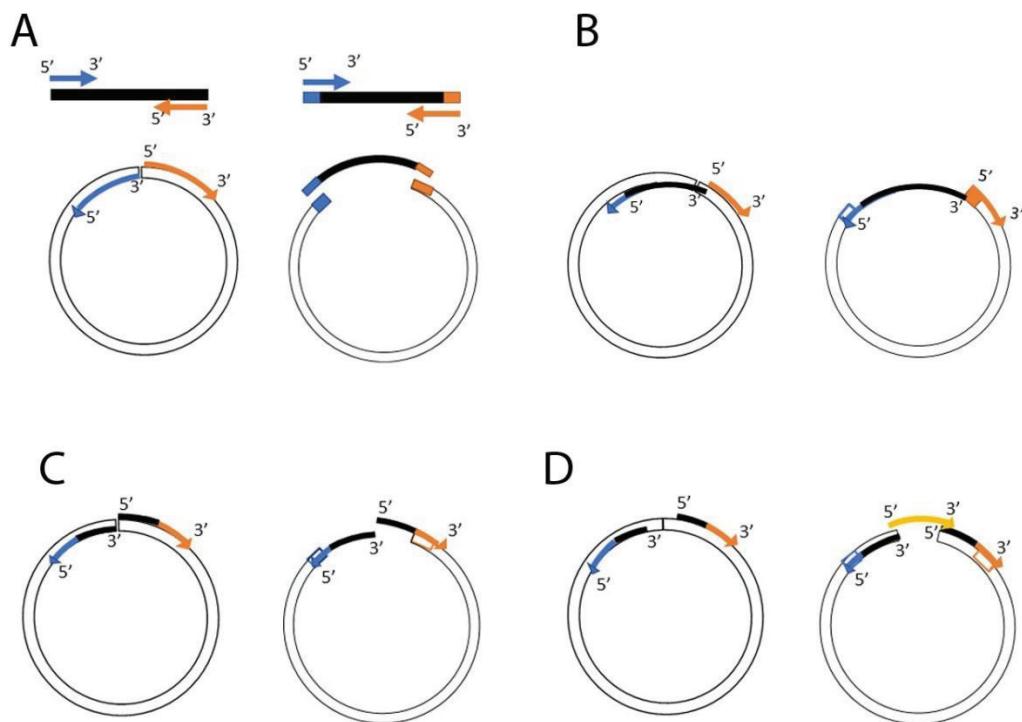


Figura 2.3 - Representação esquemática da metodologia de clonagem utilizados neste trabalho. Setas azuis: primer reverse; Setas laranjas: primers forwards A. SLIC; B. Epítipo completo num primer *reverse*; C. Reconstituição do epítipo através de 2 primers; D. Extensão de epítipo. No método A foram encomendados os fragmentos sintéticos da empresa IDT que continham a sequência de interesse. Estes fragmentos foram otimizados na plataforma IDT no que toca ao *codon usage* (preferência de códons de acordo com a espécie) para *Escherichia coli* (*E. Coli*).

Método A - Clonagem SLIC

No método A foi utilizada a estratégia SLIC, de acordo com o método descrito por (Scholz et. al., 2013) com algumas modificações. O vetor utilizado, pCoofy (~6000 bp), para inserir o fragmento de interesse já estava em laboratório. Posteriormente tanto os fragmentos sintéticos como os primers previamente desenhados foram encomendados através da empresa Integrated DNA Technologies (IDT) e antes disso otimizados para a espécie *E.coli*.

Nesta estratégia de clonagem foi desenhado um primer *forward* e *reverse* com extremidades iguais ao fragmento a ser recombinado. As reações de PCR (MyCycler,

Biorad) que deram origem ao vetor com as extremidades dos primers desenhados tiveram um volume total de 50 μ l, 10 ng do vetor, 1mM de ambos os primers, 1mM de dATPs, dCTP, dTTP, dGTP (Grisp), o tampão usado foi o 5x CG. A DNA polimerase usada é produzida em laboratório, utilizou-se cerca de 8 ng em que o restante volume é perfazido com água MilliQ autoclavada. As temperaturas usadas na reação de PCR foram sempre adaptadas à temperatura de melting dos primers que se estava a usar e a temperatura favorável da enzima da reação (ANEXO I).

Com o objetivo de minimizarmos a presença do vetor original no decorrer do protocolo, adicionou-se 1 ng da enzima DPN1 (NEB – New England Biolabs) durante 2 horas a 37°C no termobloco (Fisherbrand Isotemp Digital). Após a reação de PCR, através do uso de um kit, NZYTech, seguiu-se o protocolo de limpeza, de maneira a removermos o máximo de impurezas, como os tampões usados (*todos os produtos de PCR passaram por uma limpeza através do kit). A medição da concentração de DNA de cada produto de PCR foi feita através de um espectrofotômetro UV-Vis (NanoDrop 1000).

A recombinação entre o vetor e o fragmento de interesse a ser inserido foi complementada pela enzima RecA (NEB – New England Biolabs), que segundo (Jeong et al., 2012), é necessária para que a eficácia desta técnica seja maior. Influenciando ainda a eficácia desta etapa a quantidade de DNA do vetor usada foi de 100 ng e a quantidade de fragmento seguiu um ratio de massa molar de vetor: fragmento de 1:5. A reação implicou o uso do tampão desta enzima, RecA 10x (NEB – New England Biolabs) que ocorreu durante 30 minutos a 37 °C em banho maria (GFL). Nesta etapa o controlo das nossas amostras não apresentava a enzima RecA.

Método B – Epítoto completo num primer *reverse*

Este método de clonagem focou-se no desenho de um primer no sentido *reverse* (ANEXO II). A reação de linearização deu origem a um vetor com o fragmento de interesse inserido neste. Após a limpeza dos produtos de PCR através do kit gel pure (NZYTech) foi necessário medir a concentração de DNA presente para colocarmos a quantidade de DNA desejada na reação de ligação/fosforilação.

Método C - Reconstituição do epítoto através de 2 primers

O método C consistiu no desenho de um primer *forward* e *reverse* de maneira a reconstituir o epítipo.

Método D– Extensão do epítipo

Neste método foi necessário a realização de duas reações de PCR, em que na primeira os primers *forward* e *reverse* foram inseridos no vetor base das duas extremidades do epítipo pretendido e na segunda recorremos ao uso de um primer adicional no sentido 3'-5' para completar com os aminoácidos em falta de modo a completar o epítipo. A utilização da DPNI só se justificou usar após o segundo PCR. Contudo a limpeza com kit realizou-se entre cada reação de PCR.

Ligação / Fosforilação

O método de clonagem B, C e D apresentaram esta etapa em comum. Esta reação implica o uso de duas enzimas em simultâneo, a T4 DNA ligase (NEB – New England Biolabs) e a T4 Polynucleotide Kinase (PNK) (Thermo Scientific). A reação teve um volume de 20 µl, 1 µl de cada uma das enzimas e 10 ng do produto de PCR. Esta reação deu-se sob as condições de 37 °C, durante 2 horas em banho maria. Nesta etapa, no controlo foi usado o produto de PCR sem a adição das duas enzimas necessárias para ocorrer a reação.

Transformação

Após a reação anterior as novas construções clonadas foram transformadas em bactérias competentes *E.Coli* DH5- α , produzidas no laboratório. Foram transformados 20µl da reação através do processo de choque térmico, que altera a permeabilidade da membrana bacteriana, permitindo a internalização do plasmídeo nas bactérias. O procedimento, inclui: 30' em gelo; 1' 42 °C em banho maria (Inforns AG CH-4103, Bottminger); 5' em gelo; segue-se uma etapa de recuperação das bactérias em 1 ml de meio LB a 37 °C, com uma rotação de 160 rpm. Após uma hora de recuperação, as células foram centrifugadas (Eppendorf, centrifuge 5415D) durante 3' a 50 rpm (2,5 rcf); seguidamente o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 100 µl do meio remanescente. Estes 100 µl foram plaqueados em ambiente estéril, em meio sólido composto por LB (Luria-Bertani broth) que é um meio convencional utilizado para o crescimento e manutenção das bactérias e o antibiótico Kanamicina (Kan) (NZYTech). Posteriormente as placas ficaram a incubar numa estufa bacteriológica (Binder) durante a noite (ON) a 37 °C.

Colony PCR

Nesta etapa determinou-se a presença ou ausência do fragmento de interesse nas colónias crescidas. Todas os epítomos, independentemente do método de clonagem usado, passaram por esta etapa. Foram repicadas primeiramente 20 colónias isoladas das placas que ficaram ON a incubar dos epítomos VPK 1e 2 ;VAU 2, 10 colónias isoladas nas construções VPK 2; VVL 1 e 2; LHV 1 e 2, dos epítomos 1 e 2 de VPB foram repicadas apenas 2 colónias. Posteriormente, estas colónias foram ressuspensas em 20 µl de água. Destes 20 µl, 10 µl foram fervidos durante 15 minutos no termobloco a 98 °C em que apenas 5 µl foram usados para a reação de PCR. Os outros 10 µl incubaram-se com 1 mililitro de meio LB a 37 °C a 160 rpm. Após a reação de PCR ter terminado, preparou-se um gel a 1% de agarose e foi analisado através de luz UV (Biorad).

Após a confirmação de possíveis construções positivas, apenas foram inoculadas as que mostraram sinal de amplificação. A inoculação foi feita em ambiente estéril e foram usados 10 ml de meio LB com 10 µl de antibiótico (kanamicina), tendo ficado a crescer ON a 37 °C a 160 rpm. Na manhã seguinte, todas as culturas foram centrifugadas utilizando-se um rotor TX 1000 (Thermo Scientific, megafuge 40R) a 3000g durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e os pellets obtidos foram preparados através de um kit miniprep (NZYTech).

Estas amostras foram posteriormente enviadas para sequenciação (GATC) e analisadas através da plataforma ExPasy. Após a análise dos resultados obtidos apenas uma construção de cada espécie de *Vibrio* foi expressa e purificada.

2.4 Expressão Proteica

Nesta etapa as amostras foram transformadas em células competentes, tendo-se usado células BL21*, estirpe de *E. coli*. O processo de transformação foi igual ao descrito anteriormente, tendo-se transformado apenas 1 µl da amostra. Após a incubação ON das bactérias estas foram ressuspensas em 5 ml de meio LB e inoculadas em 1 litro de meio

LB com Kan 1000x diluída. A quantidade de células inoculadas foi de 15 mg/ml, tendo-se usado um espectrofotômetro de bancada para medir a O.D. O indutor de expressão usado foi o IPTG, a uma concentração de 0.5 mM, assim que o crescimento bacteriano apresentou um O.D. A indução deu-se a 20 °C (New Brunswick Scientific – Incubator Shake), durante ON a 160 rpm. No dia seguinte este crescimento bacteriano foi centrifugado a uma velocidade de 4000g durante 20 min, tendo-se utilizado o rotor JLA 8,100 (Avanti J-26 XP1).

O sobrenadante foi descartado e o pellet congelado a -20°C até à etapa de purificação. Contudo, foram recolhidas amostras de 1ml, antes e após a indução ON da proteína. Estas amostras foram centrifugadas (Eppendorf, centrifuge 5415D) durante 3 minutos a 13000g. Seguidamente os pellets obtidos foram ressuspensos em Phosphate-buffered saline (PBS) 1x, para isso foi necessário fazer uma normalização de volumes. Estas amostras foram preparadas com 10 µl de PBS; 10 µl da amostra e 10 µl de Loading Buffer e carregadas num gel SDS.PAGE a 12%.

2.5 Purificação

O pellet obtido na etapa anterior passou por uma ação mecânica que envolveu a pressurização e despressurização de azoto, de maneira a partirmos a parede celular das células e obtermos a nossa proteína, através do Avestin Emulsiflex C3. Previamente, o pellet foi ressuspensado com 30 mL no Tampão A (Tabela 3) e adicionaram-se três inibidores de proteases. Os inibidores usados foram phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptina e a pepstatina, a uma concentração de 1:100; 1:1000 e 1:1000, respetivamente. Após o rompimento da parede celular das células bacterianas, obteve-se um lisado, que foi centrifugado no rotor JA 25.50 (Avanti J-26 XP1) durante 45 minutos a 15000g, de forma a eliminar componentes celulares de maiores dimensões e por sua vez mais densos e produzir um sobrenadante de fração proteica solúvel. Seguidamente recuperamos o lisado e o pellet foi descartado. Este lisado clarificado seguiu então para purificação da proteína recombinante AB1-Epítopo por processos cromatográficos.

2.5.1 Cromatografia de troca iónica

O lisado foi carregado numa coluna aniónica HiTrap Q HP (GE Healthcare) de 5ml, utilizando o sistema AKTA Start (GE Healthcare) de bomba peristáltica e monitorização. Esta cromatografia corresponde à primeira etapa de purificação. Nesta cromatografia foi

necessário equilibrar o sistema nos tampões a serem usados. (Tabela 5.3) tendo sido necessário fazer ciclos de elevadas concentrações de sal e baixas concentrações de sal de maneira a removermos proteína que estivesse posteriormente agarrada à coluna. O lisado obtido da centrifugação foi filtrado a 0,45 μm e injetado a um flow de 1,0 ml/min . Após a coluna estar carregada com a proteína realizou-se uma lavagem com Tampão A fração proteica adsorvida foi gradualmente eluída por um gradiente de KCl de 50mM até 400mM em 80mL. Recolheram-se as frações desde o início da eluição até ao fim e posteriormente foram preparadas amostras para confirmarmos a presença da nossa proteína através de um gel SDS-PAGE a 12%. As amostras eluídas e recolhidas foram guardadas a 4 °C para passarem ao segundo passo de purificação no dia seguinte.

2.5.2 Cromatografia de Exclusão Molecular

Nesta cromatografia a coluna usada tinha um volume maior, obtendo-se uma maior resolução. Iniciou-se com uma lavagem em água antes de ser usada e posteriormente foi equilibrada no Tampão C (Tabela 5.3).

As amostras da etapa anterior de purificação foram analisadas através do SDS-PAGE a 12% e selecionadas aquelas que continham a proteína de interesse. Posteriormente foram concentradas num concentrador de 100 kDa (GE Healthcare) até um volume de 5 ml, em ciclos de 20 minutos a 4000g. Neste passo de purificação foi usada uma coluna preparativa HiLoad 26/600 Superdex 200pg (GE Healthcare Life Sciences), que possibilita a purificação de frações na ordem das dezenas de miligramas de proteína de interesse.

Os 5 ml de proteína foram filtrados a 0,2 μm mantendo-se sempre a amostra em gelo. Seguidamente a amostra foi injetada e eluída a aproximadamente de 160 ml de volume de coluna. As amostras eluídas foram recolhidas e preparadas para serem analisadas em SDS-PAGE a 12%.

Após a visualização do gel, escolheram-se as amostras que continham a nossa proteína e concentrou-se nas mesmas condições que a concentração anterior, até um volume de aproximadamente 7 ml. Posteriormente, fizeram-se alíquotas da proteína. Uma parte foi

armazenada com 20% de glicerol e outra sem glicerol que depois seria utilizada para a vacinação.

Tabela 2.3 - Composição dos tampões usados nas cromatografias na etapa de purificação.

Tampão A e B usados na cromatografia de troca iônica. Tampão C usado na cromatografia de exclusão molecular. Tris-HCL -Tris Hydrochloride; KCL - cloreto de potássio; DTT- Ditioneitol

	Tris- HCL pH 7,5	KCL	DTT
Tampão A	50 mM	50 mM	5 mM
Tampão B	50 mM	1 M	5 mM
Tampão C	50 M	150mM	

3. Resultados e Discussão

3.1 Clonagem dos epítomos extracelulares de TolC de diferentes espécies de *Vibrio spp.*

O sucesso da clonagem passa por diversos desafios técnicos laboratoriais, desde a 1) eficácia da linearização do plasmídeo ao 2) sucesso na reação de ligação entre o vetor e o fragmento e à 3) etapa de transformação. Desta maneira, há também diversos fatores que poderão aumentar a probabilidade de sucesso de cada uma das etapas mencionadas anteriormente. Dentro dos quais destacam-se: o tamanho do fragmento a ser inserido num vetor de clonagem, o tamanho do vetor final, o design dos primers, e o método de transformação escolhido (Gupta & Shukla, 2016).

Nesta etapa foram usados estrategicamente 4 metodologias diferentes de clonagem devido à variedade dos tamanhos dos epítomos a serem clonados. Na etapa de clonagem foram desenvolvidas 10 novas construções codificando 10 novos epítomos recombinantes. Numa primeira etapa foram desenhados primers específicos para a linearização dos vetores molde (*template*)- foi utilizada a família de vetores pCoofy (Scholz et al., 2013). O sucesso da reação de amplificação por PCR do produto linearizado, foi verificado por gel de agarose (Figura 3.1). Tendo em conta que o vetor usado em todas as clonagens foi igual, o tamanho expectável destes após a linearização seria visualmente igual, dado que a diferença de extensão de sequências nucleotídicas seria imperceptível no gel de agarose.

Através da análise por gel de agarose verificou-se que todos os plasmídeos linearizaram com sucesso, apresentando um peso molecular de ~ 6000 bp como seria esperado (Figura 3.1);

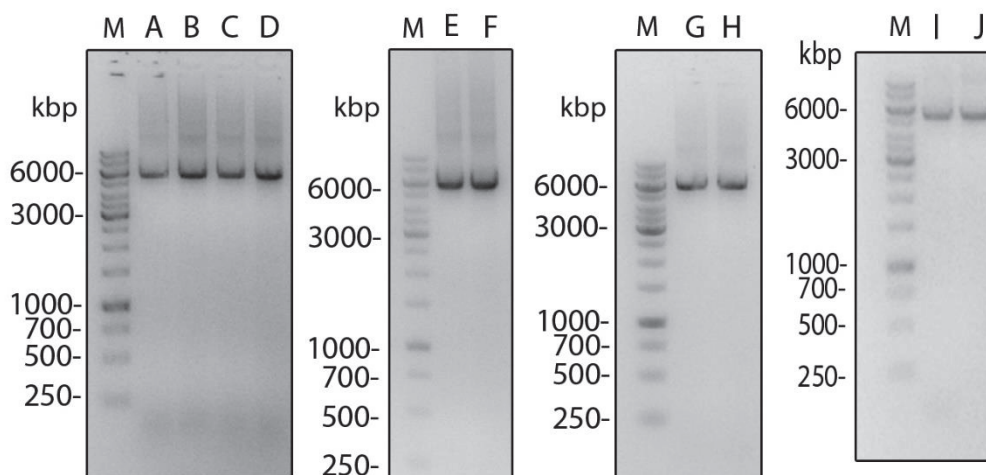


Figura 3.1 - Análise em gel de agarose da etapa de linearização das construções codificantes de epítomos de *Vibrio*. Gel de agarose 0,8% (m/v) para a verificação da etapa de linearização das 10 novas construções codificantes produzidas neste trabalho. Cada linearização recorreu a um par específico de primers desenhado para o efeito. Os produtos de linearização estão identificados para cada nova construção codificante das regiões dos epítomos de cada espécie, respetivamente, A- VHR 64-92; B- VPB 71-94; C- VPB 286-312; D- VVL 72-92; E. VPK 286-300; F. VAU 72-85; G. VHR 284-298; H. VVL 284-299; I. VPK 72-94; J. VAU 277-300. . M= Marcador Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder.

As condições otimizadas na reação de PCR tendo em conta o tamanho do vetor e as temperaturas de melting dos primers usados na reação mostraram um elevado grau de sucesso nas linearizações tal como demonstra a figura 3.1.

Após a linearização, como foi descrito na metodologia, foi adicionada a enzima DPNI à reação de maneira a diminuir a presença do vetor molde residual presente na etapa de transformação. Contudo, verificou-se que esta enzima não é 100% eficaz, visto que no nosso controlo, após a transformação em células DHA5- α , ainda foram observadas colónias, o que não seria esperado. As colónias obtidas por transformação utilizando as

novas construções codificando epítomos de *Vibrio spp.*, foram submetidas a análise pelo método de *colony PCR* (Figura 3.2). Este utiliza um par de primers por construção, sendo um deles específico para cada nova sequência de *Vibrio spp.* inserida na construção; isto permite a identificação de colônias potencialmente positivas, que resultarão num sinal de produto de amplificação, no caso concreto a ~500bp. Este peso molecular resulta do fato de estar a ser amplificada uma parte da sequência da proteína proprietária de fusão com função de cauda (proteína AB1).

O número de colônias repicadas para análise não foi o mesmo para todas as construções. Para além disso, não foram analisadas em gel de agarose todas as colônias posteriormente repicadas. Na figura 3.2, são apresentados os resultados obtidos do *colony PCR* de ambos os epítomos (L1 e L2) das espécies *V. anguillarum* e *V. parahaemolyticus*. Os resultados similares dos restantes epítomos das outras espécies de *Vibrio spp.* encontram-se no Anexo IIIa. A amplificação verificada no gel de agarose diz respeito à proteína AB1 fundida com o nosso fragmento de interesse, correspondendo ao peso molecular esperado, cerca de 500bp.

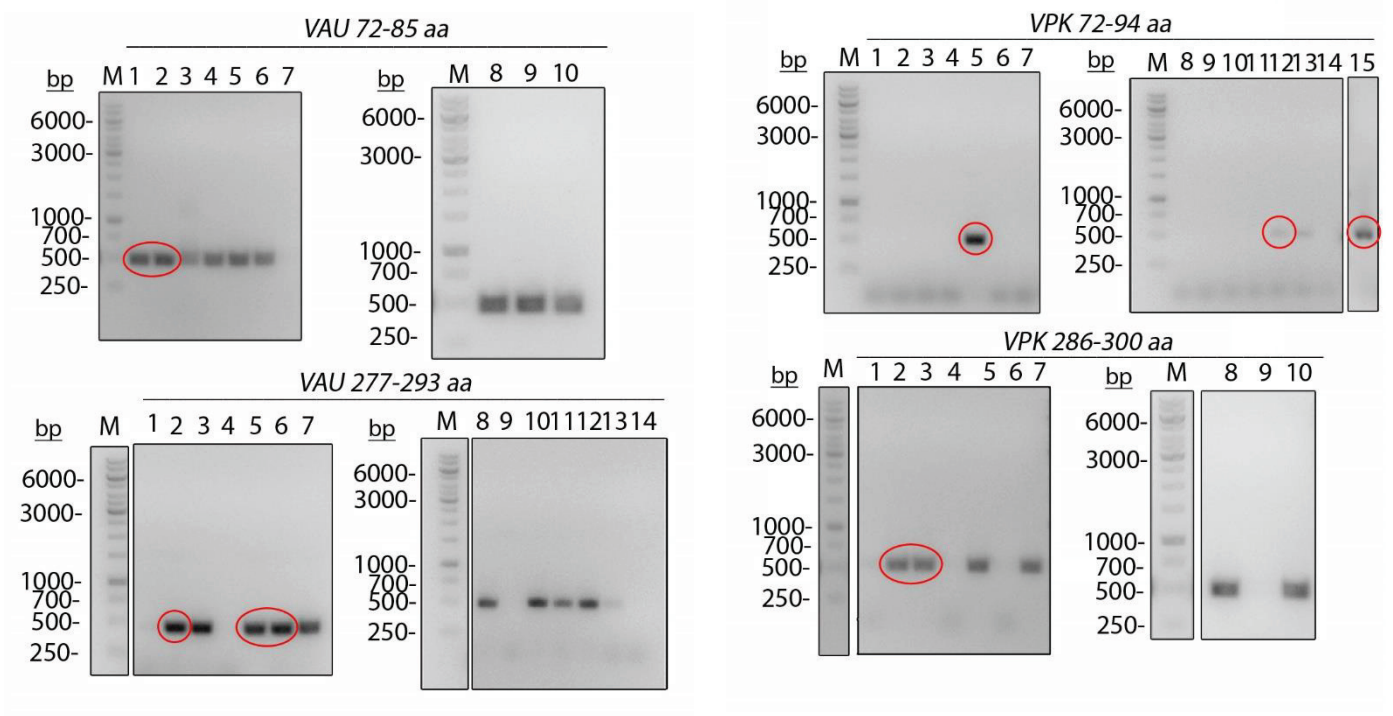


Figura 3.2 - Análise e seleção em gel de agarose de colónias positivas para *V.anguillarum* e *V.parahaemolyticus*. Análise em gel de agarose 0,8% dos produtos de amplificação de colónias aleatoriamente escolhidas para a seleção de potenciais positivas. Foi selecionada e analisada a seguinte população: 1) *V.anguillarum*- construção VAU 72-85aa: 10 colónias; construção VAU 277-293aa: 14 colónias; 2) *V.parahaemolyticus*- construção VPK 72-94aa: 15 colónias; construção VPK 286-300aa: 10 colónias. Os círculos vermelhos destacam as colónias (com sinal positivo de amplificação) selecionadas para subsequente confirmação por sequenciação: VAU 72-85aa, colónias 1 e 2, VAU 277-293aa, colónias 2,5 e 6; VPK 72-94aa, colónias 5, 12 e 15, VPK 286-300aa, colónias 1 e 2. M= Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder

Analisando a Figura 3.2, as colónias que não foram amplificadas, onde está ausente uma banda, significa que não têm o fragmento de interesse. Em alguns casos verifica-se uma ineficácia na amplificação, tal como por exemplo no VPK 72-94aa, as colónias 12 e 13. As amplificações pouco eficientes poderão representar ligações inespecíficas do primer, pelo que não são normalmente selecionadas para subsequente análise por sequenciação de DNA plasmídico.

Relativamente ao epítipo 1 de *V. anguillarum* (VAU 72-85aa), foram repicadas 10 colónias e identificados 90% de positivos; para o epítipo 2 de *V. anguillarum* (VAU 277-293aa), foram repicadas 20 colónias e identificados 65% de positivos. Quanto ao epítipo 1 de *V. parahaemolyticus* (VPK 72-94aa), foram repicadas 20 colónias e identificados 20% de positivos; para *V. parahaemolyticus* (VPK 286-300aa) por sua vez foram repicadas 10 colónias e identificadas 60% de positivos.

Foi possível verificar-se uma frequência menor de amplificações para *V. parahaemolyticus*, observando-se uma maior prevalência de obtenção de amplificações na espécie *V. anguillarum*. De forma similar, isto foi também observado nas espécies *V. harveyi* (VHR), enquanto que em *V. vulnificus* (VVL) o grau de positivos foi muito idêntico ao observado para *V. parahaemolyticus*. O método de clonagem podia influenciar esta diferença de prevalência, o que não se verifica neste caso, visto que os epítipos VPK 72-94aa e VAU 277-293aa foram clonados através do método A, enquanto que o epítipo VAU 72-85aa e VPK 286-300aa foram clonados através do método B.

Após os resultados de *colony PCR* terem sido analisados em gel de agarose, foram selecionados alguns clones positivos e preparadas as amostras de DNA plasmídico para confirmação do sucesso efetivo de clonagem através de análise por sequenciação de DNA (GATC Biotech).

Foram enviadas amostras de DNA de 2 a 3 colónias positivas em gel de agarose de cada epítipo. Contudo, após retorno de resultados de sequenciação, nem todas apresentaram o fragmento de interesse inserido adequadamente no vetor, tendo-se mesmo obtido alguns falsos positivos (Figura 3.3).

VAU

Epítipo 72-85 aa .1

```
5'3' Frame 3
FPSRN-FCLTLRTRYTM
DENGSIINRSDDTSRESDKL-RH-PDVLGNISLRPHSSTTTTTTEIRLLTKPERKLSWLL
PPLSNN-HNPLGPLNGS-GVFC-KEELYPD-RMGRAL-RIKRGCGGYAQRDRYTCORPSARSFRFLPFLSRHVRLSPSSSKSGAPFRVPI-RCTAPRPQET-L
RLMVHVVDHRPDRQFFVL-TWESTVL--WNSWSOTGNNTQRLFVSYS
```

Epítipo 277-293 aa .2

```
5'3' Frame 3
-FCLTLRRRYTMC
DENGSIYGDSDNSNSQGDYND-RH-PDVLGNISLRPHSSTTTTTTEIRLLTKPERKLSWLLPP
LSNN-HNPLGPLNGS-GVFC-EEELYPDWRMGRAL-RIKRGCGGYAQRDRYTCORPSARSFRFLPFLSRHVRLSPSSSKSGAPFRVPI-CFTAPRPQKT-LG-
WFT-WAIALIDGFSPPFDVGVHDLNSGLLFQLEHTQPISVYSFDL-GICRFRPIG-K-ADLTKEFRILQNITLTFSGTFRERGRNPVIFLILQKVPRLRIFLKNPRH
QGTAFSIGFQTIKFTVLEEKNPFSKGGGGVLP
```

VPK

Epítipo 72-94 aa .5

```
5'3' Frame 3
-FCLTLRRRYTMC
DENGSLTRGDEYDSDNSLSDVSNDSNAL-RH-PDVLGNISLRPHSSTTTTTTEIRLLTKPERKL
SWLLPPLSNN-HNPLGPLNGS-GVFC-KEELYPDWRMGRAL-RIKRGCGGYAQRDRYTCORPSARSFRFLPFLSRHVRLSPSSSKSGAPFRVPI-CFTAPRPQ
KT-LG-WFT-WAIALIDGFSPPFDVGVHDLNSGLLFQLEHQSTYLGLFF-L-GILPISAYWLKMS-PTKINANLQKITLTFRWPFRERGGTLLISKTFNRYRPE-F
-KTTGSRNWIHRITTFP-KRFGKGNPRGPERKTGGAPPHQKKNFSKKNRKRGRRCFLFPPLPPSPFAGGEKEKRRK
```

Epítipo 286-300 aa .2

```
5'3' Frame 1
-FCLTLRRRYTMC
DENGSIYGDTSNSARDNTIDN-RH-PDVLGNISLRPHSSTTTTTTEIRLLTKPERKLSWLLPPLS
NN-HNPLGPLNGS-GVFC-KEELYPDWRMGRAL-RIKRGCGGYAQRDRYTCORPSARSFRFLPFLSRHVRLSPSSSKSGAPFRVPI-CFTAPRPQKT-LG-WF
T-WAIALIDGFSPPFDVGVHVL--WLVPNWNNTQPYLGLFF-FIR
```

Figura 3.3 - Confirmação por sequenciação de DNA plasmídico das colónias de *V.anguillarum* e *V.parahaemolyticus*. As seqüências nucleotídicas resultantes do processo de

sequenciação pela empresa GATC foram analisadas pela ferramenta Translate (<https://web.expasy.org/translate/>) da plataforma online ExPasy. Foram identificadas as seguintes colónias (construções) positivas, que apresentam integralmente a sequência codificante, clonada tal como expectável: VAU 72-85aa, colónia 1, VAU 277-293aa, colónia 2; VPK 72-94aa, colónia 5, VPK 286-300aa, colónia 2. As sequências sublinhadas a preto correspondem às regiões codificantes dos epítomos de *Vibrio anguillarum* (VAU) e *Vibrio parahaemolyticus* (VPK). As sequências correspondentes à proteína tag de fusão, estão ocultadas por questões de proteção de intelectual.

As sequências nucleotídicas resultantes do processo de sequenciação foram analisadas pela ferramenta Translate (<https://web.expasy.org/translate/>) da plataforma online ExPasy. Foram identificadas as seguintes colónias (construções) positivas, que apresentam integralmente a sequência codificante, clonada tal como expectável: VAU 72-85aa, colónia 1, VAU 277-293aa, colónia 2; VPK 72-94aa, colónia 5, VPK 286-300aa, colónia 2 (Figura 3.3)

Quando comparados os 4 métodos de clonagem, verificou-se que a método B parece ser aquele que apresenta uma maior eficácia para o processo. O método A foi o único utilizado na tentativa de clonagem da maioria dos epítomos e apenas resultou no sucesso de 2/10 clonagens.

Este método A tem como base o trabalho de Scholz et al., 2013, e recorre igualmente à utilização da família de vetores pCoofy, descritos neste artigo de referência. Em todo o caso a customização necessária para o desenho das construções de epítomos de *Vibrio spp.*, baseou-se numa adaptação metodológica que claramente poderá estar a comprometer a eficiência de clonagem.

3.2 Expressão heteróloga dos epítomos recombinantes de *Vibrio spp.*

Para a expressão heteróloga dos epítomos recombinantes de *Vibrio spp.* codificados nas novas construções obtidos no passo anterior, foi utilizada a estirpe de *E.coli* BL21*. Neste

sistema a indução da expressão proteica é feita por adição do açúcar IPTG e é reprimido na ausência através da proteína lacI. A expressão é altamente controlada o que reconhecidamente favorece este sistema relativamente a outros. Efetivamente o controlo na velocidade, temperatura e tempo de expressão tem impacto na conformação e estabilidade final da proteína recombinante (Young et al., 2012).

Neste trabalho, cada novo epítipo recombinante foi desenhado para ser produzido em fusão com uma proteína proprietária com ~18-20 kDa. Esta proteína multimeriza nativamente após ser expressa em bactérias, funcionando como uma plataforma de apresentação de múltiplas cópias do epítipo de interesse. Esta conformação multimérica tem impacto nos processos subsequentes de purificação por troca iónica e por exclusão molecular: o elevado peso molecular confere um grau acrescido de estabilidade e favorece a isolamento face a outras impurezas.

Tal como na secção anterior, são aqui apresentados apenas os resultados representativos relativos aos epítipos 1 e 2 das espécies *V. anguillarum* (VAU) e *V. parahaemolyticus* (VPK).

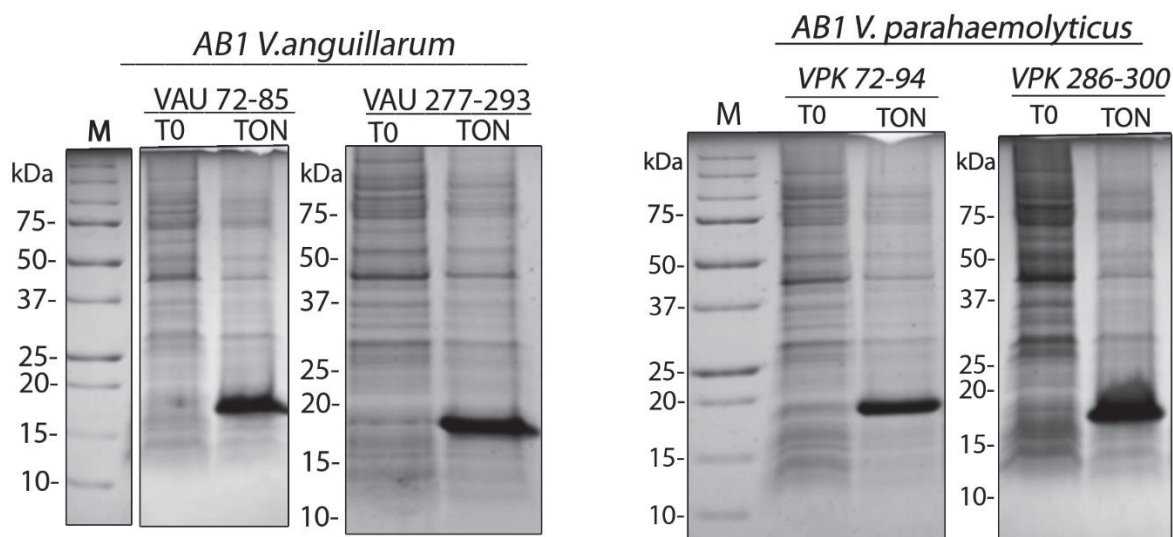


Figura 3.4 - Análise da sobreexpressão dos epítipos recombinantes de *V. anguillarum* e *V. parahaemolyticus*. Análise em SDS-PAGE 12% da sobreexpressão epítipos recombinantes de *V. anguillarum* - VAU 72-85aa, VAU 277-293aa e *V. parahaemolyticus* - VPK 72-94aa, VPK 286-300aa. T0- corresponde a uma amostra de cultura bacteriana no momento antes da indução da expressão recombinante com IPTG; TON- corresponde a uma amostra de cultura após um

período de ~16h de expressão overnight (ON), após indução de expressão com IPTG. As bandas intensas a ~18-20kDa, na amostra TON, refletem uma clara e robusta sobreexpressão de todas as versões dos epítomos recombinantes aqui analisadas. M- marcador Precision Plus Protein unstained standards (Biorad).

Analisando os resultados de sobreexpressão os epítomos recombinantes de *V. anguillarum* e *V. parahaemolyticus* por SDS-PAGE (Figura 3.4), observa-se que, no momento anterior à indução (T0), não há qualquer sinal da proteína de interesse, enquanto que a amostra correspondente ao TON apresenta um claro sinal de sobreexpressão, com presença de uma banda de ~18-20kDa. Após a indução de expressão com IPTG, durante aproximadamente 16 horas, verificou-se uma eficácia na expressão proteica semelhante entre os 4 epítomos. Denote-se que, resultados semelhantes foram igualmente observados para os restantes epítomos (Anexo IIIb).

Consistentemente com as observações em vários outros trabalhos no laboratório, verificou-se mais uma vez a robustez da proteína de fusão utilizada para uma eficiente expressão recombinante de epítomos de origem heteróloga bacteriana.

Após a expressão dos epítomos de interesse, as respetivas culturas bacterianas foram recolhidas por centrifugação e o pellet armazenado a -20°C para passos subsequentes.

3.3 Purificação dos epítomos recombinantes de *Vibrio spp.*

As Figuras 3.5 e 3.6 mostram os perfis cromatográficos numa coluna HiTrap (GE) de troca iónica, respetivamente dos epítomos recombinantes de *V. anguillarum* e *V. parahaemolyticus*. Neste primeiro passo de purificação os dois epítomos da espécie de *V. anguillarum* (Figura 3.5) mostram um comportamento ligeiramente diferente, com o epítomo VAU 72-85aa a começar de eluir a uma concentração de sal (KCl) menor do que quando comparado ao epítomo VAU 277-293aa. Efetivamente a quantidade de proteína obtida entre os dois epítomos mostra também ser diferente, com o epítomo VAU 72-85aa a aparentar um maior grau de rendimento de eluição, mas também um grau mais elevado de impurezas, tal como observado na análise SDS-PAGE. Uma explicação poderá ser o

facto de o epítopo VAU 277-293aa apresentar uma percentagem de resíduos carregados de 41,2% (Tabela 3.1) a pH7,0, potencialmente promovendo uma maior afinidade à coluna de troca iónica usada. Por outro lado, o epítopo VAU 72-85aa apresenta adicionalmente um carácter mais hidrofóbico dos seus resíduos (50% resíduos carregados, 14,3% resíduos hidrofóbicos), podendo este ser um fator diferenciador na capacidade de afinidade à coluna de troca iónica.

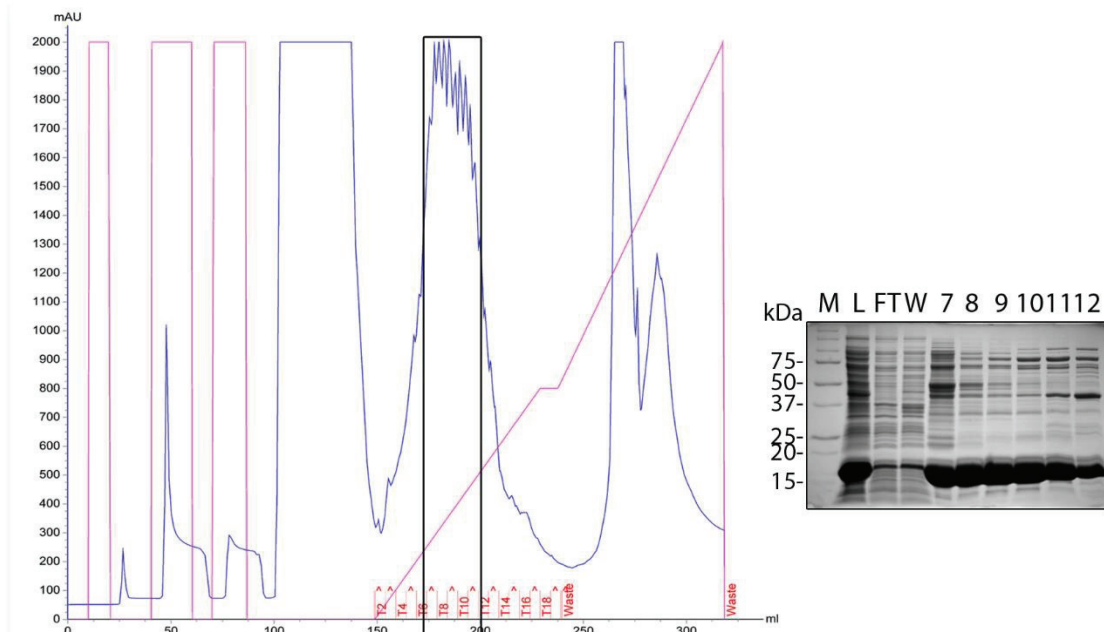
Efetivamente, embora em cada caso individual estejamos na presença de epítopos com composições de resíduos diferentes (Tabela 3.1), podendo isto refletir-se num comportamento final do produto recombinante (proteína de fusão + epítopo) também diferente, não podemos contudo esquecer que uma grande contribuição deste comportamento em solução é resultante da proteína de fusão, visto representar a grande percentagem do peso molecular final.

Na Figura 3.6, está representada a primeira etapa de purificação de ambos os epítopos da espécie *V. parahaemolyticus* (VPK). Neste caso também se verifica um comportamento ligeiramente diferente entre os dois epítopos, tendo eluído por volta dos 300 mM de KCl. Contudo, na análise por SDS-PAGE verifica-se uma ligeira diferença do epítopo VPK 286-300aa (também mais polar; Tabela 3.1), que apresenta um rendimento ligeiramente superior em produto recombinante final. De referir que existe uma diferença de tamanho entre os epítopos de cerca de 8 aminoácidos (Tabela 3.1), sendo o epítopo VPK 286-300 menor, não se observando contudo um impacto relevante como resultado desta diferença de tamanho.

Aqui claramente a contribuição da proteína de fusão sobrepõe-se ao comportamento de cada epítopo e o resultado final na coluna de troca iónica é bastante semelhante.

V. anguillarum (VAU)

Epítopo 72-85



Epítopo 277-293

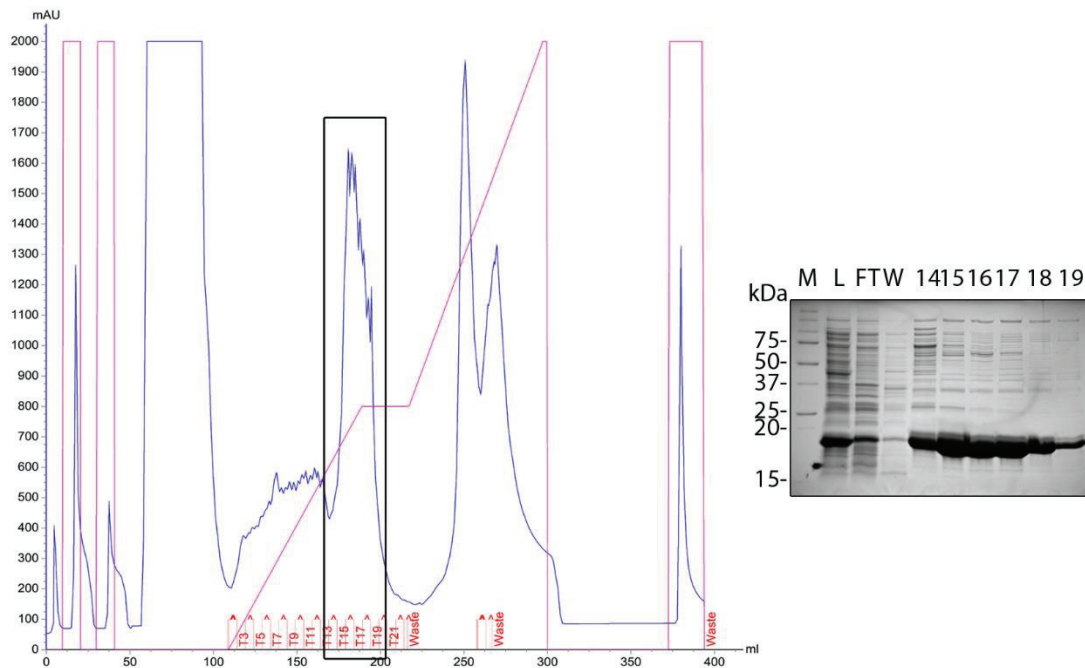
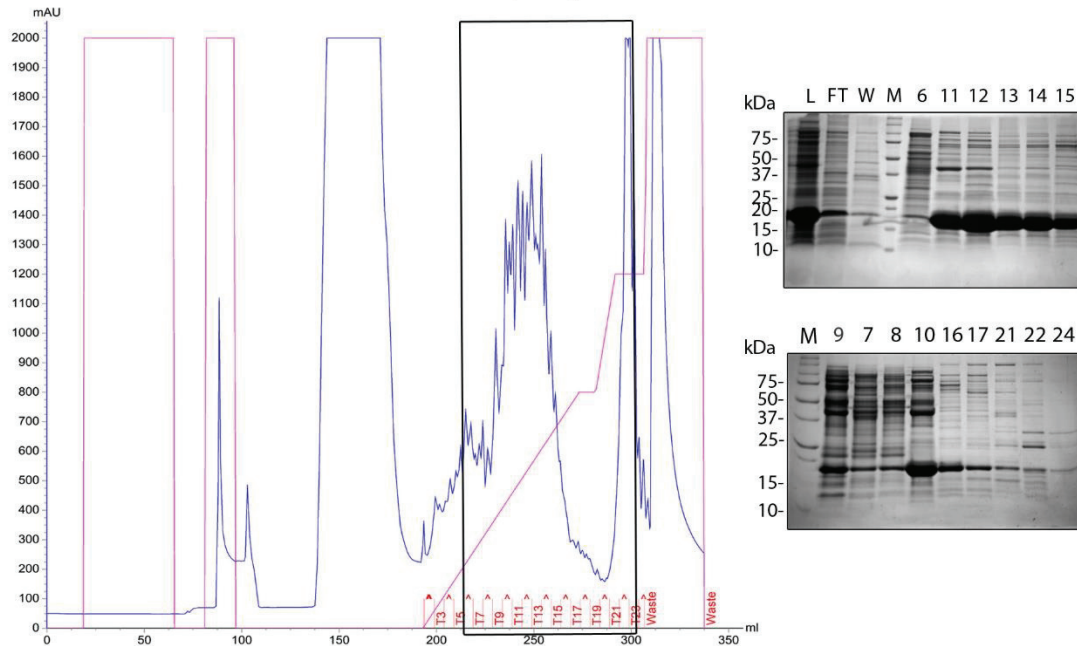


Figura 3.5 - Cromatografia de troca iónica dos epítomos *V.anguillarum*. Primeira etapa de purificação por cromatografia de troca iónica de ambos os epítomos recombinantes de *V.anguillarum* (VAU epítomos 72-85aa e 277-293aa). Nesta etapa foi utilizada a coluna Hitrap Q-GE Healthcare Q HP 5 ml e o sistema de cromatografia AKTA Start (GE Healthcare). À esquerda

na figura são apresentados os cromatogramas de troca iônica e à direita a respectiva análise em SDS-PAGE das seguintes amostras selecionadas. L- load, amostra correspondente ao lisado filtrado (*cleared lysate*) que foi carregado na coluna de troca iônica; FT – Flow-through, a amostra correspondente ao lisado após a passagem pela coluna de troca iônica, permite a avaliação da eficiência da afinidade da proteína alvo à coluna; W – wash, amostra recolhida após extensa lavagem da coluna com tampão, previamente à eluição da proteína de interesse: T14-19 (retângulo preto de destaque, no cromatograma), frações recolhidas ao longo do gradiente de eluição e correspondentes ao pico principal de eluição da proteína de interesse- banda ~18-20kDa em SDS-PAGE. M- marcador Precision Plus Protein unstained standards (Biorad).

V. parahaemolyticus (VPK)

Epítopo 72-94



Epítopo 286-300

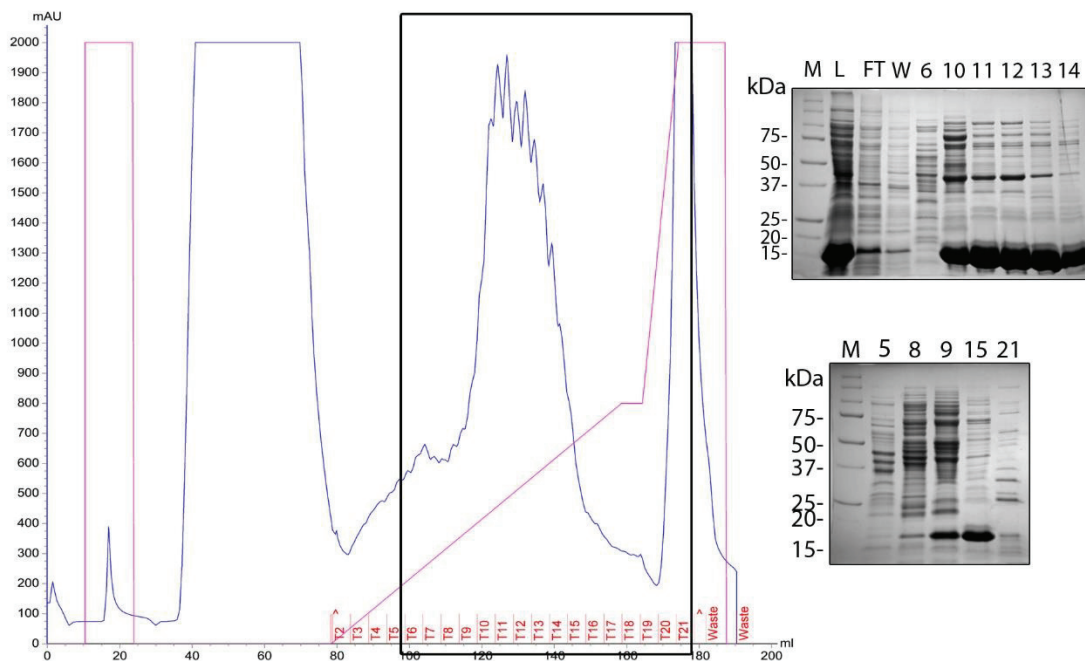


Figura 3.6 - Cromatografia de troca iónica dos epítopos de *V. parahaemolyticus*. Primeira etapa de purificação por cromatografia de troca iónica de ambos os epítopos recombinantes de *V. parahaemolyticus* (VPK epítopos 72-94aa e 286-300aa). Nesta etapa foi utilizada a coluna Hitrap Q- GE Healthcare Q HP 5 ml e o sistema de cromatografia AKTA Start (GE Healthcare). À esquerda na figura são apresentados os cromatogramas de troca iónica e à direita a respetiva análise em SDS-PAGE das seguintes amostra selecionadas: L- Load, amostra correspondente ao

lisado filtrado (cleared lysate) que foi carregado na coluna de troca iônica; FT- Flow-through, a amostra correspondente ao lisado após passagem pela coluna de troca iônica, permite avaliação da eficiência de afinidade da proteína alvo à coluna; W- Wash, amostra recolhida após extensa lavagem da coluna com tampão, previamente à eluição da proteína de interesse; T6-21 (retângulo preto de destaque, no cromatograma), frações recolhidas ao longo do gradiente de eluição, e correspondentes ao pico principal de eluição da proteína de interesse- banda ~18-20kDa em SDS-PAGE. M- marcador Precision Plus Protein unstained standards (Biorad).

Para ambos os epítomos, VPK 72-94aa e VPK 286-300aa, obteve-se um bom rendimento de purificação, como observado nas frações 7-12 e 14-16 respectivamente da análise SDS-PAGE. Contudo, há uma significativa presença de outras impurezas que rondam pesos moleculares de 75kDa, razão pela qual se procedem a um segundo passo de purificação por cromatografia por exclusão molecular, como se descreve em seguida (Figuras 3.7)

Numa purificação por exclusão molecular procuramos idealmente a obtenção de picos de eluição únicos e bem individualizados, que refletem uma população homogênea de apenas uma proteína, enriquecida sobre outras (impurezas). Quanto mais estreito o perfil do pico de eluição, maior o grau de monodispersidade, demonstrando uma população única em solução e de comportamento estável, do ponto de vista conformacional. Ligeiras alterações no perfil de eluição podem refletir estados conformacionais diferentes, no caso de estarmos a caracterizar uma proteína única.

Na Figura 3.7 são apresentados os perfis cromatográficos de exclusão molecular dos epítomos de *V. anguillarum* e *V. parahaemolyticus*. São apresentados em sobreposição os dois cromatogramas de exclusão molecular dos epítomos de *V. anguillarum* (painel superior): VAU 72-85aa (azul claro) e VAU 277-293aa (azul escuro). Nestes verifica-se uma proximidade no volume de eluição de ambos os epítomos (~170 mL). As diferenças de tamanho de cada epítopo, respectivamente de 14aa e 17aa, parecem não resultar numa diferença no volume de eluição. São igualmente apresentados em sobreposição os dois cromatogramas de exclusão molecular dos epítomos de *V. parahaemolyticus* (painel inferior): VPK 72-94aa (amarelo) e VPK 286-300aa (vermelho); nestes verifica-se uma ligeira diferença nos volumes de eluição, entre ~165 mL e ~175 mL, respectivamente.

Aqui as diferenças de tamanho de cada epítipo, respetivamente de 23aa e 15aa, parecem ter um impacto no volume final de eluição, sendo no entanto o perfil de eluição mais consistente entre ambos, ao contrário do que observado para *V.anguillarum*.

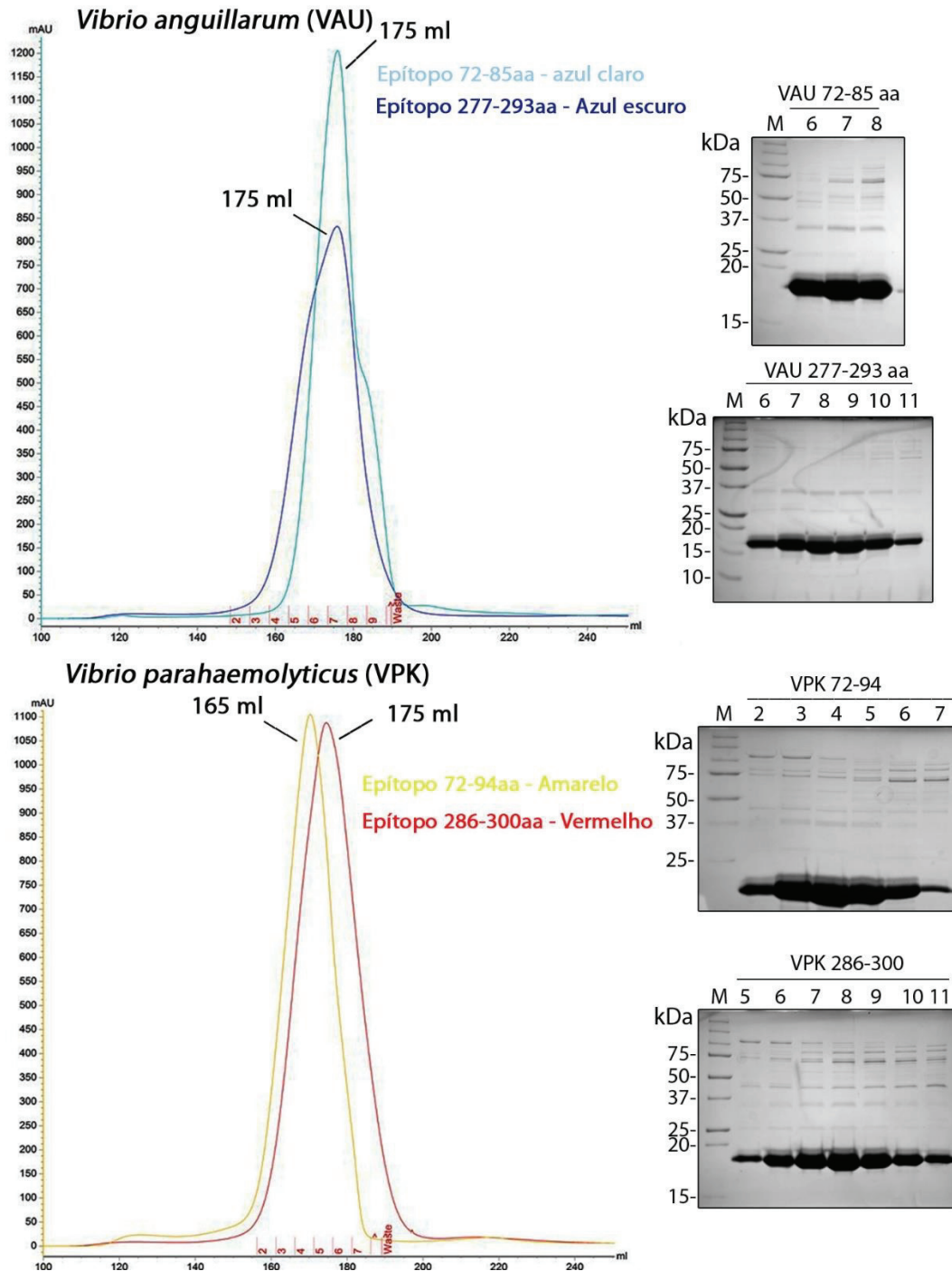


Figura 3.7 - Cromatografia de exclusão molecular dos epítipos de *V.anguillarum* e *V.parahaemolyticus*. . Segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular de ambos os epítipos recombinantes de *V.anguillarum* (VAU epítipos 72-85aa e 277-293aa) e *V.parahaemolyticus* (VPK epítipos 72-94aa e 286-300aa). Nesta etapa foi utilizada a coluna

preparativa HiLoad 26/600 Superdex 200pg (GE Healthcare Life Sciences), e o sistema de cromatografia AKTA Pure (GE Healthcare). São apresentados em sobreposição os dois cromatogramas de exclusão molecular dos epítomos de *V. anguillarum* (painel superior): VAU 72-85aa (azul claro) e VAU 277-293aa (azul escuro); verifica-se uma proximidade no volume de eluição de ambos os epítomos (~175 mL). São igualmente apresentados em sobreposição os dois cromatogramas de exclusão molecular dos epítomos de *V. parahaemolyticus* (painel inferior): VPK 72-94aa (amarelo) e VPK 286-300aa (vermelho); neste verifica-se uma ligeira diferença nos volumes de eluição (165 mL vs 175 mL). À esquerda dos cromatogramas são apresentadas as respetivas análises em SDS-PAGE das frações recolhidas ao longo da corrida de exclusão molecular – banda da proteína de interesse ~18-20kDa. M- marcador Precision Plus Protein unstained standards (Biorad).

Relativamente à espécie *V. anguillarum*, verifica-se também uma diferença evidente na quantidade de proteína obtida; em particular para o epítomo VAU 72-85 obteve-se maior quantidade de proteína. Isto resulta efetivamente do fato de na primeira etapa o rendimento já ter sido também superior. Para os epítomos da espécie *V. parahaemolyticus*, obteve-se uma quantidade de proteína idêntica em ambos.

Na Tabela 3.1 estão sintetizadas de forma comparativa as propriedades de oito epítomos de *Vibrio spp.* gerados neste trabalho.

Dos 8 epítomos produzidos e purificados, a construção que mostrou maior robustez e estabilidade ao longo de todo o protocolo de purificação foi *V. parahaemolyticus*, sendo que, onde se verificou a menor estabilidade na conformação da proteína foi na construção dos epítomos de *V. vulnificus*.

Tabela 3.1 - Análise comparativa das propriedades dos oito epítomos de *Vibrio spp.* em estudo. São sintetizadas na tabela as características de cada epítomo relativamente às propriedades de: número de aminoácidos (tamanho), carga global do epítomo, percentagem de aminoácidos com propriedades acídicas, básicas, polares e hidrofóbicas, e rácio arbitrário de aminoácidos hidrofóbicos/polares e polares/carregados. Para a hidrofobicidade e rácios, cada epítomo está colorido com um gradiente de cor verde para facilitar a comparação. Esta análise foi efectuada com recurso ao programa VectorNTi (Invitrogen). As sequências analisadas são as seguintes: *V. parahaemolyticus*(VPK)_72-94aa- LTRGDTEYDSNLISDVSNDNAL; *V. parahaemolyticus*

(VPK)_286-300aa- YGDTSNSARDNTTDN; *V.anguillarum*(VAU)_72-85aa-
INRSDTDSRESDKL; *V.anguillarum*(VAU)_277-293aa- YGDESNDNSNSOQDYND;
V.vulnificus(VVL)_72-92aa- LKRGDTDL DAGATIDNDQNAL; *V.vulnificus*(VVL)_284-299aa-
YADVSN SAQSDGTTNN; *V.harveyi*.(VHR)_64-92aa- ITRGDRDL DAGGKTSTDENVL;
V.harveyi.(VHR)_284-298aa- YADTSESVDNTTDG.

	VPK 72-94	VPK 286-300	VAU 72-85	VAU 277-293	VVL 72-92	VVL 284-299	VHR 64-92	VHR 284-298
Length (aa)	23,0	15,0	14,0	17,0	21,0	16,0	21,0	15,0
Charged (%)	30,4	33,3	50,0	41,2	33,3	18,75	38,1	33,3
Acidic (%)	21,7	20,0	28,6	29,4	23,8	12,5	23,8	26,7
Basic (%)	4,4	6,7	21,4	0,0	9,5	0	14,3	0,0
Polar (%)	43,5	60,0	35,7	58,8	23,8	62,5	23,8	53,3
Hydrophobic (%)	26,1	6,7	14,3	0,0	33,3	18,75	23,8	13,3
Hydroph/Charged	0,9	0,2	0,3	0,0	1,0	1	0,6	0,4
Polar/Charged	1,4	1,8	0,7	1,4	0,7	3,3	0,6	1,6

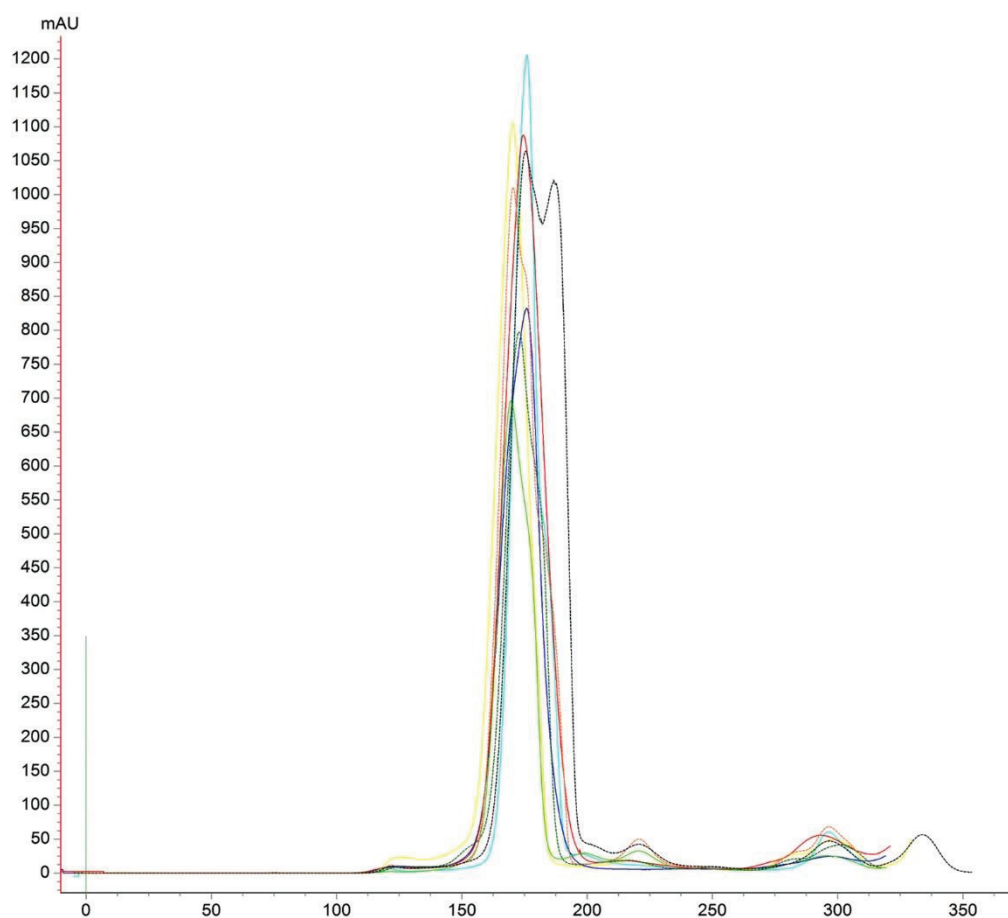


Figura 3.8 - Cromatografia de exclusão molecular dos oito epítomos de *Vibrio* spp. em estudo. São apresentados em sobreposição e para efeitos de comparação de perfil de eluição,

todos os cromatogramas de exclusão molecular dos epítomos estudados. *V. parahaemolyticus* (VPK) 72-94aa (amarelo); *V. parahaemolyticus* (VPK) 286-300aa (vermelho); *V. anguillarum* (VAU) 72-85aa (azul ciano); *V. anguillarum* (VAU) 277-293aa (azul); *V. vulnificus* (VVL) 72-92aa (azul claro); *V. vulnificus* (VVL) 284-299aa (verde musgo); *V. harveyi* (VHR) 64-92aa (verde); *V. harveyi* (VHR) 284-298aa (verde escuro).

Na Figura 3.8 são apresentados em sobreposição e para efeitos de comparação de perfil de eluição, todos os cromatogramas de exclusão molecular dos epítomos estudados. Na generalidade verifica-se que todos os perfis estão dentro dos mesmos limites de eluição, ~150-200 mL, com picos de eluição a variar entre os ~170-180 mL. As intensidades dos picos de eluição refletem o rendimento obtido para cada epítomo no passo de purificação por troca iónica, não podendo no entanto concluir-se mais nenhum efeito a nível de estabilidade da proteína. Por outro lado, os perfis de eluição observados remetem para comportamentos conformacionais únicos de cada fusão proteína AB1-epítomo que parecem estar correlacionados com a composição dos diferentes epítomos.

Como já referido, o comportamento da proteína AB1 de fusão, aqui utilizada para efeitos de favorecimento de expressão, bem como de purificação, estava já devidamente caracterizado no laboratório. Consistentemente as fusões proteína AB1-epítomo mantiveram o seu comportamento global estável e robusto, mantendo a sua capacidade de multimerização para um peso molecular de ~160 kDa, correspondente a um volume de eluição de 170-180 mL na coluna de exclusão molecular utilizada, independentemente do epítomo recombinante clonado. Em todo o caso podem ser observados comportamentos de eluição únicos como é o caso do epítomo *V. vulnificus* (VVL) 284-299aa, que apresenta um duplo pico e um alargamento da sua janela de eluição. Isto reflete a tendência para a co-existência de duas populações com conformações ligeiramente diferentes, podendo neste caso a composição do epítomo (16 resíduos; hidrofobicidade de 18,75%, rácio resíduos polares/hidrofóbicos 3,3) ser em parte responsável pelo perfil observado.

4. Conclusão

Trabalhos anteriores no laboratório de acolhimento demonstraram que os canais-túnel TolC do género *Vibrio* apresentam uma diversidade única dos seus loops extracelulares L1 e L2 e que esses loops parecem seguir um perfil de compensação de tamanho, não totalmente transversal a outras Gram-negativas. O presente trabalho demonstrou ser possível o desenho e produção de versões recombinantes destes *loops* extracelulares, nomeadamente de TolCs de patógenos *Vibrio* de peixe. Estes produtos recombinantes, aos quais chamámos epítomos recombinantes, serão a base para procedimentos de imunização ativa de peixes hospedeiros, ou mesmo para a produção de anticorpos para imunização passiva, com recurso a outros hospedeiros. De facto, a motivação de base para o presente trabalho era o desenho de novos anticorpos IgY derivados de gema de ovo, com especificidade para os loops L1 e L2 de TolCs de patógenos *Vibrio* de peixe. Trabalhos anteriores no laboratório (Tese Mestrado em Bioquímica, João Laranjeira) demonstraram que anticorpos IgY de codorniz produzidos contra TolC de *E.coli* conseguem bloquear o efluxo de moléculas citotóxicas, denotando um efeito promissor como antimicrobianos ou como adjuvantes de antimicrobianos. Esta é uma aplicação terapêutica que continua a ser largamente explorada no laboratório de acolhimento. A imunização de galinhas como hospedeiras, utilizando os epítomos recombinantes produzidos neste trabalho, já está em curso tendo, no entanto, saído fora do calendário de trabalho laboratorial para o presente projeto.

É expectável que estes anticorpos possam igualmente servir para procedimentos de monitorização e diagnóstico rápido de patógenos *Vibrio* de peixe, contribuindo para um controlo mais robusto de Vibrioses, nomeadamente em contexto de aquacultura.

Finalmente, antevê-se também que os novos anticorpos IgY produzidos contra os loops extracelulares destes organismos *Vibrio*, possam ser ferramentas críticas para a caracterização estrutural e funcional e compreensão mais exaustiva do modo de funcionamento do canal-túnel TolC no género *Vibrio*, onde a diversidade parece ser um aspeto muito particular do mesmo.

5 Bibliografia

- A. Polson, M. B. von W. & G. F. (1980). Antibodies to Proteins from Yolk of Immunized Hens. *Immunological Communications*, 9(5), 495–514. <https://doi.org/https://doi.org/10.3109/08820138009066011>
- Alfiansah, Y. R., Hassenrück, C., Kunzmann, A., Taslihan, A., Harder, J., & Gärdes, A. (2018). Bacterial abundance and community composition in pond water from shrimp aquaculture systems with different stocking densities. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02457>
- Almeida, A., Cunha, Â., Gomes, N. C. M., Alves, E., Costa, L., & Faustino, M. A. F. (2009). Phage therapy and photodynamic therapy: Low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Marine Drugs*, 7(3), 268–313. <https://doi.org/10.3390/md7030268>
- Amaro, C., & Biosca, E. G. (1996). *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1454–1457. <https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1454-1457.1996>
- Amatul-Samahah, M. A., Wan Omar, W. H. H., Mohd Ikhsan, N. F., Amal Azmai, M. N., Zamri-Saad, M., & Ina-Salwany, M. Y. (2020). Vaccination trials against vibriosis in shrimp: A review. *Aquaculture Reports*, 18, 100471. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100471>
- Andersen, C. (2003). Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 147, 122–165. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0008-y>
- Annie Selva Sonia, G., & Lipton, A. P. (2012). Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from the captive-reared tropical marine ornamental blue damselfish, *Pomacentrus caeruleus* (Quoy and Gaimard, 1825). *Indian Journal of Marine Sciences*, 41(4), 348–354.
- Austin, B., Austin, D. A. (2007). *Bacterial Fish Pathogens : Disease of Farmed and Wild Fish*. <https://www.springer.com/gp/book/9781402060687>
- Baharum, S. B. E. ., & ; Mohd Azinuddin Ahmad Mokhtar. (2010). Marine microorganisms: Potential Application and Challenges. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 555–564. <https://doi.org/DOI:10.3923/jbs.2010.555.564>
- Baloch, A. R., Zhang, X. Y., & Schade, R. (2014). IgY Technology in aquaculture - a review. *Reviews in Aquaculture*, 7(3), 153–160. <https://doi.org/10.1111/raq.12059>
- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, A., Katouli, M., Kühn, I., Möllby, R., Bruscolini, F., & Donelli, G. (1999). Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2748–2753. <https://doi.org/10.1128/aem.65.6.2748-2753.1999>
- BARUA, A., FURUSAWA, S., & YOSHIMURA, Y. (2000). Influence of Aging and Estrogen Treatment on the IgY Concentration in the Egg Yolk of Chicken, *Gallus domesticus*. *Japanese Poultry Science*, 37(5), 280–288. <https://doi.org/10.2141/jpsa.37.280>

- Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., & Th ewis, A. (2009). *Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken : a review*. *13*(2), 295–308.
- Chatterjee, A., & O’Brian, M. R. (2018). Rapid evolution of a bacterial iron acquisition system. *Molecular Microbiology*, *108*(1), 90–100. <https://doi.org/10.1111/mmi.13918>
- Cordero, O. X., Ventouras, L. A., DeLong, E. F., & Polz, M. F. (2012). Public good dynamics drive evolution of iron acquisition strategies in natural bacterioplankton populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(49), 20059–20064. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213344109>
- Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(6), 343–359. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>
- Darshanee Ruwandeepika, H. A., Sanjeewa Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. *Reviews in Aquaculture*, *4*(2), 59–74. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01061.x>
- Das, S., Lyla, P. S., & Khan, S. A. (2006). Marine microbial diversity and ecology: Importance and future perspectives. *Current Science*, *90*(10), 1325–1335.
- Das, S., & Mangwani, N. (2015). Ocean acidification and marine microorganisms: responses and consequences. *Oceanologia*, *57*(4), 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2015.07.003>
- DeLoney-Marino, C. R., Wolfe, A. J., & Visick, K. L. (2003). Chemoattraction of *Vibrio fischeri* to Serine, Nucleosides, and N-Acetylneuraminic Acid, a Component of Squid Light-Organ Mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(12), 7527–7530. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7527-7530.2003>
- Deng, Y., Xu, L., Chen, H., Liu, S., Guo, Z., Cheng, C., Ma, H., & Feng, J. (2020). Prevalence , virulence genes , and antimicrobial resistance of *Vibrio* species isolated from diseased marine fish in South China. *Scientific Reports*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71288-0>
- Denkin, S. M., & Nelson, D. R. (2004). Regulation of *Vibrio anguillarum* empA metalloprotease expression and its role in virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(7), 4193–4204. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4193-4204.2004>
- Echazarreta, M. A., & Klose, K. E. (2019). *Vibrio* flagellar synthesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00131>
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. In *Fisheries Oceanography*. <https://doi.org/10.1111/fog.12466>
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*.
- Federici, L., Du, D., Walas, F., Matsumura, H., Fernandez-Recio, J., McKeegan, K. S., Borges-Walmsley, M. I., Luisi, B. F., & Walmsley, A. R. (2005). The crystal structure of the outer membrane protein VceC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(15), 15307–15314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500401200>

- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, *110*(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, *34*(9), 643–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Froelich, B., Gonzalez, R., Blackwood, D., Lauer, K., & Noble, R. (2019). Decadal monitoring reveals an increase in *Vibrio* spp. Concentrations in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *PLoS ONE*, *14*(4), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215254>
- Grando, T. H., Baldissera, M. D., de Sá, M. F., do Carmo, G. M., Porto, B. C. Z., Aguirre, G. S. V., Azevedo, M. I., de Jesus, F. P. K., Santurio, J. M., Sagrillo, M. R., Stefani, L. M., & Monteiro, S. G. (2017). Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *Journal of Immunological Methods*, *449*, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.002>
- Guan, H. H., Yoshimura, M., Chuankhayan, P., Lin, C. C., Chen, N. C., Yang, M. C., Ismail, A., Fun, H. K., & Chen, C. J. (2015). Crystal structure of an antigenic outer-membrane protein from *Salmonella Typhi* suggests a potential antigenic loop and an efflux mechanism. *Scientific Reports*, *5*(July), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep16441>
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2016). Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, *36*(6), 1089–1098. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264>
- Haenen, O. L. M., Van Zanten, E., Jansen, R., Roozenburg, I., Engelsma, M. Y., Dijkstra, A., Boers, S. A., Voorbergen-Laarman, M., & Möller, A. V. M. (2014). *Vibrio vulnificus* outbreaks in Dutch eel farms since 1996: Strain diversity and impact. *Diseases of Aquatic Organisms*, *108*(3), 201–209. <https://doi.org/10.3354/dao02703>
- Higgins, M. K., Eswaran, J., Edwards, P., Schertler, G. F. X., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004). Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC. *Journal of Molecular Biology*, *342*(3), 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.088>
- Holmen, I. M., Schjøberg, I., Marie, E., & Bar, S. (2017). *RISK MANAGEMENT IN AQUACULTURE – INTEGRATING SUSTAINABILITY PERSPECTIVES*. *7Bh*, 1–10.
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, *31*(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Jeong, J. Y., Yim, H. S., Ryu, J. Y., Lee, H. S., Lee, J. H., Seen, D. S., & Kang, S. G. (2012). One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(15), 5440–5443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-12>
- Kanonenberg, K., Schwarz, C. K. W., & Schmitt, L. (2013). Type I secretion systems - a story of appendices. *Research in Microbiology*, *164*(6), 596–604. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.011>
- Kokashvili, T., Whitehouse, C. A., Tskhvediani, A., Grim, C. J., Elbakidze, T., Mitaishvili, N., Janelidze, N., Jaiani, E., Haley, B. J., Lashkhi, N., Huq, A., Colwell, R. R., & Tediashvili, M.

- (2015). Occurrence and Diversity of Clinically Important *Vibrio* Species in the Aquatic Environment of Georgia. *Frontiers in Public Health*, 3(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00232>
- Kollberg, H., Carlander, D., Olesen, H., Weja, P., Johannesson, M., & Larsson, A. (2003). *Oral Administration of Specific Yolk Antibodies (IgY) May Prevent Pseudomonas aeruginosa Infections in Patients With Cystic Fibrosis : A Phase I Feasibility Study*. 440(January), 433–440. <https://doi.org/10.1002/ppul.10290>
- Koronakis, V. (2003). TolC - The bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Letters*, 555(1), 66–71. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01125-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01125-6)
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., & Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405(6789), 914–919. <https://doi.org/10.1038/35016007>
- Kustusch, R. J., Kuehl, C. J., & Crosa, J. H. (2012). *Power plays: iron transport and energy transduction in pathogenic vibrios*. 24(3), 559–566. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9437-2>.Power
- Le Roux, F., Wegner, K. M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C. R., Amaro, C., Ritchie, J. M., Defoirdt, T., Destoumieux-Garzón, D., Blokesch, M., Mazel, D., Jacq, A., Cava, F., Gram, L., Wendling, C. C., Strauch, E., Kirschner, A., & Huehn, S. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: Ecology, evolution and pathogenesis (Paris, 11-12 March 2015). *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00830>
- Lee, S. B., Mine, Y., & Stevenson, R. M. W. (2000). Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), 110–115. <https://doi.org/10.1021/jf9906073>
- Lei, H. T., Chou, T. H., Su, C. C., Bolla, J. R., Kumar, N., Radhakrishnan, A., Long, F., Delmar, J. A., Do, S. V., Rajashankar, K. R., Shafer, W. M., & Yu, E. W. (2014). Crystal structure of the open state of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrE outer membrane channel. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097475>
- Li, G., & Wang, M. (2019). *The role of Vibrio vulnificus virulence factors and regulators in its infection-induced sepsis*.
- Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., & Jia, M. (2019). Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, 222(February), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.003>
- Li, X., Wang, L., Zhen, Y., Li, S., & Xu, Y. (2015). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production : a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0038-8>
- Li, Y., & Ma, Q. (2017). *Iron Acquisition Strategies of Vibrio anguillarum*. 7(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00342>
- Liu, H., Wang, Y., Cao, J., Jiang, H., Yao, J., Gong, G., Chen, X., Xu, W., & He, X. (2020). Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 515(August 2019), 734578. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734578>
- Lixing Huang., Qiancheng Gao., Youyu Zhang., Wei Xu ., Q. Y. (2021). Community Change and Pathogenicity of *Vibrio*. In *IntechOpen*. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>

- Maeda, T., Matsuo, Y., Furushita, M., & Shiba, T. (2003). Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA. *Fisheries Science*, 69(2), 385–394. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00633.x>
- Maldonado, M. A., Buschmann, A. H., Tomova, A., Lo, A., Ivanova, L., Moy, F., Godfrey, H. P., Cabello, F. C., & Henri, L. A. (2012). *Salmon Aquaculture and Antimicrobial Resistance in the Marine Environment*. 7(8), 26–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042724>
- Möller, L., Kreikemeyer, B., Luo, Z. H., Jost, G., & Labrenz, M. (2020). Impact of coastal aquaculture operation systems in Hainan island (China) on the relative abundance and community structure of *Vibrio* in adjacent coastal systems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 233, 106542. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106542>
- Nascimento, I. P., & Leite, L. C. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), 1102–1111. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>
- Novriadi, R. (2016). Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.20884/1.oa.2016.12.1.24>
- O’Dor, R. (2004). A Census of Marine Life. *BioScience*, 54(2), 92–93. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0092:ACOML\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0092:ACOML]2.0.CO;2)
- O’Toole, R., Milton, D. L., & Wolf-Watz, H. (1996). Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Molecular Microbiology*, 19(3), 625–637. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.412927.x>
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Osei, G., Xinxiang, A., & Yiquan, H. (2018). The extracellular proteases produced by *Vibrio parahaemolyticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2453-4>
- Osunla, C. A., & Okoh, A. I. (2017). *Vibrio* pathogens: A public health concern in rural water resources in sub-Saharan Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(10), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101188>
- Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, 19(5), 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>
- Panagiotis Angelidis, G. B. (2015). Effect of Temperature and Seasonality Principal Epizootiological Risk Factor on Vibriosis and Photobacteriosis Outbreaks for European Sea Bass in Greece (1998-2013). *Journal of Aquaculture Research & Development*, 06(05), 2013–2015. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000338>
- Pei, X. Y., Hinchliffe, P., Symmons, M. F., Koronakis, E., Benz, R., Hughes, C., & Koronakis, V. (2011). Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), 2112–2117. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012588108>
- Penduka, D., Okoh, O. O., & Okoh, A. I. (2011). In-Vitro antagonistic characteristics of crude aqueous and methanolic extracts of *Garcinia kola* (Heckel) seeds against some *Vibrio* bacteria. *Molecules*, 16(4), 2754–2765. <https://doi.org/10.3390/molecules16042754>
- Pereira, E. P. V., Tilburg, M. F. Van, Florean, E. O. P. T., & Guedes, M. I. F. (2020). *Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review*. January.

- Perrie, Y., Mohammed, A. R., Kirby, D. J., McNeil, S. E., & Bramwell, V. W. (2008). Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *International Journal of Pharmaceutics*, *364*(2), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.036>
- Phan, G., Benabdelhak, H., Lascombe, M. B., Benas, P., Rety, S., Picard, M., Ducruix, A., Etchebest, C., & Broutin, I. (2010). Structural and Dynamical Insights into the Opening Mechanism of *P. aeruginosa* OprM Channel. *Structure*, *18*(4), 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.018>
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, *7*(048). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20127048>
- Roger CHONG, B. B. and R. B. (2011). Fish Disease Management. *Disease Management*, *1*(1), 1–12.
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Rohul Amin, A. K. M., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., & Hayashi, T. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, *4*(DEC), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00414>
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-asplund, J., & Terzolo, H. R. (2005). *Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine*. 129–154.
- Scholz, J., Besir, H., Strasser, C., & Suppmann, S. (2013). A new method to customize protein expression vectors for fast, efficient and background free parallel cloning. *BMC Biotechnology*, *13*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-12>
- Silveira, D. R., Milan, C., Rosa, J. V. da, & Timm, C. D. (2016). Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. de importância em doenças transmitidas por alimentos. *Arquivos Do Instituto Biológico*, *83*(0), 1–7. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001252013>
- Striedner, G., Pfaffenzeller, I., Markus, L., Nemecek, S., Grabherr, R., & Bayer, K. (2010). Plasmid-free T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology and Bioengineering*, *105*(4), 786–794. <https://doi.org/10.1002/bit.22598>
- Su, C. C., Radhakrishnan, A., Kumar, N., Long, F., Bolla, J. R., Lei, H. T., Delmar, J. A., Do, S. V., Chou, T. H., Rajashankar, K. R., Zhang, Q., & Yu, E. W. (2014). Crystal structure of the *Campylobacter jejuni* CmeC outer membrane channel. *Protein Science*, *23*(7), 954–961. <https://doi.org/10.1002/pro.2478>
- Symmons, M. F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(17), 7173–7178. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900693106>
- Tanabe, T., Funahashi, T., Shiuchi, K., Okajima, N., Nakao, H., Miyamoto, K., Tsujibo, H., & Yamamoto, S. (2012). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore. *Microbiology (United Kingdom)*, *158*(8), 2039–2049. <https://doi.org/10.1099/mic.0.059568-0>
- Thommes, P. I. A., Gassmann, P., & Zurich, U. (1990). *Efficient against production a conserved*

egg yolk antibodies protein. 2528–2532.

- Thompson, F. L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G. S., Pereira, A., De Bem, M. M., Sorgeloos, P., & Swings, J. (2003). *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 245–252. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02447-0>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). <Verschuere et al 00.pdf>. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655–671.
- Vieira, M. A. M. (2009). Ilhas de patogenicidade Pathogenicity islands Islas de patogenicidad. *O Mundo Da Saúde*, 33(4), 406–414. http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/70/406a414.pdfhttps://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/70/406a414.pdf
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6578–6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>
- Zhang, Xiao-Ying; Vieira-Pires, Ricardo S.; Xu, L. (2021). Chapter 1 - Development of IgY Technology - a Historical Perspective. In R. Zhang, Xiao-Ying; Vieira-Pires, Ricardo S.; Morgan, Patricia M.; Schade (Ed.), *In IgY-Technology: Production and Application of Egg Yolk Antibodies - Basic Knowledge for a Successful Practice*. Springer Nature.
- Zhang, M., Geng, H., Tariq Javed, M., Xu, L., Li, X., Wang, L., Li, S., & Xu, Y. (2021). Passive protection of Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) against *Vibrio harveyi* infection using chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). *Aquaculture*, 532(2). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736009>
- Zhang, X. H., & Austin, B. (2005). Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1011–1019. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02583.x>

ANEXO I

Linearização		Ciclo de PCR		
Vetor	10 ng	98°C	3'	1x
Primer (FWD/VER)	1 µl	98°C	30''	
Tampão	10 µl	X	30''	
Enzima (Polimerase)	5 µl	72°C	9'	30x
H ₂ O Autoclavada	Variável	72°C	10'	1x

Colony PCR		Ciclo de PCR		
Colônia	5 µl	98°C	3'	1x
Primer (FWD/VER)	1 µl	98°C	30''	30x
Tampão	10 µl	X	30''	
Enzima (Polimerase)	5 µl	72°C	1'	
H ₂ O Autoclavada	Variável	72°C	10'	1x

Reação de Ligação/Fosforilação	
Vetor	100 ng
Primer (FWD/VER)	1 µl
Tampão	10 µl
Enzima (Polimerase)	5 µl
H ₂ O Autoclavada	Variável

Anexo I : Temperaturas utilizadas e as respectivas quantidades de reagentes utilizados nas reações de PCR e posteriormente, na última tabela, a informação pormenorizada da reação de ligação/fosforilação.

ANEXO II

Listagem dos primers utilizados ao longo do trabalho:

Linearização P30 (Método A)

Forward (# 186- LP2 REV ccdB (Vetor lin)

5'- CGCCATTAACCTGATGTTCTGGGG -3'

Reverse (#190- REV_RCK8_vetor_lin)

5'- GCTTATTTTAAATTCTTCCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC -3'

Linearização P30 (Método B)

Forward (# 186- LP2 REV ccdB (Vetor lin) geral para todos

5'- CGCCATTAACCTGATGTTCTGGGG -3'

Reverse

(L2_VH (#244 - NWE_L2_Vharveyi_rep.)

5'-
TCAGCCATCGGTGGTGTATCGGTCACGCTTTCGCTGGTATCCGCATATGAGCCATT
TTCGTCTGAAAGGCTTTG -3'

L2_VPK (#210- NWE_Epitope_306)

5'-
TCAGTTGTCCGTTGTATTGTCACGTGCCGAATTGCTTGTATCACCATATGAGCCATT
TTCGTCTGAAAGGCTTTG -3'

L2_VVL (#227- NWE_L2_Vvulnificus)

5'-
TCAGTTGTTGGTGGTGCCATCGCTCTGCGCGCTGTTGCTCACATCCGCATATGAGCC
ATTTTCGTCTGAAAGGCTTTG -3'

L1_VAU (#211 – NWE_Epitope_309)

5'-
TCACAGCTTATCGCTTTCACGTGAATCGGTGTCAGAACGGTTAATTGAGCCATTTTC
GTCTGAAAGGCTTTG -3'

Linearização P30 (Método C)

Forward

L1_VH (#231- FWD_L1_Vharveyi_3NWE)

5'-
GGCAAACCAGCACCGATGAAAACGTGCTGTGACGCCATTAACCTGATGTTCTGGG
G -3'

L1_VV (#240- FWD_L1_Vvulnificus_3NWE)

5'-
GCGACCATTGATAACGATCAGAACGCGCTGTGACGCCATTAACCTGATGTTCTGGG
G -3'

Reverse

L1_VH (#230- REV_L1_Vharveyi_3NWE)

5'-
GCCCCGCATCCAGATCGCGATCGCCGCGGGTAATTGAGCCATTTTCGTCTGAAAGGC
TTTG -3'

L1_VV (#239- REV_L1_Vulnificus_3NWE)

5'-
GCCCCGCATCCAGATCGGTATCGCCGCGTTTCAGTGAGCCATTTTCGTCTGAAAGGCT
TTG -3'

Linearização P30 (Método D)

Forward

L1_VPB (#234- FWD_L1_VPB_3NWE)

5'-

CTGGGCAAAAGCAGCAACGATCAGGATGCGCTGTGACGCCATTAACCTGATGTTCT
GGGG -3'

L2_VPB (#237-FWD_L2_VPB_3NWE)

5'-

CGCAACGCGAACAGCGATCGCACCAGCGATGGCTGACGCCATTAACCTGATGTTCT
GGGG -3'

Reverse

L1_VPB (#233- REV_L1_VPB_3NWE)

5'-

ATCATCATAATCGGTATCGCCGCGGGTCAGGTTTGAGCCATTTTCGTCTGAAAGGCT
TTG -3'

L2_VPB (#236-REV_L2_VPB_3NWE)

5'-

ATAGTTGCTTTCGGTGCCGCTATAATCGCCATATGAGCCATTTTCGTCTGAAAGGCT
TTG -3'

Extensão do epítipo – 2º PCR

Forward

L1_VPB (#242 - FWD_MID_L1_VPB)

5'- AGCGCGCTGGGCAAAAGCAGCAACGATCAGGATGCGCTG -3'

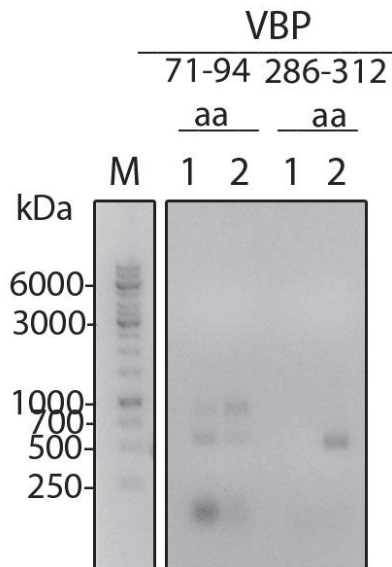
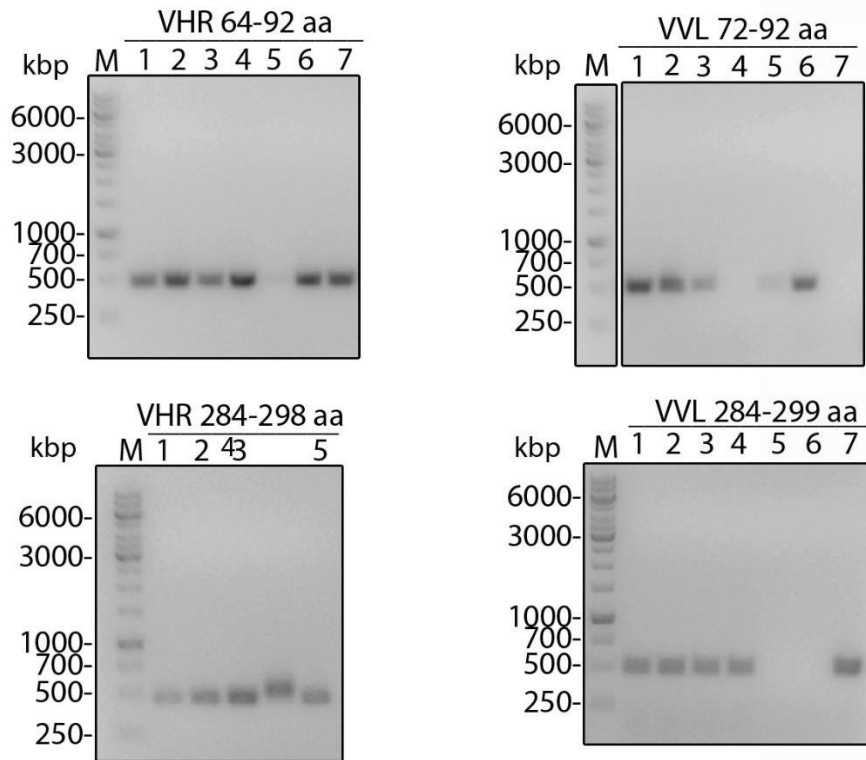
L2_VPB (#243- FWD_MID_L2_VPB)

5'- AACAGCGGCCTGGGCCGCAACGCGAACAGCGATCGCACCAGCGATGGC -3'

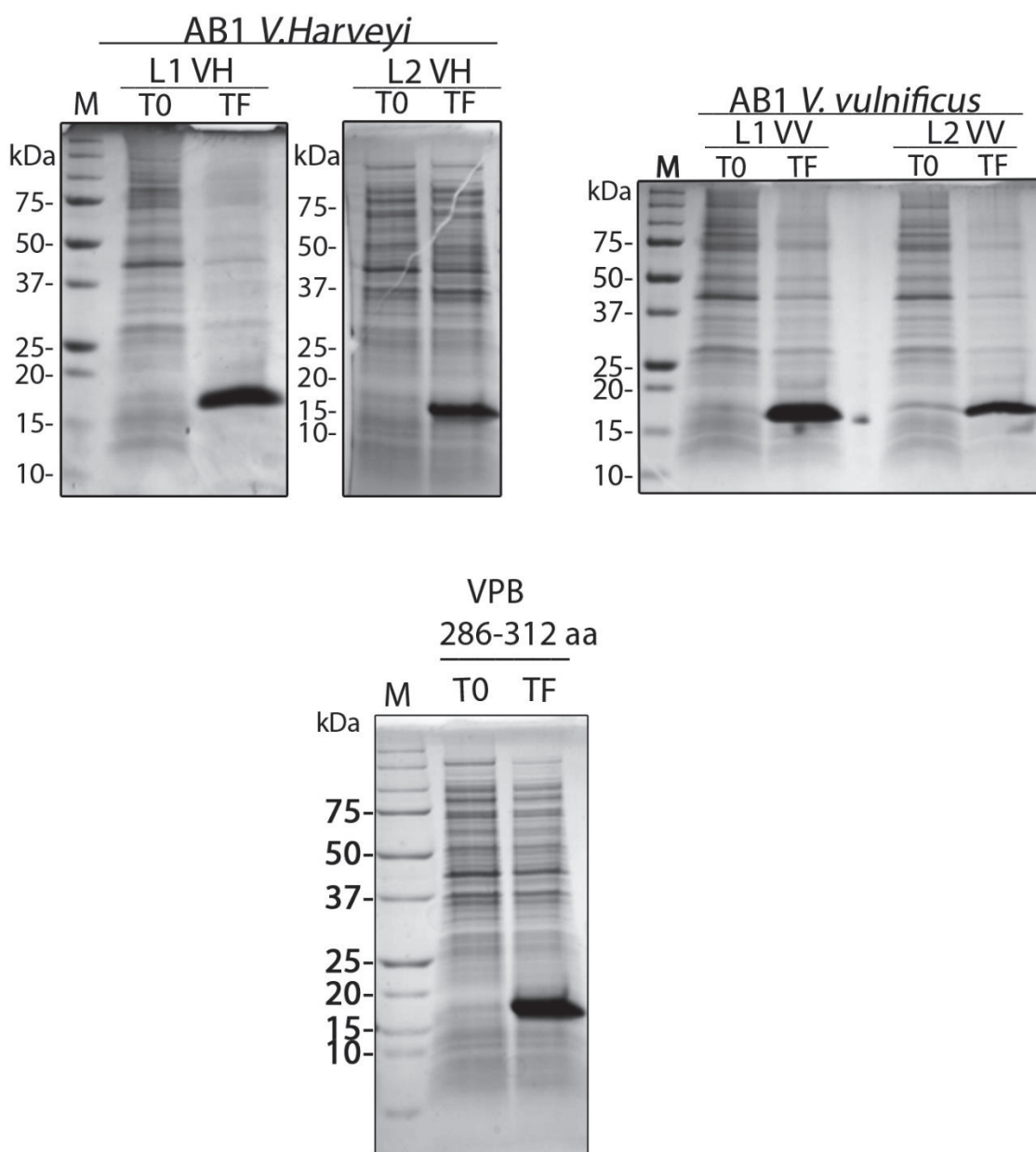
Reverse

Os mesmos primers usados na reação de linearização.

Anexo III



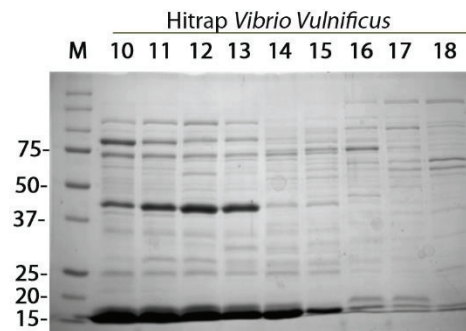
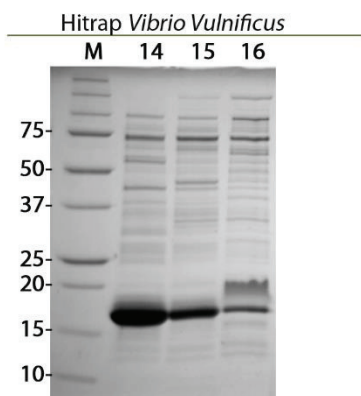
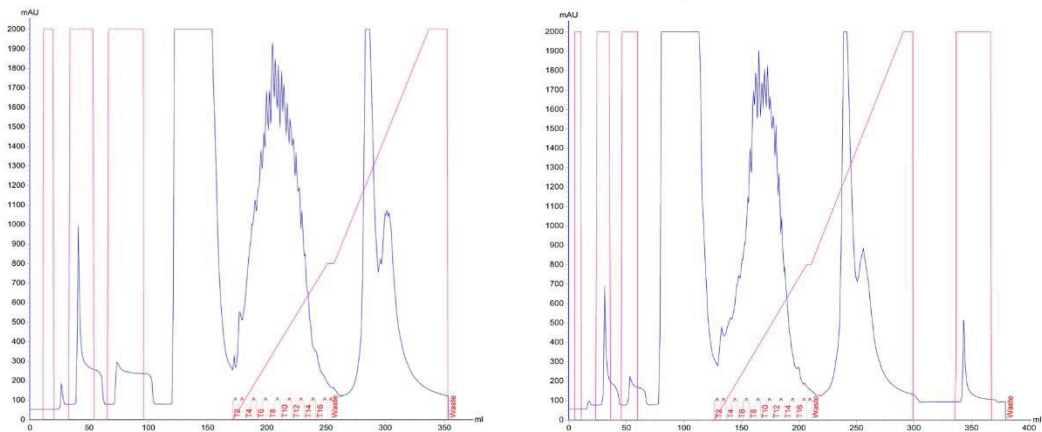
Anexo III a.: Análise e seleção em gel de agarose de colónias positivas para *V.harveyi*; *V.vulnificus* e *V.paraahaemolyticus*. Análise em gel de agarose 0,8% dos produtos de amplificação de colónias aleatoriamente escolhidas para a seleção de potenciais positivas. Foi selecionada e analisada a seguinte população: 1) *V.harveyi* construção VHR 64-92aa: 10 colónias; construção VHR 284-298aa: 5 colónias; 2) *V.vulnificus*- construção VVL 72-92aa: 15 colónias; construção VVL 284-292aa: 10 colónias; 3) *V. paraahaemolyticus* construção VPB 71-94: 2 colónias; construção VPB 286-312: 2 colónias.



Anexo III b: Análise da sobreexpressão dos epítomos recombinantes de *V. harveyi*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*. Análise em SDS-PAGE 12% da sobreexpressão epítomos recombinantes de *V. harveyi*- VHR 64-92aa, VHR 284-298aa ; *V. vulnificus* - VVL 72-92aa, VVL 284-298aa e *V. parahaemolyticus* – VPB 286-312.

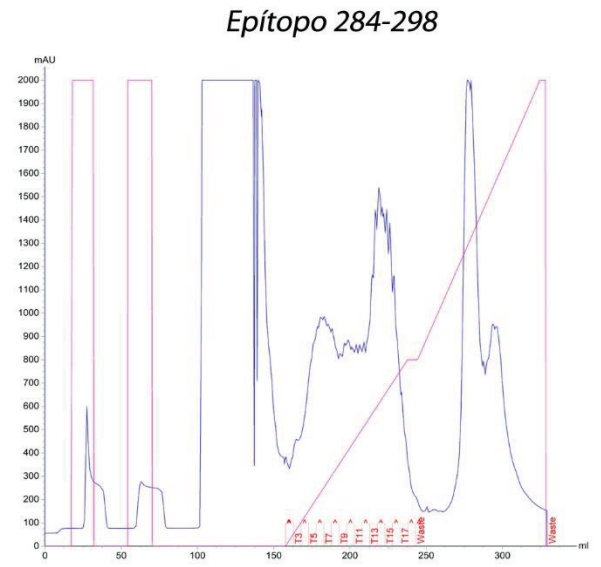
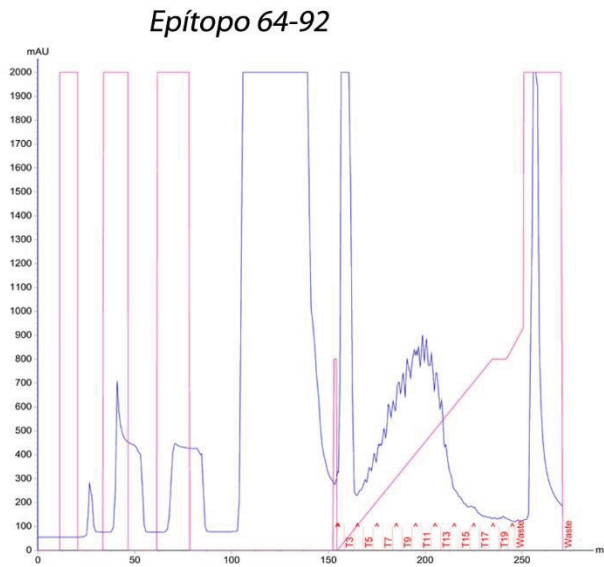
Anexo IV

V. vulnificus (VVL)

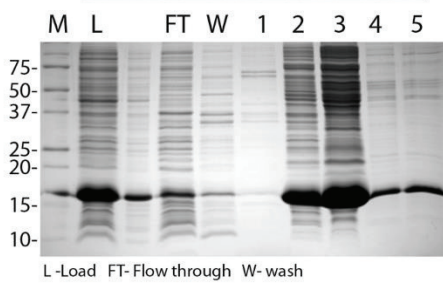


Anexo IV a: Cromatografia de troca iônica dos epítomos de *V. vulnificus*. Primeira etapa de purificação por cromatografia de troca iônica de ambos os epítomos recombinantes de *V. vulnificus* (VVL epítomos 72-92aa e 284-299aa).

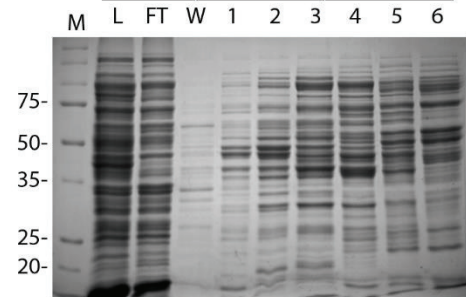
V.harveyi (VHR)



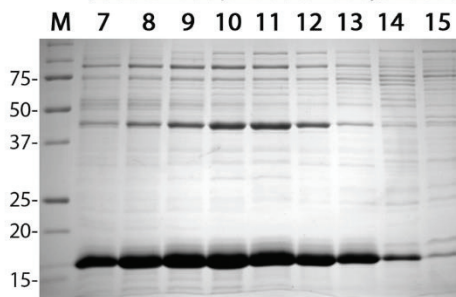
Hitrap *Vibrio Harveyi*



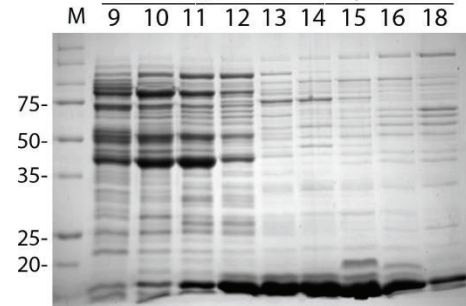
Hitrap *Vibrio Harveyi*



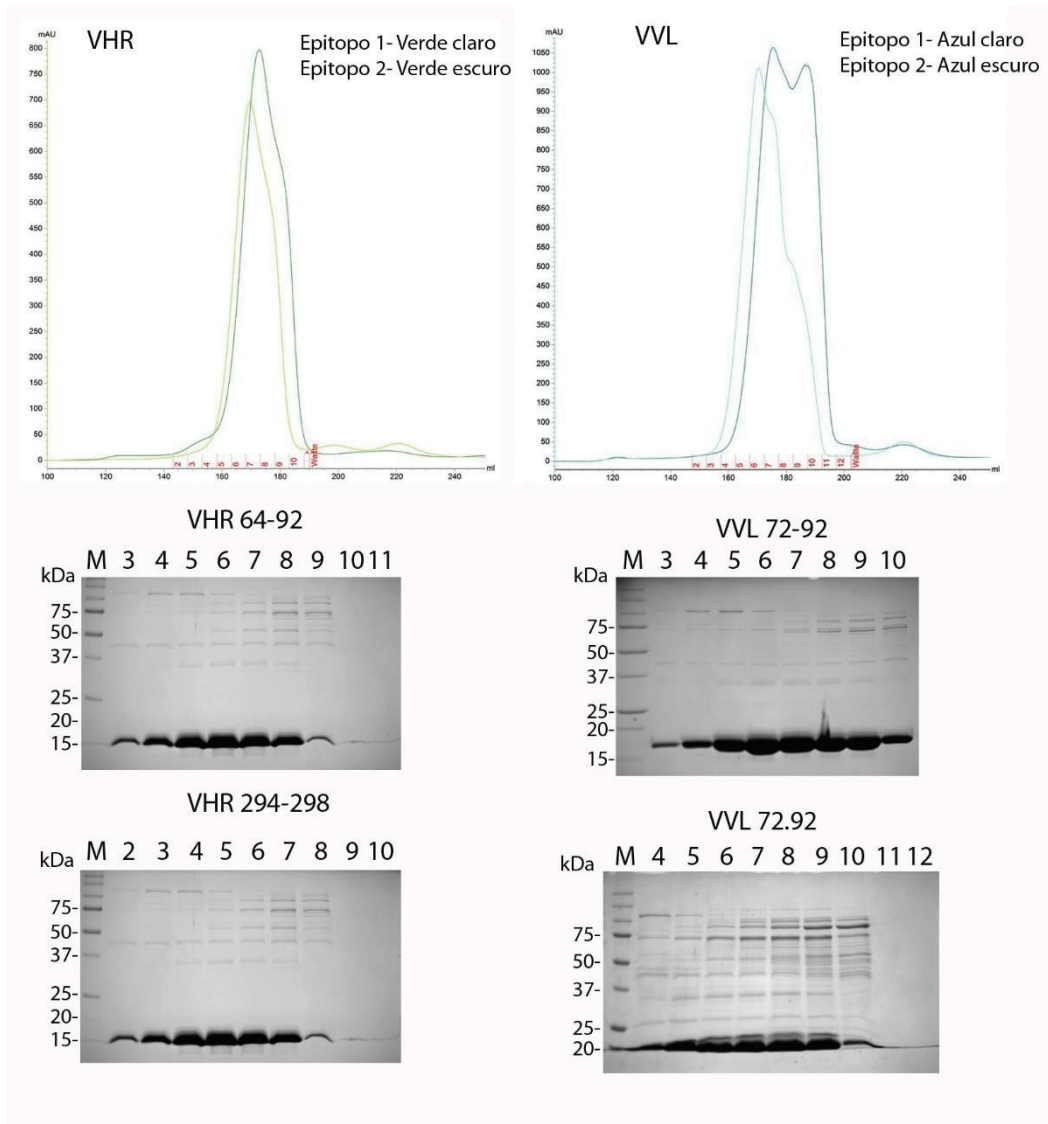
Hitrap *Vibrio Harveyi*



Hitrap *Vibrio Harveyi*

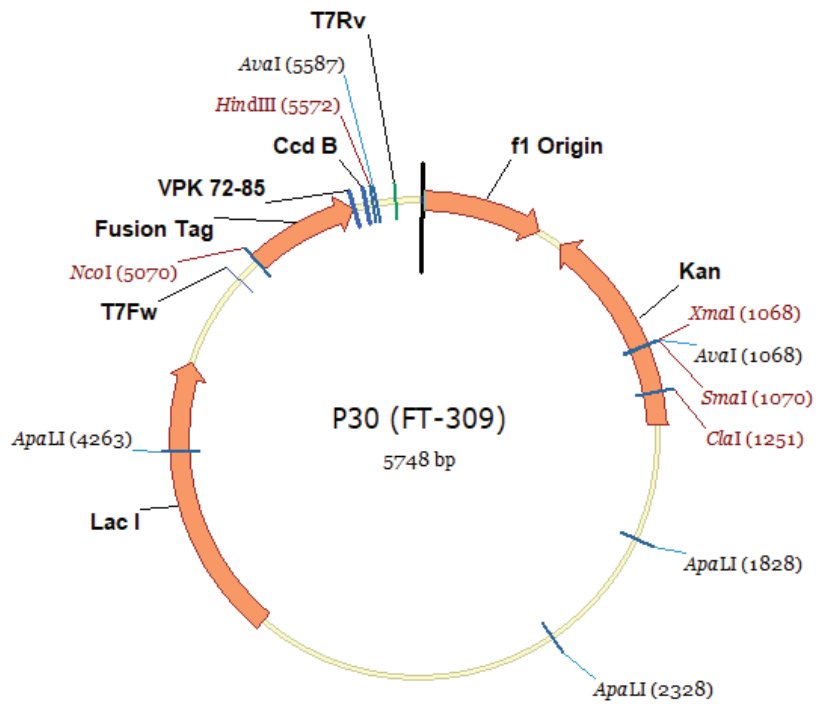


Anexo IV b: Cromatografia de troca iónica dos epítomos de *V. harveyi*. Primeira etapa de purificação por cromatografia de troca iónica de ambos os epítomos recombinantes de *V. harveyi* (VHR epítomos 64-92aa e 284-298aa).



Anexo IV c: Cromatografia de exclusão molecular dos epítomos de *V.harveyi* e *V.vulnificus*. Segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular de ambos os epítomos recombinantes de *V.harveyi* (VHR epítomos 64-92aa e 284-298aa) e *V.vulnificus* (VVL epítomos 72-92aa e 284-299aa).

Anexo V



Anexo V : Representação do vetor molde pertencente à família de vetores *pCoofy*, utilizado em todas as construções recombinantes neste trabalho.