

Gabriela E. Wachholz (bolsista IC- CNPq), Karina R. Lorenzatto & Henrique B. Ferreira (Orientador)

Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
(gwachholz@cbiot.ufrgs.br)

1. Introdução

As bactérias *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare* são duas espécies capazes de se aderir ao epitélio ciliar do trato respiratório de suínos (Razin et al., 1998). Estudos genômicos e transcritômicos comparativos entre essas duas espécies demonstram que elas têm em comum a maior parte dos genes conhecidos relacionados à virulência. Porém, enquanto *M. hyopneumoniae* é patogênica, causando a pneumonia enzoótica suína, *M. flocculare* é comensal.

Acredita-se que diferenças entre proteínas compartilhadas pelas duas espécies (ortólogas) possam ser determinantes da distinção entre os modos de vida dessas micoplasmas. Tais diferenças podem estar associadas à presença de domínios exclusivos ou divergentes ou a diferentes padrões de modificações pós-traducionais (MPTs). Dentre as MPTs mais comumente descritas em bactérias estão as fosforilações e desfosforilações, mediadas, respectivamente, por quinases e fosfatases (Cain et al., 2014).

Até o presente momento, genes relacionados a estas enzimas ainda não foram anotados nos genomas sequenciados de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* (Vasconcelos et al., 2005; Siqueira et al., 2013). Porém, considerando que cerca de 40% dos genes destas micoplasmas permanece sem anotação funcional, a existência deles não pode ser excluída.

2. Objetivos

Os objetivos gerais do presente trabalho são a identificação e a caracterização funcional de fosfatases putativas de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare*.

Os objetivos específicos são:

- Análise de sequências codificadoras de proteínas hipotéticas presentes nos genomas de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare* para identificação de fosfatases putativas;
- Amplificação da sequência codificadora de uma fosfatase putativa de *M. hyopneumoniae* 7448;
- Clonagem da sequência codificadora de uma fosfatase putativa de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448;
- Expressão de uma fosfatase putativa de *M. hyopneumoniae* 7448 em *E. coli* para produção da proteína recombinante correspondente;
- Caracterização funcional da fosfatase putativa recombinante para evidenciar a existência de uma maquinaria para desfosforilação em *M. hyopneumoniae*.

3. Material e Métodos

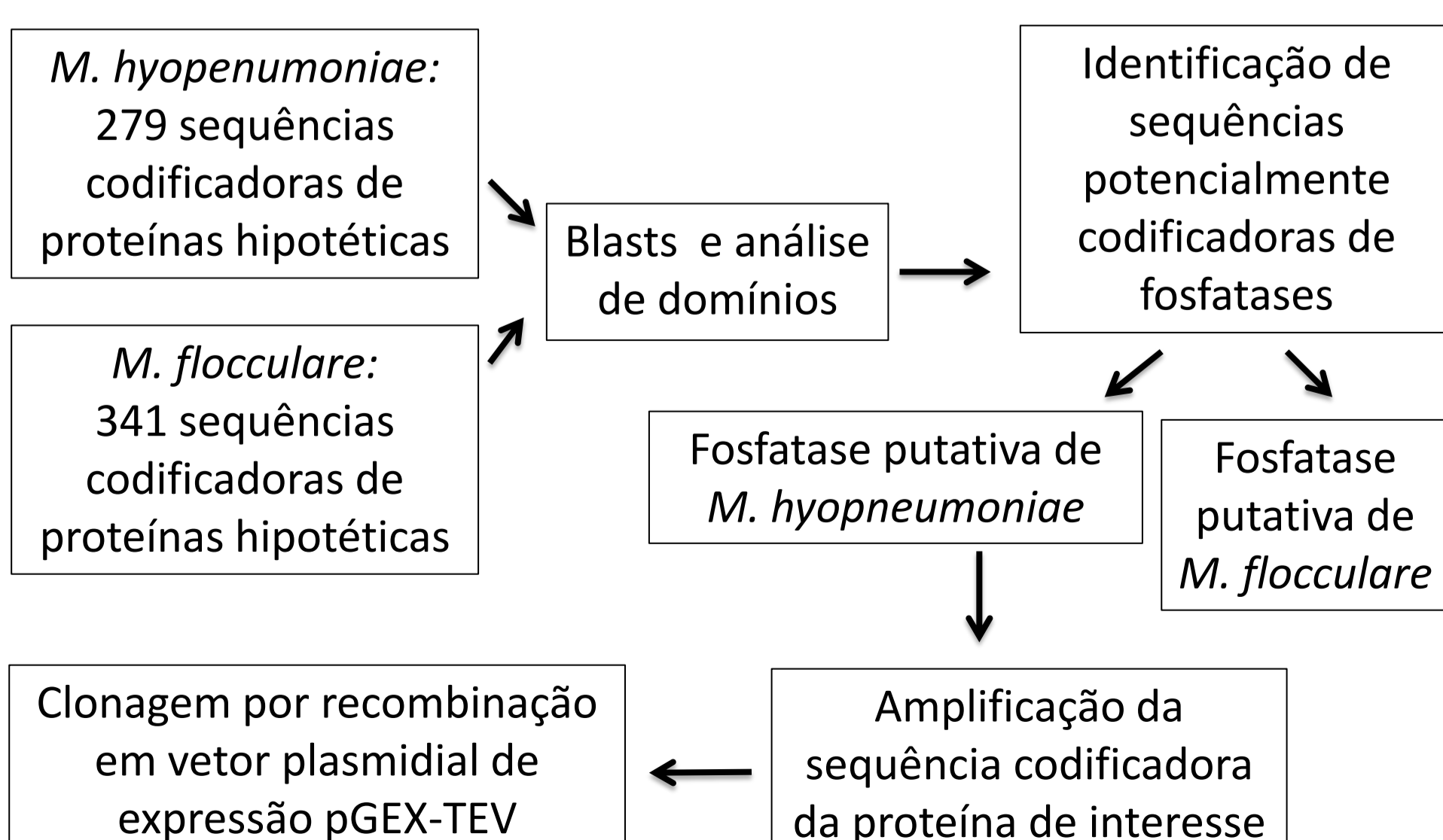


Figura 1. Fluxograma demonstrando os métodos utilizados no presente trabalho.

4. Resultados e Discussão

A análise *in silico* dos genomas de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare* possibilitou a identificação de uma fosfatase putativa de *M. hyopneumoniae* (MHP_0450) e da respectiva ortóloga de *M. flocculare* (MFC_00318).

As sequências aminoacídicas deduzidas da MHP_0450 e da MFC_00318 apresentam 82% e 90% de identidade e similaridade, respectivamente (Figura 2). As sequências aminoacídicas da MHP_0450 e da MFC_00318 apresentam identidade/similaridades de 37%/51% e 34%/54%, respectivamente, com a sequência codificadora de uma fosfatase putativa de *M. pneumoniae* (Y349_MYCPN). Além da homologia entre MHP_0450 e MFC_00318, as sequências codificadoras correspondentes também apresentam domínios relacionados com atividade fosfatásica, os quais são sugestivos da presença de maquinaria de desfosforilação em *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare*.

Como primeira etapa da caracterização dessas fosfatases, foi realizada a amplificação da sequência codificadora da MHP_0450 e para isso utilizou-se a PCR overlap para permitir a troca de um códon TGA (codificador de triptofano em *M. hyopneumoniae*, mas de parada em *E. coli*), por um códon TGG (Figura 3). Uma vez que a sequência codificadora completa da MHP_0450 foi amplificada, esta foi submetida à clonagem por recombinação no vetor de expressão pGEX-TEV (Figura 4).



Figura 2. Alinhamento de aminoácidos da MHP_0450 e MFC_00318. Resíduos idênticos estão marcados em preto.

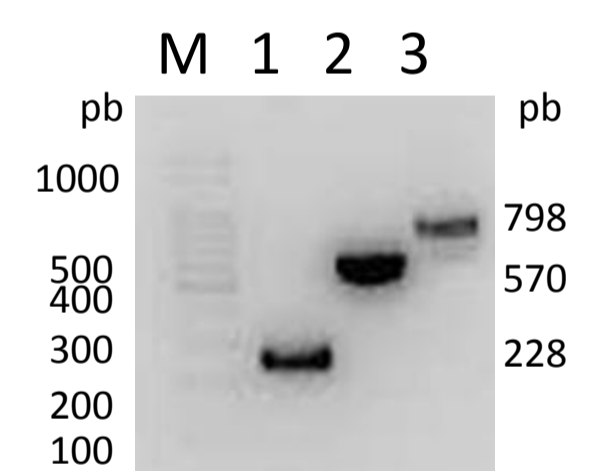


Figura 3. Análise dos produtos da PCR overlap através de eletroforese em gel de agarose 1,2%. (1 e 2) Mutagenese sítio-dirigida dos fragmentos 5' e 3' da MHP_0450, respectivamente; (3) Amplificação da sequência codificadora completa da MHP_0450, utilizando os fragmentos 5' e 3' mutados; (M) Marcador de tamanho molecular em pb.

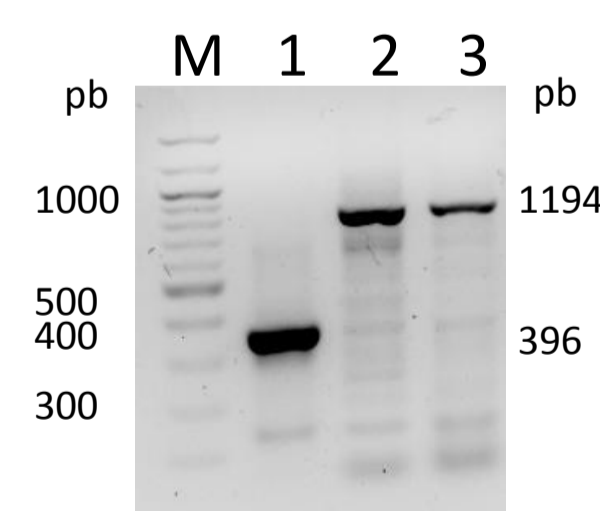


Figura 4. Análise dos produtos da PCR de colônia através de eletroforese em gel de agarose 1,2%. (1) PCR de colônia transformante; (2 e 3) PCR de colônias potencialmente recombinantes; (M) Marcador de tamanho molecular em pb.

6. Perspectivas

- Confirmação dos clones recombinantes através de sequenciamento;
- Expressão da versão recombinante da MHP_0450 em *Escherichia coli*;
- Caracterização funcional da MHP_0450 para determinação da existência ou não de maquinaria para desfosforilação em *M. hyopneumoniae*;
- Clonagem, expressão e caracterização funcional da fosfatase putativa de *M. flocculare*.

7. Referências Bibliográficas

- Siqueira, F. M., Thompson, C. E., Virgínio, V. G., Gonchoroski, T., Reolon, L., Almeida, L. G., da Fonseca, M. M., de Souza, R., Prosdoci, F., Schrank, I. S., et al. (2013). New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics* 14, 175.
- Razin, S., Yoge, D., & Naot, Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1094-1156.
- Cain, J. A., Solis, N., and Cordwell, S. J. (2014). Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics* 97, 265-286.
- Vasconcelos, A. T., Ferreira, H. B., Bizarro, C. V., Bonatto, S. L., Carvalho, M. O., Pinto, P. M., Almeida, D. F., Almeida, L. G., Almeida, R., Alves-Filho, L., et al. (2005). Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol* 187, 5568-5577.