

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**FATOR  $\sigma$  DE *Mycoplasma hyopneumoniae*:  
MUTAGÊNESE, CLONAGEM E EXPRESSÃO**

Dissertação de Mestrado

**Shana de Souto Weber**

Porto Alegre, outubro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**FATOR  $\sigma$  DE *Mycoplasma hyopneumoniae*:  
MUTAGÊNESE, CLONAGEM E EXPRESSÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

**Shana de Souto Weber**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Irene Silveira Schrank**

Porto Alegre, outubro de 2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Financiamento: FAPERGS, CNPq/MCT – Proc.: 680220/00-5 (A.T.R.V.) e CAPES.

## AGRADECIMENTOS

À professora Irene Silveira Schrank, por ser uma orientadora tão paciente, dedicada e generosa, por ter me ajudado neste projeto e por ter sido fundamental para que esta dissertação chegasse ao fim;

Ao professor Sérgio Ceroni da Silva, pela disposição em tirar minhas dúvidas de bioinformática, e por, entre outras coisas, ter me ensinado a projetar os *primers*;

Aos professores Arnaldo Zaha, Augusto Schrank, Henrique Ferreira e Marilene Vainstein, pela motivação e pelos ensinamentos;

À comissão de acompanhamento, composta pelos professores Augusto Schrank e Henrique Ferreira, pelas sugestões e críticas importantes;

À banca examinadora, formada pelos professores, Itabajara Vaz, Marilene Vainstein e Patrícia Valente, por terem aceitado avaliar este trabalho;

Aos meus colegas e ex-colegas de laboratório: Beatriz – minha companheirinha de bancada e de reciclagem de lixo; Clarissa – minha primeira colega de laboratório, Débora – colega querida, parceira de limpeza e sempre minha companhia para ficar no laboratório até tarde; Luciano – meu estagiário, por ter suportado bem a minha felicidade futebolística em 2006; Karyne e Maicon – tão animados que contagiam qualquer um, inclusive eu; e Ricardo – o otimista, quem me ensinou as primeiras técnicas, agradeço pela amizade e cooperação;

Ao pessoal dos laboratórios 210, 217 e 220, em especial à Desiree, pelos protocolos de clonagem; Broetto, por ter me acompanhado nos primeiros géis de proteína; Juliano Boldo, por ter me cedido as células para expressão; e Bianca, pelos cultivos de *M. hyopneumoniae*;

Ao Fabiano, pelos seqüenciamentos;

Aos laboratoristas, Paulo e Milton, por facilitarem muito o nosso dia-a-dia;

Aos meus tão queridos companheiros de faculdade, pela amizade e carinho;

Aos meus pais por me proporcionarem o conforto de um lar feliz, por serem tão especiais e amorosos;

À minha irmã querida, que é um exemplo de determinação para mim;

Ao meu Ferdi, por ser o melhor companheiro, amigo, colega, que eu jamais imaginei ter; por sempre estar ao meu lado, mesmo quando não sou a melhor companhia;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de qualidade e ao apoio financeiro da FAPERGS, CAPES e CNPq.

# ÍNDICE

|   |            |
|---|------------|
| <b>ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b>                                  | <b>IX</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | <b>XI</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   | <b>XI</b>  |
| <b>RESUMO</b>   | <b>XII</b> |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>XI</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>12</b>  |
| 1.1 O Gênero <i>Mycoplasma</i>  | 12         |
| 1.2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>                                       | 14         |
| 1.3 Transcrição em <i>Mycoplasma</i>                                      | 15         |
| 1.3.1 Os Promotores   | 16         |
| 1.4 Ferramentas Utilizadas no Estudo de Promotores                        | 18         |
| 1.4.1 <i>In silico</i>  | 18         |
| 1.4.2 <i>In vivo</i>  | 19         |
| 1.4.3 <i>In vitro</i>   | 20         |
| 1.5 RNA Polimerase Holoenzima   | 21         |
| 1.5.1 O Núcleo  | 22         |
| 1.5.2 O Fator $\sigma$  | 22         |
| 1.6 Expressão Heteróloga de Genes de <i>Mycoplasma</i> contendo Códon UGA | 24         |
| <b>2. OBJETIVOS</b>   | <b>26</b>  |
| 2.1 Objetivos Gerais  | 26         |
| 2.2 Objetivos Específicos   | 26         |
| <b>3. MATERIAIS &amp; MÉTODOS</b>   | <b>27</b>  |
| 3.1 Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de crescimento    | 27         |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2 Clivagens e enzimas de restrição  | 27        |
| 3.3 Extração de DNA genômico e DNA plasmidial                                     | 27        |
| 3.4 <i>Primers</i> e condições de termociclagem                                   | 28        |
| 3.5 Purificação dos fragmentos, clonagem e transformação                          | 29        |
| 3.6 Eletroforese em gel de agarose  | 29        |
| 3.7 Seqüenciamento automático e análise dos dados                                 | 29        |
| 3.8 Amplificação do gene <i>rpoD</i> de <i>M. hyopneumoniae</i>                   | 30        |
| 3.9 Mutagênese sítio-dirigida do gene <i>rpoD</i>                                 | 30        |
| 3.10 Expressão do fator $\sigma$ recombinante                                     | 33        |
| <b>4. RESULTADOS</b>  | <b>35</b> |
| 4.1 Amplificação do gene <i>rpoD</i> de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>           | 35        |
| 4.2 Substituição dos códons TGA por TGG no gene <i>rpoD</i>                       | 35        |
| 4.3 Construção de $\sigma$ ABCD ( <i>rpoD</i> contendo as mutações)               | 36        |
| 4.4 Expressão do fator $\sigma$ recombinante                                      | 38        |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>   | <b>40</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b>   | <b>47</b> |
| <b>7. ANEXOS</b>  | <b>57</b> |
| 7.1 Mapa do vetor de expressão pET-23a-d(+)                                       | 57        |
| 7.2 Protocolo de Extração de DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i>              | 58        |
| 7.3 Seqüência de nucleotídeos do gene <i>rpoD</i> de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 | 59        |
| <b>8. CURRICULUM VITAE</b>  | <b>60</b> |

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

|                    |  |
|--------------------|--|
| $\alpha$           | subunidade alfa da RNA polimerase          |
| $\beta$            | subunidade beta da RNA polimerase          |
| $\beta'$           | subunidade beta' da RNA polimerase         |
| $^{\circ}\text{C}$ | graus Celsius                              |
| CDS                | seqüência de DNA codificante               |
| $\text{CO}_2$      | dióxido de carbono                         |
| BLAST              | Basic Local Alignment Search Tool          |
| DNA                | ácido desoxirribonucléico                  |
| dNTPs              | trifosfato de desoxirribonucleosídeo       |
| fmol               | fentomol                                   |
| IPTG               | $\beta$ -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo |
| g                  | gravidade                                  |
| HCl                | ácido clorídrico                           |
| kb                 | quilobase                                  |
| kDa                | quilodalton                                |
| $\mu\text{g}$      | micrograma                                 |
| $\text{MgCl}_2$    | cloreto de magnésio                        |
| MH                 | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>            |
| $\mu\text{l}$      | microlitro                                 |
| ml                 | mililitro                                  |
| mM                 | milimolar                                  |
| tRNA               | RNA transportador                          |
| rRNA               | RNA ribossomal                             |

|                |   |
|----------------|---|
| NCBI           | Nacional Center for Biotechnology Information             |
| ng             | nanograma   |
| OD             | densidade ótica   |
| $\omega$       | subunidade ômega da RNA polimerase                        |
| pb             | par de bases  |
| PCR            | reação em cadeia da polimerase                            |
| PES            | pneumonia enzoótica suína                                 |
| RBS            | sítio de ligação dos ribossomos                           |
| RNA            | ácido ribonucléico  |
| RNAP           | RNA polimerase  |
| rpm            | revoluções por minuto                                     |
| SDS-PAGE       | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| $\sigma$       | subunidade $\sigma$ da RNA polimerase holoenzima          |
| T <sub>m</sub> | temperatura de anelamento                                 |
| U              | unidade   |
| UTR            | região não traduzida                                      |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 3.1</b> Metodologia utilizada para obtenção dos fragmentos parciais mutados a partir do gene <i>rpoD</i> . | 32 |
| <b>FIGURA 3.2</b> Obtenção do plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABCD contendo o gene <i>rpoD</i> com as 3 substituições A→G.  | 33 |
| <b>FIGURA 4.1</b> Amplificação do gene <i>rpoD</i> de <i>M. hyopneumoniae</i> .                                      | 35 |
| <b>FIGURA 4.2</b> Mutagênese sítio-dirigida do gene <i>rpoD</i> de <i>M. hyopneumoniae</i> .                         | 36 |
| <b>FIGURA 4.3</b> Construções parciais para obtenção do gene <i>rpoD</i> mutado.                                     | 37 |
| <b>FIGURA 4.4</b> Gene <i>rpoD</i> com os três códons TGA substituídos ( $\sigma$ ABCD).                             | 38 |
| <b>FIGURA 4.5</b> Expressão do fator $\sigma$ recombinante.  | 39 |
| <b>FIGURA 5.1</b> Metodologias utilizadas para inserir mutações presentes no meio de um fragmento de DNA.            | 43 |
| <b>FIGURA 5.2</b> Estratégia utilizada na amplificação e mutagênese do gene <i>glpK</i> de <i>M. pneumoniae</i> .    | 44 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>TABELA 3.1</b> <i>Primers</i> utilizados neste trabalho. | 28 |
| <b>TABELA 3.2</b> Condições de termociclagem.               | 28 |

## RESUMO

*Mycoplasma hyopneumoniae* (MH) é uma das menores bactérias encontradas na natureza, apresentando genoma altamente reduzido e ausência de parede celular. Este organismo é o agente causador da pneumonia enzoótica suína, a qual apresenta distribuição mundial causando importantes perdas econômicas. Recentemente, várias espécies de *Mycoplasma* tiveram seus genomas completamente seqüenciados, incluindo três cepas de MH. Apesar da grande quantidade de dados gerados, pouco se sabe sobre as seqüências nucleotídicas que controlam o início da transcrição nestes microrganismos. Assim como em outras espécies deste gênero, *M. hyopneumoniae* não possui vários mecanismos que regulam a expressão gênica, incluindo o sistema de dois componentes e diversos fatores  $\sigma$ . Portanto, aparentemente, os sinais que promovem e regulam a transcrição, nestes organismos, devem diferir significativamente de outras bactérias. Além disso, o baixo conteúdo de GC e a falta de promotores experimentalmente caracterizados, também são fatores que dificultam o reconhecimento de seqüências controladoras. Para possibilitar a identificação das seqüências promotoras de MH *in vitro*, através da utilização da RNA polimerase holoenzima reconstituída, este trabalho tem como objetivo purificar o fator  $\sigma$  através da expressão heteróloga do gene *rpoD* de *M. hyopneumoniae* cepa 7448. Como esta CDS possui três códons de parada UGA – os quais codificam triptofano nos micoplasmas –, foi utilizada uma técnica baseada em PCR para introduzir as mutações (TGA→TGG) necessárias. A metodologia de mutagênese sítio-dirigida, empregada neste trabalho, apresentou eficiência relativamente boa na substituição dos nucleotídeos alvo. O gene íntegro e mutado foi subclonado no vetor pET23a-d(+) e expresso em *Escherichia coli*. De acordo com o fato de que os fatores  $\sigma$  exibem menor mobilidade em SDS-PAGE, a proteína expressa apresentou uma massa molecular aparente de 64 kDa, diferente dos 58 kDa deduzidos a partir da seqüência nucleotídica. Ainda, nas condições utilizadas, maior quantidade da proteína foi produzida de forma insolúvel. Para obtenção de um fator  $\sigma$  recombinante funcional, diferentes protocolos de expressão, solubilização e purificação serão testados.

## ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* (MH) is one of the smallest bacteria found in nature, presenting a small genome and no cell wall. It is present in the majority of swine herds throughout the world, and is considered an important pathogen in the swine industry. Recently, many species of this genus had their genome completely sequenced, including three strains of MH. Nevertheless, very little is understood of the nucleotide sequences that control transcription initiation in these microorganisms. Like its relatives, *M. hyopneumoniae* lacks several major regulators of gene expression, including two component regulatory systems and multiple  $\sigma$  factors, thus it appears that the signals for promotion and regulation of transcription may differ significantly from other bacteria. In addition, the low GC content and the dearth of experimentally characterized promoters in this genus severely limit the recognition of the controlling sequences. To enable *in vitro* identification of the MH promoter sequences, the aim of this study is to purify the  $\sigma$  factor through the heterologous expression of the *rpoD* gene from the *M. hyopneumoniae* strain 7448, that will allow reconstituting RNA polymerase holoenzyme. As this CDS has three UGA stop codons – which encode tryptophan in *mycoplasma* –, a PCR-based method to introduce the necessary mutations (TGA→TGG) was used. The site-direct mutagenesis methodology, employed in this work, showed a relative good efficiency to substitute the targets nucleotides. The full length mutated gene was subcloned into pET23a-d(+) vector and expressed in fusion with a C-terminal polihistidine tag. In agreement with the fact that  $\sigma$  factors show slower mobility on SDS-PAGE, the expressed protein exhibited an apparent molecular mass of 64 kDa in despite of the 58 kDa that was deduced from the nucleotide sequence. However, most of the protein was insoluble under the conditions used. Therefore, to obtain a functional recombinante  $\sigma$  factor, different protocols related to the expression, solubilization, and purification will be tested.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O Gênero *Mycoplasma*

Este táxon é composto por alguns dos mais simples e menores organismos a se auto-replicarem. As bactérias desse gênero distinguem-se fenotipicamente de outros procariotos, principalmente, por possuírem citoesqueleto e pela ausência de parede celular, característica que as faz pertencer à classe Mollicutes – do Latim: mollis, mole; cutis, pele (RAZIN *et al.*, 1998). As primeiras espécies foram descritas há aproximadamente 70 anos, totalizando até o momento 123 espécies conhecidas (LPSN <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycoplasma.html>>).

Não existem micoplasmas de vida livre (RAZIN, 1992), estando amplamente distribuídos no reino animal como parasitas de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (PITCHER & NICHOLAS, 2005). Normalmente, estão aderidos à superfície extracelular de células e tecidos do hospedeiro, embora já tenham sido descritas algumas espécies ocupando o interior de células eucarióticas (LO *et al.*, 1993; BASEMAN *et al.*, 1995). Podem ser patogênicos ou apenas fazerem parte da microbiota natural do trato respiratório e urogenital (RAZIN, 2006). Nos homens, estão relacionados a doenças como asma, câncer, doenças auto-imunes, artrite e pneumonia (BASEMAN & TULLY, 1997).

Morfologicamente, são considerados bactérias gram-negativas, uma vez que possuem apenas uma membrana plasmática, sem a proteção adicional de uma parede celular (RAZIN, 2006). Entretanto, filogeneticamente, os micoplasmas estão relacionados às bactérias gram-positivas, compartilhando, deste modo, um ancestral em comum com os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium* (WOLF *et al.*, 2004). Especificamente, a evolução teria ocorrido através de eventos de degeneração ou redução do

genoma a partir de bactérias gram-positivas portadoras de genomas com baixo conteúdo de G+C (WOESE, 1987).

De acordo com os eventos evolutivos propostos, os genomas destes microrganismos são altamente reduzidos, variando entre 580 e 1350 kb (FRASER *et al.*, 1995; SASAKI *et al.*, 2002), e apresentam baixo conteúdo de G+C, variando entre 23 e 40% (WOESE, 1987). Além disso, as regiões intergênicas têm um maior conteúdo de A+T em relação às regiões codificantes – chegando a valores tão altos quanto 90% (DYBVIK & VOELKER, 1996), sendo ainda a distribuição de guanina e citosina, entre os genes, também irregular, ocorrendo em maior concentração nos genes que codificam para rRNAs e tRNAs (FRASER *et al.*, 1995). Como resultado desta composição atípica dos genomas, há o favorecimento da utilização de códons que contém adenina e timina (MUTO & OSAWA, 1987 *apud* BOVE, 1993); conseqüentemente, micoplasmas possuem pouquíssimos códons GGN, CCN, GCN e CGN (RAZIN, 2006). Outra particularidade, que parece estar ligada a essa questão, é a utilização do códon UGA (OSAWA *et al.*, 1992), que ao invés de servir como códon de terminação, conforme ao código genético universal, codifica para triptofano (YAMAOKA *et al.*, 1985), característica que é igualmente encontrada no genoma das mitocôndrias.

Devido ao seu genoma reduzido, esses microrganismos não possuem muitas das vias enzimáticas características da maioria das bactérias. Por exemplo, eles não apresentam vias *de novo* da biossíntese de purinas, um ciclo do ácido tricarboxílico completo, e um sistema de cadeia transportadora de elétrons mediada por citocromo (MANOLUKAS *et al.*, 1988; POLLACK, 1992; FINCH & MITCHELL, 1992; FRASER *et al.*, 1995). Isso estaria relacionado ao fato da maioria dos micoplasmas serem parasitas, estritamente, hospedeiro e tecido específicos (RAZIN *et al.*, 1998; ROTTEM & YOGEV, 2000).

## 1.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*

*Mycoplasma hyopneumoniae* (MH) é conhecido como o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES) – doença respiratória crônica, caracterizada por causar alta morbidade e baixa mortalidade (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). A PES apresenta distribuição mundial, estando presente em quase todos os rebanhos suínos (MINION *et al.*, 2004). Por determinar significativa redução no ganho de peso, gastos com tratamento, e consequentemente, menores preços de venda das carcaças, a pneumonia enzoótica é a maior causa de perdas econômicas na produção intensiva de suínos (THACKER, 2006).

Esta bactéria é um patógeno extracelular que coloniza o trato respiratório através da aderência às células do epitélio ciliar (DEBEY & ROSS, 1994). Como demonstrado por Zielinski *et al.* (1990), essa aderência é essencial para que ocorra a colonização do organismo. O estabelecimento da infecção por *M. hyopneumoniae* resulta em ciliostase, perda dos cílios, morte das células epiteliais e inflamação aguda na traquéia, brônquios e bronquíolos, além de predispor o hospedeiro a infecções mais severas ocasionadas por patógenos secundários (CIPRIAN *et al.*, 1988; DJORDJEVIC *et al.*, 2004).

Graças ao impacto econômico causado pela pneumonia enzoótica suína, há um grande empenho da comunidade científica em estudar MH. Prova disso é que três cepas (232, J e 7448) já tiveram seus genomas seqüenciados, fazendo desta, a espécie de micoplasma mais vezes seqüenciada (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005). As pesquisas têm dedicado atenção principalmente à identificação de adesinas, com a finalidade de desenvolver uma vacina efetiva que previna a fixação de *M. hyopneumoniae* aos cílios pulmonares.

### 1.3 Transcrição em *Mycoplasma*

Além da importância atribuída aos micoplasmas por apresentarem relevância médica ou veterinária, estes microrganismos também têm despertado interesse por possuírem o genoma extremamente reduzido, fazendo com que sejam objetos de estudo bastante convenientes na determinação do conjunto mínimo de genes necessários para o estabelecimento de vida independente (GIL *et al.*, 2004). Sendo assim, a partir da década de 90, onze espécies diferentes desse gênero tiveram seus genomas seqüenciados (NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub.html>>).

O número de genes anotados, envolvidos com a transcrição, varia entre as seqüências genômicas analisadas. Na cepa 232 de *M. hyopneumoniae* são 11 genes e em *M. penetrans* chegam a ser 23, correspondendo, respectivamente, a 1,6% e 2,2% do total de CDSs (SASAKI *et al.*, 2002; MINION *et al.*, 2004). Entretanto, em *Bacillus subtilis* – bactéria gram-positiva que compartilha ancestral comum com os mollicutes –, são encontrados 276 genes relacionados a este processo, equivalendo a 6,7% das seqüências codificadoras (SASAKI *et al.*, 2002).

A RNA polimerase dos micoplasmas se parece com a das eubactérias, sendo codificada pelos genes conservados *rpoA* (subunidade  $\alpha$ ), *rpoB* (subunidade  $\beta$ ) e *rpoC* (subunidade  $\beta'$ ). Porém, somente um fator  $\sigma$  foi identificado (NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub.html>>), diferentemente de *Escherichia coli*, que tem no mínimo 6 fatores  $\sigma$  (BLATTNER *et al.*, 1997), e de *B. subtilis*, que contém no mínimo 18 deles (KUNST *et al.*, 1997).

Durante a evolução reductiva, pela qual estes organismos provavelmente passaram, vários mecanismos regulatórios, presentes nas bactérias superiores, foram perdidos (HALBEDEL *et al.*, 2007). Conseqüentemente, não possuem diversos genes codificando

ortólogos bacterianos convencionais, tais como: múltiplos fatores  $\sigma$ , sistemas de dois componentes (*two-component system*) e fator de terminação de transcrição Rho (FRASER *et al.*, 1995). Portanto, aparentemente, os sinais que promovem e regulam a transcrição, nos micoplasmas, devem diferir significativamente de outras bactérias (WEINER III *et al.*, 2000).

### 1.3.1 Os Promotores

As seqüências nucleotídicas que controlam o início e a regulação da transcrição nos micoplasmas são pouco entendidas (HALBEDEL *et al.*, 2007), uma vez que, até agora, apenas alguns promotores foram identificados e analisados (WALDO III *et al.*, 1999; WEINER III *et al.*, 2000; MUSATOVOVA *et al.*, 2003; HALBEDEL *et al.*, 2007). Esta carência de informação prejudica muito a interpretação dos dados obtidos com o seqüenciamento dos genomas. A anotação de regiões promotoras nestes microrganismos é especialmente difícil, pois, como fora observado em *M. hyopneumoniae*, o conteúdo de A+T nas seqüências codificantes (~70%) é tão alto quanto nas regiões intergênicas (~80%). (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Em 2000, Weiner III *et al.*, com o intuito de aumentar a quantidade de informações disponíveis sobre os promotores de micoplasmas, determinaram os sítios de início de transcrição de 22 genes de *M. pneumoniae*. Estes sítios identificados e outros 10 sítios de início de transcrição previamente descritos foram alinhados e, através da análise das 50 bases localizadas imediatamente à montante destes foi possível encontrar um forte consenso na região -10, enquanto que, na região -35 foi obtido apenas um consenso fraco. Várias possíveis regiões -10 foram identificadas: TA(AGT)AAT, TAA(GT)AT, TACTAT e TATTAA; e, considerando o conteúdo de G+C presente no genoma de *M. pneumoniae*, consensos similares aos das regiões -35 de *E. coli* foram detectados entre 15 e 20 bases de

distância da 5' da região -10, apresentando uma seqüência TTGA relativamente conservada.

Recentemente, a região promotora do gene *ldh* de *M. pneumoniae* foi estudada *in vivo* (HALBEDEL *et al.*, 2007). Fragmentos contendo as prováveis regiões -10 e -35 do gene, de acordo com os consensos sugeridos anteriormente (WEINER III *et al.*, 2000), foram capazes de transcrever o gene *lacZ* no próprio *M. pneumoniae*, confirmando a sua atividade promotora e comprovando as predições feitas *in silico* por Weiner III *et al.* (2000). A análise deste promotor, feita por meio da inserção de mutações pontuais, indica que, neste organismo, a região -10 é muito importante para transcrição, enquanto a região -35 proposta não apresenta a mesma relevância.

Foi demonstrado, também, que uma alta proporção de transcritos tem extremidades 5' heterogêneas, ocorrendo, em menor freqüência, entre as bases 1 e 4 a 5' do sítio de início de transcrição principal (WEINER III *et al.*, 2000). Ainda, grande parte dos RNAs mensageiros mostrou não possuir a região 5'-UTR que poderia conter o sítio RBS, resultado diferente do encontrado em outras bactérias (WEINER III *et al.*, 2000; HALBEDEL *et al.*, 2007). A seqüência RBS (que é uma seqüência complementar à extremidade 3' do rRNA 16S) apenas pode ser encontrada em cerca de 80 genes de *M. pneumoniae* (WEINER III *et al.*, 2000).

Diferentes mecanismos de regulação envolvendo alterações reversíveis nas seqüências promotoras têm sido descritos em algumas espécies de *Mycoplasma*, sendo responsáveis por controlar a expressão de várias famílias gênicas de lipoproteínas. Dentre estes eventos, podemos citar: expansão e contração de segmentos contíguos de resíduos de adeninas entre as regiões -10 e -35 (YOGEV *et al.*, 1991), expansão e contração de repetições de trinucleotídeos a 5' da região promotora (GLEW *et al.*, 1998), e inversões de DNA sítio-específicas envolvendo o promotor e a região RBS do gene (BHUGRA *et al.*, 1995; NOORMOHAMMADI *et al.*, 2000). Portanto, a identificação de promotores é fundamental

para que o controle da expressão gênica nesses microrganismos seja bem entendido.

## **1.4 Ferramentas Utilizadas no Estudo de Promotores**

### **1.4.1 *In silico***

A grande quantidade de genomas microbianos seqüenciados tem resultado em um rápido acúmulo de enormes quantidades de dados. Em vista disso, a detecção de regiões promotoras, através de métodos computacionais, tem atraído a atenção de pesquisadores nos últimos anos (KIM & SIM, 2005).

Vários programas desenvolvidos para fazer o reconhecimento de promotores estão disponíveis. No entanto, estes têm sido predominantemente baseados na grande quantidade de informações disponíveis para *E. coli* (WEINER III *et al.*, 2000), e não levam em consideração o contexto biológico das seqüências analisadas (KIM & SIM, 2005). Este fato dificulta a identificação de promotores em micoplasmas, tendo em vista que possuem um conteúdo de G+C menor do que o apresentado pela *E. coli*. Nestes casos tem sido sugerida a adaptação dos algoritmos através de ajustes que levem em consideração o conteúdo de guanina/citosina do genoma em questão, visando, assim, possibilitar a utilização destes em diferentes espécies bacterianas (HERTZ & STORMO, 1996).

Poucos trabalhos têm se dedicado a produzir ferramentas de bioinformática destinadas especificamente a encontrar seqüências promotoras em micoplasmas. Além de uma matriz de peso gerada por Weiner III *et al.* (2000) a partir de matrizes baseadas em dados sobre promotores de *E. coli* (HERTZ & STORMO, 1996), recentemente, foi desenvolvido um sistema utilizando inteligência artificial (VALIATI, 2006). Porém, neste foi obtida apenas uma baixa capacidade preditiva, não identificando com a certeza desejada novos possíveis

promotores. Portanto, embora existam ferramentas de bioinformática que auxiliam na determinação de seqüências regulatórias, estas são limitadas pela falta de promotores experimentalmente caracterizados nesse gênero. (WEINER III *et al.*, 2000; VALIATI, 2006).

#### **1.4.2 *In vivo***

O estudo *in vivo* de seqüências controladoras permite caracterizá-las funcionalmente. Com o emprego de sistemas-repórter, os promotores podem ser mapeados por meio de ensaios de deleção e mutagênese sítio-dirigida.

As primeiras tentativas de identificação e análise de regiões promotoras de micoplasmas *in vivo* foram feitas em *E. coli* (KNUDTSON & MINION, 1994; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 1998). Porém, provavelmente devido ao DNA genômico rico em AT dos micoplasmas, foi constatado que seqüências não reconhecidas como promotores nestas bactérias apresentavam falsa atividade promotora em *E. coli*, evidenciando, assim, a importância de se investigar a regulação gênica no próprio organismo de origem (KNUDTSON & MINION, 1994).

Halbedel & Stulke (2006), com o propósito de analisar as seqüências envolvidas no início da transcrição de *M. pneumoniae*, construíram o vetor pGP353. Este plasmídeo permite a clonagem de fragmentos contendo prováveis seqüências promotoras em frente à CDS do gene *lacZ*, o qual codifica a galactosidase, uma das mais populares enzimas-repórter. Esse sistema-repórter foi escolhido por gerar resultados rápidos, tanto qualitativos, através da visualização da atividade enzimática em colônias, quanto quantitativos, em ensaios usando como substrato cromatogênico o o-nitrofenil-D-galactopiranosídeo (MILLER, 1972 *apud* HALBEDEL & STULKE, 2006). Além disso, sistemas-repórter baseados no gene *lacZ* já foram estabelecidos em outros mollicutes, tais como *Acholeplasma oculi*, *Mycoplasma*

*pulmonis*, *Mycoplasma arthritidis* e *Mycoplasma capricolum* (KNUDTSON & MINION, 1994; DYBVIG *et al.*, 2000; JANIS *et al.*, 2005).

A análise molecular dos mecanismos envolvidos na regulação da transcrição em *M. hyopneumoniae* ainda não é possível devido à carência de sistemas-repórter adequados que possam ser utilizados para o estudo de suas regiões promotoras *in vivo*. Visando suprir essa deficiência é que, recentemente, em nosso laboratório, foi desenvolvido o plasmídeo pOSTM, o qual possui origem de replicação de *M. hyopneumoniae*, e tem o gene de resistência à tetraciclina como gene-repórter (LOPES, 2007). Além disso, a utilização de pGP353 também foi avaliada com este objetivo (REOLON, 2007). Através da resistência aos antibióticos foi possível observar que ambos plasmídeos são capazes de ser transformados nessa espécie, no entanto, nenhum deles se manteve estável nas células hospedeiras.

### **1.4.3 *In vitro***

A RNA polimerase holoenzima ao reconhecer um promotor liga-se a ele. Logo, *gel mobility shift assay* (retardação em gel) e *footprinting* são exemplos de técnicas capazes de revelar a localização do sítio onde esteja ocorrendo a interação entre a proteína, no caso a RNA polimerase, e o DNA.

As duas técnicas baseiam-se na ligação da proteína ao DNA. Porém, enquanto no *gel mobility shift assay* essa ligação é detectada por causar redução da mobilidade eletroforética do fragmento de DNA (LANE *et al.*, 1992), no *footprinting*, ela é constatada pela habilidade do ligante em proteger o DNA da clivagem, preservando o sítio de ligação (HAMPSHIRE *et al.*, 2007). Esta última é normalmente utilizada para posicionar a região controladora dentro de um fragmento de restrição previamente identificado pela retardação em gel. A aplicação destas metodologias é ampla, sendo bastante utilizadas no

desenvolvimento de estudos sobre regulação transcricional em bactérias (PELCHAT & PERREAULT, 2004; HOOK-BARNARD *et al.*, 2006; WILSON & LAMONT, 2006).

Outro método empregado na caracterização de promotores é a transcrição *in vitro*. Diferentemente das demais técnicas citadas, esta já fora utilizada para analisar promotores de micoplasmas (GAFNY *et al.*, 1988; HYMAN *et al.*, 1988). Nestes dois trabalhos, onde foram pesquisadas as regiões 5' dos operons de rRNA de *M. capricolum* e *M. pneumoniae*, a transcrição *in vitro* foi feita com a RNA polimerase de *E. coli*. Entretanto, como mencionado anteriormente, os resultados obtidos por Knudtson & Minion (1994) sugerem que a RNA polimerase de *E. coli* pode reconhecer seqüências que não possuam atividade promotora nos micoplasmas. Deste modo, fica clara a necessidade de utilização da RNA polimerase holoenzima de *Mycoplasma* em experimentos *in vitro* que pretendam definir as verdadeiras regiões envolvidas com o início da transcrição nestes organismos.

## 1.5 RNA Polimerase Holoenzima

O componente central na regulação da transcrição bacteriana é a RNA polimerase (RNAP). Quando composta pelo núcleo da enzima e pelo fator  $\sigma$ , é chamada de holoenzima, sendo responsável pelo início da transcrição (BROWNING & BUSBY, 2004).

O processo de transcrição, bastante estudado em *E. coli*, consiste em 3 estágios: iniciação, alongamento e terminação. Durante a iniciação, a RNA polimerase holoenzima liga-se especificamente aos dois hexâmeros conservados do promotor, nas posições -35 e -10 relativas ao sítio de início de transcrição, para formar o complexo fechado. A subsequente desnaturação das fitas do DNA, nas proximidades da região -10, resulta no complexo aberto e no início da transcrição. Depois de cerca de 9-12 nucleotídeos de RNA terem sido sintetizados, o complexo de iniciação entra no estágio de alongamento. Esta transição é

marcada por uma mudança conformacional significativa, que leva simultaneamente à perda do contato com o promotor, liberação do fator  $\sigma$  e formação de um complexo de alongamento (GROSS *et al.*, 1998).

### 1.5.1 O Núcleo

Trabalhos com RNA polimerase de *E. coli* demonstraram que o núcleo da enzima é composto por cinco polipeptídios:  $\alpha$ I e  $\alpha$ II,  $\beta$ ,  $\beta'$ , e  $\omega$ , cujas estruturas e funções são evolutivamente conservadas (DARST, 2001). O sítio ativo da polimerase é formado a partir das grandes subunidades  $\beta$  e  $\beta'$  (KORZHEVA *et al.*, 2000). A união destas é mantida por um dímero composto pelas duas subunidades  $\alpha$ , sendo, portanto, responsável pela montagem do núcleo da enzima. A pequena subunidade  $\omega$ , não tem participação direta na transcrição, mas aparentemente funciona como uma chaperona para auxiliar no dobramento de  $\beta'$  (HAMPSEY, 2001).

A síntese de RNA a partir de um DNA molde é catalisada pelo núcleo da RNA polimerase na presença de nucleosídeos trifosfatados. Apesar disso, ela é incapaz de iniciar a transcrição nos sítios apropriados (BORUKHOV & SEVERINOV, 2002). Para tanto, nas bactérias, é necessária a participação de um único polipeptídeo, o fator  $\sigma$ , que se liga ao núcleo da RNAP resultando na formação da RNA polimerase holoenzima, a qual consegue reconhecer as seqüências promotoras e iniciar a transcrição (DARST, 2001).

### 1.5.2 O Fator $\sigma$

O primeiro fator  $\sigma$  bacteriano foi descoberto em 1969, como sendo uma

subunidade da RNA polimerase de *E. coli* (BURGESS *et al.*, 1969). Ele está envolvido com três funções principais: garantir o reconhecimento de seqüências promotoras específicas, posicionar a RNA polimerase holoenzima no promotor alvo, e facilitar o relaxamento do DNA dupla-fita próximo ao sítio de início de transcrição (WOSTEN, 1998).

Embora esteja claro que  $\sigma$  é responsável pelo reconhecimento das seqüências promotoras pela RNAP, no fator  $\sigma$  livre, a distância entre os domínios que a ligam ao DNA é inapropriada para que haja interação simultânea com os elementos -10 e -35. O reconhecimento simultâneo dos elementos promotores alvo somente torna-se possível após ocorrerem mudanças conformacionais em  $\sigma$  que são provocadas pela formação da holoenzima (BORUKHOV & SEVERINOV, 2002).

A participação de  $\sigma$  no processo de transcrição é objeto de diversos estudos. Novos resultados obtidos têm sugerido que estes fatores não estariam envolvidos somente no processo de início de transcrição. Um número crescente de evidências bioquímicas sustenta a possibilidade de que  $\sigma$  seria mantida no complexo de alongamento, e não liberada, como se acredita (*e.g.* BAR-NAHUM & NUDLER, 2001). Portanto, alternativamente, o fator  $\sigma$  poderia influenciar etapas durante o alongamento através de sua associação temporária (*e.g.* KAPANIDIS *et al.*, 2005) ou permanente (BAR-NAHUM & NUDLER, 2001; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2001) ao complexo de alongamento, ou potencialmente através do *imprinting* conformacional que permanece no complexo de alongamento após a liberação de  $\sigma$  (BERGHOFER-HOCHHEIMER *et al.*, 2005). Tais efeitos permitiriam ao fator  $\sigma$  auxiliar na regulação de fases diferentes da transcrição.

A maioria das bactérias contém múltiplos fatores  $\sigma$ , os quais, quando combinados com a RNAP, formam holoenzimas que são capazes de reconhecer diferentes tipos de promotores, ativando conjuntos de genes específicos. Em *E. coli*, por exemplo, existem os fatores  $\sigma_{32}$ , que direcionam a síntese de genes, cujos produtos estabilizam ou renaturam

proteínas;  $\sigma_{54}$ , que mobilizam genes envolvidos com a assimilação de componentes nitrogenados;  $\sigma_S$ , que aciona genes requeridos durante a fase estacionária ou em casos de estresse. Logo, a associação de fatores  $\sigma$  alternativos apropriados com o núcleo da RNA polimerase permite às células ajustarem, rapidamente, o padrão de transcrição, de modo a otimizar o metabolismo celular em resposta às mudanças nas condições ambientais e nos sinais celulares (MOONEY *et al.*, 2005).

O número genes que codificam fatores  $\sigma$  varia bastante de um organismo para outro: de apenas um nas espécies de *Mycoplasma* (e.g. FRASER *et al.*, 1995), até mais de 60 em *Streptomyces coelicolor* (BENTLEY *et al.*, 2002). Bactérias simbiotes e parasitas aparentemente requerem um número menor de fatores de transcrição próprios (MITTENHUBER, 2002), havendo, portanto, uma grande correlação entre o número de genes que codificam fatores  $\sigma$  e a diversidade de ambientes em que os organismos podem viver (BROWNING & BUSBY, 2004).

## **1.6 Expressão Heteróloga de Genes de *Mycoplasma* contendo Códons UGA**

Até o final da década de 70, acreditava-se que o código genético era universal, todavia, com a descoberta de que o códon de parada UGA (códon opal) era utilizado para incorporar triptofano nas mitocôndrias e nos micoplasmas, este dogma foi abandonado (MACINO *et al.*, 1979; YAMAO *et al.*, 1985). Esta modificação peculiar do código genético foi considerada ser resultado de um processo de otimização em resposta ao baixo conteúdo genômico de G+C apresentado por estes organismos (JUKES *et al.*, 1987).

Pressupõe-se que, inicialmente, o códon UGA não era muito utilizado como códon de terminação, sendo, então, UAA, o códon de parada preferencial, uma vez que UAG também ocorria em menor frequência. Subsequentemente, o códon para triptofano UGG foi

seqüencialmente substituído pelos códons UGA disponíveis, complementando a otimização do conteúdo de G+C (JUKES *et al.*, 1987).

Esta ocorrência de códons UGA nos genes de micoplasma tem freqüentemente impedido a expressão heteróloga destes, uma vez que, em *E. coli* e outros hospedeiros, UGA é utilizado como códon de terminação. Para contornar este problema, uma variedade de diferentes estratégias tem sido empregada.

A expressão dos genes de micoplasma, contendo códons de parada, foi descrita em três hospedeiros diferentes, porém sem muito sucesso. *Spiroplasma citri*, que utiliza o mesmo código genético do gênero *Mycoplasma*, foi a primeira espécie a ser aplicada na clonagem e expressão de genes exógenos (STAMBURSKI *et al.*, 1991). Outras tentativas foram feitas com *B. subtilis* e cepas de *E. coli* supressoras do códon opal, entretanto, ambos os organismos apresentaram baixa eficiência de expressão (SMILEY & MINION, 1993; KANNAN & BASEMAN, 2000).

Sendo assim, estratégias que proporcionem a introdução de mutações A→G para substituir os códons UGA por UGG (codifica triptofano no código genético universal), possibilitam que os genes portadores de códons de terminação sejam expressos normalmente em *E. coli*. Em casos onde ocorram somente alguns códons opal, sucessivas mutações podem ser feitas através de mutagênese sítio-dirigida (ROBINO *et al.*, 2005). Recentemente, foi desenvolvida uma técnica, chamada MMR (*multiple mutation reaction*), que permite a substituição simultânea de múltiplos códons UGA (HAMES *et al.*, 2005). Ainda, com a mesma finalidade, os genes de *Mycoplasma* podem ser sintetizados *in vitro* a partir de oligonucleotídeos, contudo esta estratégia é bastante cara.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Tendo em vista a necessidade de identificar as seqüências nucleotídicas que controlam o início da transcrição em *Mycoplasma* spp., e a inexistência de ferramentas que possibilitem este estudo em *Mycoplasma hyopneumoniae*, a caracterização de promotores *in vitro* é uma opção. Deste modo, este trabalho tem como objetivo expressar o fator  $\sigma$  de *M. hyopneumoniae*, visando, posteriormente, reconstituir a RNA polimerase holoenzima, a qual, então, poderá ser aplicada em experimentos de análise funcional de promotores desta bactéria.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Amplificação e clonagem do gene *rpoD* de *M. hyopneumoniae*;
- Mutagênese sítio-dirigida dos três códons TGA presentes no gene *rpoD*;
- Expressão do fator  $\sigma$  em *Escherichia coli*;

### **3. MATERIAIS & MÉTODOS**

#### **3.1 Linhagens bacterianas, meios de cultura e condições de crescimento**

*E. coli* XL1-Blue e *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) foram mantidas em meio sólido Luria-Bertani contendo 20 µg/ml de tetraciclina (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Quando transformadas com os plasmídeos pUC18, pET23a-d(+) (Novagen) [ANEXO 7.1], ou seus recombinantes, foram cultivadas em meio Luria-Bertani (sólido e líquido) contendo 100 µg/ml de ampicilina. O cultivo foi feito a 37°C por 16 horas, com agitação de 150 rpm (quando em meio líquido).

*Mycoplasma hyopneumoniae* 7448, procedente da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), foi isolada de um suíno infectado em Lindóia do Sul, SC, Brasil. O cultivo foi feito em meio Friis líquido (FRIIS, 1975) a 37°C, sob leve agitação até que o indicador de ph, presente no meio, mudasse de cor.

#### **3.2 Clivagens e enzimas de restrição**

As enzimas de restrição SmaI, EcoRI, XhoI, NcoI, SacII, SacI e KpnI foram adquiridas da empresa Amersham Pharmacia Biotech, sendo as clivagens feitas de acordo com as especificações do fabricante.

#### **3.3 Extração de DNA genômico e DNA plasmidial**

O DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448 foi extraído a partir de 5 ml

de cultivo conforme protocolo em anexo [ANEXO 7.2].

A extração de DNA plasmidial a partir de *E. coli* XL1-Blue foi feita de acordo com o descrito por Sambrook & Russell (2001).

### 3.4 Primers e condições de termociclagem

Os primers [TAB. 3.1] foram projetados a partir da seqüência nucleotídica da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* (número de acesso no GenBank: NC\_007332) [ANEXO 7.3]. As PCRs [TAB. 3.2] foram feitas no termociclador Mastercycler (Eppendorf).

TABELA 3.1 Primers utilizados neste trabalho.

| Primer | Seqüência (5'-3')                                | Tamanho (pb) | Tm (°C) |
|--------|--|--------------|---------|
| Aup    | <u>CCATGGC</u> CAGAAAATAAAGAACTTTTCCCC           | 30           | 65,4    |
| Ado    | TCAATTGCAAGATT <u>C</u> CACTTTTCAATATAT          | 30           | 58,6    |
| Bup    | ATATATTGAAAAGTG <u>G</u> AATCTTGCAATTGA          | 30           | 58,6    |
| Bdo    | AACTTCATCACTATAAACTTTTGGTTTGTG                   | 30           | 61,2    |
| Cup    | ATTATATAACAGAAAATAGTCCAAATCAAT                   | 30           | 55,8    |
| Cdo    | CGCTTGGCGGAT <u>C</u> CA <u>C</u> CAGGTTGCATAAGT | 30           | 70,9    |
| Dup    | ACTTATGCAACCTG <u>G</u> TG <u>G</u> ATCCGCCAAGCG | 30           | 70,9    |
| Ddo    | <u>CTCGAGAT</u> TAAAATCCCTTAATGATAGGCG           | 30           | 68,6    |

Seqüência sublinhada de Aup – sítio para enzima de restrição NcoI  
 Seqüência sublinhada de Ddo – sítio para enzima de restrição XhoI  
 Realce em preto – nucleotídeos substituídos da seqüência original (mutados)

TABELA 3.2 Condições de termociclagem.

|                      | SigmaMh1        | SigmaMh2      | SigmaMh3      | SigmaMh4        |
|----------------------|-----------------|---------------|---------------|-----------------|
| Desnaturação inicial | 94°C por 5'     | 94°C por 5'   | 94°C por 5'   | 94°C por 5'     |
|                      | 60°C por 30''   | 62°C por 30'' | 62°C por 30'' | 62°C por 30''   |
| 35 ciclos            | 68°C por 1'30'' | 68°C por 30'' | 68°C por 1'   | 68°C por 1'30'' |
|                      | 94°C por 30''   | 94°C por 30'' | 94°C por 30'' | 94°C por 30''   |

### 3.5 Purificação dos fragmentos, clonagem e transformação

A purificação de todos os fragmentos de DNA foi feita utilizando o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Os produtos de PCR do gene *rpoD* e os fragmentos parciais  $\sigma$ AB,  $\sigma$ CD,  $\sigma$ ABC  $\sigma$ BCD foram tratados com Klenow DNA polimerase (Fermentas) e com cinase de polinucleotídeos (*Polynucleotide kinase*, PNK, Fermentas) e clonados no vetor pUC18 clivado com SmaI e defosforilado com fosfatase alcalina de camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP, USB), seguindo as orientações dos fabricantes.

Os fragmentos SacI-5'- $\sigma$ ABC-3'-SacII e SacII-5'- $\sigma$ CD-3'-KpnI foram clonados no vetor pUC18 clivado com SacI e KpnI.

As clonagens e as transformações – todas feitas por eletroporação, foram executadas de acordo com Sambrook & Russell (2001).

### 3.6 Eletroforese em gel de agarose

Todos os produtos de PCR e todas as reações de clivagem foram analisados em gel de agarose 0,8% com 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídio, conforme descrito por Sambrook & Russell (2001).

### 3.7 Seqüenciamento automático e análise dos dados

Os clones foram submetidos à reação de seqüenciamento, utilizando o *kit Dyenamic et dye terminator cycle sequencing* (Amersham Biosciences), desenvolvido para o seqüenciador automático MEGABACE, conforme o manual do fabricante. Além dos *primers*

M13 *foward* e *reverse* (Invitrogen), também foram utilizados os *primers* que constam na Tabela 3.1, conforme a necessidade.

Os resultados de seqüenciamento foram processados no pacote de programas Staden e analisados no banco de dados *nucleotide collection* a partir do algoritmo *Blastn* do programa BLAST (NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

### **3.8 Amplificação do gene *rpoD* de *M. hyopneumoniae***

O gene *rpoD* foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos Aup e Ddo que continham, respectivamente, os sítios de restrição de NcoI e XhoI [TAB. 3.1]. As reações foram realizadas em volume final de 25 µl contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris-HCl, 0,2 mM de dNTPs, 30 pmol de cada *primer*, 1U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e 50 ng de DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448. Foram feitos 35 ciclos de acordo com o programa SigmaMh1 [TAB. 3.2]. O fragmento gerado, depois de purificado, foi clonado no sítio SmaI do vetor pUC18, gerando pUC18σMH. Este foi transformado em *E. coli* XL-1 Blue. Para confirmar a clonagem, os clones foram clivados com EcoRI e, após, seqüenciados.

### **3.9 Mutagênese sítio-dirigida do gene *rpoD***

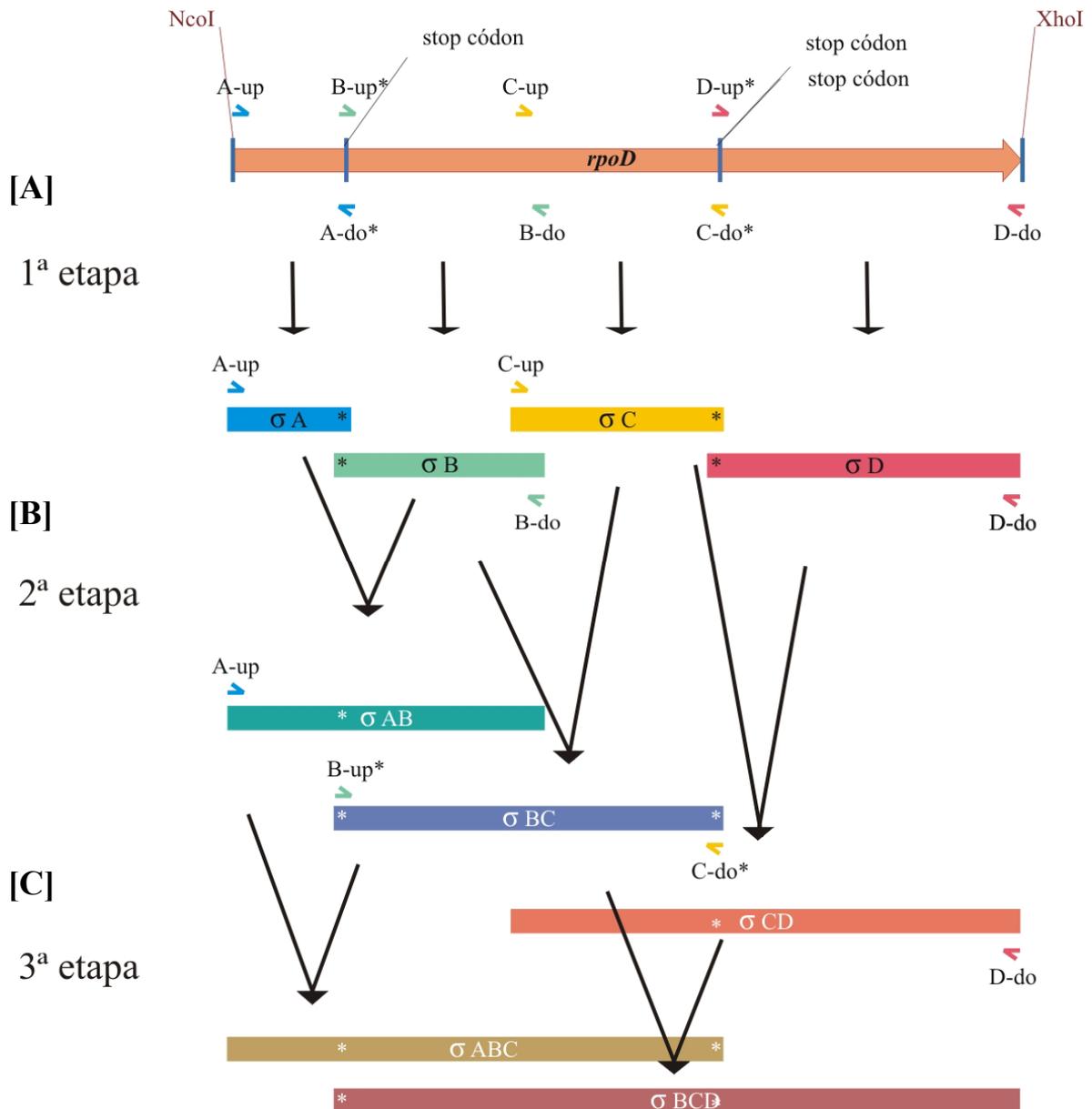
Inicialmente, os três códonos TGA presentes no gene *rpoD* foram substituídos por 3 códonos TGG. As mutações A→G foram inseridas através da amplificação do gene *rpoD* em 4 fragmentos diferentes, utilizando *primers* mutagênicos: fragmento σA (Aup e Ado), fragmento σB (Bup e Bdo), fragmento σC (Cup e Cdo) e fragmento σD (Dup e Ddo) [FIG. 3.1

A e TAB. 3.1]. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25  $\mu$ l contendo 2,5  $\mu$ l de *10X Pfx50 PCR Mix* (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs, 30 pmol de cada *primer*, 1U de *Pfx50 DNA Polymerase* (Invitrogen) e 50 ng do plasmídeo pUC18 $\sigma$ MH. Foram feitos 35 ciclos de acordo com o programa SigmaMh2 [TAB. 3.2]. Os fragmentos gerados foram purificados a partir de gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

$\sigma$ AB,  $\sigma$ BC e  $\sigma$ CD foram gerados, respectivamente, a partir da união dos seguintes fragmentos:  $\sigma$ A e  $\sigma$ B,  $\sigma$ B e  $\sigma$ C,  $\sigma$ C e  $\sigma$ D [FIG. 3.1 B]. Esta união dos fragmentos foi realizada por PCR. Cada reação foi realizada em volume de 25  $\mu$ l contendo 2,5  $\mu$ l de *10X Pfx50 PCR Mix* (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs, 30 pmol de cada *primer*, 1U de *Pfx50 DNA Polymerase* (Invitrogen) e 40 fmoles de cada fragmento. Para gerar  $\sigma$ AB foram utilizados os fragmentos  $\sigma$ A e  $\sigma$ B, e os *primers* Aup e Bdo; para gerar  $\sigma$ BC foram usados os fragmentos  $\sigma$ B e  $\sigma$ C, e os *primers* Bup e Cdo; e para gerar  $\sigma$ CD foram usados os fragmentos  $\sigma$ C e  $\sigma$ D, e os *primers* Cup e Ddo [FIG. 3.1 B]. Foram feitos 35 ciclos de acordo com o programa SigmaMh3 [TAB. 3.2]. Os fragmentos obtidos foram purificados a partir de gel de agarose 0,8% , sendo  $\sigma$ AB, e  $\sigma$ CD clonados no sítio SmaI do vetor pUC18, gerando os plasmídeos pUC18 $\sigma$ AB e pUC18 $\sigma$ CD. Estes foram transformados em *E. coli* XL-1 Blue, e os clones, depois de confirmados por PCR, foram seqüenciados para verificar a presença das substituições A $\rightarrow$ G.

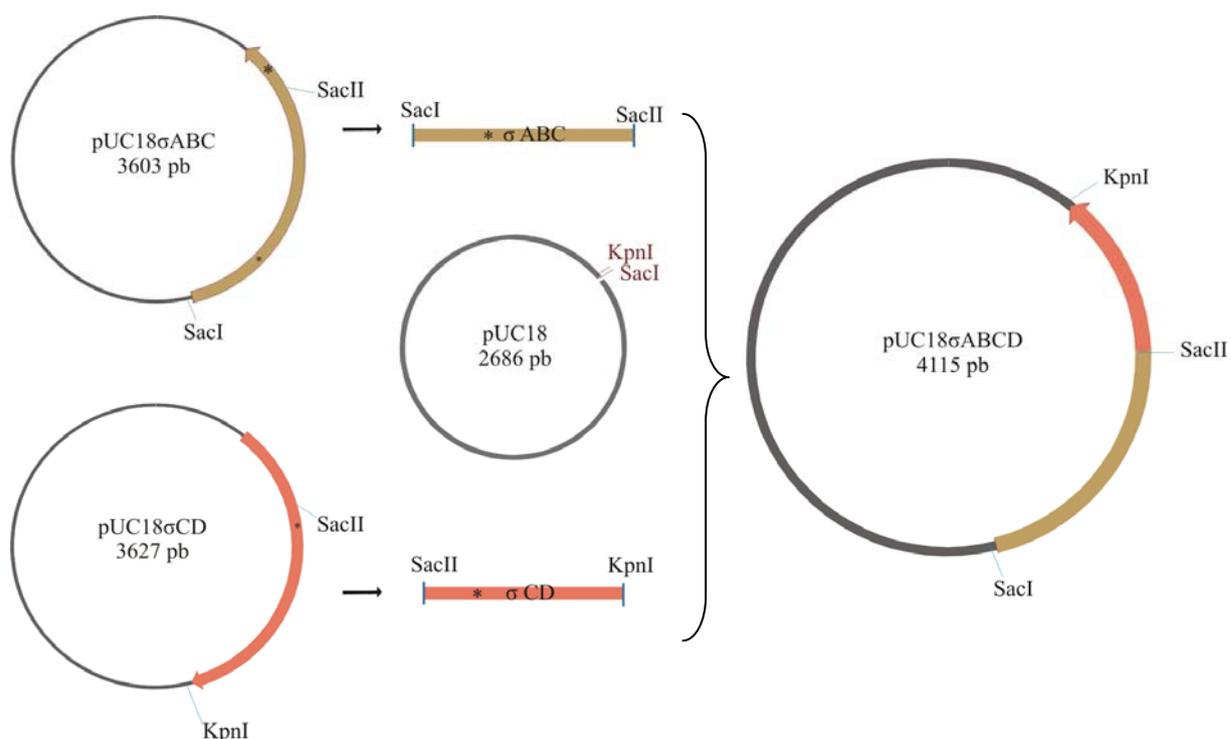
$\sigma$ ABC e  $\sigma$ BCD foram gerados, respectivamente, a partir da união dos seguintes fragmentos:  $\sigma$ AB e  $\sigma$ BC,  $\sigma$ BC e  $\sigma$ CD [FIG. 3.1 C]. Esta união dos fragmentos foi realizada por PCR. Cada reação foi realizada em volume de 25  $\mu$ l contendo 2,5  $\mu$ l de *10X Pfx50 PCR Mix* (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs, 30 pmol de cada *primer*, 1U de *Pfx50 DNA Polymerase* (Invitrogen) e 40 fmoles de cada fragmento. Para gerar  $\sigma$ ABC foram utilizados os fragmentos  $\sigma$ AB e  $\sigma$ BC, e os *primers* Aup e Cdo; para gerar  $\sigma$ BCD foram usados os fragmentos  $\sigma$ BC e  $\sigma$ CD, e os *primers* Bup e Ddo. Foram feitos 35 ciclos de acordo com o programa SigmaMh4 [TAB. 3.2]. Os fragmentos  $\sigma$ ABC e  $\sigma$ BCD foram purificados a partir de gel de agarose 0,8% e

clonados no sítio *Sma*I do vetor pUC18, gerando os plasmídeos pUC18 $\sigma$ ABC e pUC18 $\sigma$ BCD. Estes foram transformados em *E. coli* XL-1 Blue e os clones, depois de confirmados por PCR, foram sequenciados para verificar a presença das substituições A→G.



**FIGURA 3.1 Metodologia utilizada para obtenção dos fragmentos parciais mutados a partir do gene *rpoD*.** Esquema mostrando as diferentes etapas do processo. [A] 1ª etapa: amplificação, a partir do plasmídeo pUC18 $\sigma$ MH, dos 4 fragmentos  $\sigma$ A,  $\sigma$ B,  $\sigma$ C e  $\sigma$ D. [B] 2ª etapa: amplificação de  $\sigma$ AB a partir dos fragmentos  $\sigma$ A e  $\sigma$ B, utilizando os *primers* A-up e B-do; amplificação de  $\sigma$ BC a partir dos fragmentos  $\sigma$ B e  $\sigma$ C utilizando os *primers* B-up e C-do; amplificação de  $\sigma$ CD a partir dos fragmentos  $\sigma$ C e  $\sigma$ D utilizando os *primers* C-up e D-do. [C] 3ª etapa: amplificação de  $\sigma$ ABC a partir dos fragmentos  $\sigma$ AB e  $\sigma$ BC utilizando os *primers* A-up e C-do; amplificação de  $\sigma$ BCD a partir dos fragmentos  $\sigma$ BC e  $\sigma$ CD utilizando os *primers* B-up e D-do. A-do\*, B-up\*, B-do\*, C-up\*, C-do\*, D-up\* - *primers* contendo mutações (TGA→TGG). \* - fragmentos com as substituições.

O plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABC foi clivado com SacI e SacII, e pUC18 $\sigma$ CD foi clivado com SacII e KpnI. Os fragmentos liberados foram purificados, a partir do gel de agarose 0,8%, e ligados ao vetor pUC18 clivado com SacI e KpnI, gerando o plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABCD [FIG. 3.2]. Este foi transformado em *E. coli* XL-1 Blue. Para confirmar a clonagem, os clones foram clivados com EcoRI e, após, seqüenciados.



**FIGURA 3.2** Obtenção do plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABCD contendo o gene *rpoD* com as 3 substituições A→G. O plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABC foi clivado com SacI e SacII, e pUC18 $\sigma$ CD foi clivado com SacII e KpnI. Os fragmentos liberados foram ligados ao vetor pUC18 clivado com SacI e KpnI, gerando o plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABCD.

### 3.10 Expressão do fator $\sigma$ recombinante

O fragmento  $\sigma$ ABCD foi liberado do vetor pUC18 através de clivagem com as enzimas de restrição NcoI e XhoI. Este fragmento, depois de purificado, foi subclonado no vetor de expressão pET23a-d(+) clivado com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo

pET $\sigma$ ABCD. Este plasmídeo foi transformado em *E. coli* XL-1 Blue. Os clones foram confirmados por PCR e clivagem com NcoI e XhoI.

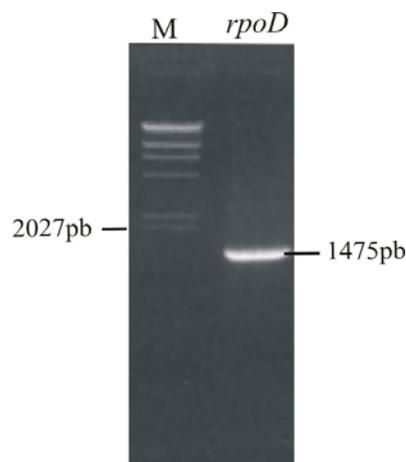
Para expressão do fator  $\sigma$  recombinante, inicialmente, o plasmídeo pET $\sigma$ ABCD foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Desta transformação foi selecionada uma colônia, a qual foi pré-inoculada em 1ml de meio líquido Luria-Bertani contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina e 1% de glicose, sendo cultivada a 37°C, sob agitação de 150 rpm, durante 16 horas. Após, 400  $\mu$ l do pré-inóculo foram inoculados em 200 ml do mesmo meio contendo as mesmas concentrações de antibiótico e glicose, e incubado a 37°C, a 200 rpm. Quando a OD<sub>600</sub> atingiu o valor de 0,4 foi realizada a indução por 3 horas com 1 mM de IPTG, nas mesmas condições. Depois da indução, a cultura foi recuperada por centrifugação a 5000 g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi estocado a -20°C.

Para análise da expressão da proteína recombinante, uma alíquota de 1 ml foi retirada antes da indução e outras três foram retiradas a cada hora após a adição de IPTG. Estas alíquotas foram centrifugadas a 16000 xg por 1 minuto em microcentrífuga (Eppendorff 5415 C). O precipitado das amostras foi ressuscitado em 100  $\mu$ l de tampão de migração SDS-PAGE 1X e fervido por 10 minutos em banho-maria. O precipitado (fração insolúvel) foi separado do sobrenadante (fração solúvel), e ressuscitado em outros 100  $\mu$ l de tampão de migração SDS-PAGE 1X. Um volume de 20  $\mu$ l de cada fração foi analisado em gel SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie Coloidal G250 (NEUHOFF *et al.*, 1985).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amplificação do gene *rpoD* de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Com o objetivo de clonar o gene *rpoD* para realização de experimentos posteriores, este foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*. A amplificação desta CDS, a qual originalmente possui 1470 pb, gerou um produto de 1475 pb [FIG. 4.1], devido à utilização de *primers* que adicionaram as suas extremidades os sítios de restrição XhoI e NcoI. Este fragmento foi ligado ao plasmídeo pUC18, sendo denominado pUC18 $\sigma$ MH. A seqüência foi confirmada por seqüenciamento.



**FIGURA 4.1** Amplificação do gene *rpoD* de *M. hyopneumoniae*.

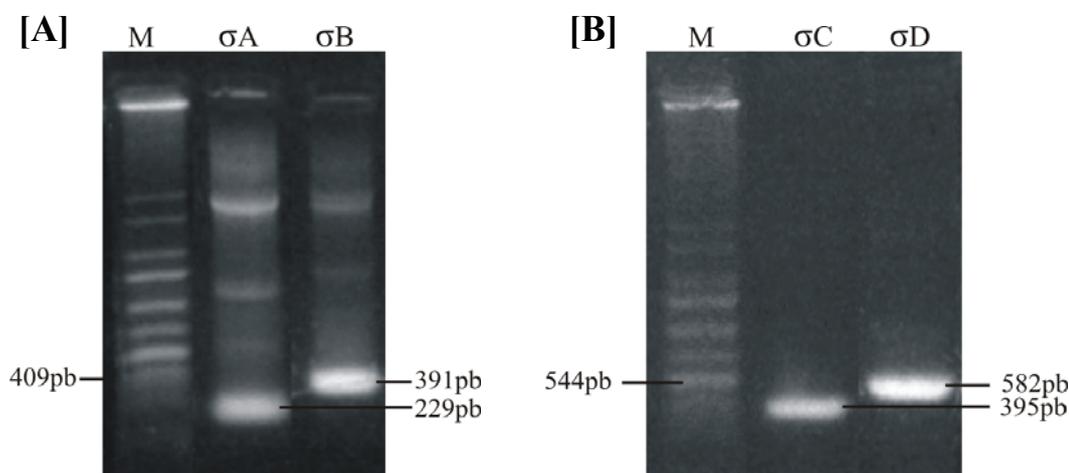
Gel de agarose 0,8% / brometo de etídeo mostrando o produto da amplificação do gene *rpoD* obtido por PCR a partir do DNA genômico da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*. M – marcador de tamanho molecular; *rpoD* – produto da PCR.

### 4.2 Substituição dos códons TGA por TGG no gene *rpoD*

O fator  $\sigma$  de *M. hyopneumoniae* é composto por 490 aminoácidos, possuindo três triptofanos. No gene *rpoD* estes são codificados por três códons TGA,

localizados nas posições 221, 904 e 907 em relação a adenina do códon de início de tradução.

Para possibilitar a expressão heteróloga do gene *rpoD* em *E. coli*, os três códons TGA existentes tiveram de ser substituídos por três códons TGG. Utilizando o plasmídeo pUC18 $\sigma$ MH e *primers* contendo as mutações (A→G) necessárias, o gene foi amplificado em 4 partes diferentes: fragmento  $\sigma$ A (229 pb), fragmento  $\sigma$ B (391 pb), fragmento  $\sigma$ C (395 pb) e fragmento  $\sigma$ D (582 pb) [FIG. 4.2].



**FIGURA 4.2 Mutagênese sítio-dirigida do gene *rpoD* de *M. hyopneumoniae*.**

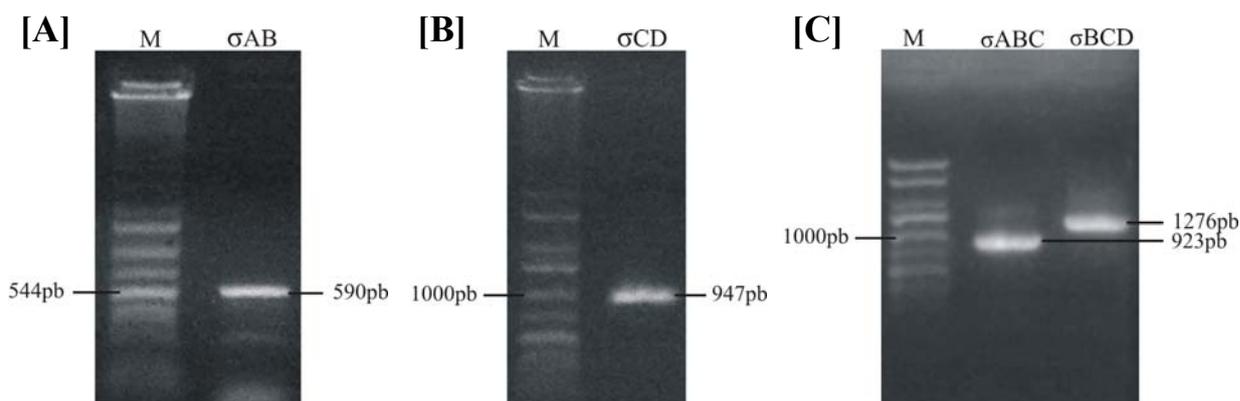
Os códons TGA existentes no gene *rpoD* foram substituídos por TGG através de sua amplificação em 4 fragmentos diferentes utilizando *primers* contendo as mutações necessárias (A→G). [A] Gel de agarose 0,8% / brometo de etídeo mostrando a amplificação dos fragmentos mutados  $\sigma$ A e  $\sigma$ B. M – marcador de massa molecular;  $\sigma$ A e  $\sigma$ B – produtos da PCR. [B] Gel de agarose 0,8% / brometo de etídeo mostrando a amplificação dos fragmentos mutados  $\sigma$ C e  $\sigma$ D. M – marcador de tamanho molecular;  $\sigma$ C e  $\sigma$ D – produtos da PCR.

### 4.3 Construção de $\sigma$ ABCD (*rpoD* contendo as mutações)

Depois de inseridas as mutações nos fragmentos  $\sigma$ A,  $\sigma$ B,  $\sigma$ C e  $\sigma$ D, estes foram empregados na construção de um gene *rpoD* íntegro passível de ser expresso em *E. coli*. Primeiramente foram feitas duas PCRs, uma utilizando como DNA molde  $\sigma$ A e  $\sigma$ B para amplificação do fragmento  $\sigma$ AB (590 pb) [FIG. 4.3 A], e outra utilizando  $\sigma$ C e  $\sigma$ D como molde para obtenção do fragmento  $\sigma$ CD (947 pb) [FIG. 4.3 B]. Isto foi possível, pois os fragmentos

compartilham entre si uma região de 30 pb que permitiu o anelamento entre eles durante a reação. Utilizando a mesma metodologia, pretendia-se gerar o fragmento completo  $\sigma$ ABCD a partir dos fragmentos parciais  $\sigma$ AB e  $\sigma$ CD, porém, não foi possível amplificar produtos que correspondessem ao tamanho esperado de 1475 pb.

Ainda, com o objetivo de se obter o fragmento  $\sigma$ ABCD através da mesma estratégia, foram produzidos fragmentos parciais maiores,  $\sigma$ ABC e  $\sigma$ BCD [Fig. 4.3 C], com respectivamente, 923 e 1276 pares de bases. Estes fragmentos, agora contendo uma região de sobreposição de 680 pb a mais do que os 62 pb existentes entre  $\sigma$ AB e  $\sigma$ CD, foram utilizados na amplificação de  $\sigma$ ABCD, porém, novamente, sem sucesso.



**FIGURA 4.3 Construções parciais para obtenção do gene *rpoD* mutado.**

As seqüências parciais do gene *rpoD* -  $\sigma$ AB,  $\sigma$ BC,  $\sigma$ ABC e  $\sigma$ BCD -, foram obtidas a partir da união dos fragmentos mutados  $\sigma$ A,  $\sigma$ B,  $\sigma$ C e  $\sigma$ D através de PCR. Géis de agarose 0,8% / brometo de etídeo mostrando [A] amplificação do fragmento mutado  $\sigma$ AB. M – marcador de tamanho molecular;  $\sigma$ AB – produto da PCR. [B] amplificação do fragmento mutado  $\sigma$ CD. M – marcador de tamanho molecular;  $\sigma$ CD – produto da PCR. [C] amplificação dos fragmentos mutados  $\sigma$ ABC e  $\sigma$ BCD. M – marcador de tamanho molecular;  $\sigma$ ABC e  $\sigma$ BCD – produtos da PCR.

Para confirmar a inserção das mutações nos fragmentos amplificados,  $\sigma$ AB,  $\sigma$ CD,  $\sigma$ ABC e  $\sigma$ BCD, estes foram clonados e seqüenciados. Foram analisados onze clones, destes, sete possuíam as substituições A→G requeridas. Um clone pUC18 $\sigma$ ABC e um pUC18 $\sigma$ CD, cujas mutações haviam sido confirmadas, foram usados para gerar o fragmento  $\sigma$ ABCD. Para tanto, inicialmente, foi realizado um mapa de restrição do gene *rpoD* com o objetivo de

identificar sítios de restrição únicos e que estivessem presentes na região de sobreposição entre os fragmentos  $\sigma$ ABC e  $\sigma$ CD. Dentre os sítios de restrição que atendiam às condições estabelecidas, foi escolhido o reconhecido por SacII. Esta enzima além de gerar extremidades coesivas que possibilitam a clonagem direcionada, também não reconhece nenhuma seqüência do vetor pUC18. A seqüência correspondente a região 5' do gene (nucleotídeos 1-800) foi purificada a partir da clivagem do plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABC com as enzimas de restrição SacI e SacII, e a região 3' (nucleotídeos 801-1475) foi obtida a partir da clivagem do plasmídeo pUC18 $\sigma$ CD com SacII e KpnI. Estes fragmentos foram ligados simultaneamente ao vetor pUC18 digerido com SacI-KpnI. Esta metodologia possibilitou gerar o plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABCD, o qual, após seqüenciado, mostrou conter o gene *rpoD* completo com os 3 códons TGA substituídos [FIG. 4.4]. Todos os 9 clones seqüenciados apresentavam as três mutações.

```

      160          *      180          *      200          *      220          *
rpoD : TTTAGATAATTTTCTATTTTTTAAAGTCACGATGAAATTTATAAATATATTGAAAAGTGAATCTTGCAATTGAAG
ABCD : TTTAGATAATTTTCTATTTTTTAAAGTCACGATGAAATTTATAAATATATTGAAAAGTGAATCTTGCAATTGAAG
      TTTAGATAATTTTCTATTTTTTAAAGTCACGATGAAATTTATAAATATATTGAAAAGTGAATCTTGCAATTGAAG
      *          860          *          880          *          900          *          920
rpoD : TAAAGCAGTTGCAAAATATGACTATACCCGTGGATTTAAATTCTCAACTTATGCAACCTGCTGATCCGCCAAGCGA
ABCD : TAAAGCAGTTGCAAAATATGACTATACCCGTGGATTTAAATTCTCAACTTATGCAACCTGCTGATCCGCCAAGCGA
      TAAAGCAGTTGCAAAATATGACTATACCCGTGGATTTAAATTCTCAACTTATGCAACCTGCTGATCCGCCAAGCGA

```

**FIGURA 4.4 Gene *rpoD* com os três códons TGA substituídos ( $\sigma$ ABCD).**

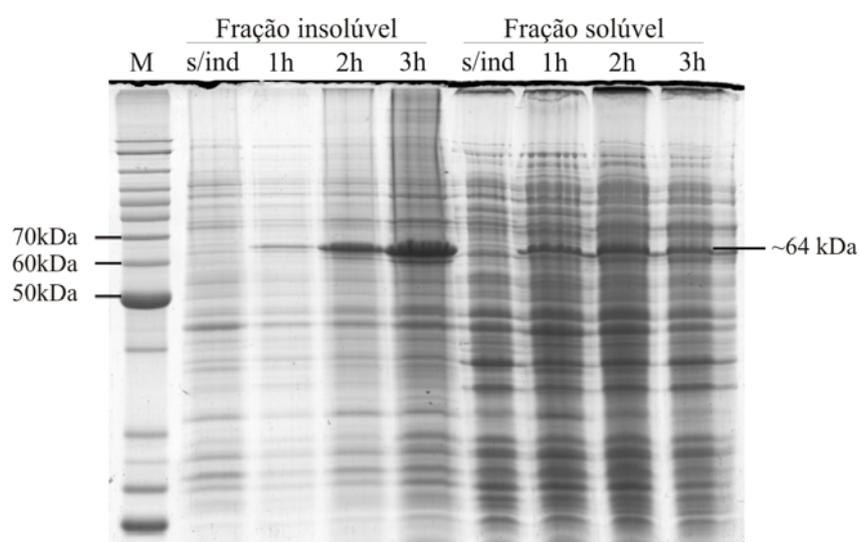
O plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABCD foi seqüenciado mostrando conter o gene *rpoD* completo, contendo as três mutações. A figura mostra o alinhamento dos segmentos 156-231 e 848-925 entre o gene *rpoD* selvagem e o consenso gerado a partir do seqüenciamento de  $\sigma$ ABCD (*rpoD* mutado). *rpoD* – gene *rpoD* selvagem; ABCD – gene *rpoD* contendo as 3 mutações A→G; em vermelho – códons mutados.

#### 4.4 Expressão do fator $\sigma$ recombinante

Para expressar o fator  $\sigma$  em *E. coli*, o fragmento  $\sigma$ ABCD, obtido através da clivagem de pUC18 $\sigma$ ABCD com XhoI e NcoI foi purificado e ligado ao vetor de expressão

pET23a-d(+). Esta clonagem gerou o plasmídeo pET $\sigma$ ABCD. A expressão do fator  $\sigma$  foi realizada na cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com pET $\sigma$ ABCD.

A indução do gene clonado pôde ser observada após 1 hora de indução com 1 mM IPTG. O experimento de SDS-PAGE demonstrou que a proteína heteróloga está na fração insolúvel do extrato protéico, e que diferentemente dos 58 kDa estimados para o fator  $\sigma$  fusionado à calda de polihistidina, a proteína expressada apresentou massa molecular de aproximadamente 64 kDa [FIG. 4.5].



**FIGURA 4.5** Expressão do fator  $\sigma$  recombinante.

A expressão do fator  $\sigma$  foi induzida com a adição de 1mM de IPTG durante 3 horas. Foram coletadas amostras de 1ml, antes e após a indução. Gel de SDS-PAGE 12,5% / coomassie coloidal blue G250 mostrando a provável indução do fator  $\sigma$ . M – marcador de massa molecular; s/ ind – antes da indução; 1h – após 1 hora de indução; 2h – após 2 horas de indução; 3h – após 3 horas de indução.

## 5. DISCUSSÃO

Com a conclusão do seqüenciamento do genoma de várias espécies de *Mycoplasma*, tem crescido o interesse pela identificação das seqüências envolvidas no início da transcrição, pois estas são fundamentais para a compreensão dos mecanismos que regulam a expressão gênica destes microrganismos. Entretanto, o estudo das regiões promotoras de micoplasmas é dificultoso, uma vez que as atuais ferramentas de bioinformática têm sido ineficientes em fazer a predição, e que são escassas as metodologias que possibilitam a caracterização experimental.

Diferentemente de outros mollicutes como *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. capricolum* e *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae* não possui um sistema-repórter estabelecido que permita o estudo de promotores *in vivo* (DYBVG *et al.*, 2000; JANIS *et al.*, 2005; HALBEDEL & STULKE, 2006). Apesar das vantagens de se estudar seqüências controladoras no próprio organismo, existem alguns inconvenientes que prejudicam a aplicação desta prática nas espécies que compõe esta classe. Como demonstrado por Lartigue *et al.* (2003), os vetores replicativos de micoplasmas, geralmente, são espécie-específicos, podendo haver incompatibilidade com vetores portadores de origens de replicação heterólogas. Além disso, plasmídeos contendo *oriC* homólogas podem se integrar na *oriC* do cromossomo do hospedeiro através de recombinação homóloga (RENAUDIN *et al.*, 1995).

Outra dificuldade em se trabalhar com micoplasmas é a sua manipulação fastidiosa. *M. hyopneumoniae* representa um exemplo típico deste fator. Esta bactéria apresenta crescimento lento, sendo que as colônias tornam-se visíveis somente após 10 dias de incubação, quando estão com aproximadamente 0,25 a 1 mm de diâmetro (ROSS, 1999). O crescimento é feito em meio Friis, o qual é oneroso, e quando cultivado em meio sólido, os níveis de CO<sub>2</sub> devem ficar entre 5-10% (FRIIS, 1974).

O trabalho desenvolvido por Lopes (2007) teve como objetivos construir um vetor contendo a *oriC* de *M. hyopneumoniae* que fosse replicativo e estável, e estabelecer um protocolo de eletrotransformação para este organismo. O plasmídeo gerado, pOSTM, contendo *tetM* como gene-repórter, foi utilizado em experimentos de transformação. Como já era esperado para mollicutes, foi obtida baixa frequência de transformantes. Não foi possível, ainda, estabelecer transformantes estáveis, pois não apresentaram multiplicação após o segundo repique. A ocorrência de integração do plasmídeo no cromossomo, a instabilidade do vetor devido à presença em duplicata da região *oriC* ou a morte das células transformadas após um período prolongado de cultivo, podem ser explicações para a perda precoce dos transformantes (LOPES, 2007).

Tendo em vista que a análise *in silico* de promotores de micoplasmas é limitada pela falta de promotores experimentalmente caracterizados (WEINER III *et al.*, 2000; VALIATI, 2006), e que *M. hyopneumoniae* não possui um sistema de transformação estável, o estudo *in vitro* de promotores deste patógeno se apresenta como uma alternativa. Para viabilizar essa proposta, é que este trabalho tem como finalidade expressar e purificar o fator  $\sigma$  de *M. hyopneumoniae*, possibilitando assim, posteriormente, reconstituir a RNA polimerase holoenzima deste organismo, a qual poderá, então, ser utilizada em experimentos que permitam identificar os sítios de interação entre a holoenzima e o promotor.

Para fazer a clonagem e a expressão de  $\sigma$ , optou-se pela utilização do sistema pET. Este sistema permite a expressão do gene de interesse por meio da enzima T7 RNA polimerase, que atua sob o controle do promotor *lacUV5*. As cepas de *E. coli*, utilizadas neste sistema como células hospedeiras, possuem uma cópia do gene da T7 RNA polimerase, permitindo, deste modo, a transcrição do fragmento heterólogo pela indução do promotor *lacUV5* com IPTG (DUBENDORFF & STUDIER, 1991). Além da capacidade de produzir grandes quantidades da proteína alvo, outro atrativo desta metodologia é que, através dos plasmídeos da série pET-23a, é possível expressar a proteína fusionada a uma cauda de

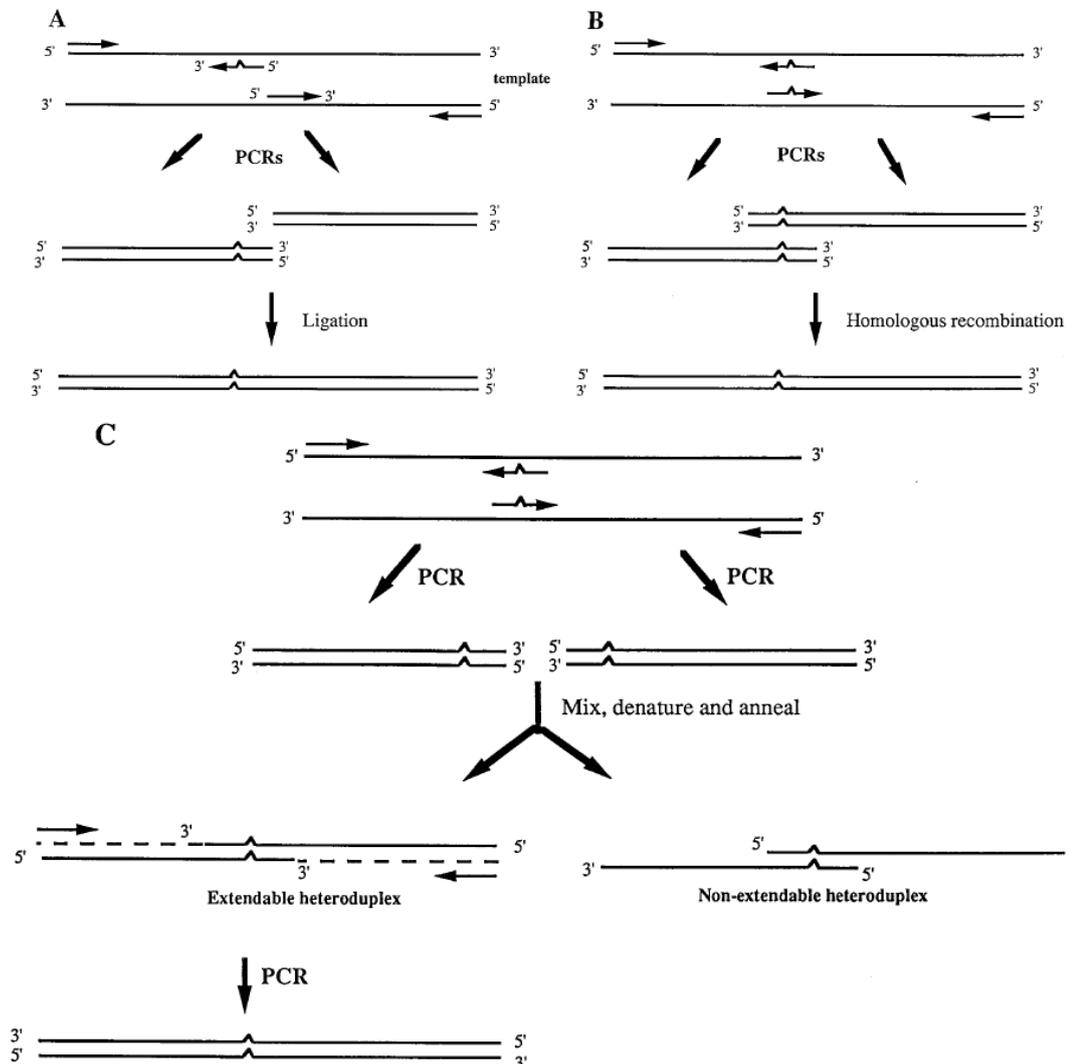
polihistidinas, o que torna mais fácil a purificação, uma vez que esta pode ser feita por cromatografia de afinidade à níquel.

A expressão heteróloga de genes de micoplasma em *E. coli* encontra também dificuldades, pois estes organismos utilizam códons genéticos diferentes. Enquanto nos micoplasmas TGA codifica triptofano, em *E. coli*, que utiliza o código genético universal, esta trinca serve como códon de parada. Desta forma, para expressar *rpoD*, gene responsável por codificar o fator  $\sigma$  em *M. hyopneumoniae*, foi preciso fazer a substituição de 3 códons TGA por 3 códons TGG, os quais codificam triptofano pelo código genético universal.

Assim como em outros trabalhos, onde os genes de micoplasmas a serem expressos também possuíam apenas alguns códons TGA (KNUDTSON *et al.*, 1997; ROSATI *et al.*, 2000; NOH *et al.*, 2002), as mutações A→G, inseridas no gene *rpoD*, também foram feitas por mutagênese sítio-dirigida. A metodologia de mutagênese, utilizada neste trabalho, é conhecida pelo nome de *overlap extension* PCR. Por meio desta técnica, foram gerados quatro fragmentos parciais do gene *rpoD*:  $\sigma_{AB}$ ,  $\sigma_{CD}$ ,  $\sigma_{ABC}$  e  $\sigma_{BCD}$ . Estes deveriam conter as devidas substituições A→G, entretanto, apenas 63% dos fragmentos seqüenciados possuíam as mutações correspondentes. Ainda, por esta metodologia, a obtenção do fragmento final  $\sigma_{ABCD}$ , consistindo no gene *rpoD* íntegro contendo as 3 mutações, não foi possível. Esta baixa eficiência e a não obtenção de  $\sigma_{ABCD}$ , concordam com o observado por Ho *et. al.* (1989), onde discutem que o rendimento desta técnica de mutagênese sítio-dirigida cai drasticamente quando o fragmento de DNA mutado a ser gerado é maior de 600 pb.

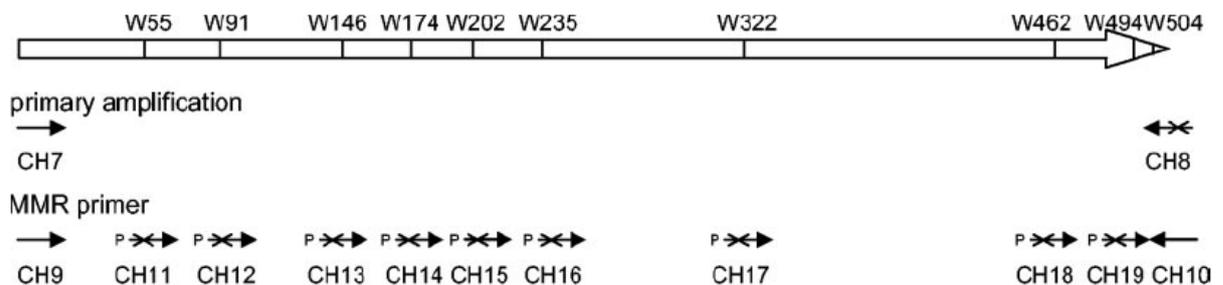
A introdução de mutações sítio-específicas no meio dos genes pode ser feita, basicamente, por 3 métodos, os quais diferem entre si apenas pela maneira de obter o produto final. Em todos, incluindo *overlap extension* PCR, a primeira etapa consiste na amplificação do gene em fragmentos parciais, quando são inseridas as mutações através da utilização de *primers* mutagênicos. Os fragmentos parciais gerados, contendo as alterações, correspondem a diferentes segmentos do gene, que então devem ser unidos para dar origem ao gene

completo e mutado. Esta segunda etapa pode ser feita de diferentes formas de acordo com a metodologia empregada. *overlap extension* PCR permite a fusão dos fragmentos através do anelamento de extremidades 3' comuns entre eles, seguida de extensão e PCR [FIG. 5.1 C]. Nas outras duas metodologias esta união pode ser feita através da ligação dos fragmentos [FIG. 5.1 A], ou *in vivo* por meio de recombinação [FIG. 5.1 B].



**FIGURA 5.1 Metodologias utilizadas para inserir mutações presentes no meio de um fragmento de DNA.** [A] Introdução de mutações pela ligação *in vitro* de dois produtos de PCR. Dois PCRs são feitos separadamente para obter duas metades de um gene completo. Os produtos de PCR resultantes são, depois, ligados para formar o gene completo carregando as mutações que foram inseridas pelos *primers*. [B] Introdução de mutações por recombinação homóloga *in vivo*. Dois PCRs são feitos para gerar dois fragmentos que possuem seqüências de sobreposição que foram introduzidas por dois *primers*. As extremidades que não possuem sobreposição são ligadas a um vetor e transformadas em bactérias. Como resultado da recombinação homóloga *in vivo* da bactéria, uma das duas seqüências de sobreposição é removida e os dois fragmentos são unidos. [C] Introdução de mutações *in vitro* por *overlap extension* PCR. Dois PCRs são feitos para produzir dois fragmentos que possuem seqüências sobrepostas. Estes dois fragmentos são, então, misturados, desnaturados e anelados para obter fragmentos mutantes em PCR posterior. Modificado de Ling & Robinson, 1997.

Recentemente, Hames *et al.* (2005), desenvolveram uma técnica aparentemente promissora, tendo conseguido inserir 9 mutações A→G no gene *glpK* de *M. pneumoniae* em uma única PCR [Fig. 5.2]. MMR (*multiple mutation reaction*) tem como princípio o uso de *primers* mutagênicos que hibridizam mais fortemente ao DNA molde do que os *primers* externos. Os *primers* mutagênicos são fosforilados na suas extremidades 5', o que permite que sejam ligados, pela ação de uma DNA ligase termoestável, aos grupos 3' OH dos *primers* anelados à montante. A mutagênese sítio-dirigida de *rpoD* através desta metodologia está sendo testada em nosso laboratório, porém os resultados ainda são preliminares.



**FIGURA 5.2** Estratégia utilizada na amplificação e mutagênese do gene *glpK* de *M. pneumoniae*.

As posições dos códons TGA presentes no gene *glpK* selvagem, e as posições e orientações dos *primers* externos e mutagênicos são mostradas. O sítio de anelamento de cada oligonucleotídeo está indicado por setas. Oligonucleotídeos que portam as mutações A→G estão indicados como setas cruzadas. Modificado de Hames *et al.*, 2005.

Como não foi possível gerar o fragmento  $\sigma$ ABCD através da técnica de *overlap extension* PCR, outra alternativa teve de ser utilizada. A ligação simultânea dos fragmentos SacI-5'- $\sigma$ ABC-3'-SacII e SacII-5'- $\sigma$ CD-3'-KpnI – obtidos a partir da clivagem dos plasmídeos pUC18 $\sigma$ ABC e pUC18 $\sigma$ CD –, ao vetor de clonagem pUC18, originou o plasmídeo pUC18 $\sigma$ ABCD. Essa ligação concomitante de três fragmentos de DNA teve uma eficiência de clonagem de 86%, resultado que pode ser atribuído à escolha das enzimas de restrição, as quais, por gerarem extremidades coesivas e não compatíveis, possibilitaram a clonagem direcionada. Conforme o esperado, devido à utilização dos fragmentos  $\sigma$ ABC e  $\sigma$ CD cujas

alterações A→G já haviam sido confirmadas, todos os clones pUC18 $\sigma$ ABCD seqüenciados apresentaram as três substituições.

Células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformadas com o plasmídeo recombinante pET $\sigma$ ABCD, após 1 hora de indução com 1 mM de IPTG, passaram a expressar uma proteína com 64 kDa. Este valor de massa molecular, observado no gel SDS-PAGE, difere dos 58 kDa estimados para o fator  $\sigma$  de *M. hyopneumoniae* fusionado à cauda de polihistidina. No entanto, este resultado é consistente com o fato de que os fatores  $\sigma$  fazem parte de um grupo de proteínas que apresentam migração anormal em géis de SDS-PAGE, apresentando menor mobilidade do que prevê sua massa molecular (BURTON *et al.*, 1981; LIU & MATSUMURA, 1995; FUJITA *et al.*, 2000).

Ainda, a proteína expressa mostrou estar em bem maior concentração na fração insolúvel. A superprodução de proteínas heterólogas no citoplasma de *E. coli* freqüentemente resulta na formação de corpos de inclusão compostos por agregados insolúveis da proteína expressa (SINGH & PANDA, 2005). Em alguns casos, proteínas presentes nos corpos de inclusão podem ser usadas diretamente na preparação de anticorpos contra a proteína alvo, porém, em situações onde a atividade biológica é necessária, não podem ser aplicadas por estarem na forma inativa. Entretanto, as proteínas presentes em corpos de inclusão podem ser solubilizadas. Em geral, isso é feito através do uso de altas concentrações de reagentes caotrópicos (VALLEJO & RINAS, 2004), o que resulta na perda da estrutura secundária, uma das principais razões da ausência de recuperação de proteínas bioativas (DILL & SHORTLE, 1991). Portanto, metodologias de solubilização mais brandas, contendo baixas concentrações de agentes caotrópicos deverão ser testadas para obtenção do fator  $\sigma$  na sua forma ativa.

O fator  $\sigma$ , uma vez purificado, será utilizado para reconstituir a RNA polimerase holoenzima. Diferentemente de  $\sigma$ , as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\beta'$ , que compõem o núcleo da holoenzima, não serão obtidas pela mesma estratégia empregada neste trabalho, pois apesar do gene *rpoA* possuir apenas 999 pb e nenhum códon TGA a ser mutado, *rpoB* e *rpoC*

possuem, respectivamente, 3663 pb contendo 5 TGAs e 4239 pb contendo 7 TGAs. Para este isolamento, pretende-se utilizar metodologias que apliquem etapas de precipitação e cromatografias de troca iônica, de acordo com o descrito na literatura (*e.g.* FUJITA *et al.*, 2000; MANI *et al.*, 2006). Além disso, outra possibilidade a ser estudada é utilização da metodologia de *pull down*, que serviria como uma cromatografia de afinidade, onde  $\sigma$  estaria na fase estacionária, atuando como ligante para RNA polimerase. No entanto, se não for possível a purificação do fator  $\sigma$  na sua forma solúvel a partir dos corpos de inclusão, outras condições de expressão serão testadas, ou, ainda, essa subunidade deverá ser purificada juntamente com o núcleo da RNA polimerase.

## 6. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W., & LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17): 3389-3402, 1997

BAR-NAHUM, G. & NUDLER, E. Isolation and characterization of  $\sigma(70)$ -retaining transcription elongation complexes from *Escherichia coli*. *Cell*, 106(4): 443-451, 2001.

BASEMAN, J. B.; LANGE, M.; CRISCIMAGNA, N. L.; GIRON, J. A. & THOMAS, C. A. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb.Pathog.*, 19(2): 105-116, 1995.

BASEMAN, J. B. & TULLY, J. G. *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg.Infect.Dis.*, 3(1): 21-32, 1997.

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDENO-TARRAGA, A. M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUANG, C. H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. & HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885): 141-147, 2002.

BERGHOFER-HOCHHEIMER, Y.; LU, C. Z. & GROSS, C. A. Altering the interaction between  $\sigma 70$  and RNA polymerase generates complexes with distinct transcription-elongation properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102(4): 1157-1162, 2005.

BHUGRA, B.; VOELKER, L. L.; ZOU, N.; YU, H. & DYBVIG, K. Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. *Mol.Microbiol.*, 18(4): 703-714, 1995.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G., III; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B. & SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331): 1453-1474, 1997.

BORUKHOV, S. & SEVERINOV, K. Role of the RNA polymerase  $\sigma$  subunit in transcription initiation. *Res.Microbiol.*, 153(9): 557-562, 2002.

- BOVE, J. M. Molecular features of mollicutes. *Clin.Infect.Dis.*, 17 Suppl 1: S10-S31, 1993.
- BROWNING, D. F. & BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat.Rev.Microbiol.*, 2(1): 57-65, 2004.
- BURGESS, R. R.; TRAVERS, A. A.; DUNN, J. J. & BAUTZ, E. K. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221(5175): 43-46, 1969.
- BURTON, Z.; BURGESS, R. R.; LIN, J.; MOORE, D.; HOLDER, S. & GROSS, C. A. The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase  $\sigma$  subunit from *E coli* K12. *Nucleic Acids Res.*, 9(12): 2889-2903, 1981.
- CIPRIAN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TORTORA, J.; COLMENARES, G.; LOPEZ-REVILLA, R. & DE LA, G. M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can.J.Vet.Res.*, 52(4): 434-438, 1988.
- DARST, S. A. Bacterial RNA polymerase. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 11(2): 155-162, 2001.
- DEBEY, M. C. & ROSS, R. F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect.Immun.*, 62(12): 5312-5318, 1994.
- DHANDAYUTHAPANI, S.; RASMUSSEN, W. G. & BASEMAN, J. B. Identification of mycoplasmal promoters in *Escherichia coli* using a promoter probe vector with Green Fluorescent Protein as reporter system. *Gene*, 215(1): 213-222, 1998.
- DILL, K. A. & SHORTLE, D. Denatured states of proteins. *Annu.Rev.Biochem.*, 60: 795-825, 1991.
- DJORDJEVIC, S. P.; CORDWELL, S. J.; DJORDJEVIC, M. A.; WILTON, J. & MINION, F. C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect.Immun.*, 72(5): 2791-2802, 2004.
- DUBENDORFF, J. W. & STUDIER, F. W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J.Mol.Biol.*, 219(1): 45-59, 1991.
- DYBVIG, K. & VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu.Rev.Microbiol.*, 50: 25-57, 1996.

DYBVIG, K.; FRENCH, C. T. & VOELKER, L. L. Construction and use of derivatives of transposon Tn4001 that function in *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis*. J.Bacteriol., 182(15): 4343-4347, 2000.

FINCH, L. R. & MITCHELL, A. Sources of nucleotides In: J.Maniloff; R.N.McElhaney; L.R.Finch & J.B.Baseman, editors. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol., 1992. p. 211-230.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERLAVAGE, A. R.; SUTTON, G.; KELLEY, J. M.; FRITCHMAN, R. D.; WEIDMAN, J. F.; SMALL, K. V.; SANDUSKY, M.; FUHRMANN, J.; NGUYEN, D.; UTTERBACK, T. R.; SAUDEK, D. M.; PHILLIPS, C. A.; MERRICK, J. M.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; BOTT, K. F.; HU, P. C.; LUCIER, T. S.; PETERSON, S. N.; SMITH, H. O.; HUTCHISON, C. A., III & VENTER, J. C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. Science, 270(5235): 397-403, 1995.

FRIIS, N. F. *Mycoplasmas in pigs, with a special regard to the respiratory tract.*, Univ. Royal Vet. and Agricult., Copenhagen, 1974.

FRIIS, N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. Nord.Vet.Med., 27(6): 337-339, 1975.

FUJITA, M.; SAGARA, Y. & ARAMAKI, H. In vitro transcription system using reconstituted RNA polymerase ( $E\sigma(70)$ ,  $E\sigma(H)$ ,  $E\sigma(E)$  and  $E\sigma(S)$ ) of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol.Lett., 183(2): 253-257, 2000.

GAFNY, R.; HYMAN, H. C.; RAZIN, S. & GLASER, G. Promoters of *Mycoplasma capricolum* ribosomal RNA operons: identical activities but different regulation in homologous and heterologous cells. Nucleic Acids Res., 16(1): 61-76, 1988.

GIL, R.; SILVA, F. J.; PERETO, J. & MOYA, A. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. Microbiol.Mol.Biol.Rev., 68(3): 518-537, 2004.

GLEW, M. D.; BASEGGIO, N.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F. & WALKER, I. D. Expression of the pMGA genes of *Mycoplasma gallisepticum* is controlled by variation in the GAA trinucleotide repeat lengths within the 5' noncoding regions. Infect.Immun., 66(12): 5833-5841, 1998.

GROSS, C. A.; CHAN, C.; DOMBROSKI, A.; GRUBER, T.; SHARP, M.; TUPY, J. & YOUNG, B. The functional and regulatory roles of  $\sigma$  factors in transcription. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol., 63: 141-155, 1998.

HALBEDEL, S. & STULKE, J. Probing in vivo promoter activities in *Mycoplasma pneumoniae*: a system for generation of single-copy reporter constructs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2): 1696-1699, 2006.

HALBEDEL, S.; EILERS, H.; JONAS, B.; BUSSE, J.; HECKER, M.; ENGELMANN, S. & STULKE, J. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*: Analysis of the Promoters of the *ackA* and *ldh* Genes. *J. Mol. Biol.*, 2007.

HAMES, C.; HALBEDEL, S.; SCHILLING, O. & STULKE, J. Multiple-mutation reaction: a method for simultaneous introduction of multiple mutations into the *glpK* gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7): 4097-4100, 2005.

HAMPSEY, M. Omega meets its match. *Trends Genet.*, 17: 190-191, 2001.

HAMPSHIRE, A. J.; RUSLING, D. A.; BROUGHTON-HEAD, V. J. & FOX, K. R. Footprinting: a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods*, 42(2): 128-140, 2007.

HERTZ, G. Z. & STORMO, G. D. *Escherichia coli* promoter sequences: analysis and prediction. *Methods Enzymol.*, 273: 30-42, 1996.

HO, S. N.; HUNT, H. D.; HORTON, R. M.; PULLEN, J. K. & PEASE, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1): 51-59, 1989.

HOOK-BARNARD, I.; JOHNSON, X. B. & HINTON, D. M. *Escherichia coli* RNA polymerase recognition of a  $\sigma 70$ -dependent promoter requiring a -35 DNA element and an extended -10 TGn motif. *J. Bacteriol.*, 188(24): 8352-8359, 2006.

HYMAN, H. C.; GAFNY, R.; GLASER, G. & RAZIN, S. Promoter of the *Mycoplasma pneumoniae* rRNA operon. *J. Bacteriol.*, 170(7): 3262-3268, 1988.

JANIS, C.; LARTIGUE, C.; FREY, J.; WROBLEWSKI, H.; THIAUCOURT, F.; BLANCHARD, A. & SIRAND-PUGNET, P. Versatile use of *oriC* plasmids for functional genomics of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6): 2888-2893, 2005.

JUKES, T. H.; OSAWA, S.; MUTO, A. & LEHMAN, N. Evolution of anticodons: variations in the genetic code. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 52: 769-776, 1987.

KANNAN, T. R. & BASEMAN, J. B. Expression of UGA-containing *Mycoplasma* genes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 182(9): 2664-2667, 2000.

KAPANIDIS, A. N.; MARGEAT, E.; LAURENCE, T. A.; DOOSE, S.; HO, S. O.; MUKHOPADHYAY, J.; KORTKHONJIA, E.; MEKLER, V.; EBRIGHT, R. H. & WEISS, S. Retention of transcription initiation factor  $\sigma 70$  in transcription elongation: single-molecule analysis. *Mol.Cell*, 20(3): 347-356, 2005.

KIM, K. B. & SIM, J. S. Computational detection of prokaryotic core promoters in genomic sequences. *J.Microbiol.*, 43(5): 411-416, 2005.

KNUDTSON, K. L. & MINION, F. C. Use of lac gene fusions in the analysis of *Acholeplasma* upstream gene regulatory sequences. *J.Bacteriol.*, 176(9): 2763-2766, 1994.

KNUDTSON, K. L.; MANOHAR, M.; JOYNER, D. E.; AHMED, E. A. & COLE, B. C. Expression of the superantigen *Mycoplasma arthritidis* mitogen in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant protein. *Infect.Immun.*, 65(12): 4965-4971, 1997.

KORZHEVA, N.; MUSTAEV, A.; KOZLOV, M.; MALHOTRA, A.; NIKIFOROV, V.; GOLDFARB, A. & DARST, S. A. A structural model of transcription elongation. *Science*, 289(5479): 619-625, 2000.

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A. M.; ALLONI, G.; AZEVEDO, V.; BERTERO, M. G.; BESSIERES, P.; BOLOTIN, A.; BORCHERT, S.; BORRISS, R.; BOURSIER, L.; BRANS, A.; BRAUN, M.; BRIGNELL, S. C.; BRON, S.; BROUILLET, S.; BRUSCHI, C. V.; CALDWELL, B.; CAPUANO, V.; CARTER, N. M.; CHOI, S. K.; CODANI, J. J.; CONNERTON, I. F.; DANCHIN, A. & . The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657): 249-256, 1997.

LANE, D.; PRENTKI, P. & CHANDLER, M. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol.Rev.*, 56(4): 509-528, 1992.

LARTIGUE, C.; BLANCHARD, A.; RENAUDIN, J.; THIAUCOURT, F. & SIRAND-PUGNET, P. Host specificity of mollicutes *oriC* plasmids: functional analysis of replication origin. *Nucleic Acids Res.*, 31(22): 6610-6618, 2003.

LING, M. M. & ROBINSON, B. H. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal.Biochem.*, 254(2): 157-178, 1997.

LIU, X. & MATSUMURA, P. An alternative  $\sigma$  factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. *Gene*, 164(1): 81-84, 1995.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; KOTANI, H.; PIERCE, P. F.; WEAR, D. J.; NEWTON, P. B., III; TULLY, J. G. & SHIH, J. W. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by

mycoplasma penetrans: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. Mod.Pathol., 6(3): 276-280, 1993.

LOPES, B. M. T. Construção de vetor *oriC* de *Mycoplasma hyopneumoniae* - uma ferramenta para estudos genéticos do agente da Pneumonia Enzoótica Suína. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Mycoplasma*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycoplasma.html>>. Acesso em: 12/9/2007

MACINO, G.; CORUZZI, G.; NOBREGA, F. G.; LI, M. & TZAGOLOFF, A. Use of the UGA terminator as a tryptophan codon in yeast mitochondria. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 76(8): 3784-3785, 1979.

MANI, N.; DUPUY, B. & SONENSHEIN, A. L. Isolation of RNA polymerase from *Clostridium difficile* and characterization of glutamate dehydrogenase and rRNA gene promoters in vitro and in vivo. J.Bacteriol., 188(1): 96-102, 2006.

MANOLUKAS, J. T.; BARILE, M. F.; CHANDLER, D. K. & POLLACK, J. D. Presence of anaplerotic reactions and transamination, and the absence of the tricarboxylic acid cycle in mollicutes. J.Gen.Microbiol., 134(3): 791-800, 1988.

MILLER, J. H. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.

MINION, F. C.; LEFKOWITZ, E. J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M. & MAHAIRAS, G. G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. J.Bacteriol., 186(21): 7123-7133, 2004.

MITTENHUBER, G. An inventory of genes encoding RNA polymerase  $\sigma$  factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. J.Mol.Microbiol.Biotechnol., 4(1): 77-91, 2002.

MOONEY, R. A.; DARST, S. A. & LANDICK, R.  $\Sigma$  and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? Mol.Cell, 20(3): 335-345, 2005.

MUKHOPADHYAY, J.; KAPANIDIS, A. N.; MEKLER, V.; KORTKHONJIA, E.; EBRIGHT, Y. W. & EBRIGHT, R. H. Translocation of  $\sigma(70)$  with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. Cell, 106(4): 453-463, 2001.

MUSATOVOVA, O.; DHANDAYUTHAPANI, S. & BASEMAN, J. B. Transcriptional starts for cytoadherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. FEMS Microbiol.Lett., 229(1): 73-81, 2003.

MUTO, A. & OSAWA, S. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 84(1): 166-169, 1987.

National Center of Biotechnology Information. Complete Bacteria Taxonomy / List. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub.html>>. Acesso em: 17/9/2007

NEUHOFF V., STAMM R. & EIBL H. Electrophoresis 6, 427-448, 1985.

NOH, E. J.; KANG, S. W.; SHIN, Y. J.; KIM, D. C.; PARK, I. S.; KIM, M. Y.; CHUN, B. G. & MIN, B. H. Characterization of mycoplasma arginine deiminase expressed in *E. coli* and its inhibitory regulation of nitric oxide synthesis. Mol.Cells, 13(1): 137-143, 2002.

NOORMOHAMMADI, A. H.; MARKHAM, P. F.; KANCI, A.; WHITHEAR, K. G. & BROWNING, G. F. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. Mol.Microbiol., 35(4): 911-923, 2000.

OSAWA, S.; JUKES, T. H.; WATANABE, K. & MUTO, A. Recent evidence for evolution of the genetic code. Microbiol.Rev., 56(1): 229-264, 1992.

PELCHAT, M. & PERREAULT, J. P. Binding site of *Escherichia coli* RNA polymerase to an RNA promoter. Biochem.Biophys.Res.Comm., 319(2): 636-642, 2004.

PITCHER, D. G. & NICHOLAS, R. A. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? Vet.J., 170(3): 300-306, 2005.

POLLACK, J. D. Carbohydrate metabolism and energy conservation In: J.Maniloff; R.N.McElhaney; L.R.Finch & J.B.Baseman, editors. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol., 1992. p. 181-200.

RAZIN, S. Mycoplasma taxonomy and ecology In: J.Maniloff; R.N.McElhaney; L.R.Finch & J.B.Baseman, editors. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992. p. 3-22.

RAZIN, S.; YOGEV, D. & NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol.Mol.Biol.Rev., 62(4): 1094-1156, 1998.

RAZIN, S. The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes) In: Dworkin, M; Falkow, S; Rosenberg, E; Schleifer, K & Stackbrandt, E, editors. The Prokaryotes. New York: Springer, 2006. p. 836-904.

RENAUDIN, J.; MARAIS, A.; VERDIN, E.; DURET, S.; FOISSAC, X.; LAIGRET, F. & BOVE, J. M. Integrative and free *Spiroplasma citri oriC* plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*. J.Bacteriol., 177(10): 2870-2877, 1995.

REOLON, L. A. Caracterização funcional de promotores de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Monografia (Título de Biomédico) - Faculdade de Biomedicina, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

ROBINO, P.; ALBERTI, A.; PITTAU, M.; CHESSA, B.; MICILETTA, M.; NEBBIA, P.; LE, G. D. & ROSATI, S. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. Vet.Microbiol., 109(3-4): 201-209, 2005.

ROSATI, S.; ROBINO, P.; FADDA, M.; POZZI, S.; MANNELLI, A. & PITTAU, M. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. Vet.Microbiol., 71(3-4): 201-210, 2000.

ROSS, R. F. Mycoplasmal diseases In: Straw & B., editors. Disease of swine. Iowa: Iowa State University, 1999. p. 495-509.

ROTTEM, S. & YOGEV, D. Mycoplasma interaction with eukaryotic cells. Subcell.Biochem., 33199-227, 2000.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SASAKI, Y.; ISHIKAWA, J.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; KENRI, T.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; HORINO, A.; SHIBA, T.; SASAKI, T. & HATTORI, M. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. Nucleic Acids Res., 30(23): 5293-5300, 2002.

SINGH, S. M. & PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J.Biosci.Bioeng., 99(4): 303-310, 2005.

SMILEY, B. K. & MINION, F. C. Enhanced readthrough of opal (UGA) stop codons and production of *Mycoplasma pneumoniae* P1 epitopes in *Escherichia coli*. Gene, 134(1): 33-40, 1993.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; CARVALHO, L. F. & OLIVEIRA, S. J. Clínica e Patologia Suína. Goiânia: Art 3 impressos especiais, 1999.

STAMBURSKI, C.; RENAUDIN, J. & BOVE, J. M. First step toward a virus-derived vector for gene cloning and expression in spiroplasmas, organisms which read UGA as a tryptophan codon: synthesis of chloramphenicol acetyltransferase in *Spiroplasma citri*. J.Bacteriol., 173(7): 2225-2230, 1991.

THACKER, E. L. Mycoplasmal disease In: Straw, B. E.; Zimmermann, J. J.; D'Allaire, S. & Taylor, D. J, editors. Diseases of Swine. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 701-717.

VALIATI, J. Redes neurais aplicadas ao reconhecimento de regiões promotoras na família Mycoplasmataceae. Tese (Doutorado em Ciência da Computação) - Programa de Pós-Graduação em Computação, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

VALLEJO, L. F. & RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. Microb.Cell Fact., 3(1): 11-2004.

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.; VES-FILHO, L.; ASSUNCAO, E. N.; AZEVEDO, V. A.; BOGO, M. R.; BRIGIDO, M. M.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, S. S.; CAREPO, M. S.; CARRARO, D. M.; DE MATTOS CASCARDO, J. C.; CASTRO, L. A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R. G.; CUNHA, C. W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M. S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G. R.; FREITAS, N. S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T. B.; GRISARD, E. C.; GUIMARAES, C. T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S. N.; KRIEGER, M. A.; LAURINO, J. P.; LIMA, L. F.; LOPES, M. I.; LORETO, E. L.; MADEIRA, H. M.; MANFIO, G. P.; MARANHAO, A. Q.; MARTINKOVICS, C. T.; MEDEIROS, S. R.; MOREIRA, M. A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C. E.; NICOLAS, M. F.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXAO, R. F.; PEDROSA, F. O.; PENA, S. D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L. S.; POTRICH, D. P.; SALIM, A. C.; SANTOS, F. R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M. P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S.; SCHUCK, A. F.; SEUANEZ, H. N.; SILVA, D. W.; SILVA, R.; SILVA, S. C.; SOARES, C. M.; SOUZA, K. R.; SOUZA, R. C.; STAATS, C. C.; STEFFENS, M. B.; TEIXEIRA, S. M.; URMENYI, T. P.; VAINSTEIN, M. H.; ZUCCHERATO, L. W.; SIMPSON, A. J. & ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. J.Bacteriol., 187(16): 5568-5577, 2005.

WALDO III, R. H.; POPHAM, P. L.; ROMERO-ARROYO, C. E.; MOTHERSHED, E. A.; LEE, K. K. & KRAUSE, D. C. Transcriptional analysis of the hmw gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. J.Bacteriol., 181(16): 4978-4985, 1999.

WEINER III, J.; HERRMANN, R. & BROWNING, G. F. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res., 28(22): 4488-4496, 2000.

WILSON, M. J. & LAMONT, I. L. Mutational analysis of an extracytoplasmic-function  $\sigma$  factor to investigate its interactions with RNA polymerase and DNA. *J.Bacteriol.*, 188(5): 1935-1942, 2006.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol.Rev.*, 51(2): 221-271, 1987.

WOLF, M.; MULLER, T.; DANDEKAR, T. & POLLACK, J. D. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 54(Pt 3): 871-875, 2004.

WOSTEN, M. M. Eubacterial  $\sigma$ -factors. *FEMS Microbiol.Rev.*, 22(3): 127-150, 1998.

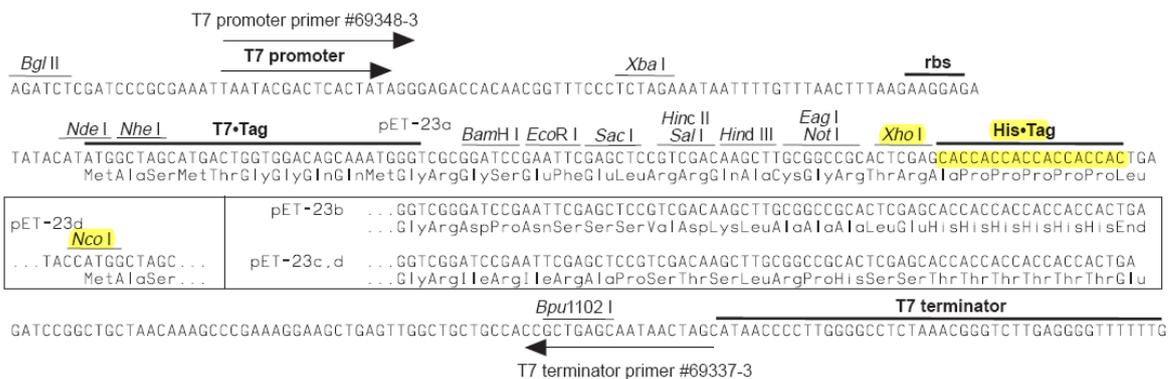
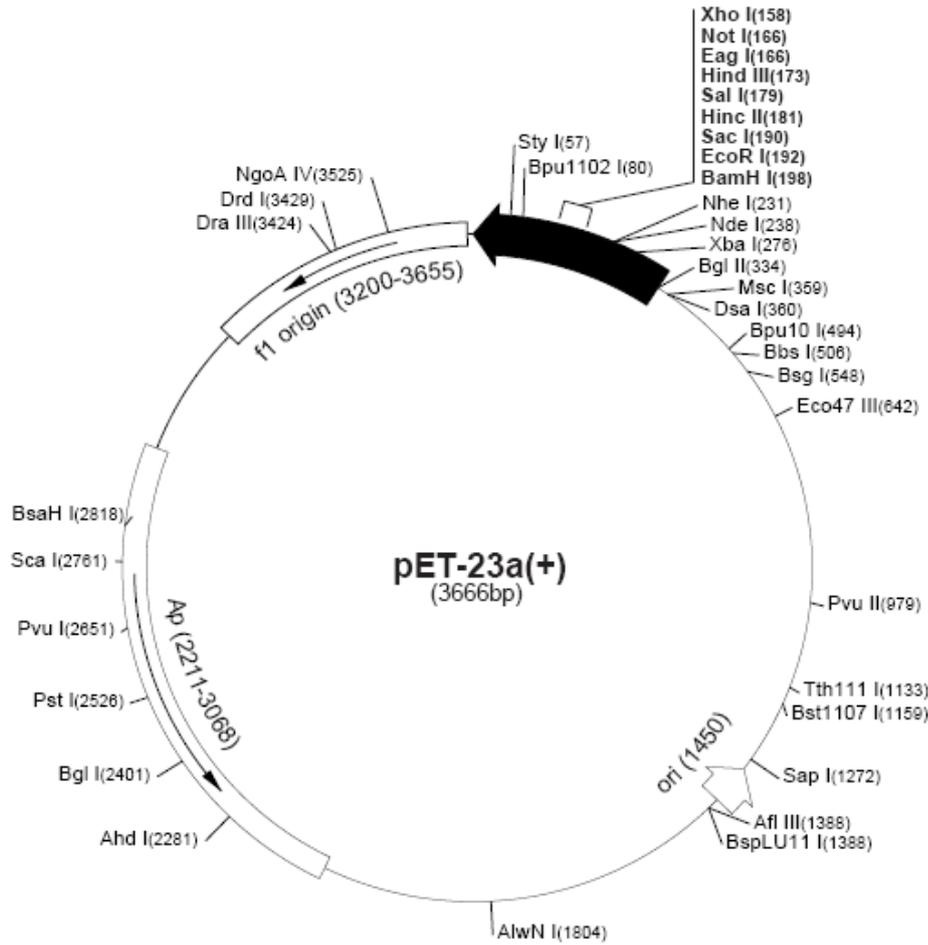
YAMAO, F.; MUTO, A.; KAWAUCHI, Y.; IWAMI, M.; IWAGAMI, S.; AZUMI, Y. & OSAWA, S. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 82(8): 2306-2309, 1985.

YOGEV, D.; ROSENGARTEN, R.; WATSON-MCKOWN, R. & WISE, K. S. Molecular basis of *Mycoplasma* surface antigenic variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding regions and 5' regulatory sequences. *EMBO J.*, 10(13): 4069-4079, 1991.

ZIELINSKI, G. C.; YOUNG, T.; ROSS, R. F. & ROSENBUSCH, R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers. *Am.J.Vet.Res.*, 51(3): 339-343, 1990.

## 7. ANEXOS

### 7.1 Mapa do vetor de expressão pET-23a-d(+)



pET-23a-d(+) cloning/expression region

## 7.2 Protocolo de Extração de DNA genômico de *M. hyopneumoniae*

0. Centrifugar 5 ml de cultura por 30 min a 3360 g
1. Ressuspender as células em 1 mL de tampão TE;
2. Homogeneizar em Vórtex;
3. Dividir em 2 tubos grandes (1,7 ou 2,0 mL);
4. Adicionar para cada tubo:
  - 15µL SDS 10%;
  - 1,5µL proteinase K (20m/mL);
5. Misturar invertendo gentilmente o tubo;
6. Incubar por 1h a 37°C;
7. Adicionar:
  - 100 µL NaCl 5M;
  - 80 µL de CTAB 1%;
8. Incubar 10 min à 65°C;
9. Adicionar 1 vol. de fenol:clorofórmio
10. Inverter gentilmente o tubo;
11. Centrifugar 5 min 13.000 rpm;
12. Transferir o sobrenadante para outro tubo;
13. Adicionar 800µL de clorofórmio;
10. Inverter gentilmente o tubo;
11. Centrifugar 5 min 13.000 rpm;
12. Transferir o sobrenadante para outro tubo;
13. Adicionar 600 µL de isopropanol gelado, misturar invertendo gentilmente o tubo;
14. Deixar a -20°C por pelo menos overnight ou 1h à -80°C;
15. Centrifugar 13.000 rpm, 5 min;
16. Lavar com etanol 70% gelado; (Adicionar 500µL de etanol 70% sem agitar e centrifugar a 13.000rpm por 2 min; depois descartar cuidadosamente o sobrenadante e adicionar mais 500µL de Etanol 70%) Repetir 2X;
17. Secar (pode ser em estufa até 37°C);
18. Ressuspender o pellet em 10-30 µL de água autoclavada e colocar na geladeira por 3hs;
19. Adicionar 3µL de RNase (10 mg/ml) e incubar a 37°C por 1h
20. Checar 10% do volume em gel de agarose 0,8% - 60V

### 7.3 Sequência de nucleotídeos do gene *rpoD* de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448

1 ATGACAGAAA ATAAAGAACT TTTCCCCCAA AAAGAGGATT TTATTCCAAT TTCTAATATT  
61 AATCAAAAATA GTTCTGAATA TGAGTTTATT ATCGAGAAAT TAGAACAAAA ATTAGAACAA  
121 AAACACCCAAA AGATAGGAAA AAATAGCTCT AATTTAGATA ATTTTTCTAT TTTTTTAAGT  
181 CACGATGAAA TTTATAAATA TATTGAAAAG TGAAATCTTG CAATTGAAGA AGAAAACTT  
241 GATGATTTTT TTCAAACTTT AATACAAAAGA AAAATAATTG CTGACGAAGT CGATAAAGAG  
301 GATCTTGAAA ATGTTTCAAG TTTTGATTTT GCCGAGCAA TTAATAATAA AAAATCTGTT  
361 AGAGATAAAA AAAATAAAAA ATATAGTCAA GATTTTGATC AGTCACCTAAT AAACCTAGAT  
421 GATCAAAAATT TCGATATTAA TCATAACGAG GAAGATGATA ATTCTGACCT AAATCTAGGA  
481 CAATCAGTCG ATGATTCCTT AAAAAATTCAG GAAATTGACG ACCTGGATTA TATAACAGAA  
541 AATAGTCCAA ATCAATACCA CAAACCAAAA GTTTATAGTG ATGAAGTTTA CCTTAACAAA  
601 CTGACCGATA CAAGTGATAT GATAAAATGG TATATGCGTT GGATCGGAAA ATATGGAAAA  
661 CTTTTAACGG CTGAAGAAGA AAGAGAACTT GCAAAAAAAA TGAAAATCAA AGGCCGGATT  
721 GGAAAAAAG CGCGTGATAC CTTAATAAAA CGGAATTTAC GTCTGGTGGT TAACAGTGCA  
781 AAACGCTATA AAAACCGCGG TCTTGATTT ATCGATCTAA TCTCAGAGGG TAACCTCGGT  
841 ATTATTAAAG CAGTTGCAA ATATGACTAT ACCCGTGGAT TTAAATTCCTC AACTTATGCA  
901 ACCTGATGAA TCCGCCAAGC GATTACAAGG GCGGTTGCCG ACCAGGCCCG GCTCATTCGA  
961 ATTCCGGTTC ACATGGTCGA GACAATCAAT AAAATTAATA AGGTAGAAAG GGAATTACAA  
1021 CAAGAAAAAAG GACTTAATCC AACAGCCGAA GAAATTTTCAG AACGTTTAGG TGGCGAATTT  
1081 AGCCCTGATA AAATACGGTA TATTAAAAAA ATCAATATCG ATCCAATTTT ACTAGATAAA  
1141 GCAATTGGGA AAGAGGAAGA TAGTTCATTT TCTGATTTTA TCAAGGATGA GAATATGATT  
1201 TCCCAGTAG ATTATGCAAT TCGTGAGGAA AAAGCGAAAG TTTTGCTTGA AATGATCGAT  
1261 TCAACACTTG ATTATGATGA AAGAGATTTT ATCAAAGAC GTTATGGGGT CGGAACAAAC  
1321 GATGAAGGAA TTCCTTATCA GGCACATAGT TTTGAAGAGC TTGCGGCGAT GCGCCGAGTA  
1381 ACAAAAAGAGA GGGTTAGGCA AATTGAGGCA AAAATTCCTAA AAAAAATTAAG AACCCACAC  
1441 CGCCGCCTAT CATTAAGGGA TTTTAATTAA

Sublinhado: códons de terminação TGA.

## 8. CURRICULUM VITAE

### Dados Pessoais

Nome Shana de Souto Weber  
E-mail shana@cbiot.ufrgs.br

### Formação Acadêmica/Titulação

2006 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Fator  $\sigma$  de *Mycoplasma hyopneumoniae*: Mutagênese, Clonagem e Expressão  
Orientador: Irene Silveira Schrank  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2001 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Caracterização da região promotora do gene *vlhA* em diferentes isolados de *Mycoplasma synoviae*  
Orientador: Sérgio Ceroni da Silva  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

### Formação complementar

2004 - 2004 Curso de curta duração em RDA em Microorganismos.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Clonagem e expressão em bactérias gram-positivas.  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

### Atuação profissional

1. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

### Vínculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### Atividades

02/2005 - 06/2005 Projetos de pesquisa, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*Participação em projetos:*  
*Deteção de Chlamydia trachomatis em amostras de urina masculina por reação em cadeia da polimerase*

02/2005 - 07/2005 Estágio, Lacen

*Estágio:*  
*Desenvolvimento de método de deteção de Chlamydia trachomatis e Diagnóstico de Mycobacterium em amostras clínicas*

## 2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

### **Vínculo institucional**

2002 - 2006 Vínculo: Bolsista iniciação científica , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### **Atividades**

- 09/2002 - 09/2004 Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia  
*Linhas de Pesquisa:*  
*Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico de Actinobacillus pleuropneumoniae*
- 09/2002 - 04/2006 Estágio, Centro de Biotecnologia  
*Estágio:*  
*Iniciação Científica*
- 09/2002 - 09/2004 Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia  
*Participação em projetos:*  
*Clonagem e expressão do gene apxIV de Actinobacillus pleuropneumoniae*
- 11/2004 - 12/2005 Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia  
*Participação em projetos:*  
*Análise da região controladora do gene vIha de Mycoplasma synoviae*
- 04/2005 - 12/2006 Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia  
*Participação em projetos:*  
*Resistência aos antimicrobianos e presença de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de Escherichia coli*
- 04/2006 - Atual Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia  
*Participação em projetos:*  
*Clonagem e expressão do fator  $\sigma$  de Mycoplasma hyopneumoniae em Escherichia coli*
- 04/2006 - Atual Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia  
*Participação em projetos:*  
*Caracterização funcional de promotores de Mycoplasma hyopneumoniae*

### **Linhas de pesquisa**

1. Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

## Projetos

- 2006 - Atual Clonagem e expressão do fator  $\sigma$  de *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Escherichia coli*  
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa  
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);  
Integrantes: Shana de Souto Weber; Irene Silveira Schrank (Responsável)
- 2006 - Atual Caracterização funcional de promotores de *Mycoplasma hyopneumoniae*  
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);  
Integrantes: Shana de Souto Weber; Irene Silveira Schrank (Responsável); Luciano Reolon
- 2005 - 2005 Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras de urina masculina por reação em cadeia da polimerase  
Situação: Concluído Natureza: Desenvolvimento  
Alunos envolvidos: Graduação (2); Especialização (0); Mestrado acadêmico (1); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);  
Integrantes: Shana de Souto Weber; Fernando Hayashi Sant'Anna; Daniela Becker; Alzira Resende do Carmo Aquino; Marilene Henning Vainstein (Responsável)
- 2005 - 2006 Resistência aos antimicrobianos e presença de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli*  
Situação: Concluído Natureza: Pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (4); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);  
Integrantes: Shana de Souto Weber; Mateus Matiuzzi da Costa; Irene Silveira Schrank (Responsável); Franciele Maboni; Lilian Kolling; Guilherme Drescher; Agueda Castagna de Vargas  
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq
- 2004 - 2005 Análise da região controladora do gene *vlha* de *Mycoplasma synoviae*  
Situação: Desativado Natureza: Pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);  
Integrantes: Shana de Souto Weber; Sérgio Ceroni da Silva (Responsável); Irene Silveira Schrank  
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq
- 2002 - 2004 Clonagem e expressão do gene *apxIV* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
Situação: Desativado Natureza: Desenvolvimento  
Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);  
Integrantes: Shana de Souto Weber; Mateus Matiuzzi da Costa; Sérgio Ceroni da Silva; Irene Silveira Schrank (Responsável)  
Financiador(es): Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

## Produção em C, T & A

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

★ BROETTO, L., CECAGNO, R., SANT'ANNA, F. H., WEBER, S.S., SCHRANK, I. S.

1. Stable transformation of *Chromobacterium violaceum* with a broad-host range plasmid.. Applied Microbiology and Biotechnology. , v.71, p.450 - 454, 2006.

#### Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

REOLON, L., WEBER, S.S., LOPES, B. M. T., SILVA, S. C., SCHRANK, I. S.

1. In vivo promoter activities in *Mycoplasma hyopneumoniae*: evaluation of a reporter system. In: XI Congresso Argentino de Microbiologia, 2007, Córdoba.  
**XI Congresso Argentino de Microbiologia, 2007.**

WEBER, S.S., SCHRANK, I. S., SILVA, S. C.

2. Caracterização da região promotora do gene *vlhA* em diferentes isolados de *Mycoplasma synoviae* In: 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, São Pedro - SP.  
**Resumos da 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2006. p.103 -**

REOLON, L., WEBER, S.S., SILVA, S. C., SCHRANK, I. S.

3. Caracterização funcional de promotores de *Mycoplasma hyopneumoniae* In: XVIII Salão e XV Feira de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre - RS.  
**Livro de Resumos XVIII Salão de Iniciação Científica e XV Feira de Iniciação Científica, 2006.**

WEBER, S.S., SCHRANK, I. S.

4. Clonagem e expressão do fator  $\sigma$  de *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Escherichia coli* In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre - RS.  
**Livro de Resumos PPGBCM, 2006. p.133 -**

WEBER, S.S., SCHRANK, I. S., SILVA, S. C.

5. Clonagem e expressão do fator  $\sigma$  de *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Escherichia coli* In: XVIII Salão e XIV Feira de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre - RS.  
**Livro de Resumos XVIII Salão de Iniciação Científica e XV Feira de Iniciação Científica, 2006.**

WEBER, S.S., COSTA, M. M., SILVA, M. S., MABONI, F., FERRONATTO, A. I., DRESCHER, G., VARGAS, A. C., SCHRANK, I. S.

6. Resistência aos antimicrobianos e presença de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli* In: 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, São Pedro - SP.  
**Resumos da 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2006. p.102 -**

WEBER, S.S., SCHRANK, I. S., SILVA, S. C.

7. Análise da região controladora do gene *vlhA* de *Mycoplasma synoviae* In: XVII Salão e XIV Feira de Iniciação Científica, Porto Alegre, 2005.

WEBER, S.S., SCHRANK, I. S., SILVA, S. C.

8. Análise da região controladora do gene *vlhA* de *Mycoplasma synoviae* In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, 2005.

BECKER, D., JARDIM, A. F. M., WEBER, S.S., SANT'ANNA, F. H., SANTOS, S., RIBEIRO, M. O., SCHERER, L.

9. Contribuição da PCR in house no diagnóstico da tuberculose: a experiência em rotina de um laboratório de saúde pública In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP.  
**XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia., 2005.**

- WEBER, S.S., COSTA, M. M., SILVA, S. C., SCHRANK, I. S.
10. Clonagem e expressão em *E. coli* do gene *apxIVA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* In: XXIV Reunião de Genética de Microorganismos, Gramado, 2004.
- WEBER, S.S., COSTA, M. M., SILVA, S. C., SCHRANK, I. S.
11. O gene *apxIV* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*: expressão e purificação da proteína em *E. coli* In: XVI Salão e XIII Feira de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre.  
**Livro de Resumos XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica, 2004.**
- WEBER, S.S., COSTA, M. M., SILVA, S. C., SCHRANK, I. S.
12. Clonagem e expressão do gene *apxIV* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em *E. coli*. In: XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre.
- Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo expandido)
- COSTA, M. M., SILVA, M. S., MABONI, F., WEBER, S.S., KOLLING, L., DRESCHER, G., VARGAS, A. C., SCHRANK, I. S.
1. Resistência ao antimicrobianos e presença de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli* In: XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005, Fortaleza.  
**Anais do XII congresso brasileiro da ABRAVES, 2005. v.2. p.7 - 8**