

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

**EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO  
RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae***

Dissertação de Mestrado

**Scheila Gabriele Mucha**

Porto Alegre, março de 2013.

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

**EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO  
RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae***

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.

**Scheila Gabriele Mucha**

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

Porto Alegre, março de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microrganismos Diazotróficos, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“... nada que seja valioso será fácil!”

William Douglas

## **Agradecimentos**

À professora Irene Silveira Schrank, pelo acolhimento no laboratório desde o meu período de iniciação científica e pela oportunidade de realizar esse trabalho, sendo uma orientadora muito paciente e dedicada e sempre dando boas sugestões quando surgem os problemas.

Aos demais professores do PPGBCM, por todos os ensinamentos e motivações durante o período do mestrado.

Aos colegas do laboratório 222: Fran – companheira de todo dia, sempre me atualizando das novidades; Luciano – que me ensinou as primeiras técnicas de biologia molecular; Amanda – IC meiga a quem pude transmitir meu conhecimento; e Tiago – colega de biomedicina sempre disposto a uma conversa sobre a faculdade ou futebol, agradeço pela amizade, convívio e cooperação. Também aos colegas antigos – Shana, Fernando e Ricardo –, pelos dias que o laboratório era mais movimentado e mais animado.

Aos colegas dos laboratórios 210, 217 e 220, pelo convívio diário e pelo auxílio sempre que necessário. Em especial à Veridiana, pelos protocolos de expressão de proteínas, pelas dúvidas tiradas e pelas sugestões sempre úteis.

Às minhas queridas colegas de biomedicina, pela maravilhosa amizade proporcionada, pelas experiências trocadas e pelos momentos inesquecíveis, mesmo que nos últimos tempos não tenhamos nos encontrado com frequência.

À minha amiga Bruna, por me tirar às vezes do mundo da pós-graduação e me ajudar a curtir a vida.

À minha irmã Pâmela, pelas risadas diárias, pelos gostos compartilhados, pelas indias, pelos “snacks” no fim do dia e por me aguentar todo esse tempo.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pela força para realizar esse trabalho, pela confiança, pelo conforto nos momentos de angústia e especialmente por sempre acreditarem em mim.

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

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas, símbolos e unidades</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>X</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>XI</b>
<b>Resumo</b>	<b>XII</b>
<b>Abstract</b>	<b>XIII</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>14</b>
1.1 Pneumonia Enzoótica Suína	14
1.2 O Gênero <i>Mycoplasma</i>	15
1.3 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	18
1.4 Transcrição em <i>Mycoplasma</i>	19
1.4.1 Transcrição em <i>M. hyopneumoniae</i>	23
1.5 Fatores de transcrição	25
1.5.1 Fatores de transcrição em <i>M. hyopneumoniae</i>	28
<b>2. Objetivos</b>	<b>30</b>
2.1 Objetivos gerais	30
2.2 Objetivos específicos	30
<b>3. Materiais &amp; Métodos</b>	<b>31</b>
3.1 Seleção de genes	31
3.2 Linhagens bacterianas, meios de cultivo e condições de crescimento	31
3.3 Extração de DNA genômico e plasmidial	32
3.4 <i>Primers</i> e condições de amplificação (PCR)	32
3.5 Eletroforese em gel de agarose, purificação dos fragmentos de DNA e quantificação de DNA	33
3.6 Amplificação e mutagênese sítio dirigida	33

3.7 Clonagem	35
3.8 Expressão das proteínas recombinantes	36
3.9 Solubilização das proteínas recombinantes	37
3.10 Purificação das proteínas recombinantes fusionadas à GST	37
3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	38
<b>4. Resultados</b>	<b>39</b>
4.1 Isolamento dos genes selecionados	39
4.2 Clonagem dos genes selecionados por recombinação homóloga	41
4.3 Expressão das proteínas recombinantes	42
4.4 Solubilização das proteínas recombinantes	45
4.5 Purificação das proteínas recombinantes	46
<b>5. Discussão</b>	<b>48</b>
<b>6. Referências</b>	<b>56</b>
<b>7. Anexos</b>	<b>65</b>
7.1 Mapa do vetor de expressão pGEX 4T1	65
7.2 Sequências de nucleotídeos dos genes de <i>M. hyopneumoniae</i> utilizados neste trabalho	66
7.3 Protocolo de extração de DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i>	69
<b>8. Curriculum vitae</b>	<b>70</b>

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
A	adenina
C	citossina
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CIRCE	do inglês <i>controlling inverted repeat of chaperon expression</i>
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano-sulfonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTT	ditiotretitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
fmol	fentomol
G	guanina
GST	glutathiona S-transferase
HCl	ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPTG	β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase (1000 pares de bases)
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodalton
μg	micrograma
μL	microlitro
mL	mililitro
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
OD	densidade ótica
ORF	fase aberta de leitura (do inglês <i>open reading frame</i> )
pb	par de bases
PBS	tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PES	pneumonia enzoótica suína
pH	potencial de hidrogênio

pmol	picomol
RLM-RACE	amplificação rápida das extremidades 5' dos cDNAs mediada por RNA ligase (do inglês <i>RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA ends</i> )
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportador
rpm	revoluções por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
T	timina
T <sub>m</sub>	temperatura de fusão
U	unidade
UT	unidade de transcrição
V	volt

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Introdução de mutações <i>in vitro</i> por meio de <i>overlap extension</i> PCR.	34
<b>Figura 2.</b> Amplificação dos genes MHP7448_0551 (proteína hipotética) e MHP7448_0639 (proteína hipotética – possível fator $\sigma$ ) de <i>M. hyopneumoniae</i> .	39
<b>Figura 3.</b> Mutagênese sítio-dirigida e amplificação do gene MHP7448_0010 (HrcA) de <i>M. hyopneumoniae</i> .	40
<b>Figura 4.</b> Mutagênese sítio-dirigida e amplificação do gene MHP7448_0279 (regulador transcricional) de <i>M. hyopneumoniae</i> .	40
<b>Figura 5.</b> Clones de MHP7448_0639 (proteína hipotética – possível fator $\sigma$ ) e MHP7448_0551 (proteína hipotética) obtidos a partir do experimento de recombinação.	41
<b>Figura 6.</b> Clones de MHP7448_0010 (HrcA) obtidos a partir do experimento de recombinação.	42
<b>Figura 7.</b> Substituição do códon TGA no gene MHP7448_0010 (HrcA).	42
<b>Figura 8.</b> Expressão da proteína MHP7448_0639 (proteína hipotética – possível fator $\sigma$ ) recombinante.	43
<b>Figura 9.</b> Expressão da proteína MHP7448_0551 (proteína hipotética) recombinante.	44
<b>Figura 10.</b> Expressão da proteína MHP7448_0010 (HrcA) recombinante.	44
<b>Figura 11.</b> Análise da solubilidade da proteína MHP7448_0010 (HrcA) recombinante.	45
<b>Figura 12.</b> Resultado da solubilização das proteínas recombinantes MHP7448_0551 (proteína hipotética) e MHP7448_0639 (proteína hipotética – possível fator $\sigma$ ) com 0,5% de sarcosil.	45
<b>Figura 13.</b> Purificação da proteína recombinante MHP7448_0639 (proteína hipotética – possível fator $\sigma$ ).	46
<b>Figura 14.</b> Expressão e purificação da proteína recombinante MHP7448_0010 (HrcA).	47
<b>Figura 15.</b> Purificação da proteína recombinante MHP7448_0551 (proteína hipotética).	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens Bacterianas utilizadas neste trabalho.	31
<b>Tabela 2.</b> <i>Primers</i> utilizados neste trabalho.	32
<b>Tabela 3.</b> Condições de amplificação do DNA.	33

## RESUMO

*Mycoplasma hyopneumoniae* é uma das menores bactérias presentes na natureza, apresentando um genoma reduzido com alto conteúdo de A+T e ausência de parede celular. Este organismo é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, uma doença crônica que afeta rebanhos em todo mundo sendo responsável por grandes perdas econômicas. Para investigar a patogênese de *M. hyopneumoniae* é importante entender seus mecanismos genéticos, porém, apesar do sequenciamento do genoma de várias linhagens (7448, J, 232 e 168), pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam e controlam a expressão gênica neste microrganismo, principalmente no que se relaciona às proteínas regulatórias. Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA e propiciam a capacidade de controlar a expressão gênica sob diferentes estímulos metabólicos ou condições de crescimento. O conhecimento que se tem sobre essas proteínas em *M. hyopneumoniae* é escasso, então, desta forma, este trabalho tem como objetivo a análise de potenciais fatores de transcrição de *M. hyopneumoniae*. Para isso foram selecionadas proteínas tradicionalmente descritas em bancos de dados como fatores de transcrição (*HrcA* – MHP7448\_0010; *transcriptional regulator* – MHP7448\_0279; e a proteína hipotética MHP7448\_0551), além de uma proteína hipotética que apresenta similaridades estruturais com fatores sigma (MHP7448\_0639). Estas proteínas foram clonadas por recombinação homóloga *in vivo* no vetor de expressão pGEX 4T1 e transformadas em *Escherichia coli* para expressão das proteínas recombinantes. Porém, para empregar essa técnica foi necessário realizar a mutagênese sítio-dirigida para a substituição do códon UGA (triptofano em micoplasmas) para UGG (triptofano no código genético universal) nas proteínas que apresentavam este códon. As mutações foram inseridas através da técnica de *overlap extension* PCR, utilizando *primers* mutagênicos. Foram obtidos clones para três proteínas (MHP7448\_0551, MHP7448\_0639 e MHP7448\_0010), que foram eficientemente expressas em *E. coli*. Depois de solubilizadas com 0,5% de sarcosil, essas proteínas foram submetidas a um processo de purificação por cromatografia de afinidade. A purificação foi bem sucedida para duas das três proteínas testadas, e novos testes serão realizados com a proteína ainda não purificada (MHP7448\_0010). Uma vez purificados, os potenciais fatores de transcrição serão utilizados na identificação das regiões do DNA que essas proteínas regulam e que estão envolvidas no controle da expressão gênica em *M. hyopneumoniae*.

## ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* is one of the smallest bacteria found in nature, presenting a reduced genome with a high A+T content and no cell wall. This bacterium is the etiological agent of swine enzootic pneumonia, a chronic disease that affects herds throughout the world and is responsible for great economic losses. To investigate the pathogenesis of *M. hyopneumoniae* it is important to understand their genetic mechanisms, however, despite the genome sequencing of several strains (7448, J, 232 and 168), little is known about the mechanisms that regulate and control the gene expression in this bacterium, especially about regulatory proteins. Transcription factors are proteins that bind to DNA providing the ability to control gene expression under different metabolic stimuli or growth conditions. The knowledge about these proteins in *M. hyopneumoniae* is scarce; therefore, the aim of this study is the analysis of potential transcription factors of *M. hyopneumoniae*. We selected proteins traditionally reported in databases as transcriptional factors (HrcA – MHP7448\_0010; transcriptional regulator – MHP7448\_0279; and the hypothetical protein MHP7448\_0551), and a hypothetical protein which has structural similarities with sigma factors (MHP7448\_0639). These proteins were cloned by *in vivo* homologous recombination in the expression vector pGEX 4T1 and were transformed into *Escherichia coli* to express the recombinant proteins. Nevertheless, for the application of this system it was necessary to perform site-directed mutagenesis to replace the codon UGA (tryptophan in mycoplasma) to UGG (tryptophan in the universal genetic code) in the proteins that presented this codon. The mutations were introduced by overlap extension PCR technique, using mutagenic primers. Clones were obtained for three proteins (MHP7448\_0551, MHP7448\_0639 and MHP7448\_0010), which were efficiently expressed in *E. coli*. After solubilization with 0.5% sarkosyl, these proteins were subjected to purification by affinity chromatography. Purification was successful for two of the three tested proteins, and further tests will be carried out with the protein not purified (MHP7448\_0010). After purification, the potential transcription factors will be used to identify the regions of DNA that these proteins regulate and which are involved in the control of gene expression in *M. hyopneumoniae*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 – Pneumonia Enzoótica Suína

A suinocultura é uma atividade de grande importância econômica para o Brasil, estando presente em aproximadamente 50% das propriedades rurais do país. O rebanho suíno brasileiro, estimado em 39,3 milhões de cabeças, configura o país como 4º maior produtor mundial da espécie, sendo que o maior efetivo de suínos encontra-se na região Sul (48,6%) (IBGE, 2011). Com o objetivo de se obter maior produtividade, os suínos passaram a ser criados de forma intensiva. Entretanto, essa forma de produção leva a uma alta densidade populacional em ambientes fechados, propiciando maior exposição a agentes infecciosos. Entre as enfermidades bacterianas de maior importância à suinocultura destacamos a pneumonia enzoótica suína (PES).

A PES é uma das principais doenças respiratórias em suínos, sendo causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*. Essa bactéria coloniza o trato respiratório do animal causando dano ao epitélio ciliar das vias aéreas inferiores através da adesão a esse tecido (DEBEY & ROSS, 1994). A aderência aos cílios é essencial para a iniciação da infecção, e uma vez estabelecida ela induz ciliostase, perda dos cílios e morte das células epiteliais, o que resulta em função diminuída do aparelho mucociliar (mecanismo de defesa inespecífico do trato respiratório) (DEBEY & ROSS, 1994; THACKER, 2004), predispondo o animal a infecções por patógenos secundários (CIPRIAN *et al.*, 1988; MAES *et al.*, 1996; THACKER, 2004). Em adição ao impacto físico do organismo no trato respiratório, *M. hyopneumoniae* também altera a resposta imune do hospedeiro, sendo capaz de mimetizar várias superfícies antigênicas e utilizar-se dessa variação para evadir o sistema imune (THACKER, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004).

A PES é uma doença de rebanho muito contagiosa caracterizada por uma tosse crônica não-produtiva, retardo de crescimento, alta morbidade e baixa mortalidade (MAES *et al.*, 1996). A enfermidade é a causa das maiores perdas econômicas na indústria suína devido à perda de peso dos animais em decorrência das lesões pneumônicas e dos gastos com tratamentos (THACKER, 2004; MAES *et al.*, 2008). É caracterizada por uma broncopneumonia catarral, geralmente associada com complicações broncopulmonares purulentas, com transmissão por contato direto,

indireto e através de aerossóis eliminados durante os acessos de tosse (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

O controle da PES pode ser realizado pelo uso de antibióticos e pela vacinação. Tetraciclina e macrolídeos são os antibióticos mais frequentemente utilizados no controle da PES e as vacinas atualmente disponíveis no mercado são compostas pelo microrganismo inativado (bacterinas) (MAES *et al.*, 2008). Essas medidas podem diminuir o nível de infecção em um rebanho e o número de bactérias nos pulmões melhorando as condições de saúde dos animais, mas elas não garantem que *M. hyopneumoniae* tenha sido eliminado do organismo. Dessa forma, é necessária a realização de mais esforços no desenvolvimento de vacinas mais eficazes e melhores estratégias de vacinação para a erradicação da doença.

## 1.2 – O Gênero *Mycoplasma*

Os organismos do gênero *Mycoplasma* estão entre os menores e mais simples organismos auto-replicativos identificados. Pertencem à classe Mollicutes (do Latim: mollis, mole; cutis, pele), sendo que a ausência de parede celular e a existência de citoesqueleto são características que diferenciam fenotipicamente essas bactérias dos demais procariotos (RAZIN & HAYFLIK, 2010). Até o momento, o número de espécies de Mollicutes identificadas está em cerca de 200 e esse número continua crescendo (<http://www.the-icsp.org/taxa/mollicuteslist.htm>).

Não existem micoplasmas de vida livre. Esses organismos estão amplamente difundidos pela natureza como parasitas de humanos, mamíferos, aves, répteis, peixes, artrópodes e plantas (RAZIN *et al.*, 1998). Acredita-se que todo organismo testado para a presença de micoplasmas vai apresentar resultado positivo, encontrando-se sempre espécies únicas (organismo-específico) (PITCHER & NICHOLAS, 2005). Os micoplasmas podem ser patogênicos ou apenas fazer parte da microbiota natural do hospedeiro (RAZIN, 2006). Algumas espécies já foram descritas ocupando o interior de células eucarióticas, embora normalmente essas bactérias sejam extracelulares, se aderindo à superfície de células e tecidos do hospedeiro (LO *et al.*, 1993; BASEMAN *et al.*, 1995). Nos seres humanos os micoplasmas estão relacionados a doenças, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, tais como síndromes respiratórias, pneumonia, artrite reumatóide, e doenças auto-imunes. Também foram associados como

co-fatores para a patogênese da AIDS e transformações malignas, aberrações cromossômicas, Síndrome da Guerra do Golfo e outras doenças complexas e inexplicáveis, como síndrome da fadiga crônica e doença de Crohn (BASEMAN & TULLY, 1997).

A falta de parede celular explica algumas das propriedades únicas dos micoplasmas, como sensibilidade ao choque osmótico e detergentes, resistência à penicilina e formação de colônias com a forma peculiar de “ovo frito”. A existência de apenas uma membrana trilaminar simples faz com que morfologicamente os micoplasmas sejam considerados gram-negativos (RAZIN, 2006). Entretanto, filogeneticamente relacionam-se com bactérias gram-positivas, compartilhando um ancestral comum com os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium* (WOLF *et al.*, 2004). Acredita-se que a evolução dos Mollicutes teria ocorrido por degeneração ou redução do genoma de bactérias gram-positivas com baixo conteúdo de G+C, acompanhado de perdas significativas de sequências genômicas (WOESE, 1987). A compactação do genoma dos micoplasmas só foi possível graças à adoção do modo de vida parasitário por esses organismos (RAZIN, 1999).

Os genomas dos organismos do gênero *Mycoplasma* são bastante reduzidos e variam entre 580 kb (*Mycoplasma genitalium*) e 1358 kb (*Mycoplasma penetrans*) (FRASER *et al.*, 1995; SASAKI *et al.*, 2002), apresentando um baixo conteúdo de G+C, que varia entre 23 e 40% (RAZIN *et al.*, 1998). Assim como ocorre em outros organismos, a distribuição do conteúdo G+C nos genomas de *Mycoplasma* é desigual. Nas regiões intergênicas o conteúdo de A+T é maior do que nas regiões codificantes, podendo chegar à ordem de 90% (DYBVG & VOELKER, 1996). Também entre os genes a distribuição de nucleotídeos é irregular, sendo que o conteúdo de G+C concentra-se muito mais nos genes codificadores de rRNA e tRNA (RAZIN *et al.*, 1998).

Como resultado da composição atípica dos genomas de *Mycoplasma*, há o favorecimento de códons que usem adenina e timina. Dessa forma existem pouquíssimos códons GGN, CCN, GCN e CGN em seu genoma (DYBVG & VOELKER, 1996). O alto conteúdo A+T dos genomas pode ter sido o fator que levou os micoplasmas a usar o códon UGA para codificar triptofano (YAMAO *et al.*, 1985), característica também encontrada no genoma das mitocôndrias (MACINO *et al.*, 1979). Uma vez que no código genético universal o códon UGA codifica um sinal de término

da tradução, isso faz com que a expressão de genes de micoplasmas em hospedeiros que utilizam o código universal fique comprometida. Entretanto, existem várias metodologias que possibilitam resolver o problema da expressão heteróloga de genes de *Mycoplasma*, como a utilização de hospedeiros contendo genes supressores (SMILEY & MINION, 1993), a utilização de metodologias de mutagênese dirigida (ROBINO *et al.*, 2005), além de uma estratégia denominada reação de múltiplas mutações (do inglês MMR, *multiple mutation reaction*), que corrige todos os códons UGA em uma única reação de amplificação (HAMES *et al.*, 2005).

A economia de informação genética foi provavelmente a responsável pela perda, nos micoplasmas, de várias das vias enzimáticas características da maioria das bactérias, impedindo a presença de uma vasta gama de atividades metabólicas. A maioria das atividades metabólicas existentes parece estar associada com formação de energia, em vez de fornecer substratos para as vias de síntese das rotas biossintéticas (RAZIN & HAYFLIK, 2010). Consequentemente, esses organismos possuem complexas necessidades nutricionais, como a dependência de fontes externas de precursores biossintéticos, incluindo aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos e esteróis (BASEMAN & TULLY, 1997). Assim como observado para as vias do metabolismo central, apenas os sistemas regulatórios considerados indispensáveis para sobrevivência no ambiente natural foram mantidos durante sua evolução redutiva (HALBEDEL & STULKE, 2007). Esses fatos, em concomitância com seu reduzido genoma, fazem dos micoplasmas um objeto de investigação adequado para a determinação do conjunto mínimo de genes necessários para a vida independente (HUTCHISON *et al.*, 1999; GLASS *et al.*, 2006), além de levar a tentativas de criar uma célula artificial baseada no paradigma de que *M. genitalium* perdeu a maioria dos genes não-essenciais (GIBSON *et al.*, 2008; GIBSON *et al.*, 2010).

A busca pela determinação do conjunto mínimo de genes para uma célula independente, aliada à importância econômica dos micoplasmas, devido ao fato de que muitas espécies são patógenos de seres humanos e animais, fez com que muitos desses organismos tivessem seus genomas completamente sequenciados (FRASER *et al.*, 1995; HIMMELREICH *et al.*, 1996; CHAMBAUD *et al.*, 2001; SASAKI *et al.*, 2002; PAPAIZISI *et al.*, 2003; JAFFE *et al.*, 2004; WESTBERG *et al.*, 2004; MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005; SIRAND-PUGNET *et al.*, 2007; DYBVIK *et al.*, 2008; CALDERON-COPETE *et al.*, 2009). Informações sobre Mollicutes já

sequenciados podem ser encontradas em [http:// services.cbib.u-bordeaux2.fr/molligen/](http://services.cbib.u-bordeaux2.fr/molligen/) (BARRÉ *et al.*, 2003).

### 1.3 – *Mycoplasma hyopneumoniae*

*M. hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, sendo um patógeno que apresenta distribuição mundial e está presente em quase todos os rebanhos suínos. Seu primeiro isolamento pulmonar foi relatado por Maré e Switzer (1965) e Goodwin *et al.* (1965) a partir de suínos com sintomas de pneumonia, sendo também os primeiros a realizar a reprodução experimental da doença. Assim como a maioria dos membros do gênero *Mycoplasma*, *M. hyopneumoniae* infecta apenas um único hospedeiro, o suíno, no entanto os mecanismos de especificidade pelo hospedeiro ainda são desconhecidos (MINION *et al.*, 2004).

O isolamento de *M. hyopneumoniae* apresenta várias dificuldades devido a sua natureza fastidiosa, o crescimento lento e a presença de outros micoplasmas no trato respiratório suíno (MAES *et al.*, 2008). Entre esses microrganismos estão *Mycoplasma hyorhinis*, causador de artrites e poliserosites e *Mycoplasma flocculare*, que até o momento não está sendo considerado patogênico. Essas espécies apresentam grande semelhança com *M. hyopneumoniae* no que diz respeito à morfologia, crescimento e antigenicidade (ROSS, 1999). Além disso, existe também uma dificuldade de cultivo que é geral para os micoplasmas, sendo que muitas espécies nunca foram cultivadas (RAZIN *et al.*, 1998). *M. hyopneumoniae* é uma das espécies que apresentam método de cultivo estabelecido. O meio Friis, desenvolvido para isolamento de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, é um meio rico e possui soro suíno livre de anticorpos e o indicador de pH vermelho fenol. O crescimento bacteriano acidifica o meio ocorrendo a mudança de coloração do mesmo de vermelho para amarelo, indicando a oxidação da glicose por *M. hyopneumoniae* (FRIIS, 1975).

Devido ao impacto econômico causado pela pneumonia enzoótica suína, há um grande empenho da comunidade científica em estudar *M. hyopneumoniae*. Prova disso é que esta espécie possui ao menos quatro linhagens sequenciadas (232, J, 7448 e 168). O genoma dessas bactérias consiste, respectivamente, de 892.758 pb, 897.405 pb, 920.079 pb e 925.576 pb, sendo que o conteúdo G+C perfaz apenas 28% desse genoma.

A maior parte do genoma, superior a 80%, é constituído de regiões codificantes (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2011).

A disponibilidade dos genomas sequenciados tem propiciado melhor entendimento acerca da biologia molecular de *M. hyopneumoniae*, auxiliando vários estudos referentes ao seu metabolismo e sua patogenicidade.

#### 1.4 – Transcrição em *Mycoplasma*

A transcrição é o processo em que a informação contida na sequência de DNA de um gene é sintetizada em RNA, dando origem a todas as moléculas de RNA necessárias ao funcionamento celular, tais como os RNAs mensageiros, regulatórios e estruturais. A transcrição é o primeiro estágio do controle da expressão gênica e a principal etapa na qual ela é regulada. Proteínas regulatórias determinam se um gene em particular está disponível para ser transcrito pela RNA polimerase. O passo inicial (e muitas vezes único) na regulação está na decisão de transcrever ou não um gene. A maioria dos eventos regulatórios ocorre no início da transcrição, embora os estágios subsequentes desse processo sejam, por vezes, regulados (LEWIN, 2008).

O número de genes anotados envolvidos com a transcrição varia entre os genomas bacterianos analisados. Na linhagem 232 de *M. hyopneumoniae* são 11 genes e em *M. penetrans* são 23, correspondendo respectivamente a 1,6% e 2,2% do total de sequências de DNA codificantes (SASAKI *et al.*, 2002; MINION *et al.*, 2004). Entretanto, em *Bacillus subtilis* são encontrados 276 genes relacionados a esse processo, equivalendo a 6,7% das sequências codificadoras (SASAKI *et al.*, 2002), enquanto em *Pseudomonas aeruginosa* 8,4% dos genes estão envolvidos com a regulação gênica (STOVER *et al.*, 2000). O número de genes que codificam proteínas com função regulatória parece aumentar com o tamanho do genoma bacteriano (STOVER *et al.*, 2000). No entanto, é importante salientar que existe um número grande de proteínas hipotéticas distribuídas ao longo do genoma de diversas espécies de *Mycoplasma* ainda sem função conhecida, podendo, portanto, alterar o número de genes relacionados à transcrição.

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

2004). A RNA polimerase dos micoplasmas é semelhante a das eubactérias, sendo codificada pelos genes conservados *rpoA* (subunidade  $\alpha$ ), *rpoB* (subunidade  $\beta$ ) e *rpoC* (subunidade  $\beta'$ ). Porém somente um fator  $\sigma$  – responsável pelo reconhecimento das sequências promotoras – foi identificado (RAZIN *et al.*, 1998), diferentemente de *Escherichia coli*, que tem no mínimo sete fatores  $\sigma$  (MAEDA *et al.*, 2000) e de *B. subtilis*, que contém no mínimo 18 deles (KUNST *et al.*, 1997). A associação de fatores  $\sigma$  alternativos ao núcleo da RNA polimerase permite às células reconhecer diferentes tipos de promotores, ativando conjuntos de genes específicos e dessa forma ajustar rapidamente o padrão de transcrição, de modo a alterar de forma eficaz o metabolismo celular em resposta às condições ambientais e aos sinais celulares (MOONEY *et al.*, 2005). Como até o momento apenas um fator  $\sigma$  foi identificado nos micoplasmas, esses organismos devem possuir um mecanismo diferente de resposta ao estresse e às mudanças ambientais.

Para a transcrição ter início, a primeira etapa necessária é o reconhecimento, pela RNA polimerase holoenzima, de sequências promotoras localizadas à montante do ponto de início da transcrição. São essas sequências que determinam quais as regiões do genoma que devem ser transcritas. Nas bactérias, quatro diferentes elementos promotores foram identificados. Os dois principais são os hexâmeros -10 e -35, que estão localizados, respectivamente, 10 e 35 pares de bases à montante do sítio de início de transcrição. Os outros elementos promotores são o elemento -10 estendido e o elemento UP. O elemento -10 estendido é um motivo de 3-4 pares de bases localizado imediatamente à montante do elemento -10 e o elemento UP é uma sequência de aproximadamente 20 pares de bases rica em sequências A-T localizado à montante do elemento -35. Em conjunto esses quatro elementos especificam a ligação inicial da RNA polimerase a um promotor, mas a contribuição relativa de cada elemento difere entre os promotores (BROWNING & BUSBY, 2004).

A identificação de regiões promotoras nos micoplasmas é dificultada devido ao seu genoma A+T rico, fato que dificulta a definição *in silico* das sequências promotoras, uma vez que a predição destas tem sido baseada predominantemente em dados disponíveis para *E. coli* (WEINER III *et al.*, 2000). Além disso, existem poucas sequências de promotores gênicos de *Mycoplasma* sp. caracterizadas experimentalmente.

Os promotores gênicos já estudados em micoplasmas, reconhecidos pelo seu único fator sigma, possuem consenso na região -10, enquanto na região -35 não foi identificado consenso, ou então apenas um consenso muito fraco. Isso foi demonstrado no estudo de Weiner III *et al.* (2000), que com o objetivo de aumentar os dados disponíveis sobre promotores de micoplasmas, determinaram o sítio de início de transcrição de 22 genes de *Mycoplasma pneumoniae*. O estudo de Halbedel *et al.* (2007) analisando *in vivo* a região promotora do gene *ldh* de *M. pneumoniae* confirmou experimentalmente os consensos sugeridos por Weiner III *et al.* (2000). Nesse estudo, fragmentos de DNA contendo as prováveis regiões -10 e -35 do gene foram capazes de transcrever o gene repórter *lacZ* em *M. pneumoniae*, confirmando sua atividade promotora. Uma análise mais detalhada desse promotor, utilizando mutações pontuais nessa região, sugere uma maior importância da região -10 para a transcrição nesse organismo, enquanto a região -35 não teria a mesma relevância. Análises de sequências promotoras de *M. genitalium* também demonstraram haver forte consenso na região -10, enquanto nenhum consenso foi identificado na região -35 (MUSATOVOVA *et al.*, 2003; ZHANG & BASEMAN, 2011a). A ausência de uma região -35 similar a de *E. coli* também tem sido relatada em micobactérias. Dessa forma, parece que a região -35 pode não ser um pré-requisito para a ação da RNA polimerase em determinadas espécies bacterianas (MUSATOVOVA *et al.*, 2003).

Apesar de terem perdido os múltiplos fatores  $\sigma$ , os micoplasmas conservaram a resposta ao choque térmico e proteínas de choque térmico semelhantes às proteínas DnaK (HSP70) e GroEL bacterianas foram identificadas em diversos Mollicutes. Nos genomas de *M. genitalium* e *M. pneumoniae* sete proteínas de choque térmico foram identificadas (FRASER *et al.*, 1995; HIMMELREICH *et al.*, 1996). Como nas bactérias gram-negativas a resposta ao choque térmico é regulada por fatores sigma alternativos que interagem com o núcleo da RNA polimerase, nos micoplasmas essa resposta deve ocorrer de forma distinta (RAZIN *et al.*, 1998).

Quanto à organização gênica, os genes dos organismos pertencentes ao gênero *Mycoplasma* estão predominantemente organizados em unidades de transcrição contendo vários genes. Isso pode ser visto em *M. pneumoniae*, onde a maioria dos genes está organizada em longos agrupamentos gênicos com sequências intergênicas curtas ou ainda sem a presença de sequências intergênicas. Isso sugere que a maioria desses genes é co-transcrita em mRNAs policistrônicos (HALBEDEL *et al.*, 2007). A análise do

transcriptoma de *M. pneumoniae* trouxe novas informações relacionadas à organização gênica dessa bactéria e sua complexa regulação. Foi demonstrado que a maior parte dos operons policistrônicos de *M. pneumoniae* contém dois ou três genes e que a maior unidade de transcrição é o operon ribossomal, contendo 20 genes. O transcriptoma ainda revelou que nem todos os genes em uma unidade de transcrição são expressos coordenadamente; em vez disso, genes em posições internas podem ser reprimidos ou ativados em resposta a mudanças nas condições de crescimento. Foi demonstrado que as unidades de transcrição (operons) podem ser subdivididas em unidades de transcrição menores (suboperons), implicando uma alta taxa de transcritos alternativos. Interessantemente, foi observado que genes que eram separados em diferentes suboperons tendiam a pertencer a diferentes categorias funcionais. Dessa forma, embora a redução do genoma leve a formação de longas unidades de transcrição acomodando genes com diferentes funções, pode ocorrer a existência de sítios internos de início e término da transcrição, de forma a modular a transcrição dos genes internos com funções relacionadas (GÜELL *et al.*, 2009). Além disso, o transcriptoma também evidenciou a existência de 89 RNAs anti-senso, que podem estar envolvidos com a regulação gênica a nível pós-transcricional.

Assim como o início da transcrição é determinado por sequências promotoras, o seu término é determinado por sequências terminadoras. No entanto, os mecanismos envolvidos na terminação da transcrição dos micoplasmas ainda não foram bem estabelecidos. A terminação parece ser independente do fator de terminação Rho, tendo em vista que um gene que codifica para esta proteína não foi encontrado nos genomas dos micoplasmas até agora analisados e o término da transcrição parece ocorrer em sítios pouco definidos (RAZIN *et al.*, 1998). Alguns autores sugerem a presença de grampos de terminação para a regulação da expressão gênica (GÜELL *et al.*, 2009), enquanto outros afirmam que eles não participariam desse processo (GARDNER & MINION, 2010). A terminação abrupta da transcrição, que indicaria a presença de terminadores, parece não ocorrer com grande frequência. Sendo assim, foi proposto que o término da transcrição ocorreria de forma gradual, ou seja, a RNA polimerase continuaria a transcrição além do fim do gene, e se desligaria da fita molde gradativamente (GARDNER & MINION, 2010).

Apesar da aparente reduzida maquinaria de regulação gênica, tanto estresse ambiental quanto metabólico parecem garantir respostas transcricionais específicas nos

micoplasmas (WEINER III *et al.*, 2003; MUSATOVVOVA *et al.*, 2006; GÜELL *et al.*, 2009; ZHANG & BASEMAN, 2011b). Uma complexa regulação parece ocorrer nessas bactérias, apesar da presença de poucos fatores de transcrição, indicando que outros processos regulatórios podem estar envolvidos, como a regulação por RNA antisense (YUS *et al.*, 2009). Devido ao processo de evolução redutiva ao qual os micoplasmas foram submetidos, vários mecanismos regulatórios foram perdidos nesses organismos, como múltiplos fatores  $\sigma$  e sistemas de dois componentes (*two-component system*) (HALBEDEL *et al.*, 2007). Portanto, aparentemente, os sinais que promovem e regulam a transcrição nos micoplasmas deve diferir significativamente de outras bactérias, dificultando seu estudo (WEINER III *et al.*, 2000).

#### 1.4.1 – Transcrição em *M. hyopneumoniae*

Assim como as outras bactérias pertencentes ao gênero, *M. hyopneumoniae* possui poucos genes relacionados com a transcrição. Pela classificação do COG (do inglês *Cluster of Ortholog Groups*) apenas 20 genes estão implicados nesse processo na linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae*, correspondendo a 3% do total de sequências codificantes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/coxik.cgi?gi=18652>). No entanto, embora a expressão gênica em micoplasmas não seja bem caracterizada, trabalhos recentes trouxeram novas informações relacionadas à regulação em *M. hyopneumoniae*.

Em 2012, Weber *et al.* publicaram um estudo elucidando as sequências promotoras de *M. hyopneumoniae*. Nesse estudo, os sítios de início de transcrição de 23 genes de *M. hyopneumoniae* foram determinados através da técnica de 5'RLM-RACE, que permite a distinção entre transcritos primários e processados. Os 23 sítios de início de transcrição determinados experimentalmente foram alinhados e suas sequências 5' foram analisadas à procura de padrões de nucleotídeos que pudessem determinar elementos promotores. Em 21 dos 23 genes analisados foram encontrados motivos de seis nucleotídeos com os padrões TATAAT ou TAAAAT na distância de 5-8 nucleotídeos do sítio de início da transcrição. Dessa forma, a sequência consenso determinada foi TATAAT, que é idêntica a sequência canônica do elemento promotor -10 do fator  $\sigma^{70}$ . Além disso, foi observada conservação considerável de bases à montante do elemento -10, com um padrão que condiz com um elemento -10 estendido comumente encontrado em bactérias gram-positivas, conhecido como elemento -16. No entanto, enquanto foi possível identificar elementos -10 e -16, nenhum padrão

conservado correspondendo ao elemento -35 foi identificado, diferentemente do que é encontrado em outras espécies de *Mycoplasma*, que apresentam um consenso fraco relacionado ao elemento -35. Porém, foram identificadas sequências A-T ricas à montante do elemento -10, que poderiam estar relacionadas ao elemento promotor UP, que pode afetar o reconhecimento do promotor e melhorar a atividade promotora de um elemento -10 na ausência de um bom elemento -35 (MIROSLAVOVA & BUSBY, 2006; WEBER *et al.*, 2012).

Sobre a organização transcricional em *M. hyopneumoniae*, resultados de Siqueira *et al.* (2011) indicam que os genes dessa bactéria estão organizados preferencialmente em unidades transcricionais (UT). Na linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae* foram detectados 117 UTs contendo entre duas e 29s ORFs e 34 mRNAs monocistrônicos, contendo uma única ORF, de forma que apenas 5% das ORFs de *M. hyopneumoniae* encontram-se no último caso. Foi sugerido que, independentemente do tamanho das regiões intergênicas, genes adjacentes localizados na mesma fita de DNA (ou seja, com a mesma orientação) seriam transcritos em uma única molécula de RNA. Desta forma, a transcrição iniciaria a partir de um promotor a montante do primeiro gene e prosseguiria até que houvesse um gene na fita oposta (orientação oposta), levando a formação de longos mRNAs policistrônicos, muitas vezes compostos por genes com funções aparentemente não relacionadas.

Através de análises dos estudos de Siqueira *et al.* (2011) e Weber *et al.* (2012) pôde ser visto que embora existam longos mRNAs policistrônicos sendo transcritos a partir de um promotor situado à montante da primeira ORF da UT, há a ocorrência de promotores internos em frente a várias ORFs dentro das unidades de transcrição. A expressão descoordenada dentro da UT pode ocorrer quando o produto de um gene individual precisa ser expresso à parte dos outros, mediando um papel diferente. Isso poderia estar relacionado com os suboperons vistos em *M. pneumoniae* (GÜELL *et al.*, 2009). Assim, uma UT pode ter promotores à montante e internos, resultando em diferentes tamanhos de transcritos, indicando que a unidade transcricional inteira pode ser expressa a partir de um promotor comum ou que uma porção da unidade transcricional pode ser transcrita separadamente, em resposta a um sinal específico (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Esses dados corroboram as informações de Gardner e Minion (2010), que demonstraram que mesmo quando a transcrição não cessa

entre genes, há a evidência de iniciação transcricional independente pelo promotor do gene seguinte na sequência.

Gardner e Minion (2010) evidenciaram que as regiões intergênicas no genoma de *M. hyopneumoniae* são transcionalmente ativas. Seus resultados demonstraram que 93% das regiões intergênicas maiores que 50 pb são transcritas. Isso pode ser um indicativo de que essa bactéria não controla estritamente sua transcrição, sendo que em muitas regiões a transcrição continua para além do gene, apresentando uma redução gradual até o promotor do gene seguinte ser encontrado. A transcrição de regiões intergênicas também sugere que esses RNAs podem ter um papel importante na fisiologia de *M. hyopneumoniae*, podendo atuar como RNAs reguladores.

Diversos estudos utilizando microarranjos para examinar as alterações globais na transcrição demonstraram que *M. hyopneumoniae* pode regular seus genes em resposta às alterações ambientais (MADSEN *et al.*, 2006a; MADSEN *et al.*, 2006b; SCHAFER *et al.*, 2007; ONEAL *et al.*, 2008; MADSEN *et al.*, 2008). Esses estudos trazem informações sobre o estado metabólico da bactéria, no entanto não revelam quais mecanismos estão envolvidos na regulação gênica. Dessa forma são necessários mais estudos a fim de emergir novos conhecimentos acerca da regulação gênica em *M. hyopneumoniae*, tendo em vista que essa bactéria parece ter uma regulação transcricional muito mais complexa do que pode ser esperado em um primeiro momento.

### 1.5 – Fatores de transcrição

As células bacterianas adaptam continuamente a expressão de seus genes em resposta às mudanças ambientais. Sabe-se que em todos os organismos a expressão gênica é modulada predominantemente ao nível de início da transcrição, através de proteínas conhecidas como fatores de transcrição. Estas proteínas se ligam ao DNA e propiciam a capacidade de controlar a expressão gênica sob diferentes estímulos metabólicos ou condições de crescimento (PÉREZ-RUEDA & MARTINEZ-NUNEZ, 2012). Nesse contexto, um fator de transcrição pode ativar ou reprimir o início da transcrição, permitindo ou bloqueando o acesso da RNA polimerase ao promotor. Alguns fatores de transcrição funcionam somente como ativadores – aumentando a afinidade da RNA polimerase pelo promotor – ou como repressores – diminuindo a

afinidade da RNA polimerase pelo promotor –, enquanto outros podem funcionar como ambos, de acordo com o promotor alvo (BROWNING & BUSBY, 2004).

O genoma de *E. coli* K-12 contém mais de 300 genes que codificam proteínas preditas a se ligarem a promotores e regular positiva ou negativamente a transcrição (PÉREZ-RUEDA & COLLADO-VIDES, 2000). A maior parte dessas proteínas se liga ao DNA através de uma sequência específica, e isso assegura que suas ações sejam dirigidas a promotores específicos (BROWNING & BUSBY, 2004). Algumas dessas proteínas controlam a transcrição de apenas um ou dois genes, sendo bastante exclusivas, enquanto outras controlam um grande número de genes, sendo que se sabe que apenas sete dessas proteínas regulatórias são responsáveis por modular diretamente a expressão de 51% dos genes de *E. coli* (MARTINEZ-ANTONIO & COLLADO-VIDES, 2003).

Os fatores de transcrição constituem uma classe de proteínas cuja esfera de ação é altamente flexível, não apenas na detecção de diversos estímulos ambientais e endógenos, mas também em explorar vários mecanismos combinatórios que podem regular diferencialmente a expressão gênica. Além disso, a diversidade de sequências reconhecidas pelos fatores de transcrição é enorme e pode ocorrer em qualquer localização, desde algumas bases a jusante do promotor até centenas de bases a montante do sítio de início da transcrição (PÉREZ-RUEDA & MARTINEZ-NUNEZ, 2012). Nesse aspecto, quatro modos principais de repressão associados com os fatores de transcrição e a localização de seus sítios de ligação ao DNA nas bactérias foram descritos: (a) repressão por impedimento estérico, no qual o fator de transcrição se liga entre ou ao longo dos elementos promotores; (b) repressão por bloqueio do alongamento da transcrição, no qual o fator de transcrição se liga no início da região codificante; (c) repressão por looping de DNA, no qual os sítios de ligação ao DNA estão à montante e à jusante do promotor e dois monômeros do mesmo fator de transcrição se ligam ao DNA; e (d) repressão pela modulação de um ativador. Em contraste, quatro principais modos de ativação da transcrição também foram propostos: (a) ativação de classe I, na qual um fator de transcrição se liga à montante do promotor e interage com a subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase; (b) ativação classe II, na qual um fator de transcrição se liga à montante do promotor e promove a ligação do fator  $\sigma$  e o recrutamento da RNA polimerase; (c) ativação mediada por mudanças conformacionais, na qual um fator de transcrição se liga ao promotor e permite a ele se ligar à RNA

polimerase, geralmente torcendo o DNA; e (d) ativação pela modulação de um repressor, aliviando o efeito da repressão (BROWNING & BUSBY, 2004; PÉREZ-RUEDA & MARTINEZ-NUNEZ, 2012).

Entre as bactérias, o número de fatores de transcrição varia de apenas alguns nas archaeas *Nanoarchaeum equitans* e *Ignicoccus hospitalis* a centenas nas bactérias *B. subtilis* e *E. coli*, como já mencionado (PÉREZ-RUEDA & MARTINEZ-NUNEZ, 2012). Essa diferença entre o número de fatores de transcrição se correlaciona com a hipótese de maturação do genoma. Esta teoria propõe que genomas maiores requerem uma rede mais complexa de proteínas regulatórias para coordenar a expressão de um conjunto maior de funções celulares, de forma que organismos mais complexos terão um número maior de fatores de transcrição em relação a bactérias mais simples (STOVER *et al.*, 2000; RANEA *et al.*, 2005). Também foi sugerido que a existência de apenas alguns elementos regulatórios em bactérias com genomas pequenos seria compensada com um aumento no número de sítios de ligação ao DNA por elemento, em contraste com o grande número de elementos regulatórios identificados em genomas maiores, que controlam uma proporção menor de sítios de ligação ao DNA (PÉREZ-RUEDA & MARTINEZ-NUNEZ, 2012). Além disso, uma maior proporção de genes em genomas pequenos está organizada em operons, simplificando a maquinaria necessária para a expressão gênica, em contraste com genomas mais complexos, em que uma porção reduzida de genes é organizada em operons (CHERRY, 2003), que poderia também influenciar a proporção de fatores de transcrição nesses organismos.

Outro ponto a ser considerado além do tamanho dos genomas é o estilo de vida das bactérias. Bactérias de vida livre, que experimentam um ambiente menos estável e sujeito a grandes mudanças, requerem um conjunto maior de proteínas regulatórias para responder de forma eficiente a um amplo conjunto de sinais ambientais, como mudanças em condições físico-químicas ou a quantidade e qualidade de nutrientes disponíveis. Por outro lado, patógenos celulares obrigatórios e endossimbiontes apresentam um número menor de fatores de transcrição, pois aparentemente perderam progressivamente seus reguladores, uma vez que estes não seriam necessários no ambiente relativamente estável fornecido pelo hospedeiro (CASES *et al.*, 2003).

Essas informações são importantes, pois uma vez que *M. hyopneumoniae* possui um genoma bastante reduzido, além de ter um modo de vida dependente de seu

hospedeiro, conseqüentemente deverá apresentar um número bastante restrito de fatores de transcrição.

#### 1.5.1 – Fatores de transcrição em *M. hyopneumoniae*

Reolon (2010) realizou a análise de proteínas que apresentam ligação ao DNA de *M. hyopneumoniae*. Através de análises por espectrometria de massas foram identificadas 32 proteínas que possivelmente apresentam a capacidade de ligação ao DNA. Dentre essas foram identificadas proteínas sabidamente envolvidas com a transcrição, como MHP7448\_0010 (HrcA – repressor transcricional induzido por temperatura); MHP7448\_0279 (regulador transcricional); MHP7448\_0168 (*rpoA* – RNA polimerase subunidade  $\alpha$ ); MHP7448\_0637 (NusG – proteína anti-terminação transcricional). Também foram realizadas análises *in silico*, através de diversos programas de bioinformática, nas quais foram identificadas 59 proteínas que podem se ligar ao DNA, dentre as quais 16 são proteínas hipotéticas, ainda sem função estabelecida, e que poderiam desempenhar funções de regulação.

Algumas das proteínas identificadas por espectrometria de massas foram também identificadas por ferramentas de bioinformática. Entre elas estão o repressor transcricional HrcA e o regulador transcricional MHP7448\_0279. Esses resultados estão de acordo com informações depositadas no DBD (do inglês *Transcriptional Factor Prediction Database*), que prediz três fatores de transcrição para *M. hyopneumoniae*. Além das proteínas acima citadas, também a proteína hipotética MHP7448\_0551 é predita como fator de transcrição pelo DBD, sendo que esta proteína foi também identificada nas análises *in silico* do trabalho de Reolon (2010).

A proteína HrcA de *M. hyopneumoniae* já foi identificada experimentalmente, bem como a região do DNA a qual ela se liga. Esta proteína é um repressor transcricional induzido por temperatura, controlando a expressão de genes em resposta a variações de temperatura, também conhecidas como proteínas de choque térmico. HrcA interage com uma região do DNA denominada elemento CIRCE (do inglês *controlling inverted repeat of chaperon expression* – repetições invertidas de controle da expressão de chaperonas), que existem com frequência na região à montante de operons que codificam chaperonas, como *dnaKe groEL* (ZUBER & SCHUMANN, 1994). Uma região à montante do gene *dnaK* de *M. hyopneumoniae* contendo uma sequência

repetida invertida (5'-CTGGCACTT-N<sub>9</sub>-AAGTGCCAA-3') foi identificada como sítio de ligação para a proteína HrcA de modo a regular negativamente sua expressão sob condições de choque térmico (CHANG *et al.*, 2008).

Dentre as proteínas hipotéticas identificadas no estudo de Reolon (2010), uma foi particularmente interessante: a proteína hipotética MHP7448\_0639. Quando analisada com programas desenvolvidos para analisar a estrutura das proteínas mostrou-se estruturalmente bastante similar ao fator  $\sigma^{28}$  de *B. subtilis*, apesar de não apresentar grande homologia de sequência primária. Este fator  $\sigma$  foi denominado “fator de motilidade” por estar envolvido principalmente na regulação de genes relacionados à biossíntese flagelar. Somando com este resultado, o estudo de Fonsêca *et al.* (2012) utilizando modelagem comparativa de proteínas demonstrou similaridades estruturais entre a proteína codificada por MHP7448\_0639 e as estruturas cristalinas do fator  $\sigma$  sigE de *Rhodobacter sphaeroides* e com a sigma flagelar  $\sigma^{28}$  de *Aquiflex aeolicus*. Apesar de *M. hyopneumoniae* possuir apenas um fator  $\sigma$  identificado (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005) e não possuir flagelo, a proteína hipotética MHP7448\_0639 é um excelente alvo para estudos que possam determinar sua expressão e função biológica, pois poderia apresentar uma função reguladora igual ou diferente da desempenhada pela  $\sigma^{28}$ , ou ainda participar de outros mecanismos regulatórios da expressão gênica até então não identificados em *M. hyopneumoniae*.

Estudos de transcrição e expressão podem contribuir para o entendimento de processos metabólicos e regulatórios em *M. hyopneumoniae*, pois podem revelar proteínas envolvidas nesses processos, ajudando a preencher lacunas sobre o funcionamento desta bactéria. O uso dessa estratégia no estudo de fatores de transcrição de *M. hyopneumoniae* é de grande utilidade, pois através da obtenção dessas proteínas será possível identificar experimentalmente sequências envolvidas na regulação da expressão gênica deste microrganismo, sendo a identificação destas um passo essencial para a elucidação de mecanismos regulatórios nesta bactéria.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivos gerais

Tendo em vista o pouco conhecimento relativo a regulação gênica em *M. hyopneumoniae* o estudo de proteínas regulatórias é importante para entender os mecanismos que controlam e regulam a expressão gênica nessa bactéria. Deste modo, este trabalho tem como objetivo a clonagem, expressão e purificação de potenciais fatores de transcrição de *M. hyopneumoniae*, que poderão posteriormente ajudar a identificar as regiões do DNA envolvidas nos processos de regulação gênica desta bactéria.

### 2.2 – Objetivos específicos

- Isolamento dos genes e mutagênese sítio-dirigida dos códons TGA codificando triptofano dos potenciais fatores de transcrição de *M. hyopneumoniae*;
- Clonagem por recombinação dos genes selecionados no vetor pGEX 4T1;
- Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*;
- Purificação das proteínas recombinantes.

### 3. MATERIAIS & MÉTODOS

#### 3.1 – Seleção de genes

Foram selecionados para esse estudo os genes que codificam para as três proteínas tradicionalmente descritas em bancos de dados com fatores de transcrição MHP7448\_0010 (HrcA), MHP7448\_0279 (regulador transcricional) e MHP7448\_0551 (proteína hipotética), além da proteína hipotética MHP7448\_0639, que nos trabalhos de Reolon (2010) e de Fonsêca *et al.* (2012) mostrou similaridades estruturais com fatores  $\sigma$ .

#### 3.2 – Linhagens bacterianas, meios de cultivo e condições de crescimento

As linhagens de *E. coli* (Tabela 1) foram mantidas em meio sólido Luria-Bertani (LB) sem adição de antibióticos (SAMBROOK & RUSSEL, 2011). Quando transformadas com o plasmídeo pGEX 4T1 (GE Healthcare) [Anexo 1] ou seus recombinantes foram cultivadas em meio LB (sólido e líquido) ou Circle Grow (CG) (Q-BIOgene) (líquido) contendo 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina. O cultivo foi feito a 37°C por 16 horas, com agitação de 200 rpm (quando em meio líquido).

**Tabela 1. Linhagens Bacterianas utilizadas neste trabalho.**

<b>Linhagem</b>	<b>Uso</b>	<b>Referência</b>
<i>E. coli</i> XL1- Blue	Clonagem	Stratagene
<i>E. coli</i> KC8	Recombinação	Parrish <i>et al</i> , 2004
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star	Expressão	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta	Expressão	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysE	Expressão	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RP	Expressão	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) CodonPus	Expressão	Stratagene

*Mycoplasma hyopneumoniae* 7448, precedente da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), foi isolado de um suíno infectado em Lindóia do Sul, SC, Brasil (VASCONCELOS *et al*, 2005). O cultivo foi feito em meio Friis líquido (FRIIS, 1975) a 37°C, sob leve agitação até que o indicador de pH vermelho fenol presente no meio mudasse de cor (amarelo).

### 3.3 – Extração de DNA genômico e plasmidial

O DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448 foi extraído a partir de 5mL de cultivo conforme protocolo em anexo [Anexo 3].

A extração de DNA plasmidial a partir de *E. coli* XL1-Blue e *E. coli* KC8 foi feita a partir de preparações de pequena escala, de acordo com o procedimento descrito por Sambrook e Russell (2001).

### 3.4 – Primers e condições de amplificação (PCR)

Os primers utilizados nesse trabalho (Tabela 2) foram projetados utilizando o programa Vector NTI Advance™ 10.0 (Invitrogen) a partir da sequência nucleotídica da linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae* (número de acesso no GenBank: NC\_007332) [Anexo 2]. Além dos nucleotídeos específicos para a amplificação de cada sequência, os primers das extremidades dos genes apresentam oligonucleotídeos adicionais homólogos ao vetor de expressão pGEX 4T1, de forma a possibilitar posterior recombinação com esse vetor.

As reações de amplificação – PCRs (Tabela 3) foram feitas em termociclador TC-3000 (Techne).

**Tabela 2. Primers utilizados neste trabalho.**

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Tm (°C)</b>
pGEX_MHP0010_A	<u>TGGTCCGCGTGGATCCCCG</u> ATGCCAAAATTAGACTCAAAAAAAG	67,9
MHP0010_B	GTTCGATCTCAAGCATTTC█CAAATTG	57,2
MHP0010_C	CAATTTG█GAAATGCTTGAAGATCGAAC	57,2
pGEX_MHP0010_D	<u>GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCA</u> ATTATCCCTTTCTAATCTTGCTTTTG	66,5
pGEX_MHP0279_A	<u>TGGTCCGCGTGGATCCCCG</u> ATTATGAGTGTTCTAACCATTTC	67,4
MHP0279_B	TCATCAAGCTTAAG█CATTCAATTACGA	56,9
MHP0279_C	TCGTAATTGAATG█CTTAAGCTTGATGA	56,9
pGEX_MHP0279_D	<u>GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCA</u> CTAATGATTTTTTCATTTTCTTATAC	64
pGEX_MHP0551_A	<u>TGGTCCGCGTGGATCCCCG</u> TAAAAAATGAATAGTAATTTAATTGATC	64,4
pGEX_MHP0551_B	<u>GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCA</u> CTAATTTTTCAACAAATTAATAATTT	63,7
pGEX_MHP0639_A	<u>TGGTCCGCGTGGATCCCCG</u> GTGTTTTCTATGTCACCAGAGCG	71,4
pGEX_MHP0639_B	<u>GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCA</u> CTAAAAAAACTACGTAATTTATTATTGTTAG	64,3

Itálico e sublinhado – nucleotídeos homólogos ao vetor de expressão pGEX 4T1.

Realce em preto – nucleotídeos substituídos da sequência original (mutados).

**Tabela 3. Condições de amplificação do DNA.**

	<b>MHP0639</b>	<b>MHP0551</b>	<b>MHP0010_AB</b>	<b>MHP0010_CD</b>
Desnaturação inicial	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'
35 ciclos	94°C por 30"	94°C por 30"	94°C por 30"	94°C por 30"
	53°C por 30"	46°C por 30"	51°C por 30"	51°C por 30"
	72°C por 30"	72°C por 45"	72°C por 45"	72°C por 30"
Extensão final	72°C por 5'	72°C por 5'	72°C por 5'	72°C por 5'

	<b>MHP0010_AD</b>	<b>MHP0279_AB</b>	<b>MHP0279_CD</b>	<b>MHP0279_AD</b>
Desnaturação inicial	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'
35 ciclos	94°C por 30"	94°C por 30"	94°C por 30"	94°C por 30"
	51°C por 30"	49°C por 30"	42°C por 30"	40°C por 30"
	72°C por 1'	72°C por 30"	72°C por 40"	72°C por 1'
Extensão final	72°C por 5'	72°C por 5'	72°C por 5'	72°C por 5'

### 3.5 – Eletroforese em gel de agarose, purificação dos fragmentos de DNA e quantificação de DNA

Todos os produtos das reações de PCR, extrações de DNA plasmidial e reações de clivagem foram analisados em gel de agarose 0,8-1,2% com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas em aparelho Gel Doc XR (Bio-Rad).

As purificações dos fragmentos de DNA foram feitas a partir das reações de PCR ou de gel de agarose com o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

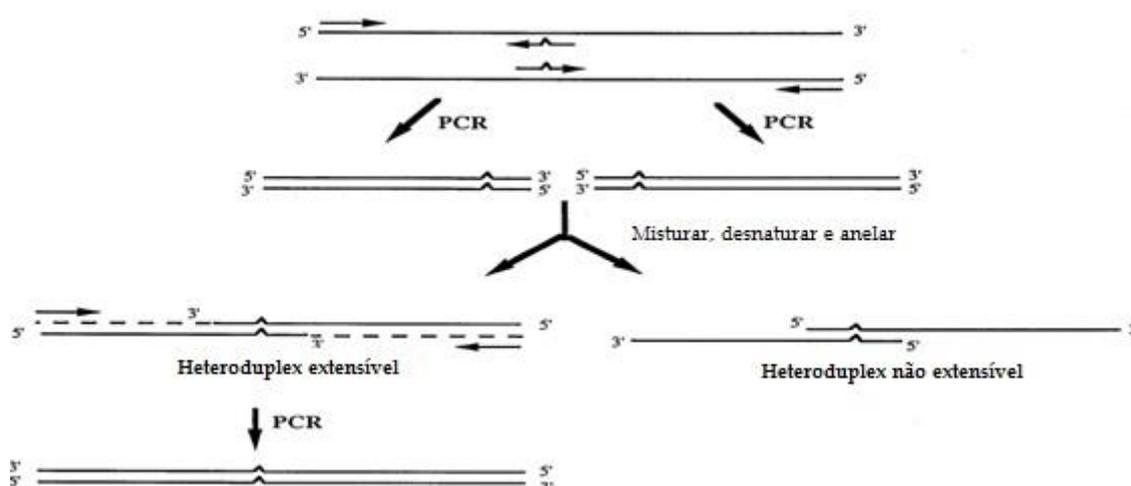
As quantificações de DNA foram realizadas com o fluorímetro Qubit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.6 – Amplificação e mutagênese sítio-dirigida

Os genes MHP7448\_0551 (proteína hipotética) e MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) foram amplificados a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* utilizando, respectivamente, os programas MHP0551 e MHP0639 (Tabela 3). As reações foram feitas em um volume final de 25 µL contendo 30 pmol de cada *primer*, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de *GoTaq DNA Polymerase*

(Promega) e 50 ng de DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448. Os fragmentos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% e purificados com o kit GFX.

Os genes MHP7448\_0010 (HrcA) e MHP7448\_0279 (regulador transcricional) possuem, cada um, um códon TGA codificando triptofano, que foi substituído pelo códon TGG através de mutagênese sítio-dirigida. As mutações A→G foram realizadas pela técnica de *overlap extension PCR* (HO *et al.*, 1989). Através dessa técnica duas reações de PCR foram feitas para produzir dois fragmentos de DNA que possuem sequências sobrepostas, contendo a mutação que se deseja inserir. Em uma reação de PCR posterior esses fragmentos foram misturados e combinados em uma reação de “ligação” na qual as sequências sobrepostas se anelam, permitindo que a sobreposição 3’ de cada fita atue como um *primer* para a extensão da extremidade 3’ da fita oposta (Figura 1).



**Figura 1. Introdução de mutações *in vitro* por meio de *overlap extension PCR*.** Duas reações de PCR são realizadas para produzir dois fragmentos de DNA que possuem sequências sobrepostas. Estes fragmentos são, então misturados, desnaturados e anelados para obter fragmentos mutantes em uma reação de PCR posterior. Modificado de Ling & Robinson, 1997.

Para se obter o gene MHP7448\_0010 (HrcA) mutado foram realizadas duas reações de PCR gerando os fragmentos MHP0010\_AB e MHP0010\_CD. O fragmento AB foi gerado com os *primers* pGEX\_MHP0010\_A (*primer* externo) e MHP0010\_B (*primer* mutagênico), através de uma reação de 35 ciclos de acordo com o programa MHP0010\_AB (Tabela 3). O fragmento CD foi gerado com os *primers* MHP0010\_C

(*primer* mutagênico) e pGEX\_MHP0010\_D (*primer* externo) de acordo com o programa MHP0010\_CD (Tabela 3). As reações foram feitas em um volume final de 25µL contendo 30 pmol de cada *primer*, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de *GoTaq DNA Polymerase* (Promega) e 50 ng de DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448. Os fragmentos AB e CD foram purificados e utilizados como molde em uma reação de PCR para se obter o fragmento mutante final. O fragmento MHP0010\_AD foi amplificado em uma reação de PCR similar à descrita acima, porém no lugar do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* foram utilizados 40 fmoles dos fragmentos AB e CD purificados. Foram utilizados os *primers* pGEX\_MHP0010\_A e pGEX\_MHP0010\_D, e a reação foi feita de acordo com o programa MHP0010\_AD (Tabela 3).

Para o gene MHP7448\_0279 (regulador transcricional) foi utilizado o mesmo processo que o descrito para o gene MHP7448\_0010. Para gerar o fragmento MHP0279\_AB foram utilizados os *primers* pGEX\_MHP0279\_A e MHP0279\_B em uma reação de acordo com o programa MHP0279\_AB e para gerar o fragmento MHP0279\_CD foram utilizados os *primers* MHP0279\_C e pGEX\_MHP0279\_D de acordo com o programa MHP0279\_CD. Para gerar o fragmento final MHP0279\_AD carregando a mutação foram utilizados 40 fmoles dos fragmentos AB e CD purificados em uma reação de PCR com os *primers* pGEX\_MHP0279\_A e pGEX\_MHP0279\_D, de acordo com o programa MHP0279\_AD (Tabela 3).

Os fragmentos finais MHP0010\_AD e MHP0279\_AD foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% e purificados a partir do gel com kit o GFX.

### 3.7 – Clonagem

O sistema de expressão utilizado foi o plasmídeo pGEX 4T1 (GE Healthcare). Para construção dos plasmídeos recombinantes, o vetor pGEX 4T1 foi linearizado por clivagem com as enzimas de restrição EcoRI e NotI. Após a clivagem, o vetor linearizado foi purificado a partir de gel de agarose 0,8% com o kit GFX.

Os fragmentos finais resultantes das reações de PCR foram clonados no vetor purificado por recombinação homóloga *in vivo* em *E. coli* KC8 (PARRISH *et al.*, 2004). A recombinação é possível devido aos nucleotídeos idênticos presentes nas extremidades dos fragmentos de DNA e do vetor linearizado, possibilitando assim a clonagem direcionada do fragmento.

As células bacterianas foram transformadas com 50 ng do vetor linearizado e 50 ng do produto de PCR a ser clonado em 25 µL de tampão KCM 2X (200 mM KCl; 60 mM CaCl<sub>2</sub>; 100 mM MgCl<sub>2</sub>). Após choque térmico, as células foram incubadas em 1mL de meio LB a 37°C por 1 hora e semeadas em LB sólido com ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído das colônias resultantes do experimento de recombinação e os clones foram confirmados através de PCR utilizando *primers* específicos para o vetor e também *primers* específicos para os genes.

Os clones confirmados por PCR foram sequenciados com o kit *Dyemantic ET Dye Terminator Cycle Sequence* (Amersham Biosciences) em sequenciador automático MEGABACE 1000, conforme manual do fabricante, utilizando *primers* específicos para o vetor pGEX 4T1.

### 3.8 – Expressão das proteínas recombinantes

Após a reação de sequenciamento, um clone para cada proteína recombinante foi selecionado e transformado por choque térmico em cinco linhagens de expressão de *E. coli* (Tabela 1). Uma colônia de cada célula transformada foi pré-inoculada em meio CG com 100 µg/mL de ampicilina, sendo cultivada a 37°C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Posteriormente, o pré-inóculo foi adicionado na concentração de 1% em um novo volume de meio CG e este foi incubado a 37°C com agitação de 200 rpm até atingir a OD<sub>600</sub> de 0,8, quando foi induzida a expressão das proteínas com IPTG. Foram utilizados os seguintes volumes de meio de cultura para cada experimento: 5 mL nos ensaios iniciais para escolha das condições de indução da expressão das proteínas; 100mL nos ensaios de determinação da solubilidade das proteínas recombinantes; e 1-2L para purificação das proteínas recombinantes.

A expressão da proteína recombinante em fusão com GST foi induzida com IPTG nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mM, em tempos de 3, 6 e 16 horas sob agitação e com temperaturas de 37° e 30°C.

Para análise da expressão das proteínas, uma alíquota de 1 mL foi retirada antes da indução e outra alíquota foi retirada 3 horas após a adição de IPTG. Estas alíquotas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga e o precipitado das células foi ressuspensionado em 75 µL de tampão PBS 1X adicionados de 25 µL de tampão de amostra 4X de eletroforese com β-mercaptoetanol (125 mM Tris-

HCl; 0,02% azul de bromofenol; 4% SDS; 40% glicerol; 400 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). As amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos e posteriormente analisadas em SDS-PAGE 12% (10  $\mu$ L).

Para analisar a solubilidade das proteínas, após a indução, as células foram centrifugadas a 7000 rpm por 6 minutos, ressuspendidas em 10 mL de tampão PBS 1X (para 100 mL de cultura) e lisadas utilizando sonicador com 3 a 5 pulsos de 30 segundos em amplitude de 60%. Após a lise, as células foram centrifugadas por 30 minutos a 9000 rpm para separar as frações solúvel e insolúvel. O precipitado (fração insolúvel) foi ressuspendido em um volume igual de PBS 1X e alíquotas das frações solúvel e insolúvel foram processadas para análise em SDS-PAGE 12%.

### 3.9 – Solubilização das proteínas recombinantes

As proteínas que se mostraram insolúveis foram submetidas ao processo de solubilização. Após a indução, as células foram centrifugadas a 7000 rpm por 6 minutos e ressuspendidas em tampão STE (10 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) contendo 100  $\mu$ g/mL de lisozima (75  $\mu$ L do tampão para cada 1 mL de cultura). Após incubação de 15 minutos no gelo, a concentração de DTT foi ajustada para 5 mM e foi adicionado sarcosil nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5% para solubilização das proteínas recombinantes. As células foram lisadas como descrito acima e após separação das frações solúvel e insolúvel, alíquotas foram retiradas e processadas para análise em SDS-PAGE 12%.

### 3.10 – Purificação das proteínas recombinantes fusionadas à GST

A fração solúvel do extrato celular foi incubada com a resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) para a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. A incubação da fração solúvel com a resina foi feita por 16 horas a 4°C com agitação. Após a incubação, a resina com a proteína de fusão ligada foi assentada em uma coluna para cromatografia (Bio-Rad) sendo realizada clivagem com trombina para liberar a proteína de interesse da GST. Para cada 1 mL da resina foi adicionado 1 mL de tampão de clivagem contendo 1 U de trombina. A clivagem ocorreu durante 16 horas em temperatura ambiente.

Após a clivagem, foram recolhidos 5 volumes de eluição da coluna a fim de coletar a proteína clivada. Em seguida, foi adicionado à coluna 1 volume de tampão de glutathiona reduzida (20 mM Glutathiona reduzida; 50 mM Tris-HCl – pH 8,0) para liberar a GST e a proteína de fusão que ainda estivesse ligada à resina. Foram recolhidas 5 eluições com o tampão de glutathiona reduzida. Todas as eluições da coluna foram analisadas por eletroforese. Amostras da resina antes e após a clivagem com trombina e a eluição com glutathiona reduzida também foram coletadas para análise em SDS-PAGE 12%.

### 3.11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

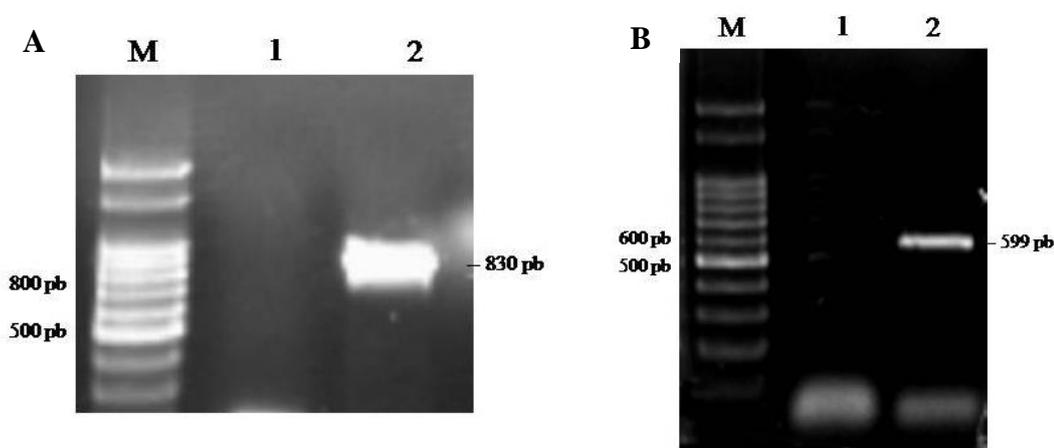
Para a separação eletroforética das proteínas foi utilizado o sistema de SDS-PAGE na concentração de 12%. As amostras foram resolvidas em um sistema de cubas verticais de eletroforese (Bio-Rad). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina/SDS (25 mM Tris; 250 mM glicina; 0,1 % SDS - pH 8,3) e com uma voltagem constante de 100 V. Como marcador de peso molecular foi utilizado HMW-SDS *Marker Kit* ou LMW-SDS *Marker Kit* (GE Healthcare) e o volume das amostras analisadas aplicado no gel foi 10 µL.

Para visualização das proteínas após eletroforese, os géis foram corados com coomassie coloidal G250 (1,6% ácido ortofosfórico; 8% sulfato de amônio; 0,08% coomassie brilliant blue G-250; 20% metanol). Para revelação do gel, o excesso de corante foi removido com ácido acético 5% sob agitação por 1 hora.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 – Isolamento dos genes selecionados

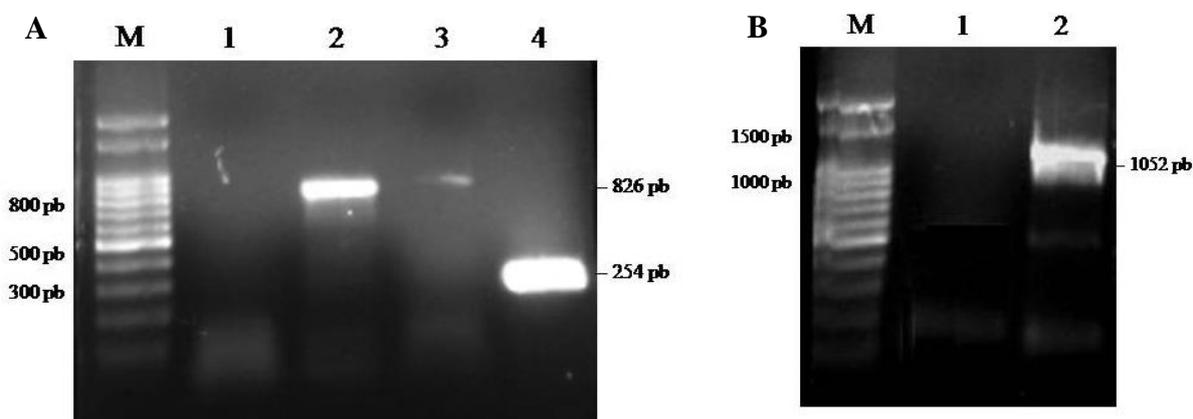
As sequências dos genes MHP77448\_0551 (proteína hipotética) e MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) foram eficientemente amplificadas por reações de PCR a partir do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448. A amplificação desses genes gerou produtos de 830 e 599 pb, respectivamente (Figura 2A e B).



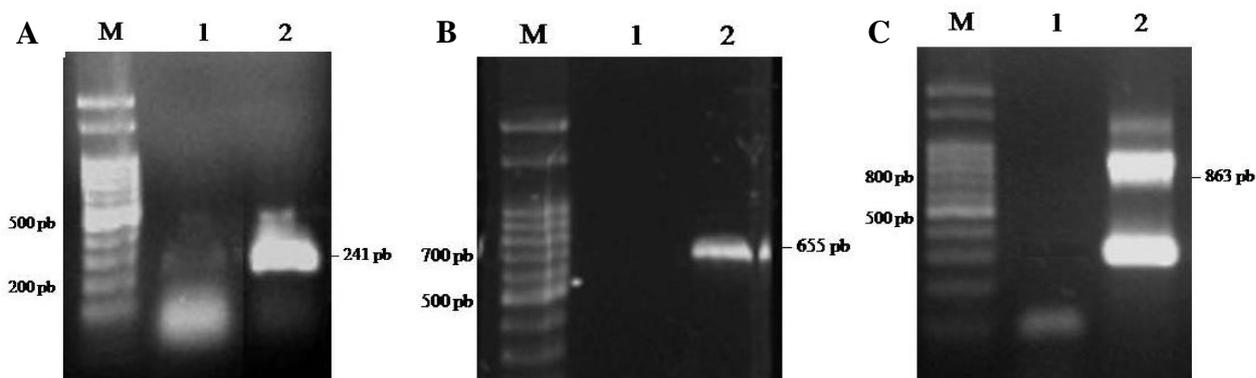
**Figura 2. Amplificação dos genes MHP7448\_0551 (proteína hipotética) e MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) de *M. hyopneumoniae*.** (A) Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando uma banda de 830 pb referente à amplificação do gene MHP7448\_0551. (B) Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando uma banda de 599 pb referente à amplificação do gene MHP7448\_0639. M – marcador de tamanho molecular (marcador de 100 pb). 1 – controle negativo (PCR sem DNA). 2 – produto da reação de PCR.

Para possibilitar a expressão heteróloga dos genes MHP7448\_0010 (HrcA) e MHP7448\_0279 (regulador transcricional) foi necessário substituir os códons TGA que codificavam triptofano por TGG. As mutações A→G foram inseridas pela técnica de *overlap extension PCR* e para isso foram gerados dois fragmentos intermediários para cada gene em que foi necessário realizar a mutagênese. O gene MHP7448\_0010 (HrcA) foi amplificado em duas partes, gerando o fragmento AB de 826 pb e o fragmento CD de 254 pb (Figura 3A). Através de uma nova amplificação utilizando estes dois fragmentos como molde foi gerado o fragmento AD, de forma a amplificar o gene MHP7448\_0010 inteiro, com 1052 pb (Figura 3B). Isso foi possível, pois os fragmentos compartilhavam entre si uma região de 28 pb que permitiu o anelamento entre eles durante a reação de amplificação.

A mesma metodologia foi utilizada para amplificar o gene MHP7448\_0279 (regulador transcricional). Inicialmente foram gerados os fragmentos AB com 241 pb e CD com 655 pb (Figuras 4A e B). Em seguida, utilizando esses dois fragmentos como molde, foi gerado o fragmento AD, amplificando os 863 pb do gene MHP7448\_0279 (Figura 4C).



**Figura 3. Mutagênese sítio-dirigida e amplificação do gene MHP7448\_0010 (HrcA) de *M. hyopneumoniae*.** (A) Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando bandas de 826 de 254 pb referentes, respectivamente, à amplificação dos fragmentos AB e CD de MHP7448\_0010. Linhas 1 e 3 - controle negativo (PCR sem DNA). Linhas 2 e 4 – produtos da reação de PCR. (B) Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando uma banda de 1052 pb referente à amplificação do gene MHP7448\_0010 a partir dos fragmentos AB e CD. 1 – controle negativo (PCR sem DNA). 2 – produto da PCR. M – marcador de tamanho molecular (marcador de 100 pb).



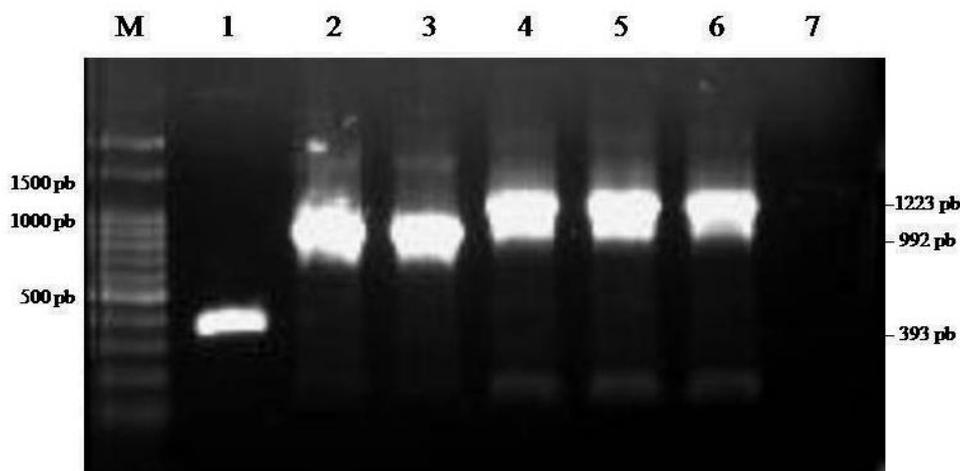
**Figura 4. Mutagênese sítio-dirigida e amplificação do gene MHP7448\_0279 (regulador transcricional) de *M. hyopneumoniae*.** (A) Amplificação do fragmento AB de MHP7448\_0279 – banda de 241 pb. (B) Amplificação do fragmento CD de MHP7448\_0279 – banda de 655 pb. (C) Amplificação do gene MHP7448\_0279 a partir dos fragmentos AB e CD – banda de 863 pb. Eletroforese em gel de agarose 1,2%. M – marcador de tamanho molecular (marcador de 100 pb). 1 – controle negativo (PCR sem DNA). 2 – produto da reação de PCR.

Os produtos finais das amplificações dos genes MHP7448\_0010 e MHP7448\_0279 (fragmentos AD) foram purificados a partir de gel de agarose devido à presença de bandas inespecíficas nas reações de PCR.

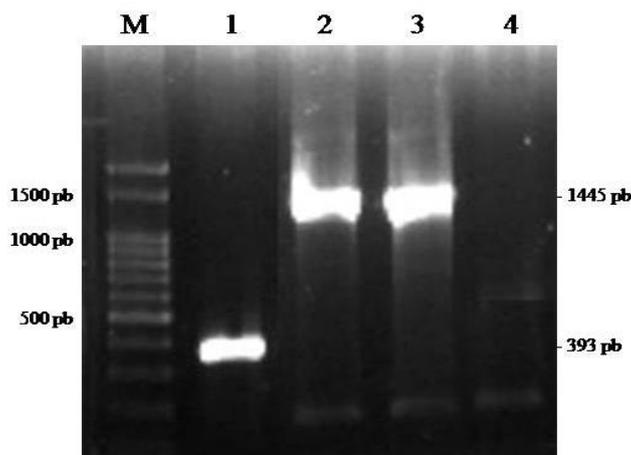
#### 4.2 – Clonagem dos genes selecionados por recombinação homóloga

A clonagem por recombinação homóloga com o vetor pGEX 4T1 resultou no seguinte: 7 colônias transformantes para o gene MHP7448\_0551 (proteína hipotética), das quais 3 foram consideradas recombinantes; 2 colônias transformantes para o gene MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ), onde as 2 foram recombinantes; e 7 colônias transformantes para o gene MHP7448\_0010 (HrcA), das quais 2 foram recombinantes. Nenhuma colônia recombinante foi obtida para o gene MHP7448\_0279 (regulador transcricional), mesmo após várias tentativas, apesar da presença de algumas colônias transformantes.

As colônias recombinantes foram confirmadas por PCR utilizando *primers* específicos para o vetor. Nessa reação, a região amplificada corresponde ao sítio múltiplo de clonagem onde as sequências são inseridas. Plasmídeos não recombinantes apresentaram bandas de 393 pb (referentes às sequências do vetor) enquanto plasmídeos recombinantes apresentaram bandas de 992 pb para o gene MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ), 1223 pb para o gene MHP7448\_0551 (proteína hipotética) (Figura 5) e uma banda de 1445 pb para o gene MHP7448\_0010 (HrcA) (Figura 6).



**Figura 5. Clones de MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) e MHP7448\_0551 (proteína hipotética) obtidos a partir do experimento de recombinação.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando os produtos de PCR da amplificação dos clones positivos de MHP7448\_0639 e MHP7448\_0551. 1 – controle positivo da PCR (vetor pGEX 4T1) mostrando a amplificação de uma banda de 393 pb. 2 e 3 – clones positivos para o gene MHP7448\_0639 mostrando a amplificação de uma banda de 992 pb. 4, 5 e 6 – clones positivos para o gene MHP7448\_0551 mostrando a amplificação de uma banda de 1223 pb. 7 – controle negativo (PCR sem DNA). M – marcador de tamanho molecular (marcador de 100 pb).



**Figura 6. Clones de MHP7448\_0010 (HrcA) obtidos a partir do experimento de recombinação.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando os produtos de PCR da amplificação dos clones positivos de MHP7448\_0010. 1 – controle positivo da reação de PCR (vetor pGEX 4T1) mostrando a amplificação de uma banda de 393 pb. 2 e 3 – clones positivos para o gene MHP7448\_0010 mostrando a amplificação de uma banda de 1445 pb. 4 – controle negativo (PCR sem DNA). M – marcador de tamanho molecular (marcador de 100 pb).

As clonagens foram confirmadas por sequenciamento e todos os recombinantes dos três genes que tiveram resultado positivo para a clonagem apresentaram as sequências nas fases de leitura corretas. A substituição A→G nos clones de MHP7448\_0010 (HrcA) também foi confirmada no sequenciamento (Figura 7).

```

B09. abd. exp      ATAATTGAAAAAAAAATCAATTTGGGAAAATGCTTGAAGATCGAACAACAAA
B10. abd. exp      ATAATTGAAAAAAAAATCAATTTGGGAAAATGCTTGAAGATCGAACAACAAA
B11. abd. exp      ATAATTGAAAAAAAAATCAATTTGGGAAAATGCTTGAAGATCGAACAACAAA
MHP7448_0010      ATAATTGAAAAAAAAATCAATTTGAGAAAATGCTTGAAGATCGAACAACAAA
*****

```

**Figura 7. Substituição do códon TGA no gene MHP7448\_0010 (HrcA).** Os clones de MHP7448\_0010 foram sequenciados mostrando conter o gene completo e a mutação desejada. A figura mostra o alinhamento entre o segmento 763-812 do gene MHP7448\_0010 selvagem e as sequências geradas a partir do sequenciamento dos clones 1 e 2 de pGEX\_0010. Em destaque a substituição desejada A→G.

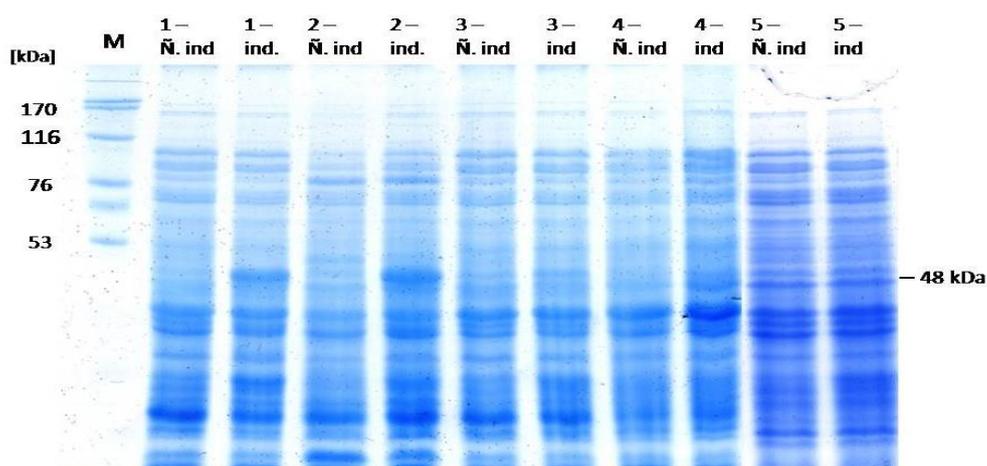
#### 4.3 – Expressão das proteínas recombinantes

Um clone de cada recombinante confirmado por sequenciamento foi selecionado ao acaso para transformação nas diferentes linhagens de expressão de *E. coli* para caracterização das proteínas recombinantes. Após um ensaio piloto em condições padrões de expressão com indução com 0,1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C

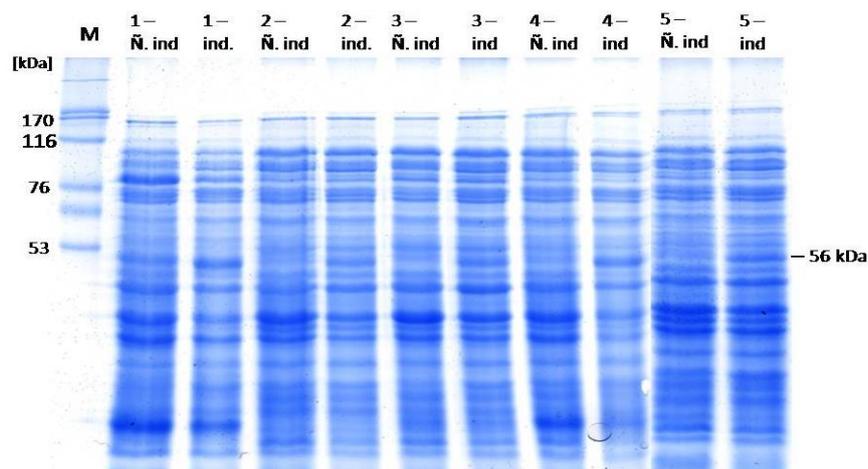
foram analisadas quais linhagens bacterianas melhor expressavam as proteínas recombinantes desejadas.

Resultados similares foram encontrados para as três proteínas recombinantes testadas. Para a proteína MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) as linhagens que apresentaram melhor expressão foram *E. coli* BL21 (DE3) RP e *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta (Figura 8). Para a proteína MHP7448\_0551 (proteína hipotética) as linhagens *E. coli* BL21 (DE3) RP e *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta também foram as que induziram melhor expressão (Figura 9). Finalmente, para a proteína MHP7448\_0010 (HrcA) as linhagens que apresentaram melhor expressão foram *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta e *E. coli* BL21 (DE3) pLysE (Figura 10). Inicialmente foram realizados os demais testes de indução com as duas linhagens que apresentaram melhor expressão para cada proteína, mas posteriormente escolheu-se apenas a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta, pois esta apresentava as melhores condições de expressão de proteínas.

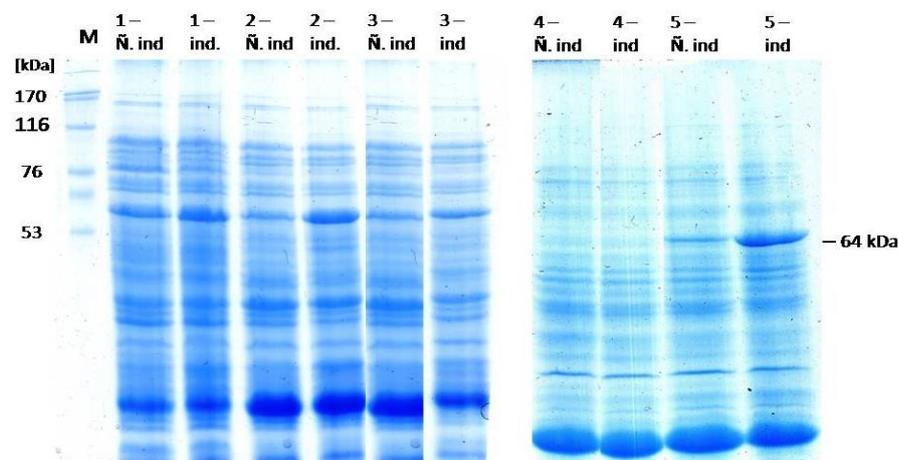
Não houve diferença de expressão utilizando diferentes concentrações de IPTG (0,1, 0,5 e 1 mM) nem diferentes tempos de indução (3, 6 e 16 horas). A variação na temperatura (30° e 37° C) também não ocasionou mudança na expressão das proteínas recombinantes. Dessa forma optou-se pelas condições padrão para indução da expressão das proteínas, com indução com 0,1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C.



**Figura 8. Expressão da proteína MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) recombinante.** Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão de uma proteína de 48 kDa referente à proteína recombinante. A melhor indução da proteína recombinante foi nas linhagens 1 e 2. 1 – *E. coli* BL21 (DE3) RP. 2 – *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. 3 – *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. 4 – *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus. 5 – *E. coli* BL21 (DE3) Star. Ind. – cultura induzida. Ñ ind. – cultura não induzida. M – marcador de massa molecular.

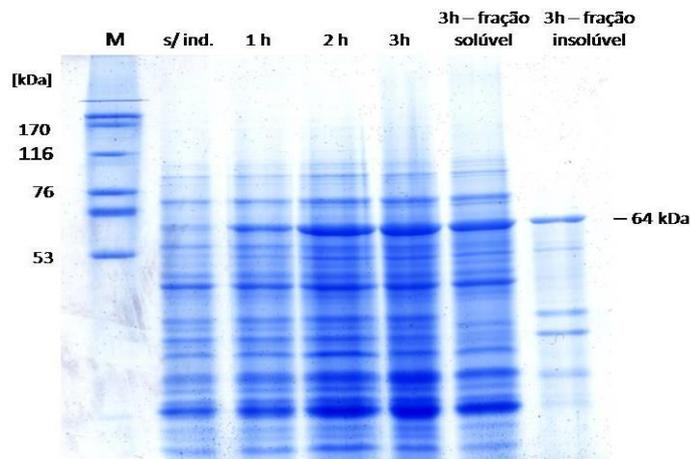


**Figura 9. Expressão da proteína MHP7448\_0551 (proteína hipotética) recombinante.** Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão de uma proteína de 56 kDa referente à proteína recombinante. A melhor indução da proteína recombinante foi nas linhagens 1 e 4. 1 – *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. 2 – *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. 3 – *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus. 4 – *E. coli* BL21 (DE3) RP. 5 – *E. coli* BL21 (DE3) Star. Ind. – cultura induzida. Ñ ind. – cultura não induzida. M – marcador de massa molecular.



**Figura 10. Expressão da proteína MHP7448\_0010 (HrcA) recombinante.** Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão de uma proteína de 64 kDa referente à proteína recombinante. A melhor indução da proteína recombinante foi nas linhagens 1 e 2. 1 – *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. 2 – *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. 3 – *E. coli* BL21 (DE3) RP. 4 – *E. coli* BL21 (DE3) Star. 5 – *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus. Ind. – cultura induzida. Ñ ind. – cultura não induzida. M – marcador de massa molecular.

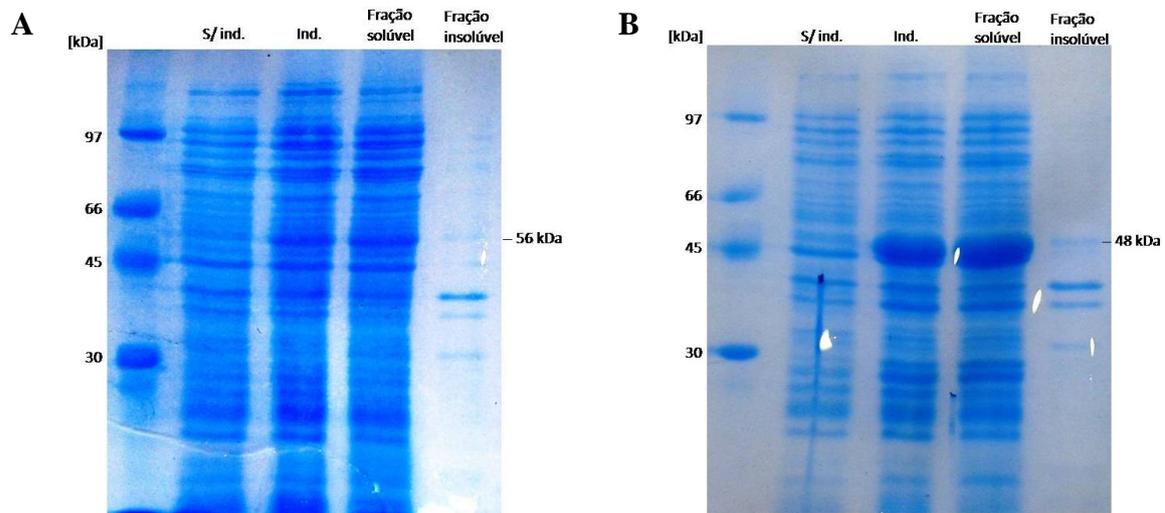
Na determinação da solubilidade das proteínas através da lise celular por sonicação foi verificado que as proteínas MHP7448\_0551 (proteína hipotética) e MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) recombinantes estavam na fração insolúvel (dados não mostrados), enquanto que a maior parte da proteína MHP7448\_0010 (HrcA) recombinante encontrava-se na fração solúvel (Figura 11).



**Figura 11. Análise da solubilidade da proteína MHP7448\_0010 (HrcA) recombinante.** Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão de uma proteína de 64 kDa referente à proteína recombinante após 1, 2 e 3 horas de indução e após 3 horas a separação das frações solúvel e insolúvel. Após a separação das frações celulares verificou-se que a maior parte da proteína recombinante encontrava-se na fração solúvel. M – marcador de massa molecular. s/ind. – cultura não induzida.

#### 4.4 – Solubilização das proteínas recombinantes

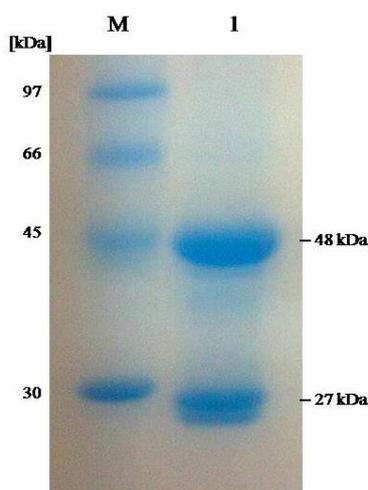
A solubilização das proteínas recombinantes MHP7448\_0551 e MHP7448\_0639 (proteínas hipotéticas) foi possível com todas as concentrações de sarcosil testadas (Figura 12A e B). Escolheu-se a menor concentração de sarcosil testada (0,5%) para interferir menos com a ligação das proteínas na coluna de afinidade.



**Figura 12. Resultado da solubilização das proteínas recombinantes MHP7448\_0551 (proteína hipotética) e MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) com 0,5% de sarcosil.** (A) Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão de uma proteína de 56 kDa referente à proteína MHP7448\_0551 recombinante. A maior parte da proteína recombinante encontra-se na fração solúvel após solubilização com 0,5% de sarcosil. (B) Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão de uma proteína de 48 kDa referente à proteína MHP7448\_0639 recombinante. Quase a totalidade da proteína recombinante encontra-se na fração solúvel após solubilização com 0,5% de sarcosil. M – marcador de massa molecular. s/ind. – cultura não induzida. Ind – cultura induzida.

#### 4.5 – Purificação das proteínas recombinantes

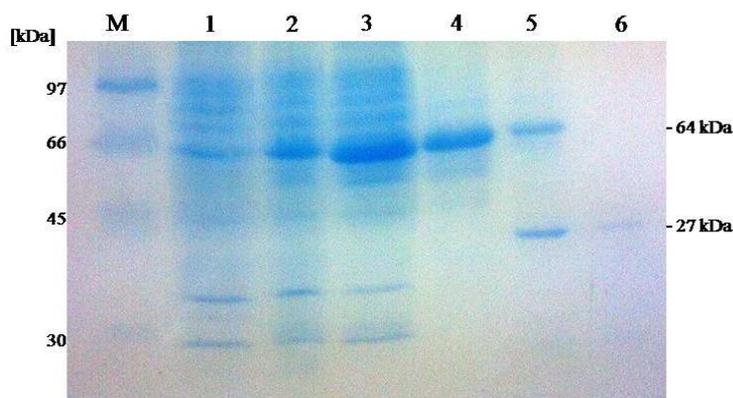
As proteínas recombinantes produzidas neste trabalho foram purificadas por meio de sua cauda de GST (Glutathione S-Transferase) adquirida através da clonagem no vetor pGEX 4T1. Após a solubilização, a fração solúvel do extrato celular contendo a proteína recombinante foi incubada com a resina para ligação da proteína e posterior eluição. A proteína MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) foi eluída da coluna com o tampão de eluição contendo 20 mM de glutathione reduzida e 50 mM de Tris-HCl (pH 8). Toda a proteína foi recolhida na primeira eluição de 2 mL da coluna (Figura 13). Junto com a proteína de fusão de 48 kDa foi co-purificada uma proteína de 27 kDa, referente à proteína GST. A clivagem da proteína de fusão com trombina não foi realizada.



**Figura 13. Purificação da proteína recombinante MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ).** Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a purificação de uma banda de 48 kDa referente à proteína MHP7448\_0639 recombinante. Foi co-purificada uma banda de 27 kDa referente à proteína GST. I – purificação da proteína de fusão. M – marcador de massa molecular.

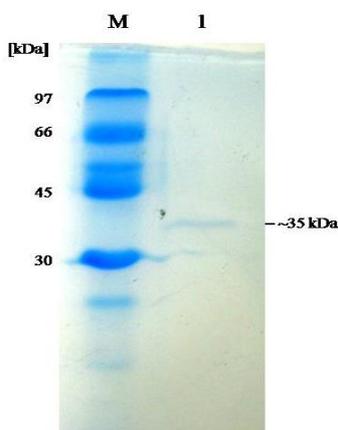
As proteínas recombinantes MHP7448\_0010 (HrcA) e MHP7448\_0551 (proteína hipotética) foram incubadas com a resina com a mesma metodologia utilizada para a proteína MHP7448\_0639, porém antes de sua eluição foi feita a clivagem da proteína de fusão com trombina. Não foi recuperada nenhuma proteína após a ligação de MHP7448\_0010 (HrcA) com a resina, nem após a eluição da clivagem com trombina, nem após a eluição com o tampão de glutathione reduzida. Porém houve ligação da proteína de fusão à resina, e após a clivagem com trombina apenas a GST permaneceu ligada à resina, não sendo mais detectada a proteína de fusão, como mostrado na Figura

14. Desse modo, parece que de alguma forma a proteína se perdeu, pois não foi observada nenhuma banda nas eletroforeses de todas as amostras eluídas da coluna.



**Figura 14. Expressão e purificação da proteína recombinante MHP7448\_0010 (HrcA).** Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a expressão de uma banda de 64 kDa referente à proteína recombinante MHP7448\_0010. Apesar da proteína de fusão ter se ligado à resina (coluna 5) e não estar mais presente após a clivagem com trombina (coluna 6), nenhuma proteína foi eluída após as lavagens da coluna. 1 – cultura não induzida. 2 – cultura induzida. 3 – fração solúvel. 4 – fração insolúvel. 5 – resina após a ligação da proteína de fusão. 6 – resina após a clivagem da proteína de fusão com trombina. M – marcador de massa molecular.

Da mesma forma, a clivagem com trombina foi realizada para clivar a proteína de fusão e liberar a proteína MHP7448\_0551 (proteína hipotética) pura. Foi detectada uma pequena banda na primeira eluição da coluna após a clivagem. Entretanto, essa banda apresenta cerca de 35 kDa, enquanto que a banda esperada da proteína após a clivagem com trombina seria de 30 kDa (Figura 15). É necessário repetir o experimento a fim de confirmar se a banda produzida é realmente a proteína MHP7448\_0551 clivada.



**Figura 15. Purificação da proteína recombinante MHP7448\_0551 (proteína hipotética).** Gel de SDS-PAGE 12% mostrando a purificação de uma pequena banda de aproximadamente 35 kDa referente à proteína MHP7448\_0551 após a clivagem da proteína de fusão com trombina. A banda esperada após a clivagem da proteína de fusão era de 30 kDa. 1 – proteína purificada. M – marcador de massa molecular.

## 5. DISCUSSÃO

A conclusão do sequenciamento de diversas espécies de *Mycoplasma* permitiu a atenção de vários pesquisadores para os mecanismos que regulam e controlam a expressão gênica nesses microrganismos. A identificação das regiões do DNA que regulam a transcrição nos micoplasmas é precária, pois a predição *in silico* dessas sequências é dificultada em virtude das características peculiares do genoma destas bactérias (A+T rico) e a predição *in vivo* apresenta problemas devido à ausência de metodologias que possibilitem tal estudo, como transformação e vetores de clonagem e expressão organismo-específicos. No entanto, apesar das dificuldades, recentemente vários avanços foram feitos na descoberta das sequências envolvidas no início da transcrição, como a elucidação de que a região -10 dos promotores tem maior importância para o início da transcrição do que a região -35 (HALBEDEL *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2012). Em *M. hyopneumoniae* foi inclusive feito o mapeamento dos possíveis promotores no genoma dessa bactéria (WEBER *et al.*, 2012). Entretanto, apesar de progressos na detecção das sequências que controlam o início da transcrição, poucos estudos foram feitos sobre a identificação de proteínas que regulam essas regiões.

Em 2007, Weber propôs-se a purificar o fator  $\sigma$  de *M. hyopneumoniae* a fim de posteriormente reconstituir a RNA polimerase holoenzima dessa bactéria com o objetivo de identificar *in vitro* as regiões controladoras de *M. hyopneumoniae*. Porém, após a super-expressão dessa proteína em *E. coli*, a proteína foi obtida somente na fração insolúvel, impossibilitando sua purificação e a reconstituição da RNA polimerase para os experimentos de identificação de promotores.

Reolon (2010) realizou um estudo importante relacionado às proteínas regulatórias, identificando as proteínas que se ligam ao DNA em *M. hyopneumoniae*. Nesse trabalho foram identificadas experimentalmente 32 proteínas e nos ensaios *in silico* 59 proteínas que se ligam ao DNA. Das proteínas identificadas experimentalmente, quatro são sabidamente envolvidas com a transcrição: a subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase (*RpoA* – MHP7448\_0168), a proteína anti-terminação transcricional NusG (MHP7448\_0637), o repressor transcricional induzido por calor HrcA (MHP7448\_0010) e o regulador transcricional MHP7448\_0279. Entre as proteínas identificadas pelos métodos *in silico*, seis foram relacionadas à transcrição.

São elas HrcA, a subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase, o fator sigma da RNA polimerase (*RpoD* – MHP7448\_0060), a subunidade  $\beta'$  da RNA polimerase (*RpoB*– MHP7448\_0616), o regulador transcricional MHP7448\_0279 e o fator de alongamento transcricional NusA (MHP7448\_0586). A partir desse estudo foram selecionados os potenciais fatores de transcrição que seriam expressos no presente trabalho. As proteínas HrcA (MHP7448\_0010) e regulador transcricional (MHP7448\_0279) foram identificados tanto nas análises experimentais quanto nas análises *in silico*, se tornando bons alvos para o estudo de fatores de transcrição. Além disso, essas proteínas são preditas como fatores de transcrição pelo DBD (*Transcriptional Factor Prediction Database*), que também prediz como fator transcricional a proteína hipotética MHP7448\_0551. Essa proteína também foi identificada nas análises *in silico* do trabalho de Reolon (2010) como apresentando ligação ao DNA, e dessa forma foi incluída para os experimentos de expressão do nosso trabalho.

A última proteína incluída nos experimentos de expressão, a proteína hipotética MHP7448\_0639, foi escolhida com base nos trabalhos de Reolon (2010) e de Fonsêca *et al.* (2012), que demonstraram que esta proteína possui similaridades estruturais com o fator  $\sigma^{28}$  de *B. subtilis* e *A. aeolicus*. Esse fato torna essa proteína muito interessante, pois até o momento apenas um fator  $\sigma$  foi identificado em *M. hyopneumoniae*, assim como nas outras bactérias pertencentes ao gênero (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005). Entretanto, como os promotores de *M. hyopneumoniae* apresentam pouca conservação na região -35, isso sugere que outros fatores  $\sigma$  podem estar presentes, sendo uma forma de responder rapidamente às mudanças ambientais. Dessa forma, caso MHP7448\_0639 se confirmar como um fator  $\sigma$  alternativo, ela pode estar envolvida em alguma resposta ao estresse, como é visto nas demais bactérias (MOONEY *et al.*, 2005), revelando processos regulatórios até então não entendidos em *M. hyopneumoniae*.

Chang *et al.* (2008) expressaram a proteína HrcA de *M. hyopneumoniae* e identificaram a região do DNA à qual ela se liga. Esse repressor transcricional induzido por temperatura controla a expressão de proteínas de choque térmico nesse microrganismo. Assim como nas demais bactérias, HrcA se liga a uma região do DNA denominada elemento CIRCE (do inglês *controlling inverted repeat of chaperon expression*) (ZUBER & SCHUMANN, 1994; CHANG *et al.*, 2008), de forma a regular negativamente a expressão das proteínas as quais se liga. Chang *et al.* (2008)

identificaram uma região perfeitamente repetida e invertida à frente do gene que codifica a proteína DnaK de *M. hyopneumoniae*, abrangendo os nucleotídeos -101 a -85 à montante do códon de iniciação. Ao testar essa região em ensaios de retardo de mobilidade eletroforética verificaram que ocorre a ligação da proteína HrcA com o elemento CIRCE detectado. Ao procurar por motivos semelhantes no genoma de *M. hyopneumoniae* em busca de possíveis elementos CIRCE, encontraram duas possíveis regiões em *M. hyopneumoniae* 7448, uma à frente do gene que codifica a proteína DnaK e outra à frente do gene que codifica a proteína ClpB, ambas proteínas de choque térmico. Portanto, como as regiões do DNA as quais a proteína HrcA se liga já são conhecidas, essa proteína está sendo purificada no presente estudo de modo a servir como controle em futuros estudos de imunoprecipitação de cromatina, a fim de identificar as regiões do DNA as quais as proteínas regulatórias se ligam. Além de servir como controle, podem ser identificadas novas regiões de ligação ao DNA para HrcA, uma vez que até onde se sabe essa é a única proteína envolvida na regulação das proteínas de choque térmico em *M. hyopneumoniae*.

Para possibilitar a expressão heteróloga de genes de *M. hyopneumoniae* em *E. coli* devem ser observados os genes do micoplasma que possuem códons TGA codificando triptofano, pois esses códons são lidos como sinal de término de transcrição em *E. coli*, levando a produção de uma proteína truncada. Neste trabalho, dois dos quatro genes selecionados apresentavam a presença de um códon TGA codificando triptofano, sendo necessário realizar a mutagênese sítio-dirigida para substituir o códon TGA por TGG, que codifica triptofano no código genético universal, de forma a expressar corretamente as proteínas em *E. coli*. A metodologia que utilizamos para a mutagênese é conhecida pelo nome de *overlap extension PCR*, e foi escolhida por ser um método rápido, simples e eficiente na geração de produtos de PCR mutados (SIMIONATTO *et al.*, 2009). A utilização dessa técnica foi muito satisfatória, pois produziu as sequências completas dos dois genes testados e os dois clones de MHP7448\_0010 (HrcA) sequenciados apresentaram a substituição A→G corretamente.

As clonagens dos genes amplificados no vetor de expressão pGEX 4T1 foram realizadas por recombinação homóloga *in vivo*. Essa técnica foi escolhida como metodologia para clonar as proteínas alvo devido à sua praticidade e eficiência, além de ser uma técnica econômica. É possível, por meio dela, a obtenção de clones com os produtos corretos com boa eficiência (mais de 67%) a partir de apenas 20 nucleotídeos

homólogos ao vetor em cada extremidade (PARRISH *et al.*, 2004). Neste trabalho foram utilizados 20 nucleotídeos homólogos em uma extremidade e 24 na outra, de forma a obter uma clonagem eficiente. O vetor pGEX 4T1 foi clivado com duas enzimas de restrição, EcoRI e NotI, de forma a aumentar a eficiência da clonagem e diminuir a re-ligação do vetor. No entanto, ainda assim não obtínhamos uma clonagem eficiente, mostrando um *background* muito grande de colônias nas células transformadas apenas com o vetor, sem a adição do inserto. Esse problema foi resolvido com a purificação do vetor clivado a partir do gel de agarose, obtendo assim um *background* aceitável para a detecção de colônias recombinantes. A eficiência da clonagem foi de 43% para o gene MHP7448\_0551 (proteína hipotética), 29% para o gene MHP7448\_0010 (HrcA) e 100% para o gene MHP7448\_0639 (proteína hipotética - possível fator  $\sigma$ ). Nenhum clone foi detectado para MHP7448\_0279 (regulador transcricional), embora tenha ocorrido a presença de colônias transformantes. A variação entre a eficiência das clonagens e o fato de nenhum clone ser obtido para MHP7448\_0279 podem ser resolvidos aumentando-se o número de nucleotídeos homólogos ao vetor, etapa que aumenta a eficiência da clonagem (PARRISH *et al.*, 2004).

O sistema de expressão escolhido nesse trabalho foi o vetor pGEX 4T1. Este vetor tem um promotor forte (*tac*), que permite um elevado nível de transcrição da sequência clonada sendo fortemente regulado para minimizar cargas metabólicas durante a multiplicação na célula hospedeira, além de ser quimicamente induzível por IPTG (WEICKERT *et al.*, 1996). Além disso, o vetor expressa a proteína de interesse em fusão com a GST, o que torna possível a sua purificação por cromatografia de afinidade a partir de extratos de *E. coli*, além de possibilitar a clivagem da proteína de interesse da GST a partir de um sítio de clivagem proteolítico reconhecido por trombina.

As diferentes linhagens de *E. coli* utilizadas para a indução da expressão das proteínas mostraram diferentes resultados na expressão das proteínas recombinantes. Para todas as proteínas expressas, a linhagem que obteve melhor resultado na expressão foi a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. Esta linhagem possui os genes que codificam tRNAs para os códons arginina, isoleucina, leucina, prolina e glicina (KANE, 1995), sendo que 26% da sequência de MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ), 28% da sequência de MHP7448\_0551 (proteína hipotética) e 31% da sequência

de MHP7448\_0010 (HrcA) são constituídas por esses aminoácidos. A proteína melhor expressa foi MHP7448\_0639 (proteína hipotética - possível fator  $\sigma$ ), enquanto que a expressão de MHP7448\_0551 (proteína hipotética) e MHP7448\_0010 (HrcA) foi menor. Para melhorar a expressão dessas proteínas poderiam ser testadas outras linhagens bacterianas de expressão, outras condições de indução da expressão, ou ainda outros sistemas de expressão, como por exemplo utilizando cauda de polihistidina (pET).

A insolubilidade das proteínas recombinantes representa uma dificuldade para estudos estruturais e funcionais de proteínas. Apenas cerca da metade de todas as proteínas recombinantes, mesmo aquelas de origem bacteriana, são solúveis quando expressas em *E. coli* (CHRISTENDANT *et al.*, 2000). A expressão de proteínas em um sistema heterólogo pode levar à formação de corpos de inclusão, e conseqüentemente, à insolubilidade do produto protéico. Os corpos de inclusão são agregados de proteínas, e ocorrem pela deposição de polipeptídeos mal dobrados ou parcialmente dobrados, de modo que a agregação está ligada a conformação e a estabilidade da proteína (FINK, 1998; VILLAVERDE & CARRIÓ, 2003). A insolubilidade pode ser gerada por inúmeros fatores, como a auto-agregação de intermediários conformacionais e a agregação com os componentes da membrana plasmática durante ou após a lise da célula (FRANKEL *et al.*, 1991).

As proteínas MHP7448\_0551 (proteína hipotética) e MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) recombinantes se mostraram insolúveis quando expressas no vetor pGEX 4T1. Para a solubilização dessas proteínas foi utilizado o detergente sarcosil na concentração de 0,5%. O sarcosil é um detergente iônico amplamente utilizado na solubilização de proteínas (FRANKEL *et al.*, 1991; FRANGIONI & NEEL, 1993; TAO *et al.*, 2010) e seu uso é capaz de inibir as agregações de proteínas com componentes da membrana celular da bactéria (FRANKEL *et al.*, 1991). O uso de detergentes apresenta uma vantagem na solubilização de proteínas, pois as proteínas solubilizadas com esses reagentes são frequentemente ativas, não sendo necessária uma etapa de redobrimento para a proteína voltar a sua forma nativa (VILLAVERDE & CARRIÓ, 2003). A solubilização das proteínas MHP7448\_0551 e MHP7448\_0639 com 0,5% de sarcosil foi bastante eficiente, e quase a totalidade dessas proteínas foi solubilizada.

Após a solubilização da proteína MHP7448\_0639 (proteína hipotética – possível fator  $\sigma$ ) com 0,5% de sarcosil foi possível purificar a proteína recombinante com o uso da resina Glutathione Sepharose 4B. Em ensaios anteriores, utilizando 1,5% de sarcosil para a solubilização da proteína, a purificação não foi possível, pois a proteína não se ligou à resina. Isso ocorre devido ao fato que ao desfazer os agregados protéicos, o detergente encapsula a proteína, prejudicando sua capacidade de ligação à resina (TAO *et al*, 2010). Esse problema pode ser resolvido com o uso de detergentes não-iônicos após a solubilização das proteínas, pois eles são capazes de sequestrar o sarcosil, resultando no aumento da ligação da proteína à resina (FRANGIONI & NEEL, 1993). Entretanto, mesmo com o uso de 2% do detergente Triton X-100 a proteína continuou não se ligando à resina. Com a diminuição da concentração de sarcosil para 0,5% a proteína recombinante se manteve solúvel e sua ligação à resina foi possível. Porém, uma grande fração da proteína de fusão permaneceu no extrato celular, sem se ligar à resina, apesar do uso de 2% de Triton X-100 (dados não mostrados). Alguns estudos apontam que o uso concomitante de Triton X-100 e CHAPS tem um efeito sinérgico com o sarcosil, sendo que o seu uso em conjunto funciona melhor do que quando são usados sozinhos contra o detergente iônico. Foi postulado que o uso de Triton X-100 e CHAPS forma grandes estruturas mistas de micelas que incorporam as moléculas de sarcosil da solução e dessa forma diminuem a concentração aparente de sarcosil em torno da GST, potencialmente liberando sítios ativos ou facilitando o redobramento adequado das proteínas (TAO *et al*, 2010). Esta estratégia utilizando os dois detergentes não iônicos deve ser utilizada nas próximas purificações de proteínas, a fim de aumentar a quantidade de proteína purificada.

A purificação de MHP7448\_0010 (HrcA) não foi bem sucedida. Apesar de haver a ligação de uma fração da proteína recombinante à resina, esta proteína não foi eficientemente eluída da coluna. Assim como aconteceu com MHP7448\_0639, a maior parte da proteína recombinante não se ligou à resina (o mesmo ocorreu com MHP7448\_0551), apesar de não ter sido utilizado sarcosil nessa proteína, pois a mesma já se encontrava na fração solúvel. A clivagem com trombina pode ter afetado a estrutura da proteína, ou ela pode ter se ligado diretamente à resina, não sendo eluída com os tampões utilizados na coluna. Como apenas um experimento para purificação dessa proteína foi realizado, ainda não se podem tirar muitas conclusões sobre o resultado, pois pode ter ocorrido algum problema na execução da técnica que levou a

esse efeito. Dessa forma, a purificação dessa proteína deve ser repetida com o intuito de descobrir o que aconteceu com a proteína de fusão e tentar purificar a proteína recombinante corretamente.

Na purificação de MHP7448\_0551 (proteína hipotética) uma pequena banda de cerca de 35 kDa foi detectada na eletroforese após a clivagem da proteína de fusão com trombina. A proteína esperada era de 30 kDa, entretanto, algumas proteínas apresentam migração eletroforética anormal em géis de SDS-PAGE, apresentando menor mobilidade do que prevê sua massa molecular, como é o caso de fatores  $\sigma$  (LIU & MATSUMURA, 1995). Da mesma forma que com MHP7448\_0010 (HrcA), apenas um experimento de purificação foi realizado, e apenas um gel de poliacrilamida foi corrido na eletroforese. É necessário repetir a eletroforese a fim de verificar se a proteína tem realmente esse tamanho. Além disso, a eficiência da purificação foi muito baixa, sendo purificadas apenas 60  $\mu$ g da proteína por litro de cultivo. O uso de Triton X-100 e CHAPS para diminuir o efeito do sarcosil na ligação da proteína recombinante à resina deve ser testado com o objetivo de aumentar a eficiência da purificação.

Depois de purificadas, as proteínas provenientes deste estudo serão utilizadas em ensaios para determinar que regiões do DNA esses possíveis fatores de transcrição se ligam. Para isso, a partir das proteínas purificadas pretende-se produzir anticorpos para serem usados em ensaios de imunoprecipitação de cromatina. Através dessa técnica é possível determinar se existe a ligação direta de um determinado fator de transcrição a uma região reguladora de interesse através da imunoprecipitação desta cromatina com anticorpo específico para o fator de transcrição. Após a detecção das regiões de ligação dessas proteínas, pretende-se também realizar o experimento de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA), com o objetivo de confirmar a ligação dos fatores de transcrição às regiões do DNA determinadas e definir qual é a afinidade de ligação por essas regiões.

A expressão das proteínas recombinantes foi bem sucedida para três dos potenciais fatores de transcrição analisados neste trabalho. Apenas um gene, o regulador transcricional MHP7448\_0279 não foi expresso, pois sua clonagem não foi eficiente. A expressão, purificação e o posterior uso dessas proteínas regulatórias de *M. hyopneumoniae* serão de grande utilidade para o entendimento de processos regulatórios nessa bactéria, uma vez que ainda existe escassez de dados disponíveis na literatura que auxiliem na compreensão da regulação gênica em micoplasmas, principalmente

relacionados às proteínas envolvidas nesse processo. A expressão eficiente de três potenciais fatores de transcrição de *M. hyopneumoniae* torna possível a caracterização dessas proteínas e identificação das regiões do DNA que elas controlam na bactéria de estudo, possibilitando alavancar o entendimento do processo de regulação gênica neste microrganismo.

## 6. REFERÊNCIAS

BARRÉ, A; DARUVAR, A. & BLANCHARD, A. MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic Acids Res.*, 32 (Database issue): D307-D310, 2004.

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.

BROWNING, D. F. & BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat.Rev.Microbiol.*, 2(1): 57-65, 2004.

CALDERON-COPETE, S. P.; WIGGER, G.; WUNDERLIN, C.; SCHMIDHEINI, T.; FREY, J.; QUAIL, M. A. & FALQUET, L. The *Mycoplasma conjunctivae* genome sequencing, annotation and analysis. *BMC Bioinf.*, 10(Suppl 6): S7, 2009.

CASES, I; DE LORENZO, V. & OUZONIS, C. A. Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *TrendsMicrobiol.*, 11(6): 248-253, 2003.

CHAMBAUD, I; HEILIG, R.; FERRIS, S.; BARBE, V.; SAMSON, D.; GALISSON, F.; MOSZER, I.; DYBVIG, K.; WROBLEWSKI, H.; VIARI, A.; ROCHA, E. P. & BLANCHARD, A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res.*, 29(10): 2145-2153, 2001.

CHANG, L.-J.; CHEN, W.-H.; MINION, F. C. & SHIUAN, D. Mycoplasmas regulate the expression of heat-shock protein genes through CIRCE-HrcA interactions. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 367(1): 213-218, 2008.

CHERRY, J. L. Genome size and operon content. *J.Theor.Biol.*, 221(3): 401-410, 2003.

CHRISTENDAT, D.; YEE, A.; DHARAMSI, A.; KLUGER, Y.; GERSTEIN, M.; ARROWSMITH, C. H. & EDWARDS, A. M. Structural proteomics: prospects for high throughput sample preparation. *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, 73(5): 339-345, 2000.

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.

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.

DYBVIG, K. & VOELKER, L.L. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu.Rev.Microbiol.*, 50: 25-57, 1996.

DYBVIG K.; ZUHUA C.; LAO P.; JORDAN D. S.; FRENCH C. T.; TU A. H. & LORAINÉ A. E. Genome of *Mycoplasma arthritidis*. *Infect.Immun.*, 76(9): 4000-4008, 2008.

FINK, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *FoldDes.*, 3(1): R9-23, 1998.

FONSÊNCA, M. M.; ZAHA, A.; CAFFARENA, E. R. & VASCONCELOS, A. T. Structure-based functional inference of hypothetical proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J.Mol.Model.*, 18(5): 1917-1925, 2012.

FRANGIONI, J. V. & NEEL, B.G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal.Biochem.*, 210(1): 179-187, 1993.

FRANKEL, S.; SOHN, R. & LEINWAND, L. The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 88(4): 1192-1196, 1991.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERVALAGE, 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. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord.Vet.Med.*, 27(6): 337-339, 1975.

GARDNER, S. W. & MINION, F. C. Detection and quantification of intergenic transcription in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology*, 156 (Pt 8): 2305-2315, 2010.

GIBSON, D. G.; BENDERS, G. A.; ANDREWS-PFENNKOCH, C.; DENISOVA, E. A.; BADEN-TILLSON, H.; ZAVERI, J.; STOCKWELL, T. B.; BROWNLEY, A.; THOMAS, D. W.; ALGIRE, M. A.; MERRYMAN, C.; YOUNG, L.; NOSKOV, V. N.; GLASS, J.I.; VENTER, C.; HUTCHISON III, C. A. & SMITH, O. Complete chemical synthesis, assembly and cloning of *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 319(5867): 1215-1220, 2008.

GIBSON, D. G.; GLASS, J.I; LARTIGUE, C.; NOSKOV, V. N.; CHUANG, R. Y.; ALGIRE, M. A.; BENDERS, G. A.; MONTAGUE, M. G.; MA, L.; MOONDIE, M. M.; MERRYMAN, C.; VASHEE, S.; KRISHNAKUMAR, R.; ASSAD-GARCIA, N.; ANDREWS-PFENNKOCH, C.; DENISOVA, E. A.; YOUNG, L.; QI, Z. Q.; SEGALL-SHAPIRO, T. H.; CALVEY, C. H.; PARMAR, P. P.; HUTCHISON III, C. A.; SMITH, O. & VENTER, C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 329(5986): 52-56, 2010.

GLASS, J.I.; ASSAD-GARCIA, N.; ALPEROVICH, N.; YOOSEPH, S.; LEWIS, M.R.; MARUF, M.; HUTCHISON III., C.A.; SMITH, H.O. & VENTER, J.C. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 103(2): 425–430, 2006.

GOODWIN, R. F. W.; POMEROY, A. P. & WHITTLESTONE, P. Production of enzootic pneumonia in pigs with a *Mycoplasma*. *Vet.Rec.*, 77: 1247-1249, 1965.

GÜELL, M.; NOORT, V.; YUS, E.; CHEN, W.-H.; LEIGH-BELL, J.; MICHALODIMITRAKIS, K.; YAMADA, T.; ARUMUGAM, M.; DOERKS, T.; KÜHNER, S.; RODE, M.; SUYAMA, M.; SCHMIDT, S.; GAVIN, A.-C.; BORK, P. & SERRANO, L. Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science*, 326 (5957): 1268-1271, 2009.

HALBEDEL, S. & STULKE, J. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. *Int.J.Med.Microbiol.*, 297(1): 37-44, 2007.

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.*, 371(3): 596-607, 2007.

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

HIMMELREICH, R.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; PIRKL, E.; LI, B. C. & HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, 24(22): 4420-49, 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.

HUTCHISON, C. A. III; PETERSON S. N.; GILL, R. S.; CLINE, R. T.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; SMITH, H. O. & VENTER, J. C. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science*, 286(5447):2165–2169, 1999.

JAFFE, J. D.; STANGE-THOMANN, N.; SMITH, C.; DECAPRIO, D.; FISHER, S.; BUTLER, J.; CALVO, S.; ELKINS, T.; FITZGERALD, M. G.; HAFEZ, N.; KODIRA, C. D.; MAJOR, J.; WANG, S.; WILKINSON, J.; NICOL, R.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B.; BERG, H. C. & CHURCH, G. M. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *GenomeRes.*, 14(8): 1447-61, 2004.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 6(5): 494-500, 1995.

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A. M.; ALLONI, G.; AZEVEDO, V.; BERTERO, M. G.; BESSIERES, P.; BOLOTIN, A.; BORCHERT, S.; BORRIS, 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.

LEWIN, B. Transcription. In: *Genes IX*. Artmed, 2008.

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

LIU, W.; FENG, Z.; FANG, L.; ZHOU, Z.; LI, Q.; LI, S.; LUO, R.; WANG, L.; CHEN, H.; SHAO, G. & XIAO, S. Complete sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J.Bacteriol.*, 193 (4): 1016-1017, 2011.

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.

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.*, 76(8): 3784-3785, 1979.

MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; EDWARDS, R. & MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infect. Immun.*, 74(1): 160 -166, 2006a.

MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L. & MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology*, 152(Pt 4): 937-944, 2006b.

MADSEN, M. L.; PUTTAMREDDY, S.; THACKER, E. L.; CARRUTHERS, M. D. & MINION, F. C. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infect. Immun.*, 76(2): 658-663, 2008.

MAEDA, H.; FUJITA, N. & ISHIHAMA, A. Competition among seven *Escherichia coli*  $\sigma$  units: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 28(18): 3497-3503, 2000.

MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H. & KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet.Quart.*, 18(3): 104-109, 1996.

MAES, D; SEGALLES, J; MEYNS, T; SIBILA, M.; PIETERS, M. & HAESEBROUK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet.Microbiol.*, 126(4): 297-309, 2008.

MARÉ, C. J. & SWITZER, W. P. *Vet Med Small Anim Clin* 60: 841-846, 1965.

- MARTÍNEZ-ANTONIO, A. & COLLADO-VIDES, J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.*, 6(5): 482-489, 2003.
- 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):7123-33, 2004.
- MIROSLAVOVA, N. S. & BUSBY, S. J. Investigations of the modular structure of bacterial promoters. *Biochem. Soc. Symp.*, (73): 1-10, 2006.
- 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.
- MUSATOVOVA, O.; DHANDAYUTHAPANI, S. & BASEMAN, J. B. Transcriptional starts for cytoadherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol.Lett.*, 229(1):73-81, 2003.
- MUSATOVOVA, O.; DHANDAYUTHAPANI, S. & BASEMAN, J. B. Transcriptional heat shock response in the smallest known self-replicating cell, *Mycoplasma genitalium*. *J.Bacteriol.*, 188(8): 2845-2855, 2006.
- ONEAL, M. J.; SCHAFER, E. R; MADSEN, M. L. & MINION, F. C. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to norepinephrine. *Microbiology*, 154(Pt 9): 2581-2588, 2008.
- PAPAZISI, L.; GORTON, T. S.; KUTISH, G.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F.; NGUYEN, D. K.; SWARTZELL, S.; MADAN, A.; MAHAIRAS, G. & GEARY, S.J. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R (low). *Microbiol.*, 149(Pt 9): 2307-2316, 2003.
- PARRISH, J. R.; LIMJINDAPORN, T.; HINES, J. A.; LIU, J.; LIU, G. & FINLEY, R. L. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by *in vivo* recombination in *Escherichia coli*. *J.Proteome Res.*, 3(3): 582-586, 2004.
- PÉREZ-RUEDA, E. & COLLADO-VIDES, J. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, 28(8): 1838-1847, 2000.
- PÉREZ-RUEDA, E. & MARTINEZ-NUÑEZ, M. A. The repertoire of DNA-binding transcription factors in prokaryotes: functional and evolutionary lessons. *Sci.Prog.*, 95(Pt 3): 315-329, 2012.
- PITCHER, D. G. & NICHOLAS, R. A. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? *Vet.J.*, 170(3): 300-306, 2005.
- RANEA, J. A.; GRANT, A.; THORNTON, J. M. & ORENCO, C. A. Microeconomic principles explain an optimal genome size in bacteria. *TrendsGenet.*, 21(1): 21-25, 2005.

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

RAZIN, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Biosci.Rep.*, 19 (5): 367-372, 1999.

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.

RAZIN, S. & HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. *Biologicals.*, 38(2): 183-190, 2010.

REOLON, L. A. Análise de proteínas que ligam ao DNA de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, 2010.

RIBEIRO, F. C.; SILVA, J. C. P.; SANTOS, J. L. & PONTES, K. C. S. Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*, 56(6): 709-714, 2004.

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

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B., *et al.* *Disease of swine*. 8th. Iowa: Iowa State University, 1999. p. 495-509.

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.

SIQUEIRA, F. M.; SCHRANK, A. & SCHRANK, I. S. *Mycoplasma hyopneumoniae* transcription unit organization: genome survey and prediction. *DNA Res.*, 18 (6): 413-422, 2011.

SCHAFER, E. R.; ONEAL, M. J.; MADSEN, M. L. & MINION, F. C. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 153(Pt 11): 3785-3790, 2007.

SIMIONATTO S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI, V.; LUERCE, T. D.; HARTWIG, D. D.; MOREIRA, A. N. & DELLAGOSTIN, O. A. Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. *J.Microbiol. Methods*, 79(1): 101-105, 2009.

SIRAND-PUGNET, P.; LARTIGUE, C.; MARENDA, M.; JACOB, D.; BARRE, A.; BARBE, V.; SCHENOWITZ, C.; MANGENOT, S.; COULOUX, A.; SEGURENS, B.; DE DARUVAR, A.; BLANCHARD, A. & CITTI, C. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoSGenet.*, 3(5): e75, 2007.

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.; MORAES, N.; CARVALHO, L. F. & OLIVEIRA, S. J. Pneumonia enzoótica. In: Clínica e patologia suína. 2.ed. Goiânia: Art 3 Impresses Especiais, 1999.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S. L.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R., KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.-S.; WU, Z.; PAULSENK, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E. W.; LORY, S. & OSLON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406 (6799): 959-964, 2000.

TAO, H.; LIU, W.; SIMMONS, B. N.; HARRIS, H. K.; COX, T. C. & MASSIAH, M. A. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques*, 48(1): 61-64, 2010.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim.HealthRes.Rev.*, 5(2): 317-320, 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.; MARANHÃO, 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.

VILLAVERDE, A. & CARRIÓ, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. Biotechnol.Lett., 25(17): 1385-1395, 2003.

WEBER, S. S. Fator  $\sigma$  de *Mycoplasma hyopneumoniae*: Mutagênese, Clonagem e Expressão. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

WEBER, S. S.; SANT'ANNA, F. H. & SCHRANK, I. S. Unveiling *Mycoplasma hyopneumoniae* promoters: sequence definition and genomic distribution. DNA Res., 19(2): 103-115, 2012.

WEICKERT, M. J.; DOHERTY, D. H.; BEST, E. A. & OLINS, P. O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. Curr.Opin.Biotechnol., 7(5): 494-499, 1996.

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

WEINER III, J.; ZIMMERMAN, C.-U.; GOHLMANN, H. W. H. & HERRMANN, R. Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. Nucleic Acids Res., 31(21): 6306-6320, 2003.

WESTBERG J.; PERSSON A.; HOLMBERG A.; GOESMANN A.; LUNDEBERG J.; JOHANSSON K. E.; PETTERSSON B. & UHLEN M. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). GenomeRes., 14(2): 221-227, 2004.

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.

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., 82(8): 2306-2309, 1985.

YUS, E.; MAIER, T.; MICHALODIMITRAKIS, K.; NOORT, V.; YAMADA, T.; CHEN, W.-H.; WODKE, J. A.H.; GÜELL, M.; MARTÍNEZ, S.; BOURGEOIS, R.; KÜHNER, S.; RAINERI, E.; LETUNIC, I.; KALININA, O. V.; RODE, M.; HERRMANN, R.; GUTIÉRREZ-GALLEGO, R.; RUSSEL, R. B.; GAVIN, A.-C.; BORK, P. & SERRANO, L. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. Science, 326(5957): 1263-1268, 2009.

ZHANG, W. & BASEMAN, J. B. Transcriptional regulation of MG\_149, an osmoinducible lipoprotein gene from *Mycoplasma genitalium*. *Mol.Microbiol.*, 81(2): 327-339, 2011a.

ZHANG, W. & BASEMAN, J. B. Transcriptional response of *Mycoplasma genitalium* to osmotic stress. *Microbiology*, 157(Pt 2): 548-556, 2011b.

ZUBER, U. & SCHUMANN, W. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.*, 176(5): 1359-1363, 1994.



**7.2 – Sequências de nucleotídeos dos genes de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 utilizados neste trabalho.**

**A) MHP7448\_0010 (HrcA)**

```
1 ATGCCAAAAT TAGACTCAA AAAAGAAAA TATCTTAAAC AAATAGTCGA AAATTTTCATA
61 AAAACCGGTG AATCTATCGG TTCTCTTAAC TTAAAACAAA GTTATGGTAT CAAAAAATCA
121 CCTTCATATC TTCGGGCAAT TATGAATCAA CTTGAAAAGG AAGGATTCTT AGAAAAATCT
181 CATAGTTCAA GTGGCAGAAAT CCCGACTTTA CAAGGTTTTTC AATATTATGC GGAATTTTTTA
241 TCTTTTGACG AAAATGAAAA TTTAGCAAAC AAATTTAAAAG ATTTATTCGC CCGTCGTCGC
301 ATAAATATTG AAAACACAAT TTCTGAAGCC GTTAAATTAA TTTCTGAATC GGTGGTACT
361 ACCCTAATTG CAACAACAAA TAACGAAAAT GAACGATTAA TGTCAATAAA TTTAACGCAA
421 ATTTCCCAA ATGAAGGAAT TATTGTTGTT GTTAGTTCCA GTGGTAATGT GGAAAATAAA
481 AAAATAACTT TTTCTGAACA GATTCCAAGA CAAGATGTTA AAATTGCTAT TAGACTTTTC
541 CAGGAAAGAT TAATAAATAC ACCTTTGCTT GAAATTTCTT CAAAATTAGC TATTTTAAAA
601 CAGGAATTAG AGAAACAAAT TAAACACAGC GATGAACTTT TGCATCATTT TATGGAAAAA
661 ATTTTAAATT TTCAAGTCCA AAATAAGTCT AATATCTACA ATAAAAATTC GCTGATTTTG
721 GACAAGGAGA TTTCGCGGGC CAACTTGTT GATTTACTTT ATATAATTGA AAAAAAATCA
781 ATTTGAGAAA TGCTTGAAGA TCGAACAACA AAAGACGATG ATACCCTAAA AATCAGTATA
841 AAGTCCCCAG AAGTTTCATT TATTTGAAA AAATTTGAAA AATTTTTACC AATTAAGGAA
901 ATCAGTATGG TTGGGGCAGC TAAAAAATTT AATTATTCGG CCGCTCGAAC AGGTATAAAA
961 CTTTTGGAAG ATTTTTTATC AAACAAAAGC AAGATTAGAA AGGGATAA
```

Sublinhado: códon TGA codificando triptofano.

## B) MHP7448\_0279 (regulador transcripcional)

1 ATTATGAGTG TTCTAACCAT TTCAAAAAAT TTTAAATTAA CTCACATTGA AAAATTAATT  
61 ATCCGGTTTA TTGAAACAAA ACCACGAAAA TTTGTTGAGC AAACATATCAA TGAACCTGCA  
121 GCAACCTTAT TTATAAGTGT CGGAACAATT ACACAATTAA CAAAAAAGCT TGGATTTAAC  
181 AATTTCAAAG AATTAAAAAA ATTCGTAATT GAATGACTTA AGCTTGATGA AGATAATAAT  
241 TTATATAACG AAAACGACCA AATTGAAAAAT ATTAACCTGC TTTATGTACA CAGTATCGAG  
301 AAAACACTAG CAATTCTTAA TGTTTCGCAA ATTAATCGAA TTGTTGATAC TATTCCTAAA  
361 ATGGATAAAA TTATTACTTA TGGCACAGCT TCTTCAATAA CTGTTGCTAC AGAATTTTCA  
421 AATAATCTTA GAAATTTACA CCTTAATAGC CTATGCGCAA AAAATATTTT CGATATTGCC  
481 TCATGGATTG GCAATCCTGG TAGTACTTGC CTCGTTATTT TTTCGGTTTC AATGGCTTCA  
541 CGCGATGCAG TTGCGCTTAC TAAATTGGCA AAACAACACC AAATAAACAC CATTTTTATA  
601 ACTTCAAATA CAAATTTGGA AAAGAATTCA TTCTCAGAAG TAGTTTATTT TGATACTTTA  
661 GAACAAAATA ATAATATTTT TCCAGTTGGT TCTAAAGTAT CACAACTTTT TATTGGTGAT  
721 CTAATTTTCGT TAAAAATTCG AAAAAATTA AATAGTTCTC GTTCAGAATT TTTTAATGAA  
781 TTTAGACGTC TTTGGTATAA AAAAAATTA AATCATTA

Sublinhado: códon TGA codificando triptofano.

## C) MHP7448\_0551 (proteína hipotética)

1 TTAAAAATGA ATAGTAATTT AATTGATCAA CTTTCATTGT TATTAAAGCA AAATCGGAAT  
61 TTTATTGATA AGGAAATTGC CGGTTTTTTT CTTTTAAATA TTCAAAAAAT AATGTCTTTA  
121 AAGTTGGAAA TAATTGCCAA AAGTGCAAAT TGTTCAACTG CTTTCAGTTAT AAAATTTTGT  
181 AAAAAACTAG GTTTTAAAGG GCTAAAAGAT TTATTGCCCG CTTTAGATCG CAATTATTCG  
241 TATTTAAATT TCCAAAAAAA ACGTTATTCT GAGAACAAAA TTAGTCAAAA AAATCAAATT  
301 TTAAGCAAAT ATCATCTGTT GATAATGAAT AATCTTGATA AAATTTATAA TCTAAACTAT  
361 AATTCGATGA TAAAAATTTGT AAAATTATTA CAAAAAATC GACATATAAT GCTTTTTGGG  
421 AAAGGCTCAA ATTTAGAATC TATCAATATT TTTGCAAATT ATTTATCAAA ATTGCAATAT  
481 CATATCGATT ATCATTATGA TTTTGAAGTT CAACAAAAAT GGACTGAAAA ATCAATTGAC  
541 TCAAGTGTTT GTGTTTTTTT TAGTTTCTCC GGGATGCATT CAATAATTGA TGAATTAGTT  
601 AATAAAATGA AAGCAAAAAA TTGTATAAAT GTCGCTTTTA CTGGAAATTT TGAAAGTAAT  
661 TTATATAAGC AATCTTTAAT TAGTTTTTTA ACTTTTAAAA ATGAAGATGT TCTTGAAAAT  
721 CACACCTCTG CACGTATTTT TTTTATATAT TTAGTAATGC AAATTATTAA TTTGTTGAAA  
781 AATTAG

**D) MHP7448\_0639 (proteína hipotética)**

1 GTGTTTTCTA TGTCACCAGA GCGAAAAGAA AAAATAAAAA AAAATAAACG CTGTTTAAAG  
61 GTTTTAAATA AATATTCACA TATTTTATTA GCTTGTTCAA AACAGGTAAT GAAAACTTTT  
121 AATCAAATTC CGTTAACTTA TTTGGATTTA TTTAACGCTT CAATTGAAAA ATTTGTAAAT  
181 CTTTATGAAG AATTTGATCC GAGTTTGGGA ATTCCACTTG AAAATTATTT AGTTCATAAA  
241 ATTAAATTGT TTATGTTAGG TTATGCAACT TCGTTTACAA CAAAAAATTA TCAAATTGCC  
301 AATTTTTCAA TTCACTTGA TGACTIONTCA GAAACAGTCC AATTTGCAGC TGAATCCGAT  
361 CAGGAATACT ATGAAATTCA AGATATTTAC AACCGAATTA CTAGCAATCT TGATGAAGTT  
421 GAATACGAAA TTTTTCAAAT GTTTTTCATT CAGGACTTTC CGACAAAGGA CATTGCAAAA  
481 AAAATAGGAC TTACAACCCA GAAAGTCAAT GATTTTATTC GACTAACAAA TAATAAATTA  
541 CGTAGTTTTT TTTAA

### 7.3 – Protocolo de extração de DNA genômico de *M. hyopneumoniae*

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

## 8. CURRICULUM VITAE

MUCHA, S. G.; MUCHA, S.

### Dados Pessoais

Nome: Scheila Gabriele Mucha

E-mail: scheilagm@yahoo.com.br

### Formação acadêmica/titulação

- 2011 - atual** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Análise da expressão de fatores de transcrição recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae*  
Orientador: Irene Silveira Schrank  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2007 - 2010** Graduação em Biomedicina.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Desenvolvimento de Vetores para Transformação em *Mycoplasma hyopneumoniae*  
Orientador: Irene Silveira Schrank  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

### Atuação profissional

#### 1. Laboratório Nacional Agropecuário RS - LANAGRO/RS

#### Vínculo institucional

- 2010 - 2010** Vínculo: Bolsista ITI, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

#### Atividades

- 08/2010 - 12/2010** Estágio, LABV - Laboratório de Bebidas e Vinagres  
*Estágio: Análises físico-químicas de bebidas*

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

### Vínculo institucional

<b>2011 - Atual</b>	Vínculo: Mestranda, Enquadramento funcional: Mestranda, Regime: Dedicção exclusiva
<b>2009 - 2010</b>	Vínculo: Bolsista Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva
<b>2008 - 2009</b>	Vínculo: Aluna de Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Parcial

### Atividades

<b>03/2011 - Atual</b>	Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia, UFRGS <i>Linhas de pesquisa:</i> <i>Caracterização de proteínas regulatórias de Mycoplasma hyopneumoniae</i>
<b>08/2008 - Atual</b>	Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia, UFRGS <i>Linhas de pesquisa:</i> <i>Vetores de transformação de Mycoplasma hyopneumoniae</i>

### Projetos

<b>2011 - Atual</b>	Caracterização de proteínas regulatórias de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Integrantes: Scheila Gabriele Mucha, Irene Silveira Schrank (Responsável)
<b>2008 - Atual</b>	Vetores de transformação de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Integrantes: Scheila Gabriele Mucha, Luciano Reolon; Irene Silveira Schrank (Responsável)

### Produção em C, T & A

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MUCHA, S. G., SCHRANK, I. S.

Cloning and expression of recombinant transcription regulators of *Mycoplasma hyopneumoniae*. 7448 In: 28ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu.

**Resumos da 28ª Reunião de Genética de Microrganismos.** , 2012.

2. MUCHA, S. G., SCHRANK, I. S.

Desenvolvimento de Vetores para Transformação em *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: XXII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2010, Porto Alegre.

**Livro de Resumos - XXII Salão de Iniciação Científica e XIX Feira de Iniciação Científica UFRGS.** , 2010.

3. MUCHA, S. G., REOLON, L. A., SCHRANK, I. S.

Desenvolvimento de um vetor para análise de regiões promotoras em *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: XXI Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2009, Porto Alegre.

**Livro de Resumos - XXI Salão de Iniciação Científica e XVIII Feira de Iniciação Científica UFRGS.** , 2009.