

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

Análise de proteínas que ligam ao DNA de
***Mycoplasma hyopneumoniae* 7448**

Dissertação de Mestrado

Luciano Antonio Reolon

Porto Alegre, março de 2010

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

Análise de proteínas que ligam ao DNA de
***Mycoplasma hyopneumoniae* 7448**

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.

Luciano Antonio Reolon

Orientadora: Prof^a Dr^a Irene Silveira Schrank

Porto Alegre, março de 2010

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

Agradecimentos

À professora Irene Silveira Schrank, por ser uma orientadora participativa, dedicada e paciente, por ter ajudado a execução deste projeto e por ter sido fundamental para a realização desta dissertação.

Aos demais professores do PPGBCM, em especial aos professores Arnaldo Zaha, Augusto Schrank, Henrique Ferreira e Marilene Vainstein, pelos ensinamentos, motivações e por estarem sempre abertos ao diálogo.

A todos os colegas do laboratório 222, em especial: à Shana, que me ensinou as primeiras técnicas; Ricardo, por estar sempre disposto a ajudar e por ser o companheiro do café, onde sempre obtivemos as melhores idéias; ao Fernando, pelo convívio dentro e fora do laboratório, companheiro de futebol e de sofrimento numa fase não tão boa do nosso Grêmio; e a Débora, amiga e colega de faculdade, sempre com um protocolo salvador para ajudar.

Ao Paulo, pelo auxílio nas análises de espectrometria de massas, sempre disposto a tirar minhas dúvidas (que não foram poucas!).

Ao pessoal dos laboratórios 210, 217 e 220, pelo convívio diário e pelas grandes amizades, em especial à Bianca, pelos cultivos de *M. hyopneumoniae*.

À minha família, pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim.

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

SUMÁRIO

Abreviaturas, símbolos e unidades	VII
Lista de figuras	VIII
Lista de tabelas	IX
Resumo	X
Abstract	XI
1. Introdução	12
1.1 Suinocultura e a pneumonia enzoótica suína (PES)	13
1.2 O Gênero <i>Mycoplasma</i>	12
1.2.1 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	14
1.3 Controle da expressão gênica em micoplasmas	15
1.3.1 Regiões promotoras	16
1.3.2 Proteínas que ligam ao DNA	17
1.3.3 Fatores de transcrição	18
1.3.4 Motivos de ligação ao DNA	18
1.3.4.1 Hélice-volta-hélice	19
1.3.4.2 Variações estruturais do domínio HTH	20
1.3.5 Interações proteína-DNA	23
1.3.6 Predição <i>in silico</i> de proteínas que ligam ao DNA	26
2. Objetivos	27
2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. Materiais e métodos	28
3.1 Linhagens bacterianas, cultivos e extratos celulares	28
3.2 Enriquecimento das amostras com proteínas que ligam ao DNA	28
3.2.1 Lise celular	28
3.2.2 Precipitação com Polietilenamina	28
3.2.3 Cromatografia de afinidade DNA-Celulose	29

3.3	Quantificações de proteínas	29
3.4	Eletroforeses	29
3.4.1	Géis unidimensionais	29
3.4.2	Géis bidimensionais	30
3.5	<i>Western blot</i>	30
3.6	Espectrometria de massas	31
3.7	Análise dos dados	32
3.8	Ferramentas <i>in silico</i>	32
4.	Resultados	34
4.1	Otimização da lise celular de <i>M. hyopneumoniae</i> .	34
4.2	Enriquecimento de amostras com proteínas que ligam ao DNA de <i>M. hyopneumoniae</i> .	35
4.2.1	Precipitação com polietilenamina (PEI)	35
4.2.2	Cromatografia de afinidade DNA-celulose	37
4.3	Identificação de proteínas que ligam ao DNA	38
4.3.1	Preparo de amostras	38
4.3.2	Identificação de proteínas por espectrometria de massas	40
4.4	Predição <i>in silico</i> de proteínas que ligam ao DNA	40
4.4.1	<i>MEME Suite: Motif-based sequence analysis tools</i>	41
4.4.2	<i>Jemboss e HTH predictor</i>	41
5.	Discussão	52
6.	Conclusão	58
7.	Perspectivas	59
6.	Bibliografia	60
7.	Anexo I	69
8.	Anexo II	77
9.	Anexo III	81
10.	<i>Curriculum Vitae</i>	83

Abreviaturas, símbolos e unidades

α RNAP	subunidade alfa da RNA polimerase
β RNAP	subunidade beta da RNA polimerase
β' RNAP	subunidade beta' da RNA polimerase
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
CDS	seqüência de DNA codificante
CO_2	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	trifosfato de desoxirribonucleosídeo
fmol	fentomol
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
g	gravidade
HCl	ácido clorídrico
kb	quilobase
kDa	quilodalton
μg	micrograma
MgCl_2	cloreto de magnésio
μL	microlitro
mL	mililitro
mM	milimolar
MS	Espectrometria de massas
tRNA	RNA transportador
rRNA	RNA ribossomal
ng	nanograma
OD	densidade ótica
ω RNAP	subunidade ômega da RNA polimerase
pb	par de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão PBS + Tween
PCR	reação em cadeia da DNA Polimerase
PEI	polietilenamina
PES	pneumonia enzoótica suína
PTS	sistema fosfoesterase
RBS	sítio de ligação dos ribossomos
RNA	ácido ribonucléico
RNAP	RNA Polimerase
rpm	revoluções por minuto
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato
σ RNAP	subunidade σ da RNA polimerase holoenzima

Lista de figuras

Figura 1 – Motivo hélice-volta-hélice.	20
Figura 2 – Variações mais comuns do domínio hélice-volta-hélice.	22
Figura 3 – Reconhecimento de um par de bases A-T na dupla hélice de DNA.	24
Figura 4 – Estrutura cristalográfica da Proteína C de controle de restrição-modificação Esp1396 de <i>Enterobacter sp.</i>	24
Figura 5 – Interações proteína-DNA.	25
Figura 6 – Células visualizadas em microscópio de fluorescência com o uso do kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability (Invitrogen).	33
Figura 7 – Precipitação de proteínas com PEI.	35
Figura 8 – Confirmação da presença do fator σ de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 em amostras de proteína precipitadas com PEI.	35
Figura 9 – Cromatografia de afinidade DNA-celulose	36
Figura 10 – Confirmação da presença do fator σ de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 em amostras eluídas da cromatografia de afinidade.	37
Figura 11 – Proteínas isoladas que ligam ao DNA de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	38
Figura 12 – Representação gráfica do consenso do motivo HTH (MEME).	44
Figura 13 – Representação gráfica do consenso do motivo Rrf2 (MEME).	45
Figura 14 – Representação gráfica do consenso do motivo σ (MEME).	46
Figura 15 – Estrutura do complexo da holoenzima RNAP e o DNA	67
Figura 16 – Arquitetura geral dos fatores σ do grupo 1	69
Figura 17 – Representação esquemática do processo de purificação da RNAP de <i>M. hyopneumoniae</i>	71
Figura 18 – Purificação do fragmento σ_2 - $\sigma_{1.2}$	72
Figura 19 – Expressão da região σ_2 (σ_2 - $\sigma_{1.2}$) recombinante	73
Figura 20 – Expressão da região σ_2 (σ_2 - $\sigma_{1.2}$) recombinante com variações da concentração de IPTG e da temperatura	74

Lista de tabelas

Tabela 1 – Motivos de ligação ao DNA mais comumente encontrados	19
Tabela 2 – Lista de proteínas de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 identificadas experimentalmente como proteínas que ligam ao DNA	42
Tabela 3 – Proteínas hipotéticas identificadas experimentalmente: análise de domínios conservados e detecção de homologia/estrutura	44
Tabela 4 – Predição de proteínas com motivo HTH.	45
Tabela 5 – Predição de proteínas com motivo Rrf2.	46
Tabela 6 – Predição de proteínas com motivo σ .	47
Tabela 7 – Predição de hélice-volta-hélice (HTH) utilizando os programas <i>Jemboss</i> e <i>HTH Predictor</i> .	48
Tabela 8 – Proteínas de <i>M. hyopneumoniae</i> com potenciais motivos de ligação ao DNA identificadas <i>in silico</i> .	49
Tabela 9 – Proteínas preditas como de ligação ao DNA que foram identificadas experimentalmente e por bioinformática.	58

Resumo

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES), uma doença crônica, caracterizada pela alta morbidade e baixa mortalidade, e que infecta 200 milhões de suínos anualmente, gerando milhões de dólares de perdas em todo o mundo. *M. hyopneumoniae* adere-se aos cílios das células do epitélio traqueal, causando a redução do movimento ciliar, predispondo o animal a patógenos secundários. É uma das menores bactérias presentes na natureza, apresentando um genoma reduzido, sem parede celular e com alto conteúdo de guanina+citosina. Atualmente, estão disponíveis as sequências dos genomas de três linhagens de *M. hyopneumoniae*, duas patogênicas (7448 e 232) e uma não patogênica (J), porém pouco se sabe a respeito das sequências que regulam e controlam a expressão gênica em espécies de *Mycoplasma* ou das proteínas que ligam ao DNA, que desempenham um papel fundamental em todos os aspectos genéticos do organismo, como transcrição, replicação e reparo. Tipicamente, 2-3% de um genoma procariótico e 6-7% de um eucariótico codificam proteínas que ligam ao DNA. A interação mais comum entre proteína e DNA ocorre entre uma alfa-hélice da proteína com a cavidade maior do DNA, sendo que aproximadamente 84% dos fatores de transcrição de um componente utilizam o motivo hélice-volta-hélice para a ligação ao DNA. Sendo assim, a hélice-volta-hélice assume um papel central na regulação da transcrição e, portanto, torna-se um excelente alvo para análises *in silico*. Não há relatos de trabalhos de identificação de proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae* utilizando métodos experimentais e predições *in silico*. Neste trabalho foi empregado um método de cromatografia de afinidade DNA-celulose para obter amostras enriquecidas com proteínas de superfície, onde foram identificadas 32 proteínas, sendo que muitas delas são conhecidas e estão realmente envolvidas em processos que requerem a ligação ao DNA. Além da análise experimental, uma análise utilizando o genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 foi realizada, utilizando vários algoritmos designados a encontrar genes que codificam proteínas que ligam ao DNA, sendo que 59 proteínas foram preditas como ligantes a DNA. Da sobreposição dos dados obtidos *in silico* e experimentalmente foram identificadas sete proteínas, sendo duas hipotéticas. A identificação destas proteínas disponibiliza um grupo de proteínas-alvo para futuros estudos de regulação e controle da expressão gênica de *M. hyopneumoniae*.

Abstract

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of Enzootic Pneumonia (EP), a chronic disease, characterized by high morbidity and low mortality that infects 200 million pigs every year causing hundreds of millions of dollars of loss for swine farmers worldwide. *M. hyopneumoniae* attaches to the cilia of the tracheal epithelial cells, causing a reduction in the ciliary action, predisposing the swine to secondary pathogens. *M. hyopneumoniae* is one of the smallest bacteria present in nature with a small genome, no cell wall and high guanine/cytosine content. Published genome sequences of three *M. hyopneumoniae* strains, two pathogenic (232 and 7448) and one nonpathogenic (J) are available, but little is understood about the sequences that regulate and control gene expression in *Mycoplasma* species and its DNA-binding proteins (DBPs), that plays a central role in all aspects of genetic activity within an organism, such as transcription, replication and repair. Typically 2-3% of a prokaryotic genome and 6-7% of a eukaryotic genome encode genes that code for DBPs. The common protein-DNA interaction region in bacteria occurs between an alpha-helix present in the protein and the major groove of DNA. Among the bacterial one-component transcription factors (TFs), up to 84% of the output domains comprise a DNA-binding helix–turn–helix (HTH) region. Therefore, the HTH motif assumes a central role in transcription regulation and becomes a main target for *in silico* predictions. There have been no reports of the *in silico* and experimental identification of DBPs in *M. hyopneumoniae*. In this work we employed a method of DNA-cellulose column chromatography to obtain a DBPs enriched sample, for later mass spectrometry analysis, where we identified 32 proteins, many of which are involved in biological processes that require DNA binding. In addition to the proteomic approach, genomic analysis of the *M. hyopneumoniae* 7448 genome was performed *in silico* with several algorithms designed to identify genes that encode DBPs and we have characterized 59 proteins predicted as DBPs. The overlap analysis between bioinformatics and proteomics has resulted in the identification of seven proteins, two of which are hypothetical proteins. The identification of these proteins has provided a valuable set of proteins that may be used in the studies to analyze the regulation and control of gene expression in *M. hyopneumoniae*.

1. Introdução

1.1 Suinocultura e a pneumonia enzoótica suína (PES).

A suinocultura está presente em aproximadamente 50% das propriedades rurais do Brasil. O rebanho suíno brasileiro, estimado em 36 milhões de cabeças, tem sua maior concentração na região sul, que representa mais de 45% deste rebanho (IBGE, 2005). Objetivando uma maior produtividade, os produtores de suínos passaram a utilizar uma criação de forma intensiva. No entanto, esta forma de produção gera uma alta densidade populacional em ambientes fechados propiciando uma maior exposição a agentes infecciosos. Entre as enfermidades bacterianas de maior importância à criação de suínos podemos ressaltar a PES (pneumonia enzoótica suína).

A PES é causada pela bactéria fastidiosa *Mycoplasma hyopneumoniae*, sendo uma das principais doenças respiratórias dos suínos. *M. hyopneumoniae* destrói o elevador mucociliar, principal mecanismo de defesa inespecífico do trato respiratório dos suínos (DEBEY e ROSS, 1994), predispondo o animal a patógenos secundários (CIPRIAN *et al.*, 1988; DEBEY e ROSS, 1994; THACKER, 2006). É uma doença infecciosa crônica, muito contagiosa, caracterizada por uma broncopneumonia catarral, geralmente associada a complicações broncopulmonares purulentas (ANDRADA, 2003a), sendo sua transmissão por contato direto, indireto e através de aerossóis eliminados durante os acessos de tosse. Esta enfermidade se manifesta clinicamente por tosse seca e atraso no crescimento do animal. Rebanhos contendo PES apresentam uma alta morbidade e baixa mortalidade, sendo as perdas econômicas decorrentes da queda de produtividade, que podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). Segundo uma pesquisa realizada pelo Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA – EMBRAPA, Concórdia, SC, Brasil) em 2001, essas perdas chegam a aproximadamente 80 milhões de reais por ano no Brasil.

A vacinação tem se mostrado a maneira mais eficaz de controlar a PES (KAVANAGH, 1994; CHEN *et al.*, 2003), porém as vacinas apresentam alto custo de produção e oferecem uma proteção apenas parcial. Por este motivo, a medicação através da adição de antibióticos na comida e na água ainda é bastante comum (VICCA, *et al.*, 2004), sendo que os mais utilizados são: tetraciclina, tiamulina, tilosina, espiramicina,

valnemulina, lincomicina e as novas quinolonas enrofloxacina, danofloxacina e norfloxacina (ANDRADA, 2003a).

1.2 Gênero *Mycoplasma*

As bactérias do gênero *Mycoplasma* pertencem à classe *Mollicutes* (*mollis*, mole; *cutis*, pele, em Latim), ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* (WALKER, 2003), possuindo um tamanho diminuto, sendo consideradas os menores organismos auto-replicáveis conhecidos. Distinguem-se fenotipicamente de outros grupos principalmente por possuírem citoesqueleto e pela ausência da parede celular, sendo que taxonomicamente esta ausência de parede celular é utilizada para separar os micoplasmas de outras bactérias na classe *Mollicutes* (RAZIN *et al.*, 1998).

A maioria dos membros do gênero *Mycoplasma* são patogênicos, colonizando uma gama bastante variada de hospedeiros, como animais, plantas e insetos (PITCHER & NICHOLAS, 2005) e até o momento não foi descrito nenhuma espécie de micoplasma de vida livre (RAZIN, 1992). Normalmente são patógenos extracelulares, embora já tenha sido descrito na literatura alguns micoplasmas como patógenos intracelulares, encontrando-se frequentemente aderido a superfície celular ou tecidual (LO *et al.*, 1993; BASEMAN *et al.*, 1995).

Como não sintetizam peptídeo glicano ou seus precursores, não possuem parede celular, mas uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, fosfolípidos e colesterol, este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana (QUINN, 2005; WALKER, 2003), sendo que todos os micoplasmas necessitam de colesterol para seu crescimento (RAZIN *et al.*, 1998). Essa ausência de parede celular faz com que, morfológicamente, sejam consideradas bactérias gram-negativas, entretanto, filogeneticamente, os micoplasmas estão relacionados com bactérias gram-positivas, compartilhando um ancestral comum com os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (WOLF *et al.*, 2004).

O tamanho do genoma dos organismos deste gênero varia de 580 kb (*Mycoplasma genitalium*) até 1.358 kb (*Mycoplasma penetrans*) (FRASER *et al.*, 1995; SASAKI *et al.*, 2002), com baixo conteúdo de guanina+citosina. Este genoma atipicamente rico em adenina e timina, variando entre 60 e 77% de conteúdo A+T (WOESE, 1987), pode ter

contribuído para o fato de micoplasmas utilizarem o códon UGA para codificar triptofano (KANNAN & BASEMAN, 2000), uma vez que possuem poucos códons GGN, CCN, GCN e CGN (RAZIN, 2006).

Além de apresentarem grande importância econômica, uma vez que são patógenos que afetam a saúde animal e humana (BASEMAN & TULLY, 1997), por possuírem um genoma reduzido são considerados ótimos objetos de estudo na determinação dos genes mínimos necessários para o estabelecimento de vida independente, sendo que vários micoplasmas tem seu genoma completamente sequenciados (CALDERON-COPETE *et al.*, 2009; CHAMBAUD *et al.*, 2001; DYBVIG *et al.*, 2008; FRASER, *et al.*, 1995; GLASS *et al.*, 2000; HIMMELREICH *et al.*, 1996; JAFFE *et al.*, 2004; MINION *et al.*, 2004; PAPAZISI *et al.*, 2003; SASAKI *et al.*, 2002; SIRAND-PUGNET *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2005; WESTBERG *et al.*, 2004).

1.2.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, sendo encontrado causando esta infecção em todo o mundo. Devido ao grande impacto econômico que causa na suinocultura, é a espécie de micoplasma que teve seu genoma mais vezes sequenciado (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005). MARÉ & SWITZER (1965) e GOODWIN *et al.* (1965) foram os primeiros a relatar o isolamento de micoplasma a partir de pulmões com característica de pneumonia, sendo os primeiros, também, a realizar a reprodução experimental da doença. Assim como a maioria dos membros da ordem Mycoplasmatales, *M. hyopneumoniae* infecta um único hospedeiro, o suíno, porém os mecanismos de especificidades pelo hospedeiro ainda são desconhecidos.

O isolamento de *M. hyopneumoniae* apresenta dificuldades, devido, principalmente, a sua natureza fastidiosa e também pela frequente presença no trato respiratório de suínos de outros *Mycoplasmas* como *M. hyorhinis*, que pode causar artrites e poliserosites, e *M. flocculare*, que até o momento não é considerado patogênico. Estes microrganismos apresentam grande semelhança com *M. hyopneumoniae* considerando sua morfologia, crescimento e antigenicidade (ROSS, 1999). Existe, também, uma dificuldade de cultivo *in vitro*, que se apresenta comum para as diversas espécies de micoplasmas, sendo que muitas espécies nunca foram cultivadas (RAZIN *et al.*, 1998). FRIIS (1975) desenvolveu um meio

especial para isolamento de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*. Este meio possui como indicador de pH o vermelho fenol. A multiplicação microbiana é visível quando ocorre a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, indicando a oxidação da glicose pelo *M. hyopneumoniae* e produção de ácido.

Através do sequenciamento de diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae*, como as linhagem patogênicas 232 (MINION *et al.*, 2004), 7448 e a não patogênica J (VASCONCELOS *et al.*, 2005) foi possível identificar algumas características gerais desta bactéria: seus genomas consistem de 892.758 pb, 920.079 pb e 897.405pb, respectivamente, sendo que o conteúdo guanina+citosina perfaz apenas 28% deste genoma. A maior parte do genoma, aproximadamente 88%, é constituída por regiões codificadoras. Para a linhagem 7448, que apresenta um total de 681 prováveis sequências codificadoras de proteínas, foram assinaladas funções para 421 (61,8%), enquanto 105 (15,4%) sequências são consideradas proteínas hipotéticas conservadas e 155 (22,7%) são proteínas hipotéticas exclusivas de *M. hyopneumoniae* (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Outras características genéticas relevantes deste patógeno são: sistema de secreção de proteínas de membrana bastante simplificado, ausência de um gene para a RNase H (responsável pela remoção de fragmentos de Okasaki durante a replicação de DNA), possui um sistema primitivo de reparo de DNA e resposta ao estresse, presença de um único fator sigma (similar ao fator sigma 70 de *Escherichia coli*), incapacidade de modificar fosfolipídeos, além de um processamento incompleto de lipoproteínas. Também podemos ressaltar a ausência das proteínas de choque térmico GroEL e GroES (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005).

1.3 Controle da expressão gênica em micoplasmas.

No gênero *Mycoplasma*, considerado o mais simples patógeno bacteriano, muito pouco se conhece sobre os mecanismos que regulam e controlam a expressão gênica. O número de genes que são classificados como envolvidos na transcrição variam de acordo com o genoma. Em *M. hyopneumoniae* linhagem 232, somente 11 genes foram anotados para este processo (MINION *et al.*, 2004). No entanto, é importante salientar que ainda existe um número grande de proteínas hipotéticas distribuídas ao longo do genoma de diversas espécies de *Mycoplasma*, sem função ainda conhecida podendo, portanto, alterar o

número de genes relacionados a este processo.

Mycoplasma sp. possui uma RNA polimerase semelhante a das eubactérias, contendo as subunidades α (gene *rpoA*), subunidade β (gene *rpoB*) e a subunidade β' (gene *rpoC*). No entanto, possui apenas um fator σ (codificado pelo gene *rpoD*) identificado até o momento (NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub.html>>), diferindo significativamente de outras espécies, como *Bacillus subtilis* (18 fatores σ identificados) (KUNST *et al.*, 1997) e *E. coli* (6 fatores σ identificados) (BLATTNER *et al.*, 1997).

Alguns mecanismos de regulação, importantes em bactérias, aparentemente foram perdidos pelos micoplasmas ao longo da evolução (HALBEDEL *et al.*, 2007). Além de não possuírem os múltiplos fatores sigma, aparentemente não possuem sistemas de dois componentes e também o fator Rho (conhecido fator de terminação transcricional) (FRASER *et al.*, 1995). Devido a estas substanciais diferenças, os sinais que controlam e regulam a transcrição, nos micoplasmas, devem diferir significativamente de outras bactérias (WEINER III *et al.*, 2000), dificultando mais o seu estudo.

Um melhor entendimento da regulação e controle da expressão gênica em *M. hyopneumoniae* deve considerar, invariavelmente, o estudo e a análise tanto das regiões promotoras quanto das proteínas que possuem potencial para se ligar ao DNA, uma vez que os dados disponíveis são bastante escassos.

1.3.1 Regiões promotoras

Os genomas dos micoplasmas são A+T ricos e, portanto, a análise molecular dos mecanismos de transcrição tem sido dificultada na definição *in silico* de sequências promotoras, pois a predição destas tem sido baseada predominantemente na presença de sequências canônicas presente nas regiões promotoras do genoma de *E. coli*, como por exemplo o TATTA *box*. Além disto, existem poucas sequências de promotores de genes de *Mycoplasma* sp. caracterizadas experimentalmente. Os poucos trabalhos que relatam a análise experimental de promotores de genes de micoplasmas identificaram uma região consenso conservada na região de -10 e uma região pouco conservada em -35 (WALDO III *et al.*, 1999; WEINER III *et al.*, 2000; MUSATOVOVA *et al.*, 2003; HALBEDEL *et al.*, 2007).

Recentemente, HALBEDEL *et al.* (2007) estudaram a região promotora do gene *ldh* de *M. pneumoniae*, através da utilização de um sistema repórter. Nesta análise, sequências relativas as prováveis regiões -10 e -35 do gene, foram capaz de transcrever o gene repórter *lacZ* em *M. pneumoniae*. Uma análise mais detalhada, utilizando mutações pontuais nesta região promotora, sugere uma maior importância da região -10 neste organismo, em comparação com a região -35.

1.3.2 Proteínas que ligam ao DNA

Proteínas que ligam ao DNA apresentam um papel central em muitas atividades biológicas essenciais, como transcrição, replicação, empacotamento, reparo e rearranjos de DNA. Nas últimas décadas, muitos esforços foram feitos buscando o entendimento dos princípios básicos que envolvem a ligação específica de uma proteína com o DNA. Porém, sabe-se que não existe uma simples regra geral de reconhecimento entre os aminoácidos de uma proteína e as bases do DNA. LUSCOMBE & THORNTON (2000) classificam as estruturas de ligação ao DNA conhecidas em oito grandes classes, em um total de 54 subgrupos. Esta grande variedade representa um grande desafio na predição de interações entre proteína e DNA.

A ligação entre as proteínas e o DNA pode ser inespecífica ou específica. As proteínas estruturais que ligam ao DNA são exemplos clássicos de interações não específicas entre proteína e DNA. Nos cromossomos, estas proteínas organizam o DNA em uma estrutura compacta, a cromatina. Em eucariotos, estas proteínas são representadas basicamente pelas histonas, enquanto em procariotos várias proteínas estão envolvidas nesse processo (DAME, 2005; THANBICHLER *et al.*, 2005). Por outro lado, existem proteínas que requerem uma ligação específica para poder exercer seu papel biológico. Fatores de transcrição, que regulam e controlam a expressão gênica necessitam deste posicionamento específico (MYERS & KORNBERG, 2000).

1.3.3 Fatores de transcrição

Como anteriormente discutido, a regulação da expressão gênica tem um papel central tanto na expressão tecido específica em mamíferos, quanto na expressão de genes bacterianos em função de mudanças ambientais. Apesar de existir vários exemplos de regulação gênica pós-transcricional, a maior parte desta regulação ocorre durante a transcrição, através da decisão de transcrever ou não o gene em um RNA primário. Para que esta regulação ocorra, são necessárias proteínas, os fatores de transcrição, que atuam sozinhas ou em conjunto com outras proteínas promovendo ou bloqueando o recrutamento da RNA polimerase (MYERS & KORNBERG, 2000).

A proporção de fatores de transcrição em um genoma tem mostrado certa relação com o número total de genes. Organismos com um genoma mais complexo possuem um número maior de fatores de transcrição quando comparados com organismos com genomas reduzidos. PÉREZ-RUEDA & COLLADO-VIDES (2000) estimaram que 7% de todos os produtos gênicos de *Escherichia coli K12* estariam envolvidos na regulação gênica, no entanto, busca em bancos de dados de anotação automática, como o PEDANT (FRISHMAN & MEWES, 1997) tem encontrado apenas 2-3% de proteínas que ligam ao DNA em genomas procarióticos. Esta é uma informação importante, uma vez que *M. hyopneumoniae* possui um genoma muito reduzido e conseqüentemente deverá apresentar um número bastante restrito de fatores de transcrição e proteínas que ligam ao DNA.

1.3.4 Motivos de ligação ao DNA

A habilidade que uma proteína possui de ligar-se especificamente a sequências de DNA é sem dúvida um dos aspectos mais importantes na regulação da expressão gênica. Para que ocorra tal ligação, é necessário que ocorra o reconhecimento de uma sequência específica da dupla fita de DNA pela proteína. Esse reconhecimento é realizado através de estruturas chamadas de motivos de ligação ao DNA.

Os motivos de ligação ao DNA podem ser estruturalmente divididos em um número limitado de grupos, sendo que estes motivos estão presentes em um número muito grande de proteínas, distribuídas ao longo das espécies (Tabela 1). Será analisado com mais detalhes a família hélice-volta-hélice, por ser o principal motivo encontrado em procarioto.

Tabela 1 – Motivos de ligação ao DNA mais comumente encontrados.

Motivo	Exemplo de proteínas com este motivo
Ligação específica ao DNA	
Família hélice-volta-hélice	
Hélice-volta-hélice padrão	repressor triptofano, repressor lactose (<i>E. coli</i>)
Homeodomínio	proteínas de <i>Drosophila</i>
Hélice-volta-hélice alada	proteínas regulatórias de eucariotos
Domínios POU	proteínas regulatórias de vertebrados (PIT-1/2)
Família dedo-de-zinco	
Dedo Cys ₂ His ₂	fatores de transcrição eucarióticos (TFIIIA)
Multi-cisteína	família dos receptores de esteróides (eucariotos)
Fita hélice-hélice	repressores bacterianos (MetJ, Arc e Mnt)
Domínio TBP	proteínas eucarióticas que ligam a TATA
Dímero barril-beta	proteína E2 de <i>Papillomavirus</i>
Ligação não específica ao DNA	
Histona	histonas eucarióticas
Motivo HU	proteínas bacterianas HU (empacotamento)
Polimerase	DNA e RNA polimerases

Adaptado de *Genomes Third Edition*, por T. A. Brown, publicado por *Garland Science*, 2006.

1.3.4.1 Hélice-volta-hélice

O motivo protéico de hélice-volta-hélice (HTH, do inglês, *helix-turn-helix*) foi a primeira estrutura de ligação ao DNA identificada (HARRISON & AGGARWAL, 1990) sendo o melhor caracterizado até o momento, além de ser considerado o mais comum. Análise de fatores de transcrição de um componente demonstra que mais de 84% deles apresentam HTH como um dos motivos de ligação ao DNA (ULRICH *et al.*, 2005).

Basicamente, um motivo HTH consiste de duas α -hélices formando um ângulo interno de aproximadamente 120° conectadas por uma pequena “volta” de normalmente quatro resíduos de aminoácidos. A estrutura completa compreende aproximadamente 20 resíduos. A segunda hélice é a responsável pela interação sequência-específica com o

DNA, sendo chamada de hélice de reconhecimento (KOHN *et al.*, 1997; ARAVIND *et al.*, 2005) formando a principal interface de interação entre a proteína e o DNA, através da interação com a cavidade maior do DNA. Entretanto, os resíduos de aminoácidos envolvidos no reconhecimento podem variar ao longo da hélice (BRENNAN *et al.*, 1991; OTTING *et al.*, 1990). Além disto, contatos secundários podem ocorrer, sendo estes mediados por outras partes das hélices ou também pelas suas extensões (OTTING *et al.*, 1990), como será discutido posteriormente.

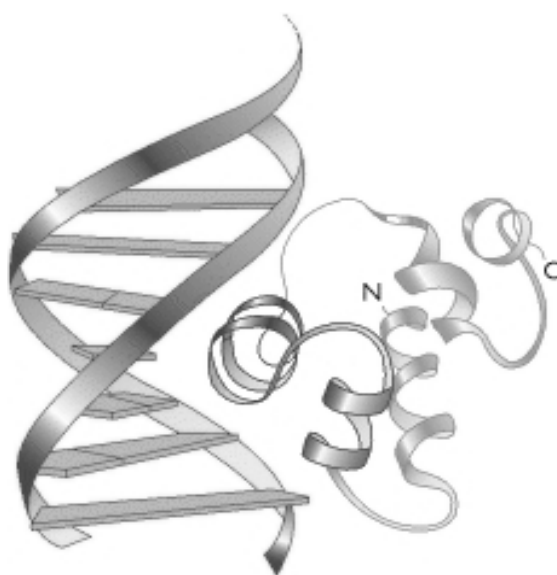


Figura 1 – Motivo hélice-volta-hélice

Na figura pode ser observado a orientação do motivo hélice-volta-hélice (em azul). N e C indicam, respectivamente, os motivos N-terminal e C-terminal da proteína. Reproduzido de *DNA-Protein Interactions* por Andrew Travers, publicado pela Chapman & Hall, 1993.

1.3.4.2 Variações estruturais do domínio HTH

Considerando a estrutura HTH basal, surgem outras conformações que são distribuídas entre as mais variadas classes de proteínas nos diferentes reinos. Entre elas temos a conformação tri-helicoidal, consistindo de três hélices que formam uma configuração parcialmente aberta, aproximada de um triângulo (Figura 2a), sendo a terceira hélice responsável pela ligação ao DNA. A característica “volta”, que é uma das utilizadas para definir este domínio, está localizada entre a segunda e terceira hélices sendo tipicamente invariável, não aceitando inserções e deleções. Entretanto, o conector entre a primeira e segunda hélice é extremamente variável, tendo diversas modificações nas

diferentes classes de domínios hélice-volta-hélice. Também podem ser encontradas, nas diversas classes, extensões N-terminal e C-terminal ao núcleo de três hélices (ARAVIND *et al.*, 2005).

Fazem parte desta versão os domínios hélice-volta-hélice de diversas proteínas de grande importância, como por exemplo, a região 3 e a região 4 dos fatores sigma, algumas outras subunidades de RNA polimerases eucarióticas e de arqueas, fatores de transcrição bacterianos e outros diversos fatores eucarióticos (ARAVIND *et al.*, 2005). Esta versão também é encontrada em domínios quelantes de zinco de diversas integrases retrovirais, porém em uma versão um pouco mais fechada, na qual a terceira hélice encontra-se numa conformação menos aberta devido à presença do íon zinco, que são quelados pelas cisteínas e histidinas presentes nas porções finais da primeira e terceira hélices (Figura 2b) (CAI *et al.*, 1997).

A partir da conformação tri-helicoidal básica, surgem outras versões que se distribuem ao longo das espécies. Destas, destacam-se duas principais: a tetra-helicoidal (Figura 2c), que consiste do domínio tri-helicoidal básico adicionado de uma quarta hélice C-terminal, sendo encontrada em alguns fatores de transcrição bacterianos. A outra conformação, chamada de multi-helicoidal consiste da inserção de duas novas hélices na região N-terminal do núcleo tetra-helicoidal resultando em uma forma globular, encontrada principalmente em fatores de transcrição basal arqueo-eucariótico (ARAVIND *et al.*, 2005).

Uma conformação bastante comum é a denominada de hélice-volta-hélice alada. Estes domínios são diferenciados por possuírem uma cadeia beta C-terminal (“asa”) empacotada contra a fenda do núcleo tri-helicoidal parcialmente aberto (Figura 2d). Basicamente, contém um núcleo helicoidal rígido, similar a versão tri-helicoidal, seguida de duas cadeias em forma de grampo (*hairpins*), sendo que muitas versões podem apresentar folhas beta. Considerando a etapa de ligação ao DNA, a “asa” pode oferecer uma certa vantagem, uma vez que fornece uma nova interface de contato e ligação ao DNA, interagindo geralmente com a cavidade menor (BRENNAN, 1993; SWINDELLS, 1995). Esta conformação protéica é encontrada no grupo de proteínas LysR, a família de reguladores que contém o maior número de proteínas descrita em procariotos, entre outras (PÉREZ-RUEDA *et al.*, 2004).

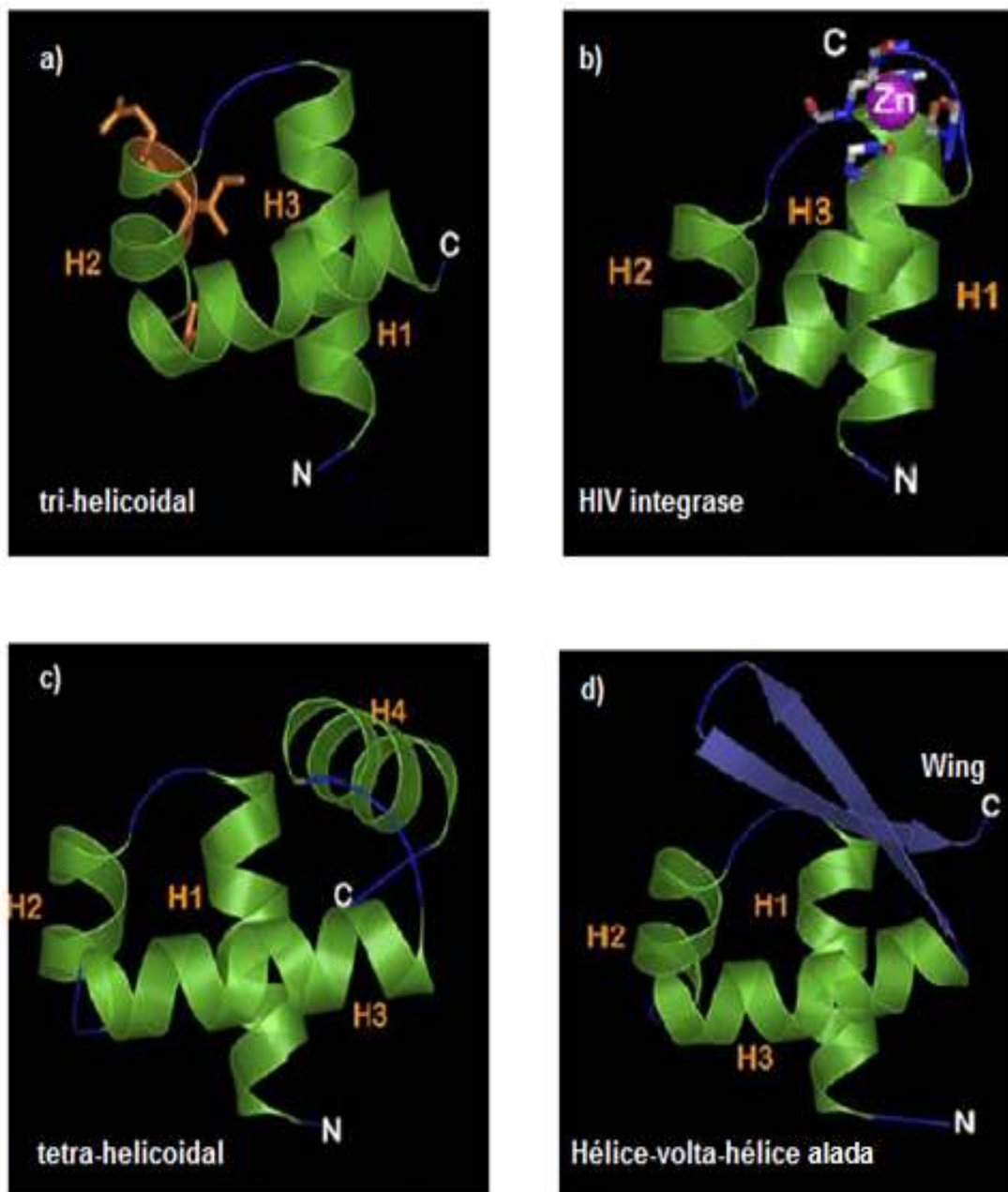


Figura 2 – Variações mais comuns do domínio hélice-volta-hélice.

As hélices são coloridas de verde e indicadas pela letra H e as “voltas” (loop) e folhas beta indicadas em azul. a) Estrutura básica tri-helicoidal (PDB: 1k78); b) domínio quelante de zinco, representado pela HIV-integrase (PDB: 1k6y); c) estrutura básica tetra-helicoidal (PDB: 1a.4); d) hélice-volta-hélice alada (PDB: 1smt). Adaptado de ARAVIND *et al.*, 2005.

1.3.5 Interações proteína-DNA

A descrição da estrutura em dupla hélice do DNA, por Watson e Crick (1953) evidenciou que embora as bases nucleotídicas encontram-se no interior da molécula de DNA, elas não estão totalmente inacessíveis, sendo que alguns grupamentos químicos, que estão associados com as purinas e pirimidinas, podem estar acessíveis no exterior da hélice. A leitura direta das sequências nucleotídicas por uma proteína que possui a habilidade de ligar-se ao DNA pode, desta maneira, ocorrer sem que haja a quebra dos pares de bases ou a abertura da molécula de DNA.

Para poder realizar ligações com os pares de bases do DNA, a proteína necessita estabelecer contatos com a cavidade maior e/ou menor do DNA. Diferentes estudos propuseram que, para a forma B de DNA fita dupla, o reconhecimento deve ocorrer primariamente na cavidade maior (SEEMAN *et al.*, 1976). Esta proposta foi embasada inicialmente no fato de que na cavidade maior a assimetria das estruturas químicas expostas das bases e que são passíveis de estabelecer ligações (uma estrutura doadora e outra acceptora para pontes de hidrogênio), fazem com que a orientação e a identidade das bases sejam identificadas de forma inequívoca (Figura 3). Inicialmente, acreditava-se que não era possível ocorrer tal reconhecimento na cavidade menor, pois só existiam duas estruturas químicas expostas conhecidas passíveis de ligações e elas eram simétricas, sendo então impossível ocorrer a discriminação sobre a orientação das bases na fita. Posteriormente, foram descobertas duas novas estruturas químicas nas bases da cavidade menor, que por serem assimétricas poderiam permitir o reconhecimento por uma proteína (KIELKOPF *et al.*, 1998).

Outros estudos analisando complexos protéicos co-cristalizados com DNA suportaram a proposta da importância da cavidade maior do DNA nas interações, pois a maioria dos contatos estabelecidos realmente ocorreram na cavidade maior (STEITZ, 1990). MCGEEHAN *et al.* (2008) investigaram a estrutura e simetria de proteínas C (proteínas controladoras, presentes em sistemas de modificação/restricção Esp1396 de *Enterobacter* sp.) e observaram que a estrutura do DNA em complexo com as proteínas (dímeros de proteína C) estava bastante distorcida, com uma grande compressão da cavidade maior associada a uma grande distensão da cavidade maior (Figura 4).

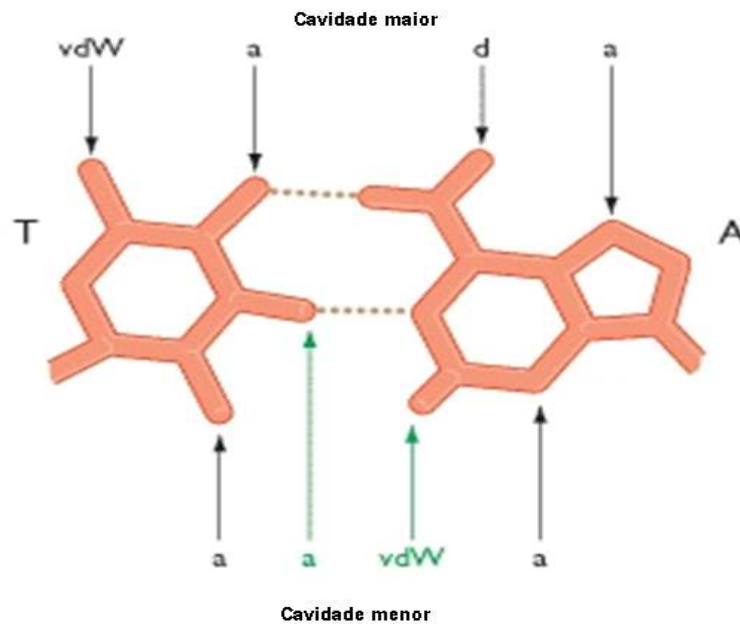


Figura 3 – Reconhecimento de um par de bases A-T na dupla hélice de DNA

Um par de bases A-T é mostrado, com as setas pretas indicando as estruturas químicas que podem ser reconhecidas através do acesso ao par de bases na cavidade maior (assimétricas) e menor (simétricas). Setas em verde indicam as novas estruturas assimétricas descobertas na cavidade menor. Abreviações: a, receptor de pontes de hidrogênio; d, doador de pontes de hidrogênio; vdW, interações van der Waals. Adaptado de KIELKOPF *et al.* (1998).

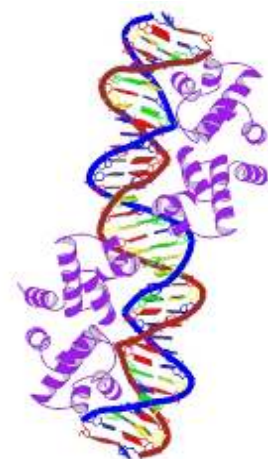
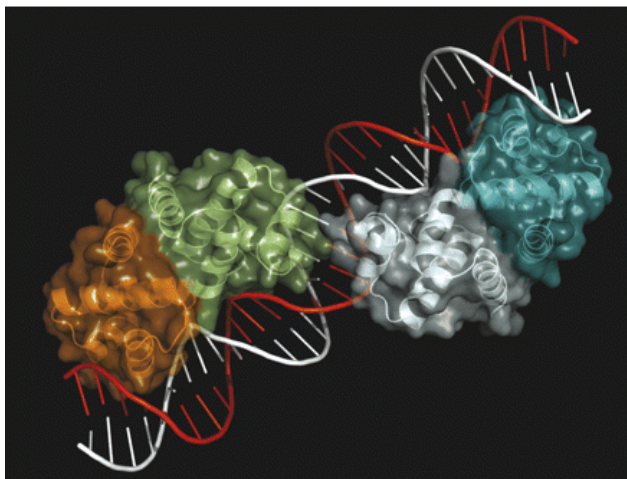


Figura 4 – Estrutura cristalográfica da Proteína C de controle de restrição/modificação Esp1396 de *Enterobacter sp.*

A estrutura cristalográfica do complexo nucleoproteína revela uma significativa ligação entre a proteína e o DNA associado a um grande distensão da cavidade maior do DNA (centro). BDB: 3CLC (MCGEEHAN *et al.*, 2008).

O contato entre o DNA e as proteínas ocorre através de ligações não-covalentes. Na cavidade maior, pontes de hidrogênio são formadas entre as bases nucleotídicas e o grupamento R dos aminoácidos do motivo de ligação ao DNA (figura 5a), enquanto na cavidade menor predominam as ligações hidrofóbicas. Na superfície da hélice, a maioria das ligações é eletrostática (figura 5b), ocorrendo entre as cargas negativas dos fosfatos dos nucleotídeos e as cargas positivas dos grupos R dos aminoácidos positivos (arginina e lisina), porém também podem ocorrer algumas pontes de hidrogênio (BROWN, 2006).

As proteínas que se ligam especificamente ao DNA também podem interagir com o DNA de forma inespecífica, pois a proporção desigual entre o grande tamanho do DNA e o número limitado de proteínas ligantes sugere que estas se associem ao DNA majoritariamente de forma não-específica (STORMO & FIELDS, 1998). A diferença entre uma ligação específica e não-específica é medida através da termodinâmica. As proteínas podem ligar-se, teoricamente, a milhões de sítios ao longo do DNA, porém, com um número limitado de contatos, diferentemente da ligação específica, que irá envolver um motivo de ligação ao DNA e um alvo específico neste, ocorrendo modificações (como, por exemplo, as que ocorrem na cavidade maior do DNA) aumentando assim o número de contatos e ligações entre a proteína e o DNA chegando a uma termodinâmica favorável para a estabilidade da ligação proteína-DNA (STORMO & FIELDS, 1998; BROWN, 2006).

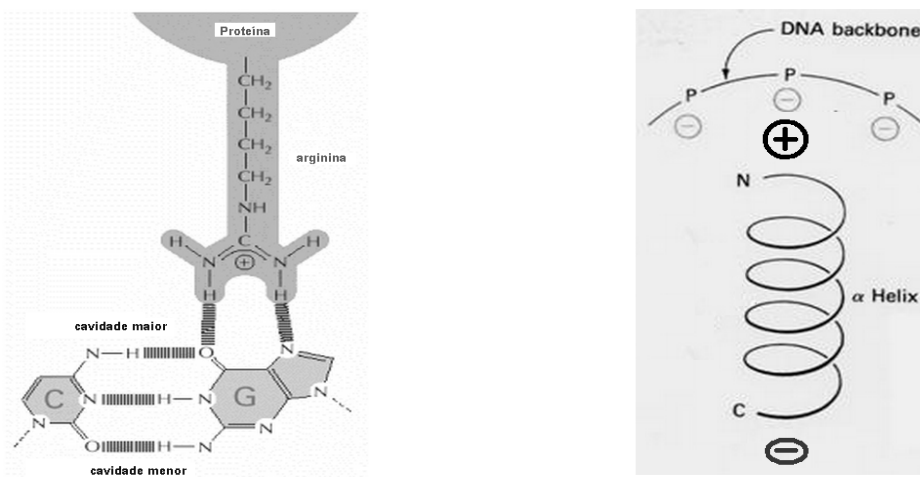


Figura 5 – Interações proteína-DNA.

a) representa uma das interações proteína-DNA mais comuns, entre arginina e guanina; b) ligação eletrostática (reproduzidos de *Molecular Biology of the Cell*, por ALBERTS *et al.* 1994, publicado por Garland Science).

1.3.6 Predição *in silico* de proteínas que ligam ao DNA

Com os crescentes avanços na área da genômica, um número cada vez maior de organismos tem seu genoma completamente sequenciado. Um dos maiores desafios desta era pós-genômica é elucidar o papel das proteínas que apresentam a sequência predita conhecida mas que continuam sem ter uma função identificada (FRIEDBERG, 2006). Presumidamente, algumas destas proteínas hipotéticas são potenciais proteínas que ligam ao DNA que ainda não foram identificadas. A capacidade de poder inferir sobre uma proteína a partir da homologia de sequência é, certamente, um importante passo para a elucidação completa dos dados gerados pelos sequenciamentos de genomas. Portanto, estudos sobre cristalografias de raio-X e análises espectroscópicas através de ressonância magnética nuclear de proteínas que ligam ao DNA tem provido dados valiosos sobre a natureza da interação entre as proteínas e o DNA.

Os métodos de identificações de proteínas que ligam ao DNA consideram algumas das características estruturais mais comuns destas proteínas. A presença de motivos hélice-volta-hélice é uma das principais características exploradas (FERRER-COSTA *et al.*, 2005), porém pode ser utilizado somente na predição de proteínas que contenham este motivo. A presença de carga global positiva nessas proteínas também tem sido aplicada (AHMAD & SARAI, 2004; SHANAHAN *et al.*, 2004; TSUCHIYA *et al.*, 2004; SZILÁGYI & SKOLNICK, 2006).

A análise da conservação da composição de aminoácidos também pode ser útil, como demonstrado por LUSCOMBE *et al.* (2000), que analisaram o efeito de mutações nesses aminoácidos na ligação das proteínas ao DNA. AHMAD *et al.* (2003) analisaram a relação entre a ligação ao DNA e a sequência protéica, além da estrutura secundária e da acessibilidade ao solvente. Mais recentemente, NIMROD *et al.* (2009) utilizaram um método combinado para a detecção de proteínas que ligam ao DNA. Neste método, foi utilizada uma série de propriedades destas proteínas, como regiões conservadas já descritas na literatura consideradas importantes para a ligação ao DNA, o potencial eletrostático destas proteínas e a conservação de aminoácidos.

Considerando estes estudos discutidos anteriormente, uma série de programas e algoritmos destinados a predição de proteínas que ligam ao DNA se encontram atualmente disponíveis. Porém, a escolha e utilização deles deve ser cuidadosa, pois normalmente cada

um deles é destinado a identificar proteínas que ligam ao DNA através de um número limitado de características. Nossa proposta de trabalho utiliza um microrganismo considerado atípico devido a sua composição de bases (A+T rico) e genoma extremamente reduzido e, portanto, devemos ser criteriosos para a análise *in silico* de proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae*. Portanto decidimos utilizar um número variado de programas de bioinformática (ver Materiais e Métodos), com a finalidade de abranger o maior número possível de características de ligação ao DNA, uma vez que muito pouco se sabe sobre fatores de transcrição e demais proteínas com potencial de ligação ao DNA em *M. hyopneumoniae*.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O objetivo principal é realizar um estudo prospectivo inicial sobre o repertório de proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae*, através de ferramentas *in silico* e também uma análise experimental das proteínas que ligam ao DNA. Para contribuir no entendimento sobre o controle e a regulação da transcrição gênica em *M. hyopneumoniae*.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar *in silico* o repertório de proteínas que possuem alguns domínios para a ligação ao DNA de *M. hyopneumoniae*.
- Realizar um estudo proteômico prospectivo do repertório de proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae*, através do uso de técnicas de proteômica para o enriquecimento de amostras para posterior análise em espectrometria de massas.
- Analisar as proteínas hipotéticas com potencial para ligar ao DNA.
- Analisar comparativamente os dados encontrados nas abordagens *in silico* e experimentais.

3. Materiais e métodos

3.1 Linhagens bacterianas, cultivos e extratos celulares

M. hyopneumoniae 7448 foi isolado de suínos infectados da localidade de Lindóia do Sul, Santa Catarina, Brasil. O isolamento e o cultivo foram realizados conforme as condições padrões estabelecidas por FRIIS (FRIIS, 1975), com células sendo incubadas em 1 litro de meio (quatro cultivos de 250 mL cada), até a densidade correspondente a 10^8 UFC mL⁻¹. As células foram recuperadas por centrifugação a 3.360 x g por 30 minutos à 4°C e ressuspensas em 10 mL de tampão TEGED (0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTT; 0,01 M Tris-HCl, pH 7.4).

3.3 Enriquecimento das amostras com proteínas que ligam ao DNA

3.2.1 Lise celular

Um sedimento de células proveniente de 1 litro de cultivo e ressuspensas em 10 mL de tampão TEGED foi lisado através da adição de 0,5% (vol/vol) do detergente Nonidet-P40 (Sigma), seguido de tratamento com homogeneizador Dounce. O lisado foi centrifugado à 18.000 x g por 25 min à 4°C e o sedimento foi descartado.

3.2.2 Precipitação com Polietilenamina

Polietilenamina – PEI (Sigma) foi adicionado (0,35% v/v) ao extrato celular para precipitação dos ácidos nucleicos e proteínas que ligam ao DNA. Após incubação em gelo, com agitação por 10 min, a suspensão foi centrifugada à 6000 x g por 10 min à 4°C. O sedimento foi lavado por ressuspensão em tampão TEGED contendo 0,1M de NaCl, novamente centrifugado conforme condições anteriores e finalmente eluído com o 10 mL do mesmo tampão, sendo novamente centrifugado. Para a utilização na coluna de cromatografia de afinidade, a amostra foi dializada por 24 hs contra o tampão A (50mM NaCl; 1mM Na₃EDTA; 1mM beta-mercaptoetanol; 1% w/w glicerol; 20mM Tris-HCl, pH 7.4) e em seguida concentrada por liofilização (Centrivap Concentrator, LABCONCO).

3.2.3 Cromatografia de afinidade DNA-Celulose

Para a realização da cromatografia de afinidade, um volume de 2 mL de uma suspensão de DNA-celulose (BioRad) foi empacotada em uma coluna cônica de polipropileno com 0,8 x 4 cm (BioRad). A coluna empacotada foi transferida para temperatura de 4°C e lavada/equilibrada com o tampão A. A amostra (1 mL, contendo as proteínas precipitadas com PEI) foi aplicada na coluna, com fluxo de 2 mL/hora. Após, a coluna foi lavada com 50 mL com tampão A e a amostra foi eluída com 10 mL de tampão A contendo 0,5 M de NaCl e posteriormente dializada 24 hs contra o tampão A e concentrada (Centrivap Concentrator, LABCONCO).

3.3 Quantificações de proteínas

Para a determinação da concentração protéica, foi utilizado como padrão o método estabelecido por BRADFORD (1976), sendo que a curva padrão foi estabelecida utilizando-se BSA (Sigma) e a leitura foi realizada a 595 nm.

3.4 Eletroforeses

3.4.1 Géis unidimensionais

As amostras enriquecidas com proteínas que ligam ao DNA foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) em condições desnaturantes, conforme descrito por LAEMMLI (1970). As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra desnaturante (TRIS-HCl 0,5 M pH 6.8; glicerol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,01%; 2-betamerceptoetanol 4% (v/v); SDS 2%) para um volume final de 20 µl, sendo posteriormente incubadas a 100°C por 5 min e finalmente resolvidos em gel separador contendo 12% de concentração final de acrilamida.

3.4.2 Géis bidimensionais

Na eletroforese bi-dimensional (2D), a primeira dimensão foi realizada utilizando-se 0,5 - 2 mg de proteínas solubilizadas em tampão IEF (7 M uréia; 2 M tio-uréia; 4% (w/v) CHAPS; 1% (w/v) DTT e 0.2% (v/v) anfólitos pH 3–10 (Bio-Rad)) para um volume final de 150 µl. Na separação da primeira dimensão foram utilizadas tiras de pH imobilizado de 7 cm, com pH variando de 4-10 (BioRad), sendo reidratadas passivamente por 16hs. A isoletrofocalização foi realizada utilizando o sistema Protean IEF (BioRad), com 4.000 V/h, até a voltagem máxima de 10.000 V. As tiras contendo as proteínas focalizadas foram armazenadas a -20°C. Após a realização da separação em primeira dimensão, a tira foi descongelada e incubada em tampão de equilíbrio contendo 1% DTT por 15 min, seguido de uma segunda etapa de incubação com tampão de equilíbrio com 4% de iodocetamida. A segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE 12%.

3.5 *Western blot*

Para a realização dos experimentos de *Western blot*, géis de poliacrilamida (conforme descritos no item anterior) foram colocados em contato com membranas de nitrocelulose e envolvidos em papel filtro. Esta montagem foi imersa em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3) e submetido a voltagem para a transferência das proteínas do gel para a membrana. Para a confirmação da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Vermelho de *Ponceau* (1:200) e em seguida descorada com tampão PBST (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO 1,5 mM, KCl 2,5 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,6). A membrana foi posteriormente bloqueada por 16 hs com solução blotto 5% (PBST + 5% leite em pó).

Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes com o tampão PBST, e incubada por 1 h com o anticorpo anti-sigma de *M. hyopneumoniae* 7448 (WEBER, 2008). A membrana foi novamente lavada três vezes com o tampão PBST, por 10 min cada, e incubado por 1 h com segundo anticorpo, conjugado com peroxidase. Após, foi novamente lavado como no passo anterior, e finalmente revelado usando o *kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) conforme protocolo do fabricante.

3.6 Espectrometria de massas

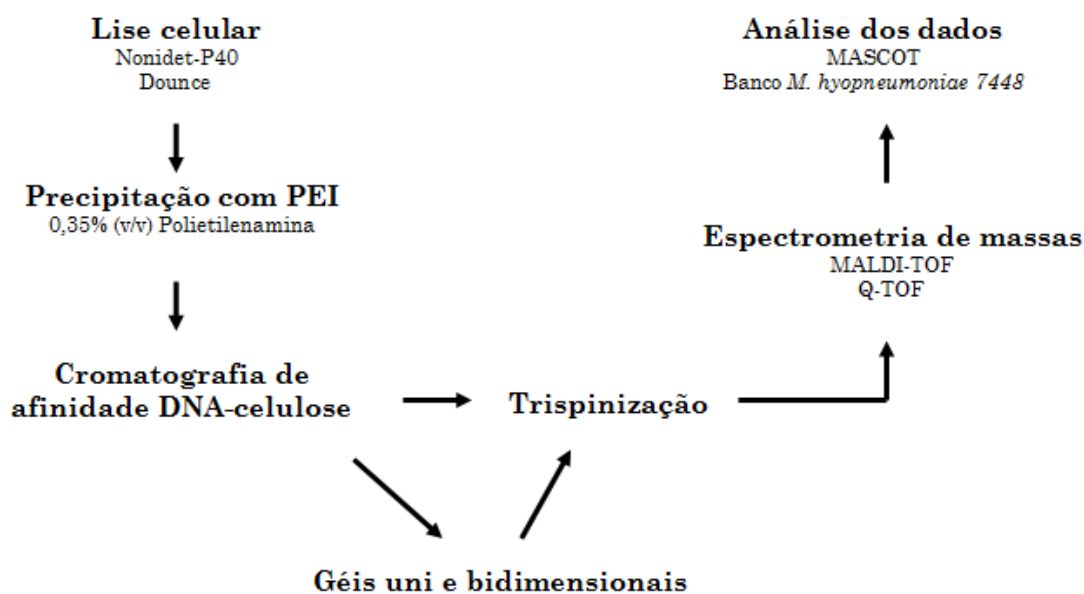
Para a identificação em MALDI-TOF MS, *spots* de proteínas foram manualmente retirados de géis uni e bi-dimensionais. Os fragmentos foram lavados três vezes com 180 µl de uma solução contendo 50% de acetonitrila e 50 mM de bicarbonato de amônio permanecendo cada vez 15 min em contato com a solução. Finalmente os fragmentos dos géis de poliacrilamida foram lavados com 180 µl de acetonitrila, sendo posteriormente secos (Centrivap Concentrator, LABCONCO). Após, os fragmentos foram reidratados com uma solução contendo bicarbonato de amônio 25mM, pH 8,0 e 10 µg de tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega), sendo que a digestão foi realizada por aproximadamente 16 horas. Após a tripsinização, os fragmentos foram incubados por 1 hora em 50 µl de uma solução para extração de peptídeos (50% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoracético em água), sendo que este passo foi executado duas vezes. Amostras digeridas com tripsina (1 µl cada, correspondendo a cada spot do gel) foram misturadas com 1 µl of alfa-ciano-4-hidroxicinâmico ácido (10 mg mL⁻¹ in 0.1% TFA in 1:1 acetonitrila/metanol) e colocadas em placa (96-spot stainless steel MALDI target plate, Waters) para secar a temperatura ambiente. A calibração interna do aparelho foi realizada utilizando uma mistura de PEG (PEG 400, 1000 e 2000 em idodeto de sódio). A espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro de massa MALDI micro MX PSD, da Micromass/Waters (UNIPROTE-MS, Cbiot/UFRGS), sendo os dados de PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) correspondente a cada *spot* analisado.

Também foi utilizada a metodologia de separação por cromatografia líquida (LC) acoplada com espectrometria de massas em tandem (MS/MS) para a identificação de proteínas. Análises de MS/MS foram realizadas um espectrômetro de massas Ultima API (Micromass, Manchester, ENG), com ionização por ESI (*electrospray*) Q-TOF (*quadrupole time-of-flight*), acoplado ao sistema de cromatografia líquida capilar (CapLC, Waters, Milford, USA). Para a identificação em ESI-Q-TOF MS/MS foram utilizadas amostras eluídas da cromatografia de afinidade DNA-celulose (0,1 – 0,5 mg) digeridas com tripsina (Promega).

3.7 Análise dos dados

A identificação dos espectros foi realizada utilizando o software Mascot (Matrix Science), sendo os espectros analisados contra as proteínas totais do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 digerido *in silico* com tripsina (disponibilizados pelo UNIPROTE-MS – Cbiot/UFRGS). Os parâmetros utilizados foram os seguintes: tripsina como enzima de corte; janela de tolerância para peptídeos monoisotópicos de ± 0.5 Da; a janela de tolerância para MS/MS de ± 0.5 Da; carboamidometilação e oxidação das metioninas foram escolhidas como modificações variáveis.

A representação esquemática da sequência dos materiais e métodos utilizada para a identificação experimental das proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae* está representada abaixo:



3.8 Ferramentas *in silico*

Foram utilizados vários algoritmos e programas descritos na literatura de livre acesso para a detecção de proteínas que ligam ao DNA, aplicados tanto para as proteínas com função conhecidas e principalmente para as proteínas hipotéticas. Para a identificação dos motivos de hélice-volta-hélice (principal motivo de ligação ao DNA), foram utilizados os programas *Helix-turn-helix Motif Predictor* (DODD & EGAN, 1990) e o *Jemboss HTH Predictor* (RICE *et al.*, 2000). A base de dados *DBD: Transcription factor prediction database* (WILSON *et al.*, 2008) foi utilizada para a análise de fatores de transcrição descritos para as espécies de micoplasmas com genoma completamente sequenciados. Para as análises de homologia/analogia, utilizamos os softwares *Phyre* (KELLEY & STERNBERG, 2009) e o *HHPred* (SÖDING *et al.*, 2005). A predição da localização subcelular foi realizada através dos programas *Psort* (HORTON *et al.*, 2007) e *PASUB* (LU *et al.*, 2004).

O programa *MEME* (TIMOTHY & ELKAN, 2004) que é um pacote de ferramentas para análise de sequências baseado em motivos estruturais foi também aplicado para a análise dos dados. Alinhamentos múltiplos de motivos de ligação ao DNA conhecidos (HTH, SIS, HrcA e Sigma) de espécies mais próximas filogeneticamente a micoplasmas foram importados do banco de dados *Pfam* (FINN *et al.*, 2008) e utilizados para a confecção das matrizes no *MEME*. Todas as proteínas codificadas pelo genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 (NCBI: NC_007332) foram submetidas a tais análises.

4. Resultados

4.1 Otimização da lise celular de *M. hyopneumoniae*.

O principal objetivo da padronização de condições de lise das células de *M. hyopneumoniae* foi para o isolamento de proteínas solúveis presente no citoplasma celular. A lise foi realizada utilizando primeiramente o detergente não iônico Nonidet-P40 (Sigma) associado à utilização de homogeneizador do tipo Dounce, para a realização de uma lise celular branda, com foco principal nas proteínas citoplasmáticas. .

A análise da eficiência da lise celular foi realizada com o uso do *kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability* (Invitrogen). Este *kit* monitora a viabilidade celular em função da integridade da membrana, através do uso de dois corantes fluorescentes: SYTO® 9 que cora os ácidos nucléicos de verde e iodeto de propídio que cora de vermelho. Enquanto o SYTO® 9 cora todas as células (com ou sem danos na membrana), o iodeto de propídio cora apenas as células que apresentam danos na membrana citoplasmática, sendo incapaz de penetrar células íntegras. Através deste método foi possível visualmente analisar a lise celular através da observação da incorporação dos corantes nas amostras (Figura 6) e concluir que este método de lise branda foi satisfatório.

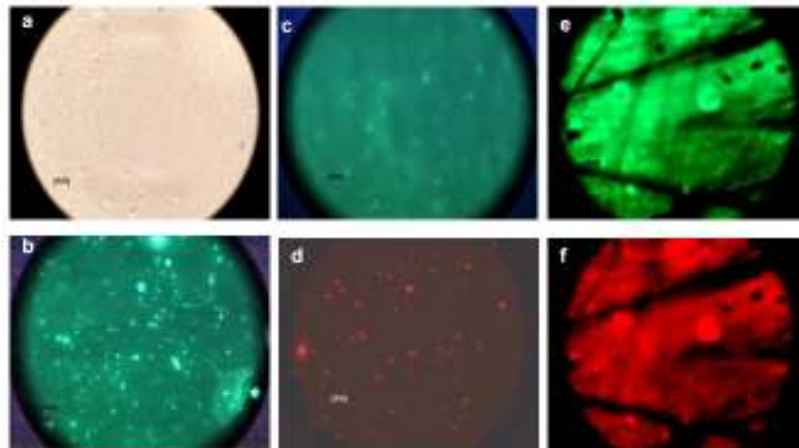


Figura 6 – Determinação da lise das células de *M. hyopneumoniae*.

Células visualizadas em microscópio de fluorescência com o uso do *kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability* (Invitrogen). A metodologia foi utilizada também para células de *E. coli* como controle do experimento. (a) células de *E. coli* focalizadas (aumento de 640x); (b) células de *E. coli* vivas (aumento de 640x). (c) células de *M. hyopneumoniae* vivas (aumento de 1000x); (d) células de *M. hyopneumoniae* mortas lisadas com Nonidet P-40 (aumento de 1000x). : (e) células de *M. hyopneumoniae* vivas (aumento de 1000x); (f) células de *M. hyopneumoniae* mortas lisadas com Nonidet P-40 seguido de tratamento com homogeneizador Dounce (aumento de 1000x).

4.2 Enriquecimento de amostras com proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae*.

4.2.1 Precipitação com polietilenamina (PEI).

A PEI é um polímero alifático de poliamina que, devido a seu alto peso molecular e alta carga catiônica, modifica a carga da superfície protéica sendo portanto, muito utilizado na precipitação de proteínas. Esta precipitação é dependente da concentração de sal, sendo que a variação de NaCl é utilizada para a posterior eluição das proteínas precipitadas. A PEI também possui como característica a habilidade de, em determinadas concentrações, ligar-se ao DNA ocasionando a sua precipitação, juntamente com as proteínas a ele ligadas.

As proteínas que ligam ao DNA provenientes do extrato bruto de *M. hyopneumoniae* 7448 foram parcialmente purificadas através da adição de PEI. A partir de 1 litro de cultivo, foi possível observar uma grande diminuição na quantidade de proteínas da amostra, uma vez que o pellet de células continha aproximadamente 20 mg de proteínas e a amostra recuperada após a precipitação com PEI possuía apenas aproximadamente 500 µg de proteínas. Estes resultados foram observados através da visualização em gel de SDS-PAGE (Figura 7).

Com o objetivo de verificar a presença de proteínas que ligam ao DNA em amostras de proteínas precipitadas com PEI, foi analisado como controle da presença deste tipo de proteína nos extratos o fator σ de *M. hyopneumoniae*. Portanto foram realizados experimentos de *Western blot*, utilizando anticorpos anti-sigma recombinante de *M. hyopneumoniae* 7448, produzidos em nosso laboratório (WEBER, 2008), sendo então possível verificar a presença do fator σ nas amostras (Figura 8).

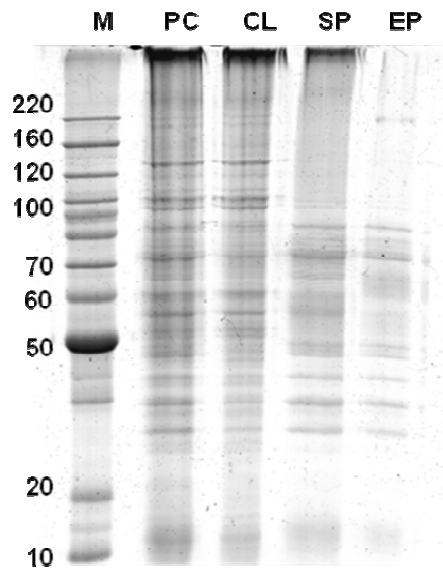


Figura 7 – Padrão de proteínas observadas após precipitação com PEI.

M – marcador de massa molecular; PC – 5 μ l do pellet de células (extrato bruto); CL – 15 μ l do sobrenadante da lise celular; SP – 15 μ l do sobrenadante PEI (proteínas que não precipitaram); EP – 15 μ l da fração de proteínas eluídas da precipitação com PEI. Gel de SDS-PAGE 12%, corado com coomassie coloidal blue G250.

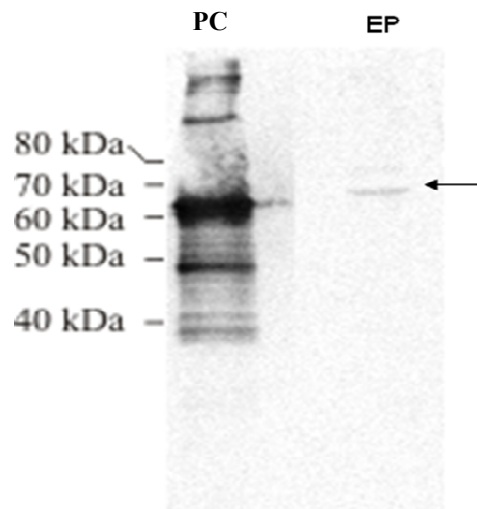


Figura 8 – Confirmação da presença do fator σ de *M. hyopneumoniae* em amostras de proteína precipitadas com PEI.

PC – controle positivo (extrato bruto de *M. hyopneumoniae* 7448); EP – 15 μ l da fração de proteínas eluídas da precipitação com PEI. A seta indica a banda correspondente ao fator sigma recombinante de *M. hyopneumoniae* 7448 (~70 kDa). Western blot utilizando anticorpos anti-sigma de *M. hyopneumoniae*, visualizados com o kit ECL Plus Western blotting detection (GE Healthcare).

4.2.2 Cromatografia de afinidade DNA-celulose

As amostras oriundas da precipitação com PEI foram concentradas (Centrivap Concentrator, LABCONCO) e ressuspensas no tampão utilizado pela coluna (tampão A). Estas amostras (1 mL cada, correspondendo ao cultivo inicial de 1 litro, contendo 500 µg de proteínas) foram então submetidas a cromatografia utilizando a matriz de afinidade DNA-celulose (GE Healthcare), que consiste de esferas de celulose com DNA de timo de novilho imobilizado, sendo este tipo de cromatografia muito utilizado para o isolamento de DNA ou RNA polimerases e demais proteínas que ligam ao DNA.

Novamente, pode-se notar uma queda no conteúdo protéico, sendo possível recuperar aproximadamente 20% (100 µg) das proteínas iniciais. Grande parte das proteínas da amostra não ligou-se ao DNA da coluna, sendo então eliminadas nas etapas de lavagem. A composição protéica eluída com 0,5 M ou 1 M de NaCl parece ser bastante semelhante, como pode ser observado no experimento de SDS-PAGE (Figura 9) e nas identificações das referidas frações por espectrometria de massas, sendo que, após a padronização da técnica, passamos a utilizar a eluição com 1 M de NaCl como padrão, uma vez que corresponde a maior fração protéica.

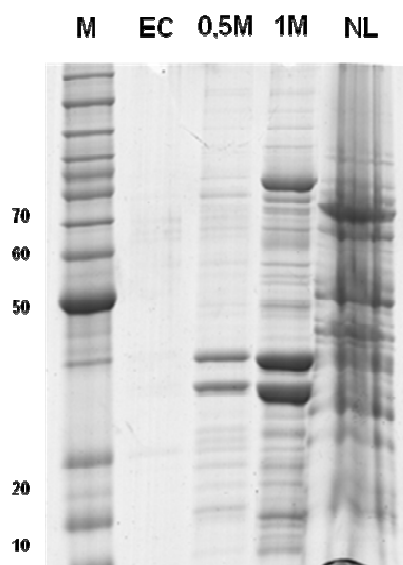


Figura 9 – Cromatografia de afinidade DNA-celulose.

M – marcador; EC – coluna equilibrada com tampão A, antes da aplicação da amostra; 0,5M – amostras eluídas com tampão A + 0,5 M de NaCl; 1M – amostras eluídas com tampão A + 1 M de NaCl; NL – proteínas que não ligaram na coluna (primeira fração da lavagem da coluna). Gel de SDS-PAGE 12%, corado com coomassie coloidal blue G250.

Com o objetivo de avaliar a presença de proteínas que ligam ao DNA nas amostras eluídas da coluna de DNA-celulose novos experimentos de *Western blot* foram realizados. A Figura 10 demonstra a presença do fator σ de *M. hyopneumoniae* em amostras eluídas da cromatografia de afinidade DNA-celulose, pois apresentou uma banda de reconhecimento do tamanho esperado quando utilizado o anticorpo anti-sigma recombinante (anteriormente utilizado).

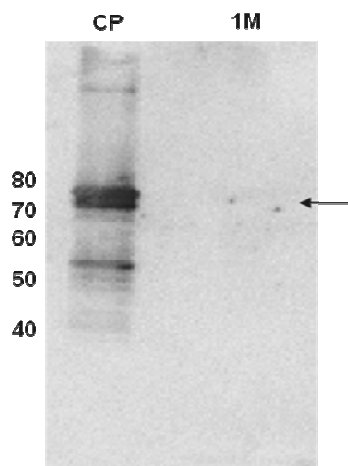


Figura 10 – Confirmação da presença do fator sigma de *M. hyopneumoniae* 7448 em amostras eluídas da cromatografia de afinidade.

CP – controle positivo (extrato bruto de *M. hyopneumoniae* 7448); 1M – 15 μ l da fração de proteínas eluídas da coluna DNA-celulose com 1M de NaCl. A seta indica a banda correspondente ao fator sigma recombinante de *M. hyopneumoniae* 7448 (~70 kDa). *Western blot* utilizando anticorpos anti-sigma de *M. hyopneumoniae* 7448, visualizados com o kit *ECL Plus Western blotting detection* (GE Healthcare).

4.3 Identificação de proteínas que ligam ao DNA

4.3.1 Preparo de amostras

Experimentos de SDS-PAGE uni e bidimensionais (1D e 2D) foram realizados com amostras protéicas enriquecidas com proteínas que ligam ao DNA, oriundas da precipitação com PEI seguida de cromatografia de afinidade (Figura 11). Todos os *spots* visíveis destes géis foram recortados e então tripsinizados para posterior análise em espectrometria de massas. Amostras não resolvidas em gel também foram utilizadas, através da tripsinização direta do material eluído da cromatografia, com posterior identificação em espectrometria de massas dos peptídeos gerados.

Com objetivo de minimizar possíveis erros de identificação, foram utilizados cultivos individuais de 1 litro, cada um deles correspondendo a uma amostra independente e cada experimento (tratamentos para enriquecimento com proteínas que ligam ao DNA e géis/tripsinização) foi repetido no mínimo três vezes.

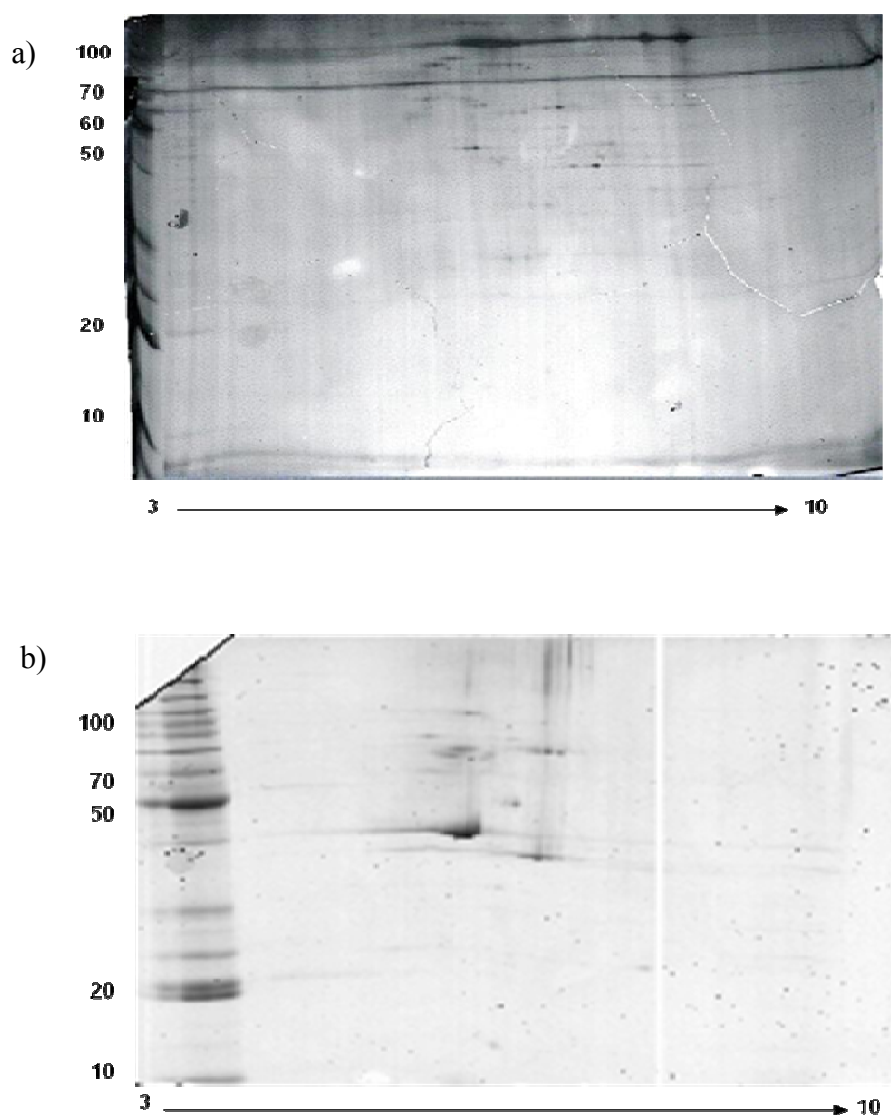


Figura 11 – Proteínas isoladas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae* 7448.

Géis de eletroforeses bidimensionais de amostras enriquecidas com proteínas que ligam ao DNA (PEI + cromatografia). Proteínas (~300 µg) foram separadas utilizando na primeira dimensão tiras (a) pH imobilizado de 17 cm, com o pH variando entre 3 – 10 e (b) pH imobilizado de 7 cm, com o pH variando entre 3 – 10, seguidas de SDS-PAGE 12% e coradas com coomassie brilliant blue G250. O massa molecular (aproximada) é mostrada na esquerda dos géis e o gradiente de pH é mostrado abaixo, da direita para a esquerda. Todos os *spots* visíveis foram recortados e submetidos à espectrometria de massas.

4.3.2 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Através da análise de amostras enriquecidas com proteínas que ligam ao DNA e que foram submetidas ou não a géis de eletroforese, foi possível identificar um total de 32 proteínas (Tabela 2). Diversas proteínas que participam de processos biológicos que requerem a ligação ao DNA (transcrição, replicação, reparo, etc.) foram identificadas, juntamente com algumas proteínas hipotéticas que até o momento nunca haviam sido experimentalmente identificadas podendo ser potenciais proteínas de ligação ao DNA. Estas proteínas hipotéticas foram submetidas a análises por buscas por domínios conservados e por homologia (Tabela 3). Os resultados destas análises sugerem que algumas destas proteínas hipotéticas podem realmente apresentar a característica de ligação ao DNA.

4.4 Predição *in silico* de proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae*

4.4.1 MEME Suite: Motif-based sequence analysis tools

Paralelamente aos experimentos de caracterização de proteínas com capacidade de ligação ao DNA foram realizadas análises *in silico* na tentativa de substanciar os dados experimentais. Com auxílio do software MEME (TIMOTHY & ELKAN, 2004) foi realizada a montagem de matrizes de probabilidade de posição específica a partir do alinhamento de sequências de motivos importados do Pfam (FINN *et al.*, 2008). Na matriz foi determinado um valor para cada aminoácido em cada posição em função da probabilidade do aminoácido estar presente naquela posição. Estas matrizes podem ser representadas numa interface gráfica contendo um grupo de letras (que correspondem a cada aminoácido) em cada posição dentro do motivo, sendo que o tamanho de cada letra é proporcional a chance que este aminoácido tem de estar naquela posição.

Os resultados individuais da aplicação destas matrizes na análise das proteínas totais presentes no genoma de *M. hyopneumoniae* estão representados através de uma Tabela com as proteínas identificadas e também com a interface gráfica mostrando o consenso dos motivos:

- **Motivo HTH:** este motivo, anteriormente já descrito, tem seu consenso em espécies relacionadas com *M. hyopneumoniae* 7448 (filos Tenericutes e Firmicutes) mostrados na Figura 12, e as 38 proteínas que foram preditas como possuindo este motivo estão apresentadas na Tabela 4.

- **Motivo Rrf2:** algumas proteínas bacterianas hipotéticas têm mostrado semelhanças com a proteína Rrf2 de *Desulfovibrio vulgaris*, entre elas algumas hipotéticas de *E. coli* e de *Bacillus subtilis*. São geralmente proteínas pequenas e que podem representar potenciais funções relacionadas a reguladores transcricionais. A Tabela 5 apresenta as seis proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 nas quais foram identificados potenciais motivos Rrf2, sendo o consenso deste motivo está representado na Figura 13.

- **Motivo sigma:** este motivo consiste basicamente da região 4 dos fatores σ , que se ligam à região -35 do DNA através de uma estrutura em forma de hélice-volta-hélice. A Figura 14 demonstra o consenso deste motivo e as oito proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 que possivelmente o contém são listadas na Tabela 6.

4.1.2 Jemboss e HTH predictor

A utilização do programa *Jemboss*, que é a interface gráfica do *EMBOSS* (*The European Molecular Biology Open Software Suite*), apresenta uma serie diversificada de ferramentas de bioinformática, que podem ser utilizadas nas análises de proteínas e DNA. Entre eles, o *emboss helixturnhelix* que identifica motivos de ligação ao DNA através do método descrito por DODD & EGAN (1990). Este método se baseia na utilização de uma matriz, calibrada com uma grande quantidade de sequências de hélice-volta-hélice previamente conhecidas, estando também disponível na ferramenta *Helix-turn-helix motif prediction* (*HTH - NPS@: Network Protein Sequence Analysis*, COMBET *et al.* 2000), que analisa a probabilidade de determinada proteína ter uma estrutura na forma de hélice-volta-hélice. Estas duas metodologias foram utilizadas em conjunto para analisar o genoma de *M. hyopneumoniae* 7448. Após esta análise foi possível identificar no genoma de *M. hyopneumoniae* 16 proteínas que apresentam este motivo de ligação ao DNA (Tabela 7). A Tabela 8 reúne os dados obtidos em todas as análises, mostrando que várias proteínas foram preditas por mais de um programa, e algumas possuem mais de um motivo predito.

Tabela 2 Lista de proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 identificadas experimentalmente como proteínas que ligam ao DNA.

Gene ^a	PM ^b	pI ^c	Proteína ^d	Processo biológico ^e	Localização ^f	Amostra ^g	Espectrometria ^h
1. Hipotéticas							
MHP7448_0327	56	9.5	MHP7448_0327 proteína hipotética	Não conhecida	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0363	19	9.6	MHP7448_0363 proteína hipotética	Não conhecida	Membrana	PP + CA	MALDI
MHP7448_0412	32	9.8	MHP7448_0412 proteína hipotética	Não conhecida	Citoplasmática	CA	MALDI
MHP7448_0425	31	9.5	MHP7448_0425 proteína hipotética	Não conhecida	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0431	47	7.2	MHP7448_0431 proteína hipotética	Não conhecida	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0444	200	9.3	MHP7448_0444 proteína hipotética	Não conhecida	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0675	102	6.6	MHP7448_0675 proteína hipotética	Não conhecida	Membrana	PP + CA	MALDI
2. Processamento da informação genética							
2.1 Transcrição							
MHP7448_0010	38	9.4	HrcA; repressor transcricional induzido por temperatura	Transcrição	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0168	37	5.4	RpoA; RNA polimerase subunidade α	Transcrição	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0279	31	9.4	Regulador transcricional	Transcrição	Não conhecida	CA	Q-TOF
MHP7448_0637	23	9.4	NusG proteína de anti-terminação transcricional	Transcrição	Citoplasmática	CA	MALDI/Q-TOF
2.2 Replicação e reparo							
MHP7448_0001	55	9.3	DnaA ; proteína de início de replicação cromossomal	DNA replication	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0006	37	9.1	DHH; família fosfoesterase	Reparo e recombinação	Citoplasmática	CA	MALDI
MHP7448_0062	32	8.9	Nfo; endonuclease IV	Reparo de DNA	Citoplasmática	CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0066	60	9.6	UvrC; excinuclease ABC subunidade C	Reparo de DNA	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0130	26	9.8	Ung; uracil-DNA glicosilase	Reparo de DNA	Citoplasmática	PP + CA	Q-TOF

2.3 Enovelamento e degradação

MHP7448_0011	28	5.5	GrpE; proteína de choque térmico	Enovelamento protéico	Citoplasmática	PP + CA	MALDI
MHP7448_0067	66	4.9	DnaK; chaperona	Enovelamento protéico	Membrana	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0071	11	10	HimA; proteína nucleóide que liga a DNA	Semelhante a histona	Citoplasmática	CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0149	51	5.5	Tig; fator “gatilho” (<i>trigger factor</i>)	Enovelamento protéico	Citoplasmática	CA	MALDI/Q-TOF

2.4 Tradução

MHP7448_0523	44	5.6	Tuf; fator de alongamento Tu	Tradução	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0075	78	5.3	FusA; fator de alongamento G	Tradução	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0243	65	8.9	AspS; aspartil-tRNA sintetase	Tradução	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0273	27	9.1	PheS; fenilalanil-tRNA sintetase cadeia α	Tradução	Citoplasmática	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0534	20	9,0	Frr; fator de reciclagem ribossomal	Tradução	Citoplasmática	CA	Q-TOF
MHP7448_0179	20	9.9	RpIF 50S proteína ribossomal L6	Estrutura do ribossomal	Citoplasmática	CA	Q-TOF
MHP7448_0193	23	10.2	RpID 50S proteína ribossomal L4	Estrutura do ribossomal	Citoplasmática	CA	Q-TOF
MHP7448_0179	25	10.0	RpIC 50S proteína ribossomal L3	Estrutura do ribossomal	Citoplasmática	CA	Q-TOF
MHP7448_0576	24	10.4	RpSD 30S proteína ribossomal S4	Estrutura do ribossomal	Citoplasmática	CA	Q-TOF

3. Metabolism

MHP7448_0494	36	9.4	Manose-6-fosfato isomerase	Metabolismo	Citoplasmática	CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0115	42	5.2	PdhA piruvato desidrogenase E1 – subunidade σ	Metabolismo	Citoplas./Membr.	PP + CA	MALDI/Q-TOF
MHP7448_0116	37	6.2	PdhB piruvato desidrogenase	Metabolismo	Citoplas./Membr.	PP + CA	MALDI/Q-TOF

^{a,d} O código do gene e nome da proteína são da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448. Número de acesso no NCBI: NC_007332.

^{b,c} PM - peso molecular (Kda, aproximado); PI – ponto isoelétrico; ambos de *ProtParam* (*ExpASY Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics*).

^e KEEG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>

^f Predição da localização subcelular com o uso do software Psort.

^g Métodos de enriquecimento com proteínas de superfície - PP: precipitação com PEI; CA: Cromatografia de afinidade.

^h Espectrometria de massas utilizada na identificação.

Tabela 3 Proteínas hipotéticas identificadas experimentalmente: análise de domínios conservados e detecção de homologia/estrutura.

Identificadas experimentalmente		Identificação por bioinformática			
		<i>Blastp</i> ^c		Detecção de homologia e predição de estrutura	
Gene ^a	Proteína ^b	Alinhamentos significantes	Domínios conservados	<i>HHPred</i> ^d	<i>Phyre</i> ^e
MHP7448_0327	Proteína hipotética metiltransferas	família N-6 DNA Metilase	N6_Mtase, N-6 DNA Metilase	Adenina-específica DNA metiltransferase	Adenina-n6-dna- <i>E-value</i> 9.3e ⁻²²
MHP7448_0363	Proteína hipotética	Não encontrado	Não encontrado	Sem predição significativa	Sem predição significativa
MHP7448_0412	Proteína hipotética	Não encontrado	Não encontrado	Sem predição significativa	Sem predição significativa
MHP7448_0425	Proteína hipotética	Não encontrado	Não encontrado	Sem predição significativa	Sem predição significativa
MHP7448_0431	Proteína hipotética PEBP	Proteína que liga fosfolípidios	PEBP, Proteína que liga a Fosfatidil-etanolamina	PEBP ou Carboxipeptidase Y	Proteínas procarióticas <i>E-value</i> 7.9e ⁻¹⁸
MHP7448_0444	Proteína hipotética	Não encontrado	Não encontrado	Sem predição significativa	Sem predição significativa
MHP7448_0675	Proteína hipotética	Enzima de restrição tipo III	Enzima de restrição 5-metilcitosina-específica subunidade McrB	Sem predição significativa	Sem predição significativa

^{a,b} O código do gene e nome da proteína são da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448. Número de acesso no NCBI: NC_007332.

^c BlastP – desenvolvido para encontrar regiões de similaridade em sequências de aminoácidos. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

^d HHPred - Detecção de homologia protéica por comparação HMM-HMM (Söding, 2005). Disponível em: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>

^e Phyre – Reconhecimento de analogia/homologia de proteínas (Kelley *et al.*, 2009). Disponível em: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>

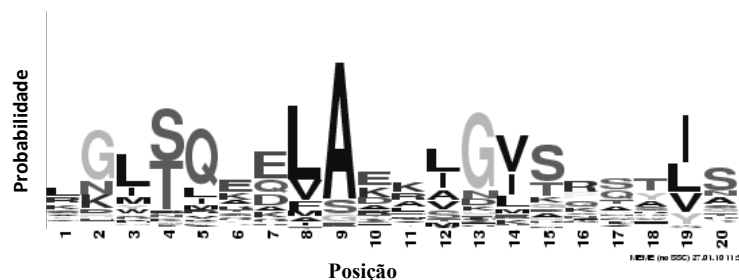


Figura 12 – Representação gráfica do consenso do motivo HTH (MEME), onde cada letra corresponde a um aminoácido, segundo o código padrão de uma letra.

Tabela 4 – Predição de proteínas com motivo HTH

Número gene ^a	Proteína ^b	Início ^c	Final ^d	Sequência encontrada ^e
MHP7448_0584	InfB fator de início da tradução	34	53	IMTIAELAQKINVSVNQII
MHP7448_0557	d-ribulose-5-fosfato3 epimerase	69	88	CKNSLEKVEKLIQIGFKTIF
MHP7448_0268	MgtA transportador de cátions tipo P	603	622	PSLKKADVGFAMITGSQVS
MHP7448_0363	proteína hipotética	130	149	KKLTWKELEWKLVDFTLK
MHP7448_0617	RpoC RNA polimerase subunidade β'	454	473	EKNSKEKISTKSDLSQLTVK
MHP7448_0488	proteína hipotética	63	82	KHLSKNKIGAIITQRNTLL
MHP7448_0630	5'-nucleotidase precursor	56	75	KGKTIAKIACYIGYDSVAIG
MHP7448_0177	RpsE 30S proteína ribossomal S5	193	212	KLRTINQVAELRDLSQQAQ
MHP7448_0033	ParC DNA topoisomerase IV	413	432	FNFSQQTQAEIASMRLYRLS
MHP7448_0532	PolC DNA polimerase III PolC	708	727	MLKNLINLAKKLQIPAVAIG
MHP7448_0445	proteína hipotética	1803	1822	SKKSQEVFSSQSSQTQTTA
MHP7448_0635	Gcp putativa <i>DNA-binding/iron</i>	250	269	YLKRQLDLALKTKKVKTTIT
MHP7448_0657	transportador ABC	167	186	AKYKIDKTEALTKLDQTLIA
MHP7448_0198	proteína P97	404	423	LEYSLDAASASLDDKDKSIV
MHP7448_0234	RbsB proteína periplasmica	57	76	VEKGIETAAKEGVDDYEVYD
MHP7448_0663	adesina – semelhante à proteína P146	182	201	QNLRETDVDFSSSQTSLSA
MHP7448_0547	proteína hipotética	1111	1130	QEISESEIQLALTKTNSTLF
MHP7448_0195	RpsJ 30S proteína ribossomal S10	75	94	NKKSREQFESRTHKRLVILK
MHP7448_0644	DnaB DNA helicase	341	360	ISRKLKQLAREVETPILALS
MHP7448_0048	AtpE ATP sintase subunidade C	16	35	QEVSQKTVDSSNLKAFAL
MHP7448_0149	Tig fator "gatilho" (<i>trigger</i>)	374	393	YESHVEKLAKFTGKSVQEIS
MHP7448_0578	Fpg formamidopirimidina-DNA glicosilase	190	209	KLISRKEAELIYFSKILQ
MHP7448_0289	proteína hipotética	175	194	KTKKIKELKNKLHEKKNQIS
MHP7448_0528	GyrA DNA girase subunidade A	765	784	FLSKKGFGKTQVGEYRLT
MHP7448_0361	transportador ABC	130	149	QHLEIEKILDKGLKEKIYA
MHP7448_0097	Lgt pró-lipoproteína diacilglicerol	284	303	KKLKLAFFERTKEKQKYVN
MHP7448_0406	RuvB DNA helicase	257	276	KSVALDVIANVLKEHRQTII
MHP7448_0407	proteína hipotética	110	129	KKLSILKLSTSTKIKDYLA
MHP7448_0109	GyrB DNA girase subunidade B	379	398	RNLLAQKAARAASREAIK
MHP7448_0375	sistema PTS- enzima IIB	62	81	SEFSQKQKAKIVGVNTLDE
MHP7448_0530	proteína hipotética	86	105	FAFKLNSLADDLEIRNNQLL
MHP7448_0574	sistema PTS - N-acetilglucosamina	102	121	LLLKQNQLAEAYKNVLVAK

MHP7448_0675	proteína hipotética	368	387	NSVEKLEIEEKIQEKQSNIR
MHP7448_0107	proteína P102	574	593	TKNGQVQASSASQSPKSSLS
MHP7448_0332	subtilisina serina protease	206	225	KNIKIVNFEEQAKKDELTYK
MHP7448_0168	RpoA RNA polimerase subunidade α	296	315	EKLSQDDFENIKNLGRKSVQ
MHP7448_0351	proteína hipotética	396	415	LNIKRKKVKDIKLNQALN
MHP7448_0365	proteína hipotética	211	230	LGHSNLEISQKMGISNFQIN

^{a, b} O código do gene e nome da proteína são da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448. Número de acesso no NCBI: NC_007332.

^{c, d} Início e Final referem-se, respectivamente, ao início e fim da predição da sequência do motivo encontrada na proteína.

^e Referente a sequência encontrada como sendo similar ao consenso do motivo.

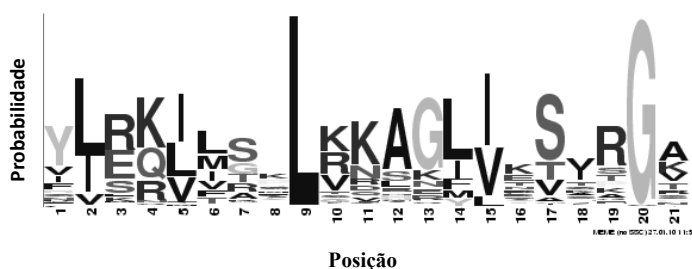


Figura 13 – Representação gráfica do consenso do motivo Rrf2 (MEME), onde cada letra corresponde a um aminoácido, segundo o código padrão de uma letra.

Tabela 5 – Predição de proteínas com motivo Rrf2.

Gene	Nome da proteína	Início	Final	Sequencia encontrada
MHP7448_0010	HrcA repressor transcricional induzido por calor	43	63	YLRAIMNQLEKEGFLEKSSS
MHP7448_0419	proteína hipotética	72	92	TIYKVLNCLIQENIETQKIA
MHP7448_0549	MtlD manitol-1-fosfato 5-desidrogenase	72	92	NNENLLKKLSSADIISTSIGA
MHP7448_0675	proteína hipotética	89	109	QKINILAKLVNSGIKIREYI
MHP7448_0200	RsmE 16S ribosomal RNA metiltransferase	43	63	YLVRLVPNSNKAEIIEKIKGN
MHP7448_0586	NusA fator de alongamento transcricional	212	232	VIENVSKNTKQSQVISKSV

^{a, b} O código do gene e nome da proteína são da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448. Número de acesso no NCBI: NC_007332.

^{c, d} Início e Final referem-se, respectivamente, ao início e fim da sequência do motivo encontrada na proteína.

^e Referente a sequência encontrada como sendo similar ao consenso do motivo.



Figura 14 – Representação gráfica do consenso do motivo σ (MEME), onde cada letra corresponde a um aminoácido, segundo a o código padrão de uma letra.

Tabela 6 – Predição de proteínas com motivo σ .

Gene	Nome da proteína	Início	Final	Sequencia encontrada
MHP7448_0060	RpoD RNA polimerase fator σ	449	477	HSFEELAAMRRVTKERVQRQIEAKILKKLR
MHP7448_0639	proteína hipotética	153	181	FPTKDIAKKIGLTTQKVNDFIRLTNNKLR
MHP7448_0480	proteína hipotética	564	592	KQLDATLEKLNLTREDINRFFAQAHEKIA
MHP7448_0618	RplL 50S proteína ribossomal	68	96	AVIKVVKDLLGLSLMDAKKLVDAAPSVLK
MHP7448_0100	proteína hipotética	40	68	KKFGEIIDKLEIDKDFVKYSANQILELSR
MHP7448_0092	proteína hipotética	637	665	KTEKDQENKIKKSIEKVTRKINSTLRKTK
MHP7448_0592	proteína que liga ATP	134	162	EILSKISYKKQTSKAKWKRLIKKAYDILR
MHP7448_0248	proteína hipotética	569	597	KSAEKTITTELSTEKTEKLEENAVVEPK

^{a, b} O código do gene e nome da proteína são da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448. Número de acesso no NCBI: NC_007332.

^{c, d} Início e Final referem-se, respectivamente, ao início e fim da sequência do motivo encontrada na proteína.

^e Referente a sequência encontrada como sendo similar ao consenso do motivo

Tabela 7 – Lista de proteínas contendo o motivo hélice-volta-hélice (HTH) utilizando os programas *Jemboss* e *HTH Predictor*.

Nome do gene / proteína ^a	Número de acesso ^b	Seqüência identificada como hélice-volta-hélice ^c <i>Jemboss</i>	<i>HTH</i> ^d <i>Predictor</i>
<i>rpoD</i> - RNA polimerase fator σ	MHP7448_0060	HSFEELAAMRRVTKERVQIE A 449-----470	100%
<i>rpIT</i> - 50S proteína ribossomal L20	MHP7448_0123	SRINAAARNQGISYSQMYKIK 62-----83	25%
<i>alaS</i> - alanil-tRNA sintetase	MHP7448_0201	RRAYWNGKKLGISHPLYKLV E 313-----334	25%
<i>secD</i> - bifuncional pre-proteína translocase	MHP7448_0241	KKYQFDAQKYLISDATVSQAL N 267-----288	25%
<i>MHP7448_0248</i> - proteína hipotética	MHP7448_0248	GSTYQIADLIDLDSQVTSSQIFR 269-----290	100%
<i>mgfA</i> - transportador de cátions tipo P ATPase	MHP7448_0268	LKKADVGFAMGITGSQVSKQV A 605-----626	71%
regulador transcricional	MHP7448_0279	QTINELAATLFISVGTITQLTK 34-----55	71%
<i>MHP7448_0365</i> - proteína hipotética	MHP7448_0365	HSNLEISQKMGISNFQINKAID 213-----234	25%
<i>pcrA</i> - helicase ATP-dependente	MHP7448_0403	IHFEDLANERGAEVEWIYRKIQ 326-----347	50%
<i>MHP7448_0414</i> - ICEF-II putativo	MHP7448_0414	LRNKEFADRLKFIPSQIYKYS 344-----365	25%
<i>MHP7448_0444</i> - proteína hipotética	MHP7448_0444	RRFYSRADKANLTSSTITNVTT 840-----861	25%
<i>oppC</i> - proteína permease	MHP7448_0503	PSSKEFSQRYNLTKEQISLLKP 2-----23	NS*
<i>potA</i> - espermidina/putrescina transportador ABC	MHP7448_0542	KKRKKLQDKLDDSDFRYSNWE N 164-----185	NS*
<i>infB</i> - fator de início da tradução IF-2	MHP7448_0584	MTIAELAQKINVSQIITYFF 36-----57	100%
<i>rpoB</i> - RNA polimerase subunidade β	MHP7448_0617	NSKEKISTKSDLSQLTVKSIIN 456-----477	NS*
<i>MHP7448_0639</i> - proteína hipotética	MHP7448_0639	FPTKDIAKKIGLTTQKVND FIR 153-----174	25%

^{a,b} O nome da proteína e número de acesso do gene são da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448. Número de acesso no NCBI: NC_007332.

^c Seqüência encontrada na proteína como sendo uma possível HTH, localização (início e final). *Jemboss* (RICE *et al.*, 2000).

^d Probabilidade desta proteína realmente possuir uma HTH. *HTH Predictor* (DODD *et al.*, 1990).

* Não significante.

Tabela 8 – Proteínas de *M. hyopneumoniae* com potenciais motivos de ligação ao DNA identificadas *in silico*.

Gene ^a	Proteína ^b	HTH ^c JemBoss	HTH ^d MEME	Rrf2 ^e MEME	Sigma ^f MEME
1. Hipotéticas*					
MHP7448_0092	MHP7448_0092 proteína hipotética				✓
MHP7448_0100	MHP7448_0100 proteína hipotética				✓
MHP7448_0248	MHP7448_0248 proteína hipotética	✓			✓
MHP7448_0289	MHP7448_0289 proteína hipotética		✓		
MHP7448_0363	MHP7448_0363 proteína hipotética		✓		
MHP7448_0365	MHP7448_0365 proteína hipotética	✓	✓		
MHP7448_0419	MHP7448_0419 proteína hipotética			✓	
MHP7448_0444	MHP7448_0444 proteína hipotética	✓	✓		
MHP7448_0445	MHP7448_0445 proteína hipotética		✓		
MHP7448_0480	MHP7448_0480 proteína hipotética				✓
MHP7448_0488	MHP7448_0488 proteína hipotética		✓		
MHP7448_0530	MHP7448_0530 proteína hipotética		✓		
MHP7448_0547	MHP7448_0547 proteína hipotética		✓		
MHP7448_0551	MHP7448_0551 proteína hipotética		✓		
MHP7448_0639	MHP7448_0639 proteína hipotética	✓			✓
MHP7448_0675	MHP7448_0675 proteína hipotética		✓	✓	
2. Processamento da informação genética*					
2.1 Transcrição					
MHP7448_0010	HrcA repressor transcricional induzido pelo calor		✓		
MHP7448_0060	RpoD RNA polimerase fator σ	✓			✓
MHP7448_0168	RpoA RNA polimerase subunidade α		✓		
MHP7448_0279	regulador transcricional	✓			
MHP7448_0586	NusA fator de alongamento transcricional NusA			✓	
MHP7448_0617	RpoB RNA polimerase subunidade β'	✓	✓		
2.2 Replicação e reparo					
MHP7448_0001	DnaA proteína de iniciação da replicação	✓			
MHP7448_0033	ParC DNA topoisomerase IV subunidade A		✓		
MHP7448_0109	GyrB DNA girase subunidade B		✓		
MHP7448_0283	TopA DNA topoisomerase I		✓		
MHP7448_0403	PcrA helicase ATP-dependente		✓		
MHP7448_0414	MHP7448_0414 ICEF-II putativo		✓	✓	
MHP7448_0528	GyrA DNA girase subunidade A			✓	
MHP7448_0532	PolC DNA polimerase III		✓		
MHP7448_0578	Fpg formamidopirimidina-DNA glicosilase		✓		
MHP7448_0644	DnaB DNA helicase		✓		

2.3 Enovelamento e degradação

MHP7448_0149 Tig; fator "gatilho" (*trigger factor*) ✓

2.4 Translation

MHP7448_0123 RplT 50S proteína ribossomal L20 ✓
MHP7448_0177 RpsE 30S proteína ribossomal S5 ✓
MHP7448_0195 RpsJ 30S proteína ribossomal S10 ✓
MHP7448_0200 RsmE 16S ribossomal RNA metiltransferase ✓
MHP7448_0201 AlaS alanil-tRNA sintetase ✓
MHP7448_0584 InfB fator de iniciação d tradução IF-2 ✓ ✓
MHP7448_0618 RplL 50S proteína ribossomal L7/L12 ✓

3. Metabolismo*

3.1 Metabolismo de carboidratos

MHP7448_0549 MtlD manitol-1-fosfato 5-desidrogenase ✓
MHP7448_0557 d-ribulose-5-fosfato3 epimerase ✓

3.2 Metabolismo energético

MHP7448_0048 AtpE ATP sintase subunidade C ✓

3.3 Metabolismo de lipídeos

MHP7448_0097 Lgt pró-lipoproteína diacilglicerol transferase ✓

3.4 Metabolismo de nucleotídeos

MHP7448_0630 5'-nucleotidase precursor ✓

3.5 Metabolismo de peptídeos

MHP7448_0332 subtilisina serina protease ✓
MHP7448_0635 Gcp putativa metaloproteína/AP endonuclease ✓

4. Processamento de informações ambientais*

4.1 Transporte de membrana

MHP7448_0234 RbsB proteína periplasmica que liga a açúcar ✓
MHP7448_0241 SecD bifuncional translocase SecD/SecF ✓
MHP7448_0268 MgtA transportador de cation tipo P ✓ ✓
MHP7448_0361 transportador ABC ✓
MHP7448_0375 PTS sistema enzima IIB componente ✓
MHP7448_0503 OppC oligopeptídeo transportador ABC ✓
MHP7448_0542 PotA espermidina/putrescina transportador ABC ✓
MHP7448_0574 sistema PTS - N-acetilglucosamina-especifica ✓
MHP7448_0592 Proteína que liga ATP ✓

MHP7448_0657 Transportador ABC - P115 ✓

4.2 Componentes de superfície e lipoproteínas

MHP7448_0107 proteína P102 ✓

MHP7448_0663 proteína de adesão P146 ✓

Organização dos processos biológicos de acordo com o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>

^{a,b} O código do gene e o nome da proteína corresponde ao da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448; número de acesso no NCBI: NC_007332.

^c *HTH Jemboss - EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite* (RICE *et al.*, 2000). Disponível em: <http://emboss.sourceforge.net/index.html>

^{d,e,f} HTH, Rrf2 e Sigma – *MEME: Motivos importados do Pfam* (FINN *et al.*, 2010) e utilizados no *MEME Suite* (TIMOTHY & ELKAN, 2004). Disponível em: http://meme.nbcr.net/meme4_3_0/intro.html

5. Discussão

A finalização do sequenciamento do genoma de várias espécies de micoplasmas estimulou o interesse pela compreensão dos mecanismos que regulam e controlam a expressão gênica nestes microrganismos. No âmbito desta regulação, as proteínas que ligam ao DNA desempenham um papel chave, uma vez que, na sua grande maioria, podem atuar como fatores ativando ou inibindo a transcrição. No entanto, ainda persiste uma grande dificuldade no entendimento global da transcrição em *Mycoplasma* sp., não existindo relatos até o momento relacionados à identificação de proteínas que ligam ao DNA nestas espécies. Além disto, o entendimento sobre a localização e composição das regiões onde estas proteínas se ligam como, por exemplo, as regiões promotoras é bastante precário, pois a predição *in silico* é dificultada pelas características peculiares do genoma deste microrganismo (A+T rico) e a predição *in vivo* apresenta problemas devido a ausência de metodologias, como transformação, vetores de clonagem e expressão, que possibilitem tal estudo.

A natureza fastidiosa de *M. hyopneumoniae* foi outra dificuldade encontrada na execução deste trabalho. Apesar de já estar implementado o cultivo deste microrganismo no CBIOT/UFRGS (comunicação pessoal, Bianca Bittencourt) os cultivos em grande quantidade ainda não haviam sido padronizados. Portanto, como neste trabalho necessitamos de cultivos que variaram entre 1 e 3 litros, certas características da natureza fastidiosa do *M. hyopneumoniae* que anteriormente não eram significativas foram exacerbadas, como por exemplo variações no tempo de crescimento, aeração, agitação, etc. Além disto, os cultivos em grande escala necessitam de uma maior manipulação, em parte pelos inúmeros pré-inóculos requeridos, o que facilita a contaminação, uma vez que estamos trabalhando com um meio altamente rico em nutrientes.

Após a padronização da realização dos cultivos de *M. hyopneumoniae*, foi estabelecida a metodologia da lise celular. Quando o objetivo é purificar proteínas, devemos levar em consideração que muitas destas proteínas podem estar em complexos, formando dímeros, trímeros, etc., ou até mesmo ligadas a outras proteínas. Para evitar o rompimento destes complexos e ligações, uma lise branda foi realizada e teve sua eficiência comprovada com a utilização do *kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability* (Invitrogen), sendo possível observar no mesmo campo de focalização das

microscopias da Figura 6 a ocorrência de um aumento significativo de células emitindo a fluorescência vermelha (com danos na membrana) em relação a células emitindo a fluorescência verde (íntegras).

Análise em diferentes organismos demonstra que o percentual de proteínas que ligam ao DNA em procariotos é de aproximadamente 2-3% (LUSCOMBE *et al.* 2000). Portanto, a utilização de PEI que precipita ácidos nucleicos e as proteínas a eles ligadas, deve acarretar uma queda na quantidade de proteínas das amostras após sua utilização. Como esperado, nos nossos experimentos ocorreu a recuperação protéica após a precipitação com PEI de aproximadamente 500 µg de proteínas a partir de 20 mg de proteínas do extrato bruto. O mesmo ocorreu na purificação das proteínas utilizando a cromatografia de afinidade DNA-celulose, que também mostrou uma queda na quantidade protéica (de aproximadamente 500 µg para 100 µg). Esta diminuição na quantidade protéica tornou-se um problema para o objetivo inicial do trabalho, que era a purificação da RNA polimerase de *M. hyopneumoniae* 7448 (ver Anexo 1), porém tornou possível a realização do estudo das proteínas que ligam ao DNA, uma vez que a partir da metodologia utilizada foi possível recuperar uma amostra enriquecida com proteínas que se ligaram *in vitro* ao DNA (cromatografia DNA-celulose).

A análise por espectrometria de massas possibilitou a identificação de um total de 32 proteínas que possivelmente apresenta a capacidade de ligação ao DNA. Através desta análise proteômica foi possível identificar experimentalmente proteínas que sabidamente requerem a ligação ao DNA para desempenharem seu papel biológico, como proteínas envolvidas na transcrição: MHP7448_0010 (*HrcA* – repressor transcricional induzido por temperatura) que está envolvida no mecanismo regulatório HrcA-CIRCE controlando a expressão de genes em resposta a variações de temperatura (CHANG *et al.*, 2008); MHP7448_0168 (*RpoA* – RNA polimerase subunidade α), uma subunidade da RNA polimerase (RNAP), que é composta de duas regiões principais, sendo uma N-terminal responsável por interações proteína-proteína com as outras subunidades e a região C-terminal que contém elementos que permitem uma ligação ao DNA e a outras proteínas ativadoras da transcrição (ISHIHAMA, 1992; EBRIGHT e BUSBY, 1995); MHP7448_0279 (regulador transcricional) que está predito como um dos fatores de transcrição pelo DBD (*Transcription Factor Prediction Database*); MHP7448_0637 (NusG – proteína de anti-terminação transcricional) é um fator de terminação, que faz parte

do complexo de transcrição e interage com o fator Rho e a RNAP (LI *et al.*, 1993).

Além de proteínas envolvidas na transcrição, também foram identificadas outras proteínas que potencialmente possuem ligação ao DNA, entre elas: a DnaA proteína de início de replicação cromossomal (MHP7448_0001) – que desempenha um papel central na iniciação e regulação da replicação do cromossoma (FUJIKAWA *et al.*, 2003); a proteína nucleóide bacteriana, a *HimA* (MHP7448_0071), que é semelhante às histonas, porém com função ainda não determinada experimentalmente. Também foram caracterizadas proteínas envolvidas em eventos de reparo do DNA como as nucleases Nfo (MHP7448_0062) que é uma endonuclease do tipo V e a UvrC (MHP7448_0066) uma exonuclease ABC.

A utilização desta metodologia permitiu, também, a identificação de sete proteínas hipotéticas até então nunca encontradas experimentalmente (Tabela 3). Como já discutido anteriormente, presume-se que algumas das proteínas hipotéticas podem representar proteínas com potencial de ligação ao DNA ainda não caracterizadas. Para tentar auxiliar no entendimento inicial sobre a função de algumas destas proteínas, foram realizadas análises por homologia de sequência e de estrutura secundária. Os resultados encontrados revelam algumas particularidades interessantes nestas proteínas como: a proteína hipotética MHP7448_0327 possui um domínio conservado de N-6 DNA metilase sendo a predição da estrutura secundária semelhante a estrutura de DNA metiltransferases; a proteína hipotética MHP7448_0675 possui um domínio conservado de enzimas restrição do tipo III. Portanto, estas proteínas aparentam apresentar domínios indicando que possivelmente façam parte do repertório de proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae* 7448, porém, mais estudos são necessários para chegarmos a uma conclusão exata relativo a função destas proteínas hipotéticas.

Análise da localização subcelular das proteínas experimentalmente identificadas demonstra que a grande maioria, aproximadamente 90%, encontra-se localizada no citoplasma. Esta é uma característica esperada, uma vez que as proteínas que ligam ao DNA precisam estar em constante contato com o mesmo. Além disto, a carga global destas proteínas se apresenta, na sua maioria, positiva (Anexo 2), o que também é esperado, uma vez que na interface de ligação proteína-DNA as cargas positivas das proteínas auxiliam na ligação através da interação eletrostática com as cargas negativas dos grupos fosfatos das bases do DNA (BRENDDEL & KARLIN, 1989).

Também encontramos produtos gênicos não esperados para amostras enriquecidas com proteínas que ligam ao DNA, como as subunidades da enzima piruvato desidrogenases (*PdhB* – MHP7448_0116 e *PdhA* – MHP7448_0115) que apresenta sua atividade no metabolismo de carboidratos não possuindo motivos de ligação ao DNA. Esta proteína foi isolada, provavelmente, devido a sua abundância no citoplasma celular. Uma situação semelhante ocorre com uma quantidade significativa de proteínas ribossômicas que foram identificadas em nossas amostras. Porém, neste caso é bom salientar que algumas proteínas que ligam a ácidos nucleicos e que fazem parte da maquinaria de expressão gênica tem a habilidade intrínseca de ligar-se tanto a DNA quanto a RNA (BURCKIN *et al.*, 2005).

Utilizando a sequência genômica do *M. hyopneumoniae* 7448 foi realizada uma análise utilizando diversos algoritmos e programas de bioinformática desenvolvidos para identificar *in silico* proteínas que ligam ao DNA. A escassez de dados disponíveis para este microrganismo, associado ao pioneirismo deste estudo, nos levou a tentar selecionar diversos programas diferentes que possibilitasse a realização de uma análise *in silico* considerando as características mais comuns e melhores descritas para outras espécies. Portanto esse estudo prospectivo foi baseado no motivo de ligação hélice-volta-hélice, uma vez que este motivo está representado em aproximadamente 84% dos fatores de transcrição de um componente (ULRICH *et al.*, 2005). O pacote de programas *MEME* foi de grande utilidade, pois possibilitou a análise de outros motivos de ligação ao DNA que não possuíam programas disponíveis, além de propiciar a alternativa de selecionar a entrada de dados e, por conseguinte, controlar a calibração da matriz através da seleção de sequências de motivos alinhados e das espécies as quais eles pertencem.

Através da análise *in silico*, identificamos um total de 59 proteínas que podem ligar-se ao DNA (Tabela 8). Nesta análise, foram encontradas diversas proteínas que participam de processos que necessitam da ligação ao DNA, como transcrição, replicação e reparo. A Tabela 6 apresenta uma análise comparativa utilizando as informações geradas pela aplicação dos diferentes programas de bioinformática. Podemos notar que muitas proteínas foram identificadas por mais de um programa e que algumas possuem mais de um motivo predito de ligação ao DNA. Esta sobreposição de dados é importante, pois uma vez que a mesma proteína é encontrada em várias análises o grau de confiabilidade da predição aumenta e, como será discutido adiante, pode auxiliar numa identificação mais

segura de proteínas-alvo para futuros estudos.

Nesta análise foram, também, encontradas 16 proteínas hipotéticas (Tabela 8). Estas proteínas representam alvos privilegiados para estudos, pois o genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 exibe 155 proteínas classificadas como hipotéticas e 105 proteínas como hipotéticas conservadas. Como para estas 260 proteínas ainda não foi definida uma função biológica (VASCONCELLOS *et al.*, 2005) algumas poderiam potencialmente ligar-se ao DNA e desempenhar funções de regulação.

Várias proteínas classificadas como transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) foram encontrados em nossas análises, principalmente quando utilizamos procuras pelo motivo hélice-volta-hélice. Estes resultados apresentam uma justificativa, pois a arquitetura básica de uma proteína do tipo ABC consiste de dois domínios de ligação a nucleotídeos (*NBDs* – *nucleotide-binding domain*) e dois domínios transmembranas TM. O *NBD* se apresenta bastante conservado, sendo composto de inúmeros subdomínios bem caracterizados: domínio Walker A – uma típica “volta” (*loop*) de ligação a fosfato; domínio Walker B – que possui um sítio de ligação a magnésio; uma região de assinatura e outras sequências (compostas principalmente por *loops*) estruturais (HIGGINS, 1992; AMBUDKAR *et al.*, 2006). A região identificada como motivo de ligação ao DNA nos transportadores ABC corresponde exatamente à região de 20 aminoácidos do motivo *NBD*, encontrado quando utilizamos uma matriz do *MEME* com alinhamentos de *NBDs* de transportadores ABC oriundos do *Pfam* (Anexo 3). Portanto, as proteínas caracterizadas como transportadores ABC se tornam um contaminante comum em análise *in silico* de proteínas que ligam ao DNA, uma vez que estes programas acabam identificando a região de ligação a ATP e classificando erroneamente uma proteína de transporte de membrana como sendo uma potencial proteína de ligação ao DNA.

A proteína hipotética MHP7448_0639 foi particularmente interessante. Quando analisada com programas desenvolvidos para analisar a estrutura das proteínas (basicamente a estrutura secundária e o reconhecimento de enovelamentos, ambos através da comparação com outras estruturas experimentalmente caracterizadas) mostrou-se estruturalmente bastante similar ao fator sigma 28 (σ^{28}) de *Bacillus subtilis*, apesar de não apresentar grande homologia de sequência primária. A σ^{28} foi primeiramente isolada de *B. subtilis* (GILMAN, *et al.*, 1984) sendo posteriormente encontrada em outras espécies, como *Yersinia enterocolitica* (IRIARTE *et al.*, 1995), *E. coli* (HELMANN &

CHAMBERLIN, 1987), *Legionella pneumophila* (HEUNER *et al.*, 2002), entre outras. Este fator σ é denominado de “fator de motilidade” por estar envolvido principalmente na regulação de genes relacionados à biossíntese flagelar. Apesar de *M. hyopneumoniae* possuir apenas um fator σ identificado (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005) e não possuir flagelo, esta proteína é um excelente alvo para futuros estudos que possam determinar sua expressão e função biológica, pois poderia apresentar uma função reguladora igual ou diferente da tradicionalmente desempenhada pela σ^{28} , ou ainda participar de outros mecanismos regulatórios de expressão gênica até então não identificados em *M. hyopneumoniae*.

Os resultados obtidos da análise *in silico* demonstrou que várias proteínas foram identificadas por mais de um dos programas utilizados ou como possuindo mais de um motivo de ligação ao DNA (Tabela 8). Este resultado se justifica, pois a grande maioria dos motivos de ligação ao DNA (incluindo aqueles utilizados neste trabalho) são compostos basicamente por motivos hélice-volta-hélice. Além disto, algumas das proteínas identificadas por espectrometria de massas também foram identificadas por ferramentas de bioinformática (Tabela 9) como as proteínas hipotéticas MHP7448_444 e MHP7448_675, o repressor transcricional induzido por calor HrcA e o repressor regulador transcricional MHP7448_0279. Além delas, também foi identificada uma subunidade da RNAP, a subunidade α , e a proteína de iniciação da replicação cromossomal DnaA. Como é possível notar, todas estas proteínas (exceto as proteínas hipotéticas) possuem sabidamente a capacidade e a necessidade de ligar-se ao DNA para realizar seu papel biológico, permitindo-nos inferir que a metodologia empregada nas análises foi válida.

Informações depositadas no DBD (*Transcription factor prediction database*) (WILSON *et al.*, 2008) revelam que *M. hyopneumoniae* 7448 possui três fatores de transcrição preditos, sendo que eles foram identificados em nossas análises: a proteína hipotética MHP7448_0551 foi predita apenas *in silico*, enquanto as proteínas HrcA (MHP7448_0010) e repressor transcricional (MHP7448_0279) foram identificadas tanto experimentalmente como *in silico*.

A comparação dos resultados da análise experimental e *in silico*, associado à sobreposição na identificação das proteínas, permite selecionar algumas proteínas-alvo com grande potencial para futuros estudos que possam auxiliar no entendimento da regulação e controle da expressão gênica em *M. hyopneumoniae*. Na Tabela 9 estão listadas

as proteínas identificada pelas duas metodologias utilizadas neste trabalho. Juntamente com quatro proteínas que possuem função conhecida e apresentam a propriedade de ligar-se ao DNA estão listadas duas proteínas com função ainda não definida. As proteínas hipotéticas MHP7448_444 e MHP7448_675 foram identificadas em ambas as análises (*in silico* e proteômica) pertencendo a este seletivo grupo de proteínas (Tabela 9). A proteína hipotética MHP7448_0675 se apresenta interessante para estudos futuros pois, além de ter sido identificada pelas duas metodologias, também possui um domínio conservado de enzima de restrição do tipo V (Tabela 3). Em adição, a proteína hipotética MHP7448_0639 que revelou ter grande similaridade de estrutura com fatores σ também é um alvo muito interessante, uma vez que a descoberta de uma nova σ teria grande impacto no estudo da regulação gênica em *M. hyopneumoniae*.

Tabela 9 – Proteínas preditas como de ligação ao DNA que foram identificadas experimentalmente e por bioinformática.

Gene ^a	Proteína ^b	HTH ^d Jembooss	HTH ^e MEME	Rrf2 ^f MEME	Sigma ^g MEME
MHP7448_0001	DnaA proteína de iniciação da replicação cromossomal	✓			
MHP7448_0010	HrcA repressor transcricional induzido pelo calor		✓		
MHP7448_0168	RpoA RNA polimerase subunidade α		✓		
MHP7448_0279	regulador transcricional	✓			
MHP7448_0444	MHP7448_0444 proteína hipotética	✓	✓		
MHP7448_0675	MHP7448_0675 proteína hipotética		✓	✓	

^{a,b} O código do gene e o nome da proteína corresponde ao da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448; número de acesso no NCBI: NC_007332.

^d HTH Jembooss – EMBOSS: *The European Molecular Biology Open Software Suite* (RICE *et al.*, 2000). Disponível em: [HTTP://emboss.sourceforge.net/index.html](http://emboss.sourceforge.net/index.html)

^{e,f,g} HTH, Rrf2 e Sigma – MEME: Motivos importados do Pfam (FINN *et al.*, 2010) e utilizados no MEME HTTP (TIMOTHY & ELKAN, 2004). Disponível em: [HTTP://meme.nbcr.net/meme4_3_0/intro.html](http://meme.nbcr.net/meme4_3_0/intro.html)

6. Conclusões

Ainda existe uma grande escassez de dados disponíveis na literatura que auxiliem no entendimento da regulação gênica em micoplasmas. Por esse motivo, estudos básicos de regulação, como a predição de regiões promotoras e a determinação de proteínas que ligam ao DNA são de grande importância e necessidade para melhorar este entendimento. Este é o primeiro trabalho descrito na literatura que faz uma análise inicial das proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae* 7448, através de uma correlação entre os dados obtidos experimentalmente e *in silico*.

Através deste trabalho, foi possível identificar uma seis proteínas, oriundas da sobreposição dos dados experimentais e *in silico*, que são excelentes alvos para futuros

estudos de regulação e controle da transcrição gênica em micoplasmas. Além disto, foi possível identificar experimentalmente duas das três proteínas classificadas *in silico* como fatores de transcrição pelo DBD (WILSON *et al.*, 2008): HrcA (MHP7448_0010) e regulador transcricional (MHP7448_0279).

7. Perspectivas

- Expressão e purificação das proteínas identificadas experimentalmente e *in silico*, para estudos de ligação ao DNA.
- Determinação da região do DNA na qual ocorre a ligação com proteínas.
- *Pull-Down* utilizando como isca estas proteínas.
- Estudos para determinar a expressão e função da proteína hipotética MHP7448_0639, que demonstra homologia com fatores σ .
- Análises *in silico* com uma gama maior de domínios de ligação ao DNA.

6. Bibliografia

ANDRADA, M. Patogénesis, signos clínicos y lesiones de la neumonía enzoótica porcina. *Porci aula veterinária*, n. 74, p. 47-68, 2003a.

AHMAD, S. & SARAI, A. Moment-based prediction of DNA-binding proteins. *J.Mol.Biol.*, 341(1):65-71, 2004.

AMBUDKAR, S. V.; KIM, I. W.; XIA, D. & SAUNA, Z. E. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett.*, 580(4):1049-55, 2006.

ARAVIND, L.; ANANTHARAMAN, V.; BALAJI, S.; BABU, M. M. & IYER, L. M. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol.Rev.*, 29(2):231-62, 2005.

BAILEY, T. L. & ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc.Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.*, 2:28-36, 1994.

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.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-54, 1976.

BRENDEL, V. & KARLIN, S. Association of charge clusters with functional domains of cellular transcription factors. *Proc.Natl.Acad.Sci, USA*, 86(15):5698-702, 1989.

BRENNAN, T. J.; CHAKRABORTY, T. & OLSON, E. N. Mutagenesis of the myogenin basic region identifies an ancient protein motif critical for activation of myogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA*, 88(13):5675-9, 1991.

BRENNAN, R. G. The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell.*, 74(5):773-6, 1993.

BROWN, T. A. *Genomes Third Edition*. USA, Garland Science, 2006.

BURCKIN, T.; NAGEL, R.; MANDEL-GUTFREUND, Y.; SHIUE, L.; CLARK, T. A.; CHONG, J. L.; CHANG, T. H.; SQUAZZO, S.; HARTZOG, G. & ARES, M. Exploring functional relationships between components of the gene expression machinery. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 12(2):175-82, 2005.

CAI, M.; ZHENG, R.; CAFFREY, M.; CRAIGIE, R.; CLORE, G. M. & GRONENBORN, A. M. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat.Struct.Biol.*, 4(7):567-77. Erratum in: *Nat.Struct.Biol.*, 4(10):839-40, 1997.

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.

CHAMBAUD, I.; HEILIG, R.; FERRIS, S.; BARBE, V.; SAMSON, D.; GALISSON, F.; MOSZER, I.; DYBVIK, K.; WRÓBLEWSKI, H.; VIARI, A.; ROCHA, EP. & BLANCHARD, A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res.*, 29(10):2145-532001, 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.Comm.*, 367(1):213-8, 2008.

CHEN, Y.L. et al. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect.Immun.*, v.71, p.1155-1160, 2003.

COMBET, C.; BLANCHET, C.; GEOURJON C. & DELÉAGE G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem.Sci.*, 25(3):147-50, 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.

DYBVIK K.; ZUHUA C.; LAO P.; JORDAN D.S.; FRENCH C.T.; TU A.H. & LORAINE A.E. Genome of *Mycoplasma arthritidis*. *Infect.Immun.*, 76(9):4000-8, 2008.

DAME. R.T. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol. Microbiol.*, 56(4):858-70, 2005.

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.

DODD, I. B. & EGAN, J. B. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res.*, 18(17):5019-2, 1990.

EBRIGHT, R. H & BUSBY, S. The Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit: structure and function. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 5(2):197-203, 1995.

FERRER-COSTA, C., SHANAHAN, H. P.; JONES, S. & THORNTON, J. M. HTHquery: a method for detecting DNA-binding proteins with a helix-turn-helix structural motif. *Bioinf.*, 21(18):3679-80, 2005.

FINN, R. D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL, P. C.; SAMMUT, S. J.; HOTZ, H. R.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; EDDY, S. R.; SONNHAMMER, E. L. & BATEMAN, A. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, 36(Database issue):D281-8, 2008.

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

FRIEDBERG, I. Automated protein function prediction--the genomic challenge. *Brief.Bioinform.*, 7(3):225-42, 2006.

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.

FRISHMAN, D. & MEWES, H.W. Protein structural classes in five complete genomes. *Nat.Struct.Biol.*, (8):626-8, 1997.

FUJIKAWA, N.; KURUMIZAKA, H.; NUREKI, O.; TERADA, T.; SHIROUZU, M.; KATAYAMA, T. & YOKOYAMA, S. Structural basis of replication origin recognition by the DnaA protein. *Nucleic Acids Res.*, 31(8):2077-86, 2003.

GILMAN, M. Z.; GLENN, J. S.; SINGER, V. L. & CHAMBERLIN, M. J. Isolation of sigma-28-specific promoters from *Bacillus subtilis* DNA. *Gene.*, 32(1-2):11-20, 1984.

GLASS, J.I.; LEFKOWITZ, E.J.; GLASS, J.S.; HEINER, C.R.; CHEN, E.Y. & CASSELL, G.H. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature*, 407(6805):757-62, 2000.

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

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

HARRISON, S. C. & AGGARWAL A. K. DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu.Rev.Biochem.*, 59:933-69, 1990.

HELMANN, J. D. & CHAMBERLIN, M. J. DNA sequence analysis suggests that

- expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative sigma factor. Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 84(18):6422-4, 1987.
- HEUNER, K.; DIETRICH, C.; SKRIWAN, C.; STEINERT, M. & HACKER, J. Influence of the alternative sigma (28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. Infect.Immun., 70(3):1604-8, 2002.
- HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu.Rev.Cell.Biol., 8:67-113, 1992.
- 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.
- HORTON, P.; PARK, K. J.; OBAYASHI, T.; FUJITA, N.; HARADA, H.; ADAMS-COLLIER, C. J. & NAKAI, K. WoLF PSORT: protein localization predictor. Nucleic Acids Res., 35(Web Server issue):W585-7, 2007.
- IRIARTE, M.; STAINIER, I.; MIKULSKIS, A. V. & CORNELIS, G. R. The fliA gene encoding sigma 28 in *Yersinia enterocolitica*. J.Bacteriol., 177(9):2299-304, 1995.
- ISHIHAMA, A. Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. Mol.Microbiol., 6(22):3283-8, 1992.
- 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*. Genome Res., 14(8):1447-61, 2004.
- KANNAN, T. R. & BASEMAN, J. B. Expression of UGA-containing *Mycoplasma* genes in *Bacillus subtilis*. J.Bacteriol., 182(9): 2664-2667, 2000.
- KAVANAGH, N.T. The effect of pulse medication with combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia.International. Vet.Journal, v.47, p.58-61, 1994.
- KELLEY, L. A. & STERNBERG, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. Nat.Protoc., 4(3):363-71, 2009.
- KIELKOPF, C. L.; WHITE, S.; SZEWCZYK, J. W.; TURNER, J. M.; BAIRD, E. E.; DERVAN, P. B. & REES, D. C. A structural basis for recognition of A.T and T.A base pairs in the minor groove of B-DNA. Science, 282(5386):111-5, 1998.
- KOHN, W.D.; MANT, C. T. & HODGES, R. S. Alpha-helical protein assembly motifs. J Biol.Chem., 272(5):2583-6, 1997.

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

LI, J.; MASON, S. W. & GREENBLATT, J. Elongation factor NusG interacts with termination factor rho to regulate termination and antitermination of transcription. *Genes Dev.*, 7(1):161-72, 1993.

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.

LU, Z.; SZAFRON, D.; GREINER, R.; LU, P.; WISHART, D. S.; POULIN, B.; ANVIK, J.; MACDONELL, C. & EISNER, R. Predicting subcellular localization of proteins using machine-learned classifiers. *Bioinf.*, 20(4):547-56, 2004.

LUSCOMBE, N.M.; AUSTIN, S.E.; BERMAN, H.M. & THORNTON, J.M. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* 1(1):reviews001, 2000.

LUSCOMBE, N. M. & THORNTON, J. M. Protein-DNA interactions: amino acid conservation and the effects of mutations on binding specificity. *J.Mol.Biol.*, 320(5):991-1009, 2002.

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

MCGEEHAN, J. E.; STREETER, S. D.; THRESH, S. J.; BALL, N.; RAVELLI, R. B. & KNEALE, G. G. Structural analysis of the genetic switch that regulates the expression of restriction-modification genes. *Nucleic Acids Res.*, 36(14):4778-87, 2008.

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.

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

MYERS, L.C. & KORNBERG, R.D. Mediator of transcriptional regulation. *Annu.Rev.Biochem.*, 69:729-49, 2000.

NIMROD, G.; SZILÁGYI, A.; LESLIE, C. & BEN-TAL, N. Identification of DNA-binding proteins using structural, electrostatic and evolutionary features. *J.Mol.Biol.*, 387(4):1040-53, 2009.

OTTING, G.; QIAN, Y. Q.; BILLETTER, M.; MÜLLER, M.; AFFOLTER, M.; GEHRING, W. J. & WÜTHRICH, K. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J.*, 9(10):3085-92, 1990.

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):2307-16, 2003.

PÉREZ-RUEDA, E. & COLLADO-VIDES, J. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, 28(8):1838-47, 2000.

PÉREZ-RUEDA, E.; COLLADO-VIDES, J. & SEGOVIA, L. Phylogenetic distribution of DNA-binding transcription factors in bacteria and archaea. *Comput.Biol.Chem.*, 28(5-6):341-50, 2004.

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

QUINN, P.J. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. São Paulo, ART.MED., 2005. p.193-199.

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

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

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

REEVE, J.N.; SANDMAN, K. & DANIELS, C.J. Archaeal histones, nucleosomes, and transcription initiation. *Cell*, 89(7):999-1002, 1997.

RICE, P.; LONGDEN, I. & BLEASBY, A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.*, 16(6):276-7, 2000.

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

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.

SEEMAN, N. C.; ROSENBERG, J. M. & RICH, A. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 73(3):804-8, 1976.

SHANAHAN, H. P.; GARCIA, M. A.; JONES, S. & THORNTON, J. M. Identifying DNA-binding proteins using structural motifs and the electrostatic potential. *Nucleic Acids Res.*, 32(16):4732-41, 2004.

SIRAND-PUGNET, P.; LARTIGUE, C.; MARENDA, M.; JACOB, D.; BARRÉ, 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. *PLoS Genet.*, 3(5):e75, 2007.

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

SÖDING, J.; BIEGERT, A. & LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue):W244-8, 2005.

STEITZ, T. A. Structural studies of protein-nucleic acid interaction: the sources of sequence-specific binding. *Q.Rev.Biophys.*, 23(3):205-80, 1990.

STORMO, G. D. & FIELDS, D. S. Specificity, free energy and information content in protein-DNA interactions. *Trends Biochem.Sci.*, 23(3):109-13, 1998.

SWINDELLS, M. B. Identification of a common fold in the replication terminator protein suggests a possible mode for DNA binding. *Trends Biochem.Sci.*, 20(8):300-2, 1995.

SZILÁGYI, A. & SKOLNICK, J. Efficient prediction of nucleic acid binding function from low-resolution protein structures. *J.Mol.Biol.*, 358(3):922-33, 2006.

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

THANBICHLER, M.; WANG, S.C. & SHAPIRO, L. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *J.Cell.Biochem.*, 96(3):506-21, 2005.

TSUCHIYA, Y.; KINOSHITA, K. & NAKAMURA, H. Structure-based prediction of DNA-binding sites on proteins using the empirical preference of electrostatic potential and the shape of molecular surfaces. *Proteins*, 55(4):885-94, 2004.

ULRICH, L. E.; KOONIN, E. V. & ZHULIN, I. B. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.*, 13(2):52-6, 2005.

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.

VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; DE, K. A. & HAESEBROUCK, F. *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates 76. Antimicrob.Agents.Chemother., 48: 4470-4472, 2004.

WALKER, R.L. Mollicutes. In: HIRSH, D.C. & CHUNG, Y. editors. Microbiologia veterinária. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

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

WATSON, J. D. & CRICK, F. H. The structure of DNA. Cold Spring Harbor. Symp.Quant.Biol.,18:123-31, 1953.

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

WESTBERG J.; PERSSON A.; HOLMBERG A.; GOESMANN A.; LUNDEBERG J.; JOHANSSON K. E.; PETTERSSON B. & UHLÉN M. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Genome Res., 14(2):221-7, 2004.

WILSON, D.; CHAROENSAWAN, V.; KUMMERFELD, S. K. & TEICHMANN, S. A. DBD—taxonomically broad transcription factor predictions: new content and functionality. Nucleic Acids Res., 36(Database issue):D88-92, 2008.

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.

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

ANEXO I

Purificação da RNA polimerase (RNAP) e expressão de regiões do fator σ de *M. hyopneumoniae*.

A RNAP holoenzima

A RNAP é a enzima chave da transcrição e expressão gênica em todos os organismos. Em bactérias, o núcleo catalítico é formado geralmente por cinco subunidades: α I, α II, β , β' e ω . Este núcleo da RNAP associado à subunidade σ (fator sigma) é chamado de holoenzima, sendo então capaz de reconhecer especificamente uma região promotora e iniciar a transcrição (BROWNING & BUSBY, 2004). O núcleo da holoenzima apresenta um tamanho de ~ 400 kDa (Figura 15), sendo que a estrutura e função de cada uma das subunidades é bastante conservada (SWEETSER *et al.*, 1987; DARST, 2001).

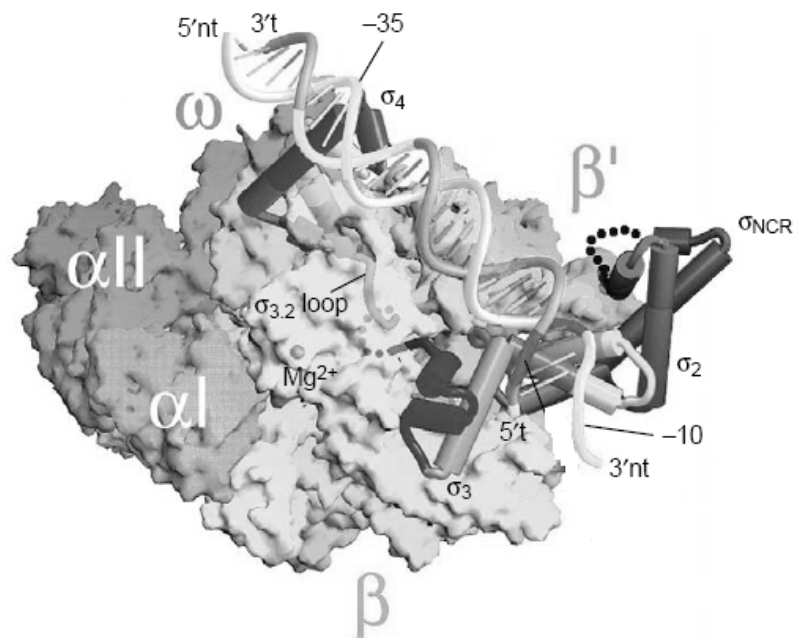


Figura 15 – Estrutura do complexo da holoenzima RNAP e o DNA.

O núcleo da holoenzima é mostrado na forma de uma superfície molecular, com as subunidades α , α I e ω em cinza, subunidade β em ciano e β' em rosa. A subunidade σ é representada com as α -hélices na forma de cilindros, sendo a região σ_2 colorida de vermelho, σ_3 de ciano, alça $\sigma_{3,2}$ de verde, σ_4 de vermelho escuro e σ_{NCR} (região não conservada) de cinza. O DNA está representado em verde, exceto pela região -10 (vermelho) e -35 (amarelo). Adaptado de MURAKAMI & DARST *et al.*, 2003.

O processo de transcrição consiste basicamente em três estágios: iniciação, alongamento e terminação. Durante a iniciação, a holoenzima liga-se especificamente a dois hexâmeros conservados presentes na região promotora. A interação com estes hexâmeros, denominados de região -35 e a região -10, relativas ao sítio de início (+1), resulta na formação de uma conformação fechada com o promotor, sendo que a fusão com a região -10 provoca a desnaturação desta, com conseqüente formação de um complexo aberto e início da transcrição. A iniciação ocorre até ~9-12 nucleotídeos, sendo que após ocorrem várias mudanças estruturais, como por exemplo a perda de contato com a região promotora, passando para as fases seguintes, na qual o fator σ já não está mais presente (RECORD *et al.*, 1996; CRAIG *et al.*, 1998).

O fator σ

O primeiro fator σ identificado como sendo uma subunidade da RNAP foi em *E. coli* (BURGESS *et al.*, 1969). Desde então, vários estudos foram realizados envolvendo este fator, que apresenta basicamente três funções: reconhecimento específico de promotores, posicionamento da RNAP e auxílio no relaxamento das fitas no início da transcrição (WOSTEN, 1998).

Muitos fatores σ já foram identificados em bactérias, porém os fatores do grupo 1 (entre eles σ^{70}) representam a classe mais utilizada na atividade transcricional da célula. Bactérias utilizam outros fatores σ , que por serem menos comuns são denominados alternativos, sendo que estes são específicos para o reconhecimento de um grupo bastante restrito de promotores, geralmente de genes associados a funções biológicas semelhantes, como por exemplo genes necessários para adaptação a mudanças ambientais, mudanças de temperaturas, utilização de substratos específicos, etc. O número de fatores sigma varia entre as espécies, desde apenas um para *M. genitalia* (FRASER *et al.*, 1995), sete para *E. coli* (ISHIHAMA, 2000) até mais de sessenta em *Streptomyces coelicolor* (BENTLEY *et al.*, 2002).

Estrutura de domínios do fator σ

Os fatores sigma de diferentes organismos pertencentes ao grupo 1 apresentam similaridade tanto na seqüência primária como estrutural. Em *E. coli* o fator σ^{70} foi analisado e dividido em domínios funcionais. Comparação da seqüência de aminoácidos demonstra uma mesma distribuição dos domínios entre σ^{70} de diferentes organismos (Figura 16).

Domínio $\sigma_{1.1}$ – localizado na região N-terminal, contém aproximadamente 90 aminoácidos. É uma região com seqüência pouco conservada, porém com uma característica ácida. Duas funções têm sido descritas para este domínio: $\sigma_{1.1}$ auto inibe o reconhecimento de promotores pela σ livre (CAMARERO *et al.*, 2002) e acelera a formação do complexo aberto em alguns promotores (VUTHOORI *et al.*, 2001).

Domínio σ_2 – a região $\sigma_{2.4}$ tem sido descrita como a responsável pelo reconhecimento do elemento promotor -10 (na forma dupla-hélice) (GROSS *et al.* 1998), enquanto a região $\sigma_{2.3}$ é essencial para a fusão com o DNA simples-fita, estabilizando a bolha de início de transcrição (MARR & ROBERTS, 1997).

Domínio σ_3 – é um domínio compacto contendo três hélices, sendo que os aminoácidos presentes na hélice N-terminal deste domínio aparentemente estão envolvidos no reconhecimento do elemento -10 (BARNE *et al.*, 1997) e na estabilização do complexo aberto (VOSKUIL & CHAMBLISS, 2002).

Domínio σ_4 – este domínio tem um formato de “C”, sendo que a região côncava é revestida pelos resíduos hidrofóbicos da região $\sigma_{4.1}$. A região σ_4 têm sido descrita como responsável pela ligação ao elemento -35 da região promotora. A mudança no DNA (curvatura) induzida pela ligação desta região com o elemento -35 facilita a interação das outras subunidades da RNAP (principalmente a região C-terminal da α) com o DNA, além de facilitar a interação com fatores de ativação que se ligam ao DNA (ROSS *et al.*, 1993).

σ_{NCR} – região não conservada.

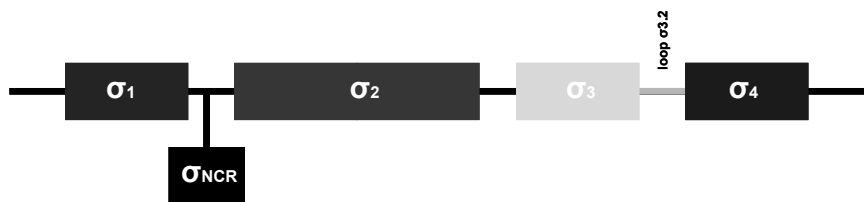


Figura 16 – Arquitetura geral dos fatores σ do grupo 1.

Ligação do fator σ com o DNA

O fator α livre (sem as demais subunidades da RNAP) não apresenta a capacidade de ligar-se especificamente ao DNA. Na holoenzima, a conformação faz com que os domínios 2 e 4 estejam dispostos numa distância específica para a ligação aos elementos -10 e -35 (CALLACI *et al.*, 1999). Além disto impedimentos alostéricos tem sido propostos, entre eles, uma aparente inibição pelo domínio 1.1, que poderia estar diretamente mascarando a região 4 (DOMBROSKI *et al.*, 1992, 1993), ou indiretamente ligando-se a região 2 (GOWRISHANKAR *et al.*, 2003) ou ainda através de mecanismos alostéricos inespecíficos (CAMARERO *et al.*, 2002). Recentemente SEVOSTYANOVA *et al.* (2007), realizaram a ligação específica de regiões de sigma livre à elementos promotores -10, sugerindo que a região mínima necessária para que ocorra a ligação seria composta pelas regiões σ_2 , uma parte da região $\alpha_{1.2}$ e uma região conectora não conservada entre eles.

Objetivos

Os objetivos iniciais do projeto de mestrado eram:

- realizar o isolamento e a purificação da RNAP de *M. hyopneumoniae*;
- realizar a expressão heteróloga de regiões da σ de *M. hyopneumoniae*.

Resultados

Purificação da RNAP de *M. hyopneumoniae*

A purificação a RNAP de *M. hyopneumoniae* tinha como principal objetivo facilitar futuros estudos *in vitro* sobre os mecanismos de transcrição deste microrganismo, principalmente através de estudos de ligação proteína-DNA para tentar determinar a região do DNA na qual a RNAP se ligaria, e por consequência poder inferir sobre regiões promotoras e demais regiões do DNA que participam do início da transcrição.

Apesar de não existirem relatos na literatura sobre a purificação desta holoenzima em espécies de *Mycoplasmas* ou espécies relacionadas, foram selecionadas algumas metodologias que se mostraram eficientes em outras espécies, principalmente em *E. coli*

(BURGESS & JENDRLSAK, 1975) e estabelecemos o plano de trabalho conforme a Figura 17. Estas metodologias estão descritas no capítulo Materiais e Métodos, pois foram também utilizadas no estudo das proteínas que ligam ao DNA de *M. hyopneumoniae*.

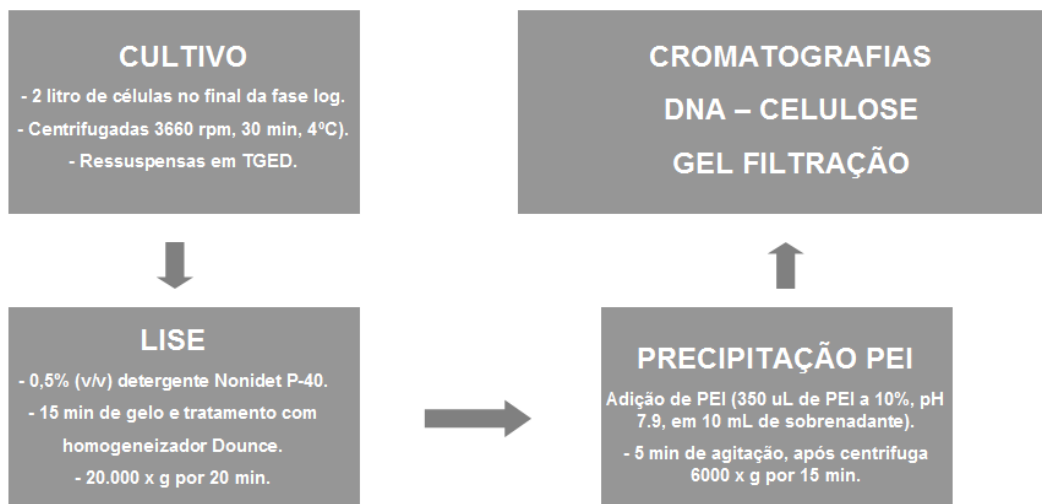


Figura 17 – Representação esquemática do processo de purificação da RNAP de *M. hyopneumoniae*.

Apesar de inicialmente os resultados terem sido promissores, ao longo do processo de purificação foi possível observar pouco rendimento na recuperação da RNAP. Como discutido anteriormente *M. hyopneumoniae* apresenta uma natureza fastidiosa necessitando de condições de cultivo especiais. A análise do rendimento da purificação da RNAP inviabilizou o processo pois seriam necessárias quantidades inviáveis de cultivos para podermos chegar ao final da purificação com quantidade de proteínas suficiente para a realização dos experimentos de interesse.

Expressão heteróloga de regiões da σ de *M. hyopneumoniae*

A expressão e purificação das regiões $\sigma_{2-3.1.2}$ e σ_4 de *M. hyopneumoniae*, para posterior estudos de ligação a possíveis regiões promotoras foi realizada considerando as definições de domínios funcionais apresentados nos trabalhos de SEVOSTYANOVA *et al.* (2007). Resumidamente, a metodologia utilizada envolveu a amplificação das regiões de interesse com *primers* específicos que continham os sítios de restrição NcoI e XhoI para clonagem direcionada em vetor de expressão. O DNA utilizado como molde foi o gene de σ de *M. hyopneumoniae* com mutações sítio-dirigidas inseridas (troca dos códons TGA por

TGG) (WEBER, 2008). O produto amplificado foi então purificado utilizando-se o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante (Figura 18). Posteriormente, o inserto foi clonado em vetor de expressão pET23a-d(+) (gerando os plasmídeos pET σ_2 - $\sigma_{1.2}$ e pET σ_4), sendo então estes plasmídeos transformados em *E. coli* XL-1 Blue. Os clones recombinantes selecionados foram confirmados por PCR e clivagem com as enzimas NcoI e XhoI e também através de sequenciamento, utilizando o *kit Dyanamic dye terminator cycle sequencing* (Amersham Biosciences), desenvolvido para o sequenciador automático MEGABACE, conforme o manual do fabricante.

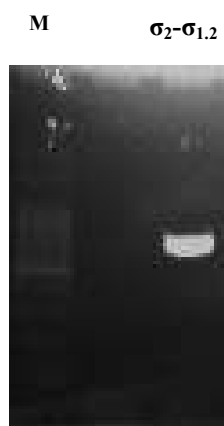


Figura 18 – Purificação do fragmento σ_2 - $\sigma_{1.2}$

Eletoforese em gel de agarose 0,8% / brometo de etídeo mostrando o produto da amplificação e purificação da região σ_2 - $\sigma_{1.2}$, obtido através da amplificação a partir do gene de σ de *M. hyopneumoniae* cepa 7448 com as mutações sítio-dirigidas. M – marcador de tamanho molecular; σ_2 - $\sigma_{1.2}$ – região 2 e 1.2 da σ .

A expressão das regiões de σ foi realizada inicialmente a partir da transformação dos plasmídeos pET σ_2 - $\sigma_{1.2}$ e pET σ_4 em *E. coli* BL21 STAR e *E. coli* BL21 RIL. De cada transformação foi selecionada uma colônia, que foram pré-inoculadas em 1 mL de meio líquido Luria-Bertani contendo 100 μ g/mL de ampicilina e 1% de glicose, sendo cultivada a 37°C, sob agitação de 150 rpm, durante 12 horas. Posteriormente, 400 μ l do pré-inóculo foram inoculados em 200 mL do mesmo meio contendo as mesmas concentrações de antibiótico e glicose, e incubado a 37°C, a 200 rpm. A indução da expressão gênica foi realizada por 3 horas com 1 mM de IPTG na OD₆₀₀ de 0,4, nas mesmas condições. Após a

indução, a cultura foi recuperada por centrifugação a 5000 g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi estocado a -20°C. Com objetivo de analisar a expressão, alíquotas de 1 mL foram retiradas em tempos distintos da indução com IPTG (uma antes e outras três alíquotas correspondendo a uma, duas e três horas de indução). Estas alíquotas foram centrifugadas a 16000 x g por 2 minutos em microcentrífuga, sendo o precipitado das amostras ressuspensionado em 100 µL de tampão de migração SDS-PAGE 1X e fervido por 10 minutos. O precipitado (fração insolúvel) foi separado do sobrenadante (fração solúvel), e ressuspensionado em outros 100 µL de tampão de migração SDS-PAGE 1X. Um volume de 20 µL de cada fração foi analisado em gel SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie Brilliant Blue .

A Figura 19, mostra que não foi possível detectar qualquer sinal de expressão. Na tentativa de otimizar a técnica, realizamos cultivos com diferentes temperaturas, concentrações de IPTG e também utilizamos outras linhagens de *E. coli* para a expressão (Figura 20). Novamente, não foi possível detectar a expressão de proteínas recombinantes.

Experimentos de *Western blot* com anticorpos anti-histidina também foram realizados, com o objetivo de verificar a existência da expressão, mesmo que muito baixa e não detectável no gel, porém novamente nenhum sinal de expressão foi detectado.

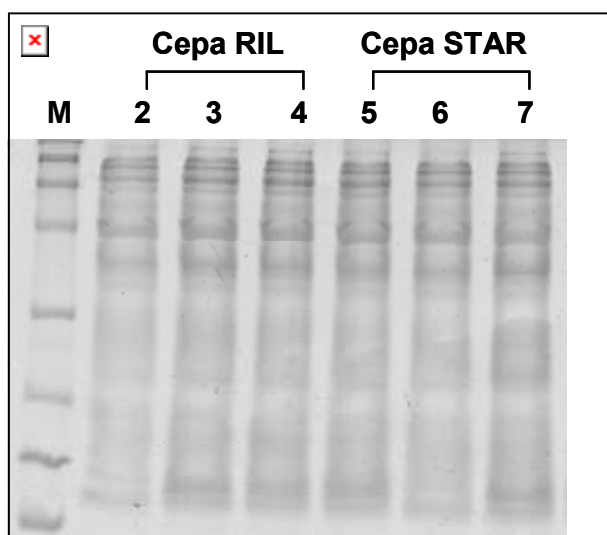


Figura 19 – Expressão da região σ_2 ($\sigma_{2.1.2}$) recombinante.

A expressão da região σ_2 ($\sigma_{2.1.2}$) em *E. coli* BL21 STAR e *E. coli* BL21 RIL foi induzida com a adição de 1mM de IPTG durante 3 horas. Foram coletadas amostras de 1mL, antes e após a indução. Gel de SDS-PAGE 12,5% / coomassie coloidal blue G250. M – marcador de massa molecular; 2 – antes da indução; 3 – após 1 hora de indução; 4 – após 3 horas de indução; 5 – antes da indução; 6 – após 1 hora de indução; 7 – após 3 horas de indução. As cepas estão indicadas na figura.

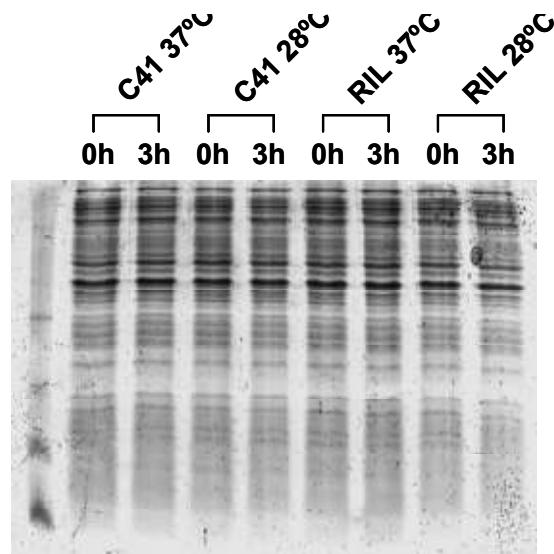


Figura 20 – Expressão da região σ_2 ($\sigma_2, \sigma_{1,2}$) recombinante com variações da concentração de IPTG e da temperatura.

A expressão da região σ_2 ($\sigma_2, \sigma_{1,2}$) em *E. coli* BL21 C41 e *E. coli* BL21 RIL foi induzida com a adição de 0.5 mM de IPTG durante 3 horas. Foram coletadas amostras de 1mL, antes e após a indução. Gel de SDS-PAGE 12,5% / coomassie coloidal blue G250. M – marcador de massa molecular; 0h refere-se a antes da indução e 3h refere-se à 3hs após a indução. A temperatura e a cepa estão indicadas na figura.

Apesar da σ inteira de *M. hyopneumoniae* 7448 já ter sido expressa (WEBER, 2008), não obtivemos sucesso na expressão de regiões separadas da σ , mesmo realizando variações diversas nas condições de expressão. Algumas hipóteses para este resultado negativo podem ser formuladas, como por exemplo a possibilidade desta região protéica de alguma maneira interferir na regulação da célula, por se tratar de uma região de uma proteína regulatória bastante conservada que está sendo super expressa. Além disto, algumas das linhagens de células de expressão apresentaram uma relativa queda na quantidade celular após a expressão, corroborando com a hipótese anteriormente citada. Porém, até o momento este resultado permanece sem uma conclusão final.

ANEXO II

Carga global das proteínas experimentalmente identificadas como proteínas que ligam ao DNA.

Proteínas identificadas experimentalmente – referência para os gráficos.

Hipotéticas – gráfico 1		Enovelamento e degradação – gráfico 4	
MHP7448_0327	proteína hipotética	MHP7448_0011	GrpE
MHP7448_0363	proteína hipotética	MHP7448_0067	DnaK
MHP7448_0425	proteína hipotética	MHP7448_0071	HimA
MHP7448_0412	proteína hipotética	MHP7448_0149	Tig
MHP7448_0431	proteína hipotética	Tradução – gráfico 5	
MHP7448_0444	proteína hipotética	MHP7448_0523	Tuf
MHP7448_0675	proteína hipotética	MHP7448_0075	FusA
Transcrição – gráfico 2		MHP7448_0243	AspS
MHP7448_0010	HrcA	MHP7448_0273	PheS
MHP7448_0168	RpoA	MHP7448_0534	Frr
MHP7448_0279	regulador transcricional	MHP7448_0179	RplF
MHP7448_0637	NusG	MHP7448_0193	RplD
Replicação e reparo – gráfico 3		MHP7448_0179	RplC
MHP7448_0001	DnaA	MHP7448_0576	RpSD
MHP7448_0006	DHH	Metabolismo – gráfico 6	
MHP7448_0062	Nfo	MHP7448_0494	manose-6P-isomerase
MHP7448_0066	UvrC	MHP7448_0115	PdhA
MHP7448_0130	Ung	MHP7448_0116	PdhB

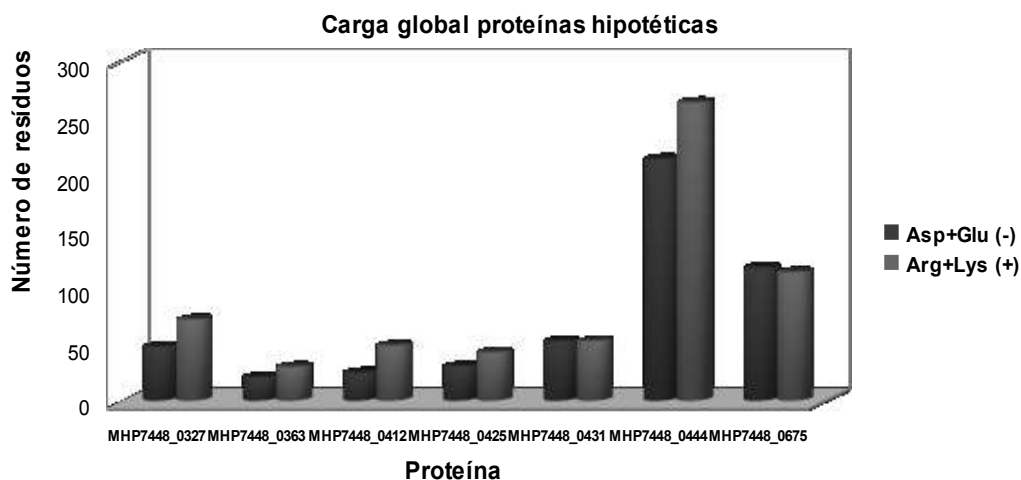


Gráfico 1 – Carga global das proteínas hipotéticas experimentalmente identificadas. Em azul (Aspartato + Glutamato) número de resíduos negativos; em vermelho (Arginina + Lisina) número de resíduos positivos.

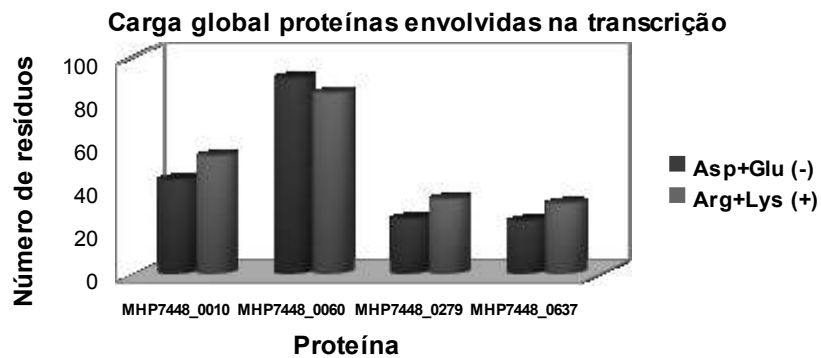


Gráfico 2 – Carga global das proteínas envolvidas na transcrição experimentalmente identificadas. Em azul (Aspartato + Glutamato) número de resíduos negativos; em vermelho (Arginina + Lisina) número de resíduos positivos.

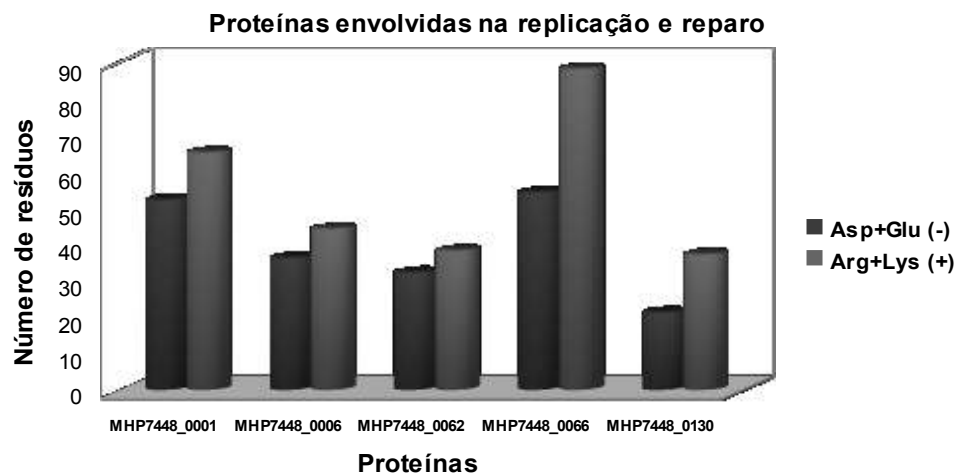


Gráfico 3 – Carga global das proteínas envolvidas em replicação e reparo experimentalmente identificadas. Em azul (Aspartato + Glutamato) número de resíduos negativos; em vermelho (Arginina + Lisina) número de resíduos positivos.

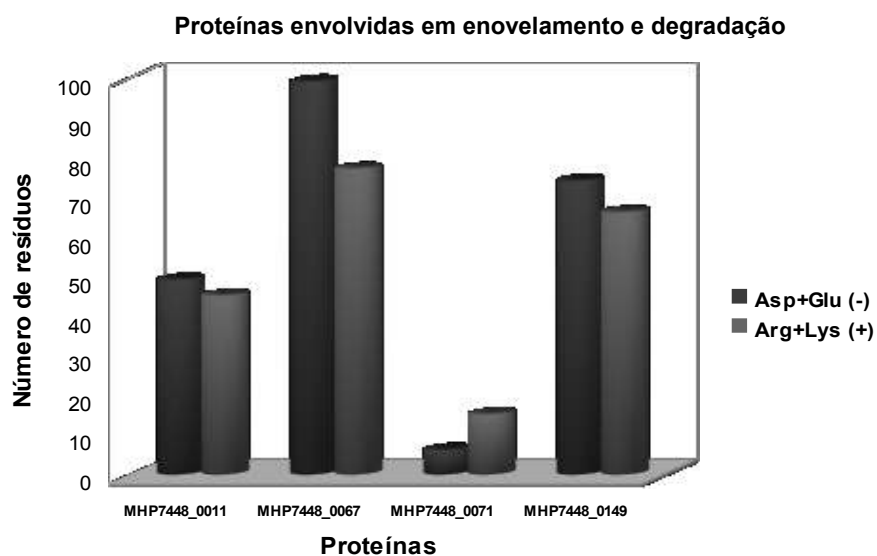


Gráfico 4 – Carga global das proteínas envolvidas em enovelamento e degradação experimentalmente identificadas. Em azul (Aspartato + Glutamato) número de resíduos negativos; em vermelho (Arginina + Lisina) número de resíduos positivos.

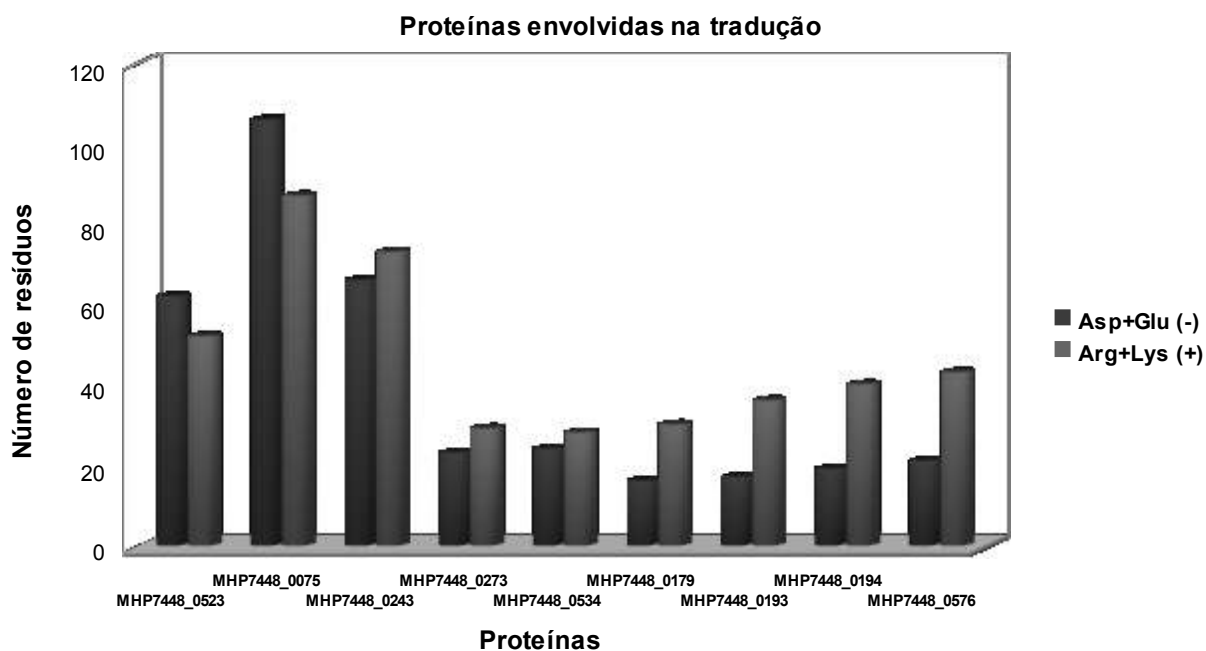


Gráfico 4 – Carga global das proteínas envolvidas na tradução experimentalmente identificadas. Em azul (Aspartato + Glutamato) número de resíduos negativos; em vermelho (Arginina + Lisina) número de resíduos positivos.

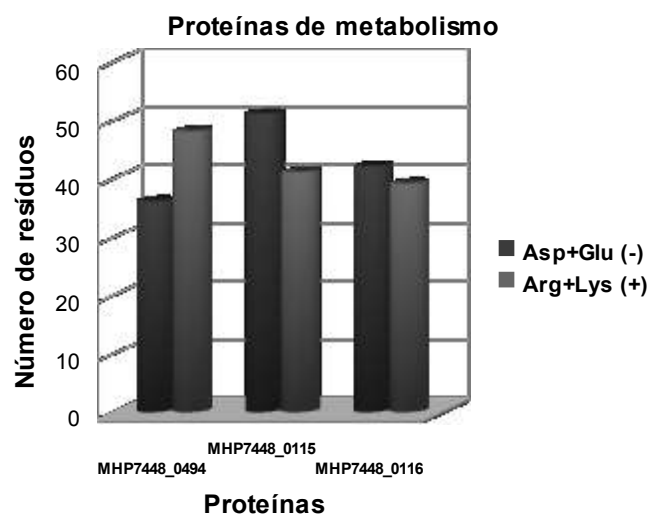
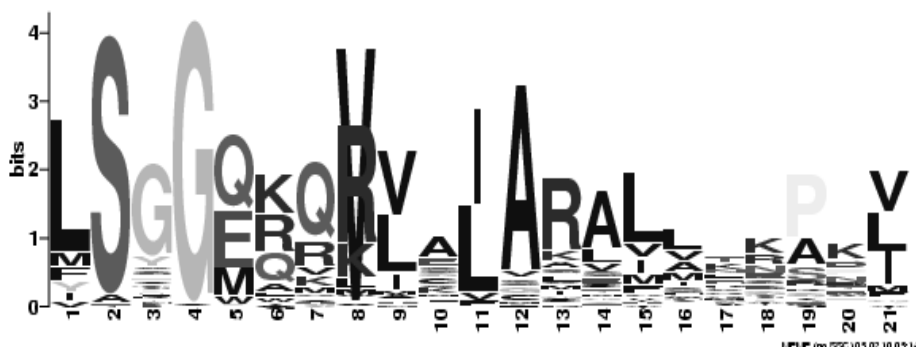


Gráfico 5 – Carga global das proteínas envolvidas no metabolismo experimentalmente identificadas. Em azul (Aspartato + Glutamato) número de resíduos negativos; em vermelho (Arginina + Lisina) número de resíduos positivos.

ANEXO III

Predição de transportadores ABC em *M. hyopneumoniae* 7448.



Representação gráfica do consenso do motivo transportador ABC (*ATP-binding cassette*), onde cada letra representa um aminoácido, segundo a classificação da IUPAC.

Predição de proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 com motivos de transportador ABC.

Gene ^a	Proteína ^b	Início ^c	Fim ^d	Sequência encontrada ^e
MHP7448_0501	oppF oligopeptídeo transportador ABC	618	638	FSGGQQRQRIARALIVEPKV
MHP7448_0369	transportador ABC - permease	508	528	LSGGQQQRVAIARGIVRHPDI
MHP7448_0361	transportador ABC	154	174	LSGGQQQRVEIAKLMLQNPKI
MHP7448_0215	oppF-1 oligopeptídeo transportador ABC	219	239	FSGGQQQRIGICRALLLRPKI
MHP7448_0542	potA espermidina/putrescina transportador ABC	232	252	LSGGMKQRVALARSLVIEPEI
MHP7448_0452	transportador ABC	196	216	MSGGQQQRISILRALVKNAKV
MHP7448_0264	cobalto transportador ABC	159	179	LSGGQKRRVAIAGILAMPDI
MHP7448_0019	transportador ABC	128	148	LSGGQKQRVAILRAFSRNSDF
MHP7448_0020	transportador ABC	128	148	LSGGQKQRVAILRAFSRNSDF
MHP7448_0023	transportador ABC	128	148	LSGGQKQRVAILRAFSRNSDF
MHP7448_0024	transportador ABC	128	148	LSGGQKQRVAILRAFSRNSDF
MHP7448_0502	oppD-1 oligopeptídeo transportador ABC	162	182	LSGGMKQRIVIAMTIAQQPSI
MHP7448_0021	transportador ABC	128	148	LSGGQKQRVAILRAFSRNSDF
MHP7448_0340	transportador ABC	128	148	LSGGQKQRVAILRSLARESDF
MHP7448_0263	cbiO cobalto transportador ABC	138	158	LSGGQKQRVAIASVLALNPEI
MHP7448_0315	transportador ABC	129	149	LSGGQKQRVAILRSLSRDSD
MHP7448_0314	transportador ABC	129	149	LSGGQKQRAAFLRSLSRKSD
MHP7448_0305	transportador ABC	129	149	LSGGQKQRVAILRSLSRDCGF
MHP7448_0383	transportador ABC	129	149	LSGGQKQRVAILRSLNRGSEF
MHP7448_0306	transportador ABC	128	148	LSGGQKQRAAFLRSLSRNADF
MHP7448_0231	mglA ribose transportador ABC	403	423	LSGGNQKQVSLAKGLATQPQV
MHP7448_0214	oppD oligopeptídeo transportador ABC	250	270	LSGGMIQRIVISAILSLEPKI
MHP7448_0514	xylG xilose transportador ABC	414	434	LSGGNQKQVVIKALSTKFDL
MHP7448_0514	xylG xilose transportador ABC	147	167	LSIAKQQMVEIAKALSKNAKL

MHP7448_0210	transportador ABC	448	468	TSGGEKVRLMFAKMMLSESNF
MHP7448_0091	uvrA exonuclease ABC subunidade A	824	844	LSGGEAQRIKLATFLQKKPTG
MHP7448_0469	transportador ABC	123	143	FSSGQKRKIMIVQSLIHDPPEL
MHP7448_0231	mgIA ribose transportador ABC	145	165	LSISQKQFIEIAKALSQKPEI
MHP7448_0627	transportador ABC	460	480	LSEGEKQKIALARLEYQDLNI
MHP7448_0379	MHP7448_0397 proteína hipotética	194	214	ISGGQEQRVAFKSIKGDNM
MHP7448_0160	transportador ABC - permease	603	623	FSSGQKQIALLQLLTQDFDL
MHP7448_0664	transportador ABC	455	475	LSEGQKQKIAFARLKYSPIKF
MHP7448_0624	transportador ABC	454	474	LSTGQIQKIHLARSLYSPKEI
MHP7448_0665	transportador ABC	455	475	LSMGQKQLVNFASHLAEAKPI
MHP7448_0210	transportador ABC	156	176	LKSGYKVKVLLAKALFGNPDI
MHP7448_0628	transportador ABC	467	487	FSTGQIQKIHLARSLYSPKEI
MHP7448_0605	putativo transportador ABC de açúcar	406	426	LSGGNQKQFVLGREILTPHEV
MHP7448_0657	transportador ABC P115	878	898	FSGGEKAIIAISLLFSIIKAR
MHP7448_0490	pgk fosfoglicerato quinase	246	266	LSIYEDDKLELAASLVKKYPD
MHP7448_0376	asnC asparaginil-tRNA sintetase	363	383	ILGGVLKIVATLVALMTGVRM
MHP7448_0091	uvrA exonuclease ABC subunidade A	137	157	LAYPEKTKLIIMAPIIEGEKG
MHP7448_0592	proteína que liga ATP	628	648	LSVKQKKKMSPYKFLKHSEI
MHP7448_0195	rpsJ 30S proteína ribossomal S10	35	55	IDAAAKKIILLARELNIEIRG
MHP7448_0221	nrdE ribonucleotideo-difosfato redutase	514	534	FSGFEKTKFASGEYFDKYTKV
MHP7448_0669	MHP7448_0669 proteína hipotética	326	346	VSLAMSILALIVVIITKTNL
MHP7448_0513	46K precursor de antígeno de superfície	161	181	EKVGELQGLSLAAGLLGKEDG
MHP7448_0605	putativo transportador ABC de açúcar	143	163	ASVVIKQKIEIKILYRSDI
MHP7448_0498	proteína hipotética	115	135	LAQNQKQMVNINILSTFATSM
MHP7448_0592	proteína que liga ATP	860	880	IQGDEADLVIIISVAYDQSAKF
MHP7448_0175	secY pré-proteína translocase subunidade	347	367	MSLQQSRVDKIAQDFAKNSTF
MHP7448_0146	proteína de transporte de cromato	5	25	ISLAIIGLVLISLLVFGGGQV
MHP7448_0502	oppD-1 oligopeptídeo transportador ABC	35	55	LSLYQQQIIAFVGESGSGKSV
MHP7448_0457	napA fator de ativação neutrofílica	92	112	LAEQIKKILEICGEIQEDGDD
MHP7448_0550	mtIA sistema PTS	180	200	AKMGQWKLYPLIALIVEPAKI
MHP7448_0082	nox NADH oxidase	412	432	LSLAIQKRLKLTIEALSDFYF
MHP7448_0084	deoD purina-nucleosídeo fosforilase	18	38	MPGDPLRAEFIAKNFLKDAKL
MHP7448_0383	transportador ABC	662	682	ISESKQKMIGILKALGGSTLL
MHP7448_0626	proteína hipotética	596	616	LSGIENQVILKKNLSKYKNI
MHP7448_0650	rpsI 30S proteína ribossomal S9	8	28	YYGTGRRKSSVARVTLKHGNG

^{a, b} O código do gene e nome da proteína são da anotação do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448. Número de acesso no NCBI: NC_007332.

^{c, d} Início e Final referem-se, respectivamente, ao início e fim da sequência do motivo encontrada na proteína.

^e Referente a sequência encontrada como sendo similar ao consenso do motivo

CURRICULUM VITAE

REOLON, L.; REOLON, L. A.

Dados Pessoais

Nome: Luciano Antonio Reolon
E-mail: lucianoreolon@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008 – atual Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Análise de proteínas que ligam ao DNA de *Mycoplasma hyopneumoniae*
Orientadora: Irene Silveira Schrank
- 2008 – 2010 Curso de Especialização *lato sensu* em Acupuntura
Colégio Brasileiro de Estudos Sistêmicos, Porto Alegre, Brasil.
Título: Acupuntura e Infertilidade, uma visão atual.
- 2004 – 2008 Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Caracterização funcional de promotores de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
Orientadora: Irene Silveira Schrank

Atuação profissional

1. Laboratório de Análises Clínicas e Banco de Sangue Marques Pereira, Porto Alegre, RS.
2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Vínculo institucional

- 2006 - 2007 Vínculo: Estagiário, Estágio curricular obrigatório
Carga horária: 40, Regime: Integral.

Atividades

- 2004 - 2005 Projeto de Pesquisa, Departamento de Bioquímica, UFRGS.
Linhas de Pesquisa:
Caracterização de lectinas de Mikania laevigata.
Integrantes: Luciano Reolon, Emanuel Souza, Magdolna M. Vozari Hampe (responsável), Gilberto Dolejal Zanetti.
Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.
- 2006 – 2008 Projeto de pesquisa, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
Linhas de Pesquisa:
Caracterização funcional de promotores de Mycoplasma hyopneumoniae.
Integrantes: Luciano Reolon, Shana Weber, Irene S. Shrank (responsável).
Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2006 – 2008 Projeto de pesquisa, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
Linhas de Pesquisa:
Transformação de Mycoplasma hyopneumoniae.
Integrantes: Luciano Reolon, Beatriz Lopes, Irene S. Shrank (responsável), Cêrgio Ceroni da Silva.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

- 2006 – atual
Projeto de pesquisa, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
Linhas de Pesquisa:
Vetores de transformação de Mycoplasma hyopneumoniae.
Integrantes: Luciano Reolon, Beatriz Lopes, Scheila Muccia, Irene S. Shrank (responsável).
Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2008 – atual
Projeto de pesquisa, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
Linhas de Pesquisa:
Proteínas que ligam ao DNA de Mycoplasma hyopneumoniae.
Integrantes: Luciano Reolon, Irene S. Shrank (responsável).
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Produção em C, T & A

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

REOLON, L.; DRESCH, R. R., ZANETTI, G. D., TRINDADE, V. M. T. ; HAMPE, M. M. V.
Purificação da Lectina de Mikania Laevigata por Cromatografia em Coluna de Estroma-Acrilamida.
Livro de Resumos XVII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2005.

REOLON, L., WEBER, S.S., SILVA, S. C., SCHRANK, I. S.
Caracterização funcional de promotores de *Mycoplasma hyopneumoniae*
In: XVIII Salão e XV Feira de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre - RS.
Livro de Resumos XVIII Salão de Iniciação Científica e XV Feira de Iniciação Científica, 2006.

REOLON, L., WEBER, S.S., SCHRANK, I. S.
Caracterização funcional de promotores de *Mycoplasma hyopneumoniae*
In: XVIII Salão e XV Feira de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre - RS.
Livro de Resumos XIX Salão de Iniciação Científica e XVI Feira de Iniciação Científica, 2007.

REOLON, L., WEBER, S.S., LOPES, B. M. T., SILVA, S. C., SCHRANK, I. S.
In vivo promoter activities in *Mycoplasma hyopneumoniae*: evaluation of a reporter system.
In: XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Córdoba.
XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007.

LOPES, B.M.T., BITTENCOURT, B.G.F., REOLON, L.A., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, I., SILVA, S.C.
Mycoplasma hyopneumoniae - Transformation with a New Replicative Vector
In: XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007, Córdoba.
XI Congreso Argentino de Microbiología, 2007.

REOLON, L., SCHRANK, I. S.
Purificação da RNA polymerase de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
Iniciação Científica, 2008, Porto Alegre - RS.
Livro de Resumos XX Salão de Iniciação Científica e XVII Feira de Iniciação Científica, 2008.