

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

**TRANSCRIÇÃO EM MICOPLASMAS:
PREDIÇÃO DE TERMINADORES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TIAGO EBERT FRITSCH

PORTO ALEGRE, 2014

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

**TRANSCRIÇÃO EM MICOPLASMAS:
PREDIÇÃO DE TERMINADORES**

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 um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre.

Tiago Ebert Fritsch

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Irene Silveira Schrank

Porto Alegre, março de 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microrganismos Diazotróficos, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à professora Irene Silveira Schrank, pela acolhida em seu laboratório, e principalmente, pelos ensinamentos.

Aos professores Arnaldo Zaha, Augusto Schrank, Henrique Ferreira e Marilene Vainstein, pela oportunidade de convívio e aprendizado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microrganismos Diazotróficos, especialmente Ricardo Cecagno, Franciele Siqueira, Sheila Mucha, Luciano Reolon e Amanda Cattani pelo compartilhamento de conhecimentos, discussões de metodologias, e amizade;

Aos colegas dos laboratórios 210, 217 e 220.

Ao Centro de Biotecnologia, onde trabalhei desde o início da graduação.

Aos funcionários do Cbiot e do PPGBCM pela disposição em sempre ajudar.

Aos meus pais, Neri Fritsch e Solange Ebert Fritsch e minha irmã Patricia, pelo apoio incondicional. E aos meus familiares, que sempre acreditaram em mim e incentivaram minhas decisões. Em especial, ao André Ebert por me direcionar para o caminho da ciência.

À UFRGS pelo ensino de qualidade.

Aos órgãos financiadores, pelo auxílio financeiro para a execução do trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. O GÊNERO <i>MYCOPLASMA SP.</i>	13
1.2. <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i>	15
1.3. TRANSCRIÇÃO EM MICOPLASMAS.....	16
1.3.1 TRANSCRIÇÃO EM <i>M. HYOPNEUMONIAE</i> 7448.....	20
1.4. TERMINADORES DA TRANSCRIÇÃO EM PROCARIOTOS.....	22
1.4.1 TERMINADORES DA TRANSCRIÇÃO EM MICOPLASMAS	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICO	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. IDENTIFICAÇÃO DE TERMINADORES DA TRANSCRIÇÃO EM <i>M. HYOPNEUMONIAE</i>	28
3.2. ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	28
3.2.1. PREDIÇÃO DE TERMINADORES	28
3.2.2. CLASSIFICAÇÃO DOS TERMINADORES	29
3.3. ANÁLISE EXPERIMENTAL	30
3.3.1. CULTIVO DE <i>M. HYOPNEUMONIAE</i> 7448	30
3.3.2. ISOLAMENTO DE DNA E RNA.....	30
3.3.3. CONSTRUÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	31

3.3.4. AMPLIFICAÇÃO DE mRNA	32
3.3.4.1 SÍNTESE DE cDNA	32
3.3.4.2 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR RT-PCR	33
3.3.4.3 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR qRT-PCR	33
4. RESULTADOS	35
4.1. ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	35
4.1.1. PREDIÇÃO DE TERMINADORES	35
4.1.2. LOCALIZAÇÃO NO GENOMA	35
4.1.3. CONFIRMAÇÃO DOS TERMINADORES	36
4.2. VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DE ALGUNS TERMINADORES PREDITOS.....	40
4.2.1. RT-PCR	41
4.2.2. qRT-PCR.....	43
5. DISCUSSÃO.....	48
6. PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	65
ANEXO 1 Protocolo de extração de DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i>	65
APÊNDICES.....	66
APÊNDICE 1 <i>Primers</i> empregados para RT-PCR e qRT-PCR	66
APÊNDICE 2 Terminadores localizados ao final de CDSs	69
APÊNDICE 3 Terminadores localizados nas mCs de <i>M. hyopneumoniae</i>	90
APÊNDICE 4 Terminadores localizados nas UTs de <i>M. hyopneumoniae</i>	92
CURRICULUM VITAE	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CDS	sequência codificante
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	trifosfato de desoxirribonucleosídeo
DPEC	dietilpirocarbonato
DTT	ditiotreitól
fmol	fentomol
Kb	quilobase
kcal	quilocaloria
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
µg	micrograma
µl	microlitro
mC	gene monocistrônico
MgCl₂	cloreto de magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
MOPS	3-[N-morfolino] ácido propanosulfônico
NaCl	cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanograma
ORF	região aberta de leitura
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
poli-U	sequência de Uridinas
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	PCR com transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio

TE	Tris-HCl/EDTA
Tm	temperatura média de anelamento
U	unidade
UT	unidade de transcrição
UFC	unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Identificação de terminadores da transcrição.

Figura 3.2 – Etapas de classificação dos terminadores.

Figura 3.3 – Representação esquemática da construção dos *primers* para validação dos terminadores por RT-PCR e qRT-PCR.

Figura 4.1 – Organização gênica em *M. hyopneumoniae*.

Figura 4.2 – Organização da unidade transcricional 10 em *M. hyopneumoniae* 7448.

Figura 4.3 – Características dos terminadores classe t_{c2} .

Figura 4.4 – Confirmação experimental do terminador da UT_10.

Figura 4.5 – Análise da expressão relativa por qRT-PCR dos terminadores classe t_{c2} .

Figura 4.6 – Análise da expressão relativa por qRT-PCR dos terminadores classe t_{c3} .

Figura 4.7 – Análise da expressão relativa por qRT-PCR dos terminadores classe t_{c4} .

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Descrição das reações de amplificação para cada par de *primers*.

Tabela 4.1 – Terminadores preditos e classificação dos terminadores classe t_{c1}

Tabela 4.2 – Presença de terminadores em mCs e UTs de *M. hyopneumoniae*.

Tabela 4.3 – Terminadores avaliados experimentalmente por RT-PCR

Tabela 4.4 – Terminadores avaliados experimentalmente por qRT-PCR

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, uma enfermidade de distribuição mundial, responsável por consideráveis perdas econômicas. Este microrganismo possui um genoma reduzido com alto conteúdo de A+T e ausência de parede celular. Para investigar a patogênese de *M. hyopneumoniae* é importante entender seus mecanismos genéticos, porém, apesar do sequenciamento do genoma de várias linhagens (J, 7448, 7422, 232, 168 e 168-L), pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam e controlam a expressão gênica neste microrganismo. Em *M. hyopneumoniae* 7448 foi previamente demonstrada a presença de sequências promotoras da transcrição no início de unidades transcricionais (UTs) e genes monocistrônicos (mCs). No entanto, o mecanismo de término da transcrição continua pouco conhecido em micoplasmas, vindo a ser o objeto de estudo neste trabalho. Para isto, foram utilizados três programas computacionais, ARNold, TransTermHP e WebGesTer, para predição de terminadores intrínsecos no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448. Para a confirmação, os terminadores preditos foram classificados em classes de acordo com suas características estruturais e funcionais. Por meio das análises *in silico*, pôde ser confirmada a presença de terminadores em 63% dos 33 mCs e em 64% das UTs. As características padrão determinadas para os terminadores intrínsecos de *M. hyopneumoniae* 7448 foram: localização a uma distância entre -11 a 200 pb do códon de parada da tradução do gene alvo e possuir um valor de energia livre de Gibbs menor que -4 kcal/mol. Já a cauda poli-U não foi encontrada em nenhum dos terminadores confirmados. As análises de RT-PCR e qRT-PCR, demonstraram que os terminadores classes t_{c2} , t_{c3} e t_{c4} possuem atividade funcional em micoplasmas. Estes resultados mostram que, apesar de divergirem do modelo de terminador de outras bactérias, como *Escherichia coli*, os terminadores de micoplasmas possuem atividade funcional. Assim, podemos sugerir que os terminadores intrínsecos sejam a principal forma de terminação da transcrição em *M. hyopneumoniae* 7448.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia, a disease with global wide distribution and responsible for considerable economic losses.. This microorganism present a reduced genome with high A+T content and no cell wall. In order to investigate the pathogenesis of the *M. hyopneumoniae* it is important to understand its genetic mechanisms. Although the genome sequences of several lineages (J, 7448, 7422, 232, 168 e 168-L) have been described, the mechanisms that regulate and control gene expression in this organism are not fully understood. It has been previously demonstrated that the sequences that promote the transcription in *M. hyopneumoniae* 7448 are located at the 5' end of the transcriptional units (UT) and monocistronic genes (mC). However, the termination mechanism of the transcription is still poorly understood in mycoplasmas such as *M. hyopneumoniae* 7448, justifying the chosen object of this study. In this work, three softwares were used to predict the intrinsic terminators in the *M. hyopneumoniae* 7448 genome: ARNold, TransTermHP, and WebGesTer. For confirmation, the predicted terminators were classified according to its functional and structural characteristics. Through *in silico* analysis it was possible to confirm the presence of terminators in 63% of the 33 mCs, and in 64% of the UTs. The characteristic patterns determined for the intrinsic terminators were localization between -11 and 200 bp distant from stop codon of the target gene and with a Gibbs free energy value of less than -4 kcal/mol. However, the poly(U) tail was not found in any confirmed terminator. The analysis by RT-PCR and qRT-PCR demonstrated that the terminators of class t_{c2} , t_{c3} and t_{c4} are functionally active in *M. hyopneumoniae*. The results show that although diverging from the terminator model of other bacterial species, such as *Escherichia coli*, the terminators of mycoplasmas do have functional activity. Therefore, it is possible to suggest that the intrinsic terminators are the main form of transcription termination in *M. hyopneumoniae* 7448.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Mycoplasma* spp.

Os microrganismos do gênero *Mycoplasma* estão entre os menores e mais simples organismos auto-replicativos já identificados. Pertencem à família *Mycoplasmataceae*, classe *Mollicutes*, do latim *mollis* (mole) e *cutis* (pele). As bactérias deste gênero se diferenciam fenotipicamente dos demais procariotos pela ausência de parede celular e a existência de citoesqueleto (RAZIN & HAYFLYK, 2010). A membrana celular de micoplasmas possui uma organização trilaminar simples, sendo composta de proteínas, glicoproteínas, fosfolipídios e colesterol, sendo este último, o responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana. Estes microrganismos possuem um crescimento fastidioso em cultura, se multiplicando num período de 3 a 20 dias após incubação, a uma temperatura ótima de 37 °C, pH em torno de 7,5, em atmosfera de 5 a 10% CO₂ e leve agitação (WALKER, 2003).

As primeiras espécies de micoplasmas foram descritas há aproximadamente 70 anos, tendo até o momento cerca de 124 espécies identificadas e esse número continua crescendo (<http://www.bacterio.net/mycoplasma.html>). Não existem micoplasmas de vida livre, uma vez que dependem de fontes externas de precursores biossintéticos. Estão amplamente distribuídos no reino animal, parasitando mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (PITCHER & NICHOLAS, 2005). A grande maioria das espécies é hospedeiro específico e pode ser patogênico ou apenas fazer parte da microbiota natural do hospedeiro, colonizando o trato respiratório e/ou urogenital (RAZIN, 2006). Normalmente, estão aderidos à superfície extracelular de células e tecidos do hospedeiro, embora já tenham sido descritos algumas espécies ocupando o interior de células eucarióticas (LO *et al.*, 1993; BASEMAN *et al.*, 1995). Em humanos, estão relacionados a enfermidades como síndromes respiratórias, pneumonia, câncer, doenças autoimunes e artrite (BASEMAN & TULLY, 1997).

A ausência de parede celular protegendo a membrana plasmática faz com que micoplasmas sejam classificados morfológicamente como bactérias

gram-negativas (RAZIN, 2006). Esta característica também explica algumas propriedades de micoplasmas, como a sensibilidade ao choque osmótico e a detergentes, resistência à penicilina e formação de colônias de diferentes formas, podendo ser esférica, em forma de pera, em forma de espiral ou filamentosa. Entretanto, filogeneticamente os micoplasmas estão relacionados às bactérias gram-positivas, compartilhando, deste modo, um ancestral em comum com os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium* (WOLF *et al.*, 2004). Possivelmente, a evolução dos micoplasmas ocorreu através de eventos de degeneração ou redução do genoma de bactérias gram-positivas portadoras de baixo conteúdo de guanina e citosina (G+C) (WOESE, 1987).

Em concordância com os processos evolutivos propostos para micoplasmas, os genomas destes microrganismos são extremamente reduzidos, variando de 580 kb (*Mycoplasma genitalium*) a 1.358 kb (*Mycoplasma penetrans*) (FRASER *et al.*, 1995; SASAKI *et al.*, 2002) e apresentam baixo conteúdo de G+C, entre 23 e 40% (WOESE, 1987). A distribuição de conteúdo G+C no genoma ocorre de acordo com a organização gênica. As regiões intergênicas têm um maior conteúdo de adenina e timina (A+T) em relação às regiões codificantes (DYBVIK & VOELKER, 1996), sendo a frequência de G+C mais alta em genes que codificam RNAs ribossômicos e transportadores (FRASER *et al.*, 1995). Como resultado desta composição atípica de bases nitrogenadas dos genomas, há o favorecimento da utilização de códons que contêm adenina e timina. Consequentemente, micoplasmas possuem pouquíssimos códons GGN, CCN, GCN e CGN (BOVE, 1993). Outra particularidade que parece estar ligada a essa questão é o fato de que enquanto que no código genético universal o códon UGA codifica um sinal de término da tradução (OSAWA *et al.*, 1992), em micoplasmas este códon codifica o aminoácido triptofano (YAMAOKA *et al.*, 1985), característica que é igualmente encontrada em genomas mitocondriais.

A economia de informação genética foi provavelmente a responsável pela perda, nos micoplasmas, de várias das vias enzimáticas características da maioria das bactérias. Como exemplos disso, podemos ressaltar a ausência de vias *de novo* na biossíntese de purinas, de um ciclo do ácido tricarbóxico completo e de um sistema de cadeia transportadora de elétrons mediada por

citocromo (MANOLUKAS *et al.*, 1988; FINCH & MITCHELL, 1992; POLLACK, 1992; FRASER *et al.*, 1995). Além disto, apenas os sistemas regulatórios considerados indispensáveis para a sobrevivência foram mantidos durante a evolução reductiva (HALBEDEL & SULKE, 2007). Isso estaria relacionado ao fato da maioria dos micoplasmas serem parasitas hospedeiro e tecido específicos (RAZIN *et al.*, 1998; ROTTEM & YOGEV, 2000).

As características peculiares de micoplasmas, como o genoma reduzido, fazem destes organismos um modelo ideal para a determinação do conjunto de genes necessários para a determinação de uma célula mínima. Isto, junto a sua importância econômica, uma vez que muitas espécies são patógenos de animais afetando economicamente processos produtivos, fez com que muitas espécies tivessem seu genoma sequenciado.

1.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES) que se caracteriza pela alta morbidade e baixa mortalidade (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). Esta bactéria coloniza o trato respiratório do animal causando dano ao epitélio ciliar das vias aéreas inferiores através da adesão a este tecido (DEBEY *et al.*, 1992). Essa aderência é essencial para que ocorra a multiplicação do organismo (ZIELINSKI *et al.*, 1990). O estabelecimento da infecção resulta em ciliostase, perda dos cílios, morte das células epiteliais e inflamação aguda na traqueia, brônquios e bronquíolos. Conseqüentemente, ocorre uma redução na eficiência do sistema mucociliar e diminuição da resistência imunológica, predispondo os animais a infecções secundárias (CIPRIAN *et al.*, 1988; DJORDJEVIC *et al.*, 2004). Em adição ao impacto físico no trato respiratório, *M. hyopneumoniae* também altera a resposta imune do hospedeiro, sendo capaz de mimetizar várias superfícies antigênicas e se utilizar dessa variação para evadir o sistema imune (THACKER, 2004).

A PES é uma das principais doenças respiratórias em suínos e ocorre em âmbito mundial, estando presente em quase todos os rebanhos suínos (MINION *et al.*, 2004). Esta enfermidade é a maior causa de perdas econômicas

na produção suinícola intensiva por determinar significativos gastos com medicamentos, atraso no ganho de peso, condenação de órgãos e carcaça e, por fim, menor valor de venda da carne (THACKER, 2006). Devido a isto, há um grande empenho da comunidade científica em estudar *M. hyopneumoniae*.

O isolamento de *M. hyopneumoniae* apresenta várias dificuldades devido a sua natureza fastidiosa, o mecanismo de multiplicação lento e a presença de outros micoplasmas no trato respiratório suíno, entre eles *Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma flocculare* (MAES *et al.*, 2008). *M. hyopneumoniae* se multiplica em meio sólido somente na presença de 5 a 10% de CO₂. O meio Friis, desenvolvido para isolamento de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, é um meio rico e possui soro suíno livre de anticorpos e o indicador de pH vermelho de fenol (FRIIS, 1975). A multiplicação bacteriana acidifica o meio permitindo a identificação de crescimento pela mudança de coloração do meio, de vermelho para amarelo, indicando a oxidação da glicose.

Devido a importância econômica, *M. hyopneumoniae* vem sendo alvo de estudos moleculares e funcionais. Prova disso é que até o momento seis cepas de *M. hyopneumoniae* (J, 7448, 7422, 232, 168 e 168-L) já tiveram seus genomas completamente sequenciados (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013). Uma característica comum entre estes genomas é um conteúdo G+C de aproximadamente 28% e a presença de regiões codificantes ocupando a maior parte do genoma, aproximadamente 80%. A disponibilidade dos genomas sequenciados tem propiciado um melhor entendimento relacionado com a biologia de *M. hyopneumoniae*, auxiliando estudos referentes ao seu metabolismo e sua patogenicidade.

1.3. Transcrição em micoplasmas

A transcrição é o processo em que a informação contida na sequência de DNA de um gene é sintetizada em RNA, dando origem a todas as moléculas de RNA necessárias ao funcionamento celular, tais como os RNAs mensageiros, estruturais e regulatórios. A transcrição é o primeiro estágio do controle da

expressão gênica, determinando a maquinaria molecular necessária para a diferenciação celular, morfogênese e adaptação de qualquer organismo (GHOSH *et al.*, 2010), e, portanto, o nível mais efetivo em que a expressão de um gene pode ser regulada.

O processo de síntese de RNA em procariotos, tendo *Escherichia coli* como modelo, consiste basicamente em três estágios: iniciação, alongamento e término. Durante a iniciação, a RNA polimerase holoenzima (associada a subunidade σ^{70}) liga-se a regiões conservadas no DNA (promotores) para formar um complexo fechado. Esta ligação provoca alterações conformacionais na molécula de DNA, resultando na separação das fitas e formação do complexo aberto. A RNA polimerase (RNAP) pode iniciar o alongamento do transcrito, seguindo até que sejam encontradas sequências que indicam o término da transcrição.

O interesse em estudar micoplasma fez com que muitas espécies tivessem seu genoma sequenciado. Até o momento, 67 cepas de 28 diferentes espécies deste gênero já tiveram seus genomas sequenciados (KEGG, 2014). A espécie com mais genomas disponíveis (12 cepas sequenciadas) é *Mycoplasma gallisepticum*, agente causador da doença respiratória crônica (DRC) em frangos. Os dados obtidos com o sequenciamento destas espécies permitiram constatar que a regulação da transcrição em micoplasmas diverge do modelo de transcrição em procariotos. Em genomas bacterianos, o número de genes anotados, envolvidos com a transcrição, varia entre as espécies analisadas. Em micoplasmas, o total de genes envolvidos na transcrição varia entre 11 a 23, o que representa 2 a 3% do total de sequências de DNA codificantes (SASAKI *et al.*, 2002; MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005). Este índice é considerado baixo quando comparado a outras espécies bacterianas, como *E. coli* (8,1%) e *Bacillus subtilis* (9%) (MADEIRA & GABRIEL, 2007). Entretanto, existe um grande número de genes sem função conhecida presentes no genoma de micoplasmas e que podem estar envolvidos na transcrição.

Assim como outras bactérias, micoplasmas possuem apenas uma RNA polimerase. Esta RNA polimerase é semelhante a de eubactérias, sendo codificada pelos genes conservados *rpoA* (subunidade α), *rpoB* (subunidade β)

rpoC (subunidade β'). Na maioria das espécies bacterianas são encontradas diversas subunidades sigma, responsáveis pelo reconhecimento de diferentes tipos de sequências promotoras, permitindo assim, a expressão diferencial de genes dependendo das condições nutricionais e ambientais (MADEIRA & GABRIEL, 2007). Entretanto, a análise dos genomas de micoplasmas demonstra a presença de uma única sequência codificadora para a subunidade sigma (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

O início da transcrição é determinado pelo reconhecimento de sequências promotoras localizadas à montante do ponto de início de transcrição pela RNA polimerase holoenzima. Nas bactérias, quatro diferentes elementos promotores foram identificados, sendo que os dois principais são os hexâmeros localizados a -10 e -35, podendo ocorrer também os elementos promotores -10 estendido e o elemento UP. Em micoplasmas a identificação de regiões promotoras é dificultada devido ao seu genoma A-T rico, o que torna a definição *in silico* das sequências promotoras mais difícil, uma vez que os algoritmos de predição utilizados se baseiam predominantemente em dados disponíveis para *E. coli*. Os promotores gênicos de 22 genes de *Mycoplasma pneumoniae*, demonstrados experimentalmente por (Weiner III *et al.*, 2000), possuem consenso na região -10, enquanto na região -35 não foi identificado consenso, ou então um consenso muito fraco. Estes dados foram confirmados por Halbedel *et al.* (2007) utilizando fragmentos de DNA contendo as prováveis regiões promotoras -10 e -35 ligados ao gene repórter *lacZ* em *M. pneumoniae*. Mutações pontuais na região -10 alteravam a expressão do gene *lacZ*, enquanto que mutações na região -35 não possuíam a mesma relevância. Dessa forma, parece que a região -35 pode não ser um pré-requisito para a ação da RNA polimerase em micoplasmas.

Considerando a distribuição gênica no genoma, micoplasmas possuem os genes predominantemente organizados em unidades de transcrição formadas por vários genes. Em *M. pneumoniae* os genes estão organizados em longos agrupamentos gênicos, formados por genes com diferentes funções, intercalados por sequências intergênicas curtas ou inexistentes, sugerindo que estes genes são co-transcritos em mRNAs policistrônicos (HALBEDEL *et al.*, 2007). Porém, a

análise do transcrito de *M. pneumoniae* mostrou que nem todos os genes de uma unidade de transcrição são expressos coordenadamente, mostrando que genes em posições internas podem ser reprimidos ou ativados em resposta a mudanças ambientais (GÜELL *et al.*, 2009). Isto demonstra que as unidades de transcrição (operons) podem ser subdivididas em unidades de transcrição menores (suboperons) implicando em alta taxa de transcritos alternativos. Esta modulação dos genes internos mostra que possivelmente ocorram sítios internos de início e término da transcrição.

Micoplasmas também não possuem vários mecanismos regulatórios presentes nas outras bactérias, tais como: sistemas de dois componentes (*two-component system*) e fator de terminação de transcrição Rho (FRASER *et al.*, 1995). Consequentemente, os sinais que promovem e regulam a transcrição nos micoplasmas provavelmente diferem significativamente de outras bactérias (WEINER III *et al.*, 2000).

Devido à disponibilidade de diversos genomas de micoplasmas anotados, a análise da expressão em nível transcricional tem sido uma ferramenta muito empregada na busca do entendimento da regulação da transcrição. Estudos importantes mostraram que tanto estresse ambiental quanto metabólico pode garantir respostas transcricionais específicas em micoplasmas. A carência de ferro em *M. hyopneumoniae* resultou em um aumento na transcrição de nove genes e redução na transcrição de 18 outros (MADSEN *et al.*, 2006a). A análise transcricional global de *M. hyopneumoniae* também foi realizada em condições de infecção, permitindo a identificação de 79 genes com alteração no padrão transcricional, sendo que 33 deles apresentaram aumento nos níveis de transcrição (MADSEN *et al.*, 2008). Quando submetido a choque térmico, *M. hyopneumoniae* responde com o aumento na transcrição de 50 genes, enquanto outros 41 têm este nível reduzido (MADSEN *et al.*, 2006b).

Portanto, apesar do processo de evolução reductiva, ao qual os micoplasmas provavelmente foram submetidos e que levou a perda de vários mecanismos regulatórios, estas bactérias possuem a capacidade de modular a expressão gênica em resposta a variações ambientais. Güel *et al.* (2009) identificaram por meio da análise do transcrito de *M. pneumoniae* a presença

de 117 transcritos que não haviam sido identificados em estudos anteriores. Destes, 89 possuem uma configuração antisense em relação a genes já determinados, sugerindo que eles tenham um papel na regulação da expressão gênica por um mecanismo de RNA de interferência. Análises de redes metabólicas demonstraram que comparado com genomas bacterianos maiores, *M. pneumoniae* possui uma proporção maior de enzimas com atividades multifuncional e um número menor de vias de sinalização em paralelo, sugerindo um metabolismo simplificado (YUS *et al.*, 2009). Em relação a análise proteômica, Kühner *et al.* (2009) utilizando purificação de proteínas por afinidade combinado com a espectrometria de massas demonstraram que uma grande porção de proteínas de *M. pneumoniae* forma um complexo proteico com múltiplas funções, o que não tem como ser predito por análises de expressão gênica.

Estas descobertas sugerem a presença de uma maquinaria transcricional altamente estruturada e multifacetada, com uma complexidade similar aquela encontrada em eucariotos, que não era esperada em micoplasmas devido ao pequeno genoma e poucos fatores transcricionais (OCHMAN & RAGHAVAN, 2009). Entretanto, apesar de todos estes avanços permanece o questionamento sobre como ocorrem estes processos em micoplasmas.

1.3.1 Transcrição em *M. hyopneumoniae* 7448

Assim como as outras bactérias pertencentes a este gênero, *M. hyopneumoniae* possui poucos genes relacionados com a transcrição. Pela classificação do COG (do inglês *Cluster of Ortholog Groups*) apenas 20 genes estão implicados neste processo na linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae*, correspondendo a 3% do total de sequências codificantes (NCBI, 2013). No entanto, apesar do mecanismo de expressão gênica em micoplasma ainda não ser bem caracterizado, trabalhos recentes trouxeram novas informações relacionadas à regulação gênica em *M. hyopneumoniae* 7448.

No trabalho de Reolon (2010) foi realizada uma busca de proteínas que apresentam ligação ao DNA de *M. hyopneumoniae* 7448 através de análises experimentais e *in silico*. Por espectrometria de massas foram identificadas 32

proteínas que possivelmente apresentam capacidade de ligação ao DNA. Entre as proteínas identificadas estão algumas que já estão descritas como reguladores transcricionais, como MHP7448_0010 (HrcA – repressor transcricional induzido por temperatura), MHP7448_0279 (regulador transcricional), MHP7448_0168 (*rpoA* – RNA polimerase subunidade α) e MHP7448_0637 (NusG – proteína anti-terminação transcricional). A utilização de programas de bioinformática permitiu a identificação de 59 proteínas que podem se ligar ao DNA, dentre as quais 16 são proteínas hipotéticas, ainda sem função conhecida, e que poderiam desempenhar funções de regulação.

Por meio da técnica 5'RLM-RACE Weber *et al.* (2012) determinaram a presença de sequências promotoras no sítio de início da transcrição de 23 genes de *M. hyopneumoniae* 7448. A análise da região 5' destas sequências permitiu identificar motivos de seis nucleotídeos com os padrões TATAAT ou TAAAAT na distância de 5-8 nucleotídeos do sítio de início da transcrição em 21 dos 23 genes estudados. Dessa forma, foi determinada a sequência consenso TATAAT, que é idêntica a sequência canônica do elemento promotor -10 do fator σ^{70} . Também foi observada conservação considerável de bases com o elemento -10 estendido de bactérias gram-positivas e sequências A-T ricas à montante do elemento -10, que possivelmente estariam relacionadas ao elemento promotor UP. No entanto, nenhum padrão conservado relacionado ao elemento -35 foi identificado.

Quanto a organização gênica de *M. hyopneumoniae*, foi demonstrado que os genes desta bactéria estão organizados preferencialmente em unidades transcricionais (UT) (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Na linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae* foram detectadas 116 UTs contendo entre duas e 29 ORFs e 33 mRNAs monocistrônicos (mC), este último compreendendo apenas 5% das ORFs. Estes dados sugerem que independentemente do tamanho da região intergênica, genes adjacentes localizados na mesma fita de DNA (ou seja, com a mesma orientação) e sem genes na fita oposta, seriam transcritos em uma única molécula de RNA. Estes dados foram confirmados experimentalmente para 21 UTs, mostrando que os genes são expressos conjuntamente. Entretanto, também se constatou que algumas ORFs dentro da UTs podem ser expressas independentemente, não sendo necessário a expressão de toda a unidade

transcricional. Isto pode ser explicado pela presença de promotores internos em frente a várias ORFs dentro das unidades de transcrição (WEBER *et al.*, 2012). Esta característica também ocorre em *M. pneumoniae* onde foi demonstrada a presença de suboperons dentro de um operon maior (GÜELL *et al.*, 2009).

1.4. Terminadores da transcrição em bactérias

A etapa de término da transcrição é essencial para a expressão correta de genes bacterianos e em muitos casos para a regulação da expressão gênica. A terminação da transcrição é controlada por muitos fatores em procariotos. A sequência de DNA molde, a estrutura do transcrito e a ação de proteínas acessórias possuem um papel determinante na eficiência deste processo (NUDLER & GOTTESMAN, 2002). Os sinais de término da transcrição induzem a dissociação do transcrito nascente e da RNA polimerase causando o fim da transcrição. Dois tipos de terminadores transcricionais bacterianos são conhecidos: terminador fator-independente e terminador fator-dependente.

Os terminadores fator-dependentes não dependem unicamente da sequência do DNA para terminar a transcrição. Eles requerem a presença de uma RNA helicase, o fator acessório Rho, sendo por isso também conhecido como terminador Rho-dependente. A terminação mediada por Rho pode ser dividida em três etapas: (1) ligação ao RNA e ativação da atividade translocase; (2) translocação do RNA através de Rho; e (3) pausa do complexo de alongamento no sítio de terminação. Na primeira etapa, Rho se liga a uma região do RNA rica em citosinas, sítio *rut* (do inglês ***Rho utilization sites***), e ativa sua atividade de translocação (RICHARDSON, 2003). Na segunda etapa o RNA é translocado no sentido 5'→3' através da cavidade central da Rho por meio da hidrólise de ATP (CIAMPI, 2006). Na última etapa, Rho causa a liberação do RNA em sítios de parada da RNAP através da interrupção do complexo de alongamento (MORGAN *et al.*, 1984). Entretanto, nem todos os sítios de parada da RNAP funcionam como sítios de término da transcrição (YUZENKOVA *et al.*, 2008). Alguns sítios de pausa, como o *his*, causam a inibição da terminação por Rho (KLEIN *et al.*, 2011). A complexidade demonstrada por este sistema torna complicada a predição de

sítios de terminação Rho-dependentes baseados somente na sequência de nucleotídeos.

Os terminadores fator-independente, ou também chamados terminadores intrínsecos, resultam na dissociação do complexo de alongamento da transcrição causada somente por interações do DNA e RNA com a RNAP sem a necessidade de reguladores transcricionais auxiliares. Entretanto, proteínas acessórias, como NusA, podem aumentar a eficiência do processo de terminação (SCHMIDT & CHAMBERLIN, 1987). Os terminadores intrínsecos possuem um modelo canônico definido em *E. coli*, sendo caracterizados por uma sequência de DNA com elemento palindrômico rico em guanina e citosina seguido por uma cauda de timinas (CARAFA *et al.*, 1990). No RNA esta sequência forma um grampo estável seguido por 7-9 resíduos de uridina (cauda poli-U). O término da transcrição em resposta a terminadores intrínsecos ocorre em quatro etapas: (1) inicialmente ocorre uma pausa da transcrição induzida pela cauda poli-U, esta parada interrompe a adição de nucleotídeos ao RNA permitindo que uma estrutura secundária em forma de grampo do terminador seja formada; (2) a estrutura do grampo é formada através da ligação das bases complementares do RNA. A velocidade deste processo vai depender das características da sequência (complementariedade de bases e tamanho do alça); (3) o grampo formado causa a desestabilização do complexo de alongamento da transcrição; (4) e, finalmente, a cauda poli-U promove a liberação do RNA nascente devido ao híbrido fraco que forma com o DNA (PETERS *et al.*, 2011).

O tipo e a frequência de cada tipo de terminador varia entre as espécies. Em *E. coli* terminadores Rho-dependentes causam o final da transcrição em aproximadamente 20% dos RNAs, incluindo RNAs não-codificantes que estariam regulando a transcrição (PETERS *et al.*, 2009). Em *B. subtilis* ocorre a presença da proteína Rho, mas ela não é essencial para esta bactéria, sugerindo que outros tipos de terminação possam substituir este mecanismo (CIAMPI, 2006). Entretanto, muitas bactérias não possuem um homólogo do gene *rho*, sugerindo que o término da transcrição deve ocorrer por terminadores intrínsecos. Entre estes organismos estão todas as espécies de

Mollicutes e algumas de *Lactobacilli*, *Cyanobacteria* e *Streptococcus* (MITRA *et al.*, 2009).

Os terminadores intrínsecos parecem ser um mecanismo de terminação da transcrição presente em todas as espécies bacterianas (MITRA *et al.*, 2011). Este mecanismo foi bem caracterizado em *E. coli*, onde está presente em aproximadamente 80% dos RNAs (PETERS *et al.*, 2009). Os terminadores de *E. coli* são utilizados como o modelo canônico de um terminador intrínseco. Porém, hoje se sabe que este modelo de terminador não é universal entre os procariotos. Terminadores intrínsecos podem possuir divergências consideráveis entre suas estruturas, posicionamento e prevalência entre procariotos. Terminadores atípicos, sem a presença de cauda poli-U, mantêm a eficiência do processo de terminação (UNNIRAMAN *et al.*, 2001; INGHAM *et al.*, 1995) e se mostraram predominantes no genoma de 13 diferentes espécies de *Mycobacterium* (MITRA *et al.*, 2008). Por meio da análise de 378 genomas de diferentes espécies, Mitra *et al.* (2009) demonstraram que diferentes filos bacterianos apresentam preferência por tipos diferentes de terminadores intrínsecos. Esta propensão parece estar correlacionada com características como o conteúdo de G+C no genoma e a presença do fator Rho. Dessa forma, a história evolutiva de cada espécie seria a responsável por determinar o tipo de terminador que ela possui.

1.4.1. Terminadores da transcrição em micoplasmas

Os processos envolvidos na terminação da transcrição em micoplasmas ainda não estão completamente estabelecidos. A terminação Rho-dependente parece não ocorrer em micoplasmas devido a ausência do gene *rho* (MITRA *et al.*, 2009) e o papel de terminadores intrínsecos em micoplasmas é controversa na literatura. Inicialmente se acreditava que este tipo de terminação não ocorria em micoplasmas, entretanto trabalhos mais recentes demonstraram a ocorrência de terminadores intrínsecos nestes microrganismos.

Os primeiros estudos para predição *in silico* de terminadores, baseados no cálculo de energia livre em torno dos códons de terminação, sugeriam que

micoplasmas não possuem terminadores intrínsecos. Washio *et al.* (1998), sugeriam que não ocorre a formação de estruturas de terminadores Rho-independente (intrínsecos) em *Mycoplasma genitalium* e *M. pneumoniae* por meio da análise do valor de energia livre de estruturas terciárias de mRNA localizadas próximo ao códon de terminação da tradução de CDSs. Uma característica peculiar de micoplasmas, o genoma rico em A-T, faz com que esta metodologia não seja ideal para a predição de terminadores nestes organismos já que as estruturas secundárias formadas no RNA irão possuir altos valores de energia livre devido a ligação mais fraca entre uridinas e adeninas.

Com o desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática foi possível detectar a presença de terminadores intrínsecos em genomas com baixo conteúdo de G-C. Aplicando cálculos de estruturas secundárias, Hoon *et al.* (2005), propuseram que a terminação Rho-independente representa a principal forma de terminação da transcrição em *Mollicutes*, mostrando a presença de terminadores intrínsecos em *M. genitalium* e *M. pneumoniae*, apesar dos grampos formados possuírem valores de energia livre de Gibbs maiores que terminadores determinados em espécies modelo, como *E. coli*. A presença de terminadores intrínsecos também foi demonstrada por meio do programa TransTermHP, que prediz terminadores por meio da estrutura secundária e da presença de uma cauda poli-U, em 20% dos genes de *M. genitalium* e 24% dos genes de *M. pneumoniae* (KINGSFORD *et al.*, 2007). O programa WebGesTer permitiu detectar terminadores canônicos e não-canônicos (sem cauda de poli-U) identificando possíveis terminadores em várias espécies de micoplasmas, incluindo *M. hyopneumoniae* (MITRA *et al.*, 2011).

Estudos pontuais em alguns genes de micoplasmas também demonstraram a presença de terminadores intrínsecos. A presença de prováveis terminadores intrínsecos ao final dos operons P1 e MgPa, proteínas de superfície relacionadas a virulência, foi demonstrada em *M. genitalium* e *M. pneumoniae* respectivamente (INAMINE *et al.*, 1988; INAMINE *et al.*, 1989). Em *M. hyopneumoniae* foi determinado um possível terminador ao final do operon rRNA 16S-23S (TASCHKE & HERRMANN, 1986). A presença de uma sequência característica de terminadores foi identificada ao final do operon P65 de *M.*

pneumoniae e sugere que os genes deste operon sejam transcritos em uma única unidade transcricional (KRAUSE *et al.*, 1997). Halbedel *et al.* (2007) mostraram a ocorrência de um terminador putativo ao final do gene *ldh* de *M. pneumoniae*.

Também já foi demonstrado pontualmente o papel funcional de terminadores intrínsecos em micoplasmas. Waldo III *et al.* (1999) analisando a transcrição do gene *hmw*, de *M. pneumoniae*, confirmaram, pela técnica de RT-PCR, a função dos grampos de terminação preditos que flanqueiam a unidade de transcrição do gene *hmw*. Em *M. genitalium*, através de qRT-PCR, Benders *et al.* (2005) demonstraram o término da transcrição ao final do operon *ftsZ* por meio de um terminador intrínseco. Em *M. agalactiae* foi determinada a presença de terminador funcional para o gene *vmpaU* dentro do *loci vmpa*, relacionado a expressão de lipoproteínas de superfície (CHOPRA-DEWASTHALY *et al.*, 2008).

Estas evidências sugerem que os terminadores intrínsecos sejam a principal forma de terminação em micoplasmas. Entretanto, o mecanismo de funcionamento do final da transcrição rho-independente em micoplasma ainda não está esclarecido. Gardner & Minion (2010) demonstraram a ocorrência de transcritos na região intergênica entre algumas CDSs de *M. hyopneumoniae*. Isto sugere que o final abrupto da transcrição poder ocorrer em micoplasmas, mas o que parece ocorrer com mais frequência é o desligamento gradual da maquinaria de transcrição.

Devido às peculiaridades nos genomas de micoplasmas, estudos de predição de terminadores são particularmente difíceis de serem realizados. Entretanto, novos programas computacionais e bancos de dados disponíveis tornaram plausível a busca por terminadores em genomas ricos em A-T. Até o momento, não existe um claro entendimento de como ocorre a regulação da expressão gênica em *Mycoplasma* sp., bem como, de que maneira a transcrição gênica tem fim nestas bactérias. Portanto, a definição e comprovação funcional de terminadores pode ajudar a compreender o mecanismo de regulação gênica em micoplasmas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo determinar a presença de terminadores intrínsecos da transcrição em *M. hyopneumoniae*.

2.2 Objetivos Específicos

Realizar a predição *in silico* de sequências de terminação intrínsecas no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448.

Comprovar a funcionalidade dos terminadores preditos no término da transcrição.

Avaliar a importância de terminadores intrínsecos em *M. hyopneumoniae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Identificação de terminadores da transcrição em *M. hyopneumoniae*

Para a identificação de terminadores da transcrição no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, foi utilizada, como base de dados, a anotação depositada no *GenBank* (NC_007332).

O delineamento metodológico utilizado para a busca de terminadores foi baseado em análises realizadas tanto *in silico* como experimentais. Para a validação de uma estrutura considerada como terminador foram realizadas diferentes etapas de seleção exemplificadas na Figura 3.1. As análises *in silico* serviram para identificar e classificar os terminadores em diferentes classes, denominadas de t_{c1} , t_{c2} , t_{c3} e t_{c4} , de acordo com critérios estabelecidos durante este trabalho. A etapa experimental foi utilizada para realizar a comprovação de atividade funcional dos terminadores preditos.



Figura 3.1: Identificação de terminadores da transcrição. Esquema ilustrando o delineamento metodológico utilizado para a validação dos terminadores.

3.2. Análise *in silico*

3.2.1. Predição de terminadores

Para a predição *in silico* de terminadores no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 foram utilizados os programas TransTermHP (KINGSFORD *et al.*, 2007), WebGesTer (MITRA *et al.*, 2011) e ARnold (NAVILLE *et al.*, 2011). Os terminadores preditos foram denominados de acordo com o programa responsável pela sua predição, por meio da utilização da letra inicial do programa e um número de identificação, por exemplo, t_{001} para o primeiro terminador do

programa TransTermHP. Os terminadores wf correspondem aos terminadores considerados “fracos” pela predição pelo programa WebGesTer.

3.2.2. Classificação dos terminadores

Os terminadores preditos foram analisados e classificados por meio das informações como o posicionamento no genoma, contexto gênico em que ocorrem, valor de energia livre de Gibbs do grampo formado e sequência de nucleotídeos (Figura 3.2).

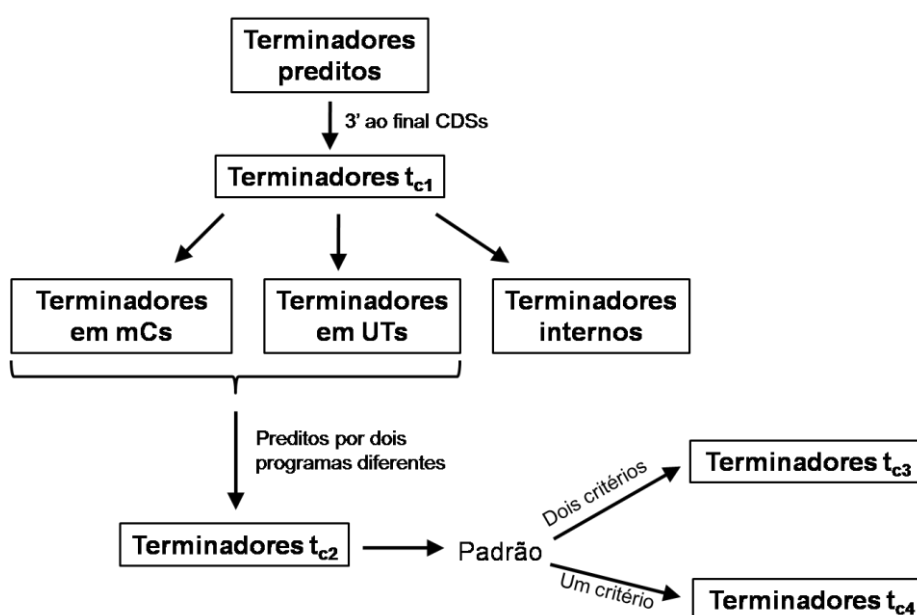


Figura 3.2. Etapas de classificação dos terminadores. Esquema ilustrando os critérios utilizados para classificação de cada uma das classes de terminadores.

O primeiro critério de seleção utilizado considerou a localização dos terminadores no genoma de *M. hyopneumoniae*. Com o uso do *software Artemis Release 13.0* (RUTHERFORD *et al.*, 2000) foi realizado o mapeamento manual de todos os terminadores no genoma. Os terminadores localizados na região 3' ao final de cada CDS foram selecionados para formar os **terminadores classe t_{c1}**.

Posteriormente, os terminadores classe t_{c1} foram analisados considerando quais terminadores foram preditos por pelo menos dois programas diferentes. Estes terminadores foram então considerados confirmados e formaram os **terminadores classe t_{c2}**.

O terceiro critério utilizado levou em consideração as características do terminador. As características apresentadas pelos terminadores classe t_{c2} foram consideradas como padrão. As características avaliadas foram o valor de energia formado pelo grampo de terminação (ΔG) e a distância entre o terminador e o códon de terminação da proteína. Os terminadores t_{c1} foram analisados e aqueles em que estas características se equiparavam ao padrão também foram considerados válidos e nomeados **terminadores classe t_{c3}** .

Alguns terminadores só satisfizeram uma das características avaliadas. Os terminadores que se enquadraram somente dentro do valor de ΔG ou da distância do códon de terminação foram chamados **terminadores classe t_{c4}** .

3.3. Análise experimental

3.3.1. Cultivo de *M. hyopneumoniae* 7448

M. hyopneumoniae 7448, procedente da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), foi isolado de um suíno infectado em Lindóia do Sul, SC, Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 2005). O cultivo foi realizado em meio Friis Líquido (FRIIS, 1975), incubado a 37°C, sob agitação por 48 horas.

3.3.2. Isolamento de DNA e RNA

O DNA genômico de *M. hyopneumoniae*, cepa 7448, foi extraído a partir de 5 ml de cultivo conforme protocolo em anexo (Anexo A).

O RNA total desta cepa de *M. hyopneumoniae* foi isolado de culturas de 20 ml de meio utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo as descrições do fabricante, sendo ressuspendido em 20 μ l de água RNase-free (DEPC). A preparação de RNA total foi tratada com 1 U/ μ g DNase/RNase free (Promega) a 37°C por 30 minutos e posteriormente quantificada em sistema Qubit™ (Invitrogen). A integridade do RNA extraído foi avaliada através de

eletroforese em gel de agarose desnaturante e posteriormente, o RNA foi armazenado a -70°C.

3.3.3. Construção dos *primers*

Os *primers* foram projetados no programa *Vector NTI Advance 10* (Invitrogen), a partir da sequência de nucleotídeos da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* (número de acesso no *GenBank*: NC_007332). Para demonstrar a atividade dos terminadores foi utilizada uma metodologia similar a empregada para comprovar a função do terminador T1 de *Pseudomonas syringae* (ARREBOLA *et al.*, 2012). Para análise do terminador foram utilizados dois pares de *primers*. O *primer forward* foi sempre posicionado dentro da região codificante da CDS. Um dos *primers reverse* foi posicionado a montante do terminador. O outro *primer reverse* foi posicionado a jusante do terminador predito. A Figura 3.2 ilustra como foi feito o posicionamento dos pares de *primers* para validação do terminador utilizando como exemplo a UT_10. No total foram projetos e empregados nas análises 60 pares de *primers* (Apêndice 1).

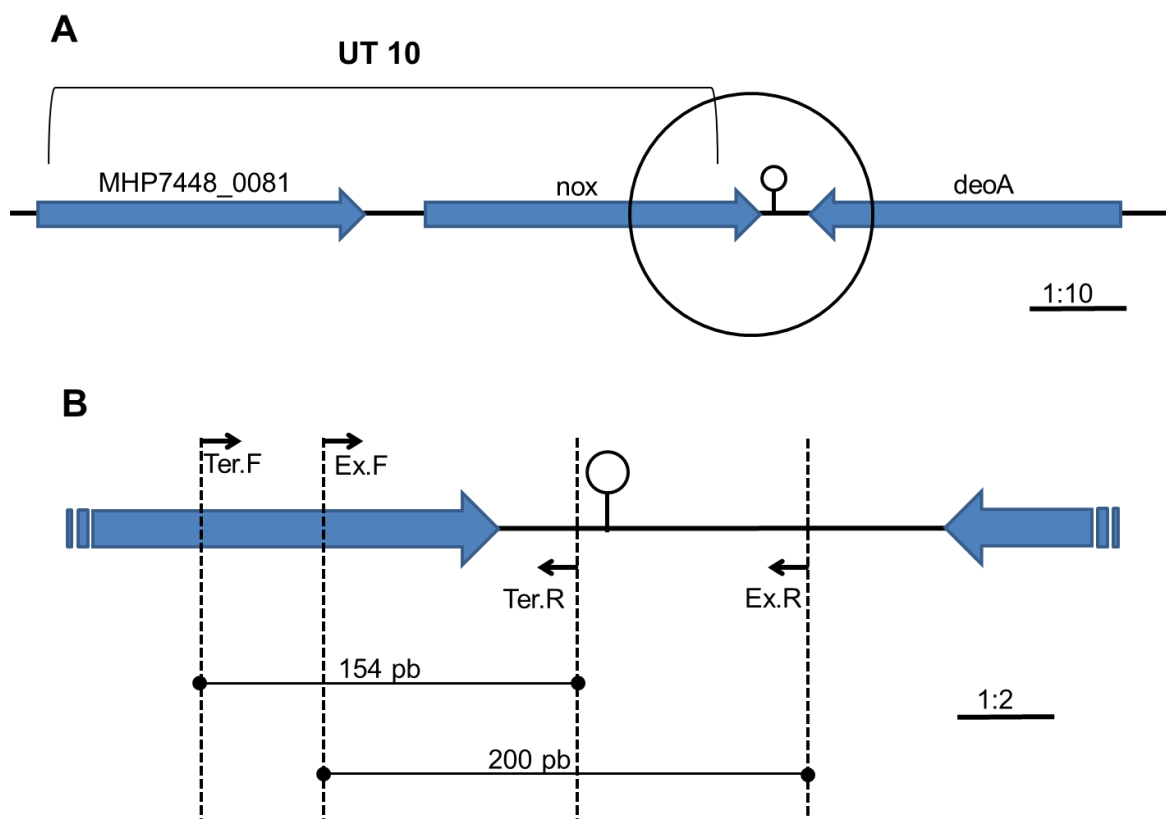


Figura 3.3. Representação esquemática da construção dos primers para validação dos terminadores por RT-PCR e qRT-PCR. A: Representação da unidade transcricional 10 e o terminador w_014 (grampo). **B:** Ampliação da região destacada na figura superior, com o posicionamento dos primers para validação do terminador (grampo). As setas pretas Ter.F, Ter.R, Ex.F e Ex.R correspondem aos primers *U.10.te.f*, *U.10.te.r*, *U.10.ex.f* e *U.10.ex*, respectivamente. Os nomes dos primers significam: “Ter” – terminador; “Ex” – externo; “F” – forward e “R” – reverse.

3.3.4. Amplificação de mRNA

3.3.4.1. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada em uma reação com volume final de 14 μ l, contendo 1 μ g de RNA total e 1 μ l de *primer reverse* específico (10 pmoles) sendo incubada a 70°C por 5 minutos e rapidamente transferida para o gelo. Posteriormente, foram adicionados à reação 5 μ l de 5X Tampão de reação (250 mM Tris-HCl - pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 5 μ l da mistura de dNTPs (10 mM) e 1 μ l (200 U) da enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (Promega). A reação foi incubada inicialmente a 37°C por 60 minutos e posteriormente, a 70°C por 15 minutos para ser inativada. Como controle da qualidade do RNA total, uma reação contendo os

mesmos componentes exceto a enzima M-MLV RT foi realizada concomitantemente. O cDNA gerado, armazenado a -20°C, foi utilizado como molde nas reações de PCR.

3.3.4.2. Amplificação do cDNA por PCR

As reações foram preparadas utilizando, 16,05 µl de água ultrapura, 2,5 µl de tampão de enzima 10X (100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM KCl), 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 2 µl de dNTP (1 mM), 1 µl de cada *primer* (10 pmoles), 0,2 µl de enzima GoTaq DNA polimerase (5 U/µl) (Promega) e 1 µl de molécula molde, totalizando 25 µl de reação de PCR. Para cada par de *primers* foram realizadas quatro reações (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Descrição das reações de amplificação para cada par de *primers*

	Molde	Objetivo
RT-PCR +	cDNA	Confirmar a ocorrência de transcrição.
RT-PCR -	cDNA sem adição de M-MLV RT	Controle da qualidade do RNA.
PCR +	DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i>	Controle positivo da amplificação e qualidade dos <i>primers</i> e reagentes.
PCR -	Água ultrapura	Controle da reação de PCR.

As condições de amplificação variaram para cada reação, de acordo com a temperatura média de anelamento (T_m) dos *primers*, bem como com o tamanho esperado para o produto (Apêndice A), sendo realizadas no termociclador TC-3000 (Techne). No geral, as condições de amplificação consistiram de uma etapa inicial de desnaturação da fita dupla do DNA a 94°C por cinco minutos, 35 ciclos compostos de três etapas para a amplificação do cDNA (30 segundos a 94°C, 30 segundos a temperatura de acordo com as características de cada par de *primer* e 60 segundos a 72°C) e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

3.3.4.3. Amplificação do cDNA por qRT-PCR

Nas reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi usado o aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e o sistema Platinum® SYBER® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). As reações foram realizadas em um volume final de 15 µl, contendo 1 µl de cDNA diluído (1:4), 1 µl de cada *primer* (10 pmoles) e 7,5 µl de Platinum® SYBER®. As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação por dois minutos a 90°C seguida de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 50°C (anelamento e alongação). Uma análise da curva de desnaturação foi programada para o fim da corrida de PCR. As linhas de corte (*threshold*) foram determinadas manualmente em uma região correspondendo à faixa linear da curva de amplificação logarítmica. Para calcular a expressão relativa dos mRNAs foi usado o método $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

4. RESULTADOS

4.1. Análise *in silico*

4.1.1. Predição de terminadores

Com o objetivo de aumentar a probabilidade de detecção de terminadores foram utilizados três programas computacionais, que possuem diferentes estratégias para determinação de um terminador. No total foram preditos 1068 possíveis terminadores no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, sendo 439 pelo programa ARNold, 334 pelo programa TranTermHP e 295 pelo WebGesTer (Tabela 4.1). Foi criado um banco de dados contendo as informações destes terminadores, como o posicionamento no genoma, valor de energia do grampo formado e sequência de nucleotídeos, que foram utilizadas para realizar a análise dos terminadores nas etapas seguintes do trabalho.

Tabela 4.1. Terminadores preditos e classificação dos terminadores classe t_{c1}

	WebGesTer	TransTerm	ARNold	Total
Terminadores preditos	295	334	439	1068
Terminadores classe t_{c1}	278	192	86	556
Terminadores em UTs	143	73	39	255 (46%)
Terminadores em mCs	40	20	5	65 (12%)
Terminadores internos	95	99	42	236 (42%)

4.1.2. Localização no genoma

Os terminadores preditos foram mapeados no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448. Somente aqueles que se localizavam na região 3' ao final das CDSs foram selecionados e formaram os **terminadores classe t_{c1}** (Apêndice 2). No total 556 terminadores se enquadraram nesta categoria, correspondendo a 52% dos preditos (Tabela 4.1). Os terminadores que não satisfizeram este critério foram considerados falso-positivos, pois se localizavam dentro de regiões codificantes ou estavam posicionados na fita antisense.

Posteriormente, os terminadores classe t_{c1} foram classificados de acordo com o contexto gênico em que eles ocorrem. Para isto foi utilizada a organização gênica de *M. hyopneumoniae* 7448 proposta por Siqueira *et al.*

(2011), que demonstra a presença de 116 unidades transcricionais (UTs) e 33 genes monocistrônicos (mCs). A Figura 4.1 mostra a organização de uma região de 90 kb do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448. Dos 556 terminadores, 65 se encontram ao final de genes monocistrônicos, 255 no final de unidades transcricionais e 236 em genes que se encontram dentro das unidades transcricionais (Tabela 4.1).

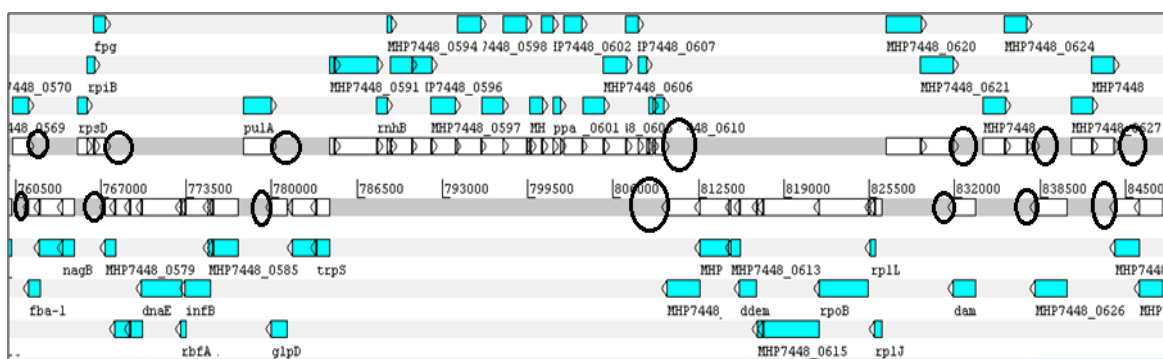


Figura 4.1. Organização gênica em *M. hyopneumoniae*. Representação da organização gênica da região localizada na posição 757294 a 848095 do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448. A procura por terminadores foi realizada nas regiões demarcadas pelos círculos pretos, que representam o final das UTs e mCs.

De acordo com esta classificação, todos os 33 genes monocistrônicos e 106 das 116 unidades transcricionais possuem um terminador classe t_{c1} (Apêndice 3 e 4). Quando analisado o número total de genes, apenas 258 dos 678 genes (38%) possuem terminador classe t_{c1} . Isto sugere que os terminadores parecem ocorrer preferencialmente após mCs e UTs. Devido a isto, para facilitar a validação dos terminadores, foram considerados apenas terminadores localizados ao final de mCs e UTs.

4.1.3. Confirmação dos terminadores

Nesta etapa de seleção foram considerados apenas os terminadores classe t_{c1} ao final de mCs e UTs. A fim de realizar a confirmação dos terminadores foi analisada a característica dos terminadores.

O primeiro critério analisado foi a confiabilidade dos dados gerados. Foi definido que para um terminador ser considerado como confirmado ele precisaria ser predito na mesma posição por pelo menos dois programas diferentes. Os

terminadores que satisfizeram este critério foram confirmados e chamados **terminadores classe t_{c2}** . A Figura 4.2 demonstra a confirmação da presença de um terminador após a UT_10, onde ocorre a presença de terminadores preditos na mesma posição pelos programas WebGesTer e TransTermHP após o gene *nox*.

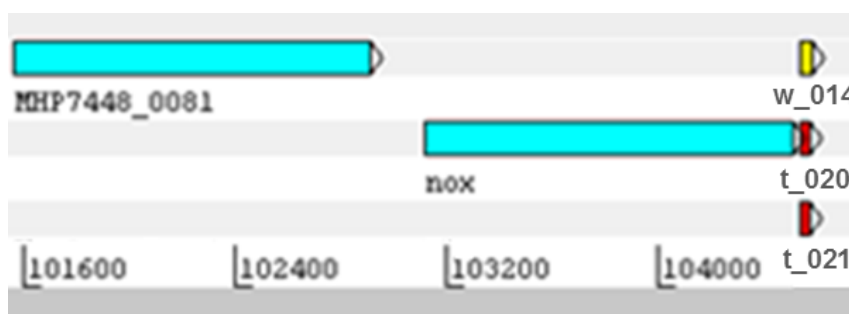


Figura 4.2. Organização da unidade transcripcional 10 em *M. hyopneumoniae* 7448. Esta unidade é composta pelos genes *MHP7448_0081* e *nox*, que são transcritos em um único mRNA. Ao final desta unidade foi predito três terminadores diferentes na mesma região, divergindo apenas poucos pares de bases entre eles. Os terminadores em vermelho foram preditos pelo programa TransTermHP e em amarelo pelo WebGesTer.

Por meio deste critério foram identificados terminadores classe t_{c2} em 7 das 33 mCs e em 39 das 116 UTs (Tabela 4.2). Apesar deste resultado confirmar a presença de terminadores em somente 21% das mCs e 34% das UTs ele demonstra a ocorrência de terminadores intrínsecos da transcrição em *M. hyopneumoniae* 7448.

Tabela 4.2. Presença de terminadores em mCs e UTs de *M. hyopneumoniae*.

	mC	UT
Classe t_{c2}	7 (21%)	39 (34%)
Classe t_{c3}	14 (43%)	36 (31%)
Classe t_{c4}	6 (18%)	11 (9%)
Sem terminador	6 (18%)	30 (26%)
Total	33	116

Para caracterizar o padrão dos terminadores de *M. hyopneumoniae* 7448 foram analisados os dados dos terminadores classe t_{c2} . Foram avaliadas 3 características utilizadas para definição de terminadores. A primeira foi analisar a distância entre o início do terminador e o códon de terminação da proteína do

gene alvo, a fim de determinar se o terminador possui um papel funcional. Em seguida foi verificada a estabilidade do grampo de terminação por meio do valor de energia livre de Gibbs (ΔG) de cada terminador. Por último foi considerada a ocorrência da presença de uma cauda poli-U ao final do grampo de terminação.

A Figura 4.3 mostra as características dos terminadores t_{c2} . Foi verificado que grande parte dos terminadores ficou a uma distância entre -11 a 200 pb do códon de terminação da proteína do gene alvo. Dois terminadores tiveram uma distância maior que 230 pb. Estes dois terminadores ocorrem nas unidades transcricionais 09 (*fusA*) e 114 (*MHP7448_r2*). No entanto, nestas duas unidades também foram verificados outros terminadores t_{c2} mais próximos do códon de terminação da proteína. Na UT_09 ocorre um terminador a 39 pb do gene *fusA* e na UT_114 tem a presença de um terminador a 167 pb do gene *MHP7448_r2* (Apêndice 2). Isto sugere que o terminador mais distante funcione como um terminador alternativo e por isso se localizaria a mais de 200 pb do final do gene alvo. Em relação ao valor de ΔG os terminadores confirmados tiveram valores que se concentraram na faixa de -11 a -4 kcal/mol. Apesar destes valores de ΔG serem relativamente altos, eles se justificam em razão do baixo conteúdo de GC no genoma de micoplasmas. A cauda poli-U após o grampo de terminação não foi encontrada em todos os terminadores confirmados, demonstrando que ela não é essencial em terminadores de micoplasmas (dado não mostrado).

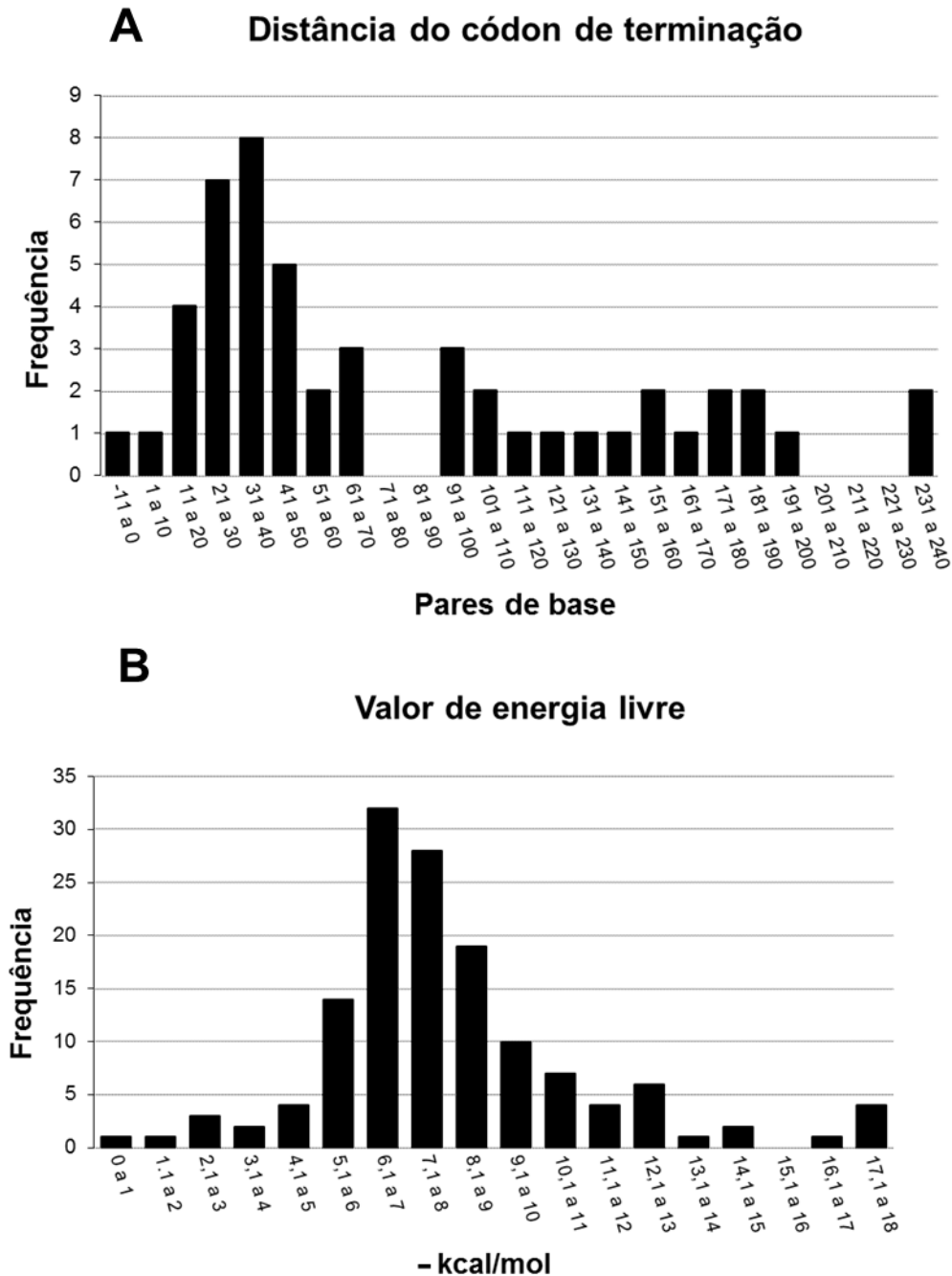


Figura 4.3. Características dos terminadores classe t_{c2} . Os gráficos mostram a distribuição dos terminadores classe t_{c2} dentro de faixas de distância (A) e de valores de energia livre de Gibbs (B). As distâncias negativas indicam sobreposição com o final do gene.

Após esta análise, o padrão definido para um terminador intrínseco de *M. hyopneumoniae* 7448 foi estar a uma distância entre -11 a 200 pb do gene alvo e possuir um valor de ΔG menor que -4 kcal/mol. Este padrão foi utilizado para refinar os dados a fim de aumentar o número de mCs e UTs com terminadores confirmados. Para isto foram analisados os terminadores t_{c1} de mCs e UTs. Os

terminadores que se enquadraram dentro do padrão definido anteriormente também foram considerados confirmados. Estes terminadores foram chamados de **terminadores classe t_{c3}**. Por este critério foram identificados terminadores t_{c3} em 14 das 33 mCs (43%) e em 36 das 116 UTs (31%), como mostrado na Tabela 4.2, aumentando o número de mCs e UTs com terminadores confirmados.

Alguns terminadores só satisfizeram um dos critérios do padrão. Por exemplo, o terminador wf_202 da UT_98 se localiza a 52 pb do códon de terminação da proteína do gene *fpg* (final da UT). Porém, este terminador tem um ΔG de -2,53 kcal/mol. Este valor de ΔG não se enquadra dentro do que foi definido como padrão, mas está próximo dele. Os terminadores que satisfizeram apenas um dos critérios e no outro possuía valores próximos ao ideal, como o exemplo citado, foram agrupados em uma nova categoria chamada **terminadores classe t_{c4}**. Estes terminadores foram considerados como plausíveis de confirmação. A sua confirmação, no entanto, foi feita por meio da análise experimental realizada em uma etapa posterior deste estudo. A Tabela 4.2 mostra que foram encontrados terminadores desta categoria em 6 mCs e 11 UTs de *M. hyopneumoniae* 7448.

A procura por terminadores direcionada à organização gênica em mCs e UTs que ocorre em micoplasmas se mostrou uma abordagem satisfatória. Foi confirmada a presença de terminadores, classes t_{c2} e t_{c3}, em 21 mCs e em 75 UTs, o que representa 63,6% do total de mCs e 64,6% das UTs. Estes números foram posteriormente elevados com a validação experimental dos terminadores da classe t_{c4}.

4.2. Validação experimental de alguns terminadores preditos

Com o objetivo de validar os terminadores preditos na análise *in silico* e determinar se possuem atividade funcional em *M. hyopneumoniae* 7448 foi avaliada a presença de transcritos na região de final da transcrição por meio de metodologias que determinam o nível de expressão gênica. Para cada terminador analisado foram construídos dois pares de *primers*, como descrito na metodologia. O *primer forward* sempre foi posicionado dentro da região

codificante do gene analisado. Para avaliar a atividade funcional o *primer reverse* foi posicionado em duas regiões distintas. Um *primer reverse* foi posicionado junto ao início terminador para demonstrar que ele estava sendo transcrito, ou seja, que o grampo de terminação estava sendo formado. O outro *primer reverse* foi posicionado imediatamente após o terminador. Um resultado negativo nesta segunda reação demonstra o final da transcrição, que estaria ocorrendo possivelmente pela atividade funcional do terminador.

4.2.1. RT-PCR

A definição experimental da atividade funcional dos terminadores transcricionais foi realizada inicialmente pela RT-PCR, através da amplificação dos fragmentos a partir de transcritos isolados de *M. hyopneumoniae* 7448. Com a utilização desta metodologia foram analisados 15 terminadores, sendo 4 da classe t_{c2} , 1 da classe t_{c3} e 10 da classe t_{c4} . Os terminadores analisados são mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Terminadores avaliados experimentalmente por RT-PCR

Terminador	Validação ¹	Localização	Classe	Gene ²	Distância ³ (pb)	ΔG
w_053	Não	mC_15	t_{c3}	pyrG	82	-5,01
wf_491	Sim	mC_28	t_{c4}	pdhD-1	193	-4,51
wf_204	Não	mC_30	t_{c4}	pulA	131	-2,48
w_202	Não	mC_31	t_{c4}	dam	195	-4,69
wf_513	Sim	mC_33	t_{c4}	gcp	190	-4,36
w_014	Sim	UT_010	t_{c2}	nox	39	-7,08
wf_075	Não	UT_036	t_{c4}	rpsT	-9 ⁴	-3,94
w_147	Não	UT_039	t_{c4}	lip	181	-4,76
wf_375	Sim	UT_060	t_{c4}	glpF	29	-2,22
wf_137	Sim	UT_066	t_{c4}	metG	149	-3,21
w_076	Não	UT_085	t_{c2}	pdhD	37	-9,01
t_264	Sim	UT_089	t_{c2}	tuf	34	-7,5
wf_202	Sim	UT_098	t_{c4}	fpg	52	-2,53
wf_215	Sim	UT_103	t_{c4}	MHP7448_0621	198	-3,11
w_102	Sim	UT_113	t_{c2}	MHP7448_0665	43	-11

¹ – Presença de atividade funcional de acordo com o experimento de RT-PCR.

² – Corresponde ao gene ao final das unidades transcricionais.

³ – Distâncias entre o códon de terminação da proteína do gene alvo e o início do terminador.

⁴ – A distância negativa representa sobreposição de 9 bases entre o final do gene e o início do terminador.

A confirmação experimental de um terminador classe t_{c2} após a UT_10 é demonstrada na Figura 4.4. Esta unidade transcricional é composta pelos genes *MHP7448_0081* e *nox*. Ao final do gene *nox* foram identificados 3 terminadores classe t_{c2} . Para a análise experimental foi considerado o terminador w_014 (Figura 4.2 em amarelo). A estrutura deste terminador é formada por uma haste de 11 nucleotídeos, com apenas 1 *mismatch*, uma alça de 3 nucleotídeos e ao final da estrutura ocorre a presença da cauda poli-U (Figura 4.4 A). O terminador w_014 está localizado a 39 pb do códon de terminação do gene *nox* e possui um ΔG de -7,08 kcal/mol. A Figura 4.4 B representa a análise realizada dos produtos gerados após a amplificação. A amplificação da região do *primer* junto ao terminador demonstra que o terminador está sendo transcrito (Figura 4.4 B, canaleta 3). Já o segundo par de *primers*, posicionado após o terminador, não apresentou transcritos na reação do cDNA (canaleta 7). Isto sugere que o término da transcrição ocorre devido à atividade do terminador w_014.

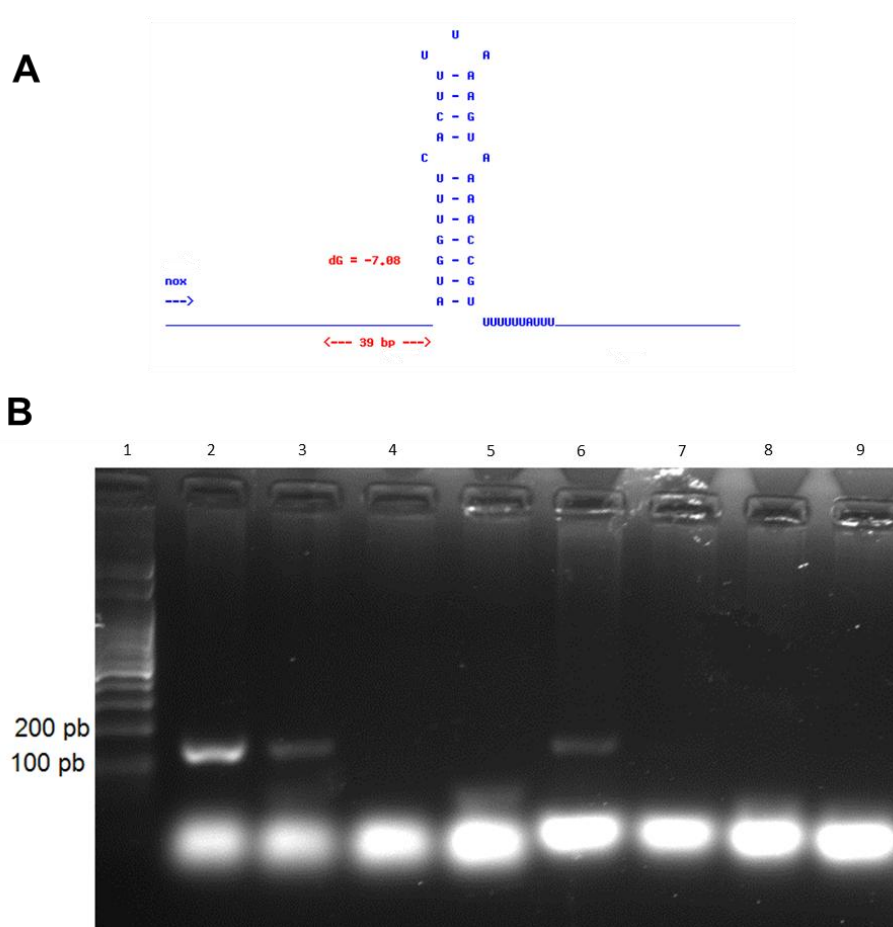


Figura 4.4. Confirmação experimental do terminador w_014 da UT_10. A: Estrutura e características do terminador w_014 predito pelo programa WebGesTer. **B:** Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o resultado da RT-PCR do terminador da UT_10. Os produtos da amplificação visualizados nas canaletas 1 e 3 representam os resultados das

reações de RT-PCR e PCR, respectivamente. A canaleta **1** contém o marcador Ladder 100pb. As canaletas **2,3,4 e 5** representam as reações com *primer* do terminador, sendo reações com DNA, cDNA positivo, cDNA negativo e controle negativo, respectivamente. As **6,7,8 e 9** são as reações com o *primer* após o terminador, seguindo a mesma ordem da sequência anterior.

A análise dos terminadores confirmados, classes t_{c2} e t_{c3} , foram realizadas para validar os dados obtidos *in silico*. Em 3 dos 5 terminadores confirmados foi possível visualizar o final da transcrição após o terminador (Tabela 4.3). Este dado mostra que os terminadores transcrpcionais possuem papel funcional em micoplasmas. Entretanto, dois terminadores apresentaram transcritos após o terminador. Nossa hipótese é que estes terminadores causaram apenas uma diminuição no nível de transcrição, sem que ocorresse o desligamento total da maquinaria de transcrição. Para confirmar esta hipótese foi necessário realizar a quantificação do nível de expressão gênica por meio de qRT-PCR.

Em relação aos terminadores da classe t_{c4} , a análise experimental se mostra necessária, pois não puderam ser confirmados por meio das análises *in silico*. Para isto, foram analisados todos os terminadores t_{c4} em que foi possível construir *primers* que se encaixavam dentro da metodologia utilizada no RT-PCR. Foi confirmado o papel funcional de 6 terminadores t_{c4} , por apresentarem uma diminuição na quantidade de transcritos após o terminador (Tabela 4.3).

4.2.2. Análise do nível de transcrição por qRT-PCR

A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi a metodologia utilizada para avaliar o nível de expressão nas regiões de término da transcrição. Desse modo, esta técnica permite validar os terminadores em que ocorre o final da transcrição e também avaliar a hipótese levantada anteriormente, de que em alguns terminadores de micoplasmas a transcrição gênica é apenas diminuída após o terminador. Para isto foram analisados todos os terminadores classes t_{c2} , t_{c3} e t_{c4} em que foi possível construir *primers* que se enquadrassem nas características da metodologia de qRT-PCR. Ao total foram avaliados 16 terminadores, sendo 8 da classe t_{c2} , 7 da classe t_{c3} e 1 da classe t_{c4} . Os terminadores analisados são demonstradas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Terminadores avaliados experimentalmente por qRT-PCR

Terminador	Validação ¹	Localização	Classe ²	Gene	Distância ³ (pb)	ΔG
w_016	Não	mC_04	t _{c3}	rbgA	88	-6,06
w_053	Sim	mC_15	t _{c3}	pyrG	82	-5,01
w_082	Não	mC_24	t _{c3}	gyrA	75	-6,41
wf_204	Sim	mC_30	t _{c4}	pulA	131	-2,48
w_109	Sim	UT_009	t _{c2}	fusA	39	-17,8
t_022	Sim	UT_011	t _{c2}	deoA	119	-10
t_055	Sim	UT_020	t _{c2}	rpmB	49	-7,6
w_140	Sim	UT_031	t _{c3}	trmE	35	-7,81
w_055	Não	UT_047	t _{c3}	ugpQ	18	-8,9
a_207	Sim	UT_058	t _{c2}	hit	27	-5,8
t_173	Sim	UT_062	t _{c2}	MHP7448_0372	43	-9,4
wf_140	Sim	UT_068	t _{c3}	ruvB	42	-3,91
w_181	Sim	UT_077	t _{c3}	rplA	107	-6,19
a_310	Sim	UT_083	t _{c2}	MHP7448_0494	24	-5,12
w_093	Sim	UT_105	t _{c2}	MHP7448_0628	109	-8,35
w_102	Sim	UT_113	t _{c2}	MHP7448_0665	43	-11

1 – Presença de atividade funcional de acordo com o experimento de RT-PCR.

2 – Corresponde ao gene ao final das unidades transcricionais.

3 – Distâncias entre o códon de terminação do gene alvo e o início do terminador.

Para comparar os resultados obtidos pelas metodologias do RT-PCR com o qRT-PCR o terminador w_102 da UT_113 foi analisado pelas duas técnicas. Este terminador foi validado pela RT-PCR (Tabela 4.3) e também na qRT-PCR (Tabela 4.4). Como mostra a Figura 4.5, não foi detectada a presença de transcritos após o terminador, assim como no experimento anterior. Isto mostra que as duas metodologias podem ser utilizadas para validar a atividade funcional dos terminadores. A vantagem do qRT-PCR é ser uma técnica mais sensível, possibilitando identificar pequenas variações no nível de expressão gênica.

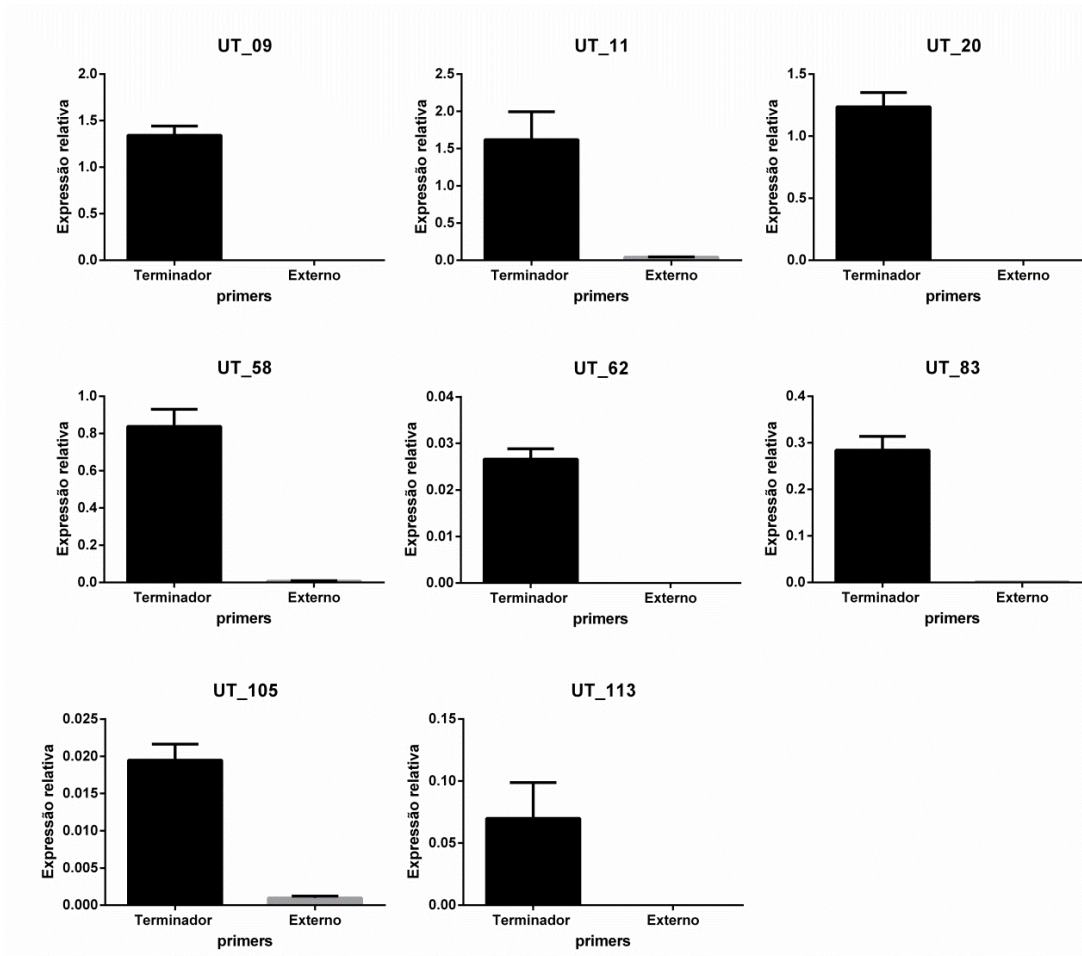


Figura 4.5. Análise do nível de expressão relativa por qRT-PCR dos terminadores classe t_{c2} . Os gráficos representam a análise do terminador presente em cada uma destas UTs. UT_09 terminador w_109, UT_11 terminador t_022, UT_20 terminador t_055, UT_58 terminador a_207, UT_62 terminador t_173, UT_83 terminador a_310, UT_105 terminador w_093, UT_113 terminador w_102. A coluna “Terminador” mostra o nível de expressão do *primer* posicionado junto ao terminador e a coluna “Externo” representa os dados do *primer* posicionado após o terminador. Os dados são apresentados como a média \pm SD a partir de três replicas biológicas.

A Figura 4.5 demonstra a análise dos terminadores classe t_{c2} . Todos os terminadores dessa classe tiveram uma diminuição significativa nos níveis de transcrição gênica após o terminador. Após os terminadores das unidades transcricionais 09, 20, 62, 83 e 113 não foi identificado a presença de nenhum transcrito, enquanto nas unidades transcricionais 11, 58, e 105 foram detectados níveis extremamente baixos de transcritos. Estes resultados mostram que está ocorrendo o término da transcrição após os terminadores. Considerando a validação experimental destes terminadores como amostragem do grupo de terminadores classe t_{c2} , consideramos que todos terminadores deste grupo possuem atividade funcional.

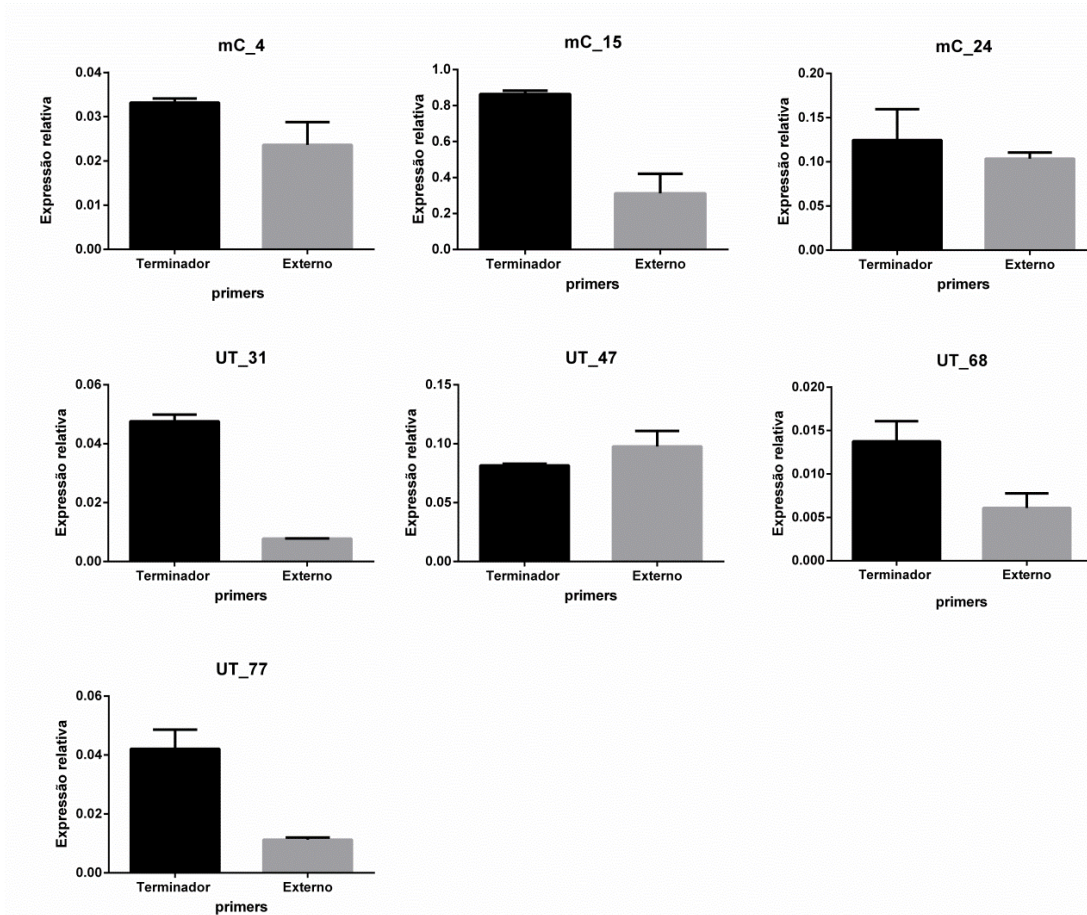


Figura 4.6. Análise do nível de expressão relativa por qRT-PCR dos terminadores classe t_{c3} . Os gráficos representam a análise do terminador presente em cada uma das mCs e UTs. mC_04 terminador w_016, mC_15 terminador w_053, mC_24 terminador w_082, UT_31 terminador w_140, UT_47 terminador w_055, UT_68 terminador wf_140, UT_77 terminador w_181. A coluna “Terminador” mostra o nível de expressão do *primer* posicionado junto ao terminador e a coluna “Externo” representa os dados do *primer* posicionado após o terminador. Os dados são apresentados como a média \pm SD a partir de três replicas biológicas.

Entre os terminadores classe t_{c3} o final da transcrição não demonstrou ser tão eficiente (Figura 4.6). Em nenhuma das unidades transcripcionais analisadas ocorreu a terminação da transcrição por completo. Apesar disso, em 4 das 7 regiões analisadas ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de transcrição após o terminador. Este dado foi encontrado após o gene monocistrônico *pyrG* (mC_15) e das unidades transcripcionais 31, 68 e 77. Estes dados mostram que a transcrição após estes terminadores esta diminuindo, porém não para completamente a síntese do RNA. Isto sugere que os terminadores classe t_{c3} possuam atividade funcional, mas que esta atividade é mais fraca comparada com os terminadores classe t_{c2} . Já para os terminadores das mCs 4 e 24 e da UT 47 não foi identificado papel funcional.

Em relação aos terminadores da classe t_{c4} foi possível a construção de *primers* para somente um dos terminadores que ainda não haviam sido validados pelo RT-PCR. O terminador wf_204 localizado após o gene monocistrônico *pulA* (mC_30) possui uma atividade funcional mais fraca, condizente com o que acontece nos terminadores t_{c3} validados. Isto porque foi identificado uma diminuição significativa nos níveis de transcritos após o terminador da mC_30, como mostrado na Figura 4.7.

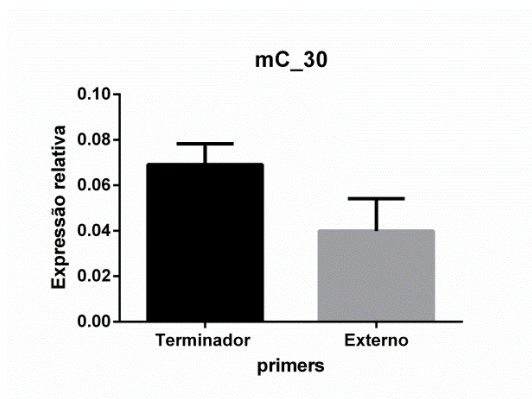


Figura 4.7. Análise do nível de expressão relativa por qRT-PCR dos terminadores classe t_{c4} . O gráfico representa a análise do terminador wf_204 presente na mC_30. A coluna “Terminador” mostra o nível de expressão do *primer* posicionado junto ao terminador e a coluna “Externo” representa os dados do *primer* posicionado após o terminador. Os dados são apresentados como a média \pm SD a partir de três replicas biológicas.

5. DISCUSSÃO

A comunidade científica tem empenhado inúmeros esforços para tentar entender os processos biológicos que ocorrem em micoplasmas devido as grandes perdas econômicas causadas pelas infecções por estes microrganismos. Além disso, o entendimento dos mecanismos biológicos de micoplasmas pode contribuir para o a determinação do conjunto de genes necessários para o estabelecimento de vida independente. A conclusão do sequenciamento de diversas espécies permitiu identificar alguns padrões entre os mecanismos que regulam e controlam a expressão gênica nesse gênero. Entre as características compartilhadas pelos micoplasmas estão: a presença de um genoma altamente reduzido com alto conteúdo de A+T, a existência de apenas uma subunidade sigma, um baixo número de genes envolvidos na transcrição, e a ausência de muitas rotas metabólicas (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

No entanto, apesar do grande número de genomas sequenciados, os mecanismos que controlam e regulam a expressão gênica em micoplasmas ainda não estão bem caracterizados. Apesar de micoplasmas possuírem um genoma reduzido e com poucas proteínas regulatórias, análises da expressão em nível transcricional mostraram que tanto estresses ambientais quanto metabólicos podem gerar respostas transcricionais específicas em micoplasmas (GÜELL *et al.* 2009). Isto sugere que elementos estruturais e funcionais no genoma possam estar regulando a transcrição. Estes elementos podem incluir promotores, terminadores, sítio de início de transcrição (TSS), ORF, UTs, regiões regulatórias não codificadoras e regiões não traduzidas (CHO *et al.*, 2009).

A identificação das regiões regulatórias no DNA é precária em micoplasmas, pois a predição *in silico* dessas sequências é dificultada em virtude das características peculiares do genoma destas bactérias (A+T rico). Já a predição *in vivo* apresenta problemas devido à ausência de metodologias que possibilitem tal estudo, como transformação e vetores de clonagem e expressão organismo-específico. Apesar das dificuldades, recentemente vários avanços foram feitos na descoberta de sequências envolvidas no início da transcrição, como a elucidação de que a região -10 dos promotores tem maior importância

para o início da transcrição do que a região -35 (HALBEDEL *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2012).

O genoma de *M. hyopneumoniae* está organizado preferencialmente em grandes unidades transcricionais compostas por genes com diferentes funções intercalados por sequências intergênicas curtas (SIQUEIRA *et al.*, 2011). No início das unidades transcricionais ocorre a presença de sequências promotoras da transcrição (WEBER *et al.*, 2012). Apesar de progressos no entendimento do processo de início da transcrição, se tem pouco conhecimento sobre a etapa de término da transcrição em micoplasmas. Este trabalho teve como objetivo demonstrar a presença de terminadores da transcrição no genoma de *M. hyopneumoniae*, dando subsídios ao entendimento da maquinaria de transcrição nesta bactéria.

A abordagem deste trabalho utilizando três programas diferentes para a predição de terminadores possibilitou a obtenção de um grande número de dados, com um total de 1068 possíveis terminadores para serem analisados nas etapas seguintes de trabalho. Esse resultado foi fundamental para o prosseguimento do trabalho uma vez que a determinação de terminadores em *Mollicutes* é dificultada pelo baixo conteúdo de guanina e citosina no genoma. Analisando o posicionamento dos terminadores preditos no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 se constatou que muitos deles eram falso-positivos. Foram selecionados somente os 556 terminadores (52% do total) posicionados após o final de CDSs, que foram classificados como terminadores classe t_{c1} . Os terminadores desconsiderados estavam, em sua maioria, localizados dentro da região codificante de CDSs ou posicionados na fita antisenso. Devido a isto, eles não podem ser considerados como terminadores transcricionais. Entretanto, estas estruturas poderiam corresponder a outros elementos estruturais, como *riboswitches* ou terminadores de RNAs regulatórios que possam existir no genoma.

Em relação à eficiência de predição de cada programa, pode-se afirmar que é reflexo do algoritmo empregado por cada um deles. Os melhores resultados foram obtidos com o programa WebGesTer. Dos 295 terminadores preditos por esse programa 279 foram selecionados para a classe t_{c1} . Além disso, os

terminadores sem a cauda poli-U só foram preditos por este programa, o que permitiu aumentar o número de UTs com terminadores. Estes resultados advêm do algoritmo deste programa que se baseia no contexto gênico do genoma para realizar a busca por terminadores, que restringe a procura por sequências palindrômicas em uma região que vai de -20 a +270 pb do códon de terminação da CDS e também por ser o único que permite a busca de terminadores não-canônicos (sem a cauda poli-U) (MITRA *et al.*, 2011).

Já pelo programa TransTermHP foi selecionado um número um pouco menor de terminadores para a classe t_{c1} (191). Este número se justifica por este programa não ter a capacidade de encontrar terminadores não-canônicos. O algoritmo deste programa restringe a busca de sequências palindrômicas às regiões em que ocorre a presença de pelo menos 3 timinas em sequência (que representam a cauda poli-U no RNA) (KINGSFORD *et al.*, 2007). Já o programa ARNold combina dois algoritmos de predição, Erpin e RNAmotif, que se baseiam em modelos de terminadores descritos em *E. coli* e *B. subtilis* (NAVILLE *et al.*, 2011). Este programa não considera o contexto gênico em que os terminadores ocorrem, o que explica porque muitos terminadores preditos por este programa foram localizados dentro da região codificante, sendo considerados falso-positivos.

Considerando que a transcrição em *M. hyopneumoniae* ocorre em unidades transcricionais é esperado que o controle da transcrição aconteça preferencialmente no início e no fim destas unidades transcricionais. Isto fez com que o trabalho fosse focado na identificação de terminadores ao final das unidades transcricionais e dos genes monocistrônicos. Com a utilização dos três programas foi possível identificar terminadores t_{c1} em todos os genes monocistrônicos e em 91% das 116 unidades transcricionais. Dentro das unidades transcricionais também podem ocorrer promotores e terminadores internos, responsáveis pela formação de transcritos alternativos. Estes ficaram inicialmente fora da análise para serem validados posteriormente.

A confirmação dos terminadores pela análise *in silico* baseou-se nas características estruturais e funcionais. Se o mesmo terminador é predito por dois programas diferentes, como é o caso dos terminadores classe t_{c2} , significa que

suas características se enquadram de maneira satisfatória no modelo de terminadores já descritos na literatura. Como muitos terminadores de micoplasmas possivelmente não se enquadram dentro do modelo tradicional de terminadores intrínsecos de bactérias, definimos as características padrão de um terminador em *M. hyopneumoniae* por meio dos terminadores classe t_{c2} . Este padrão foi então utilizado para refinar os dados do trabalho por meio da confirmação de terminadores que se enquadravam dentro destas características.

Os resultados *in silico* confirmaram a presença de terminadores em 63% das 33 mCs e em 64% das 116 UTs, considerando os terminadores classes t_{c2} e t_{c3} . Estes dados demonstram a ocorrência de terminadores intrínsecos da transcrição no genoma de *Mollicutes*, contrariando os postulados de Washio *et al.* (1998). Entretanto, os terminadores em micoplasmas divergem do padrão de terminadores encontrados na maioria das bactérias. Os terminadores em *M. hyopneumoniae* possuem valores de energia livre de Gibbs mais altos que em terminadores de *E. coli*, se concentrando numa faixa entre -4 e -11 kcal/mol. Estes valores mais altos de energia livre de Gibbs se devem ao baixo conteúdo de guanina e citosina no genoma de *Mollicutes*. Esta característica também é encontrada nos terminadores intrínsecos de *M. genitalium* e *M. pneumoniae* (HOON *et al.*, 2005).

Apesar da cauda poli-U estar presente na maioria dos terminadores de *M. hyopneumoniae*, esta característica não pode ser considerada como padrão, pois não esteve presente em todos os terminadores. A identificação de terminadores sem a cauda poli-U também foi verificada em outros micoplasmas (MITRA *et al.*, 2009). A presença da cauda poli-U não é um requerimento essencial para a função do terminador, visto que mesmo na ausência da cauda poli-U o processo de terminação mantém a eficiência (UNNIRAMAN *et al.*, 2001; INGHAM *et al.*, 1995).

A comprovação da atividade funcional dos terminadores intrínsecos em *M. hyopneumoniae* 7448 foi realizada pela validação por RT-PCR e qRT-PCR. Por meio do RT-PCR foram analisados 15 terminadores, sendo 9 deles validados por esta metodologia. Já pelo qRT-PCR foram analisados 16 terminadores, sendo confirmado o papel funcional de 13 destes. A metodologia destes experimentos se

detinha em demonstrar que a sequência de nucleotídeos do terminador estava sendo transcrita e que a jusante do terminador não era detectada a presença, ou uma diminuição, de transcritos. Como esta metodologia necessita de um resultado negativo para confirmação do terminador foi necessário a realização de reações com DNA como controle positivo da reação. Esta metodologia também foi empregada na validação do terminador *T1* ao final do operon *mgo* de *Pseudomonas syringae* (ARREBOLA *et al.*, 2012).

A análise experimental dos terminadores classes t_{c2} confirmou que estes terminadores possuem atividade funcional. Dos 4 terminadores desta classe analisados por RT-PCR somente o terminador após da UT_85 não pode ser validado por esta técnica. Com o qRT-PCR o número amostral deste grupo foi aumentado com mais sete terminadores que ainda não haviam sido testados. Todos os terminadores analisados por qRT-PCR foram validados, apesar de em 4 unidades transcricionais (11, 58, 83 e 85) ainda ter sido detectado níveis extremamente baixos de transcritos. Quanto ao terminador da UT_85 não foi possível construir *primers* para o qRT-PCR, mas nossa hipótese para que ele não tenha sido validado é que ocorra a presença de pequenos níveis de transcritos após este terminador, como ocorreu com as UTs 11, 58, 83 e 85. Utilizando os terminadores analisados como amostragem do grupo de terminadores classe t_{c2} se pode validar a atividade funcional destes terminadores, já que possuem uma alta eficiência em promover o desligamento da maquinaria de transcrição.

Entre os terminadores classe t_{c3} inicialmente somente o terminador do gene monocistrônico *pyrG* (mC_15) foi testado por RT-PCR e não foi validado pois foi detectada a presença de transcritos após o terminador. Para o qRT-PCR foram então analisados 7 terminadores, mas em nenhum deles foi detectada a ausência completa de transcrição. No entanto, por meio da qRT-PCR foi possível quantificar o nível de transcritos do terminador e após a sequência terminadora. Dos 7 terminadores analisados em 4 (mC_15 e UTs 31, 68 e 77) ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de transcrição após o terminador. Entre estes encontra-se o terminador da mC_15, mostrando que este terminador possui papel funcional. Sua atividade somente não foi detectada na RT-PCR por esta técnica ser somente qualitativa. Estes resultados sugerem que

os terminadores classe t_{c3} possuam atividade funcional, mas que sua eficiência é menor se comparada com os terminadores classe t_{c2} .

Em relação aos terminadores após os genes monocistrônicos *rbgA* e *gyrA*, mCs 4 e 24 respectivamente, ocorreu uma diminuição nos níveis de transcrição após o terminador, mas que não foi significativa estatisticamente. Uma possível explicação para isto é o fato destes dois genes possuírem outro terminador da classe t_{c3} localizado a jusante do terminador analisado experimentalmente. A presença de dois terminadores nestas unidades pode significar que eles tenham funções complementares. Em relação ao terminador da unidade transcricional 47 ocorreu um aumento que não foi estatisticamente significativo na região após o terminador. Este dado descarta que este terminador possua um papel funcional.

Os terminadores classe t_{c4} não puderam ser confirmados por meio das análises *in silico*. Então, experimentalmente foram analisados 10 terminadores. A análise por RT-PCR mostrou que seis destes terminadores apresentam papel funcional. Além disso, no terminador da mC_30, que não pôde ser validado pelo RT-PCR, foi identificado uma diminuição significativa na quantidade de transcritos após o terminador. Isto demonstra que terminadores com valores relativamente altos de energia livre de Gibbs também possuem papel funcional em *M. hyopneumoniae*, como é o caso do terminador wf_375 na UT_060 que possui um ΔG de -2,22 kcal/mol.

A determinação da presença de terminadores do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 colabora na compreensão do mecanismo de regulação da expressão gênica nesta bactéria. A UT 89 é co-transcrita em um mRNA policistrônicos com os genes *deoC*, *upp*, *MHP7448_0525*, *lon* e *tuf* seguindo esta orientação (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Por experimentos de *primer extension*, objetivando o mapeamento dos sítios de início da transcrição, foi verificada a presença de uma sequência promotora interna imediatamente antes do gene *tuf* (WEBER *et al.*, 2013). A predição de terminadores mostrou que também ocorrem terminadores classe t_{c1} internos nesta UT. Os terminadores internos estão posicionados após o gene *lon*, que se localiza imediatamente antes do gene *tuf* (Anexo 5). Além disso, ao final do gene *tuf* ocorre o terminador t_264. Este

terminador teve sua atividade funcional confirmada experimentalmente pelo RT-PCR. O produto codificado pelo gene *tuf* é o fator de alongação EF-Tu, necessário para os processos de síntese de proteínas, que estão sempre funcionais em células metabolicamente ativas. Este caso representa, possivelmente, um exemplo de regulação complexa, com a ocorrência de transcritos alternativos, onde o gene *tuf* tem sua transcrição não apenas regulada pelos elementos regulatórios da UT a qual ele pertence mas também, regulado por elementos promotores e terminadores internos. A presença de promotores e terminadores internos reforçam as teorias que sugerem a existência de suboperons em *M. hyopneumoniae*, que são importantes na transcrição diferencial de algumas ORFs pertencentes as UTs.

Os postulados deste trabalho ajudam a entender como ocorre o término da transcrição em micoplasmas. A terminação Rho-dependente parece não ocorrer em micoplasmas devido à ausência do gene *rho* (MITRA *et al.*, 2009). A identificação de terminadores intrínsecos em mais de 60% das mCs e UTs do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 sugere que esta seja a principal forma de terminação da transcrição nesta bactéria. A presença de terminadores também foi identificada nas espécies *M. genitalium*, *M. pneumoniae* (KINGSFORD *et al.*, 2007; HALBEDEL *et al.*, 2007; KRAUSE *et al.*, 1997). A validação de terminadores, com a determinação experimental de atividade funcional em 21 terminadores intrínsecos realizada neste trabalho, evidencia que estes terminadores possuem um papel central no processo de término da transcrição em *Mollicutes*. Esses resultados também foram encontrados de maneira pontual para os genes *hmw* de *M. pneumoniae*, *ftsZ* de *M. genitalium* e *vmpaU* de *M. agalactiae* (WALDO III *et al.*, 1999; BENDERS *et al.*, 2005; CHOPA-DEWASTHALY *et al.*, 2008).

Apesar de todos os experimentos realizados, em algumas UTs e mCs não foi possível identificar a presença de terminadores. Uma hipótese é que nestas UTs e mCs ocorram terminadores que diverjam significativamente das características do modelo canônico de terminadores intrínsecos em procaríotos em razão das peculiaridades do genoma de micoplasmas, como o baixo conteúdo de G-C. Para a predição destes terminadores seria necessário o desenvolvimento

de um algoritmo de predição de terminadores específico para *Mollicutes*. Outra hipótese é que nestas UTs e mCs a terminação da transcrição ocorreria de forma gradual, ou seja, a RNA polimerase continuaria a transcrição além do fim do gene, e se desligaria da fita molde gradativamente sem um final abrupto da transcrição (GARDNER & MINION 2010). A comprovação destas hipóteses pode ser realizada pelo transcritoma fita-específica de *M. hyopneumoniae* 7448 a fim de identificar o local de término da transcrição e analisar se nesta região ocorrem estruturas secundárias no RNA que poderiam ser responsáveis pelo desligamento da maquinaria de transcrição.

6. PERSPECTIVAS

Os dados obtidos neste trabalho confirmaram a atividade funcional de alguns terminadores, mas para uma análise mais completa é necessário a análise do transcritoma de *M. hyopneumoniae* 7448, assim como também precisam ser avaliados os terminadores internos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ARREBOLA, E.; CARRIÓN, V.J.; CAZORLA, F.M.; PÉREZ-GARCÍA, A.; MURILLO, J. & VICENTE, A. Characterisation of the *mgo* operon in *Pseudomonas Syringae* pv. *Syringae* UMAF0158 that is required for mangotoxin production. *BMC Microbiol.* 12, 2012.

BACTERIO: <<http://www.bacterio.net/mycoplasma.html>>. Acessado em 18.12.2013

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

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.

BENDERS, G. A.; POWELL, B. C. & HUTCHISON III, C. A. Transcriptional analysis of the conserved *ftsZ* gene cluster in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal Bacteriology*, 187: 4542-4551, 2005.

BOVE, J. M. Molecular features of mollicutes. *Clinical Infection Disease*, 17(1): S10-S31, 1993.

CHO, B. K.; ZENGLER, K.; QIU, Y.; PARK, Y. S.; KNIGHT, E. M.; BARRETT, C. L.; GAO, Y. & PALSSON, B. The transcription unit architecture of the *Escherichia coli* genome. *Nature Biotechnology*, 27(11): 1043-1049, 2009.

CHOPRA-DEWASTHALY R., CITTI C., GLEW M. D., ZIMMERMANN M., ROSENGARTEN R. & JECHLINGER W. Phase-locked mutants of *Mycoplasma agalactiae*: defining the molecular switch of high-frequency *Vpma* antigenic variation. *Molecular Microbiology*, 67(6): 1196-1210, 2008.

CIAMPI M. S. Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* 152: 2515–2528, 2006.

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.

D'AUBENTON CARAFA, Y., BRODY, E. & THERMES, C. Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.*, 216: 835–858, 1990.

DEBEY, M.; JACOBSON, C. D. & ROSS, R. F. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American Journal Veterinary Research*, 53: 1705-1710, 1992.

DJORDJEVIC, S.P.; CORDWELL, S.J.; DJORDJEVIC, M.A.; WILTON, J.; MINION, F.C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun.*, 72(5): 2791-2802, 2004.

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): 4000-4008, 2008.

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

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

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

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

GHOSH, T.; BOSE, D.; ZHANG, X. Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiol. Rev.* 34 (5): 611-627, 2010.

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

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

HALBEDEL, S.; EILERS, H.; JONAS, B.; BUSSE, J.; HECKER, M.; ENGELMANN, S. & STULKE, J. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*: Analysis of the Promoters of the *ackA* and *ldh* Genes. *J.Mol.Biol.*,371(3): 596-607, 2007.

HOON, M. J. L.; MAKITA, Y.; NAKAI, K. & MIYANO, S. Prediction of Transcriptional Terminators in *Bacillus subtilis* and Related Species. *Plos Computational Biology*, 1(3): 212-221, 2005.

INAMINE, J. M.; LOECHEL, S. & HU, P. C. Analysis of the nucleotide sequence of the P1 operon of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene*, 73: 175–183, 1988.

INAMINE, J. M.; LOECHEL, S.; COLLIER A. M.; BARILE M. F. & HU, P. C. Nucleotide sequence of the MgPa (*mgp*) operon of *Mycoplasma genitalium* and comparison to the P1 (*mpp*) operon of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene*, 82: 259–267, 1989.

INGHAM, C.J., HUNTER, I.S. & SMITH, M.C. Rho-independent terminators without 3' poly-U tails from the early region of actinophage oC31. *Nucleic Acids Res.*, 23: 370–376, 1995.

KEGG: <http://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext#D430>. Acessado em 13.01.2014

KINGSFORD C.L. AYANBULE K. & SALZBERG S.L. Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome Biol*, 8:22, 2007.

KLEIN, B. J.; BOSE, D; BAKER, K.J.; YUSOFF, Z.M.; ZHANG, X. & MURAKAMI, K.S. RNA polymerase and transcription elongation factor Spt4/5 complex structure. *PNAS*. 108: 546–550, 2011.

KRAUSE, D. C.; T. PROFT; C. T. HEDREYDA; H. HILBERT; H. PLAGENS; R. HERRMANN. Transposon mutagenesis reinforces the correlation between *Mycoplasma pneumoniae* cytoskeletal protein HMW2 and cytoadherence. *Journal Bacteriology*, 179: 2668–2677, 1997.

KÜHNER, S.; VAN NOORT, V.; BETTS, M.J.; LEO-MACIAS, A.; BATISSE, C.; RODE, M.; YAMADA, T.; MAIER, T.; BADER, S.; BELTRAN-ALVAREZ, P.; CASTAÑO-DIEZ, D.; CHEN, W.; DEVOS, D.; GÜELL, M.; NORAMBUENA, T.; RACKE, I.; RYBIN, V.; SCHMIDT, A.; YUS, E.; AEBERSOLD, R.; HERRMANN, R.; BÖTTCHER, B.; FRANGAKIS, A.S.; RUSSELL, R.B.; SERRANO, L.; BORK, P. & GAVIN, A.. Proteome Organization in a Genome-Reduced Bacterium. *Science*, 326: 1235-1240, 2009.

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

LIU, W.; XIAO, S.; LI, M.; GUO, S.; LI, S.; LUO, R.; FENG, Z.; LI, B.; ZHOU, Z.; SHAO, G.; CHEN, H. & FANG, L. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC Genomics*, 14: 80, 2013.

LIVAK, K.J.; & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.

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.

MADEIRA, H. M. F. & GABRIEL, J. E. Regulation of gene expression in Mycoplasmas: Contribution from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae* genome sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 277-282, 2007.

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

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

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

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

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

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.

MITRA,A., ANGAMUTHU,K. & NAGARAJA,V. Genome-wide analysis of the intrinsic terminators of transcription across the genus Mycobacterium. *Tuberculosis*, 88: 566–575, 2008.

MITRA,A., ANGAMUTHU,K., JAYASHREE,H.V. & NAGARAJA,V. Occurrence, divergence and evolution of intrinsic terminators across eubacteria. *Genomics*, 94: 110–116, 2009.

MITRA A.,KESARWANI A. K.,PAL D. & NAGARAJA V. WebGeSTer DB--a transcription terminator database. *Nucleic Acids Res*, 39: 2011.

MORGAN, W. D., BEAR, D. G. & VON HIPPEL, P. H. Specificity of release by *Escherichia coli* transcription termination factor Rho of nascent mRNA transcripts initiated at the λ P_R. *J. Biol. Chem.* 259: 8664–8671, 1984.

NAVILLE, M.; GHUILLOT-GAUDEFFROY, A.; MARCHAIS, A & GAUTHERET, D. ARNold A web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA Biology*. 8: 11-13, 2011.

NCBI: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/coxik.cgi?gi=18652>>. Acessado em 19.12.2013

NUDLER E. & GOTTESMAN M. E. Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes to Cells*, 7: 755-768, 2002.

OCHMAN, H. & RAGHAVAN, R. Excavating the Functional Landscape of Bacterial Cells. *Science*. 326, 2009.

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

PETERS, J. M.; MOONEY, R.A.; KUAN, P.F.; ROWLAND; J.L.; KELEŞ, S. & LANDICK, R. Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc. Natl Acad. Sci.* 106: 15406–15411, 2009.

PETERS, J. M.; VANGELOFF, A. D. & LANDICK, R. Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles. *J. Mol. Biol.*, 412 (5): 793-813, 2011.

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

POLLACK, J. D. Carbohydrate metabolism and energy conservation In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R. & BASEMAN, J. B., editors. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Washington, DC: *Am. Soc. Microbiol.*, 1992. p. 181-200.

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

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

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

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

RICHARDSON, J.P. Loading Rho to terminate transcription. *Cell*, 114:157–159, 2003.

ROTTEM, S. & YOGEV, D. Mycoplasma interaction with eukaryotic cells. *Subcellular Biochemistry*, 33: 199-227, 2000.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A. & BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16: 944-945, 2000.

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.

SCHMIDT, M. C. & CHAMBERLIN, M. J. NusA protein of *Escherichia coli* is an efficient transcription termination factor for certain terminator sites. *J. Mol. Biol.* 195: 809–818, 1987.

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

SIQUEIRA, F.M.; THOMPSON, C.E.; VIRGINIO, V.G.; GONCHOROSKI, T.; REOLON, L.; ALMEIDA, L.G. FONSECA, M.M.; SOUZA, R.; PROSDOCIMI, F.; SCHRANK, I.S.; FERREIRA, H.B.; VASCONCELOS, A.T. & AND ZAHA, A. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics*, 14: 175, 2013.

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

TASCHKE, C. & HERRMANN, R. Analysis of transcription and processing signals of the 16S-23S rRNA operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Gen Genet.* 205: 434-441, 1986.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim. Health Res. Rev.*, 5(2): 317-320, 2004.

THACKER, E. L. Mycoplasmal disease In: STRAW, B. E.; ZIMMERMANN, J. J.; D'ALLAIRE, S. & TAYLOR, D. J, editors. Diseases for Swine. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 701-717.

UNNIRAMAN, S., PRAKASH,R. & NAGARAJA,V. Alternate paradigm for intrinsic transcription termination in eubacteria. *J. Biol. Chem.*, 276: 41850–41855, 2001.

VASCONCELOS, A. T.; FERREIRA, H. B.; BIZARRO, C. V.; BONATTO, S. L.; CARVALHO, M. O.; PINTO, P. M.; ALMEIDA, D. F.; ALMEIDA, L. G.; ALMEIDA, R.; VES-FILHO, L.; ASSUNCAO, E. N.; AZEVEDO, V. A.; BOGO, M. R.; BRIGIDO, M. M.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, S. S.; CAREPO, M. S.; CARRARO, D. M.; DE MATTOS CASCARDO, J. C.; CASTRO, L. A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R. G.; CUNHA, C. W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M. S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G. R.; FREITAS, N. S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T. B.; GRISARD, E. C.; GUIMARAES, C. T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S. N.; KRIEGER, M. A.; LAURINO, J. P.; LIMA, L. F.; LOPES, M. I.; LORETO, E. L.; MADEIRA, H. M.; MANFIO, G. P.; MARANHAO, A. Q.; MARTINKOVICS, C. T.; MEDEIROS, S. R.; MOREIRA, M. A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C. E.; NICOLAS, M. F.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXAO, R. F.; PEDROSA, F. O.; PENA, S. D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-

FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L. S.; POTRICH, D. P.; SALIM, A. C.; SANTOS, F. R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M. P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S.; SCHUCK, A. F.; SEUANEZ, H. N.; SILVA, D. W.; SILVA, R.; SILVA, S. C.; SOARES, C. M.; SOUZA, K. R.; SOUZA, R. C.; STAATS, C. C.; STEFFENS, M. B.; TEIXEIRA, S. M.; URMENYI, T. P.; VAINSTEIN, M. H.; ZUCCHERATO, L. W.; SIMPSON, A. J. & ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J.Bacteriol.*, 187(16):5568-5577, 2005.

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

WALKER, R. L. Mollicutes. In: HIRSH, D.C.; CHUNG, Y. *Microbiologia veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 155-162

WASHIO, T., J.; SASAYAMA, J. & TOMITA, M. Analysis of complete genomes suggests that many prokaryotes do not rely on hairpin formation in transcription termination. *Nucleic Acids Research*, 26: 5456–5463, 1998.

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

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

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

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

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

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

YUZENKOVA, Y.; ZENKIN, N. & SEVERINOV, K. Mapping of RNA polymerase residues that interact with bacteriophage Xp10 transcription antitermination factor p7. *J. Mol. Biol.* 375, 29–35 2008.

ZIELINSKI, G. C.; YOUNG, T.; ROSS, R. F. & ROSENBUSCH, R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers. *American Journal Veterinary Research*, 51(3): 339-343, 1990.

ANEXOS

ANEXO 1 - Protocolo de extração de DNA genômico de *M. hyopneumoniae*

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

APÊNDICES

Apêndice 1. *Primers* empregados nos experimentos de RT-PCR e qRT-PCR

Contexto gênico ¹	ID Primer ²	Sequencia (5'→3')	T _m (°C)	Tamanho do produto(bp)
UT_36	U.36.ge.f	GTGTA AAAACAGCGATC	52,4	
	U.36.te.r	TAACCAAAAAATAAAATTAC	46	227
	U.36.ex.r	GACTTGGTAACTAAAAATAC	52,2	341
UT_60	U.60.ge.f	GACTTTCACTAGGATCTTCG	58,4	
	U.60.te.r	GTCTTTTTTTGTTTTATGGTC	52,8	256
	U.60.ex.r	AACTTTTTATTCTATTTTTAGG	49,6	372
UT_98	U.98.ge.f	GTTCTTATACATCTTTGAATGC	55,2	
	U.98.te.r	CTTTTCACTGACTTTTAAGCC	56,7	243
	U.98.ex.r	GTTAATGTTTTACTAATTTTTG	50,3	331
UT_39	U.39.ge.f	GTCCCGTTAAGAAGTGTG	58	
	U.39.te.r	CAATTTAGTTCATATCCAACC	55,2	323
	U.39.ex.r	CAATTCAACTTGTGAGCGAG	58,4	424
UT_66	U.66.ge.f	GGTCTCAATGGAATTTATGC	56,7	
	U.66.te.r	GAAAAGACCGTCTGGTTCAG	60,4	344
	U.66.ex.r	CACTTTTTGTTCTTGGTTTTTG	55,2	440
UT_103	U.103.ge.f	CTTGAAACTATTTATGGTAGCG	57,1	
	U.103.te.r	GAATAACTGATGGTACAGGGC	60,6	273
	U.103.ex.r	CAGGAAAAATAAACGAATTAC	53,4	448
mC_28	m.28.ge.f	GGCATTTTATTATCTTTGTCTG	54,8	
	m.28.te.r	CAAGGTATTTCTTTTTTCTCC	55,2	241
	m.28.ex.r	CAGGAAATAGTGCCGGAC	59,9	327
mC_30	m.30.ge.f	GAAACTGTTGATAACAATAAAGG	55,6	
	m.30.te.r	CCGAATTAGTGGAACCTATTG	56,7	333
	m.30.ex.r	CAGTCCCCTGGTTTGTC	59,6	418
mC_31	m.31.ge.f	GGTACAGGGCTTCGTTTAG	60,2	
	m.31.te.r	CCAATATGATTTAATTTATGGC	53,4	320
	m.31.ex.r	GACTTGCGGTTGCTTTTAG	58	387
mC_33	m.33.ge.f	CAATGATAGCAAAGCAGC	55,8	
	m.33.te.r	GCCTTATTTATCTCAGCAC	56,3	244
	m.33.ex.r	GGTTCGGTTGATGTTATTAC	56,3	354
UT_85	U.85.ge.f	GGTGCTCACATTATCGGC	59,9	
	U.85.te.r	GTTTTTACATCGTTTCAGG	54,8	228
	U.85.ex.r	CAAATTAAGTAAAAATATGCC	54,3	290
mC_15	m.15.ge.f	CAAAAACCGACTTGATTGAAG	56,7	
	m.15.te.r	GTAATTCTGGCTTGTTTAGTTTC	57,4	241
	m.15.ex.r	CTATCCTACAAATTGGTGCC	58,4	336
UT_10	U.10.te.f	GACTGAAATTAACAGAAATTGCTC	49,1	154
	U.10.te.r	ATGAAAATTGGCAAAAATTAAG	48,2	
	U.10.ex.f	AACCGTTTAACTTTGTAGTACAAG	47	200
	U.10.ex.r	TTCCTAAAAATTCAAGCTGC	47	
UT_11	qU.11.te.f	CCAGGATTTAATTCCAAGAC	47,6	144
	qU.11.te.r	ATGCAGCTTGAATTTTTAGG	46,8	

	qU.11.ex.f	CCTGAACCTGAATTTGAAAAG	48.5	215
	qU.11.ex.r	TTCTTAATTTTTGCCAATTTTC	48.3	
UT_58	qU.58.te.f	CGTGAATTAGCACTTGTTGAGC	52	
	qU.58.te.r	GGTTTTTTTAAATTGTGATAATTAGC	49.9	164
	qU.58.ex.f	CATACTCACATCCATATTATTCCG	50.2	
	qU.58.ex.r	GCATATGTCTTCGGGAATTGC	53.7	181
UT_113	qU.113.te.f	GTAAGTTTTTTACTTGATCAGCAAG	49	
	qU.113.te.r	CCCAGGTTTTCTACATAAATACG	49.8	200
	qU.113.ex.f	CCTTCATAATTTAGATCAAGAGTTAG	47.7	
	qU.113.ex.r	TCTCAAGGGGGTTTTTTTG	49.3	173
UT_89	U.89.te.f	GGGATAATGTTGATCTTACCG	48.1	
	U.89.te.r	CAGAATAAACTGAAGTTTTTTTATG	47.1	201
	U.89.ex.f	GAGAAGGTGGTAGAACCGTGG	52.7	
	U.89.ex.r	GGTCATTTCCCTGACAATTTTG	52.7	186
mC_15	qm.15.te.f	GTCCACTCGATCCACACCC	52	144
	qm.15.te.r	GTTTAGTTTTCATTAATTTTCGGGG	51.1	
	qm.15.ex.f	GCAGCTATTATTGAGAATGTTTAC	47.3	197
	qm.15.ex.r	GCCACATTAACAATTTTACTGG	50.5	
mC_30	qm.30.ge.f	CTAATTTAATTCAGAAACATCAGTC	46.5	182
	qm.30.te.r	CCGAATTAGTGGAACCTATTG	46.3	234
	qm.30.ex.r	GCTCTTGAAATAGTCAATTTTG	46	
mC_4	qm.4.te.f	GGTTTAGATTTGCCTCGCTG	51.8	189
	qm.4.te.r	CAAAAAACAAGAAAAATACCGC	50.7	
	qm.4.ex.f	GGCAAACAAAAAATTACACTAG	46.2	216
	qm.4.ex.r	GTAAAGTTCTAAAAGCAAAAAATC	46.5	
mC_24	qm.24.ge.f	GAAATTACCGCAGTTAGTTTGATC	51.3	
	qm.24.te.r	CATAATTTAGGTCACCTTTTAGAG	46.6	142
	qm.24.ex.r	CGCTACTGTATTAATTCAGCATC	48.5	199
UT_31	qU.31.te.f	GATCTCAGAATTGCCTGAAAAG	50.1	151
	qU.31.te.r	CGGATCAATTGCCAAAACG	53.8	
	qU.31.ex.f	CCGAGTTGATGATGAAAATCTTC	52.2	200
	qU.31.ex.r	TGGTAAAATTAGCTCGTTTTGG	51	
UT_47	qU.47.te.f	GAAGAACCAGCAATGATTGAAGC	54.6	189
	qU.47.te.r	GCCTTTAAAAGACTGCCAAATTG	54.2	
	qU.47.ex.f	CTCAAATCAAAGCCCGCTACC	56.8	191
	qU.47.ex.r	GACGATTAAGACCAAAGCAAAGC	55.5	
UT_68	qU.68.te.f	AGAACATCGACAAACCATTATC	47.8	187
	qU.68.te.r	GTAATCAAACCCCAAAAAGTTAC	48.9	
	qU.68.ex.f	GGAGGATTACTAAAAAGGTAGGG	51.2	172
	qU.68.ex.r	TGATTATGGTCTGAGATTTTCTC	47.3	
UT_77	qU.77.te.f	GTTTCAGCTTCAATGGGTCCC	54.9	173
	qU.77.te.r	GCGAATTTCAGGCAGACTTACC	54.7	
	qU.77.ex.f	GGGTCCCTCAATAAAGATTCCG	52	214
	qU.77.ex.r	GACAAAGACTTCATGCTTACAAAC	49.7	
UT_09	qU.09.te.f	CGGGTATTCAACGCAATTACG	54.7	181
	qU.09.te.r	CTCGGTTTTCTTAATTTTTCGC	52.2	
	qU.09.ex.f	CAAAGAGCAATTAAGGAAGATG	48.3	186
	qU.09.ex.r	GCCTCAAAGTTACATAAATTACG	49.6	
UT_20	qU.20.te.f	CGCTCTCATGCTCTAAATGC	50.3	202
	qU.20.te.r	GGAGTTTTTTAAATTCATCGC	49.8	

	qU.20.ex.f	C G A C T T A A A G T A T C A G C A A A A A C	48	178
	qU.20.ex.r	T G T A A T T G C T T T T T T C T T C T C C	48	
UT_62	qU.62.te.f	G A T G A T A G T A G A A A A C C G A C C	44.9	169
	qU.62.te.r	A G T C A A C T T T T T T A A T A A A T T A G G	44.1	
	qU.62.ex.f	T C C T T G A A A A A T T C C T T A G C G	50.9	194
	qU.62.ex.r	G C A A A A A T T A T T G A A G A A C T T T G	48	
UT_83	qU.83.te.f	G A A G G T A T T G G T A T A A T G G C A G G	51.6	165
	qU.83.te.r	T G C A A G A A A A C T T T T T T T A T G G	49	
	qU.83.ex.f	G A T G C C T T T A T T A T C A G T G G G C	52.3	193
	qU.83.ex.r	G G A A A C T C G G G A A T A A T G A T A G G	52.9	
UT_105	qU.105.ge.f	C C A C T T T G A T T C A G A A G T T T T T G C	54	
	qU.105.te.r	G A C C G C T T T G T T T C C T G A T G G	55.9	170
	qU.105.ex.r	C C G A G T C A A A C T C G A T C T T T T A G	52	244

1 – Unidade transcricional em que foi avaliada a presença do terminador.

2 – Nome de identificação do terminador. O “q” ao início representa os *primers* construídos para o qRT-PCR. O “te” define os *primers* junto ao terminador e “ex” os *primers* após o terminador. Quando desenhado apenas um *primer* dentro da região codificante ele foi exemplificado como “ge”. O “f” e “r” representam os *primers forward* e *reverse*, respectivamente.

Apêndice 2. Classificação dos terminadores localizados ao final de CDSs

Terminador ¹	Localização ²	Classe	Contexto gênico ³	Gene	Distância (pb)	ΔG (kcal/mol)	sequência (5'→3')
t_001	UT_001	t _{c1}	int.	dnaN	-7	-12,5	uagucggucuuguuuuagucuaaaauuuucucuaaaauuuagacuauuuuuuugauuaau
w_001	UT_001	t _{c1}	int.	dnaN	-6	-9,83	agucuaaaauuuucucuaaaauuuagacuauuuuuuuuug
a_002	UT_001	t _{c1}	int.	MHP7448_0006	12	-4,97	aaauaauaaaaaggaaaguaggcaaaaauuacuaauuuuuuccuuuuuuuuuaauaa
t_002	UT_001	t _{c1}	int.	MHP7448_0006	21	-6,4	aaaaaggaaaaguaggcaaaaauuacuaauuuuuuccuuuuuuuuuaauaaa
a_004	UT_001	t _{c1}	int.	MHP7448_0007	143	-11,16	aaacaagaaaagccggcaaaauuuggauaaaauuguugccgguuuaacaaaaucua
t_003	UT_001	t _{c1}	int.	ftsY	-6	-3,7	gguuuuuacuuuuuuuaccuaauuuuuacaaauaaguaaaauuuaguauuuuuucuaa
t_004	UT_001	t _{c1}	int.	ftsY	-4	-8,5	gaauuuuacuuuuuuuaccuaauuuuuacaaauaaguaaaauuuaguauuuuuucuaa
t_005	UT_001	t _{c1}	int.	ftsY	-3	-9,8	gguuuacuuuuuuuaccuaauuuuuacaaauaaguaaaauuuaguauuuuuucuaauu
w_002	UT_001	t _{c1}	int.	ftsY	119	-12,28	uuccauuuuuguaaaaauuuauuuuacaaaauggaaaauuuaagga
w_003	UT_001	t _{c1}	int.	MHP7448_0009	23	-10,78	aagcaauuacuagauaacaauuuuugcuaauuugcuuuuguuuuuuugu
a_006	UT_001	t _{c1}	int.	MHP7448_0009	24	-4,55	aaaaaaaaaaagcaaaauacuagauaacaauuuuugcuaauuugcuuuuguuuuuuguua
w_004	UT_001	t _{c3}	UT	rluC	-6	-5,89	augguaggggcauuuuaccacuuuuauuuuuc
wf_233	mC_01	t _{c3}	mC	MHP7448_0016	36	-3,41	accucaacuugguuuuugaauaa
wf_004	mC_02	t _{c1}	mC	MHP7448_0017	109	-1,91	ccuauuaaaauuuuuuagggcuaaaauug
a_009	UT_002	t _{c3}	UT	MHP7448_0018	-9	-6,9	aaaguuuucugggcgguagaagcaaaaaucgcuuuuuacaggccu
wf_236	UT_002	t _{c3}	UT	MHP7448_0018	180	-3,25	ccuauuaauuuuuuauuuuuuuagguuuacuagug
w_106	UT_002	t _{c1}	int.	MHP7448_0019	80	-6,13	cuagaaauuauuucaaaauaagauagacauuuucuauguugaaaaguu
w_005	UT_003	t _{c2}	UT	MHP7448_0030	105	-6,86	ggacugagauuuuuuuuugucagucuuuuuccuuugg
a_018	UT_003	t _{c2}	UT	MHP7448_0030	106	-8,3	aaauuaauaggacugagauuuuuuuuugucagucuuuuuccuuugguu
wf_241	UT_004	t _{c1}	UT	lsp	141	0,27	agguucuguuagucuuuuucaauuc
wf_008	UT_005	t _{c1}	UT	MHP7448_0036	12	-0,26	cgagcauacuuggcuuaucuaa
wf_009	UT_005	t _{c1}	UT	MHP7448_0036	104	-0,68	gcuaaaauagcacuaauuuua
wf_244	UT_006	t _{c1}	UT	vacB	172	-1,34	agucuucaaaagcaauugcggcuguaagaaaau

t_306	UT_101	t _{c2}	UT	MHP7448_0610	150	-7,1	cuuagaaaiaaaaaacacuaiaaaiauuauaguguaaiauuuaaaaaua
w_200	UT_102	t _{c2}	UT	MHP7448_0611	163	-6,64	acacuaiaaaiauuauaguguaaiauuuaiauuuc
a_382	UT_102	t _{c2}	UT	MHP7448_0611	164	-5,9	uuuaiaaaaaacacuaiaaaiauuauaguguaaiauuuaiauuucua
t_305	UT_102	t _{c2}	UT	MHP7448_0611	164	-7,1	uaiauuuaiaaaaaacacuaiaaaiauuauaguguaaiauuuaiauuucuaag
t_307	UT_102	t _{c1}	int.	rplL	41	-5,1	aaiauaaaiaucaaaaagguguaaiauaaacaccguaaiauuuguaaiauuuaiauuua
w_201	UT_102	t _{c1}	int.	rplL	96	-5,83	ccaiauaaaiauuuuucuaaiauaaiauuuuuuggaiauaaiauuuaia
wf_215	UT_103	t _{c4}	UT	MHP7448_0621	198	-3,11	gcuuaaiaucuguaaaggcuuaaiauaaiauu
w_202	mC_31	t _{c4}	mC	dam	195	-4,69	uggggaagaiauaiauuuuccauiauaaaccuu
w_203	mC_32	t _{c4}	mC	MHP7448_0626	90	-4,59	cacuaiaugaiauaiauuuuuaaaaaaguguccgguuuuc
w_093	UT_105	t _{c2}	UT	MHP7448_0628	109	-8,35	agcggcuugcgaucgccaiauuuaaagccguuuggaiauaaiauu
a_391	UT_105	t _{c2}	UT	MHP7448_0628	110	-7,9	caggaaiaaaagcggcuugcgaucgccaiauuuaaagccg
a_392	UT_106	t _{c1}	int.	MHP7448_0630	23	-7,8	uuuaiaaaaaagacacuaiauuugaguguguaaiauuuaiauuuaiauuua
w_204	UT_106	t _{c1}	int.	MHP7448_0630	23	-7,46	acacuaiauuugaguguguaaiauuuaiauuuaiauuua
t_310	UT_106	t _{c1}	int.	MHP7448_0630	24	-7,6	aaiauuuaiaaaaaagacacuaiauuugaguguguaaiauuuaiauuuaiauuua
wf_515	mC_33	t _{c1}	mC	gcp	111	-1,37	uggcgaiauaaiaucuguaaiauaiauuucuaaiauuuaiauuuaiauuua
wf_513	mC_33	t _{c4}	mC	gcp	190	-4,36	gcaaaaaiaucagguuaiauaaiaucuguaaiauaaiauuugcaaguaiauaa
w_094	UT_107	t _{c4}	UT	MHP7448_0634	214	-4,89	cuguaaiauuugaaagaacagcaiauuuaiauuuaiauuuaiauuua
w_206	UT_108	t _{c3}	UT	nusG	80	-4,68	ucacuaaiauuugugaiauaiauaiauaiauaiauaiauaiauaiauaiauaiaua
w_210	UT_108	t _{c1}	int.	rpmG	72	-4,98	ucgucuaaiauuuaaaaggaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa
w_209	UT_108	t _{c1}	int.	rpmG	105	-6,84	auggcuaagcggccguguaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa
w_208	UT_108	t _{c1}	int.	rpmG	182	-5,48	uugcaguaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa
w_207	UT_108	t _{c1}	int.	rpmG	200	-6,18	cggcacaiauaaiauuuggaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa
w_095	UT_109	t _{c3}	UT	MHP7448_0649	5	-6,55	aucccaiaaaaaaggguaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa
w_096	UT_109	t _{c3}	UT	MHP7448_0649	23	-4,6	uuccaaaaiauaaiauuuguaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa
w_097	UT_109	t _{c3}	UT	MHP7448_0649	43	-11,47	gugggaiaucgaaugggaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa
w_098	UT_109	t _{c3}	UT	MHP7448_0649	87	-8,16	cgugugcuuaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa
w_211	UT_110	t _{c2}	UT	MHP7448_t30	20	-8,18	aucccaiauaaiauuuggaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaaiauaa

Apêndice 3. Terminadores localizados nas mCs de *M. hyopneumoniae* 7448

mC	Gene	TransTerm HP	WebGesTer	ARNold	WebGesTer fraco
mC ₇₄₄₈ 1	MHP7448_0016				wf_233
mC ₇₄₄₈ 2	MHP7448_0017				wf_004
mC ₇₄₄₈ 3	uvrC	t_013	w_107		
mC ₇₄₄₈ 4	rbgA		w_016		
mC ₇₄₄₈ 5	MHP7448_0090	t_024 t_025		a_054	
mC ₇₄₄₈ 6	MHP7448_0094		w_018 w_019		
mC ₇₄₄₈ 7	MHP7448_0095				wf_261
mC ₇₄₄₈ 8	clpB	t_028	w_116 w_117		
mC ₇₄₄₈ 9	MHP7448_0119	t_054	w_123	a_082	
mC ₇₄₄₈ 10	MHP7448_0128				wf_039
mC ₇₄₄₈ 11	lip2	t_061 t_063	w_129		
mC ₇₄₄₈ 12	MHP7448_0200	t_094	w_139		
mC ₇₄₄₈ 13	mgtA				wf_323 wf_325
mC ₇₄₄₈ 14	MHP7448_0279	t_129	w_151		
mC ₇₄₄₈ 15	pyrG		w_053		
mC ₇₄₄₈ 16	MHP7448_0308				wf_107
mC ₇₄₄₈ 17	MHP7448_0336				wf_359
mC ₇₄₄₈ 18	MHP7448_0337		w_058		
mC ₇₄₄₈ 19	MHP7448_0344		w_157 w_158		
mC ₇₄₄₈ 20	MHP7448_0357	t_161 t_163 t_164	w_061	a_211	
mC ₇₄₄₈ 21	MHP7448_0390	t_185 t_186 t_188	w_168 w_169		
mC ₇₄₄₈ 22	MHP7448_0485		w_075		

mC ₇₄₄₈ 23	MHP7448_0522	t_266	w_079 w_080 w_081	a_338
mC ₇₄₄₈ 24	gyrA		w_082 w_083	
mC ₇₄₄₈ 25	ktrA			wf_478
mC ₇₄₄₈ 26	ktrB	t_278 t_281		wf_193
mC ₇₄₄₈ 27	MHP7448_0551	t_284 t_286	w_085	
mC ₇₄₄₈ 28	pdhD-1			a_353 wf_491
mC ₇₄₄₈ 29	nagA			wf_200
mC ₇₄₄₈ 30	pulA			wf_204
mC ₇₄₄₈ 31	dam		w_202	
mC ₇₄₄₈ 32	MHP7448_0626		w_203	
mC ₇₄₄₈ 33	gcp			wf_513 wf_515

Apêndice 4. Terminadores localizados nas UTs de *M. hyopneumoniae* 7448

UTs	Terminador ao final da UT				Genes da UT	Terminador interno		
	Transterm	WebGes Ter	ARNold	WebGes Ter fraco		Transterm	WebGes Ter	ARNold
UT_1		w_004			dnaA dnaN gidA MHP7448_0004 MHP7448_0005 MHP7448_0006 MHP7448_0007 ftsY MHP7448_0009 hrcA grpE argS MHP7448_0013 fba rluC	t_001 t_002 t_003 t_004 t_005	w_001 w_002 w_003	A_002 A_004 A_006
UT_2			A_009	wf_236	MHP7448_0018 MHP7448_0019 MHP7448_0020 MHP7448_0021 MHP7448_0022 MHP7448_0023 MHP7448_0024 MHP7448_0025		w_106	
UT_3		w_005	A_018		sipS gatC gatA gatB MHP7448_0030			
UT_4				wf_241	lsp ileS			

					parC parE			
--	--	--	--	--	--------------	--	--	--

UT_5				wf_008 wf_009	gap MHP7448_0036			
------	--	--	--	------------------	---------------------	--	--	--

UT_6				wf_244	vacB cls recA			
------	--	--	--	--------	---------------------	--	--	--

UT_7				wf_022	licA obgE MHP7448_0042 MHP7448_0043 MHP7448_0044 dinP MHP7448_0046 atpB atpE atpF atpH atpA-1 atpG atpD recU rpsB tsf ffh glyS dnaG rpoD MHP7448_0061 nfo tyrS MHP7448_0064 MHP7448_0065	t_009	w_006	
				wf_023	t_011		w_007 w_008 w_009 w_010	

UT_8	t_015	w_013	a_042		dnaK dnaJ cmk	t_014	w_011 w_012	
------	-------	-------	-------	--	---------------------	-------	----------------	--

	t_017				engA himA MHP7448_0072 lepA MHP7448_0074			
UT_9	t_016	w_108 w_109	a_040 a_041		fusA rpsG rpsL MHP7448_0078 MHP7448_0079 MHP7448_0080			
UT_10	t_020 t_021	w_014			MHP7448_0081 nox			
UT_11	t_019 t_022	w_110	a_048		deoA deoD MHP7448_0085 secA MHP7448_t1 MHP7448_t2 MHP7448_t3 MHP7448_t4 MHP7448_t5 MHP7448_t6 MHP7448_t7 MHP7448_t8 MHP7448_t9	w_111 w_112 w_113	a_050 a_051	
UT_12		w_114			MHP7448_0088 MHP7448_0089			
UT_13		w_115			uvrA MHP7448_0092 MHP7448_0093			
UT_14	t_029				MHP7448_t10 tpx lgt	w_020 w_021 w_022	a_057	

					trxB MHP7448_0099 MHP7448_0100			
UT_15					tpiA rpsO rnpB MHP7448_0105	t_030 t_032 t_033	w_023	a_066 a_068 a_070
UT_16					MHP7448_0106 MHP7448_0107 MHP7448_0108 gyrB MHP7448_0110 pfkA MHP7448_t11 MHP7448_t12	t_037 t_038 t_040 t_041 t_042 t_043 t_044	w_118 w_119 w_120	a_072 a_077
UT_17	t_047	w_026 w_027 w_028	a_081		MHP7448_0112 MHP7448_0113 apt pdhA pdhB	t_046	w_025	
UT_18	t_053	w_029	a_083		MHP7448_0117 MHP7448_0118			
UT_19	t_056	w_030	a_086		MHP7448_0120 MHP7448_0121			
UT_20	t_055 t_057	w_124	a_085		rpmB rplT rpml infC pyk MHP7448_0127		w_0125 w_0126 w_0127	

UT_21		w_0128			MHP7448_0129 ung			
UT_22	t_058 t_059 t_060 t_062	w_031	a_092		rplU rpmA			
UT_23	t_067 t_070	w_034 w_035	a_098		scr MHP7448_0135 MHP7448_0136 ldh		w_032 w_033	a_097
UT_24		w_036			MHP7448_0138 prfA hemK gltX MHP7448_0142 MHP7448_0143 MHP7448_0144	t_071 t_073		
UT_25		w_037			MHP7448_0145 MHP7448_0146 MHP7448_0147 MHP7448_0148 tig			
UT_26				wf_287	MHP7448_0150 rpe MHP7448_0152 gmk MHP7448_0154 MHP7448_0155 era cdd MHP7448_0158 MHP7448_0159 MHP7448_0160	t_075 t_076		
UT_27	t_084	w_039	a_115		deoB	t_078		

					MHP7448_0162 tlyA nifS MHP7448_0165 rluB	t_082	w_038	
--	--	--	--	--	--	-------	-------	--

UT_28	t_083	w_135	a_114		rplQ rpoA rpsK rpsM rpmJ infA map adk secY rplO rpsE rplR rplF rpsH rpsN rplE rplX rplN rpsQ rpmC rplP rpsC rplV rpsS rplB rplW rplD rplC rpsJ		w_136 w_137	a_119
-------	-------	-------	-------	--	--	--	--	-------

UT_29	t_092	w_041	a_129		MHP7448_0197 MHP7448_0198 MHP7448_0199	t_087 t_088 t_090	w_040	a_127
-------	-------	-------	-------	--	--	-------------------------	-------	-------

UT_30		w_042			alaS MHP7448_0202 MHP7448_0203 pth MHP7448_0205 ftsH lysS MHP7448_0208	t_095		
		w_043						

UT_31		w_140			trmE MHP7448_0210			
-------	--	-------	--	--	----------------------	--	--	--

UT_32	t_101	w_045	a_151		MHP7448_0211 oppB-1 oppC-1 oppD oppF-1 MHP7448_0216 MHP7448_0217		w_044	a_143
		w_046	a_152					

UT_33				wf_299	MHP7448_0219 MHP7448_0220 nrdE nrdI nrdF glyA	t_109	w_141 w_142	
-------	--	--	--	--------	--	-------	----------------	--

UT_34	t_111			wf_069	MHP7448_0225 ioIC ioIB MHP7448_0228 ioID ioIE mgIA MHP7448_0233 rbsB MHP7448_0235			
				wf_070				
				wf_071				

UT_35	t_113			wf_304	MHP7448_0237 MHP7448_0238			
	t_116			wf_305	MHP7448_0239		w_143	

					MHP7448_0240			
UT_36				wf_075 wf_076 wf_077 wf_078	secD hisS aspS MHP7448_0244 rpsT			
UT_37				wf_311 wf_312	MHP7448_0246 MHP7448_0247 MHP7448_0248 smf		w_144 w_145	a_166
UT_38		w_048			eno serS MHP7448_0252	t_118		
UT_39		w_146 w_147			lip lplA MHP7448_0255			
UT_40			a_169	wf_084	dnaX MHP7448_0257 recR tmk MHP7448_0260 MHP7448_0261 hpt cbiO MHP7448_0264 MHP7448_0265 lig MHP7448_0267		w_049	
UT_41	t_122	w_050			smpB MHP7448_0270			
UT_42	t_121	w_149 w_148 w_150			MHP7448_0271 MHP7448_0272			

UT_43		w_052			pheS pheT rpmF MHP7448_t16 MHP7448_t17 MHP7448_t18 MHP7448_t19 MHP7448_t20 truB MHP7448_0277 MHP7448_0278	t_124 t_125 t_126 t_128	w_051	
-------	--	-------	--	--	---	--	-------	--

UT_44				wf_329 wf_330	pgsA MHP7448_0282 topA rplS trmD rpsP MHP7448_0287	t_130	w_152	
-------	--	--	--	----------------------	--	-------	-------	--

UT_45			a_178		MHP7448_0289 MHP7448_0290 MHP7448_0291 MHP7448_0292		w_054	
-------	--	--	-------	--	--	--	-------	--

UT_46				wf_335 wf_337	ychF rpsR ssb rpsF MHP7448_0297 MHP7448_0298	t_135		
-------	--	--	--	----------------------	---	-------	--	--

UT_47		w_055 w_056			MHP7448_0299 MHP7448_0300 MHP7448_0301 MHP7448_0302 ugpQ			a_182
-------	--	--------------------	--	--	--	--	--	-------

UT_48				wf_340	MHP7448_0305 MHP7448_0306			
-------	--	--	--	--------	------------------------------	--	--	--

					MHP7448_0307			
UT_49					baiH lplA-1 MHP7448_0311 MHP7448_0312			
UT_50		w_057	a_191		MHP7448_0313 MHP7448_0314 MHP7448_0315 MHP7448_0316 MHP7448_0317 MHP7448_0318 MHP7448_0319 MHP7448_0320 MHP7448_0321	t_138 t_139 t_144		
UT_51		w_154			MHP7448_0324 MHP7448_0325 MHP7448_0326 MHP7448_0327			
UT_52					MHP7448_0328 MHP7448_0329 MHP7448_0330			
UT_53				wf_355 wf_356	MHP7448_0331 MHP7448_0332 MHP7448_0333	t_145 t_146	w_155	
UT_54			a_195		MHP7448_0334 MHP7448_0335			
UT_55				wf_361	MHP7448_0338 MHP7448_0339 MHP7448_0340 MHP7448_0341 MHP7448_0342		w_156	
UT_56		w_059			MHP7448_0345			

					MHP7448_0346 MHP7448_0347			
UT_57	t_153 t_154	w_159			MHP7448_t21 MHP7448_t22 MHP7448_0348 MHP7448_0349 MHP7448_0350 MHP7448_0351	t_156 t_158		a_203
UT_58	t_160	w_060	a_207		MHP7448_0352 MHP7448_0353 hit			
UT_59		w_160	a_206		MHP7448_0355 MHP7448_0356			
UT_60	t_162		a_210	wf_375	glpF glpK			
UT_61	t_170 t_171 t_172	w_064			MHP7448_0360 MHP7448_0361 MHP7448_0362 MHP7448_0363 MHP7448_0364 MHP7448_0365 MHP7448_0366 MHP7448_0367 MHP7448_0368 MHP7448_0369 MHP7448_0370 MHP7448_0371	t_165	w_062 w_063	a_214
UT_62	t_173	w_161 w_162 w_163			MHP7448_0372 MHP7448_0373 sgaA MHP7448_0375 ulaA MHP7448_0377 MHP7448_0378	t_174 t_177 t_178 t_179 t_180	w_164 w_165 w_166	a_224

UT_63	t_184	w_065			MHP7448_0379 MHP7448_0380 MHP7448_0381 MHP7448_0382 MHP7448_0383	t_181		
UT_64	t_183	w_167			MHP7448_0384 proS MHP7448_t23 MHP7448_t24			
UT_65	t_187 t_189				MHP7448_0387 MHP7448_0388 MHP7448_0389			
UT_66				wf_136 wf_137	MHP7448_0391 MHP7448_0392 ftsZ MHP7448_0394 MHP7448_0395 metG	t_190	w_066	a_233
UT_67				wf_386 wf_387 wf_388	MHP7448_0397 rnc MHP7448_0399	t_192		
UT_68				wf_140 wf_141 wf_143	MHP7448_0400 asnC MHP7448_0402 pcrA MHP7448_0404 ruvA ruvB	t_194 t_197	w_067 w_068	a_237
UT_69		w_170			MHP7448_0407 MHP7448_0408 MHP7448_0409 MHP7448_0410 MHP7448_0411 MHP7448_0412 MHP7448_0413	t_198	w_172	

		w_171			MHP7448_0414 MHP7448_0415 trsE MHP7448_0417 MHP7448_0418 MHP7448_0419 MHP7448_0420 MHP7448_0421 MHP7448_0422 MHP7448_0423 MHP7448_0424 MHP7448_0425 MHP7448_0426	t-202 t_203	w_173 w_174 w_175	a_248
--	--	-------	--	--	--	--------------------	---------------------------------	-------

UT_70		w_069			efp tkf MHP7448_0429 mnmA	t_205 t_206		
-------	--	-------	--	--	------------------------------------	----------------	--	--

UT_71	t_207	w_176			MHP7448_0431 MHP7448_0432 MHP7448_0433 MHP7448_0434 MHP7448_0435 araD sgaU ulaD MHP7448_0439 MHP7448_0440	t_208 t_209 t_214	w_177 w_178	
-------	-------	-------	--	--	--	-----------------------------	--------------------	--

UT_72					MHP7448_0441 MHP7448_0442			a_260
-------	--	--	--	--	------------------------------	--	--	-------

UT_73	t_217				MHP7448_0443 MHP7448_0444 MHP7448_0445	t_220 t_221	w_179	a_263 a_266
-------	-------	--	--	--	--	----------------	-------	----------------

UT_74	t_232 t_233				MHP7448_0446 MHP7448_0447		w_070 w_071 w_072	a_280
-------	----------------	--	--	--	------------------------------	--	-------------------------	-------

	t_234				MHP7448_0448		w_073	
UT_75	t_229 t_230 t_231				engB MHP7448_0450 MHP7448_t25 metK MHP7448_0452 MHP7448_0453			a_282
UT_76				wf_161 wf_164 wf_165	acpD acpD-1 rpmE napA rluD			
UT_77		w_180 w_181			rplA rplK MHP7448_t26 MHP7448_t27		w_182	
UT_78					MHP7448_0461 MHP7448_0462 MHP7448_0463			
UT_79					pepA trmB MHP7448_0466 MHP7448_0467 MHP7448_0468 MHP7448_0469 MHP7448_0470	t_237 t_238 t_239 t_240	w_183	
UT_80	t_243	w_074			MHP7448_0471 ptsI nadE MHP7448_0474	t_241		
UT_81	t_242	w_184			pfs			

					nadD MHP7448_0477 atpD atpA MHP7448_0480 MHP7448_0481 MHP7448_0482 MHP7448_0483 MHP7448_0484	t_244	w_185	
UT_82	t_247	w_186			MHP7448_0486 mgtE MHP7448_0488 MHP7448_0489	t_251	w_187	
UT_83	t_252		a_310		pgk MHP7448_0491 fruA MHP7448_0493 MHP7448_0494			
UT_84	t_256	w_188	a_311 a_313		MHP7448_0496 MHP7448_0497 MHP7448_0498 MHP7448_0499 MHP7448_0500 oppF oppD-1 oppC oppB MHP7448_0505	t_257	w_189	
UT_85	t_259 t_261	w_076 w_077	a_329		pdhC pdhD			
UT_86	t_260	w_190 w_191	a_330		ackA eutD MHP7448_0510 MHP7448_0511 MHP7448_0512		w_192 w_193	

UT_87				wf_179	MHP7448_0513 xylG xylH MHP7448_0516 glck		w_078	a_334
UT_88				wf_463	MHP7448_0518 MHP7448_0519 MHP7448_0520 pepF			
UT_89	t_263 t_264 t_265	w_194	a_337		tuf lon MHP7448_0525 upp deUT	t_267 t_268 t_270 t_271	w_195	
UT_90				wf_471 wf_472	pmsR MHP7448_0530 pgi polC MHP7448_0533 frr pyrH			a_342
UT_91				wf_185 wf_186	MHP7448_0536 MHP7448_0537			
UT_92	t_274	w_196			MHP7448_0538 MHP7448_0539 potC potB potA	t_276		
UT_93				wf_190	MHP7448_0543 MHP7448_0544			
UT_94	t_279			wf_479	MHP7448_0547 mtlF	t_282 t_283	w_197	a_346

	t_280				mtlD mtlA			
UT_95	t_285	w_198			ulaA MHP7448_0553 MHP7448_0554 MHP7448_0555 MHP7448_0556 MHP7448_0557 MHP7448_0558	t_287		
UT_96				wf_197	MHP7448_0569 MHP7448_0570			
UT_97				wf_493	fba-1 MHP7448_0574 nagB			a_356
UT_98			a_357	wf_202 wf_203	rpsD rpiB fpg	t_295	w_086	
UT_99		w_199			MHP7448_0579 mnuA MHP7448_0581 dnaE rbfA infB MHP7448_0585 nusA			a_358
UT_100				wf_496	glpD thrS trpS			
UT_101	t_306	w_092	a_383		MHP7448_0591 MHP7448_0592 rnhB MHP7448_0594 pgm MHP7448_0596	t_297		

					MHP7448_0597 MHP7448_0598 MHP7448_0599 MHP7448_0600 MHP7448_r1 MHP7448_0601 MHP7448_0602		w_087	
					ppa	t_298	w_088	a_372
					xyIF	t_299	w_089	a_374 a_376
					MHP7448_0605 MHP7448_0606 MHP7448_0607			
					tdk	t_300		
					MHP7448_t28		w_090	
					ptsH	t_302 t_303 t_304	w_091	a_379 a_381
					MHP7448_0610			

UT_102	t_305	w_200	a_382		MHP7448_0611 MHP7448_0612 MHP7448_0613 ddem MHP7448_0615 rpUT rpoB rplL rplJ	t_307	w_201	
--------	-------	-------	-------	--	--	-------	-------	--

UT_103				wf_215	MHP7448_0620 MHP7448_0621			
--------	--	--	--	--------	------------------------------	--	--	--

UT_104					MHP7448_0623 MHP7448_0624			
--------	--	--	--	--	------------------------------	--	--	--

UT_105		w_093	a_391		MHP7448_0627 MHP7448_0628			
--------	--	-------	-------	--	------------------------------	--	--	--

UT_106					MHP7448_0629 MHP7448_0630	t_310	w_204	a_392
--------	--	--	--	--	------------------------------	-------	-------	-------

UT_107		w_094			plsC scpA scpB MHP7448_0634			
--------	--	-------	--	--	--------------------------------------	--	--	--

UT_108		w_206			nusG rpmG MHP7448_0639 MHP7448_0640 cysS MHP7448_0642 MHP7448_0643 dnaB rplI MHP7448_0646 leuS		w_207 w_208 w_209 w_210	
--------	--	-------	--	--	--	--	----------------------------------	--

UT_109		w_095 w_096 w_097 w_098			uvrB MHP7448_0649			
--------	--	----------------------------------	--	--	--------------------------	--	--	--

UT_110	t_313	w_211			MHP7448_t30 rpsI rplM ksgA MHP7448_0653	t_314 t_315	w_212	
--------	-------	-------	--	--	---	----------------	-------	--

UT_111	t_323		a_414	wf_227	prsA gidB MHP7448_0656 MHP7448_0657 rpmG pepP MHP7448_0660 MHP7448_0661	t_218 t_219 t_220	w_099 w_100 w_101	a_411
--------	-------	--	-------	--------	--	-------------------------	-------------------------	-------

UT_112	t_324	w_213	a_413		MHP7448_0662 MHP7448_0663		w_214	
UT_113	t_325 t_326 t_327	w_102 w_103	a_425		MHP7448_0664 MHP7448_0665			
UT_114	t_328	w_215 w_216 w_217 w_218	a_424 a_426		MHP7448_r2 MHP7448_r3		w_219	
UT_115					MHP7448_0666 MHP7448_0667 greA MHP7448_0669 MHP7448_0670 MHP7448_0671 valS	t_330	w_104 w_105	a_431
UT_116	t_332	w_222			MHP7448_0674 MHP7448_0675 MHP7448_0676 rnpA rpmH			a_437

CURRICULUM VITAE

Tiago Ebert Fritsch

Dados pessoais

Nome Tiago Ebert Fritsch
Nascimento 21/01/1989 - Quinze de Novembro/RS - Brasil
E-mail tefritsch@msn.com

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Transcrição em micoplasmas: predição de terminadores
Orientador: Irene Silveira Schrank
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2008 - 2011** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Caracterização do sistema salRCBA para metabolização de salicina em *Azospirillum amazonense*
Orientador: Irene Silveira Schrank
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

- 2012 - Atual** Vínculo: Mestrando , Enquadramento funcional: Mestrando, Regime: Dedicção exclusiva
- 2008 - 2010** Vínculo: Bolsista Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Estagiario , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

- 05/2012 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia
Linhas de pesquisa:
*Identificação de terminadores da transcrição em *Mycoplasma hyopneumoniae**
- 03/2008 - 12/2010** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia
Linhas de pesquisa:
*Caracterização do sistema salRCBA para metabolização de salicina em *Azospirillum amazonense**

2. Policlínica Militar de Porto Alegre - PMPA

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiario , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

07/2010 - 01/2011 Estágio, Laboratório de Análises Clínicas

*Estágio:
Análises Clínicas*

Linhas de pesquisa

1. Caracterização do sistema salRCBA para metabolização de salicina em *Azospirillum amazonense*
2. Identificação de terminadores da transcrição em *Micoplasma hyopneumoniae*

Projetos

Projetos de pesquisa

2012 - Atual Identificação de terminadores da transcrição em *Micoplasma hyopneumoniae*

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);
Integrantes: Tiago Ebert Fritsch (Responsável); ; Irene Silveira Schrank;
Franciele Maboni Siqueira

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **FRITSCH, T. E.**, Cecagno, R., Schrank, I. S.
Análise de genes relacionados ao metabolismo de uréia e salicina em *Azospirillum amazonense* In: XXIII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2011, Porto Alegre.
Livro de Resumos - XXIII Salão de Iniciação Científica e XX FERIA de Iniciação Científica UFRGS. , 2011.
2. **FRITSCH, T. E.**, Cecagno, R., Schrank, I. S.
Análise de genes relacionados ao metabolismo de uréia em *Azospirillum amazonense*. In: XXII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2010, Porto Alegre.
Livro de Resumos - XXII Salão de Iniciação Científica e XIX FERIA de Iniciação Científica UFRGS. , 2010.
3. **FRITSCH, T. E.**, Cecagno, R., Schrank, I. S.
Clonagem e expressão dos genes *acdRS* de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 em *Azospirillum brasilense* In: XXI Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2009, Porto Alegre.
Livro de Resumos - XXI Salão de Iniciação Científica e XVIII FERIA de Iniciação Científica UFRGS. , 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **FRITSCH, T. E.**, Cecagno, R., Schrank, I. S.
ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE UREASE EM AZOSPIRILLUM
AMAZONENSE. In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada e I Encontro Latino Americano de
Microbiologia, 2010, Porto Alegre.
**Livro de resumos - IV Simpósio de Microbiologia Aplicada e I Encontro Latino
Americano de Microbiologia.** , 2010.