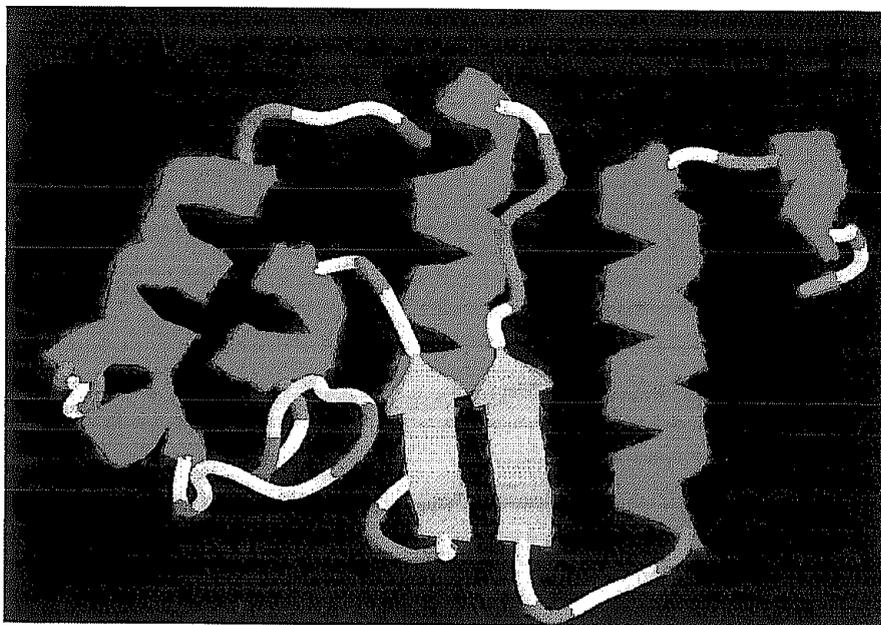


Daniela Almeida Freitas

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES *exsA* (“ABC
TRANSPORTER PROTEIN”) E *ccpA* (“CATABOLITE CONTROL
PROTEIN”) DA *Brucella abortus***



Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Vasco Azevedo

Co-Orientador: Prof. Sergio Costa Oliveira

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

2001

UFMG

100

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Dissertação defendida e aprovada, em 26 de janeiro de 2001, pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Prof. Nivaldo da Silva

Profa. Andréa Maria Amaral Nascimento

Prof. Edmar Chartone de Souza

Sérgio Costa Oliveira

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo constante apoio, confiança, incentivo e carinho, ao Rubinho pelo amor e compreensão sempre presentes, e ao meu orientador pelos ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento do mesmo

Agradecimentos

- Ao meu orientador, Professor Vasco Azevedo, por ter acreditado em meu trabalho e pelo apoio e ensinamentos durante todos estes três anos de convívio.
- Ao meu co-orientador, Professor Sergio Costa Oliveira, pelo constante apoio e ensinamentos durante todo este tempo.
- Aos professores Andréa Amaral, Edmar Chartone e Nivaldo da Silva, por participarem da banca examinadora.
- Ao Professor Alan Lane de Melo e à Luciana Ribeiro, pelas correções desta dissertação.
- À professora Ana Lucia B. Godard, pelo convívio e ajuda.
- Aos colegas do Laboratório de Genética Celular e Molecular: Anderson, Dani II, Mônica, Maria Rosa, Lino, Karla, Bruno, Elias, Rachel, Michelyne pela amizade sempre presente, pelo apoio, pelas risadas e pela união que é nossa grande aliada hoje e sempre!!! Contem sempre comigo, adoro vocês do fundo do meu coração!!!
- Às amigas do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas: Kika, Cristiana, Maria Cristina, Adriana, Grácia, Sophie, pelo constante apoio em tudo que precisei durante todos estes anos, pela amizade e carinho que vocês sempre tiveram comigo!!! Contem comigo para o que der e vier, sempre!!!
- Às amigas da turma de Mestrado: Flávia, Cláudia, Daiane, Vaninha, Vilminha, Lu Cursino, pela amizade, companheirismo, compreensão e apoio durante todo este tempo.
- Aos grandes aliados, Kátia, Narciso, Jamil e S. Carlos, pela constante ajuda e dedicação.
- À Marina pela alegria e disposição em ajudar sempre que necessário.
- Ao Professor Paulo Marcos, chefe do GIDE e a todos funcionários pelo apoio.
- À Dolores pelo apoio, sorriso e pela alegria sempre presentes ao me encontrar.
- À Coordenadora da Pós-Graduação em genética, Professora Maria Bernadete Lovato e a todos os professores de Genética pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.
- Aos amigos Débora e Túlio pelo constante apoio e por estarem sempre presentes quando eu precisava de alguma coisa.
- Aos meus pais, torcedores de carteirinha pelo meu sucesso, simplesmente pela vida maravilhosa que vocês me proporcionam, pelo apoio, amor, carinho, incentivo, compreensão, por acreditarem em mim, sempre, e também pelo exemplo!!! Se hoje estou

aqui é porque vocês souberam me educar como nenhum outro pai e mãe saberiam!!!
Amo vocês!!!

- Ao Rubinho, por todo amor, compreensão, ajuda, apoio, incentivo, sem você, chegar onde cheguei seria impossível!!! Amo você demais!!!
- Aos meus avós Didi e Dadá, pelo constante apoio e amor que vocês têm sempre comigo. E você Didi, obrigada pelas correções desta dissertação Amo vocês!!!
- Ao meu irmão, que acha que eu sempre trabalho demais, pela amizade que nos une não somente por sermos irmãos, mas também por sermos realmente amigos... Amo você!!!
- À Dani Blaso, pelo apoio sempre presente e pela torcida sempre verdadeira e aos amigos do coração Chris e Lu, pela amizade e pela descontração quando eu mais precisava!!!
- Às amigas Júlia e Marcinha pelo convívio, amizade e apoio incondicional não só durante o tempo na PUC e na UFMG como também em todos aqueles momentos valiosos de uma amizade!!!
- Ao Professor Enemir e à “Tia Sandra” pelo primeiro empurrão no meio científico e pelo apoio, amizade e incentivo incondicionais. Vocês não têm idéia o quanto vocês me ajudaram e ajudam até hoje!!! Obrigada...
- Enfim, a todos aqueles que acreditaram em mim e de uma forma ou de outra contribuíram na realização deste trabalho, o meu muito obrigada!!!

Sumário

Lista de abreviaturas.....	I
Lista de Figuras.....	III
Lista de Tabelas.....	V
Resumo.....	VI
Summary.....	VII
Introdução.....	001
1. Descobrimto do agente etiológico da brucelose.....	001
2. Características do gênero <i>Brucella</i>	001
3. Considerações taxonômicas.....	002
4. Genoma do gênero <i>Brucella</i>	004
5. Brucelose.....	006
5.1. Profilaxia.....	007
5.1.1. Vacinas.....	007
5.2. Tratamento.....	009
6. Patogênese.....	009
7. Virulência.....	011
7.1. Estratégias moleculares para identificação de fatores de virulência.....	013
7.2. Genes da <i>Brucella</i> envolvidos em sua virulência.....	017
8. Transportadores ABC (ATP-binding cassette).....	020
8.1. Polissacarídeos.....	024
9. Repressão catabólica.....	026
Justificativa e Objetivos.....	029
Material e Métodos.....	031
1. Isolamento do clone 64.....	031
1.1. Linhagens bacterianas utilizadas.....	031
1.2. Meios de cultura.....	031
1.3. Biblioteca genômica da <i>B. abortus</i>	031
1.4. Obtenção de bactérias eletrocompetentes e eletrotransformação.....	031
1.5. Extração e dosagem do DNA plasmidiano.....	032

1.6. Sequenciamento.....	033
1.7. Pesquisa de homologia em banco de dados.....	034
2. Caracterização molecular do clone 64.....	034
2.1. Extração de DNA plasmidiano em larga escala.....	034
2.2. Digestão enzimática.....	035
2.3. Resolução eletroforética.....	035
2.4. Purificação dos fragmentos de DNA.....	036
2.5. Subclonagem dos fragmentos do clone 64 em pUC18 <i>SmaI</i> /BAP.....	036
2.6. Verificação da presença e tamanho dos insertos dos subclones..	036
2.7. Organização da estrutura primária do clone 64.....	037
3. Determinação do número de cópias do gene <i>exsA</i>	038
3.1. Extração do DNA genômico da <i>B. abortus</i>	038
3.2. Digestão enzimática do DNA genômico e fracionamento eletroforético.....	039
3.3. “Southern Blot”.....	039
3.4. Marcação radioativa do fragmento do gene <i>exsA</i>	040
3.5. Hibridização.....	040
3.5.1. Pré-hibridização.....	040
3.5.2. Hibridização e lavagens das membranas.....	040
4. Construção de um plasmídeo suicida para mutagênese do gene <i>exsA</i> da <i>B. abortus</i>	041
4.1. Obtenção do gene que confere resistência à canamicina.....	041
4.2. Clonagem do gene que confere resistência à canamicina no clone 64.....	041
4.3. Inativação do gene <i>exsA</i> em <i>B. abortus</i>	042
4.3.1. Preparação de células eletrocompetentes da <i>B. abortus</i> S19.....	042
4.3.2. Eletroporação.....	042
5. Expressão da proteína ExsA.....	043
5.1. Clonagem do gene <i>exsA</i> no vetor pProEX HTb.....	043
5.2. Expressão da proteína ExsA no vetor pProEX HTb.....	044
5.2.1. Experimento piloto.....	044

5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	044
5.4. “Western Blot”.....	045
Resultados e Discussão	046
1. Identificação e isolamento do gene <i>exsA</i> da <i>B. abortus</i>	046
1.1. Geração das GSS (“Genome Survey Sequence”).....	046
2. Caracterização molecular do clone 64.....	058
2.1. Mapa de restrição.....	058
2.2. “Primer Walking”.....	060
2.3. Ordenamento clonal.....	060
2.4. Seqüência nucleotídica do clone 64.....	063
3. Gene <i>exsA</i> da <i>B. abortus</i>	069
3.1. Análise de homologia.....	069
3.2. Motivos protéicos presentes no gene <i>exsA</i>	070
3.3. Estrutura secundária.....	074
3.4. Análise de hidrofobicidade.....	076
3.5. Modelagem computacional da seqüência protéica do gene <i>exsA</i>	078
3.6. Transporte de polissacarídeos.....	081
3.7. Determinação do número de cópias do gene <i>exsA</i> no genoma da <i>B. abortus</i>	083
3.8. Obtenção de mutantes <i>exsA</i> da <i>B. abortus</i>	086
3.8.1. Inserção do gene que confere resistência à cana- micina no gene <i>exsA</i> da <i>B. abortus</i>	086
3.8.2. Eletroporação da <i>B. abortus</i>	090
3.9. Expressão da proteína ExsA recombinante da <i>B. abortus</i>	091
3.9.1. Amplificação da seqüência parcial do gene <i>exsA</i> da <i>B. abortus</i>	091
3.9.2. Expressão do clone pProEX: <i>exsA</i>	093
3.9.3. “Western Blot”.....	096
4. Gene <i>ccpA</i> da <i>B. abortus</i>	098
4.1. Análise de homologia.....	098
4.2. Motivos protéicos presentes no gene <i>ccpA</i>	101

Conclusões.....	103
Perspectivas.....	104
Referências Bibliográficas.....	105
Figuras Anexas.....	115
Tabelas Anexas.....	122

Lista de Abreviaturas

µg	Micrograma (10^{-6} g)
µl	Microlitro (10^{-6} L)
ABC	ATP-binding cassette
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BB	“ <i>Brucella</i> Broth” (meio <i>Brucella</i>)
CR	Repressão catabólica
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
EDTA	Etileno diamino tetra-acetato dissódico
EPS I	exopolissacarídeo, polissacarídeo extracelular, ou succinoglicano
EST	Etiquetas de Seqüências Transcritas
GFPuv	Proteína fluorescente verde
GMP	Guanosina monofosfato
GSS	“Genome Survey Sequence”
HMW	Alto peso molecular
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
IS	Seqüências de inserções
IVET	Tecnologia de Expressão “ <i>in vivo</i> ”
Kb	Quilobases (10^3 pb)
KDa	QuiloDalton (10^3 Da)
LB	Meio Luria Bertani
LMW	Baixo peso molecular
LPS	Lipopolissacarídeo
mA	MiliAmper
Mb	Megabases (10^6 pb)
ml	Mililitro (10^{-3} L)
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
ng	Nanograma (10^{-9} g)

OMP	Proteína de membrana externa
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsátil
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SD	“Shine-Dalgarno”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STM	“Signature-Tagged Mutagenesis”
TE	Tris-EDTA
UFC	Unidade formadora de colônia
V	Volts
W	Watts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

Lista de Figuras

Gráfico 1: Prováveis funções das GSS da <i>B. abortus</i>	056
Gráfico 2: Homologia das seqüências da <i>Brucella</i> e outros organismos às GSS da <i>B. abortus</i>	057
Figura 1: Mapa do vetor pBBR1MCS.....	116
Figura 2: Organização dos transportadores ABC.....	022
Figura 3: Mapa do vetor pUC12.....	117
Figura 4: Mapa do vetor pUC18.....	118
Figura 5: Mapa do vetor pUC4K.....	119
Figura 6: Mapa do vetor pBluescript II SK+/-.....	120
Figura 7: Mapa do vetor pProEX HTb.....	121
Figura 8: Mapa de restrição do clone 64.....	059
Figura 9: Mapa de restrição do clone 64 e ordenamento dos seus subclones.....	062
Figura 10: Seqüência nucleotídica do inserto do clone 64.....	065
Figura 11: Organização estrutural dos genes <i>exoB</i> , <i>exsA</i> e <i>exsB</i> de <i>R. meliloti</i> e <i>exsA</i> e <i>ccpA</i> da <i>B. abortus</i> e seus produtos traduzidos.....	068
Figura 12: Representação esquemática dos domínios transmembrânico e citoplasmático da seqüência protéica ExsA da <i>B. abortus</i>	072
Figura 13: Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos das proteínas transportadoras ABC da <i>B. abortus</i> (Ba) e <i>R. meliloti</i> (Rm)....	073
Figura 14: Estrutura transmembrânica da proteína ExsA da <i>B. abortus</i>	075
Figura 15: Perfil de hidropatia da proteína ExsA da <i>B. abortus</i>	077
Figura 16: Modelagem da estrutura tridimensional parcial da proteína ExsA.....	080
Figura 17: “Southern Blot”.....	085
Figura 18: Confirmação da inserção do cassete de canamicina no plasmídeo suicida.....	087
Figura 19: Esquema do clone 64:Kan.....	088
Figura 20: Esquema da seqüência parcial do clone 64:Kan.....	089

Figura 21: Confirmação da clonagem do gene <i>exsA</i> da <i>B. abortus</i> no vetor de expressão pProEX HTb.....	092
Figura 22: Tentativa de expressão da proteína ExsA em <i>E. coli</i> DH5 α ..	094
Figura 23: Cinética da expressão do clone pProEX: <i>exsA</i>	095
Figura 24: Análises através de SDS-PAGE e “Western Blot” da tentativa de expressão da proteína ExsA do clone pProEX: <i>exsA</i>	097
Figura 25: Alinhamento múltiplo das seqüências protéicas dos genes <i>ccpA</i> e seus homólogos.....	100
Figura 26: Representação esquemática dos domínios da seqüência protéica CcpA da <i>B. abortus</i>	102

Lista de Tabelas

Tabela 1: GSS da <i>B. abortus</i> obtidas no Programa de Descoberta Gênica.....	049
Tabela 2: Número de GSS depositadas no banco de dados, exemplificando alguns organismos.....	123
Tabela 3: Sítios utilizados nas análises computacionais do clone 64.....	124
Tabela 4: Subclones do clone 64.....	061
Tabela 5: BlastX do gene <i>exsA</i> da <i>B. abortus</i>	069
Tabela 6: BlastX do gene <i>ccpA</i> da <i>B. abortus</i>	098

Resumo

Brucella abortus é um patógeno intracelular facultativo que infecta animais e o homem. As bases moleculares da virulência deste microrganismo começaram a ser desvendadas recentemente. Com o objetivo de identificar novos fatores de virulência da *Brucella*, foi criado em 1998 pelos Laboratórios de Genética Celular e Molecular e Imunologia das Doenças Infecciosas da UFMG um programa de descoberta gênica, que baseia-se no sequenciamento aleatório de extremidades de clones de uma biblioteca genômica da *B. abortus* 2308. Em julho de 2000, o “National Center of Biotechnology Institut” (NCBI) criou um novo banco de dados destinado a receber as seqüências geradas por programas semelhantes a este denominado “Genome Survey Sequence” (GSS). A criação desta nova divisão do NCBI mostra a importância dos dados fornecidos por estas seqüências. Análises da seqüência nucleotídica e protéica destas extremidades revelaram um clone (clone 64) com alta homologia ao gene *exxA* de *Rhizobium meliloti*. A seqüência de aminoácidos deste gene apresenta alta homologia às proteínas ABC (ATP-binding cassette) transportadoras e suas funções estão provavelmente envolvidas na biossíntese e transporte através da membrana do succinoglicano (EPS I). A produção e o transporte deste composto em *R. meliloti* é essencial à sua invasão em seus hospedeiros. O clone 64 possui 1791pb do gene *exxA* da *B. abortus*, o que representa 99% da região codificadora do mesmo e sua seqüência parcial foi depositada em banco de dados sob número de acesso AF218367. Análises de “Southern Blot” revelaram que o gene *exxA* está presente em cópia única no genoma da *B. abortus*. Com o objetivo de verificar o papel deste gene na virulência na *B. abortus*, o cassete de canamicina foi clonado no sítio *EcoRV* do clone 64, interrompendo o gene *exxA* e possibilitando a construção de mutantes do mesmo neste microrganismo. Estudos posteriores revelaram a existência de um segundo gene presente no mesmo clone, denominado gene *ccpA* (catabolite control protein). Este gene possui 1026pb e codifica uma proteína envolvida no controle da expressão gênica e sua seqüência será brevemente depositada em banco de dados.

Summary

B. abortus is a facultative intracellular pathogen which infect animals as well as humans. The genetic basis of *B. abortus* virulence is still unknown. In order to identify new virulence factors, a gene identification program created in 1998 was taken. This approach is based on sequencing of the end of random clones from a *B. abortus* 2308 genomic library. In July of 2000, the "National Center of Biotechnology Institut", NCBI, created a new GenBank division called "Genome Survey Sequence" to receipt all kind of sequences derived from similars projects. Nucleotide and amino acid sequence of one clone (clone 64) were analysed and showed a high homology with the *Rhizobium meliloti exsA* gene. The amino acid sequence of this gene shows significant homology to ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins and its function is probably involved in succinoglycan (EPS I) biosynthesis and transport across the membrane. The production and transport of this EPS I in *R. meliloti* is essential for its invasion in alfafa root nodules. The *B. abortus exsA* gene has 1791 bp, which represents 99% of the coding region of this gene and it was deposited in the GenBank with the accession number AF218367. Southern Blot analysis revealed that *exsA* gene is present as a single copy in the *B. abortus* genome. In order to verify the role in virulence of *B. abortus exsA* gene, a kanamycin cassette was cloned in the *EcoRV* site of the gene to construct *exsA B. abortus* mutants. The *ccpA* (catabolite control protein) gene, which has 1206pb, is also present in this clone.

Introdução

1. Descobrimto do agente etiológico da brucelose

No ano de 1887, David Bruce isolou pela primeira vez o microrganismo causador da “Febre de Malta”, uma enfermidade muito difícil de diferenciar sintomática e clinicamente de outras febres endêmicas do litoral Mediterrâneo e que causava grande debilidade física e levava à morte alguns soldados ingleses residentes nesta ilha. O agente desta patologia era uma bactéria que foi denominada, pelo seu descobridor, *Micrococcus melitensis*. Posteriormente, foi descoberto que a mesma era transmitida através do consumo de leite de cabras residentes no local (Bruce, 1887).

Em 1895, Bernhard Bang isolou, proveniente de um caso de aborto bovino, um cocobacilo Gram-negativo, o qual foi denominado “*Bacillus abortus*”. Algum tempo depois observou-se um grande parentesco entre ambos microrganismos e decidiu-se denominar este novo gênero, *Brucella*, em homenagem ao seu descobridor, David Bruce (Meyer, 1990). Ambos microrganismos eram capazes de infectar homens e animais, sendo a brucelose considerada assim uma zoonose.

2. Características do gênero *Brucella*

A família Brucellae é constituída de pequenos coco-bacilos Gram-negativos, sem motilidade, sem flagelos, não secretam toxinas, e causam doença infecciosa que afeta diversas espécies animais e o homem. É muito resistente a intempéries ambientais e pode sobreviver grandes períodos no meio ambiente (Crawford *et al.*, 1990). A *Brucella* é catalase positiva e apresenta reação de oxidase geralmente positiva. A produção de H₂S e a atividade ureásica variam segundo as espécies. O citrato não é utilizado e o triptofano não é catabolizado (Freney *et al.*, 2000). Seu crescimento é aeróbico, mas algumas espécies requerem uma atmosfera com adição de 5 a 10% de CO₂. Crescem bem a 37°C, em meio rico, com pH entre 6,6 e 7,4. Em meio líquido, as culturas se mostram turvas de maneira homogênea de dois a quatro dias. As colônias tornam-se visíveis em meio sólido em dois ou três dias, podendo apresentar-se sob forma lisa ou rugosa, dependendo da linhagem, e redondas

medindo de 3 a 4 mm de diâmetro (Alton *et al.*, 1988). Sua multiplicação se dá dentro do animal hospedeiro ou em meio de cultura, sendo então considerado um parasita intracelular facultativo. Possui a capacidade de invadir e replicar-se em células de origem ecto e mesodérmica (Smith & Ficht, 1990).

Semelhante a outras bactérias Gram-negativas, *Brucella* possui uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos (LPS) que é considerado o principal fator de virulência deste gênero. Uma característica que a diferencia de outras bactérias Gram-negativas, principalmente das entéricas, é que o lipopolissacarídeo é altamente hidrofóbico e possui diferentes sensibilidades a detergentes e EDTA (Moriyón & Berman, 1982; Martínez de Tejada & Moriyón, 1993).

Brucella compartilha a mesma estrutura antigênica daquela apresentada pela maioria dos bacilos Gram-negativos. Os antígenos A (*B. abortus*) e M (*B. melitensis*) estão situados na superfície de linhagens lisas (S) sobre um único complexo: o lipopolissacarídeo (LPS-S). Estes antígenos estão presentes em quantidades variáveis segundo as espécies e se encontram ausentes nas linhagens rugosas (R). O antígeno LPS-S apresenta reações cruzadas com outras bactérias como *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, e outros (Freney *et al.*, 2000).

A identificação das diferentes espécies da *Brucella* pode ser realizada através de uma bateria clássica de ensaios bioquímicos e por identificação molecular. O primeiro baseia-se em diferentes características metabólicas (urease, oxidase, produção de H₂S), colorações, especificidade sorológica e sensibilidade a fagos (Corbel, 1997). Já a identificação molecular das mesmas é realizada pelas técnicas de RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) (Michaux-Charachon *et al.*, 1997), PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsátil) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de seqüências repetitivas encontradas em todas as espécies da *Brucella* (Ouhрани *et al.*, 1993).

3. Considerações taxonômicas

Nos últimos anos a taxonomia do gênero *Brucella* vem sendo inteiramente revista. Classicamente, este gênero se divide em seis espécies, baseado em características de cultura, metabólicas e bioquímicas. As espécies são: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B.*

ovis e *B. neotomae*. As três primeiras são divididas em biovares. Apesar da patogenia causada pelos microrganismos não constituir um critério taxonômico reconhecido, esta classificação existente sempre foi influenciada pela virulência restrita de cada espécie a um hospedeiro preferencial: ovinos e caprinos (*B. melitensis*), bovinos (*B. abortus*), suínos (*B. suis*), caninos (*B. canis*), ovinos (*B. ovis*) e o rato de deserto (*B. neotomae*) (Freney *et al.*, 2000).

A classificação do gênero *Brucella* começou a ser revista após estudos de hibridização DNA-DNA, os quais mostram uma forte similaridade de seqüência entre os ácidos nucleicos de todo o gênero (mais de 90%). Este estudo propõe que este gênero é monoespecífico, sendo as espécies recentes apenas resultado de modificações da *B. melitensis* (Verger *et al.*, 1985), constituindo apenas biovares da mesma. Apesar de algumas poucas diferenças, o estudo do polimorfismo de restrição do DNA mostra que a estrutura genômica, especificamente a ordem dos genes, está relativamente conservada entre as diversas espécies da *Brucella*, reforçando o caráter monoespecífico do gênero (Freney *et al.*, 2000). Entretanto, baseado no fato destes seis representantes do gênero se diferenciarem em várias características como preferência por determinados hospedeiros, diferentes graus de virulência e padrões de “fingerprint” de DNA genômico, o argumento que estes microrganismos constituem uma única espécie não parece ser verdadeiro (Smith & Ficht, 1990). Além disso, a variabilidade a nível de DNA tem sido constantemente encontrada entre as espécies do gênero *Brucella*, possibilitando a distinção entre as mesmas bem como alguns biovares, através da análise de marcadores moleculares (Vizcaíno *et al.*, 2000).

Recentemente, vários estudos mostraram pela comparação de seqüências do RNA ribossomal 16S, que o gênero *Brucella* está classificado na subclasse $\alpha 2$ da classe *Proteobacteria*, próximo a bactérias patogênicas simbióticas de vegetais, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium meliloti*, bactérias patogênicas ao homem, *Bartonella quintana* e *Ochrobactrum anthropi*, e bactérias fotossintéticas, *Rhodobacter sphaeroides* (Freney *et al.*, 2000). Aparentemente, *O. anthropi* é o microrganismo da subclasse *Proteobacteria* mais próximo das espécies do gênero *Brucella*. Têm-se proposto que o ancestral comum entre as espécies da *Brucella* e *O. anthropi* teriam se separado por volta de 180 a 75 milhões de anos atrás, período este que coincide com o surgimento dos mamíferos. Estudos recentes propõem que o ancestral do gênero *Brucella* originou as seis

diferentes espécies há relativamente pouco tempo em comparação àquelas bactérias representantes da subclasse $\alpha 2$ *Proteobacteria* (*Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*) (Vizcaíno *et al.*, 2000). Este fato pode explicar a alta similaridade de seqüência existente entre os ácidos nucléicos das espécies do gênero *Brucella*.

Vários autores têm demonstrado a existência de algumas linhagens da *Brucella* que apresentam características diferentes de todas aquelas presentes nas seis espécies do gênero. Estas têm sido isoladas de mamíferos marinhos, mostrando uma nova adaptação do gênero. Estudos recentes a nível de DNA têm confirmado que estas novas bactérias pertencem ao gênero *Brucella* mas exibem características diferentes das demais espécies, mostrando assim a necessidade de um estudo aprofundado que poderá alterar mais uma vez a classificação das espécies do gênero (Vizcaíno *et al.*, 2000).

4. Genoma do gênero *Brucella*

O genoma da *Brucella* é considerado rico em nucleotídeos G+C, visto que a proporção destes é em média de 56% a 58% (Smith & Ficht, 1990).

Michaux *et al* (1993) mostraram que o genoma da *Brucella* é composto por dois cromossomos circulares, geralmente de 2,1Mb e 1,15Mb, com exceção do biovar 3 de *B. suis*, que consiste de apenas um cromossomo circular com 3,2Mb. Os autores sustentam o fato de se tratar de dois cromossomos e não de apenas um cromossomo e um plasmídeo devido ao fato de existirem genes essenciais à sobrevivência destas bactérias em ambos (Vizcaíno *et al.*, 2000).

Apesar de não ser uma característica comum, outras bactérias também apresentam a mesma organização genômica daquela apresentada pela *Brucella*, como pode-se observar em várias espécies da subclasse $\alpha 2$ *Proteobacteria*. *Rhizobium*, por exemplo, possui três ou quatro replicons, dependendo da espécie, representando um cromossomo e dois ou três plasmídeos. Entretanto, ainda não se tem certeza se estes plasmídeos constituem cromossomos pelo mesmo motivo encontrado em *Brucella*. Nos plasmídeos destes também foram encontrados

genes essenciais à sobrevivência de *Rhizobium*, fazendo acreditar que os representantes deste gênero possuam, na verdade, mais de um cromossomo (Vizcaino *et al.*, 2000).

Esta organização cromossômica múltipla tem sido observada na maioria dos representantes da subclasse $\alpha 2$ *Proteobacteria*, levando a crer que existam estruturas ou funções genômicas destes microrganismos que favorecem o surgimento de vários cromossomos e que esta característica está relacionada ao fato destes apresentarem um ancestral em comum. No gênero *Brucella*, tem sido mostrado que a presença de dois cromossomos pode ser explicada por rearranjos em regiões cromossômicas que compreendem os três operons de rRNA (Vizcaino *et al.*, 2000). Entretanto, Jumas-Bilak *et al.* (1998B), sustentam a idéia de que este fato não esteja relacionado à evolução desta subclasse uma vez que existem representantes da mesma que apresentam apenas um cromossomo, como é o caso de *B. suis* (biovar 3) e algumas espécies do gênero *Rhodobacter*.

O genoma da *B. abortus* apresenta algumas peculiaridades em relação às demais espécies do gênero. Além de algumas alterações descritas recentemente, alterações estas que hoje constituem características que diferenciam as seis espécies do gênero, o genoma da *B. abortus* 544 apresenta uma grande região invertida, que compreende 640Kb. Além disso, há também uma região deletada, inicialmente estimada em 10Kb e que hoje sabe-se que compreende 26Kb e está presente em todas as linhagens da *B. abortus* (Vizcaino *et al.*, 2000).

Vários autores mostraram a presença de seqüências de inserção (IS) no genoma da *Brucella*. Estas seqüências, denominadas IS711 ou IS6501, foram primeiramente observadas em *B. ovis* e constituem uma fonte de polimorfismo do gênero *Brucella*. Posteriormente, estes autores determinaram o número destas IS nas demais espécies: 7 a 10 em *B. melitensis*, 6 a 8 em *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis*, e mais de 28 em *B. ovis*. Estas IS têm sido utilizadas na diferenciação das espécies e biovars da *Brucella*. Entretanto, esta diferenciação foi possível somente a nível de espécies, sendo que alguns biovars ainda permanecem sem aparente distinção (Vizcaino *et al.*, 2000).

Até o momento, seis grupos de fagos foram descritos em *Brucella*, e ainda não se sabe se existem fagos lisogênicos neste gênero (Freney *et al.*, 2000). Ainda não foram descritas

trocas gênicas no gênero *Brucella*, nem a presença de plasmídeos naturais. Como microrganismos intracelulares, sobrevivendo quase que exclusivamente nos hospedeiros infectados, pensa-se que as diferenças observadas nas seis espécies pode ser influenciada pela adaptação particular de cada uma a seu hospedeiro (Vizcaino *et al.*, 2000).

5. Brucelose

A brucelose é uma enfermidade que traz duas preocupações: sanitária, devido à sua possibilidade de transmissão ao homem, e econômica, devido à diminuição na produtividade animal, de seus produtos e derivados em consequência desta doença (Freney *et al.* 2000).

A maioria dos casos de brucelose humana é causada por *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus*. Esta enfermidade é adquirida diretamente a partir dos animais ou dos produtos de origem animal contaminados. A contaminação direta por contato cutâneo-mucoso é a modalidade de infecção mais freqüente (75% dos casos) enquanto que a contaminação digestiva (25% dos casos) é dividida essencialmente no consumo de produtos do leite e seus derivados contaminados ou mais raramente na ingestão de carne contaminada (Freney *et al.*, 2000). Em humanos, causa febre ondulante, anorexia, fadiga, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas, enquanto que nos animais domésticos os órgãos reprodutivos são principalmente afetados, causando aborto e infertilidade (Smith & Ficht, 1990).

A distribuição geográfica da brucelose ainda é bastante ampla, apesar de alguns países já terem erradicado a doença como Canadá, Japão, Austrália, Inglaterra e Dinamarca. A principal incidência da doença ocorre na região do Mediterrâneo, Arábia Saudita, alguns países da Europa, África e América Latina (Corbel, 1997).

No Brasil, a brucelose ocorre de maneira endêmica em todo o território nacional, especialmente a brucelose bovina, por ser esta espécie animal a mais difundida e com maior expressão econômica no país. Durante o ano de 1998, para um rebanho de aproximadamente 155 milhões de bovinos, houve 21.551 casos diagnosticados da doença em várias regiões, principalmente na região norte onde a incidência foi maior (15,11%) (Poester, 1999). Em humanos, após levantamento sorológico realizado no estado de São Paulo, no período entre 1977 a 1987, foram examinadas 168 amostras, as quais revelaram uma incidência de

aproximadamente 23,81% casos positivos (Feitosa *et al.*, 1991). Esta alta incidência se deve ao fato de que a maioria dos soros enviados para análise eram provenientes de fazendas com focos de brucelose.

5.1. Profilaxia

A profilaxia da brucelose humana baseia-se na vacinação, diagnóstico e eliminação de animais infectados, além de medidas de higiene alimentar (principalmente produtos do leite e seus derivados e também da carne) e medidas de proteção para as pessoas expostas ao microrganismo. Todas as tentativas de vacinação humana ainda se mostram ineficientes e perigosas, havendo ainda a necessidade de se desenvolver uma vacina que seja realmente eficaz ao controle desta enfermidade. Sendo assim, a prevenção da brucelose em humanos depende até o momento da erradicação ou controle da doença no animal hospedeiro (Freney *et al.*, 2000).

Segundo a Folha de São Paulo, o governo brasileiro lançará, ainda este ano, um programa de controle da brucelose em conjunto com as Secretarias da Agricultura e dos Estados, tornando obrigatória a vacinação do gado em todo o território nacional. Até o momento, esta obrigatoriedade só existe no estado de Minas Gerais. Neste estado, das 20 milhões de cabeças de gado, pelo menos 500 mil se mostravam positivas para os testes sorológicos antes do programa de vacinação, representando um índice de 2,5% do rebanho (Nascimento, 2000).

5.1.1. Vacinas

As vacinas vivas têm se mostrado até o momento, superior às vacinas mortas na prevenção da brucelose animal. Recentes estudos utilizando-se linhagens da *B. abortus* 19 viva e morta pelo calor foram realizados com o objetivo de testá-las quanto à capacidade de induzir proteção. Os resultados mostraram que a bactéria viva apresentou capacidade de induzir uma imunidade protetora muito maior que aquela apresentada pela bactéria morta (Zhan & Cheers, 1998).

A vacina viva ideal não deve provocar doença nos animais vacinados, deve prevenir a infecção em ambos os sexos, prevenir aborto e esterilidade, promover proteção contra

infecção por um longo período com uma simples dose, não induzir a produção de anticorpos os quais interferem no diagnóstico sorológico, ser biologicamente estável, não apresentar risco de reversão da virulência *in vivo* e *in vitro*, não ser patogênica ao homem e ser facilmente produzida em grande escala. A vacina viva ideal deve também conter marcadores fenotípicos ou genotípicos, que permitam uma fácil diferenciação dos isolados de campo (WHO, 1998).

Atualmente a vacinação contra infecções por *Brucella* é feita através da administração de linhagens lisas atenuadas da *B. abortus* S19 e *B. melitensis* Rev.1. A linhagem rugosa da *B. abortus* RB51 tem sido recentemente introduzida em alguns países como EUA e Chile (WHO, 1998).

B. abortus S19 é efetiva contra *B. abortus* em bovinos enquanto que *B. melitensis* Rev.1 é efetiva contra *B. melitensis* e *B. ovis* em cabras e ovelhas, respectivamente. Porém, ambas vacinas possuem três desvantagens: são patogênicas para o homem, podem causar aborto quando administradas em fêmeas gestantes e induzem a produção de anticorpos em animais imunizados, interferindo no diagnóstico de populações infectadas (Cheville *et al.*, 1993).

Várias estratégias têm sido utilizadas com o objetivo de produzir uma vacina viva atenuada que não possua os problemas citados anteriormente. Uma destas estratégias é a utilização de linhagens rugosas vivas da *Brucella* atenuadas, em especial *B. abortus* RB51, que consiste em um mutante da linhagem virulenta 2308 resistente à rifampicina (Schurig *et al.*, 1991). Esta linhagem foi identificada após sucessivos repiques em placa contendo ampicilina ou rifampicina e apresenta como característica principal a ausência de antígeno-O do LPS. Quando usada em dose única, seu efeito protetor em bovinos é similar ao provocado pela linhagem 19, com a vantagem de, aparentemente, não ser patogênica ao homem e não induzir produção de anticorpos normalmente detectados nos testes sorológicos convencionais devido à ausência de antígeno-O, podendo ser diferenciada de isolados de campo. Estudos preliminares sobre a biossegurança desta vacina têm demonstrado que ela não provoca reversão de virulência nem aborto em fêmeas gestantes. Entretanto, esta vacina apresenta algumas desvantagens. Veterinários e trabalhadores rurais expostos à RB51, quando testados pelos métodos sorológicos convencionais, serão negativos, dificultando assim o tratamento desta população de risco. Finalmente, outra desvantagem apresentada

por esta linhagem é o fato desta ser resistente a um dos antibióticos utilizados no tratamento contra a brucelose. Nos EUA a RB51 foi introduzida em 1996 (Ferraz, 1999).

Outra estratégia consiste no uso de vacinas de DNA que se baseia na imunização com o DNA de genes bacterianos clonados em vetores que são capazes de expressar as suas proteínas em células de mamíferos. Este tipo de vacinação tem se mostrado efetiva na prevenção de infecções por patógenos intracelulares (Lowrie, *et al.*, 1997). Para o controle da brucelose, a vacina de DNA pode ser uma estratégia efetiva na prevenção da infecção, como indicaram recentes estudos com a vacina de DNA L7/L12 (Kurar *et al.*, 1997). Contudo, novos antígenos bacterianos, que induzam a resposta imune celular protetora ainda necessitam ser identificados.

5.2. Tratamento

Os antibióticos ativos contra *Brucella* são primeiramente as tetraciclínas, apesar de existirem linhagens da *B. melitensis* resistentes aos mesmos. As espécies do gênero *Brucella* são particularmente resistentes aos β -lactâmicos. Normalmente, utiliza-se a rifampicina, cloranfenicol ou eritromicina no tratamento contra brucelose. A utilização rotineira do antibiograma normalmente não é necessária, entretanto, quando há suspeita de resistência a algum antibiótico, este é pedido (Freney *et al.*, 2000).

O tratamento da brucelose aguda sem aparente focalização se baseia na associação de antibióticos, onde pelo menos um deles tenha uma boa penetração intracelular, e deve ser prolongado por no mínimo 21 dias. No caso de focalização, essas mesmas associações são utilizadas por no mínimo três meses (Freney *et al.*, 2000).

6. Patogênese

O mecanismo geral de invasão da *Brucella* tanto em bovinos como em outros animais domésticos se dá da seguinte forma: 1) sobrevivência no sítio de invasão primária, 2) entrada em fagócitos e proliferação, 3) invasão da corrente sanguínea e circulação dentro de fagócitos, 4) disseminação em órgãos, especialmente baço, fígado, medula, nódulos

linfáticos, rins e útero (Smith & Ficht, 1990).

Após a invasão, as espécies do gênero *Brucella* permanecem nas células do sistema reticuloendotelial, particularmente as células fagocíticas do sistema imune, sendo capaz também de se multiplicar em células não fagocíticas. Elas podem sobreviver em células de origem ectodermal ou mesodermal, mas não são capazes de invadir tecido de origem endodermal. Estes microrganismos conseguem se manter nestas células fagocíticas uma vez que são capazes de impedir a atividade bactericida das mesmas e se replicar normalmente neste local. Na infecção inicial, os macrófagos são relativamente ineficientes no combate às bactérias intracelulares. Estas são então transportadas se disseminando amplamente nos tecidos linfóides regionais, causando a morte de macrófagos e células fagocíticas polimorfonucleadas, sendo então liberadas podendo invadir outras células. Estes tecidos linfóides constituem a porta de entrada até certos órgãos ricos em elementos do retículo endotelial, como nódulos linfáticos, baço, fígado, medula óssea e também órgãos reprodutivos. Os sintomas da doença são diversificados, dependendo do hospedeiro (Smith & Ficht, 1990).

Em 1960, um componente denominado eritritol foi encontrado na placenta de fêmeas de bovino gestantes e verificou-se que este estimulava o crescimento da *B. abortus* neste local. Foi determinado que após a infecção, os microrganismos se replicam no tecido da placenta, levando à morte fetal e conseqüente aborto provavelmente devido ao choque endotóxico causado pela presença destes microrganismos no local (Smith & Ficht, 1990).

A capacidade de metabolizar o eritritol é muito limitada entre os procariotos. Entretanto, *Brucella* é capaz de metabolizá-lo nos testículos, vesículas seminais e nos produtos da concepção encontrados em fêmeas gestantes. Este composto estimula enormemente a multiplicação da bactéria principalmente devido ao fato da energia produzida pelo seu metabolismo ser maior daquela produzida pela utilização da glicose (27ATP/molécula vs 12ATP/molécula). Sendo assim o eritritol representa um potente fator de tropismo celular fazendo com que as populações bacterianas tornem-se densas nestes locais podendo levar ao choque endotóxico. A linhagem vacinal *B. abortus* 19 é naturalmente incapaz de metabolizar o eritritol apesar de, em algumas situações, ser capaz de causar aborto em bovinos (Smith & Ficht, 1990). Em meados de 1994, foram isolados mutantes estáveis da linhagem virulenta da *B. abortus* 2308 sensíveis ao eritritol, fenótipo apresentado pela

linhagem vacinal 19. A comparação deste mutante com esta linhagem vacinal possibilitou a identificação de uma deleção no cromossomo da *B. abortus* S19, que provavelmente é responsável pela sensibilidade a este componente. Esta descoberta torna fácil e confiável a distinção da linhagem 19 em relação aos demais membros do gênero *Brucella*, através da utilização da técnica de PCR (Sangari, 1996).

Finalmente, acredita-se que o microrganismo abandona o útero após o aborto e permanece no úbere, onde a infecção se mantém até a gestação seguinte, tornando-se crônica. Entre os anestros gestacionais a bactéria também pode ser encontrada nos nódulos linfáticos associados ao úbere, útero, trato digestivo, e baço. Nas demais gestações, não se observam abortos mas o bezerro pode nascer infectado por *Brucella*. Em animais machos, podem ser encontrados estes microrganismos no epidídimo e testículos (Smith & Ficht, 1990).

7. Virulência

Vários componentes celulares sem dúvida contribuem para a sobrevivência e virulência das espécies do gênero *Brucella*. A habilidade destas em invadir e se replicar nas células do hospedeiro e bloquear a fusão fagossomo/lisossomo consiste no mecanismo de virulência e escape do sistema imune desenvolvido por estes microrganismos. Porém, pouco se conhece a respeito das bases genéticas deste virulência. A identificação de novos genes responsáveis por este mecanismo é fundamental para o entendimento de como estes patógenos causam a doença (Ugalde, 1999).

Aparentemente, a especificidade por determinado hospedeiro pode ser resultado da expressão diferencial de genes que contribuem para a virulência de cada espécie. Estas alterações podem constituir respostas adaptativas às condições presentes em cada hospedeiro (Smith & Ficht, 1990).

Em contraste a outros patógenos Gram-negativos, a superfície externa da *Brucella* não possui estruturas como pili, fimbrias, nem material capsular. A membrana externa contém apenas dois componentes identificados como fatores de virulência: o LPS e as proteínas de membrana externa (OMP) (Smith & Ficht, 1990).

O LPS é o principal componente responsável pela morfologia das colônias lisas ou rugosas das diversas linhagens da *Brucella*. Aquelas que se apresentam lisas possuem a molécula LPS completa, composta por dois domínios: a porção antigênica conhecida como antígeno-O e a porção tóxica conhecida como lipídeo A. As linhagens rugosas possuem a molécula de LPS incompleta, não apresentando o antígeno-O. Nas espécies lisas patogênicas, o antígeno-O tem sido descrito como um importante fator de virulência. Esta proposição baseia-se na observação de que as linhagens lisas sobrevivem e replicam-se nos animais e em cultura de macrófagos de maneira mais eficiente que aquela apresentada pelas rugosas (Smith & Ficht, 1990).

As proteínas de membrana externa, OMPs, se encontram expostas na superfície celular da *Brucella*. Alguns autores mostram uma suposta relação entre OMPs e a virulência destes microrganismos, uma vez que a resposta imune protetora desencadeada nos mesmos é diretamente contra estas proteínas. Esta proteção também já foi observada em outras bactérias Gram-negativas. Já foram identificados três grupos destas proteínas da *Brucella*, sendo classificadas de acordo com o tamanho de cada uma. Estudos recentes mostraram que a fagocitose estimula uma condição de estresse que altera a síntese de várias proteínas em *Brucella*, bem como em vários outros patógenos intracelulares. Foi constatado que algumas proteínas, entre elas OMPs, são expressas somente sob indução específica no macrófago ou sob alteração de pH abaixo de 4,0, sugerindo que elas possuem um papel na resistência à destruição intracelular no macrófago e conseqüentemente representam um importante fator de patogenicidade e virulência da *Brucella* (Smith & Ficht, 1990 e Sangari, 1996).

Até o momento, não foi evidenciada a produção de toxinas no gênero *Brucella* semelhantes àquelas produzidas pelos demais microrganismos, tais como *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Clostridium botulinum* e *C. tetani* (Smith & Ficht, 1990).

Os parasitas intracelulares necessitam de mecanismos que impeçam sua destruição pelas células do hospedeiro. O tipo celular no qual estes microrganismos sobrevivem é muito importante na determinação do mecanismo de escape que estes utilizam. As espécies do gênero *Brucella* possuem mecanismos interessantes uma vez que são capazes de sobreviver em células fagocíticas e não-fagocíticas (Smith & Ficht, 1990). Vários mecanismos têm sido propostos como contribuintes para a sobrevivência da *Brucella* no interior de células

fagocíticas: 1) produção de enzimas que a defendem contra a destruição oxidativa, 2) produção de enzimas que inibem a fusão fagossomo/lisossomo e 3) a secreção de 5'-guanossina monofosfato (GMP) e adenosina, que inibem a ação bactericida da mieloperoxidase-H₂O₂ (Tatum *et al.*, 1992). Alguns autores sugerem que o eritritol, citado anteriormente, pode constituir um fator de virulência, entretanto este fato ainda é discutido no meio científico (Smith & Ficht, 1990).

7.1. Estratégias moleculares para identificação de fatores de virulência

A compreensão dos mecanismos de patogenicidade e virulência de bactérias e fungos é dependente da identificação e caracterização de produtos gênicos que estejam de algum modo envolvidos com o progresso da infecção. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular associado aos progressos da genética, bioquímica, fisiologia e microbiologia, há cerca de 20 anos, tem levado à identificação de vários fatores de virulência. Além da identificação, estas novas estratégias, que baseiam-se em experimentos de estudo da expressão e transferência gênica, mutações aleatórias e dirigidas e comparação genômica, possibilitam a caracterização funcional destes fatores, bem como o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos e vacinas (Hensel *et al.*, 1995).

Uma das técnicas baseadas em expressão gênica é a "Hibridização Subtrativa". RNAs mensageiros bacterianos são recuperados após infecção de macrófagos e convertidos em cDNA. Em seguida, cDNAs do microrganismo crescido em meio de cultura são recuperados e biotinizados, sendo utilizados posteriormente na remoção dos cDNAs obtidos de bactérias crescidas dentro dos macrófagos, provenientes de expressão constitutiva. Dessa maneira torna-se possível a obtenção de um gene exclusivamente expresso durante a invasão de macrófagos. Atualmente, esta técnica vem sendo utilizada na identificação de RNAs mensageiros induzidos após a fagocitose por macrófagos (Plum & Clark-Curtiss, 1994).

Outra técnica baseada na expressão gênica é a "*in vivo* Expression Technology" (IVET). Fragmentos de DNA genômico de um determinado patógeno são clonados em fase ao gene *purA*, fusionado ao gene *lacZ*, sem o seu promotor. Linhagens bacterianas mutantes auxotróficas para o gene *purA* são transformadas com estas construções e utilizadas na infecção de camundongos. Como não há disponibilidade dos compostos necessários à suplementação nutricional do mutante, os patógenos recuperados do baço do hospedeiro que

se apresentarem Lac⁺ são selecionados. Estes possuem as construções integradas no cromossomo da bactéria onde os fragmentos de DNA clonados possuem promotores que são induzidos no momento da infecção (Mahan *et al.*, 1993).

Na tentativa de selecionar genes expressos após a invasão intracelular também é utilizado um sistema de identificação que consiste na utilização do vetor pBBR1MCS (figura 1, anexo), contendo o gene codificador da proteína fluorescente verde (GFPuv) sem o seu promotor. Uma biblioteca genômica da *B. suis* foi construída neste vetor. Promotores da *B. suis* expressos constitutivamente levam à formação de colônias esverdeadas em placa após incubação de três dias a 37°C. As colônias que não apresentavam expressão do gene *gfp* foram então infectadas em macrófagos, sendo a multiplicação intracelular da *B. suis* visualizadas por microscopia de fluorescência. Clones fluorescentes foram comparados àqueles obtidos das bactérias inoculadas em meio e somente aqueles clones que apresentaram exclusivamente a fluorescência em ambiente intracelular foram utilizados em estudos posteriores. Esta técnica possibilitou a identificação de 12 clones. Canavessi *et al* (2000) também utilizaram este mesmo sistema em *B. abortus*, identificando vários genes envolvidos em proteção osmótica, recombinação sítio-específica, metabolismo e biossíntese desta bactéria, fornecendo dados para melhor compreensão da patogênese deste microrganismo (Kohler *et al.*, 1999 e Canavessi *et al.*, 2000).

A mutagênese aleatória, utilizando transposons *in vivo* e *in vitro*, é uma técnica que também vem sendo utilizada na identificação de genes envolvidos na sobrevivência intracelular. Mutantes são obtidos em cultura bacteriana e posteriormente utilizados na infecção de macrófagos *in vitro*, permitindo a verificação da incapacidade de se estabelecerem dentro destas células (Smith & Ficht, 1990). Esta técnica foi primeiramente descrita em *B. abortus* em 1987, por Smith e Heffron. Em seguida, vários autores utilizaram a mesma em seus estudos: em 1991, Sangari e Aguero compararam três sistemas de transposição em *B. abortus*, posteriormente, em 1994, estes mesmos autores descreveram as primeiras análises a nível molecular da sensibilidade ao eritritol da linhagem vacinal de *B. abortus* (S19). Lai *et al* (1990) descreveram a inserção de vários transposons no genoma de *B. abortus*, analisando principalmente a frequência de transposição ocorrida neste microrganismo. Com o objetivo de analisar uma linhagem rugosa da *B. abortus*, que apresenta como característica principal a ausência de antígeno-O em seu LPS, Allen *et al* (1998) e McQuiston *et al* (1999), utilizaram a técnica de mutagênese por inserção de transposons na produção de uma linhagem mutante

conhecida como RA1. Análises deste mutante mostraram uma reduzida sobrevivência em camundongos, entretanto, no fígado destes animais, estas linhagens se mantinham por mais tempo que a linhagem vacinal RB51.

Outra estratégia muito utilizada em complementação ou alternativamente à anterior é a “Signature-Tagged Mutagenesis” (STM). Este método combina a mutagênese aleatória à seleção simultânea de vários mutantes utilizando um único animal. Neste processo, cada mutante gerado pela inserção do transposon carrega uma região única, capaz de diferenciá-los uns dos outros. Estas regiões ou etiquetas são fragmentos curtos de DNA, associados a um transposon, contendo 40pb variáveis, única na região central e flanqueada por duas regiões invariáveis de 20pb. Dois “pools” de mutantes são formados por “replica plate”, um destes será inoculado em meio e o outro introduzido em camundongo. Após 8 dias, as bactérias presentes no baço dos animais são recuperadas, seu DNA extraído, amplificado por oligonucleotídeos desenhados nas regiões invariáveis e posteriormente marcados por fluorescência. Este mesmo procedimento ocorre com as bactérias crescidas em meio líquido. Os fragmentos de DNA marcados são então utilizados na “varredura” das duas placas produzidas por “replica plate”. Aqueles clones que se mostrarem marcados pelo “pool” de mutantes recuperados do meio líquido e não se mostrarem marcados pelo “pool” de mutantes recuperados do baço de camundongos possuem sua virulência atenuada pois foram incapazes de sobreviver nas células do animal (Hensel *et al.*, 1995). Esta abordagem vem sendo amplamente utilizada em estudos da *Brucella*. Hong *et al* (2000) vêm utilizando a técnica de STM na identificação de genes envolvidos na infecção crônica da *Brucella*, Foulongne *et al* (2000) identificaram genes envolvidos na sobrevivência intracelular e biossíntese de LPS nas linhagens lisas e finalmente, Lestrade *et al* (2000) utilizaram esta mesma técnica e identificaram genes com várias funções como: transportadores, metabolismo de aminoácidos e DNA, regulação transcricional, síntese de peptidoglicano, e outras. A identificação de todos estes genes possibilita o surgimento de novas informações sobre as bases moleculares da virulência da *Brucella*.

Além do uso de transposons na obtenção de mutantes aleatórios *in vivo* e *in vitro*, a inativação de um determinado gene pode ser realizada de uma maneira dirigida, através da recombinação homóloga dupla. Inicialmente, é feita a clonagem de um gene marcador, geralmente um gene de resistência a algum antibiótico, no meio do gene de interesse, interrompendo-o. As construções são inseridas em bactérias selvagens e em um segundo

momento estes plasmídeos podem se integrar no genoma destas bactérias de duas formas: 1) recombinação simples, ou de apenas um ponto, e 2) recombinação dupla, envolvendo dois pontos. Esta abordagem vem sendo utilizada com sucesso na construção de mutantes, como por exemplo no estudo da Cu-Zn superóxido dismutase (*sodC*) e *htrA* em *B. abortus* (Tatum *et al.*, 1992) e *purE* em *B. melitensis* (Drazek *et al.*, 1995).

Em 1998, foi criado nos Laboratórios de Genética Celular e Molecular e Imunologia das Doenças Infecciosas da UFMG um programa com o objetivo de identificar genes envolvidos nos processos de virulência e patogenicidade da *B. abortus*. Uma das estratégias deste programa baseia-se no sequenciamento aleatório de extremidades de uma biblioteca de DNA genômico deste microrganismo construída em pUC12 e apresenta uma série de vantagens em relação às técnicas de descoberta gênica citadas anteriormente. A principal vantagem é o baixo custo desta abordagem, pois baseia-se em um único sequenciamento das extremidades. Após a geração das seqüências, estas são submetidas à análise computacional e comparadas com todas as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos depositadas em banco de dados. Esta análise permite a identificação, através de homologia, de possíveis genes relacionados à virulência e patogenicidade de vários microrganismos. O banco de dados hoje apresenta uma série de genes depositados, provenientes de vários organismos, desde bactérias até o próprio homem. Até o momento 27 genomas de microrganismos já foram totalmente sequenciados e outros 100 já estão em andamento (Tabela 3, nº 1, anexo).

Recentemente, o “National Center of Biotechnology Information”, NCBI, criou uma nova divisão do banco de dados denominado “Genome Survey Sequence”, GSS. Esta divisão é similar àquela existente das ESTs (Etiquetas de Seqüências Transcritas), diferenciando-se destas apenas por se tratar de seqüências genômicas enquanto que na primeira são seqüências geradas a partir de cDNA. A criação deste GSS foi muito importante no sentido de aproveitar a grande produção de seqüências geradas aleatoriamente que podem conter informações valiosas sobre o funcionamento dos organismos. Estas informações são provenientes de plasmídeos, cosmídeos, BACs, YACs, “exontrapping” ou de seqüências Alu-PCR (Tabela 3, nº 2).

Através desta abordagem, foram geradas 100 GSS da *B. abortus* pelos grupos dos laboratórios de Genética Celular e Molecular e Imunologia das Doenças Infecciosas,

seqüências estas que permitiram a identificação de vários genes (11) que apresentam alta similaridade a genes implicados em virulência deste microrganismo. O gene *vacB* é um dos genes identificados por este programa (Miyoshi, 2000). Este codifica, em *E. coli* e *S. flexneri*, uma RnaseR e está intimamente envolvida na regulação da expressão gênica de fatores de virulência. Um segundo gene identificado pelo programa, gene *exxA*, é parte do presente trabalho. Até o momento já existem quase 2000 GSS da *B. abortus* depositadas em banco de dados.

Em setembro de 2000, foi apresentado no Congresso de Brucelose na França o sequenciamento total do genoma da *B. melitensis* 16M (Del Vecchio *et al.*, 2000). Este avanço permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência e patogenicidade utilizados por *Brucella* através da análise de seus genes. O conhecimento completo das informações genéticas de um organismo permite uma identificação de genes candidatos a vacinas envolvidos em virulência bem como aqueles que podem ser utilizados em diagnóstico (Weinstock, 2000).

7.2. Genes da *Brucella* envolvidos em sua virulência

Vários genes têm sido identificados em *Brucella* como supostamente envolvidos nos seus mecanismos de virulência. Porém, é importante considerar que o verdadeiro resultado para determinar se um gene constitui um fator de virulência é obtido através de estudos *in vivo* realizados com a linhagem mutante em animais experimentais e hospedeiros naturais (Smith & Ficht, 1990).

As principais proteínas de choque térmico da *Brucella*, como GroEL e DnaK, têm sido reportadas como altamente imunogênicas. Esta alta imunogenicidade pode estar relacionada com o aumento da síntese desta proteína dentro do macrófago, onde a bactéria sobrevive e se multiplica, devido aos vários estresses a que a bactéria é exposta, tais como elevação da temperatura, estresse ácido e oxidativo (Clockaert *et al.*, 1996). Em mutantes da *B. suis* para o gene *dnaK* foi observada uma grande sensibilidade à acidez além de uma reduzida multiplicação em macrófagos, sugerindo o envolvimento desta enzima no mecanismo de virulência da *Brucella* (Kohler *et al.*, 1996).

A proteína HtrA (high-temperature-requirement A) está envolvida na degradação de proteínas que sofreram danos oxidativos funcionando como uma proteína de resposta a condições de estresse celular. Patógenos intracelulares, inclusive *Brucella*, normalmente expressam estas proteínas de resposta ao estresse quando presentes no ambiente intracelular. Supõe-se que estas proteínas desempenham papel principal na adaptação fisiológica da bactéria no ambiente hostil existente no fagossomo. A proteína HtrA de *Salmonella typhimurium* está envolvida na virulência desta bactéria. Mutantes *B. abortus htrA* são incapazes de crescer em meio sólido a 40°C e possuem uma maior sensibilidade à ação de agentes oxidativos como H₂O₂ e O₂⁻. Estes estudos mostraram que existe uma atenuação transitória destes mutantes *htrA* da *B. abortus*. Entretanto, as bases genéticas que explicam esta atenuação ainda permanecem desconhecidas (Sangari, 1996).

Os macrófagos possuem a capacidade de converter o oxigênio em metabólitos bactericidas, inclusive intermediários tóxicos do oxigênio como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânions superóxido (O₂⁻). A sobrevivência dos microrganismos depende da possibilidade destes conseguirem se manter nestes ambientes. A catalase, enzima produzida pelas espécies do gênero *Brucella*, consiste em um mecanismo de defesa destes microrganismos permitindo sua sobrevivência no ambiente hostil que existe nos fagócitos. Ela atua protegendo a *Brucella* contra os intermediários tóxicos do oxigênio, H₂O₂ por exemplo, liberados pelos macrófagos durante a fagocitose. Linhagens altamente virulentas apresentam alta atividade da catalase enquanto que linhagens pouco virulentas apresentam baixa atividade da mesma. Este fato mostra o possível envolvimento desta enzima na virulência da *Brucella*. Além disso, a localização periplasmática da catalase implica no seu envolvimento na defesa da bactéria contra o H₂O₂ exógeno, que constitui um dos compostos mais tóxicos para as células. Estudos realizados com mutantes da linhagem 2308 que não produziam catalase mostraram que esta enzima desempenha um papel importante na sobrevivência da *Brucella* nos macrófagos nos estágios iniciais da infecção (Sangari, 1996).

Tatum *et al* (1992) construíram mutantes das linhagens 2308 e 19 da *B. abortus* do gene que codifica a Cu-Zn superóxido dismutase (*sodC*). Esta enzima também está envolvida na proteção das bactérias contra agentes tóxicos produzidos pelos macrófagos pois os converte a oxigênio (O₂). A sobrevivência e replicação destes mutantes em macrófagos foi semelhante àquela observada nas linhagens selvagens. Entretanto, em camundongos

infectados com linhagens mutantes, um menor número de bactérias foi recuperado em comparação àqueles infectados com as linhagens selvagens, sugerindo assim o envolvimento desta enzima oxidativa na sobrevivência e patogenicidade da *B. abortus in vivo*.

recA é um gene envolvido em várias funções no metabolismo do DNA bacteriano, inclusive no reparo dos danos produzidos no mesmo por produtos oxidativos do macrófago. Rearranjos genéticos mediados pela proteína RecA podem aumentar potencialmente a virulência do patógeno ou habilitá-lo a escapar da defesa do hospedeiro, especialmente em um microambiente onde danos ao DNA ocorrem (Sangari, 1996). Com o objetivo de determinar se o gene *recA* desempenha papel importante na virulência da *B. abortus*, Tatum *et al* (1993) construíram um mutante para este gene na linhagem 2308, utilizando recombinação homóloga dupla. Quando introduzido intraperitonealmente em camundongos, foi identificada persistência do mutante *recA* 100 dias após a infecção, semelhante àquela observada na linhagem selvagem, indicando que este gene não é essencial à sobrevivência da *B. abortus*.

Drazek *et al* (1995), mostraram que o mutante para o gene *purE* de *B. melitensis*, gene este que codifica a proteína 5'phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxilase envolvida na síntese de purinas, apresentou reduzida capacidade de replicação em macrófagos humanos. Estudos mostraram que um dos mecanismos pelo qual *Brucella* inibe a fusão fagossomo/lisossomo é através da produção de purinas, sendo assim, este gene *purE*, está diretamente envolvido nos processos de virulência e patogenicidade deste microrganismo.

O polissacarídeo B (cyclic β (1-2) glucan) é produzido por vários membros da subclasse $\alpha 2$ da classe *Proteobacteria*, como *Rhizobium* e *Agrobacterium*, sendo localizado no espaço periplasmático destes microrganismos. Mutantes de *Agrobacterium* e *Rhizobium* defectivos na produção deste polissacarídeo são incapazes de invadir os seus hospedeiros, o que demonstra a sua relação na virulência dos mesmos. Recentemente, foi clonado um gene da *B. abortus*, *cgs* (β (1-2) cyclic glucan synthetase) por Iannino *et al* (1998), que provavelmente está envolvido na síntese deste polissacarídeo. Este gene constitui uma proteína integral de membrana interna e estudos sugerem que este está envolvido também no transporte de proteínas para os espaços periplasmático e extracelular da célula. Mutantes da

Brucella para o gene *cgs* mostraram reduzida virulência em camundongos, sugerindo que o polissacarídeo B ou alguma outra função do gene *cgs* ainda não identificada, fornecem à bactéria uma vantagem para a sua sobrevivência no hospedeiro. A redução na virulência, a baixa produção de anticorpos contra LPS e a capacidade de conferir imunidade apresentadas pelos mutantes *cgs*, sugerem que o mesmo constitui um candidato a vacina humana contra a brucelose (Ugalde, 1999).

8. Transportadores ABC (ATP-binding cassette)

Todos os compartimentos celulares e subcelulares são separados do meio externo por membranas lipídicas. A sobrevivência celular requer uma passagem regulada e seletiva de moléculas específicas através destas membranas, tanto na assimilação de nutrientes quanto na excreção de vários produtos. A importância do transporte através de membranas é exemplificada pelo fato de terem sido identificados 57 e 78 proteínas responsáveis por este tipo de transporte em *E. coli* e *Bacillus subtilis* respectivamente, correspondendo a 5% do genoma destes microrganismos (Higgins, 1992; Young & Holland, 1999; Braibant *et al.*, 2000).

Nos últimos anos o sequenciamento completo de vários organismos tem possibilitado a reconstrução e análise de vias bioquímicas utilizadas pelos mesmos, especialmente o transporte, síntese e degradação de compostos bioquímicos. Através de estudos comparativos, pode-se inferir sobre o transporte e a capacidade metabólica de vários organismos, estabelecendo evolutivamente as relações destes com o ambiente em que vivem (Tomii & Kanehisa, 1998).

A patogenia da *Brucella* está intimamente ligada às suas interações com as células hospedeiras. Estas interações entre patógenos e seus hospedeiros incluem não somente o contato direto entre células e bactérias, como também a assimilação e excreção de componentes entre os mesmos, atividade esta que é facilitada por transportadores (Ko & Splitter, 2000).

Transportadores ABC (ATP-binding cassette) constituem um dos sistemas de transporte ativo celular, amplamente distribuídos pelos organismos, estando presentes em

archaebacteria, eubacteria e eucariotos. Estes transportadores são parte de uma superfamília de permeases que transportam várias moléculas (íons, aminoácidos, peptídeos, antibióticos, polissacarídeos, proteínas, etc) através da membrana citoplasmática com especificidade por determinado substrato. Os transportadores ABC utilizam a energia produzida pela hidrólise do ATP no transporte contra um gradiente de concentração para o exterior ou interior da célula (Braibant *et al.*, 2000; Ko & Splitter, 2000).

Estes transportadores são também conhecidos como “periplasmic” ou “binding protein-dependent transport systems” devido à existência de um receptor periplásmico existente nestes transportadores que os distinguem de outros tipos de transportadores bacterianos. Entretanto, esta classificação é imprópria para a superfamília como um todo devido ao fato de vários transportadores ABC não estarem associados a um componente periplásmico (Higgins, 1992).

Os transportadores ABC consistem de quatro domínios associados à membrana. Dois deles são altamente hidrofóbicos, constituindo domínios transmembrânicos (MSDs: “membrane spanning domain”). Os demais constituem dois domínios citoplasmáticos (NBDs: “cytoplasmic nucleotide binding domain”) localizados na periferia da face citoplasmática da membrana. Os transportadores estão normalmente associados com alta afinidade a uma proteína extracitoplasmática de ligação ao substrato (SBP). Acredita-se que os MSDs são responsáveis pela especificidade de cada transportador (Higgins, 1992 e Braibant *et al.*, 2000).

Em vários transportadores ABC bacterianos, estes quatro domínios diferentes são expressos como polipeptídeos independentes, codificados por genes organizados em operons, ou pelo menos organizados em “clusters”. Nos eucariotos, transportadores ABC são normalmente codificados por um único gene. Entretanto, há casos em que estes transportadores bacterianos são codificados por apenas um único gene, assim como observado em eucariotos (Braibant *et al.*, 2000).

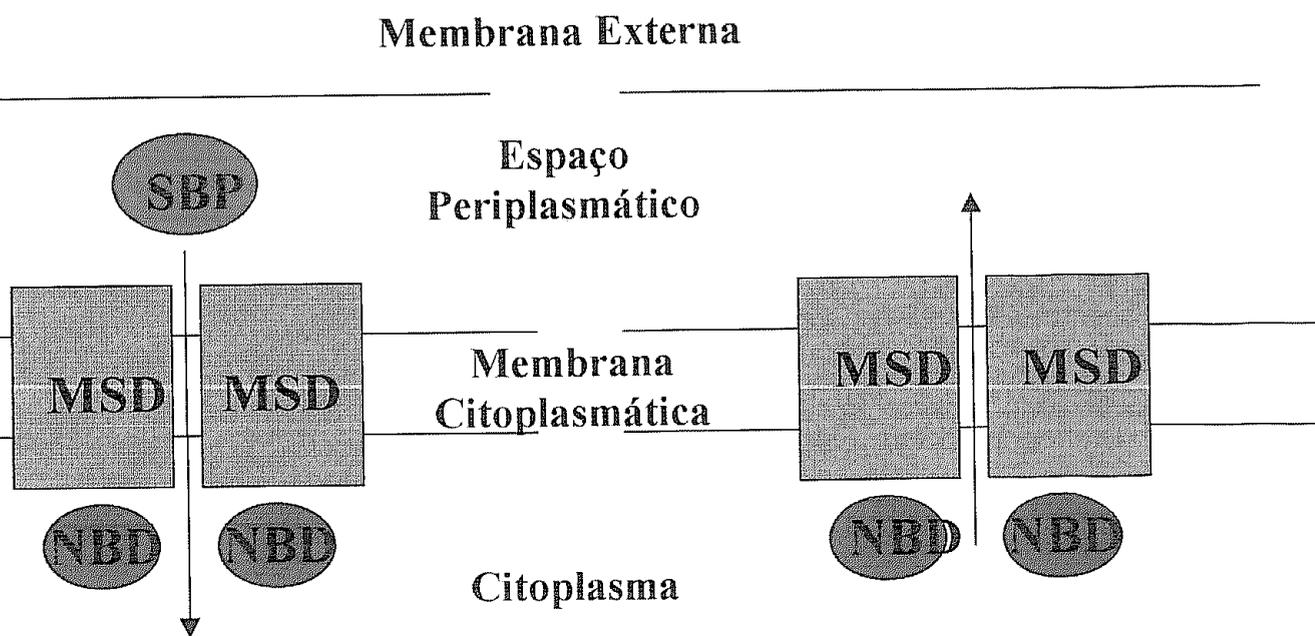
Estas proteínas são classificadas como importadores ou exportadores dependendo da direção de translocação de seu substrato. Importadores são encontrados apenas em procariotos e estão envolvidos na assimilação de moléculas extracelulares. Exportadores são encontrados tanto em procariotos quanto em eucariotos, sendo que estes são responsáveis pela exportação

de várias moléculas do citoplasma. Os exportadores procarióticos incluem transportadores de proteínas, peptídeos, drogas, antibióticos ou polissacarídeos. Alguns destes requerem proteínas adicionais responsáveis pela conexão entre proteínas de membranas externa e interna. Na figura 2 pode-se observar a estrutura dos transportadores de procariotos (Fath & Kolter, 1993; Braibant *et al.*, 2000).

Bactérias Gram-negativas

Importadores

Exportadores



*Figura 2: Organização dos transportadores ABC. Importadores e exportadores, dependendo da direção de translocação de seus substratos (indicados por setas). O protótipo procariótico é composto de dois domínios transmembrânicos (MSDs), e dois domínios citoplasmáticos (NBDs). SBP indica a presença de uma proteína de ligação ao substrato, normalmente presente nos importadores (figura adaptada de Braibant *et al.*, 2000).*

Os domínios citoplasmáticos, NBDs, dos transportadores ABC se ligam às moléculas de ATP desencadeando a hidrólise destas levando ao início do processo de transporte. Estes são os domínios mais conservados destas proteínas, apresentando cerca de 30 a 40% de homologia. Estes domínios possuem algumas seqüências presentes em todos os organismos: motivos Walker A e B e “ABC signature”, presente entre os dois primeiros. Aparentemente, todos os três constituem motivos de ligação a ATP. Recentemente, foi descrito outro motivo, encontrado após Walker B, composto de seis aminoácidos sendo, aparentemente, essencial ao processo de transporte de vários transportadores ABC (Braibant *et al.*, 2000).

Os domínios transmembrânicos, MSDs, consistem de quatro a oito α -hélices que atravessam a membrana formando um canal que permite a translocação do substrato através da mesma. Estes domínios são menos conservados em comparação aos NBDs, mas alguns deles apresentam algumas características em comum. O “EAA-loop” está presente entre as α -hélices, constituindo provavelmente o sítio de interação entre MSDs e NBDs. Entretanto, este não se encontra presente em todos os transportadores ABC. Um segundo motivo presente nestes domínios é responsável pela exportação de drogas e carboidratos de uma subfamília de transportadores ABC bacterianos, denominado proteína de membrana integral do sistema de transporte do tipo ABC-2. Finalmente, as proteínas de ligação ao substrato, SBPs, apresentam-se pouco conservadas em relação aos dois domínios citados anteriormente (Braibant *et al.*, 2000).

Os transportadores ABC bacterianos são muito importantes e podem estar relacionados aos mecanismos de virulência destes microrganismos. Este envolvimento existe uma vez que estes transportadores são responsáveis pela assimilação de vários nutrientes essenciais e também realizam a exportação de drogas bem como fatores de virulência, como por exemplo polissacarídeos (Braibant *et al.*, 2000).

Em 1998 foi realizado um estudo com transportadores ABC de sete organismos diferentes: estes são representantes de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, cyanobactéria e archaeobactéria (Tomii & Kanehisa, 1998). Estes transportadores foram então classificados em 25 grupos ortólogos, permitindo-se reconhecer a especificidade por determinado substrato de cada transportador. Entre estes grupos, os mais importantes são aqueles envolvidos nos mecanismos de virulência que os microrganismos utilizam, como por

exemplo os responsáveis pelo transporte de drogas e polissacarídeos. O grupo ortólogo 6 inclui transportadores de toxinas RTX e transportadores do “cyclic β -1-2 glucan” também conhecido como polissacarídeo B. As toxinas RTX são fatores de virulência em muitas bactérias patogênicas, sendo que seus mutantes frequentemente apresentam fenótipo atenuado. O polissacarídeo está envolvido na osmoregulação bem como nas interações entre bactérias patogênicas e seus hospedeiros, como a simbiose e tumorigênese de *Rhizobiaceae*. Sendo assim, a possibilidade de transportadores ABC classificados no grupo ortólogo 6 estarem envolvidos em patogênese bacteriana é maior que em qualquer outro grupo de ortólogos dos mesmos (Ko & Splitter, 2000).

Estudos com várias proteínas ABC de *A. tumefaciens* mostraram que estas estão envolvidas em processos de invasão e virulência celular uma vez que os mutantes para estes transportadores foram incapazes de transportar um componente essencial à invasão destes microrganismos em seu hospedeiro (Matthysse *et al.*, 1996).

O gene *exsA* de *R. meliloti* codifica um transportador ABC, provavelmente envolvido no transporte de um polissacarídeo para o exterior da célula, conhecido como polissacarídeo extracelular ou succinoglicano (EPS I). Este gene, quando mutado, torna o microrganismo incapaz de transportar normalmente o polissacarídeo dificultando o processo de invasão do mesmo. Este processo só não é totalmente abolido em mutantes para o gene *exsA* devido ao fato de existir outro transportador ABC, codificado pelo gene *ndvA*, que substitui a função do gene *exsA* (Becker *et al.*, 1995).

8.1. Polissacarídeos

Análises moleculares têm revelado que o estabelecimento do contato entre patógenos e seus hospedeiros depende de uma troca de moléculas sinalizadoras entre os mesmos. Existem várias moléculas envolvidas neste contato e nos mecanismos de virulência, sendo que a principal são os polissacarídeos. A classe *Proteobacteria* possui vários tipos de polissacarídeos envolvidos nos processos de invasão e virulência: polissacarídeo extracelular ou succinoglicano (EPS I), “cyclic β -1-2 glucan” ou polissacarídeo B e lipopolissacarídeo (LPS) (González *et al.*, 1996). A biossíntese e o transporte destes polissacarídeos para o

exterior das células pode ser realizado pelo sistema de transporte ABC, citado anteriormente (Vizcaino *et al.*, 1999).

O polissacarídeo B é produzido por *Rhizobium* e *Agrobacterium* e se localiza no espaço periplasmático destes microrganismos. Mutantes destas bactérias defectivos na produção deste tipo de polissacarídeo são incapazes de invadir e manter uma interação normal com seus hospedeiros, mostrando-se avirulentos (Ugalde, 1999).

O LPS, discutido anteriormente no presente trabalho, é um importante componente da membrana externa de várias bactérias Gram-negativas. Estudos têm demonstrado que a ausência do antígeno O, componente do LPS, faz com que os microrganismos se tornem mais sensíveis à ação do sistema imune do seu hospedeiro (Ugalde *et al.*, 2000).

O succinoglicano ou EPS I, também produzido por *Rhizobium* e *Agrobacterium*, é um polímero extracelular originado de açúcares citoplasmáticos, composto de um resíduo de galactose e sete de glicose, apresentando modificações pela adição de radicais acetato, succinato e piruvato. O processo de biossíntese do mesmo envolve interessantes mecanismos de reunião, polimerização e exportação. O EPS I pode ser separado em duas frações: HMW (alto peso molecular) e LMW (baixo peso molecular) (González *et al.*, 1996). Sugere-se que o ancestral comum da classe *Proteobacteria* possuía este polissacarídeo, mostrando a possibilidade de todos os membros desta classe serem capazes de produzir esta molécula (Leigh & Walker, 1994 e Vizcaino *et al.*, 1999).

Rhizobium pertence à classe *Proteobacteria* e compartilha vários genes que desempenham as mesmas funções em *Brucella* (genes *exoB* e *galE*, por exemplo). Estes microrganismos fixam nitrogênio em associação simbiótica às plantas leguminosas. Durante o estabelecimento desta simbiose, a bactéria induz a formação de nódulos nas plantas, invade estes nódulos, se protege com formação de uma capa de origem membranosa produzida pela própria planta e se dispersa pelo interior da mesma. Vários estudos comprovam que exopolissacarídeos produzidos por *Rhizobium* desempenham papel específico no desenvolvimento desta associação dos mesmos com seus hospedeiros. Acredita-se que o EPS I está envolvido principalmente neste processo de invasão uma vez que mutantes incapazes de produzir esta molécula não conseguem invadir seu hospedeiro. Este polissacarídeo também é produzido por *Agrobacterium*, entretanto sua função nestes

microrganismos ainda é desconhecida (Reuber *et al.*, 1991; Reuber & Walker, 1993; González *et al.*, 1996).

Supõe-se que o EPS I desempenha uma função estrutural, beneficiando a adesão de *Rhizobium* às raízes, aumentando a aquisição de nutrientes e/ou promovendo proteção contra estresse causado pelo meio. Alternativamente, o EPS I pode atuar como uma molécula sinalizadora, desencadeando o desenvolvimento de uma resposta na planta ou regulando a mesma (Becker *et al.*, 1995 e González *et al.*, 1996).

Vizcaino *et al* (1999), levantaram a possibilidade da *Brucella* produzir um tipo de polissacarídeo ainda não identificado, devido ao fato da região presente em outras espécies da *Brucella* mas que se apresenta deletada em *B. abortus*, apresentar vários genes supostamente envolvidos na síntese e/ou transporte de polissacarídeos. O LPS da *Brucella*, bem como o EPS de outros microrganismos são considerados fatores de virulência bacterianos como citado anteriormente. A identificação de um novo polissacarídeo em *Brucella* é muito importante e interessante pois possibilitará um melhor entendimento nas diferenças de patogenicidade e preferência por hospedeiro observada entre as espécies deste gênero.

9. Repressão catabólica

A repressão catabólica (CR) é um mecanismo regulatório no qual a síntese de vários sistemas de enzimas envolvidas neste processo é inibida na presença de fontes de carbono rapidamente metabolizadas, tais como glicose, sucrose e manitol. Esta repressão influencia diversos aspectos da fisiologia celular em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A expressão de vários fatores de virulência em várias bactérias patogênicas e o desenvolvimento de processos de inicialização de esporulação em *Bacillus* são controlados pela CR. Entretanto, os mecanismos primários mediadores deste processo em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são bem diferentes (Chauvaux, 1996; Behari & Youngman, 1998).

A CR em bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, vem fornecendo informações para um melhor entendimento da regulação da síntese de várias enzimas catabólicas envolvidas neste processo. O mecanismo da CR nestas bactérias envolve uma proteína de ativação catabólica

(CAP) e seu ligante regulador, AMP cíclico. Este mecanismo nestas bactérias é bem conhecido (Jones *et al.*, 1997; Behari & Youngman, 1998).

Em bactérias Gram-positivas o mecanismo de repressão é bem diferente daquele conhecido das demais bactérias. Em contraste a estas últimas, nas Gram-positivas, a CR é controlada negativamente e não há presença de produção de AMP cíclico (Egeter & Bruckner, 1996; Behari & Youngman, 1998).

Os genes envolvidos na CR de *B. subtilis*, por exemplo, são controlados por mais de um mecanismo de regulação. Um destes mecanismos é mediado por dois fatores negativos de transcrição, a proteína CcpA (catabolite control protein), uma proteína de ligação ao DNA, membro de uma família de reguladores transcricionais, e a proteína HPr que consiste em um sinal de transdução. Esta última interage com CcpA, aumentando sua especificidade. Um terceiro elemento está envolvido neste mecanismo e consiste em uma seqüência designada *cre* (catabolite-responsive element), representando a seqüência de DNA onde a proteína CcpA se liga, sendo essencial à CR de vários genes. Em várias bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de GC, seqüências *cre* estão presentes nas regiões promotoras ou próximo a estas na maioria dos genes controlados por este processo. Aparentemente, este tipo de mecanismo regulatório se encontra presente em todas estas bactérias Gram-positivas que possuem esta característica em sua seqüência de DNA (Chauvaux, 1996; Egeter & Bruckner, 1996; Behari & Youngman, 1998).

HPr é uma proteína fosfocarreadora que pode ser fosforilada em dois locais: no resíduo catalítico de histidina 15 e no resíduo regulatório de serina 46. As interações entre CcpA e HPr envolvem fosforilação desta última no resíduo regulatório de serina 46 (Chauvaux, 1996).

Análises de vários autores permitiram a determinação do mecanismo de repressão catabólica através da proteína CcpA: a glicose ou outro carboidrato de rápida metabolização geram intermediários metabólicos da via glicolítica que por sua vez ativam uma enzima quinase (“ATP-dependent HPr Kinase”) que provoca a fosforilação da proteína HPr no resíduo de serina 46. Esta proteína HPr fosforilada (HPr ser-P) interage com a proteína CcpA favorecendo a ligação ao elemento *cre*. É esta ligação a este elemento que bloqueia o início da transcrição neste local. A interação entre o elemento *cre* e a proteína CcpA foi

confirmada por vários autores, entretanto ainda não se sabe exatamente se esta interação ocorre somente com a proteína CcpA ou se ocorre com o complexo formado pelas proteínas CcpA e Hpr (Chauvaux, 1996; Behari & Youngman, 1998).

A mutação no gene *ccpA* tem como consequência um efeito pleiotrópico no crescimento celular e na regulação enzimática de vários organismos, indicando o importante papel que CcpA desempenha na CR dos mesmos. Apesar do controle catabólico mediado por CcpA-HPr se mostrar uma importante via de regulação, várias evidências sugerem que este não é o único mecanismo responsável pela CR em *B. subtilis* e outras bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de GC. Recentemente, foi mostrado em *Streptococcus mutans* que a mutação do gene *regM*, homólogo ao gene *ccpA*, não tem nenhum efeito sob várias enzimas envolvidas na CR deste microrganismo (Behari & Youngman, 1998).

Em *Listeria monocytogenes* vários açúcares são responsáveis pela regulação de genes de virulência. PrfA é uma proteína regulatória positiva determinante de virulência neste microrganismo. A regulação destes genes pelos açúcares representa um controle catabólico e provavelmente ocorre através da modificação da atividade de PrfA. Este fato está de acordo com a observação de que mutações nesta proteína resultam na expressão desregulada do gene *hly*, o qual codifica o fator de virulência hemolisina, na presença de açúcares e outros fatores ambientais. Entretanto, mutações no gene *ccpA* sugerem que a proteína codificada por este gene não é responsável pela regulação de *hly*, sugerindo que outros fatores ainda não identificados estão envolvidos na regulação de genes de virulência de *L. monocytogenes* na presença de açúcares (Behari & Youngman, 1998).

Justificativa e Objetivos

As doenças infecciosas constituem importante causa de mortes na história da humanidade. A identificação de fatores de virulência, através da utilização de novas tecnologias desenvolvidas nos últimos anos, têm sido crucial para melhor compreensão dos mecanismos de interação e sobrevivência utilizados pelos microrganismos patogênicos, bem como sua capacidade de causar danos ao hospedeiro.

A brucelose, doença causada por espécies do gênero *Brucella*, é uma zoonose responsável por grandes perdas sócio-econômicas, afetando gravemente homens e animais. *Brucella* são bactérias Gram-negativas, intracelulares facultativas que podem sobreviver em células fagocíticas bem como em células não fagocíticas. Os mecanismos de invasão e sobrevivência em vários organismos modelo já são bem conhecidos, entretanto, em *Brucella*, estes eventos começaram a ser desvendados nos últimos anos desta década.

Atualmente não existe uma vacina eficaz ao controle da brucelose humana. Entretanto, no controle da brucelose animal, há uma vacina constituída de uma linhagem viva atenuada da bactéria que apresenta três grandes desvantagens: (i) esta preparação com a bactéria viva pode causar aborto quando administrada em fêmeas gestantes; (ii) é uma linhagem patogênica para humanos; (iii) esta vacina induz produção de anticorpos em animais imunizados, interferindo no diagnóstico de populações infectadas. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de uma vacina efetiva e segura para o controle desta enfermidade.

As vacinas vivas atenuadas apresentam vantagens em relação a outros tipos de vacinas por serem capazes de induzir uma excelente imunidade. A identificação de novos genes envolvidos na virulência da *B. abortus* pode permitir a obtenção de um candidato a vacina viva, além de contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência utilizados por este microrganismo. Sendo assim, com o objetivo de identificar genes desta bactéria envolvidos nestes processos foi utilizado no presente trabalho um programa de identificação gênica. As seqüências geradas podem ser depositadas na nova divisão do banco de dados do "National Center of Biotechnology Institut", NCBI, denominado

“Genome Survey Sequence” (GSS). Esta é destinada exclusivamente a seqüências geradas a partir de programas semelhantes a estes.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo o isolamento, a identificação e a caracterização molecular do clone 64, que possui os genes *exsA* e *ccpA* da *B. abortus*, através da elaboração de um mapa de restrição, determinação e análise de sua estrutura primária, além de análises de motivos protéicos, modelagem das estruturas secundária e terciária, análise do perfil de hidropatia e verificação do número de cópias do gene *exsA* no genoma da *B. abortus*.

Material e Métodos

1. Isolamento do clone 64

1.1. Linhagens bacterianas utilizadas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho foram:

B. abortus 2308 e *B. abortus* S19. Todas foram fornecidas pelo Dr. J.M. Verger do laboratório de Patologia Infeciosa do Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica, Nouzilly, França.

E. coli DH5 α (F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(r_k- m_k+) *phoA* *supE44* λ *thi-1* *gyrA96* *relA1*)

1.2. Meios de cultura

Para o cultivo das linhagens de *B. abortus* foi utilizado o meio de cultura "Brucella Broth" (BB) (DIFCO) e para *E. coli*, os meios Luria Bertani (LB) (DIFCO), SOB e SOC (GIBCO BRL). Estes meios foram suplementados com 1,5% de ágar bacteriológico para cultura em meio sólido.

1.3. Biblioteca genômica da *B. abortus*

A biblioteca genômica utilizada foi construída no laboratório do Prof. Sérgio Costa Oliveira (ICB/UFMG), a partir da digestão parcial do DNA genômico de *B. abortus* 2308, com a enzima *Cla*I (GIBCO BRL). Os fragmentos que possuíam 4Kb, em média, foram clonados no sítio *Acc*I do vetor pUC12 (figura 3) (Vieira & Messing, 1982).

1.4. Obtenção de bactérias eletrocompetentes e eletrotransformação

Uma colônia de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 10 ml de meio SOB e incubada durante 18 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Uma alíquota de 5 ml desta cultura foi diluída em 500ml do mesmo meio e incubada, sob as mesmas condições, até que a DO₆₀₀ 0.2-0.25 fosse alcançada. A cultura foi então transferida para um banho de gelo durante 30 minutos e em

seguida centrifugada durante 20 minutos a 8000 rpm a 4°C (centrífuga Sorvall T21, rotor SL250). Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 200 ml de glicerol 10% gelado e estéril e submetido às mesmas condições. A suspensão bacteriana foi novamente centrifugada sob as mesmas condições e o precipitado ressuspensionado em 200 ml de glicerol 10% gelado e estéril. Este passo foi repetido uma vez e o precipitado foi ressuspensionado em 100 ml de glicerol 10% gelado e estéril. Finalmente, ressuspendeu-se o precipitado em 2 ml de glicerol 10% gelado e estéril e alíquotas de 50 µl da suspensão bacteriana foram congeladas, utilizando-se uma mistura de gelo seco e metanol, sendo estas estocadas a -70°C.

Para análise da eficiência de transformação, tubos com células eletrocompetentes, congeladas a -70°C, foram colocadas no gelo durante cinco minutos. Em seguida adicionou-se, em dois tubos de células, 1 e 10 ng de pUC18, respectivamente, sendo estas misturas transferidas para cubetas de eletroporação, previamente resfriadas. Ambas amostras foram submetidas a um pulso de 2.5 Volts, capacitância 25 µFD e resistência de 200 Ω. Após o choque, foi acrescentado 950ml de meio SOC a cada cubeta. A mistura foi transferida para um tubo de 2ml e incubada a 37°C durante 1 hora. Diluições de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100µg/ml), X GAL (40µg/ml) e IPTG (0,04mM) e incubadas a 37°C durante 18 horas. Obteve-se 8,7 x 10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC) por micrograma de DNA.

1.5. Extração e dosagem do DNA plasmidiano

As colônias bacterianas que possuíam o fenótipo indicativo da presença de inserto foram inoculadas em 5 ml de meio LB suplementado com ampicilina (100µg/ml) e os inóculos foram incubados durante 18 horas. Em seguida, o DNA plasmidiano foi extraído pelo método de lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979), utilizando-se o "Kit" comercial Wizard™ Plus SV MiniPrep (Promega). Três mililitros da cultura bacteriana foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em 250µl de solução I (Tri-HCl, 50mM pH 7.5; EDTA, 10mM; RNase A 100µg/ml). Após cinco minutos, foi acrescentado 250µl de solução II (NaOH, 0,2M; SDS, 1%) e homogeneizada por inversão até que a mistura ficasse translúcida. Adicionou-se então 350µl de solução III (KOAc, 0,759M; ácido acético glacial, 2,12M pH 4.2) e o produto foi incubado durante cinco minutos a temperatura

ambiente. Em seguida, foi realizada uma centrifugação de 10 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante transferido para uma coluna do "Kit" e centrifugado durante 1 minuto. A coluna foi lavada com 1ml de uma solução contendo 60mM de NaOAc, 10mM de Tri-HCl pH 7.5; etanol 60% e o DNA plasmidiano foi eluído em 50µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.2, EDTA 1 mM).

Cinco microlitros do DNA plasmidiano, acrescentado de tampão de amostra (azul de bromofenol 0.5%, glicerol 25%), foi depositado em gel de agarose diluído 1% em tampão TAE 1X (Tris base 40mM pH 7.2, NaOAc 20mM, EDTA 1mM). A corrida eletroforética foi efetuada a 100 Volts durante 60 minutos em uma cuba horizontal. A quantificação do DNA das amostras foi estimada comparando-se com a intensidade do DNA de fago lambda (Stratagene) na concentração de 55ng/µl.

1.6. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas pelo método de terminação da cadeia de DNA (Sanger *et al.*, 1977). Foram utilizados iniciadores fluorescentes e uma DNA polimerase termoresistente seguindo as instruções do "Kit Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing with 7-deaza-dGTP" (Amersham Pharmacia Biotech). Os iniciadores fluorescentes utilizados foram : M13 (-40, Forward) 5' **GTT TTC CCA GTC ACG AC** 3' e M13 (Reverse) 5' **CAG GAA ACA GCT ATG AC** 3'.

O sequenciamento cíclico, baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), foi realizado em um termociclador (Mini-cyclerTM, MJ Research). Dois programas foram utilizados. O primeiro com o iniciador M13 (-40, Forward) cujas condições foram: 95°C - cinco minutos/ 25 ciclos de 95°C - 1 minuto, 50°C - 36 segundos, 72°C - 1 minuto e 24 segundos/ 72°C - 8 minutos. O segundo com o iniciador M13 (Reverse), seguindo as mesmas condições, com exceção da alteração da temperatura de anelamento que foi alterada para 55°C.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% e 8M de uréia em um sequenciador automático de DNA (A.L.F.- Automatic Laser Fluorescent Sequencer, Pharmacia Biotech), a 1500Volts, 45mAmper, 34 Watts e 45°C durante 12 horas. Os resultados do sequenciamento foram armazenados sob a

forma de cromatogramas e processados automaticamente pelo aparelho, utilizando o programa ALFwin Sequence Analyser 2.0 (Amersham Pharmacia Biotech). As seqüências foram editadas para eliminação de regiões indesejáveis do vetor, ambigüidade entre nucleotídeos e dados de baixa qualidade no final da mesma.

1.7. Pesquisa de homologia em banco de dados

As seqüências editadas foram comparadas a todas as seqüências de DNA e proteínas conhecidas, previamente depositadas em banco de dados, utilizando-se os programas BLAST N, para comparação entre seqüências de ácidos nucléicos, e BLAST X, para proteínas, após tradução automática das seqüências de DNA nas seis fases de leitura (tabela 3/ nº3).

2. Caracterização molecular do clone 64

2.1. Extração de DNA plasmidiano em larga escala

O clone denominado 64 foi inoculado em uma pré-cultura de 5ml de meio LB suplementado com 100µg/ml de ampicilina durante 8 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. A mesma foi então diluída em 500ml do mesmo meio nas mesmas condições de cultura durante 18 horas. A cultura foi centrifugada durante 10 minutos, a 8000 rpm, em temperatura ambiente (Sorvall T21, rotor SL250). O sedimento foi então ressuscitado em 18ml da solução I a 4°C (Glicose 50mM, EDTA 10mM, Tris base 25mM), suplementado com 2 ml de lisozima a 10mg/ml (SIGMA) e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado à mistura 40ml de solução II (0,2N NaOH e 1% SDS), preparada no momento do uso, seguindo-se de inversões e incubação em gelo durante cinco minutos. 20ml da solução III (KOAc 3M pH 4.8) a 4°C foi acrescentada e incubada no gelo durante 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm a 15°C e filtrada em papel de filtro duplo e o volume mensurado. A precipitação do DNA foi feita adicionando-se 1 volume de isopropanol (MERCK) à mistura, ficando esta incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente e foi então centrifugada a 13.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuscitado em 11ml de tampão TE pH 7.5, acrescido de 0,6ml de EDTA e transferido para um tubo cônico de 50ml contendo 13,25g de cloreto de cézio (SIGMA) e

1,25ml de solução de brometo de etídeo 10mg/ml. A mistura foi em seguida transferida para tubos de ultracentrifugação (Sorvall) com capacidade de 12ml e posteriormente lacrados em aparelho selador Crimper (Sorvall) e então centrifugados a 65.000 rpm durante 16 horas (Rotor VH65 - Sorvall ultracentrífuga).

O DNA plasmidiano fracionado foi visualizado com luz ultravioleta manual (320nm), coletado com o auxílio de uma agulha acoplada a uma seringa plástica descartável de 5ml e transferido para um tubo de 2ml. Sucessivas lavagens com 1ml de álcool isoamílico foram realizadas até que a fase inferior ficasse totalmente límpida. Em seguida esta fase foi coletada e submetida a diálise em membrana previamente tratada com tampão TE. Após a diálise, foi acrescentado 1X o volume de isopropanol, e a mistura mantida a -20°C. O produto foi então centrifugado por 30 minutos a 13000 rpm e precipitado com etanol 70%. Finalmente, o DNA foi ressuspensionado em 100µl de água mili-Q estéril.

A concentração e pureza do DNA foram estimadas após leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280nm (UV mini 1240 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, SHIMADZU) de uma alíquota diluída 1:50 em água milli-Q estéril.

2.2. Digestão enzimática

Cerca de 1µg de DNA plasmidiano (clone 64), obtido através da técnica descrita no item 2.1, foi digerido utilizando-se 5 unidades das seguintes enzimas de restrição *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *BglII*, *XmnI*, *EcoRV*, *BamHI*, *NotI*, *BglIII*, *HincII*, *NheI*, *SmaI*, *XbaI* e *HpaII*. As condições de reação foram as mesmas recomendadas pelos fabricantes e o volume final da reação foi de 20µl.

2.3. Resolução eletroforética

Os DNAs plasmidianos digeridos acrescidos de 1:10 do volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 25%) foram fracionados em gel de agarose cuja concentração variou de 0,7 a 1,2%, dependendo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados, em tampão TAE 1X (Tris base 40mM pH 7.2, NaOAc 20mM, EDTA 1mM), contendo brometo

de etídeo (0,5µg/ml). As corridas foram realizadas a 100Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado e o gel fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta (320nm) através do sistema de documentação fotográfica “Kodak Digital Science™ DC40 Camera” (Kodak) e a foto processada pelo programa “Electrophoresis Documentation and Analysis System” (Kodak). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder (GIBCO BRL).

2.4. Purificação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA foram recuperados do gel de agarose e purificados de acordo com o protocolo do fabricante do “Kit” comercial “Rapid Gel Extration” (GIBCO BRL).

2.5. Subclonagem dos fragmentos do clone 64 em pUC18 *SmaI*/BAP

O preenchimento dos fragmentos que apresentavam extremidades coesivas foi realizado utilizando-se entre 0,2-1µg de DNA, 2mM de dNTPs, 1,5 unidades de Klenow e tampão universal one-phor-all 1X (Amersham Pharmacia Biotech), incubados em banho maria a 25°C durante 30 minutos e transferidos para outro que estava a 75°C durante 15 minutos para inativação da enzima. As clonagens foram feitas utilizando-se 50 ng de pUC18 *SmaI*/BAP (figura 4, anexo) (Amersham Pharmacia Biotech), 2 unidades de T4 DNA ligase (GIBCO BRL), 150 ng dos fragmentos de DNA com extremidades “cegas” ou coesivas que foram preenchidas, tampão de ligação 1X (GIBCO BRL) a 16°C durante 18 horas em um termociclador “Mini-cycler™ MJ Research”.

2.6. Verificação da presença e tamanho dos insertos dos subclones

Colônias brancas obtidas após transformação, descrita no item 1.4, tiveram o inserto do DNA plasmidiano amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes iniciadores: M13 (universal) 5' CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' e M13 (reverse) 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10µl, contendo 20 pM de cada iniciador, 0,25mM de dNTPs, 0,1 unidade de Taq DNA polimerase (GIBCO BRL),

2mM de $MgCl_2$ e tampão da enzima IX concentrado (GIBCO BRL). A reação ocorreu em um aparelho termociclador "Mini-cyclerTM MJ Research". O programa utilizado consistiu de: 95°C - cinco minutos; 25 ciclos de 95°C - 1 minuto, 55°C - 36 segundos, 72°C - 1 minuto e 24 segundos; 72°C - 8 minutos. Após a reação, todo o volume da mesma foi aplicado em gel de agarose a 1%, sendo a corrida eletroforética analisada e documentada como descrito no item 2.3.

Confirmada a presença do inserto, a colônia correspondente foi inoculada em 5ml de meio LB, suplementado com ampicilina (100 μ g/ml) e incubada sob agitação constante durante 18 horas a 37°C.

O DNA plasmidiano foi extraído através da técnica de lise alcalina utilizando-se o "Kit" comercial "Wizard Mini Prep" (Promega). A concentração do DNA plasmidiano obtido, as reações de sequenciamento e suas análises em banco de dados de DNA e proteínas, foram realizadas como descrito nos itens 1.5, 1.6 e 1.7 respectivamente.

2.7. Organização da estrutura primária do inserto do clone 64

As fitas senso e antisenso dos subclones foram sequenciadas em média 5 vezes, como descrito no item 1.6. As sequências geradas foram analisadas manualmente ou com o auxílio dos programas computacionais BlastN e BCM Search Launcher (tabela 3, nºs 3 e 4 respectivamente) com o objetivo de se eliminar regiões de vetor, ambigüidades e ordená-las para se reconstituir o inserto do clone 64.

Com o objetivo de se completar a estrutura primária do clone 64, foram também realizados sequenciamentos (item 1.6) com oligonucleotídeos desenhados no interior da sequência deste clone. Estes oligonucleotídeos são os seguintes: (exsAR) 5'GAT CCG ACA CAC CGT TCT G 3', (exsAF) 5'ATC TCG CTT GGT TTC GTG G 3', (operonF) 5' CCT CAT CGC CCT GCT CTC 3' e (operonR) 5' CTC CAG TTA TGT CAC CGA AT 3'.

As buscas das possíveis janelas de leitura abertas (ORFs) e motivos regulatórios na sequência do clone 64, bem como a definição das estruturas secundária e terciária da proteína, foram realizadas pelos programas de número 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 14 (tabela 3).

Foram consideradas, nestas análises, as regiões que codificavam polipeptídeos iguais ou maiores a 70 aminoácidos as quais foram submetidas a uma análise mais detalhada em banco de dados de DNA e proteínas.

3. Determinação do número de cópias do gene *exsA*

3.1. Extração do DNA genômico da *B. abortus*

Uma única colônia de *B. abortus* 2308 foi inoculada em 25ml do meio “*Brucella* Broth” (DIFCO) e cultivada durante 72 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 9000 rpm durante cinco minutos em uma minicentrífuga MSE (Sanyo). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 1ml da solução I (Tris-HCl 10mM pH 7.0, EDTA 10mM pH 8.0, NaCl 300mM) e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 300µl de solução II (Tris-HCl 25mM pH 8.0, EDTA 10mM pH 8.0, NaCl 10mM) e 300µl de lisozima (10mg/ml) diluída nesta mesma solução, que foi então incubada no gelo durante 10 minutos e transferida para um banho maria, durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, foi acrescentado à mistura 22µl de sarcosil 30% e incubado a 65°C durante 20 minutos, seguida de incubação em gelo durante cinco minutos. Foi acrescentado à mistura 1 volume de fenol (GIBCO BRL) e homogeneizado vigorosamente durante 1 minuto. Em seguida, a mesma foi centrifugada durante cinco minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo no qual foi acrescentado 1 volume de fenol-clorofórmio (1:1). O procedimento citado anteriormente foi repetido e o sobrenadante novamente transferido para um novo tubo. Foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto (Synth) e 200mM de NaOAc, após esta etapa, a mistura foi incubada durante 30 minutos a -20°C e centrifugada durante cinco minutos a 10.000 rpm. Acrescentou-se ao DNA precipitado, 600µl de etanol 70% seguindo-se de centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o DNA mantido a temperatura ambiente para que este secasse completamente. O mesmo foi ressuscitado em 50µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.2, EDTA 1 mM) e tratado a 37°C, em banho-maria durante 1 hora com RNaseA (100µg/ml).

3.2. Digestão enzimática do DNA genômico e fracionamento eletroforético

O DNA genômico de *B. abortus* 2308 sofreu digestões enzimáticas simples com as enzimas *Xba*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Cla*I e *Eco*RI. As reações foram realizadas com 15µg de DNA genômico, 45 unidades de cada enzima, o respectivo tampão 1X concentrado para as digestões simples (Amersham Pharmacia Biotech), durante 2 horas a 37°C.

Após a digestão enzimática, foi preparado um gel de controle com 1/10 do volume das reações e em seguida realizou-se o fracionamento eletroforético em gel de agarose 1%, com o restante das reações, durante 5 horas a 100 Volts. Os géis foram fotografados e documentados como descrito no item 2.3.

3.3. "Southern Blot"

Após ser fotografado, o gel foi tratado com a solução I (HCl 0,2N) durante 15 minutos, a solução foi então descartada e o gel enxaguado com água bidestilada. Em seguida o mesmo foi tratado três vezes, durante 15 minutos, com solução II (NaCl 1,5M; NaOH 0,5N) e novamente enxaguado com água bidestilada. Por fim, o gel foi tratado três vezes durante 15 minutos com a solução III (Tris base 1M pH 7.4 e NaCl 1,5 M).

O gel foi colocado sobre um suporte contendo papel Wattmam sobre um reservatório contendo 10X SSC. Foram colocadas sobre o gel uma membrana de "nylon" Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech), três folhas de papel Wattmam umedecidas em solução de 2X SSC, duas pilhas de papel toalha, uma placa de vidro e um peso de 500 gramas. A transferência foi efetuada durante 18 horas em temperatura ambiente. O sistema foi desfeito e a posição das canaletas marcadas.

O DNA foi fixado à membrana através de exposição à luz ultra violeta (320nm) em um aparelho CL1000 crosslinker (UVP), com três pulsos de 60 segundos a $1,2 \times 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, e estocadas entre duas folhas de papel de filtro até o momento da hibridização.

3.4. Marcação radioativa do fragmento do gene *exsA*

Utilizou-se como sonda um fragmento de 1600pb do gene *exsA* obtido através da digestão com *Hind*III. 50ng deste fragmento purificado foi marcado radioativamente com [α^{32} P] dCTP (3000 Ci/mmol) através da técnica de “random primer” utilizando-se o “Kit” comercial “Random Primers DNA Labelling System” (GIBCO BRL), de acordo com as recomendações do fabricante. Os nucleotídeos não incorporados foram purificados por fracionamento em coluna de Sephadex G50 Fine, previamente preparada em pipeta Pasteur e equilibrada com tampão TE (Tris base, 10mM, EDTA, 1mM) acrescido de 50mM de NaCl. O mesmo processo foi utilizado para marcar o padrão de peso molecular 1Kb DNA ladder (GIBCO BRL).

3.5. Hibridização

3.5.1. Pré-hibridização

As membranas foram umedecidas em solução de 2X SSC (1XSSC – 0,15M NaCl, 0,015M de citrato de sódio) e em seguida submetidas à pré-hibridização durante 3 horas a 37 °C, em um forno de hibridização (Techne Hybridizer HB-1D), em 50 ml de solução de: formamida deionizada (50%), DNA de esperma de salmão (100 μ g/ml), NaCl (0,9M), Na₂HPO₄ (0,048M), EDTA (0,005M), SDS (0,1%) e Denhardt (0,2%).

3.5.2. Hibridização e lavagens das membranas

Após o período de pré-hibridização, a sonda, desnaturada a 95°C durante 7 minutos, foi acrescentada (500 μ l; 5x10⁶ cpm) à solução citada anteriormente (item 3.4) e incubada durante 18 horas nas mesmas condições usadas na pré-hibridização. Após este período as membranas foram lavadas 6 vezes; 3 vezes na solução I (2X SSC, 0,1% SDS) e 3 vezes na solução II (1X SSC-0,1%SDS), com temperatura variando entre a ambiente e 65°C. Em seguida, as membranas foram colocadas juntamente ao filme (TMG/RA 35x43, Kodak) em um “cassete” de autoradiografia com intensificador (X-OMATIC CASSETTE, Kodak) a -

70°C durante 24 horas. Os filmes foram revelados de acordo com as especificações do fabricante (GBX Kodak).

4. Construção de um plasmídeo suicida para mutagênese do gene *exsA* de *B. abortus*

4.1. Obtenção do gene que confere resistência à canamicina

Utilizou-se 10µg do vetor pUC4K (figura 5, anexo) na digestão com a enzima *EcoRI* (GIBCO BRL) para a retirada do gene de resistência à canamicina. As condições de reação foram as mesmas recomendadas pelos fabricantes e o volume final da reação foi de 100µl. A reação de digestão foi posteriormente submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, o fragmento de interesse de aproximadamente 1,28Kb foi excisado do gel, purificado e dosado, como descrito nos itens 2.3, 2.4 e 1.5, respectivamente. Após esta purificação o fragmento correspondente ao gene de resistência à canamicina foi submetido ao preenchimento de pontas conforme descrito no item 2.5.

4.2. Clonagem do gene que confere resistência à canamicina no clone 64

Após análise de restrição do clone 64, aproximadamente 10µg do DNA do mesmo foi utilizado na digestão com a enzima *EcoRV*, sendo as condições de reação as mesmas recomendadas pelos fabricantes e o volume final da reação de 100µl. A purificação do clone 64 digerido foi realizada conforme descrito no item 2.4. Este clone purificado foi desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina (CIAP – GIBCO BRL). A reação de desfosforilação foi feita com 8µg do vetor, 2,67U/µl da enzima CIAP e tampão da mesma (1X). A reação foi incubada a 37°C por 1 hora, sendo transferida para banho-maria a 75°C por 15 minutos para inativação da ação da mesma. Posteriormente, a reação foi submetida a purificação conforme descrito no item 2.4, e dosada em gel de agarose 1% de acordo com o item 1.5.

Após estas preparações, o gene de resistência à canamicina foi utilizado na mistura de ligação com o clone 64 digerido, desfosforilado e purificado conforme descrito no item 2.5. A transformação deste produto de ligação foi realizada de acordo com o item 1.4. Posteriormente, foram selecionadas colônias que fossem resistentes aos antibióticos ampicilina (100µg/ml) e canamicina (50µg/ml). Os clones positivos para esta construção

foram denominados clone 64:Kan. Para confirmação do fenótipo canamicina resistente, o DNA do clone 64:kan foi digerido com a enzima de restrição *Pst*I e o produto da digestão analisado em gel de agarose, conforme descrito nos itens 2.2 e 2.3, respectivamente.

4.3. Inativação do gene *exsA* em *B. abortus*

4.3.1. Preparação de células eletrocompetentes da *B. abortus* S19

Inicialmente, com o objetivo de se obter uma cultura saturada da *B. abortus* S19, uma alíquota de 5µl desta bactéria em estoque (mantida a -70°C) foi inoculada em 5ml de meio BB, em um tubo cônico de 50ml e incubado a 37°C, 200 rpm durante 48 horas. Após este período, 1ml deste cultivo saturado foi diluído em 100ml de meio BB em erlenmeyer de 250ml e incubado a 37°C, 200 rpm durante aproximadamente 12 horas, até alcançar DO₆₀₀ 0,4-0,5. Em seguida a cultura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos, e centrifugada durante 10 minutos a 10000rpm e 4°C (centrífuga Sorvall T21, rotor SL250). O sobrenadante foi eliminado e ressuspendeu-se o precipitado em 100ml de água mili-Q estéril a 4°C. O produto foi novamente centrifugado seguindo-se as mesmas condições, o precipitado novamente ressuspendido em 50ml de água mili-Q a 4°C, seguido de nova centrifugação. Repetiu-se o mesmo procedimento de ressuspensão e centrifugação com 25ml de água mili-Q a 4°C e em seguida ressuspendeu-se o precipitado em 10ml de água mili-Q com 10% de glicerol a 4°C, centrifugando-se novamente. Finalmente o precipitado foi ressuspendido em 1ml de água mili-Q com 10% de glicerol a 4°C, separado em alíquotas de 100µl e estocado a -70°C.

4.3.2. Eletroporação

Para análise da eficiência de transformação, tubos com células eletrocompetentes, congeladas a -70°C, foram colocadas no gelo durante cinco minutos. Em seguida adicionou-se, 200ng do vetor pBBR1MCS (figura 1), sendo esta mistura transferida para as cubetas de eletroporação de 0,2cm, previamente resfriadas e estéreis, e deixou-se no gelo até o momento da eletroporação (não ultrapassando 20 minutos). O mesmo procedimento foi realizado com 200ng do vetor pBluescript II SK - + (figura 6, anexo), que é utilizado como controle negativo. O eletroporador (Gene-Pulser/Pulse Controller, BioRad CA, USA)

instalado em fluxo laminar foi ajustado com os seguintes parâmetros: 25µF de capacitância, 2,5kv de voltagem e 600 OHMs de resistência. Em seguida, eletroporou-se as células, as quais foram imediatamente ressuspensas em 900µl de meio SOC e incubadas a 37°C, 200 rpm durante 4 horas. Posteriormente, 100µl destas suspensões foram plaqueados em meio BB sólido suplementado com canamicina (50µg/ml) e ampicilina (100µg/ml) para as transformações realizadas com os vetores pBBR1MCS e pBluescript II SK - +, respectivamente, e incubados a 37°C em estufa com 10% de CO₂. O mesmo procedimento foi realizado com o clone 64:kan seguindo-se as mesmas condições citadas anteriormente, com exceção das concentrações do DNA que variaram de 500ng a 10µg.

5. Expressão da proteína ExsA

5.1. Clonagem do gene *exsA* no vetor pProEX HTb

Para clonagem direcional do gene *exsA* no vetor pProEX HTb (figura 7, anexo), foram desenhados oligonucleotídeos com adaptadores nas pontas, de modo que estes permitiram a amplificação deste gene e posterior digestão com enzimas de restrição para a clonagem (*Pst*I e *Bam*HI). Os oligonucleotídeos desenhados foram: *exsA*BamF (Foward) 5' GGG GAT CCA TCG ATT TCC GGG GG 3' e *exsA*PstR (Reverse) 5' GGC TGC AGT TAA CAG ATA TGT CTT 3' (sublinhado e negrito: sítios das enzimas *Bam*HI e *Pst*I, respectivamente). As condições para a PCR foram as mesmas citadas no item 2.6. Após a reação, todo o volume da mesma foi aplicado em gel de agarose a 1%, sendo a corrida eletroforética analisada e documentada como descrito no item 2.3.

A banda com o tamanho esperado, referente ao gene *exsA*, foi excisada do gel, purificada e dosada conforme citado nos itens 2.4 e 2.3, respectivamente. Em seguida o produto purificado foi digerido com as enzimas *Pst*I e *Bam*HI e novamente purificados e dosados como descrito acima. As condições utilizadas nas digestões foram seguidas conforme especificações do fabricante.

O vetor pProEX HTb foi digerido com as enzimas *Pst*I e *Bam*HI conforme especificações do fabricante, o produto analisado em gel, purificado e dosado conforme citado nos itens 2.3, 2.4 e 1.5, respectivamente. O vetor purificado foi então desfosforilado conforme descrito no

item 4.2. Finalmente, foi feita a ligação do gene *exsA* no vetor pProEX HTb, sendo posteriormente realizada a transformação deste produto em DH5 α como descrito nos itens 2.5 e 1.4, respectivamente, e as colônias brancas selecionadas. Para confirmação da clonagem do gene *exsA* no vetor pProEX HTb, o DNA dos clones obtidos foi extraído, digerido com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI e analisados em gel de eletroforese como descrito nos itens 1.5, 2.2 e 2.3, respectivamente.

5.2. Expressão da proteína ExsA no vetor pProEX HTb

5.2.1. Experimento piloto

Foi preparado um pré-inóculo saturado, utilizando-se 5ml de meio SOB suplementado com ampicilina (100 μ g/ml), com período de incubação de 16 horas, a 37°C e 200 rpm. Após o crescimento da cultura, 500 μ l da mesma foram inoculados em 50ml de meio SOB, 0,1% de glicose, suplementado com ampicilina (100 μ g/ml) e mantido sob as mesmas condições até atingirem DO₆₀₀ 0,5. Neste momento, foi retirada uma alíquota de 25ml da cultura e adicionado IPTG (0,6mM, concentração final). As células eram novamente incubadas sob as mesmas condições e foram retirados 1ml de cultura a cada 1 hora após a indução com IPTG. Foram retiradas no total 6 alíquotas, referentes a 1, 2, 3, 4, 5, ON (over night) horas de expressão. As alíquotas retiradas foram centrifugadas e o precipitado diluído em tampão de amostra (1X) (Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%, β -mercaptoetanol 5%).

5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em sistema de mini-gel (BioRad). Os géis foram feitos a partir de uma solução estoque (p/v) de acrilamida 29,2% e bis-acrilamida 0,8%. O gel de separação foi feito com 10% acrilamida (3,05ml de estoque de acrilamida/bisacrilamida, 2,5ml de Tris-HCl estoque 1,5M pH 8,8 e 0,1% SDS). O gel de empacotamento foi feito a 4% de acrilamida (600 μ l de estoque de acrilamida/bisacrilamida, 1,25ml de Tris-HCl estoque 0,5M pH 6,8 e 0,1% SDS). A polimerização dos géis ocorreu na presença de persulfato de amônio e TEMED, nas concentrações finais de 0,1% e 1:2000, v/v, respectivamente. As amostras diluídas em tampão de amostra foram fervidas por cinco

minutos e aplicadas no gel. A corrida das mesmas foi realizada em tampão de corrida (15% Tris, 72% glicina, 5% SDS, pH 8,3) a 100V até migração completa pelo gel. O padrão de peso molecular utilizado foi o 10kDa Ladder (GIBCO – BRL). O gel foi corado com azul brilhante de Comassie (Comassie Blue R 250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) em temperatura ambiente por 30 minutos. O gel foi descorado com solução de metanol 50% e ácido acético 10% por aproximadamente três horas, até que as bandas fossem evidenciadas.

5.4. “Western Blot”

Após a separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad), utilizando-se o sistema Mini Transblot (BioRad), em tampão de transferência (0,025M Tris, 0,192M glicina, pH 8,3 e 20% metanol), por 1 hora a 100V, em banho de gelo em câmara fria. A transferência das proteínas foi monitorada pela coloração da membrana por uma solução de 1% de Ponceau S (Merck), em ácido acético 10%. Em seguida o padrão de peso molecular foi retirado e a membrana cortada em tiras, sempre que necessário para utilização de diferentes soros.

As membranas foram bloqueadas em 50ml de solução TBST (NaCl 0,5M, Tris 0,02M, pH 7,5, Tween 20 0,05%) com 5% de leite em pó desnatado, por 1 hora sob agitação branda em temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas três vezes durante 10 minutos cada, com TBST nas mesmas condições acima. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o soro anti-histidina (Anti-His, Amersham Pharmacia Biotech) diluído 1:1000 em TBST, por 1 hora, temperatura ambiente, sob agitação branda. Após a reação com o anticorpo, as membranas foram submetidas às lavagens como descrito acima. As membranas foram então incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente com Anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma), diluído 1:2000 em TBST e novamente lavadas como descrito anteriormente. A última lavagem foi realizada com Tampão da Fosfatase alcalina (Tris-HCl 100mM, pH 8,5, MgCl₂ 5mM e NaCl 100mM). A reação foi revelada com incubação a temperatura ambiente das membranas em tampão fosfatase alcalina contendo os substratos NBT (Nitro Blue Tetrazolium) 4mM e BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) 3,8mM, até que as bandas se tornassem visíveis. Esta foi paralisada pela submersão das membranas em água destilada.

Resultados e Discussão

1. Identificação e isolamento do gene *exxA* da *B. abortus*

1.1. Geração das GSS (“Genome Survey Sequence”)

A compreensão dos mecanismos de patogenicidade e virulência de bactérias e fungos depende da identificação e caracterização de produtos gênicos que estejam de algum modo envolvidos com o progresso da infecção destes organismos (Hensel *et al.*, 1995).

Com o objetivo de identificar genes envolvidos no processo de infecção da *B. abortus*, foi utilizado um Programa de Descoberta Gênica baseado no sequenciamento aleatório de extremidades de clones de uma biblioteca genômica da linhagem 2308. A principal vantagem desta técnica é o seu baixo custo, pois baseia-se em um único sequenciamento destas extremidades. Estas são então submetidas a análises de homologia e suas seqüências nucleotídicas e protéicas comparadas às demais existentes em banco de dados (tabela 3/nº 3). Em julho de 2000, o “National Center of Biotechnology Information” (NCBI) criou uma nova divisão do banco de dados denominada “Genome Survey Sequence” (GSS), destinada a receber seqüências produzidas a partir de programas similares ao citado anteriormente. A criação desta mostra a importância da geração destes dados, uma vez que estas seqüências podem fornecer informações valiosas sobre o funcionamento de vários organismos.

Através desta abordagem, foram geradas 100 GSS da *B. abortus* (tabela 1). Nesta tabela estão apresentados o nome dos clones sequenciados, a homologia encontrada em banco de dados (tabela 3/nº 3, anexo) e o programa utilizado nas análises bem como as suas homologias.

Análises das GSS geradas permitiram a identificação de vários genes supostamente envolvidos em virulência e patogenicidade (11%), genes homólogos a enzimas (24%), a proteínas envolvidas no transporte celular (7%), proteínas “heat shock” (2%) e genes com outras funções (52%). Das 100 GSS geradas, apenas 4% destas não apresentaram homologia a nenhuma seqüência depositada em banco de dados. Estes resultados são apresentados no

gráfico 1. Dos 11% de genes identificados como supostamente envolvidos em virulência, hoje a grande maioria já foi estudada e seu envolvimento nestes processos foram confirmados, como por exemplo os genes *htrA*, *purE* da *B. abortus* e o gene *ndvB* de *R. meliloti*. No gráfico 2 são mostrados as homologias das seqüências da *Brucella* e de outros organismos às GSS da *B. abortus*. Das 100 seqüências geradas, 11% apresentaram homologia a genes de espécies da própria *Brucella*, 52% apresentaram homologia às demais bactérias, 21% a outros organismos e em 16% destas não foi possível a identificação do organismo homólogo.

Os dados fornecidos pelas seqüências permitem análises referentes à qualidade da biblioteca utilizada. Como mostrado na tabela 1, das 100 GSS geradas apenas duas se mostraram idênticas (clones 9A/N/ F e 16A/N/ F), indicando que esta biblioteca apresenta uma redundância muito baixa. Além disso, em alguns clones a homologia é igual em uma extremidade do mesmo e diferente na outra, mostrando que as seqüências destes clones se completam, sendo uma a continuidade da outra. Este fato é importante quando se precisa analisar genes de tamanho superior ao tamanho dos insertos dos clones da biblioteca ou quando os genes, mesmo menores que o tamanho destes insertos, não se apresentam completos em um único clone.

Os dados fornecidos pela geração das GSS mostram que este método é muito eficaz na identificação de genes envolvidos nos processos de virulência e patogenicidade dos organismos, pois levou à identificação de 11 genes supostamente relacionados a estes processos. Vários estudos semelhantes a esta abordagem utilizando-se técnicas como STM e transposons necessitam da produção de um número muito maior de clones (em torno de 20.000). No presente trabalho, como houve identificação de um número grande de supostos genes de virulência, decidiu-se parar o programa de sequenciamento aleatório e estudar especificamente estes genes encontrados. Sendo assim, dos 11 genes identificados, 2 foram selecionados visando a avaliação de sua função e o provável envolvimento nos processos de virulência e patogenicidade da *B. abortus*. Um destes genes, o gene *vacB* (clone p011R) foi objeto de estudo de uma tese de mestrado (Miyoshi, 2000) e o segundo gene escolhido, o gene *exsA* (clone 64/A/N/ F), é parte deste trabalho. O clone 64 foi escolhido por apresentar em uma de suas extremidades sequenciadas uma alta homologia ao gene *exsA* de *R. meliloti* e por este gene constituir, neste organismo, um importante fator de virulência uma vez que é essencial à invasão do mesmo em seu hospedeiro.

Rhizobium e *Brucella* são representantes da subclasse α -2 *Proteobacteria*. Estudos realizados por Scupham e Triplett (1997), mostraram que estes microrganismos compartilham genes que possuem funções idênticas, sendo que genes rhizobiais são normalmente funcionais em *Brucella*. Baseados neste fato, acredita-se que o gene *exsA* identificado em *B. abortus* esteja envolvido em algum mecanismo de virulência deste microrganismo, provavelmente desempenhando uma função muito semelhante àquela existente em *R. meliloti*. Estes mesmos pesquisadores sugeriram a ausência de qualquer gene da família *exs* no genoma da *Brucella*. Entretanto, dados encontrados neste trabalho revelaram dois clones homólogos a dois genes desta família, contrariando os resultados destes pesquisadores. O clone p016F provavelmente representa o gene *exsD*, e o clone 64/A/N/ F o gene *exsA* da *Brucella*.

Até o momento já existem **2.148.783** GSS depositadas em banco de dados, das quais **1.994** são representadas por *B. abortus*. Na tabela 2, em anexo, são mostrados alguns dos organismos e suas GSS depositadas. As 100 GSS geradas pelo programa de descoberta gênica referente a este trabalho serão brevemente depositadas neste mesmo banco de dados.

Tabela 1: GSS da *B. abortus* obtidas no Programa de Descoberta Gênica. Em vermelho estão destacados os supostos genes envolvidos em virulência e patogenicidade da *B. abortus*. O clone 64, objeto de estudo deste trabalho, está destacado em azul e sublinhado.

Nome dos Clones GSS	Homologia	Programa	Probabilidade
1A/N/R	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 seção 235 de 400 do genoma completo	Blast N	3e-11
	Proteína CLPB (U20646) CLpB (<i>Synechococcus</i> sp.)	Blast X	4e-65
2A/N /F	Proteína CreA	Blast X	0.26
4A/N/ R	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> “dentrificans biotin”	Blast N	1,2
	Tryptophanyl-tRNA sintetase – <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Blast X	3e-05
5A/N/ F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – glutamato sintase	Blast N	3.4e-08
	Glutamato sintase (NADPH) Precursor	Blast X	2.5e-07
6A/N/ F	(X99622) “homologous ton-termini” a “glucose-6- phosphate dehydrogenase”	Blast X	3e-12
7A/N/ F	Glycoprotein Humana IIb (GPIIb) Exon 2-29	Blast N	0.999
7A/N/ R	X59103 (Z80226) Proteína hipotética Rv0783c <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Blast X	3e-08
9A/N/ F	<i>Escherichia coli</i> região cromossomal de 76.0 a 81.5 minutos	Blast N	3.7e-33
	“Nickel-binding periplasmic protein precursor”	Blast X	1.8e-20
10A/N/ R	<i>Brevibacillus brevis</i> “tyrocidine biosynthesis”	Blast N	0,24
	Proteína NiKD <i>Escherichia coli</i>	Blast X	1e-16
12A/N/ R	<i>Brucella melitensis</i> 16M Genes: “5'phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxilase” (<i>purE</i>) e “carbon dioxide binding protein” (<i>purK</i>)	Blast X	8e-12
14A/N/ F	<i>Rhizobium tropici</i> “putative uridylyltransferase”	Blast N	1e-09
	(U47030) “putative uridylyl transferase	Blast X	2e-29
16A/N/ F	<i>Escherichia coli</i> Região cromossomal de 76.0 a 81.5 minutos	Blast N	3.7e-33
	“Nickel-binding periplasmic protein precursor”	Blast X	1.8e-20
16A/N/ R	<i>Ascaris lumbricoides</i> Gene: “small nuclear RNA” (snRNA) U4-1	Blast N	0.25
	Proteína niKD – <i>Escherichia coli</i>	Blast X	1e-16

21A/N/ F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> glutamato sintase	Blast N	5.6e-08
	"large subunit of NADH-dehydrogenase	Blast X	2.2e-08
21A/N/ R	<i>Brucella melitensis</i> 16M Genes: "5'phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxilase" (purE) e "carbon dioxide binding protein" (purK)	Blast N	2e-11
	Proteína hipotética KIAA0192>gi116636941	Blast X	2,6
24A/N/ R	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Seção do genoma completo de 9 a 63 minutos	Blast N	0,0010
	(D64004) CobW (<i>Synechocystis</i> sp)	Blast X	6.e-12
27A/N/ R	<i>Caenorhabditis elegans</i> "cosmid W04d2", seqüência completa	Blast N	0,93
	Proteína (y14964) "amide urea binding"	Blast X	7e-05
35A/N/R	<i>Brucella abortus</i> clone pJD58	Blast N	4e-96
	"D-Xylose transport ATP-binding cassette protein" <i>Escherichia coli</i>	Blast X	4e-11
36A/N/ R	<i>Bacillus subtilis</i> gene <i>hspN</i> "90kDa protease (bacillopeptidase F)" (AE001080) "Carbohydrate Kinase" família pfKB (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)	Blast N	0.079
		Blast X	7e-06
64A/N/ F	<i>Rhizobium meliloti</i> fragmento de DNA de 10.6Kb do gene <i>exoB</i> ao <i>exsG</i> "ATP-binding cassette transporter protein" ExsA <i>Rhizobium meliloti</i>	Blast N	6e-12
		Blast X	5e-30
64A/N/ R	<i>Vibrio cholerae</i> cromossomo I, seção de 158 a 251 do cromossomo completo	Blast N	3e-04
	"Catabolite control protein", CcpA <i>Lactococcus lactis</i>	Blast X	1e-07
1A V/ F	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Blast N	0.97
11A V/ F	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Proteínas FlaD	Blast N	4e-29
	"Flagellar P-Ring protein precursor"	Blast X	8e-20
13A V/ R	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> Gene: "beta-hydroxybutyl-CoA-dehydrogenase" (<i>hbdA</i>) (U32229) HbdA (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>)	Blast N	9.4e-21
		Blast X	1.7e-36
15A V/ F	<i>Bacillus subtilis</i> Genes: <i>yWiA</i> , <i>sbo</i> , <i>ywiB</i>	Blast N	7.3e-09
	"Argnyl-tRNA SYNTHETASE" ("ARGININE— tRNA")	Blast X	1e-18
20A V/ R	(U39453) 31kDa "outer membrane protein" (<i>Brucella melitensis</i>)	Blast N	3e-04
	(U393970) 25kDa "outer membrane protein" (<i>Brucella melitensis</i>)	Blast X	4.2e-07
2B V/ R	<i>Brucella suis</i> "urease gene cluster"	Blast N	1.3e-133
	Hipotética "ABC Transporter Permease family"	Blast X	3.7e-10

3B V/ R	<i>Salmonella typhimurium</i> Genes: <i>malM</i> , <i>malL</i> (LamB), <i>malK</i> (AE000597) "iron-regulated outer membrane protein"	Blast N	3.6e-05
		Blast X	1.9e-05
5B V/ F	<i>Brucella ovis</i> Proteínas "heat shock" 70 (dnaK)	Blast N	3e-86
	PROTEÍNA DNAK ("Heat shock protein" 70) (HSP70)	Blast X	4e-27
5B V/ R	<i>Brucella ovis</i> Proteína "Heat shock" 70 (dnaK) (Y09633) Proteína hipotética	Blast N	8.0e-59
		Blast X	3.2e-05
9/B/V/ F	Proteína XrfbI <i>Vibrio cholerae</i>	Blast X	7e-14
9B/V/ R	<i>Brucella abortus</i> Gene <i>mazG</i> (U78089) Desconhecido (<i>Brucella abortus</i>)	Blast N	6.8e-10
		Blast X	0.0015
20B/V/ F	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 seção 187 de 400 do genoma completo	Blast N	1.9e-05
	Proteína hipotética 111,0kDa	Blast X	3.0e-05
4-I/ F	"Synthetic construct hygromycin B phosphotransferase"	Blast X	0.006
44-I/ R	"hsIUV operon heat shock protein (hsIU)"	Blast X	4e-36
p001F	<i>B. bronchiseptica</i> Gene: <i>cyaA</i> codificando "adenylate cyclase hemolysin" (AF006000) Desconhecido	Blast N	1,0
	<i>Bordetella pertusis</i>	Blast X	4e-20
p001R	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 seção 135 de 400 do genoma completo	Blast N	8.0e-05
	"Dipeptide ABC transporter, permease protein dppB" <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Blast X	4e-21
p002F	"Pumpkin mRNA for glycolate oxidase", (abóbora)	Blast N	0,59
	"Lactate dehydrogenase"	Blast X	1.0e-17
p002R	<i>Ralstonia eutropha</i> Gene: <i>cbbBc</i> "formate dehydrogenase-like protein"	Blast N	1.8e-24
	Proteína hipotética: 84,6kDa CY274.31C <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Blast X	2.4e-21
p003F	Proteína Rdmc <i>Streptomyces purpurascens</i>	Blast X	0,025
p003R	<i>Rhizobium meliloti</i> Proteína 319kDa, Gene <i>ndvB</i>	Blast N	4.6e-49
	Proteína 319kDa NdvB <i>Rhizobium meliloti</i>	Blast X	6.6e-50
p004F	<i>Escherichia coli</i> Genes: "thiosulfate binding protein" (<i>cysP</i>), "sulfate permease" (<i>cysT</i> , <i>cysW</i> , <i>cysA</i>) e "o-acetylserine (thiol)-lyase-B" (<i>cysM</i>)	Blast N	1.3e-21
	"Sulfate/thiosulfate transport protein" CysA <i>Escherichia coli</i>	Blast X	2.5e-40
p004R	"Serine acetyltransferase" <i>Escherichia coli</i>	Blast X	2.5e-28
p005F	"Interleukin-11 receptor alpha chain" <i>Homo sapiens</i>	Blast X	0,14

p006F	<i>Brucella abortus</i> Gene <i>htrA</i> -like	Blast N	2e-64
	<i>Brucella abortus</i> Proteína HtrA-like	Blast X	1e-17
p006R	<i>Brucella abortus</i> Gene: <i>recA</i>	Blast N	5.6e-99
	<i>Brucella abortus</i> Proteína RecA	Blast X	3e-28
p007F	Seqüência cromossômica humana do 9q34 <i>Homo sapiens</i>	Blast N	1,1
	Proteína hipotética: YDE6_SCHPO <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Blast X	0,88
p007R	Gene de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Blast N	5.5e-28
	"Phosphate-specific transport complex" PstB <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Blast X	1e-19
p008F	<i>Escherichia coli</i> Região cromossômica de 76.0 a 81.5 minutos	Blast N	1.6e-52
	Proteína NicD <i>Escherichia coli</i>	Blast X	2.7e-38
p008R	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 seção 313 de 400 do genoma completo	Blast N	1.8e-27
	Proteína hipotética o314 - <i>Escherichia coli</i>	Blast X	1e-22
p009F	<i>Brucella abortus</i> Gene <i>uvrA</i> "UV endonuclease" e Gene <i>ssb</i> "single stranded DNA binding protein"	Blast N	1.5e-220
	Proteína SSB "Single-strand binding" <i>Brucella abortus</i>	Blast X	9e-17
p009R	(AE000694) Proteína hipotética <i>Aquifex aeolicus</i>	Blast X	7e-13
p010F	Proteína SPY75 <i>Mus musculus</i>	Blast X	0,58
p010R	<i>Brucella melitensis</i> 16M Genes: "5'phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxilase" (<i>purE</i>) e "carbon dioxide binding protein" (<i>purK</i>)	Blast N	1.0e-86
	"Two component sensor" <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Blast X	0,62
p011F	"multidrug resistance protein" MDR	Blast X	8e-28
p011R	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 seção 144 de 529 do genoma completo	Blast N	1,0
	Proteína VacB "Ribonuclease R" (Rnase R) <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Blast X	5e-10
p012F	<i>Homo sapiens</i> "mRNA for serotonin transporter"	Blast N	0,99991
	"Polyprotein precursor" "Hepatitis GB virus A"	Blast X	1,7
p012R	"Spore-cortex-lytic enzyme prepeptide precursor" <i>Bacillus subtilis</i>	Blast N	0,070
p013R	"IAA-Ala hydrolase, IAA-amino acid hydrolase" <i>Arabidopsis thaliana</i>	Blast X	4e-05

p014F	<i>Homo sapiens</i> Cromossomo 16, clone BAC	Blast N	0,85
	Regulador transcricional hipotético da região intergênica THIK-EPR <i>Bacillus subtilis</i>	Blast X	4e-04
p014R	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> Gene <i>hemA</i> "encoding 5-aminolevulinic acid synthase"	Blast N	2e-14
	"5-aminolevulinate synthase precursor" <i>Mus musculus</i>	Blast X	3e-35
p015R	"Periplasmic iron-binding protein" <i>Synechocystis</i> sp.	Blast X	6e-16
p016F	<i>Rhizobium meliloti</i> fragmento de DNA de 10.6Kb do gene <i>exoB</i> ao <i>exsG</i>	Blast N	1.2e-20
	Proteína ExsD <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Blast X	1e-09
p017F	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 genoma completo	Blast N	0,994
	"Similar to mucin, similar to lactoperoxidase, thyroid peroxidase, myeloperoxidase and eosinophil peroxidase" <i>Caenorhabditis elegans</i>	Blast X	2,9
p017R	"Segment polarity protein dishevelled" Dsh <i>Drosophila melanogaster</i>	Blast X	6,7
p018F	<i>Caenorhabditis elegans</i> Cosmideo F01G12	Blast N	0,82
	"Carboxynorspermidine decarboxylase" <i>Synechocystis</i> sp.	Blast X	0,99
p018R	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gene <i>uvrB</i>	Blast N	4.3e-27
	Produto gênico <i>uvrB</i> <i>Escherichia coli</i>	Blast X	1e-29
p019F	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> cosmideo I28	Blast N	9.5e-05
	"Actin interacting protein 2" <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Blast X	8e-09
p019R	<i>A. thaliana</i> Gene <i>bcb</i> codificando "blue copper-binding protein"	Blast N	0,00017
	"Actin interacting protein 2" <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Blast X	5e-04
p020F	Seqüência de DNA de <i>Drosophila melanogaster</i>	Blast N	5,0
	Proteína "Naphtalene dioxygenase iron sulfur" <i>Neptunomonas naphthovorans</i>	Blast X	6,9
p020R	"UPP_Yeast Uracil phosphoribosyltransferase (UMP pyrophosphorylase)" <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Blast X	0,13
p021F	Nenhuma homologia	Blast N	-
	"Mannosyltransferase" <i>Escherichia coli</i>	Blast X	0,053

p021R	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655 Seção de 185 a 400 do genoma completo	Blast N	1.4e-16
	Proteína <i>RfbD</i> <i>Vibrio cholerae</i>	Blast X	1e-14
p022R	Proteína transmembrânica <i>Rhodobacter</i> sp.	Blast X	5,8
p023R	<i>Pseudomonas viridiflava</i> “pectate lyase”	Blast N	8e-04
	“Spore-cortex-lytic enzyme prepeptide precursor” <i>Bacillus subtilis</i>	Blast X	3,4
p024F	<i>Pseudomonas cepacia</i> Seqüências de inserção: IS401, IS401 transposase, IS408 transposase	Blast N	0,002
	“ABC transporter” <i>Homo sapiens</i>	Blast X	3e-07
p024R	Proteína hipotética 2 <i>Mus musculus</i>	Blast X	3,1
p025F	Nenhuma homologia	Blast N	-
	“Phenol catabolic pathway positive regulator” DnpR <i>Pseudomonas</i> sp.	Blast X	1,8
p026F	Nenhuma homologia	Blast N	-
	Nenhuma homologia	Blast X	-
p026R	“VF17-VARV DNA-binding 11kD phosphoprotein” Vírus da varíola	Blast X	1,4
p027F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genes: PRP21, SPP91, CDC6, NUC1 e CRY2	Blast N	0,51
	Proteína hipotética de 44.2KD da região intergênica GLK-NUPC <i>Escherichia coli</i>	Blast X	2e-07
p027R	“PBP3 penicillin-binding protein 3 precursor” <i>Escherichia coli</i>	Blast X	5e-06
p028F	DNA humano do cromossomo 19-“specific cosmidF25419 containing family members” <i>Homo sapiens</i>	Blast N	0,22
	“Hepatocyte growth factor activator inhibitor” <i>Homo sapiens</i>	Blast X	9,2
p028R	“AMP1 Human putative aminopeptidase 1” (metap 1) (peptidase M 1)	Blast X	3e-11
p029F	<i>Gallus gallus</i> Seqüência de DNA do contig do cosmídeo cB12	Blast N	0,14
	Transcriptase reversa <i>Caenorhabditis elegans</i>	Blast X	1,7
p029R	GumO <i>Xanthomonas campestris</i>	Blast X	0,27
p030F	<i>Brucella ovis</i> Fragmento gênico, região repetida	Blast N	2e-04
	“Homeobox protein HOX-D3” <i>Homo sapiens</i>	Blast X	6,9
p030R	“AQPZ Aquaporin 2 (bacterial nodulin-like intrinsic protein)” <i>Escherichia coli</i>	Blast X	5e-36
p031F	“L-sorbose dehydrogenase, FAD dependent” <i>Gluconobacter oxydans</i>	Blast X	5e-14

p032F	Proteína FtsK-like <i>Azospirillum brasilense</i>	Blast X	6e-26
p032R	ATPase ClpC <i>Treponema pallidum</i>	Blast X	4,3
p033F	“Cobalamin biosynthesis protein D” <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Blast X	1e-09
p033R	Proteína BluC <i>Rhodobacter capsulatus</i>	Blast X	6e-05
p034F	HUMF12MUT “coagulation factor XII gene” <i>Homo sapiens</i>	Blast N	0,35
	“Y4JC_Rhisin” Proteína hipotética de 13,1kDa Y4jC <i>Rhizobium</i> sp.	Blast X	3e-23
p034R	51A Proteína de superfície <i>Paramecium tetraurelia</i>	Blast X	4,6
p035F	Caenorhabditis elegans Cosmídeo ZC8	Blast N	0,088
	“Adaptative response regulatory protein” <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Blast X	6e-13
p035R	<i>Bacillus subtilis</i> Genes: <i>nprE</i> , <i>yla(A-O)</i> e <i>pycA</i>	Blast N	2,1
	“Aspartate-B-semialdehyde dehydrogenase” <i>Legionella pneumophila</i>	Blast X	2e-06
p036F	“Tox protein DT-201” Gene artificial	Blast X	0,003
p037F	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	Blast N	0,015
	Proteína hipotética Rv2476c <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Blast X	2e-07
p039F	Caenorhabditis elegans Cosmídeo F56C9	Blast N	0,86
	Nenhuma homologia	Blast X	-

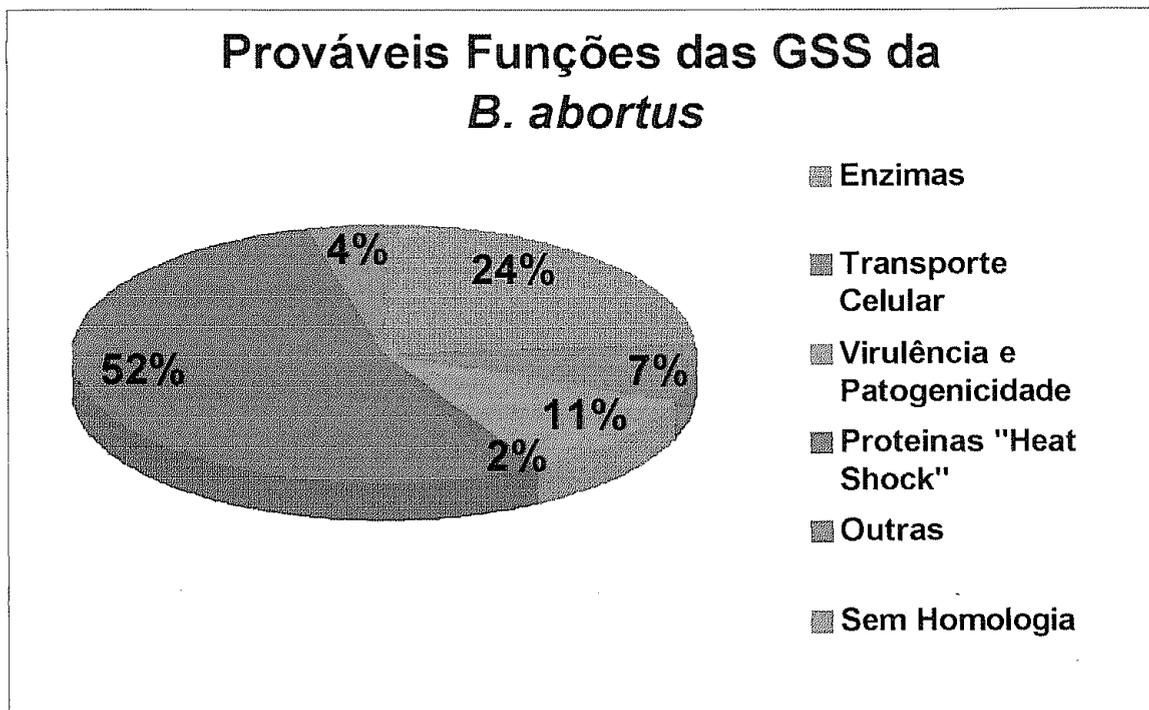


Gráfico 1: Prováveis funções das GSS da B. abortus. Análises das GSS geradas permitiram a identificação de 11% de genes supostamente envolvidos em virulência e patogenicidade, 24% de genes homólogos a enzimas, 7% a proteínas envolvidas no transporte celular, 2% a proteínas "heat shock" e 52% com outras funções. Das 100 GSS geradas, apenas 4% destas não apresentaram homologia a nenhuma seqüência depositada em banco de dados.

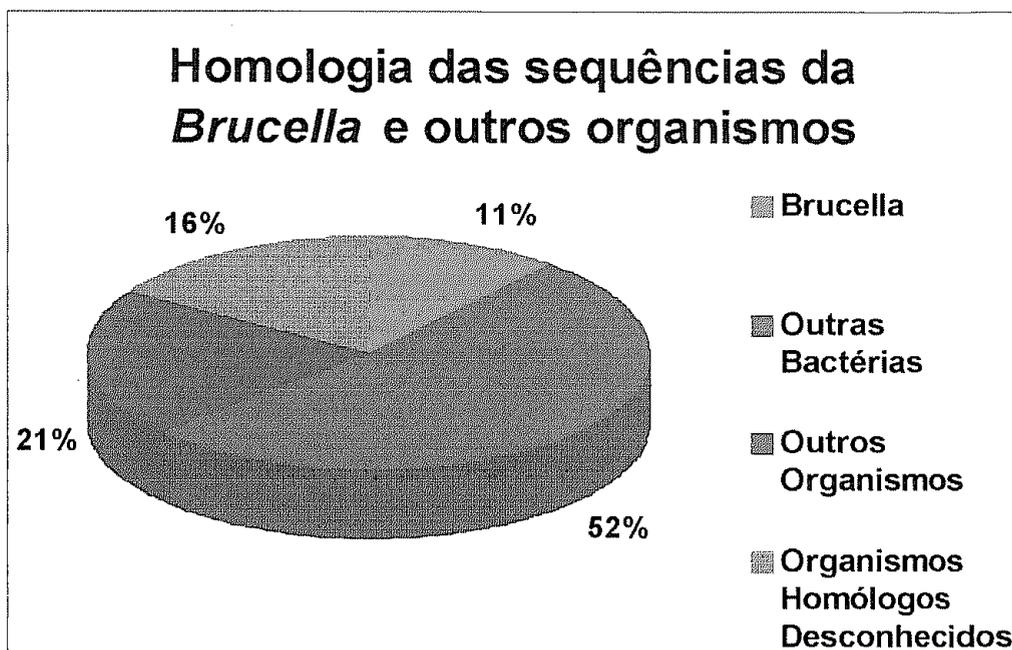


Gráfico 2: Homologia das seqüências da Brucella e outros organismos às GSS da B. abortus. Das 100 seqüências geradas, 11% apresentaram homologia a genes de espécies do gênero Brucella, 52% apresentaram homologia às demais bactérias, 21% a outros organismos e em 16% destas não foi possível a identificação do organismo homólogo.

2. Caracterização Molecular do clone 64

A obtenção da estrutura primária completa do clone 64 foi alcançada através da construção de subclones e utilização de duas estratégias. A primeira consiste no sequenciamento dos subclones obtidos através da análise do perfil de restrição deste clone e a segunda estratégia consiste no “primer walking” através da utilização de oligonucleotídeos desenhados nas seqüências dos subclones, possibilitando a definição da estrutura primária completa do inserto deste clone.

2.1. Mapa de restrição

Com o objetivo de determinar o tamanho do inserto do clone 64, bem como organizá-lo estruturalmente, foi realizado um mapeamento por endonucleases de restrição com as seguintes enzimas: *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *BglI*, *XmnI*, *EcoRV*, *BamHI*, *NotI*, *BglII*, *HincII*, *NheI*, *SmaI* e *XbaI* (figura 8). As análises dos perfis de restrição apresentados pela figura 8 permitiram estimar o tamanho do inserto do clone 64 em aproximadamente 3,0Kb e construir subclones derivados do inserto do mesmo. Nesta figura nas canaletas de 2 a 5 estão mostradas as digestões utilizadas na geração dos subclones do clone 64. A canaleta 2 apresenta a digestão com duas enzimas que não cortam o inserto (*EcoRI* e *PstI*), liberando-o do vetor pUC12 (figura 3, anexo). Sendo assim, apesar da existência de digestão parcial, verifica-se que o inserto possui em média 3,0Kb que somados aos 2,6Kb do vetor correspondem ao clone 64 não digerido. As canaletas 3 e 5 mostram digestões com as enzimas *HindIII* e *XmnI* respectivamente, e seus produtos de digestão originaram os três subclones deste trabalho. A primeira enzima possui um sítio na seqüência do inserto e um no vetor. O fragmento de 1,5Kb produzido por esta digestão foi utilizado como sonda no “Southern Blot” e representa quase que exclusivamente o gene *exsA* da *B. abortus*. O fragmento de 4,0Kb foi recircularizado originando o segundo subclone. O fragmento de 1,0Kb produzido pela digestão com *XmnI* representa exclusivamente o inserto do clone 64 originando o terceiro subclone deste trabalho. O fragmento de 2,0Kb da canaleta 4 também foi utilizado na construção de um subclone, porém sem sucesso. As digestões das canaletas de 6 a 13 mostram a linearização do clone 64 devido à existência de um sítio único das enzimas no inserto deste clone ou na seqüência do vetor.

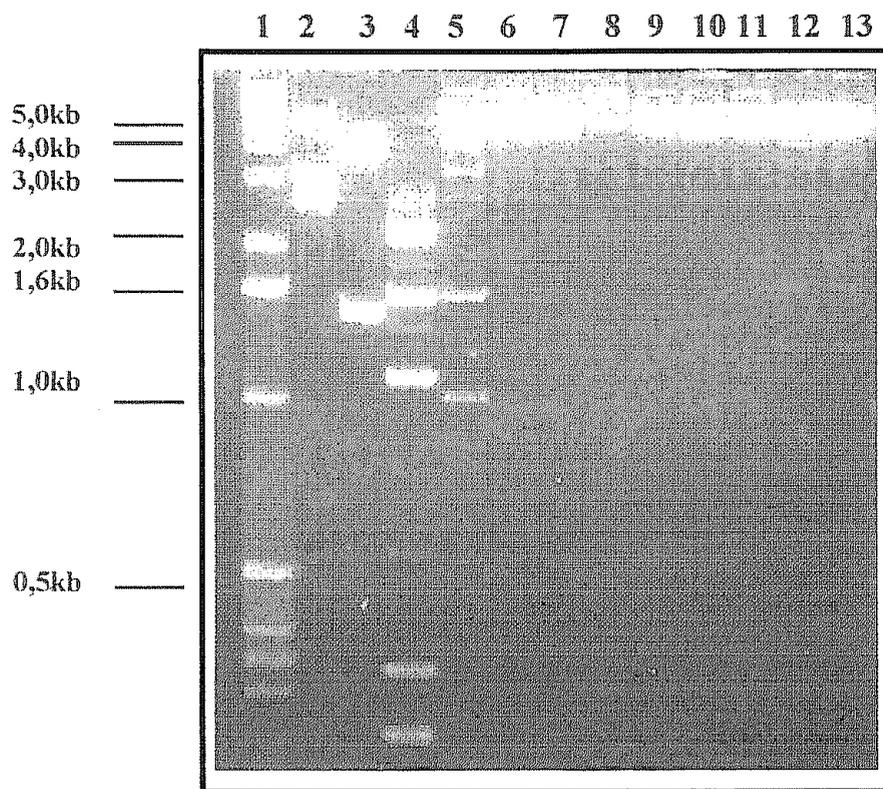


Figura 8: Mapa de restrição do clone 64. Gel de agarose a 1% exibindo os perfis eletroforéticos de digestões enzimáticas simples e duplas. A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (GIBCO BRL). As canaletas 2 a 13 mostram os perfis das digestões com as enzimas: *EcoRV/PstI*; *HindIII*; *BglI*; *XmnI*; *EcoRV*; *BamHI*; *NotI*; *BglII*; *HincII*; *NheI*; *SmaI* e *XbaI*, respectivamente.

2.2. “Primer Walking”

Os três subclones de 4,0Kb, 1,5Kb e 1,0Kb, representados na tabela 4 foram sequenciados em suas duas extremidades. Um número maior de subclones poderia ser gerado através da utilização de digestões duplas (com duas enzimas) do clone 64. Entretanto, decidiu-se utilizar a segunda estratégia que consiste no “primer walking”, citado anteriormente.

Nesta abordagem oligonucleotídeos interiores às seqüências dos três subclones construídos foram desenhados e utilizados em reações de sequenciamento com o objetivo de completar a estrutura primária do clone 64 (item 2.7). Esta técnica utilizada é rápida pois elimina as etapas de clonagem e transformação utilizadas na primeira estratégia. Além destes oligonucleotídeos interiores à seqüência do inserto do clone 64, foram realizados sequenciamentos com os oligonucleotídeos universais (M13 Forward e Reverse, ítem 1.6), que são complementares à seqüência do vetor pUC12. Ambas as fitas de DNA dos subclones gerados foram sequenciadas em média cinco vezes, devido à alta porcentagem de GC encontrada no genoma da *B. abortus*, permitindo a determinação da seqüência nucleotídica com o mínimo de erros.

2.3. Ordenamento clonal

Todas as seqüências geradas foram ordenadas e editadas manualmente ou através de programas computacionais (tabela 3/nº 4). A organização da estrutura primária do clone 64 é mostrada na figura 9, com representação esquemática de todos os subclones provenientes de digestões enzimáticas e de todas as seqüências geradas pela utilização dos oligonucleotídeos. A estrutura do clone 64 está de acordo com os resultados sugeridos pelo mapa de restrição apresentando 3065pb de inserto. Análises posteriores permitiram a identificação de um segundo gene presente neste clone: o gene *ccpA*.

Tabela 4: subclones do clone 64

<i>Clone</i>	<i>Enzimas utilizadas na digestão</i>
pUC18:1000 (1,0Kb)	<i>XmnI</i>
pUC18:1500 (1,5Kb)	<i>HindIII</i>
pUC12Δ1500 (4,0Kb)	<i>HindIII</i>

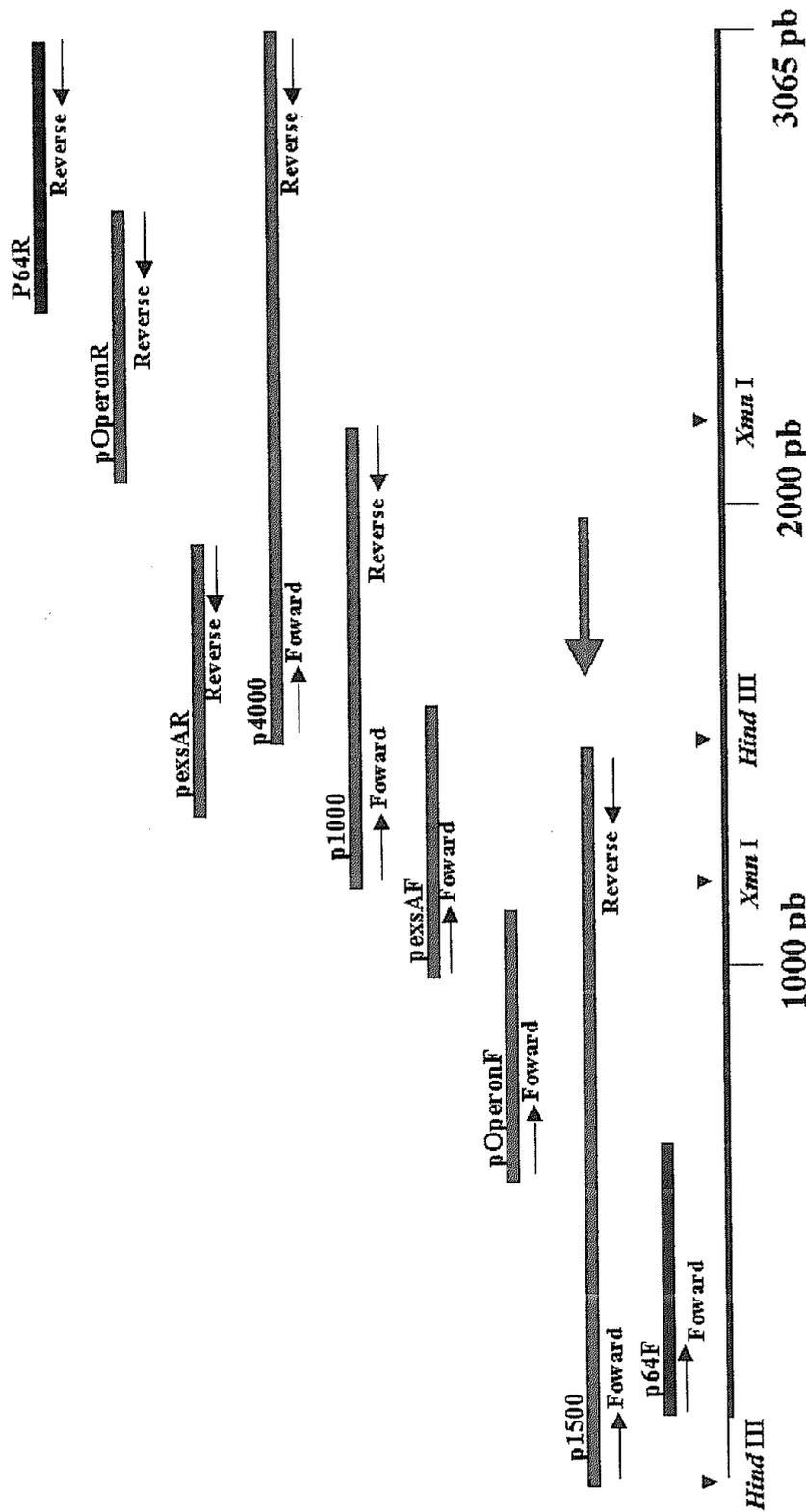


Figura 9: Mapa de restrição do clone 64 e ordenamento dos seus subclones. Os 3065pb do inserto do clone 64 estão representados pela linha inferior e os sítios das enzimas estão indicados por setas. Os 3 subclones estão representados por barras vermelhas, as seqüências geradas pelos oligonucleotídeos desenhados no interior do clone 64 estão representados por barras azuis e aquelas geradas pelo sequenciamento com os oligonucleotídeos M13 Forward e Reverse estão representados por barras negras. A barra marcada com uma seta vermelha representa o clone utilizado como sonda nos experimentos de "Southern Blot" (item 3.7). A direção de cada oligonucleotídeo, Forward e Reverse, utilizado no sequenciamento de cada subclone, está representada por setas negras.

2.4. Sequência nucleotídica do clone 64

Após o sequenciamento do inserto do clone 64, todas as seqüências geradas foram submetidas a análises computacionais (tabela 1/nºs 3 e 5) com o objetivo de identificar as possíveis ORFs (janelas abertas de leitura) e seus elementos regulatórios existentes neste clone. Foram encontradas duas ORFs, homólogas aos genes *exsA* de *R. meliloti* e *ccpA* de *Lactococcus lactis* e *B. megaterium*.

Alguns critérios foram adotados para a classificação das seqüências como ORFs. Elas deveriam possuir mais de 70 resíduos de aminoácidos, começar com ATG, GTG ou TTG e serem precedidas pela seqüência complementar 3' AUU CCU CCA CUA G 5' para o 16S de *E. coli* conhecida como Shine Dalgarno (SD) (Shine & Dalgarno, 1974).

A seqüência codificadora do gene *exsA* de *R. meliloti* possui 1812pb, 603 aminoácidos e é composto por três possíveis códons de iniciação. Até o momento ainda não se sabe qual destes três códons é verdadeiramente o responsável pelo início da tradução da proteína pois todos eles são precedidos por SD (Becker *et al.*, 1995). O gene *exsA* da *B. abortus* apresenta-se incompleto no clone 64 e baseando-se no primeiro códon de iniciação de *Rhizobium* pode-se concluir que estão faltando apenas 15pb na porção 5' deste gene para que sua seqüência codificadora se torne completa.

A determinação da estrutura primária completa do clone 64 (figura 10) mostrou que o gene *exsA* da *B. abortus* é composto por 1791pb, codifica um polipeptídeo de 596 aminoácidos e 65,5kDa. Sua seqüência parcial foi depositada em banco de dados sob número de acesso **AF218367** (tabela 3/nº 9 e 13). Nesta seqüência foi encontrado um provável códon de iniciação, TTG, e um códon de terminação, TAA. O códon de iniciação TTG identificado tem a mesma localização do segundo códon de iniciação do gene *exsA* de *R. meliloti*. Devido a este fato e devido à existência de uma seqüência SD anterior ao mesmo, acredita-se que este códon TTG constitua realmente um códon de iniciação do gene *exsA* desta bactéria, podendo ser o local onde a tradução começa.

O gene *ccpA* da *B. abortus*, também presente no clone 64, é composto por 1026pb, codifica um polipeptídeo de 341 aminoácidos e possui peso molecular de 36,8kDa (tabela 3/nº 9 e 13). Sua seqüência codificadora está completa neste clone. Neste gene foram encontrados códons de iniciação e terminação, bem como a seqüência SD anterior ao primeiro. Análises computacionais mostraram que este gene é expresso no sentido contrário ao gene *exsA* (tabela 3/nº9). Entre os genes *ccpA* e *exsA* da *B. abortus* existe uma região intergênica de 91pb. A seqüência gênica do *ccpA* será depositada em breve em banco de dados.

O gene *exsA* de *R. meliloti* apresenta-se organizado formando grupos funcionais juntamente a outro gene da mesma família que se localiza posteriormente a este primeiro, conhecido como *exsB* (Becker *et al.*, 1995). Em *P. aeruginosa*, os genes *exsA*, *exsB* e *exsC* foram caracterizados como parte de um grande operon. Este fato não é muito relevante nas análises do gene *exsA* da *B. abortus* pois estes genes de *P. aeruginosa* desempenham funções muito diferentes da provável função exercida por este gene da *B. abortus* (Hovey & Frank, 1995). Entretanto, baseados na proximidade filogenética existente entre *Brucella* e *Rhizobium*, esperava-se que a organização do gene *exsA* fosse a mesma para estes dois microrganismos. Contrariando o esperado, analisando-se as características encontradas entre os genes *exsA* e *ccpA* da *B. abortus* citadas acima, pode-se dizer que posteriormente ao primeiro não existe nenhum outro gene desta mesma família. Sendo assim, em *Brucella*, a organização do gene *exsA* é diferente daquela presente em outros organismos. Um fato que pode explicar esta diferença é que, apesar da proximidade existente entre *Brucella* e *Rhizobium*, em algum momento do processo evolutivo, estes se diferenciaram, levando à aquisição de uma organização gênica diferente para cada um destes microrganismos. A figura 11 mostra a organização estrutural dos genes *exsA* da *B. abortus* e *R. meliloti*, destacando-se a diferença existente entre as seqüências gênicas destes dois microrganismos.

ATCGATTTCCGGGGGCCTGCGTTCCGCAGCGTTCTCGGCTACACGTTTCAGCCACTGGCGAAGTCAGCCCTTGCGG

Gene *exsA* →

CTGTCGGCGATGATTATCGGCATGTTGCTGGCGACACCGCCCGACGTTCTCACCCCGCTCTATTCCGGGGCGGCTG

GTGGATTTCGCTGTCGCTGGGCAGCAATGCATGGGATGCGGGCGATCCACGCCCTCATCGCCCTGCTCTCGCTGGGT

operon F →

GCGCTGGCGCTCGTTTCGCGGGCAGGTCACGTTTTTATGTCTTGACCGACTTCACCTTGAAAATCATGAGCGAC

ATGGCGGCAAGCGCCTTTCGCAAGCTGCAACGCTTTTCGACCGACTGGCACGGAATGCCTTTGCCGGCTCGACG

GTGCGCAAGGTGACACGCGGCATGTGGGCGCTCGACCTGCTGAACGACACGCTCATCATCGCGCTTCTGCCCTCG

CTCCTGATGCTCGTGGGTTCCGGTGGTCTGCTGGCATGGTTCTGGCCACTGATGGGCTGATGGTGGCAATCGGC

TCGGTGCTTTATATCGCCTGCACCATCGTCATCTCGCTTGGTTTTCGTGGCGCCTGCGGCCACGCTCGCAAATAGC

exsA^F →

TGGGATACGCGCATGGGCGGTGCACTGGCCGATTCCATGTCGTGCAACGCCGTGGTCAAGGCTTTCGGCGCAGAA

GCGCGGAGGATGAACGGCTCGCCATGGTTCGTGAACAAGTGGCGCACGCACACGGCGCACATGGCTGCAGGTCTG

CACGCAGGATCCCGTTTCATCCAGGGGACAAACCTTCTGGTGATGCGCGGGCGTCATCATCGCTTTTGCCCTTAT

CTGTGGACCAGGGGGCAAGCGACGGCTGGCGATATAACCTTTTCGTTCTCACCGCCTTTTCTTCATGCTGCAAGGC

TATCTGCGTGATGTGGGCATGCATATCCGCAACCTGCAACGCTCGGTCAATCACATGGAGGAACCTGGTCGATATC

GAAGCCCAGCTACGCATTGCCGACAAGCCCCGGCGCGCCCGCGATCAGGATCGGCAATGGCGAGATCACCTTCAAT

Figura 10 (continua)

CACGTCACCTTCCATTATGGCAGGCACGAAGCCGCGCTCTACCGCGACTTCTCGGTGCGGATCGAAGCTGGCGAG
 →

CGGGTTCGGTCTGGCGGGCTCCGGCTCCGGCAAGACGACCTTCGTGAAGCTCATCCAACGGCTTTATGACGTCAAT
 →

GGCGGCGCAATCCTGATCGACGGGCAAACATCGCCGATGTCACACAGGCGTCCCTGCGTTTCGCAGATCGCCATC
 →

GTGCAGCAGGAACCAATCCTGTTTTACCGGACGCTGGCGGAAAACATCGCCTATGCCCCCCCCGGCGCATCACAG
 →

GCCGAGATCGAGGAAGCCGCTCGCCTTGCCAGCGCGCATGACTTTATCAGCCGGCTGCCCAAGGGCTACCGGACG
 →

CTGGTGGGCGAGCGCGGCGTGAAGCTTACCGGCGGTGAGCGTCAGCGCGTGGCAATTGCCCGCGCCTTCTCTCGCG
 →

GATGCGCCGATCCTCATTCTGGACGAGGCCACATCGAGCCTCGATTTCGGAATCGGAAGTGCTGATCCAGCACGCC
 →

ATGGAACGGCTGATGGTGGGGCGCACCACGCTTGTTCATCGCCACCGTCTTTCCACAGTGCGCGCGCTCGACC GG
 →

CTTCTGGTGTTCGACAAGGGCCGCATTGTGGAAGAAGGCAATCATGACCGGCTGATCCGCAAGTCAGACGGCATT
 →

TATCGTCGCCTGTTTCGAGCGCCAGGCGCTGGAAGTACCAAGGGATTTGGAAGACATATCTGTTAACAAGCCAG
 →

ATCCAGATATGGACGGCAGGGCCGGGAATATTCCGGCCCTGTTTCTGGATAAAAGGCAAGTGCAAAAACCGCTCGAA
 →

ACGCGTTCTAGGCAGGAACTCTGGCGGAAGACTGGCGAACGATGAGCTTATAGTCGATCCGCTGTGCAGGCGAG
 ←

TTTCCCCGCTCTCCATCTGGCGCAAAGCATATCGGCGGCATCCC GCGTCATCTCGAAAATCGGCTGGCGAACAG
 ←

TGGTGATCTGCGGCGAGACCATAGTTGCAATCGCACTATCGTCAAAAACCGACGACCGTAAGATCATCGGGAACGG
 ←

CGATCCC GGCATCATAGGCGACCTGCATCACGGCGGCTGCCATATCGTCATTGGAGGCGAAGATGGCGGTCGGCC
 ←

Figura 10 (continua)

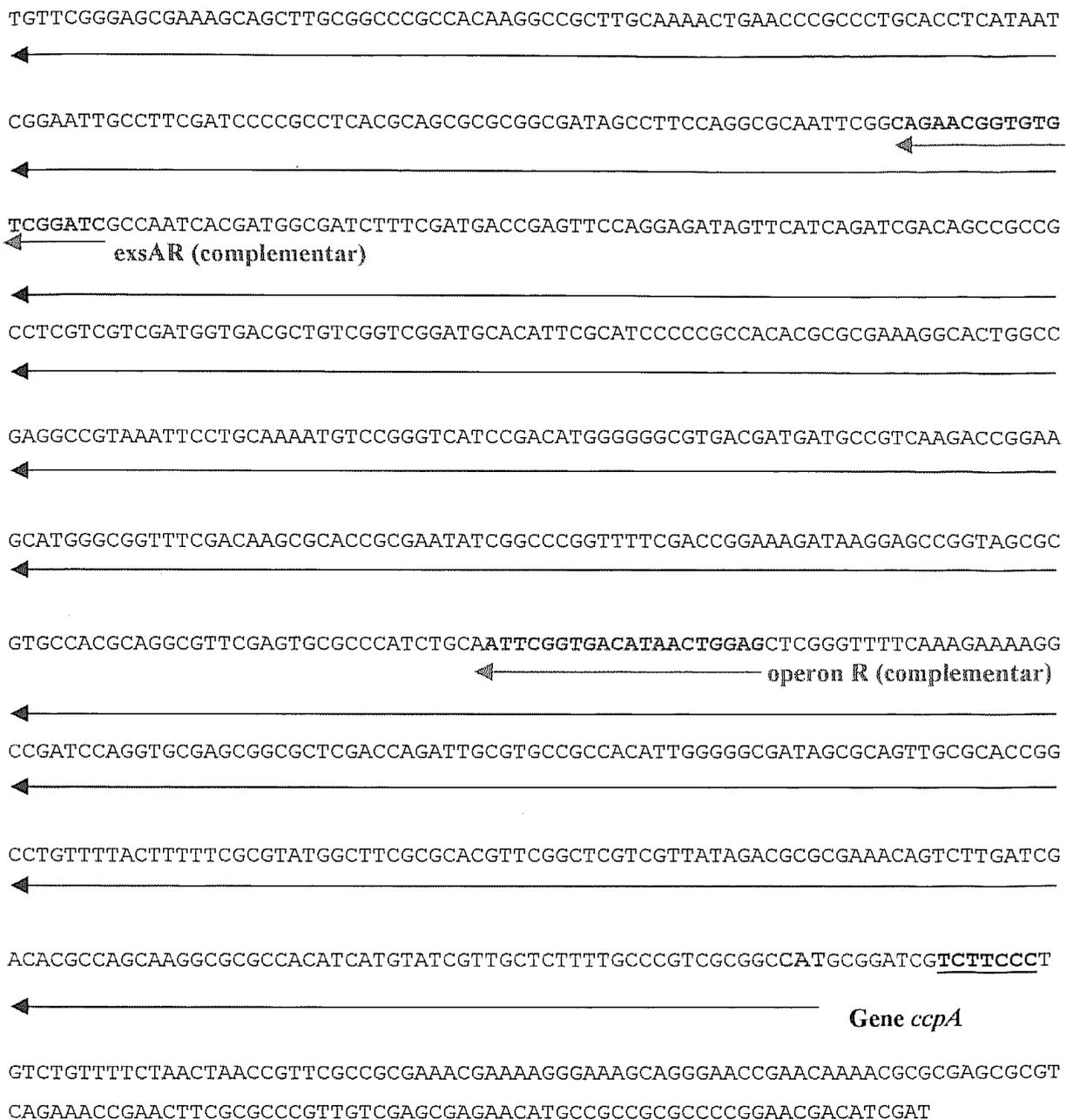


Figura 10: Seqüência nucleotídica do inserto do clone 64. Na primeira linha estão representados os nucleotídeos do clone 64. A flecha indica a direção do transcrito esperado. Os possíveis códons iniciadores estão destacados em azul e os terminadores em vermelho. As prováveis seqüências "Shine-Dalgarno" (SD) estão sublinhadas e em negrito. A região intergênica está destacada em itálico. Em vermelho escuro estão destacados os oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento e as setas que os acompanham mostram a direção de cada um. É importante lembrar que a seqüência do gene *ccpA* está representada pela sua fita complementar.

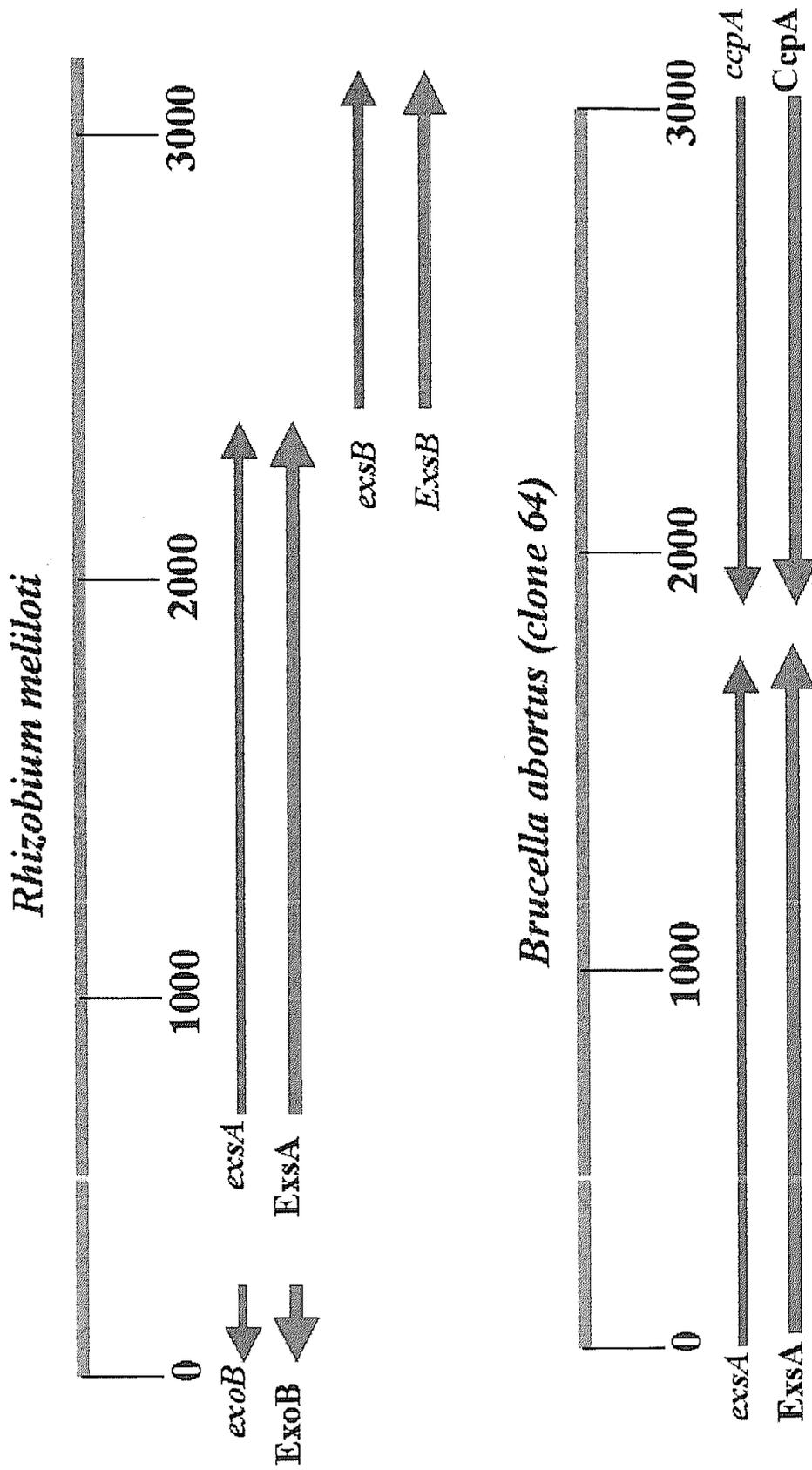


Figura 11: Organização estrutural dos genes *exoB*, *exsA* e *exsB* de *R. meliloti* e *exsA* e *ccpA* de *B. abortus* e seus produtos traduzidos. As setas vermelhas representam os genes e suas direções transcricionais. As setas azuis representam as proteínas bem como o sentido de sua expressão.

3. Gene *exsA* da *B. abortus*

3.1. Análise de homologia

A seqüência de aminoácidos do gene *exsA* da *B. abortus* possui alta homologia com proteínas do tipo ABC ("ATP-binding cassette") transportadoras de vários organismos (tabela 5). Estes transportadores são responsáveis pelo transporte de várias moléculas (ions, aminoácidos, peptídeos, antibióticos, polissacarídeos, proteínas, etc) através da membrana citoplasmática, com especificidade ao substrato (Braibant *et al.*, 2000).

Tabela 5: Blast X do gene *exsA* da *B. abortus*

Organismo	Homologia	Probabilidade	Identidade
<i>Rhizobium meliloti</i>	ATP-binding transport protein <i>exsA</i>	0.0	67%
<i>Brucella abortus</i>	ATP-binding protein B	6×10^{74}	38%
<i>Brucella abortus</i>	ATP-binding protein A	5×10^{72}	42%
<i>Vibrio cholerae</i>	ABC transporter, ATP-binding protein	8×10^{70}	38%
<i>Deinococcus radiodurans</i>	ABC transporter, ATP-binding protein	1×10^{69}	34%

A mais alta homologia encontrada foi com o gene *exsA* de *R. meliloti*. Neste microrganismo este gene codifica um transportador ABC envolvido no transporte de polissacarídeos para o exterior da célula, especificamente o polissacarídeo extracelular conhecido como succinoglicano ou EPS I. Este gene de *R. meliloti* foi identificado por Becker *et al* (1995). Mutantes deste gene neste microrganismo mostraram reduzida capacidade de invadir as raízes de suas plantas hospedeiras. González *et al* (1996), mostraram que os polissacarídeos constituem fatores de virulência de vários organismos, desempenhando um papel estrutural

no processo de invasão, possibilitando a adesão destes em seus hospedeiros, aumentando a aquisição de nutrientes ou promovendo proteção contra estresse causado pelo meio. Sendo assim, baseados na semelhança das seqüências, pode-se dizer que provavelmente o gene *exsA* da *B. abortus* codifica um transportador ABC e consiste em um importante fator de virulência desta bactéria, estando provavelmente envolvido no transporte de polissacarídeos para o exterior deste microrganismo. Análises posteriores que serão brevemente discutidas fornecem dados que reforçam esta afirmação.

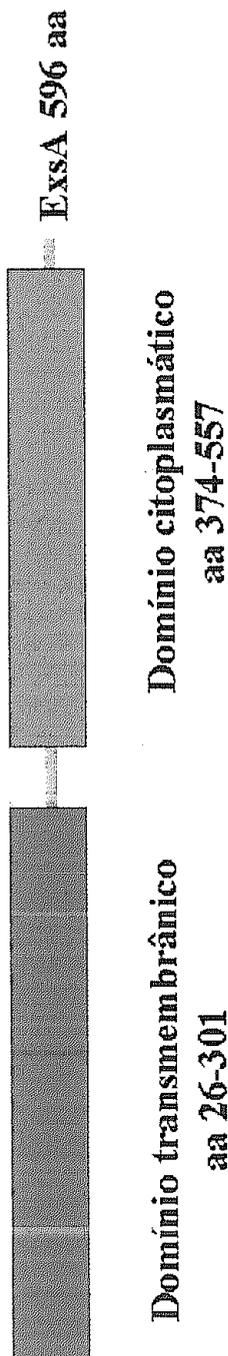
O gene *exsA* é também encontrado em *P. aeruginosa*. Entretanto, neste microrganismo, este gene desempenha uma função muito diferente daquela encontrada em *Rhizobium*, pois consiste em um fator de ativação de transcrição da família AraC, responsável pelo controle da expressão de proteínas extracelulares de virulência. Este gene também está envolvido nos processos de virulência deste microrganismo, mas de uma forma diferente daquela observada em *R. meliloti* (Hovey & Frank, 1995).

3.2. Motivos protéicos presentes no gene *exsA*

Os transportadores ABC possuem quatro domínios associados à membrana. Dois deles são altamente hidrofóbicos, conhecidos como domínios transmembrânicos e os outros dois são caracterizados como domínios citoplasmáticos, localizados na periferia da face citoplasmática da membrana (Higgins, 1992 e Braibant *et al.*, 2000).

As análises de motivos protéicos conservados na seqüência do gene *exsA* da *B. abortus* (tabela 3/nº6) identificaram os dois domínios citados anteriormente, presentes em todos os transportadores ABC de todos os organismos, como mostrado na figura 12. Os domínios citoplasmáticos se ligam às moléculas de ATP desencadeando a hidrólise destas, iniciando o processo de transporte. Estes são os domínios mais conservados destas proteínas e provavelmente os mais importantes, uma vez que alterações em suas seqüências bloqueiam totalmente a função dos transportadores ABC. Acredita-se que os domínios transmembrânicos são responsáveis pela especificidade de cada transportador (Braibant *et al.*, 2000). A identificação destes domínios protéicos altamente conservados em todos os transportadores ABC confirma a hipótese anterior de que o gene *exsA* da *B. abortus* codifica uma proteína membro da família dos transportadores ABC. Os domínios citoplasmáticos desta família possuem algumas seqüências altamente conservadas em todos os organismos.

que constituem motivos de ligação ao ATP: motivos Walker A e B e “ABC signature”, situado entre os dois primeiros. Estas seqüências podem variar um pouco de localização mas são características típicas destes transportadores. Análises da seqüência protéica ExsA da *B. abortus* revelaram a existência das três seqüências citadas acima, contribuindo na caraterização do gene *exsA* como um transportador ABC. Na figura 13 está representado o alinhamento das seqüências protéicas ExsA de *B. abortus* e *R. meliloti*, destacando-se os motivos Walker A e B e o “ABC Signature”. No início desta mesma figura é possível observar os cinco aminoácidos que faltam na seqüência codificadora do gene *exsA* da *B. abortus*.



Seqüência de aminoácidos da Proteína ExsA

IDFRGPAFRSVLGYTF SHWRSQPLRLSAMIIGMLLATPPDVLTPLYSGRLVDSLGLSNA
 WDAAIHALIALLSL GALALVSRAGHVFMSLTDFTLKIMSDMAASAERKLRQRFSTDWHANA
 FAGSTVRKVTGVMWALDLDLNDTLIIALLPESLLMLVGSVLLAMFWPLMGLMVAIGSVLYI
 ACTIVISLGFVAPAAATLANSWDTRMGALADSMSCNAVVKAFGAAREDERLAMVVKWR
 THTAHMAAGLHAGSRFIQGTNLLVMRGVILAFALYLWTRGQATAGDI TFRSHRLEFFMLQG
 YLRDVGMIHNRNLQRSVNHMEELVDIEAQLRIADKPGAPAIRIGNGEITFNHVTFHYGRHE
 AALYRDFSVRIEAGEEVGLAGSGSKTTFVKLIQRLYDVNGGALLIDGONLADV TQASLR
 SOLAI VQCEPILFHRITIAENLAYARPGASQAEIEEAARLASAHDFISRLPKGYRRTL VGER
 GVKLTSGERQVALARAF LAIDAPILLIDEATSSLDSESVLIQHAMERLWVGR TTVIAH
 RLSTVRALDRLLVFDKGRIVEEGNHDALIRKSDGIYRRL FERQALEITKGFGRHIC -

Figura 12: Representação esquemática dos domínios transmembrânico e citoplasmático da seqüência proteica ExsA da *B. abortus*. O domínio transmembrânico (vermelho) está contido entre os aminoácidos 26 e 301 e o domínio citoplasmático (verde) está contido entre os aminoácidos 374 e 557. A região em cinza representa o restante da proteína ExsA, que é composta por 596 aminoácidos.

B a	---	IDFRGPAPRSVLGYTFSSHWSQPLRLSAMIIGMLLATPPDVLTPLYSGRLVDSLS	55
R m	*	MAFTRFTARRNRAFRSVFRFSWDHWKQPVRLAALLTVLLSTLADVLTPLYSGRLVDAVI	60
B a	---	AGSND--AWDAAIHALIALSLGALALVSRAGHVFMSLTDFTLKIMSDMAASAFRKLQR	111
R m	*	SGAASDDVAANAAMAAMFMLMALSGAIILRH-VTFMGIVSLTKMMSDIAAFAFHIIQR	119
B a	---	FSTWHANAFAGSTVRKVTGRGNWALDLLNDTLIIALLPSLLMLVGSVLLAWFWPMLGLM	171
R m	*	FSSDWHANSEFAGSTVRKVTGRGNWALDLLNDTLIIALLPSLLMLVGSVLLAWFWPMLGLM	179
B a	---	VAI GSVLYIACTIVISLGFVAPAA TLANSWBTMRGGALADSMSCNAVVKAFGAEAREDER	231
R m	*	IGLSIAFIAVTVSLSLGYVAPMAASLANSWDTRLGGALADAVSCNTVVKAFGAEAREDER	239
B a	---	LAMVVNKKWRHTAHMAAGLHAGSRFIQGTNLLVMRGVIAAFALYLWTRGQATAGDITFRS	291
R m	*	LAKVLRKWEHRTRRTWSRGTLNG-TAOGGAMLLVLRRAAVIGFALLWARGQATAGDITFVL	298
B a	---	HRLFFMLQGYLRLDVGMIHNRNLRQSVNHNNEELVDIEAQLR-IADKPGAPAIRICNGEITFN	350
R m	*	T-SFFILQGYLREVGMIHNRNLRQSVNHNNEELVVAIHAQPLGVEDRPGAKPIRIITEGIEFR	357
B a	---	HVFHYGRHEAALYRDFSVRIEAGERVGLV	409
R m	*	DVTFHYGHRAPLYEGFSVNIAGGERVGLV	417
B a	---	NIADVTQASLRSQIAIVQEPILFHRTRLAENIAYARPGASQAEIEEAARLASAHDFFISRL	469
R m	*	NIADFTQASLRSQIAIVQEPILFHRSLAENIAYARPGATQDIEEAARLASAHDFFIAAL	477
B a	---	PKGYRTL VGERGVKI	529
R m	*	PKGYRTL VGERGVKI	537
B a	---	MVGRITLVIARHLSTVRALDRLLVFDKGRIVEEGNHDAIRKSDGIIYRRLFFERQALELTK	589
R m	*	MTGRITLVIARHLSTVRALDRLLVFDKGRIVEEGNHDAIRKSDGIIYRSLFFERQALELTK	597
B a	---	GFGRNIC	596
R m	*	GLILSEG	604

Figura 13: Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos das proteínas ABC transportadoras de *B. abortus* (Ba) e *R. meliloti* (Rm). Em destaque estão os motivos Walker A e B (vermelho) e o ABC "Signature" (marrom). "Caps" são indicados por hífen, (*) indicam resíduos idênticos, (:) indicam substituições conservadas e (.) indicam substituições semi-conservativas.

3.3. Estrutura secundária

Os domínios transmembrânicos dos transportadores ABC consistem de quatro a oito α -hélices que atravessam a membrana, formando um canal que permite a translocação do substrato através da mesma. Estes domínios são menos conservados em comparação aos citoplasmáticos (Braibant *et al.*, 2000). Vários transportadores ABC apresentam seis α -hélices, como descrito por Ko e Splitter (2000). Estes pesquisadores descreveram dois outros transportadores ABC da *B. abortus*, denominados BapA e BapB. Entretanto, o número de α -hélices pode variar entre as proteínas desta grande família.

Análises computacionais da proteína ExsA da *B. abortus* (tabela 3/nº 7) permitiram a determinação da estrutura secundária da mesma, sugerindo que sua estrutura transmembrânica possui cinco α -hélices, separadas por duas alças citoplasmáticas e duas periplasmáticas (figura 14). Esta informação fornece, mais uma vez, um dado importante na afirmação de que a proteína ExsA desta bactéria representa um transportador ABC, uma vez que estas proteínas apresentam o mesmo tipo de estrutura secundária. A presença destas α -hélices é importante para o transporte de compostos através da membrana e principalmente para a especificidade do substrato, uma vez que acredita-se que estes domínios transmembrânicos são os responsáveis por esta especificidade. Este fato é fácil de ser compreendido pois são estes domínios que entrarão em contato com o substrato transportado (Higgins, 1992 e Braibant *et al.*, 2000).

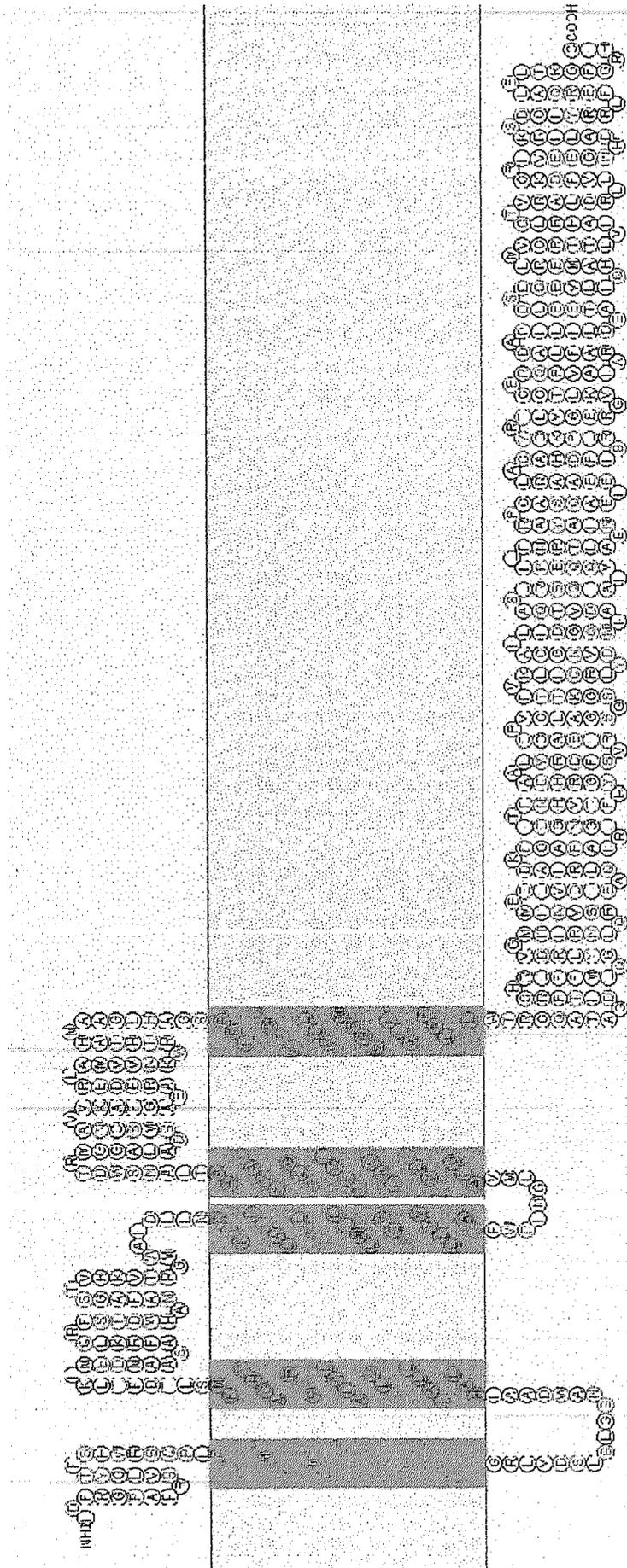


Figura 14: Estrutura transmembrânica da proteína ExxA da *B. abortus*. Este modelo sugere que esta proteína apresenta 5 α -hélices transmembrânicas, separadas por duas alças citoplasmáticas e duas periplasmáticas. Em verde estão representadas as α -hélices, o periplasma está representado pela linha azul acima e o citoplasma pela linha azul abaixo das α -hélices.

3.4. Análise de hidrofobicidade

Análises de hidrofobicidade pelo método Kite-Doolittle da proteína ExsA da *B. abortus* (tabela 3/nº7) indicaram que esta proteína é uma típica proteína transmembrânica composta por cinco segmentos que atravessam a membrana, exatamente como foi proposto pela modelagem da estrutura secundária da mesma. Este perfil de hidrofobicidade coincide com várias outros transportadores ABC, como por exemplo, BapA e BapB de *B. abortus* e NdvA de *R. meliloti*, que possuem um maior número de segmentos transmembrânicos mas com estrutura semelhante (Ko & Splitter, 2000).

A figura 15 mostra o perfil de hidropatia da proteína ExsA da *B. abortus*, destacando-se as cinco porções transmembrânicas e seus respectivos padrões de hidrofobicidade. Os resultados desta figura coincidem com aqueles da figura 12, que mostra que os domínios transmembrânicos se concentram na porção inicial desta proteína (destacados em vermelho na figura 12 e em verde na figura 15). Sendo assim, os resultados da figura 15, além de confirmarem aqueles da figura 12, reforçam a argumentação de que esta proteína é um transportador ABC e que esta possui todas as características dos membros desta família. Estes resultados obtidos são os mesmos daqueles encontrados no gene *exsA* de *R. meliloti* (Becker *et al.*, 1995).

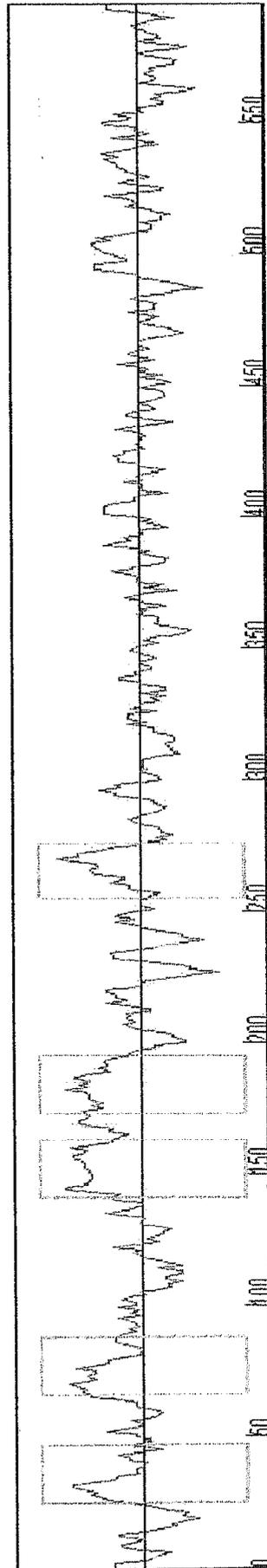


Figura 15: Perfil de hidropatia da proteína ExsA da *B. abortus*. Acima e abaixo da linha azul no meio da figura estão indicadas a hidrofobicidade e a hidropatia relativas respectivamente. As 5 porções transmembrânicas estão representadas por retângulos verdes e o perfil de hidropatia de cada porção e do restante da sequência está representado pela linha vermelha. É importante notar que as porções transmembrânicas se concentram na primeira metade da sequência proteica do gene *exsA* da *B. abortus*, como descrito na figura 14. Os números abaixo do perfil de hidropatia indicam os aminoácidos da sequência ExsA.

3.5. Modelagem computacional da seqüência protéica do gene *exsA*

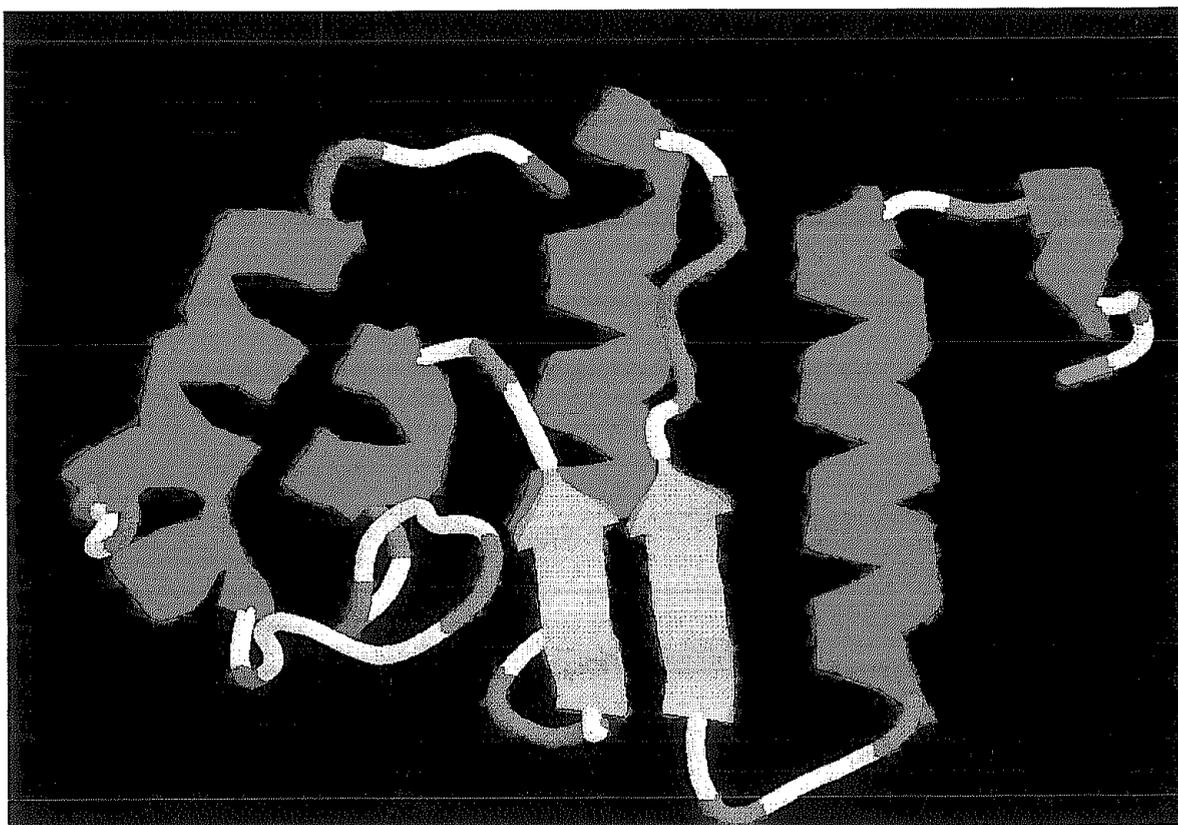
Com o objetivo de determinar a estrutura tridimensional da proteína ExsA da *B. abortus*, sua seqüência foi submetida à modelagem computacional (tabela 3/nº 8). A figura 16 mostra o modelo teórico gerado por estas análises, visualizado através do programa RasMol (tabela 3/nº 15). Este resultado mostra a modelagem de apenas 113 dos 596 aminoácidos presentes na proteína ExsA da *B. abortus*, que representam uma das subunidades dos transportadores ABC. As análises foram baseadas na difração de raios X obtidas do modelo disponível da subunidade de ligação a ATP (“ATP-binding subunit”) do transportador ABC de *S. typhimurium* (acesso PDB:1BOU).

A seqüência parcial protéica ExsA modelada é caracterizada por seis α -hélices, duas fitas β e 15 alças ou “loops” (figura 16). Os resultados obtidos através desta análise confirmam mais uma vez que a seqüência protéica do gene *exsA* da *B. abortus* codifica um transportador ABC pois tem como modelo a subunidade mais conservada das proteínas desta família que é o domínio que se liga à molécula de ATP de *S. typhimurium*.

As análises de modelagem computacional não permitiram a definição completa do número de α -hélices, fitas β e alças ou “loops” da proteína ExsA da *B. abortus*. Entretanto, análises do programa PredictProtein (tabela 3/nº14) mostraram que esta provavelmente é composta por 65,3% de α -hélices, 9,4% de fitas β e 25,3% de alças ou “loops”.

A maioria dos transportadores ABC bacterianos são codificados por vários genes normalmente organizados em operons, ou em “clusters” funcionais (Braibant *et al.*, 2000). Aparentemente, este é o caso do transportador ABC de *S. typhimurium*. Esta afirmação baseia-se na proteína deste microrganismo utilizada na modelagem da proteína ExsA da *B. abortus*. A proteína de *S. typhimurium* é codificada por um único gene e é composta por 262 aminoácidos que representam a subunidade de ligação ao ATP dos transportadores ABC. Provavelmente, outros genes deste microrganismo codificam os demais domínios destes transportadores. Em *Brucella* o transportador ABC identificado neste trabalho é codificado por um único gene, o gene *exsA* como demonstrado nas figuras 12 e 16. Na primeira são mostrados os domínios citoplasmático e transmembrânico da seqüência protéica do gene *exsA* da *B. abortus*. Um transportador ABC é composto por estes dois domínios, sendo

assim o gene *exsA* da *B. abortus*, que possui 596 aminoácidos, codifica todos os domínios desta proteína. Os resultados da figura 16 comprovam esta afirmação uma vez que apenas uma porção da proteína ExsA composta por 113 aminoácidos foi modelada, representando a subunidade de ligação ao ATP. O restante do gene *exsA* provavelmente codifica os demais domínios deste transportador.



*Figura 16: Modelagem da estrutura tridimensional parcial da proteína ExsA. O modelo foi feito com 113 dos 596 aminoácidos presentes na seqüência protéica do gene exsA da B. abortus. Esta estrutura é caracterizada pela presença de 6 α -hélices (representadas em rosa), 2 fitas β (representadas em amarelo) e 15 alças ou "loops" (representadas em azul). Os segmentos em branco representam resíduos diferentes destes citados anteriormente. As porções N-terminal e C-terminal da seqüência protéica ExsA modelada estão representadas em verde e vermelho respectivamente. A estrutura tridimensional obtida foi baseada na difração de raios X da subunidade de ligação a ATP do transportador ABC de *S. typhimurium*, composto por 262 aminoácidos.*

3.6. Transporte de polissacarídeos

Em 1998 foi realizado um estudo com transportadores ABC de sete organismos diferentes (Tomii & Kanehisa, 1998). Estes transportadores foram então classificados em 25 grupos ortólogos, permitindo-se reconhecer a especificidade por determinado substrato de cada transportador. Entre estes grupos, os mais importantes são aqueles envolvidos nos mecanismos de virulência dos microrganismos, como por exemplo os responsáveis pelo transporte de drogas e polissacarídeos. O grupo ortólogo 6 inclui transportadores de toxinas de *E. coli*, por exemplo, e transportadores de polissacarídeos, principalmente o “cyclic β -1-2 glucan” também conhecido como polissacarídeo B de *R. meliloti* (Tomii & Kanehisa, 1998 e Ko & Splitter, 2000). González *et al* (1996), mostraram que polissacarídeos são reconhecidamente fatores de virulência de vários organismos. Iannino *et al* (1998), mostraram que o “cyclic β -1-2 glucan” desempenha importante papel na simbiose e tumorigênese de *R. meliloti* e *A. tumefaciens* respectivamente, sendo também caracterizado como um fator de virulência. Sendo assim, a possibilidade de transportadores ABC classificados no grupo ortólogo 6 estarem envolvidos em patogênese bacteriana é maior que em qualquer outro grupo (Tomii & Kanehisa, 1998 e Ko & Splitter, 2000).

Com o objetivo de confirmar a classificação do transportador ABC da *B. abortus* em um dos grupos ortólogos citados anteriormente, análises computacionais da estrutura protéica ExsA da *B. abortus* foram solicitadas aos pesquisadores Kentaro Tomii e Minoru Kanehisa, Universidade de Kyoto, Japão. Estas análises permitiram a estes pesquisadores classificar esta proteína da *B. abortus* no grupo ortólogo 6 dos transportadores ABC. Esta informação é muito importante pois confirma que o gene *exsA* codifica um transportador ABC e também mostra a possibilidade deste gene estar envolvido nos processos de virulência e patogenicidade da *B. abortus*.

Baseando-se nestas informações, pode-se inferir sobre os compostos que provavelmente são transportados pela proteína ExsA da *B. abortus*. Recentemente, Iannino *et al* (1998) caracterizaram o gene *cgs* da *B. abortus*, que codifica uma proteína integral de membrana interna responsável pela biossíntese do “cyclic β -1-2 glucan” e transporte de proteínas para o espaço periplasmático e meio extracelular. A atenuação da virulência da *Brucella* em camundongos foi verificada em mutantes deste gene, mostrando que o mesmo está envolvido

nas interações entre este microrganismo e seu hospedeiro. Outra informação importante é que estes mutantes não induzem produção de anticorpos contra o antígeno O do LPS, possibilitando diferenciá-los de espécies de campo da *Brucella*. A proteína Cgs apresenta alta homologia às proteínas ChvB de *A. tumefaciens* e NdvB de *R. meliloti* e interação com os produtos gênicos de *chvA* e *ndvA*, destes mesmos microrganismos, respectivamente. Estes últimos genes codificam proteínas do tipo transportadores ABC (Ugalde, 1999). Como o gene *exsA* da *B. abortus*, caracterizado neste trabalho, apresenta alta homologia ao gene *ndvA*, pode-se supor que os genes *cgs* e *exsA* da *B. abortus* interagem entre si, promovendo a biossíntese do “cyclic β -1-2 glucan”, papel do gene *cgs*, bem como seu transporte para o espaço periplasmático, papel que provavelmente seria desempenhado pela proteína ExsA. Sendo assim, pode-se dizer que os genes *exsA* e *cgs* da *B. abortus* estão envolvidos nos processos de virulência desta bactéria pois provavelmente são responsáveis pela biossíntese e transporte de compostos caracterizados como fatores de virulência.

Os transportadores ABC são parte de uma superfamília de permeases que transportam várias moléculas como íons, aminoácidos, peptídeos, antibióticos, polissacarídeos, proteínas, e outros, através da membrana citoplasmática, com especificidade por determinado substrato. O LPS, componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, é composto por uma porção antigênica, polissacarídeo O ou antígeno O, e uma porção tóxica, conhecida como lipídeo A. O gene *exsA* de *R. meliloti* é responsável pelo transporte de polissacarídeos através da membrana, especificamente o polissacarídeo extracelular ou succinoglicano (EPS I). Mutantes deste microrganismo apresentam reduzida invasão em seus hospedeiros. Sendo assim, baseados nesta afirmação e na alta homologia dos genes *exsA* de *R. meliloti* e *B. abortus*, pode-se supor que o gene *exsA* deste último está envolvido no transporte de polissacarídeos através da membrana e mutantes do mesmo podem apresentar redução na invasão de células hospedeiras como foi demonstrado em *Rhizobium*. Finalmente, pode-se inferir que o polissacarídeo O do LPS provavelmente consiste em um dos compostos transportados pela proteína ExsA, estando esta, mais uma vez, envolvida no processo de virulência da *Brucella*, uma vez que este composto é reconhecidamente um fator de virulência desta bactéria.

Se o gene *exsA* estiver realmente envolvido no transporte do polissacarídeo O para o exterior

da célula e se análises de mutantes para este mesmo gene apresentarem atenuação da virulência da *Brucella*, este gene será um ótimo candidato à vacina. Primeiramente, devido à atenuação da virulência e em segundo lugar devido ao fato de que a linhagem mutante para o gene *exsA* provavelmente não levará à produção de anticorpos contra o polissacarídeo O do LPS. Esta não produção de anticorpos ocorrerá em consequência da ausência deste composto do LPS, permitindo-se a diferenciação desta linhagem mutante em relação às linhagens de campo da *B. abortus*. Um dos problemas da utilização da linhagem 19 da *B. abortus* como vacina é que esta induz produção de anticorpos contra o polissacarídeo O do LPS, assim como ocorre com as linhagens de campo. Sendo assim, fica difícil diferenciar se a produção de anticorpos contra este polissacarídeo proveniente do gado vacinado com S19 é em resposta à linhagem vacinal ou à de campo, dificultando o diagnóstico da brucelose nestes animais.

3.7. Determinação do número de cópias do gene *exsA* no genoma da *B. abortus*

O gênero *Brucella* apresenta uma organização genômica constituída por dois cromossomos, cujo modelo evolutivo envolve eventos de duplicação a partir de um ancestral comum, seguido de divergência até a situação atual (Jumas-Bilak *et al.*, 1998A). Para a construção de mutantes da *Brucella* é necessário verificar o número de cópias dos genes nos cromossomos, pois a presença de mais de uma cópia gênica pode inviabilizar a obtenção dos mesmos.

O número de cópias do gene *exsA* presente no genoma da *B. abortus* foi verificado através da técnica de “Southern Blot”, utilizando-se como sonda o inserto do subclone pUC18:1500 (figura 9 e tabela 3). Para isto, a estratégia adotada foi a utilização de enzimas que não reconheçam sítios no interior do inserto do clone 64, como *Xba*I, *Bam*HI e *Eco*RI e enzimas que reconheçam sítios neste mesmo local, como *Hind*III e *Cla*I.

A figura 17 mostra os fragmentos identificados após as digestões com as enzimas citadas acima. Utilizando-se como exemplo a canaleta 2, os resultados do “Southern Blot” confirmam o mapa de restrição. Nesta canaleta está representada a digestão do DNA genômico da *B. abortus* com a enzima *Hind*III. O mapa de restrição mostra que esta enzima digere o gene *exsA* em apenas um local, a 1,5Kb do início do inserto do clone 64. A banda de aproximadamente 3,0Kb revelada no “Southern Blot” mostra a existência de um segundo sítio de restrição desta enzima do lado 5’ do gene *exsA* no genoma da *B. abortus*. A enzima

*Cla*I flanqueia o inserto do clone 64 e a identificação da banda de aproximadamente 3,0Kb representa exatamente o tamanho deste inserto. As demais enzimas utilizadas não possuem sítios de restrição neste inserto, conseqüentemente os fragmentos observados são maiores que 3,0Kb.

Através das análises dos resultados da figura 17, pode-se dizer que o gene *exsA* é cópia única no genoma da *B. abortus* pois todos os fragmentos submetidos ao gel de agarose apresentaram uma única banda. A sonda utilizada na identificação do gene *exsA* é composta por quase toda a seqüência nucleotídica do mesmo. Se este gene estivesse presente em mais de uma cópia no genoma desta bactéria seriam identificados mais de um fragmento de DNA no gel de agarose, uma vez que a chance dos genes serem flanqueados pela mesma seqüência de DNA no genoma da *B. abortus* é mínima. Desta forma, o aparecimento de apenas uma banda indica a presença de apenas uma cópia gênica. Estes resultados mostraram a possibilidade da construção de mutantes *exsA* da *B. abortus*.

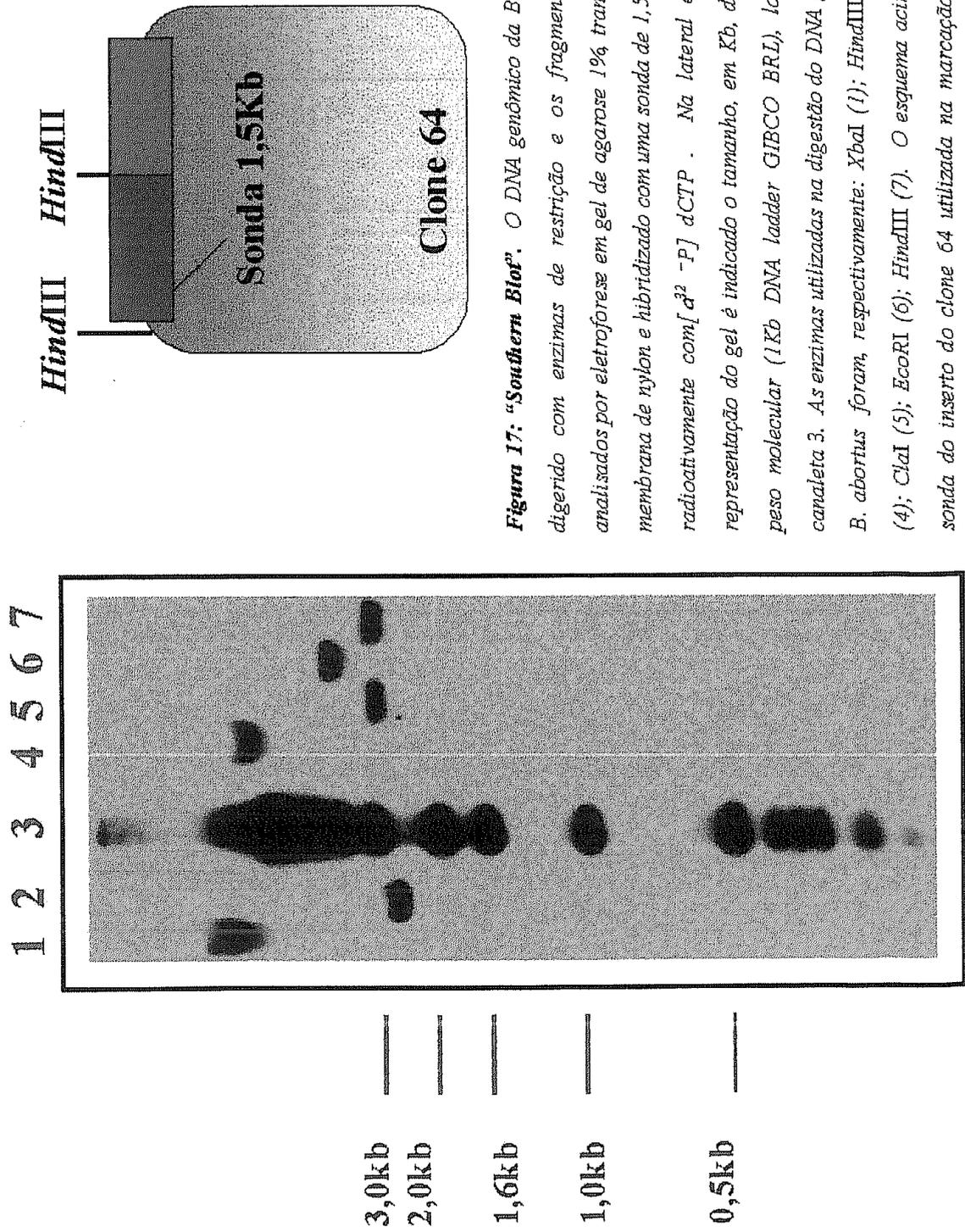


Figura 17: "Southern Blot". O DNA genômico da *B. abortus* foi digerido com enzimas de restrição e os fragmentos gerados analisados por eletroforese em gel de agarose 1% transferido para membrana de nylon e hibridizado com uma sonda de 1,5Kb marcada radioativamente com $[\alpha^{32}P]$ dCTP. Na lateral esquerda da representação do gel é indicado o tamanho, em Kb, do padrão de peso molecular (1Kb DNA ladder GIBCO BRL), localizado na canaleta 3. As enzimas utilizadas na digestão do DNA genômico da *B. abortus* foram, respectivamente: *XbaI* (1); *HindIII* (2); *BamHI* (4); *ClaI* (5); *EcoRI* (6); *HindIII* (7). O esquema acima mostra a sonda do inserto do clone 64 utilizada na marcação flanqueada pelos sítios da enzima *HindIII*.

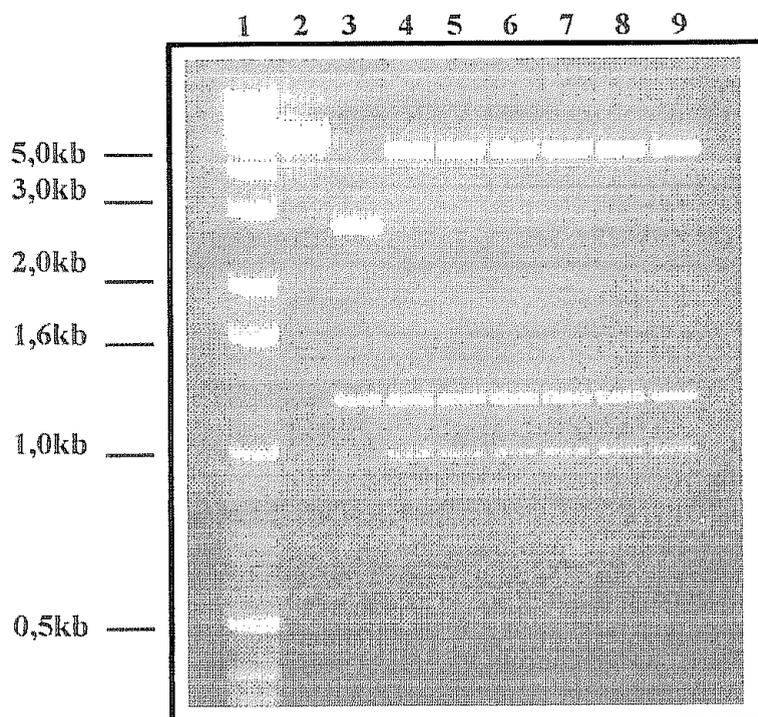
3.8. Obtenção de mutantes *exsA* da *B. abortus*

3.8.1. Inserção do gene que confere resistência à canamicina no gene *exsA* da *B. abortus*

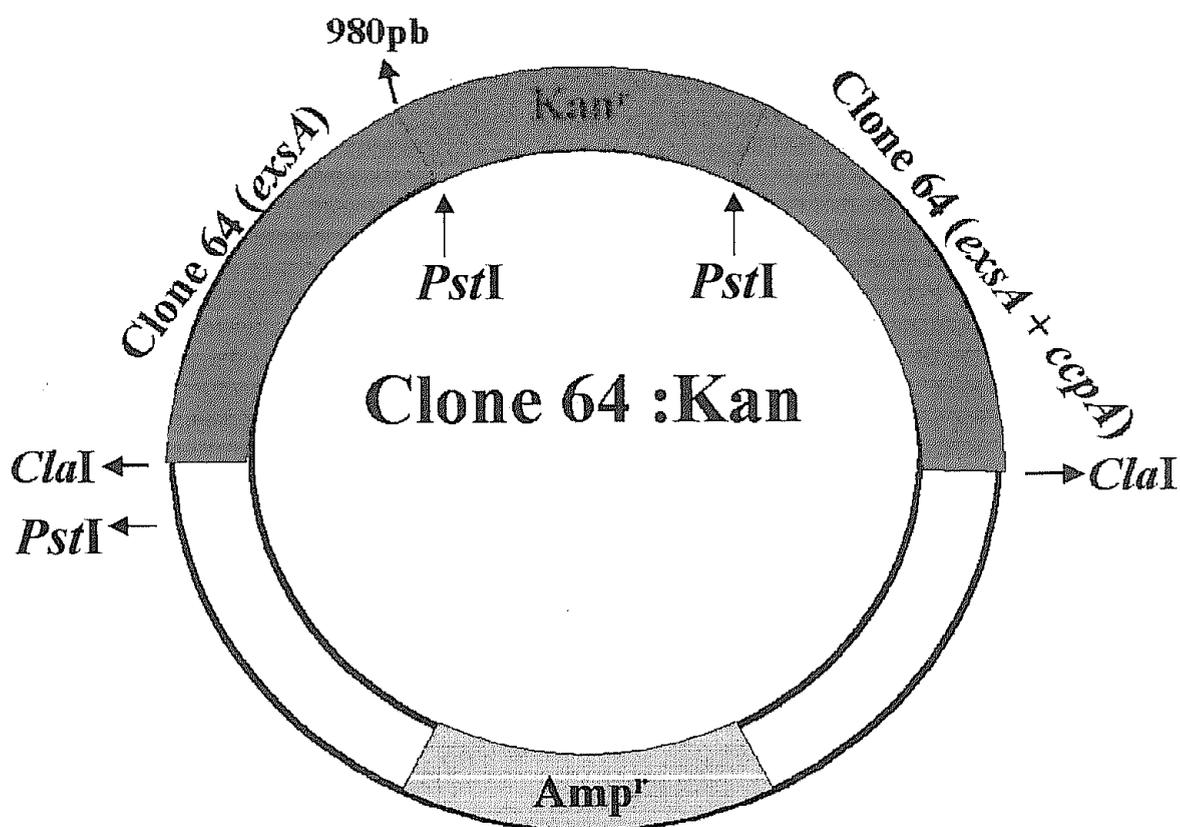
Com o objetivo de obter mutantes *exsA* da *B. abortus*, a seqüência nucleotídica deste gene foi interrompida no clone 64 pelo “cassete” de canamicina que confere resistência a este antibiótico, utilizando-se um plasmídeo não replicativo (suicida) em *Brucella*. Para isto, este “cassete”, presente no vetor pUC4K (figura 5, anexo), foi liberado deste através de digestão enzimática (*EcoRI*). Em seguida, o mesmo foi inserido no inserto do clone 64 previamente digerido com *EcoRV*, a aproximadamente 980pb do início do mesmo. Este local de inserção foi escolhido por se encontrar na metade do gene *exsA* da *B. abortus*, facilitando posteriormente a recombinação neste microrganismo. Nesta etapa foram obtidos 30 clones resistentes a canamicina e 6 foram escolhidos nas análises de digestão enzimática para confirmação da inserção do “cassete”.

A figura 18 mostra a digestão com *PstI* dos 6 clones escolhidos objetivando confirmar a inserção do “cassete” de canamicina no gene *exsA*. Como controles o clone 64 e o vetor pUC4K foram também digeridos com a mesma enzima. A canaleta 2 mostra a linearização do clone 64 e a canaleta 3 mostra a liberação do “cassete” de canamicina do vetor pUC4K (1,2Kb). As canaletas de 4 a 9 mostram a digestão dos clones canamicina resistentes. Os resultados desta figura mostram que todos os 6 clones possuem o gene *exsA* interrompido pela seqüência do “cassete” uma vez que todos apresentaram a banda referente a este último. Estas 6 construções idênticas foram denominadas clone 64:Kan. Destes 6 clones obtidos, 1 foi aleatoriamente escolhido e utilizado nos experimentos de obtenção de mutantes *exsA* da *B. abortus*.

Na figura 19 é mostrado um esquema do clone 64:kan interrompido pelo “cassete” de canamicina e na figura 20 é descrita a seqüência nucleotídica do mesmo, para melhor visualização.



*Figura 18: Confirmação da inserção do “cassete” de canamicina no plasmídeo suicida. Gel de agarose a 1% exibindo perfil eletroforético de digestões enzimáticas com a enzima PstI de 6 clones para confirmação da inserção do “cassete” de canamicina no sítio de EcoRV do gene *exsA* da *B. abortus*. A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular 1 Kb DNA ladder. A canaleta 2 mostra o clone 64 digerido, e as canaletas de 3 a 9, mostram os perfis das digestões do vetor pUC4K e de 6 clones que apresentaram a inserção do “cassete”, respectivamente.*



*Figura 19: Esquema do clone 64:Kan. Em azul e vermelho é mostrado o inserto do clone 64:Kan, destacando-se o gene *exsA* (vermelho) interrompido pelo "cassete" de canamicina (azul) e o restante do inserto do clone 64 (vermelho) composto pelo restante do gene *exsA* e pelo gene *ccpA*. Nesta figura são destacados ainda a localização dos sítios de restrição das enzimas *ClaI* e *PstI* no clone 64:Kan. Em cinza é mostrado o gene de resistência a ampicilina.*

ATCGATTTCCGGGGGCTGCGTTCCGCGAGCGTTCTCGGCTACACGTTTCAGCCACTGGCGAAAGTCAGCCCTTGC
GGCTGTGGCGATGATTATCGGCATGTTGCTGGCGACACCGCCGACGTTCTCACCCGCTCTATTCCGGGGCG
GCTGGTGGATTGCTGTGCTGGGCGAGCAATGCATGGGATGCGGGGATCCACGCCCTCATCGCCCTGCTCTCG
CTGGGTGCGCTGGCGCTCGTTTCGCGGGGAGGTACGTTTTTATGTCTTGACCGACTTCACCTTGAAAAATCA
TGAGCGCATGGCGGCAAGCGCCTTTTCGCAAGCTGCACCGCTTTTCGACCGACTGGCACGCGAATGCCTTTGC
CGGCTCGACGGTGCAGGTGACACGCGGGTGTGGGCGCTCGACCTGTAACGACACGCTCATCATCGCG
CTTCTGCCCTCGCTCCTGATGCTCGTGGGTTGCGGTGGTGTGCTGCTGGCATGGTTCTGGCCACTGATGGGCCTGA
TGGTGGCAATCGGCTCGGTGCTTTATATCGCCTGCACCATCGTCATCTCGCTTGGTTTCGTGGCGCCTGCGGC
CACGCTCGCAAATAGCTGGGATACGCGCATGGGCGGTGCACTGGCCGATTCCATGTGCTGCAACGCCGTGGTC
AAGGCTTTCCGGCGCAGAAGCGCGGAGGATGAACGGCTCGCCATGGTGTGAAACAAGTGGCGCACGCACACGG
CGCACATGGCTGCAGGTCTGCACGCAGGATCCCGTTTTCATCCAGGGGACAAACCTTCTGGTGTGCGCGGCGT
CATCATCGCTTTTGCCTTTTATCTGTGGACCAGGGGGCAAGCGACGGCTGGCGATATAACCTTTCTGTCTCAC
CGCCTTTTCTTCATGCTGCAAGGCTATCTGCGTGTGTTGGGCGATGCATATCCGCAACCTGCAACGCTCGGTCA
ATCACATGGAGGAAGTGGTTCGATAAATCCCGGATCCGTCGACCTGCAGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGC
CTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATAACAGGCCTGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAAGTGGGGGAGCC
ACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGTATTTGAACTTTTGTCTTTGCCACGGAACGGTCT
GCGTTGTGCGGAAGATGCGTGTCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTGATTTTATTCACAAAAGCCGCGTC
CCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTACAACCAATTAACCAATTTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGC
ATCAAATGAAACTGCAATTTTATTCATATCAGGATTAACAATACCATAATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATG
AAGGAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGCTGCGATTCCGACTCGTCC
AACATCAATACAACCTATTAATTTCCCGCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACG
ACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCACAGGCCAGCCATTACGCT
CGTCATCAAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTTCATTGCTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCG
ATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACA
ATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTA
ACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTGTGATGGTGGAAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAG
TCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTGCGCGCATCG
GGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATA
AATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACC
CCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTATCTTGTGCAATGTAA
CATCAGAGATTTTGGACACAACGTTGGCTTTCCCCCCCCCCCCCTGCAGGTCGACGGATCCGGGGAATTTATCGA
AGCCCAGCTACGCATTGCCGACAAGCCCGGCGCGCCCGCATCAGGATCGGCAATGGCGAGATCACCTTCAAT
CACGTCACCTTCCATTATGGCAGGCACGAAGCCGCGCTCTACC CGGACTTCTCGGTGCGGATCGAAGCTGGCG
AAGCGGTGCGTCTGGCGGGCTCCGGCTCCGGCAAGACGACCTTCGTGAAAGCTCATCCAACGGCTTTATGACGT
CAATGGCGGCGCATCCTGATCGACGGGCAAAACATCGCCGATGTCACACAGGGCTCCCTGCGCTTCGCGAGATC
GCCATCGTGCAGCAGGAACCAATCCTGTTTACCGGACGCTGGCGGAAAACATCGCCTATGCCCGCCCCGGCG
CATCACAGGCCGAGATCGAGGAAGCCGCTCGCCTTGCCAGCGCGCATGACTTTATCAGCCGGCTGCCAAGGG
CTACCGGACGCTGGTGGGCGAGCGCGGCTGAAAGCTTACCGGCGGTGAGCGTCAGCGCGTGGCAATTGCCCGC
GCCTTCTCGCGGATGCGCCGATCCTCATTTCTGGACGAGGCCACATCGAGCCTCGATTCCGGAATCGGAAGTGC
TGATCCAGCACGCCATGGAACGGCTGATGGTGGGGCGCACCACGCTTGTTCATCGCCACCCTTTCCACAGT
GCGCGGCTCGACCGCTTCTGGTGTTCGACAAGGGCCGATTTGTGGAAGAAGGCAATCATGACGCGCTGATC
CGCAAGTCAGACGGCATTATCGTGCCTGTTTCGAGCGCCAGGCGTGGAACTGACCAAGGGATTTGGAAGAC
ATATCTGTAA

*Figura 20: Esquema da seqüência parcial do clone 64:Kan. Esta figura mostra a localização da inserção do “cassete” de canamicina no interior do gene *exsA* no clone 64:kan. Os nucleotídeos na cor preta representam o gene *exsA* e os vermelhos representam a seqüência do “cassete” de canamicina. Os sítios de *EcoRI* do “cassete” de canamicina que foram preenchidos para a inserção estão representados em vermelho e sublinhados. Anteriormente e posteriormente à seqüência deste “cassete” está destacado em azul o sítio da enzima *EcoRV* que foi utilizada na linearização do clone 64, permitindo a inserção do mesmo. Em vermelho, no início e no final da seqüência do gene *exsA* estão representados seus códon de iniciação (TTG) e terminação (TAA).*

3.8.2. Eletroporação da *B. abortus*

Antes de se iniciar as eletroporações das construções clone 64:Kan da *B. abortus*, foram realizados experimentos piloto com controles positivo e negativo objetivando a otimização dos parâmetros de eletroporação e incubação. A linhagem 19 da *B. abortus* foi primeiramente utilizada por motivos de segurança. O controle positivo utilizado foi o vetor que se replica em *Brucella* pBBR1MCS (figura 1, anexo). Como controle negativo foi utilizado o vetor pBluescript II SK (+) (figura 6, anexo) conhecido como vetor suicida, assim como ocorre com o vetor pUC12 (figura 3, anexo). Na eletroporação da linhagem S19 da *B. abortus* com os controles foram utilizados dois valores de resistência (400 e 600 Ω) e dois intervalos de incubação após a eletroporação (4 e 16 horas). Após o plaqueamento e incubação, contou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas em cada tratamento.

Nas eletroporações com o controle positivo o tratamento utilizando-se 600 Ω de resistência e 4 horas de incubação após a eletroporação apresentou maior número de UFC, em torno de 1×10^4 UFC/ μ g. Este valor é um ótimo resultado para *Brucella*, representando uma excelente eficiência de eletroporação para este microrganismo. No controle negativo, como esperado, não foram observadas colônias nas placas.

Apesar da otimização de todas as condições necessárias à eletroporação da *B. abortus* S19, após a eletroporação da mesma com as construções clone 64:Kan, nenhuma colônia foi observada nas placas após o tempo de incubação pré-determinado. Várias concentrações de DNA foram utilizadas mas o resultado continuou negativo. Nesta etapa do trabalho, esperava-se uma recombinação dupla entre o clone 64:Kan e o genoma da *B. abortus* com conseqüente troca do gene selvagem pelo gene mutado, interrompido pelo “cassete” de canamicina. A hipótese levantada para explicar a ausência de colônias é que o experimento está otimizado apenas para eletroporações com vetores replicativos em *Brucella*. A utilização de um controle representado por um vetor suicida com um gene interrompido que já tenha produzido mutantes da *Brucella* eliminaria esta hipótese. Sendo assim, novos experimentos deverão ser realizados com o objetivo de se otimizar a eletroporação da *B. abortus* com vetores suicidas.

3.9. Expressão da proteína ExsA recombinante da *B. abortus*

3.9.1. Amplificação da seqüência parcial do gene *exsA* da *B. abortus*

O objetivo deste experimento é a produção da proteína ExsA da *B. abortus* para ser utilizada nos testes de atenuação da virulência dos mutantes *exsA*. Para isso, a seqüência parcial do gene *exsA* deste microrganismo foi amplificada por PCR a partir do clone 64. Os oligonucleotídeos utilizados nesta amplificação (*exsABamF* e *exsAPstR*) estão mostrados no item 5.1. Estes possuem em sua extremidade sítios para enzimas de restrição com o objetivo de se facilitar a clonagem.

Após a amplificação, o produto foi digerido com as enzimas *BamHI* e *PstI*, clonado no vetor de expressão pProEX HTb e cinco clones ampicilina resistentes foram selecionados. Com o objetivo de confirmar a clonagem da seqüência parcial do gene *exsA* no vetor de expressão foi realizada uma digestão enzimática com os cinco clones candidatos. A figura 21 mostra o perfil eletroforético exibido por estes clones após digestão com as enzimas *PstI* e *HindIII*. Nas canaletas de 2 a 6 a banda em torno de 1,8Kb representa o gene *exsA* e a banda em torno de 5,0Kb o vetor pProEX HTb. Este resultado confirmou que o gene foi clonado nos cinco clones candidatos e estes foram denominados pProEX:*exsA*. Destes, três foram aleatoriamente selecionados para os experimentos de expressão.

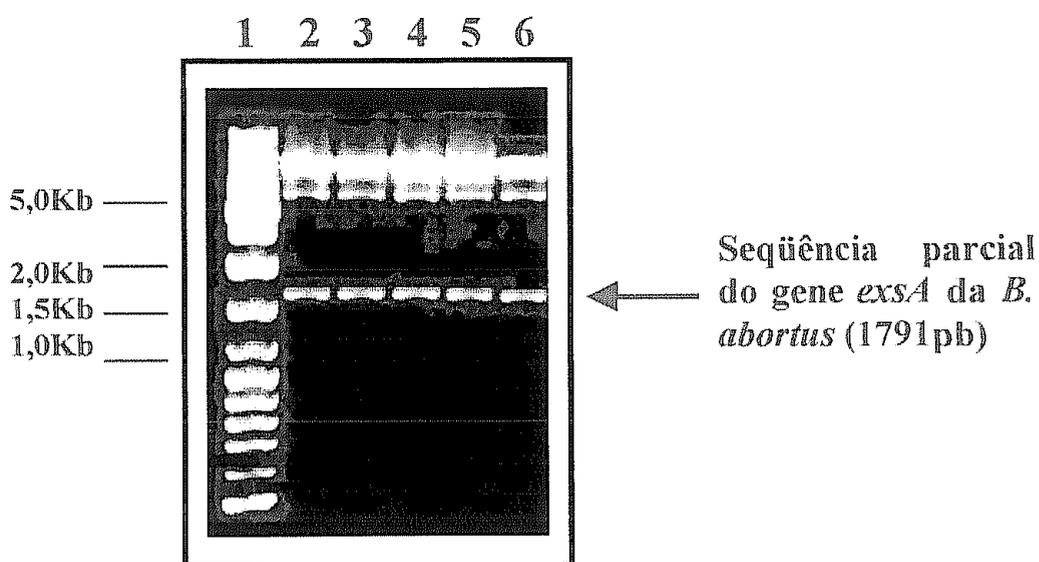


Figura 21: Confirmação da clonagem do gene exsA da B. abortus no vetor de expressão pProEX HTb. A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular Gene Ruler ladder (GIBCO BRL). As canaletas de 2 a 6 mostram o perfil eletroforético dos clones candidatos. O fragmento de aproximadamente 5,0Kb representa o vetor pProEX HTb linearizado e o fragmento de aproximadamente 1,8Kb representa o gene exsA da B. abortus e está indicado pela seta vermelha.

3.9.2. Expressão do clone pProEX:*exsA*

Primeiramente foi feito um experimento piloto com os 3 clones selecionados, sendo que após a cultura atingir $DO_{600} \sim 0,5$, a expressão da mesma foi induzida através da adição de IPTG. O produto expresso, após indução por 3 horas, foi então analisado em gel de poliacrilamida.

A figura 22 mostra o resultado do gel de poliacrilamida da tentativa de expressão da proteína ExsA dos clones pProEX:*exsA*. De acordo com análises computacionais (tabela 3/nº 13) e manuais, esperava-se que a proteína ExsA apresentasse um tamanho aproximado de 65,5kDa. Como controle negativo foi utilizada uma alíquota dos clones expressos que não sofreu indução por IPTG. No gel de poliacrilamida, nas canaletas de 3 a 5, a expressão dos clones pProEX:*exsA* não está clara, impossibilitando se fazer qualquer afirmação se houve a expressão da proteína. Nesta figura não é possível se diferenciar uma banda na altura esperada e decidiu-se fazer novo experimento determinando a cinética da expressão. Nesta etapa, dos 3 clones existentes 1 foi aleatoriamente selecionado.

A cinética da expressão foi realizada sob as mesmas condições utilizadas no primeiro experimento e um maior número de alíquotas foi retirado das amostras correspondendo a vários períodos de indução por IPTG. Neste experimento foram utilizados 2 controles positivos que expressam proteínas previamente conhecidas com o objetivo de se eliminar a hipótese de estar havendo algum problema na indução da expressão. O controle negativo não induzido do clone pProEX:*exsA* foi novamente utilizado.

A figura 23 mostra a cinética da expressão do clone pProEX:*exsA*. Neste experimento verificou-se que houve indução por IPTG como esperado uma vez que os controles positivos apresentaram expressão de suas proteínas normalmente. Entretanto, a expressão do clone pProEX:*exsA*, mostrado nesta figura nas canaletas de 4 a 9, ainda continuou duvidosa impossibilitando a confirmação da expressão da proteína ExsA deste clone. Sendo assim, decidiu-se utilizar a técnica de “Western Blot” objetivando-se a confirmação da expressão desta proteína.

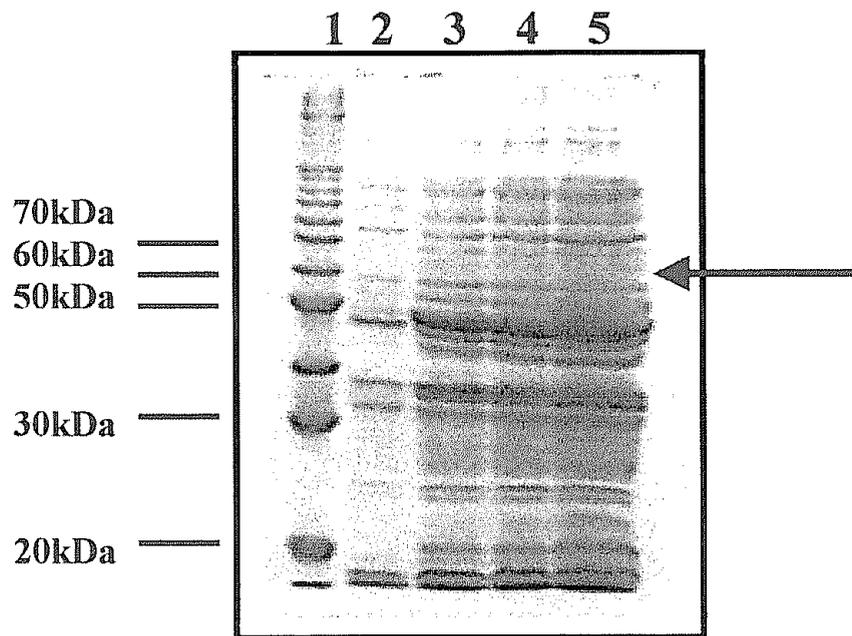


Figura 22: Tentativa de expressão da proteína ExsA em E. coli DH5α. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) corado com azul de Coomassie. A canaleta 1 representa o padrão de peso molecular, 10kDa ladder (GIBCO BRL), a canaleta 2 representa a o clone pProEX:exsA não induzido por IPTG, e nas canaletas de 3 a 5 estão representadas as expressões após 3 horas de indução de 3 clones pProEX:exsA. A altura esperada da proteína ExsA está marcada com uma seta vermelha.

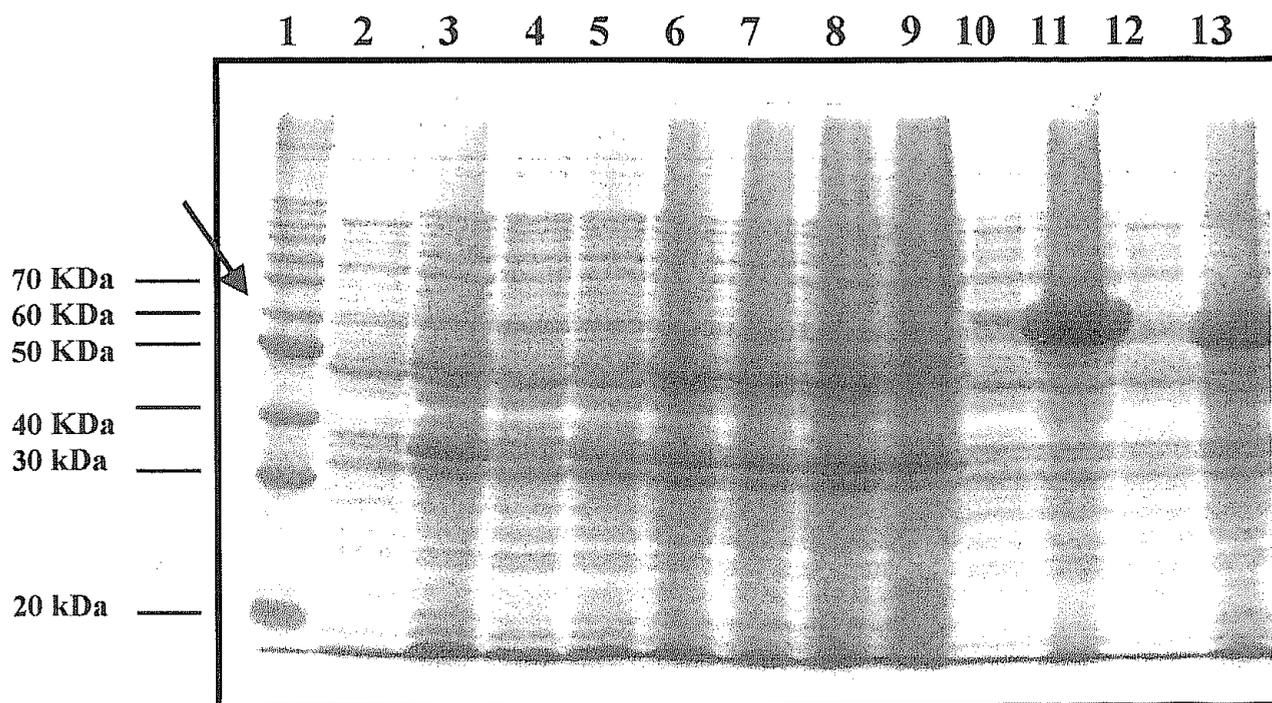


Figura 23: Cinética da expressão do clone pProEX:exsA. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) corado com a azul de Comassie. Na canaleta 1 está representado o padrão de peso molecular 10kDa ladder (GIBCO BRL). As canaletas 2 e 3 representam os controles negativos, ou seja a não indução do clone pProEX:exsA com 1 e 3 horas de crescimento respectivamente. As canaletas de 4 a 9 representam a indução com IPTG deste mesmo clone após 1h, 2hs, 3hs, 4hs, 5hs e ON respectivamente. As canaletas 10 e 12 representam não indução dos controles positivos. Nas canaletas 11 e 13 estão representados a expressão induzida destes mesmos controles. A seta vermelha mostra a altura da proteína ExsA esperada.

3.9.3. “Western Blot”

Os vetores pProEX (GIBCO BRL) possuem uma cauda composta por 6 histidinas em sua seqüência. Este fato permite a utilização da técnica de “Western Blot” nos vetores através do uso de anticorpos anti-histidina (Amersham Pharmacia Biotech).

Nesta etapa utilizou-se a mesma expressão do clone pProEX:*exsA* realizada no experimento anterior. Neste experimento foram utilizados 2 controles positivos que são reconhecidos pelo anticorpo anti-histidina. A utilização destes controles é importante pois mostra se os anticorpos utilizados estão funcionando normalmente.

A figura 24 mostra o gel de poliacrilamida na lateral esquerda (A) e a membrana do “Western Blot” na lateral direita (B). Como pode-se perceber pelos resultados desta figura, houve reconhecimento do anticorpo anti-histidina apenas com os dois controles positivos utilizados. A ausência da identificação de uma banda na altura de 65,5kDa na canaleta 3 mostra que não houve expressão da proteína ExsA da *B. abortus* no clone pProEX:*exsA*.

Com o objetivo de verificar se a seqüência parcial do gene *exsA* da *B. abortus* foi clonada em fase de leitura correta no vetor pProEX HTb, foram realizados sequenciamentos do clone pProEX:*exsA* com o oligonucleotídeo M13 Reverse (item 1.6). Entretanto, não foram obtidas seqüências de qualidade que pudessem explicar a ausência de expressão da proteína ExsA da *B. abortus* neste vetor. Pode-se então supor que esta ausência de expressão está relacionada ao fato da seqüência parcial do gene *exsA* da *B. abortus* se apresentar fora da fase correta de leitura neste vetor.

Todos os resultados obtidos nas análises do gene *exsA* da *B. abortus* mostram que este gene codifica uma proteína da família dos transportadores ABC. Os dados gerados por este trabalho mostraram a possibilidade deste gene estar envolvido nos processos de virulência e patogenicidade da *Brucella*, podendo ser caracterizado como um fator de virulência desta bactéria.

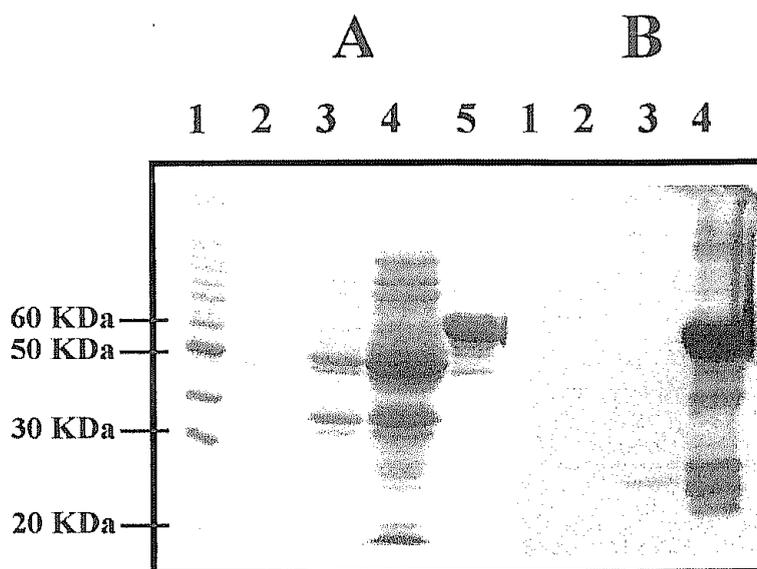


Figura 24: Análises através de SDS-PAGE e "Western Blot" da tentativa de expressão da proteína ExsA do clone pProEX:exsA. O painel A mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de Comassie. A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular 10kDa ladder (GIBCO BRL), a canaleta 2 mostra o clone pProEX:exsA não induzido, a canaleta 3 representa a expressão deste mesmo clone com 3 horas de indução e as canaletas 4 e 5 representam as expressões dos controles positivos após três horas de indução. No painel B está representado o resultado do "Western Blot". Nas canaletas 1 e 2 estão representados a não indução e a indução por 3 horas do clone pProEX:exsA respectivamente e nas canaletas 3 e 4 são mostradas as expressões dos controles positivos reconhecidas pelo anticorpo anti-histidina. Este resultado confirma a ausência de expressão da proteína ExsA.

4. Gene *ccpA* da *B. abortus*

4.1. Análise de homologia

O segundo gene identificado no clone 64 é o gene *ccpA* da *B. abortus*. A seqüência de aminoácidos deste gene possui alta homologia a proteínas envolvidas no controle da repressão catabólica (CR) de vários organismos, principalmente os genes *ccpA* dos mesmos (tabela 6). Esta repressão é um mecanismo regulatório no qual a síntese de várias enzimas envolvidas neste processo é inibida na presença de fontes de carbono rapidamente metabolizadas, tais como glicose, sucrose e manitol. A expressão de vários fatores de virulência em bactérias patogênicas e o desenvolvimento de processos de inicialização de esporulação em *Bacillus* são controlados pela CR (Behari & Youngman, 1998 e Chauvaux, 1996). Na figura 25 está representado o alinhamento da seqüência protéica do gene *ccpA* da *B. abortus* e seus homólogos.

Tabela 6: BlastX do gene *ccpA* da *B. abortus*

Organismo	Homologia	Probabilidade	Identidade
<i>Bacillus megaterium</i>	Catabolite control protein	4×10^{37}	33%
<i>Bacillus subtilis</i>	Degradation regulator protein DegA	9×10^{37}	32%
<i>Bacillus subtilis</i>	Catabolite control protein	4×10^{35}	33%
<i>Salmonella typhimurium</i>	CytR	3×10^{34}	33%

O gene *ccpA* da *B. abortus* apresenta maior homologia ao mesmo gene de *B. megaterium*. Neste microrganismo este gene representa um fator negativo de transcrição que juntamente a outras proteínas desempenha papel importante no controle da CR. Em várias bactérias Gram-

positivas com baixo conteúdo de GC, existem seqüências conhecidas como elementos *cre*, que se encontram presentes nas regiões promotoras ou próximo a estas na maioria dos genes controlados pela CR. Análises de vários autores permitiram a determinação do mecanismo de repressão catabólica através da proteína CcpA mostrando que a interação entre esta e o elemento *cre* é responsável pelo bloqueio do início da transcrição gênica (Chauvaux, 1996; Behari & Youngman, 1998).

O gene *ccpA* também controla a CR de outros organismos da mesma maneira conforme citado anteriormente. Entretanto, até o momento, este gene só foi identificado em bactérias Gram-positivas e sua identificação em *Brucella* abre novos caminhos para a compreensão deste mecanismo de repressão catabólica nestes microrganismos. Atualmente, o mecanismo da CR conhecido nestas bactérias envolve uma proteína de ativação catabólica (CAP) e seu ligante regulador, AMP cíclico. Este mecanismo nestas bactérias é bem conhecido (Jones *et al.*, 1997; Behari & Youngman, 1998). Sendo assim, análises da seqüência protéica do gene *ccpA* da *B. abortus* foram realizadas com o objetivo de se confirmar esta classificação.

Bm	-----MNVTIYDVAREASVSMATVSRVNGNPNVVKPSTRKKVLETIERLGYRPNVAVARGL	55
Lm	-----MNVTIYDVAREANVSMATVSRVNGNPNVVKPSTRKKVLDVINQLGYRPNVAVARGL	55
Lc	--MEKQTIITIDVAREANVSMATVSRVNGNPNVVKPATRKKVLEVIERLDYRPNVAVARGL	58
Ll	--MVESTTTIYDVARVAGVSMATVSRVNGNANVKEKTRQKVLEAIAELDYRPNVAVARGL	58
Bs	-----MKTTIYDVAKAAGVSIITVSRVINNTGRI SDKTRQKVMNMNEMAYTPNVHAAAL	55
Ba	MAATGKRATIHVARLAGVSIKTVSRVYNDEPNVREAI REKVKQAGAQLRYRQCQGGTQS	60
	: : * : * : * : * : * : *	
Bm	ASKKTTTVGVII PDISNI FYAELARGIEDIATMYKYNI ILSNSDQNDKELHLLNMLGK	115
Lm	ASKRTTTVGVII PDISNVFYAELARGIEDIATMYKYNI ILSNSDENEDKELQVLTLLGK	115
Lc	ASKKTTTVGVII PDVTNMFSS LARGIDDVATMYKYNI ILSNSDENNQKEVTVLTLLAK	118
Ll	ASKRTTTVGVILPTITSTYFAAITRGVDDIASMYKYNMILANSNDNDVEKEEKVLETFLSK	118
Bs	TGKRTNMIALVAPDISNPFY GELAKSIEERADELGFQMLICSTDYDPKKEPKYFVSLKQK	115
Ba	GRAPLAPGSAFSLKTRAPVMS PNCRWAHSNACVARATGSLFRSKTGPIFAVRLSKP PML	120
	. . . : . . . : . . . : . . . : . . .	
Bm	QVDGII FMS---GNVTEEHVEELKKS PVPVLAAS IESTNQI PSVTIDYEQA AFDVAVQSL	172
Lm	QVDGII YMG---ERISEQLQE EFD RSPAPVVLGAVDMENKFASVNI DYKQATKEAVKRF	172
Lc	QVDGLIFMG---HELTDSIRAEFSRSKTPVVLGASIDPDEQVGSVNI DYVAVEEATRQL	175
Ll	QVDGIVYMG---SSLDEKIRTS LKNSRTPVVLVGTIDGDKEIPSVNI DYHLAAYQSTTKL	175
Bs	KVDGII FATGIBSHDSMSALEE IASEQIPIAMI SQDKP LLPMDI VVIDDV RGGYEA AKHL	175
Ba	PVLTASSSRP-PCRMRTRFCRNL RPRPVP FARVAGDANVHPTDSVTIDDEAAAVDL MNYL	179
	* . . . * . . . *	
Bm	IDSGHKNI AFVSGTLEEPINHAKVKVGYKRALTESGLPVRDSYIVEGDYTYDSGIEAVEK	232
Lm	VDNGHKQIAFVSGSLNEP VNRMKLAGYKEALEEAGIAYQEDYIIE-KYNYNAGVKVWAE	231
Lc	LESNGKRVALATGSLTHP INGQFRLKGYKQALEKAGVAYDESLIFENEPSYQAGLALFDK	235
Ll	IENGNKKIAYIMGSLKD-VENTERMVGYQEALLEANIEFDENLVFEGNYSYEQKSLAER	234
Bs	LSLGHTNIACIIG-DGSTTGEKNRIKGFROAMEEAGVPIDESLIQTRFSLESGKEEAGK	234
Ba	LELGHRKIAIVIG-DPHRS AELRLEGYRRALREAGIEGNSDYEVQGGFSFASGLVAGRK	238
	: * : * : * : * : * : * : *	
Bm	LLEEDEKPTAIFVGTDEMALGVIHGAQDRGLNVPNDLEIIGFDNTRLSTMVRPQLTSVVQ	292
Lm	LSALSCKPNAVVDDELAI GILNAALDAGIKVPEDLEVMTSNNTKLTLM SRPQLSTIVQ	291
Lc	LQKVG--ATAVIAGDDELAVGLLDGAI DKGVKVPDDFEIITSNNTKLT EMTRPQLTSIDQ	293
Ll	LLERG--ATS AVVSHDTVAVGLLSAMMDKEVKVPEEF EII SGANSPITQYTYPTLTSVNQ	292
Bs	LLDRN-APTAF AFNDVLACAAIQAARI RGIKVPDDLSIIGFDNTILAEMAAPLTTVAQ	293
Ba	LLSLPNRPTAIFASNDDMAAVMQVAYDAGI AVPDDLTVVGFDDSAIATMVS PQITTVRQ	298
	* . . . * : * . . . : : : : : * : : : *	
Bm	PMYDIGAVAMRLLT KYMNKETVDS SIVQLPHRIEFRQSTK-----	332 (33%)
Lm	PLYDIGAVAMRLLT KLMTSEEVDEKT VILPHSEKLRGTTKEKK---	334 (30%)
Lc	PLYDIGAVAMRLLT KMMNKEEIEBKT VMLGFDILKRGSTK-----	333 (29%)
Ll	PLYDLGAVAMRLLT KLMLKE DVEQNQLVLDHEIISRSTK-----	332 (29%)
Bs	PIKEMGAERHRTAGRSNRGKRKAKQKIVLPPELVVRHSTSP LNT--	337 (32%)
Ba	PIFEMTRDAADMLLRQMESGE-TSPAQRIDYKLVQRSSARVPA--	341
	: : . . . : : * : : *	

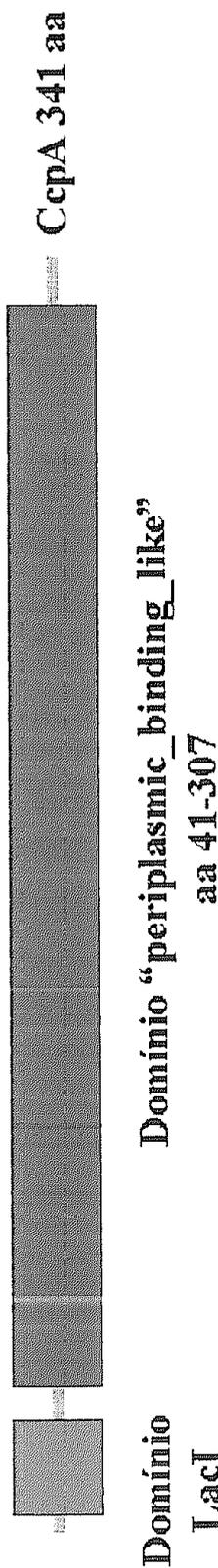
Figura 25: Alinhamento múltiplo das seqüências protéicas dos genes *ccpA* e seus homólogos. *ccpA* de *B. megaterium* (Bm), *ccpA* de *L. monocytogenes* (Lm), *ccpA* de *Lactobacillus casei* (Lc), *ccpA* de *L. lactis* (Ll), *degA* de *B. subtilis* (Bs) e *ccpA* da *B. abortus* (Ba). O tamanho da seqüência protéica de cada organismo e a identidade destas com *ccpA* da *B. abortus* estão mostrados no final de cada seqüência. “Gaps” são indicados por hífen, (*) indicam resíduos idênticos, (:) indicam substituições conservadas e (.) indicam substituições semi-conservativas.

4.2. Motivos protéicos presentes no gene *ccpA*

Enquanto as análises de homologia da seqüência protéica do gene *ccpA* da *B. abortus* sugerem que este gene está envolvido no controle da repressão catabólica deste microrganismo, a procura de motivos protéicos conservados (tabela 3/nº 6) nesta mesma seqüência mostra outros resultados. Esta afirmação é baseada na identificação de dois domínios protéicos presentes no gene *ccpA* da *B. abortus* que se encontram ausentes nos demais genes *ccpA* de outros organismos, sugerindo que provavelmente a função desempenhada por este gene da *Brucella* é diferente daquela observada nos demais.

Foram identificados os domínios “periplasmic_binding_like”, que ocupa quase que a seqüência nucleotídica inteira do gene *ccpA* da *B. abortus*, e o *LacI* (figura 26). Este último é encontrado em vários genes envolvidos no controle da expressão gênica. A família *LacI* é formada por proteínas de ligação periplasmáticas (“periplasmic binding proteins”) e por reguladores transcricionais *LacI*. As primeiras constituem receptores primários envolvidos no transporte de açúcares e os demais constituem reguladores transcricionais relacionados ao repressor *lac*.

O gene *degA* de *B. subtilis* apresenta os mesmos domínios protéicos presentes no gene *ccpA* da *B. abortus*. Este gene também possui alta similaridade a outros genes da família *LacI* e provavelmente codifica uma protease responsável pela degradação enzimática durante a esporulação deste microrganismo (Bussey & Switzer, 1993). Sendo assim, pode-se dizer que baseando-se nestes resultados, o gene *ccpA* da *B. abortus* pode estar envolvido no transporte de açúcares e repressão catabólica ou pode codificar uma protease, ambas funções estando relacionadas ao regulador transcricional *LacI*. Estudos posteriores devem ser realizados objetivando-se a verificação da real função do gene *ccpA* da *B. abortus*.



Seqüência de aminoácidos da Proteína CcpA

MAATGKRATIHQVAVR LAGVSIKTVSRVYNIENPVREAI REKVKQAGAQLRYRFPQCGGTQSGRAPLAPGSAFSLKTR
 APVMSPCRWAHSNACVARATGSLSFRSKTGPITFAVRLSKPMLPVL TASSRPPCRMTRTFRCNLRPRPVPFARV
 AGDANVHPTDSVTIDDEAAAVDLMNYLLELGHKIAIVIGDPTHRSAELRLEGYRRALREAGIEGNSDYEYVQGGFS
 FASGLVAGRKLLSLENRPTAIFASNDDMAAAVMQVAYDAGIAVPDDLTVVGFDDSAIATMVSPQITTVRQPIFEMT
 RDAADMLLRQMESGETSPAQRIDYKLIIVRQSSARVPA-

Figura 26: Representação esquemática dos domínios da seqüência protéica CcpA da *B. abortus*. O domínio “periplasmic_binding_like” (vermelho) está contido entre os aminoácidos 41 e 307 e o domínio LacI (verde) está contido entre os aminoácidos 6 e 33. A região em cinza representa o restante da proteína CcpA, que é composta por 341 aminoácidos.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Das 100 GSS geradas, 24% apresentaram homologia a enzimas, 7% a proteínas envolvidas no transporte celular, 11% a genes envolvidos na virulência e patogenicidade, 2% a genes envolvidos no choque térmico, 52% a genes com outras funções e 4% não apresentaram nenhuma homologia em banco de dados.
- A estratégia de obtenção de GSS é eficiente para a descoberta de novos genes, inclusive aqueles envolvidos nos processos de virulência e patogenicidade da *Brucella*.
- Foram identificados dois novos genes, posteriormente caracterizadas como genes *exsA* e *ccpA*, ainda não descritos no genoma da *B. abortus*.
- A seqüência parcial do gene *exsA* da *B. abortus* possui 1791pb e codifica um polipeptídeo de 596 aminoácidos. Análises de homologia, hidrofobicidade, motivos protéicos e estruturas secundária e tridimensional mostram que o mesmo codifica um transportador ABC classificado no grupo ortólogo 6 destes transportadores. Este gene está presente em uma única cópia no genoma deste microrganismo.
- O gene *ccpA* da *B. abortus* possui 1026pb e codifica um polipeptídeo de 341 aminoácidos. Análises de homologia e procura de motivos protéicos sugerem duas funções diferentes para este gene, impossibilitando assim a suposição da mesma.

Perspectivas

- Construção de um mutante *exsA* na *B. abortus* com o objetivo de se verificar seu papel na virulência deste microrganismo
- Verificar se o gene *ccpA* da *B. abortus* está envolvido no controle da repressão catabólica ou no transporte de açúcares e se este tem alguma implicação na virulência deste microrganismo.

Referências Bibliográficas

- Allaoui, A., Scheen, R., Rouvroit, C.L. and Cornelis, G.R. (1995). VirG, a *Yersinia enterocolitica* lipoprotein involved in Ca⁺² dependency, is related to ExsB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 177: 4230-4237.
- Allardet-Servent, A., Bourg, G., Ramuz, M., Pages, M., Bellis, M. and Roizes, G. (1988). DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 170: 4603-4607.
- Allen, C.A., Adams, L.G. and Ficht, T.A. (1998). Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect. Immun.* 66: 1008-1016.
- Alton G.G., Jones, L.M., Angus, R.D and Verger, J.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- Andrade, A.G., Van Nistelrooy, J.G.M., Peery, R.B., Skatrud, P.L. and De Waard, M.A. (2000). The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol. Gen. Genet.* 263: 966-977.
- Battisti, L., Lara, J.C. and Leigh, J.A. (1992). Specific oligosaccharid form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5625-5629.
- Becker, A., Kuster, H., Niehaus, K. and Puhler, A. (1995). Extension of the *Rhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene cluster: identification of the *exsA* gene encoding an ABC transporter protein, and the *exsB* gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 249: 487-497.
- Behari, J. and Youngman, P. (1998). A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J. Bacteriol.* 180: 6316-6324.
- Birnboim, H. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extration procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc.Ac.Res.* 7:1513-1523.
- Borst, P., Zelcer, N. and van Helvoort, A. (2000). ABC transporters in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486: 128-144.
- Boschiroli, L., Crevero, S., Arese, A. and Rosseti, O.L. (1995). Construcción y caracterización de una mutante de *Brucella abortus* por inactivación de un gen que codifica una proteína de 26 kDa. *Arch. Med. Vet.* 27: 103-110.

- Braibant, M., Gilot, P. and Content, J.** (2000). The ATP binding cassette (ABC) transport system of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Ver.* 24: 449-467.
- Bruce, D.** (1887). Note on the discovery of microorganism in Malta Fever. *The Practitioner.* 39:161-163.
- Bussey, L.B. and Switzer, R.L.** (1993). The *degA* gene product accelerates degradation of *Bacillus subtilis* phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 6348-6353.
- Canavessi, A., Eskra, L., Carey, M. and Splitter, G.** (2000). *Brucella abortus* genes identified by a green fluorescent protein (GFP) reporter system. *Brucellosis2000 including the 53rd brucellosis research conference.* Nimes, France
- Chauvaux, S.** (1996). CcpA and HPr (ser-P): mediators of catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol.* 147: 518-522.
- Cheville, N.F., Stevens, M.G., Jensen, A.E. Tatum, F.M. and Halling, S.M.** (1993). Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 54: 175-180.
- Cloeckaert, A., Grayon, M., Verger, J.M., Letesson, J.J. and Godfroid, F.** (2000). Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. *Res. Microbiol.* 151: 209-216.
- Cloeckaert, A., Verger, J-M., Grayon, M. and Grépinet, O.**(1996). Polymorphism at the *dnaK* locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species-specific marker. *J. Med. Microbiol.* 45: 200-205.
- Corbel, M.J.** (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 213-221.
- Crawford, R.M., Huber, J.D. and Bruce, S.** Epidemiology and surveillance. In: K. Nielsen & J.R. Ducan. *Animal Brucellosis.* CRC Press, 1990. p. 131-152.
- Del Vecchio, V., Redkar, R., Patra, G., Hagijs, S., Elzer, P., Larsen, N. and Fonstein, M.** (2000). Genome sequencing of *Brucella melitensis*. *Brucellosis 2000 including the 53rd brucellosis research conference.* Nimes, France.
- Drazek, E.S., Houng, S.A., Crawford, R.M., Hadfield, T.L., Hoover, D.L. and Warren, R.L.** (1995). Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* 16M for growth in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 63: 3297-3301.
- Egeter, O. and Bruckner, R.** (1996). Catabolite repression mediated by the catabolite control protein in *Staphylococcus xylosus*. *Mol. Microbiol.* 21: 739-749.
- Fath, M.J. and Kolter, R.** (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57: 995-1017.

- Feitosa, M.H., Bittar, C.R. and Gomes, S.P. (1991). Brucelose: levantamento sorológico no Estado de São Paulo no período de 1977 a 1987. *Vet. E. Zoot.* 3: 9-15.
- Ferraz, L.B.F. (1999). Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. *Rev. Bras. Reprod. Animal.* 23: 504-508.
- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. and Adams, L.G. (1989). DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 57: 3281-3291.
- Finck-Barbançon, V., Yahr, T.L. and Frank, D.W. (1998). Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J. Bacteriol.* 180: 6224-6231.
- Fleiszig, S.M.J., Wiener-Kronish, J.P., Miyazaki, H., Vallas, V., Mostov, K.E., Kanada, D., Sawa, T., Yen, T.S.B. and Frank, D.W. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect. Immun.* 65: 579-586.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazevielle, C., Michaux-Charachon, S. and O'Callaghan, D. (2000). Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an *in vitro* macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect. Immun.* 68: 1297-1303.
- Frenchick, P.J., Markham, F. and Cochrane, A.N. (1984). Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 46: 332-335.
- Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. and Bollet, C. *Precis de Bacteriologie Clinique*. Paris: ESKA, 2000. p.1413-1423.
- Glucksmann, M.A., Reuber, T.L. and Walker, G.C. (1993). Genes needed for the modification, polymerization, export and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 7045-7055.
- Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckert, A., Godfroid, J. and Letesson, J.J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival and in mice and in macrophages. *Infect. Immun.* 66: 5485-5493.
- Goldstein, J., Hoffman, T., Frasch, C., Lizzio, E.F., Beining, P.R., Hochstein, D., Lee, Y.L., Angus, R.D. and Golding, B. (1992). Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infect. Immun.* 60: 1385-1389.

- González, J.E., York, G.M. and Walker, G.C.** (1996). *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene*. 179: 141-146.
- Gross, A., Spiesser, S., Terraza, A., Rouot, B., Caron, E. and Dornand, J.** (1998). Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Infect. Immun.* 66: 1309-1316.
- Heinhold, B.B., Chan, S.Y., Reuber, T.L., Marra, A., Walker, G.C. and Reinhold, V.N.** (1994). Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm 1021. *J. Bacteriol.* 176: 1997-2000.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E. and Holden, D.W.** (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*. 269: 400-403.
- Higgins, C.F.** (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T.** *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. 9.ed. Baltimore: SansTache, 1994. p.79.
- Hong, P.C., Tsolis, R.M. and Ficht, T.A.** (2000). Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.* 68: 4102-4107.
- Hovey, A.K. and Frank, D.W.** Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. (1995). *J. Bacteriol.* 177: 4427-4436.
- Hoyer, B.H. and McCullough, N.B.** (1968). Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *J. Bacteriol.* 95: 444-448.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F. and Kim, S.H.** (1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of na ABC transporter. *Nature*. 396: 703-707.
- Iannino, N.I., Briones, G., Tolmasky, M. and Ugalde, R.A.** (1998). Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic $\beta(1-2)$ glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J. Bacteriol.* 180: 4392-4400.
- Jones, B.E., Dossonnet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J. and Klevit, R.E.** (1997). Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem.* 272: 26530-26535.

- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charanchon, S., Bourg, G., O'Callaghan, D. and Ramuz, M. (1998A). Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.* 27: 99-106.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charanchon, S., Bourg, G., Ramuz, M. and Allardet-Servent, A. (1998B). Unconventional genomic organization in the Alpha subgroup of the *Proteobacteria*. *J. Bacteriol.* 180: 2749-2755.
- Kempf, B., Gade, J. and Bremer, E. (1997). Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J. Bacteriol.* 179: 6213-6220.
- Kim, J.A., Sha, Z. and Mayfield, J.E. (2000). Regulation of *Brucella abortus* catalase. *Infect. Immun.* 68: 3861-3866.
- Ko, J. and Splitter, G.A. (2000). *Brucella abortus* tandem repeated ATP-binding proteins, BapA and BapB, homologs of *Haemophilus influenzae*, are not necessary for intracellular survival. *Microbial Pathogenesis.* 29: 245-253.
- Kohler, S., Ouahrani-Bettache, S., Layssac, M., Teyssier, J. and Liautard, J.P. (1999). Constitutive and inducible expression of green fluorescent protein in *Brucella suis*. *Infect. Immun.* 67: 6695-6697.
- Kohler, S., Teyssier, J., Cloeckert, A., Rouot, B. and Liautard, J.P. (1996). Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol. Microbiol.* 20: 701-712.
- Krulwich, T.A. The Bacteria. In: W. Epstein. *Bacterial Transport ATPases*. AP Press, 1990. p. 87-110.
- Kurar, E. and Splitter, G.A. (1997). Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine.* 15: 1851-1857.
- Lai, F., Schurig, G.G. and Boyle, S.M. (1990). Electroporation of a suicide plasmid bearing a transposon into *Brucella abortus*. *Microb. Pathog.* 9: 363-368.
- Leigh, J.A. and Walker, G.C. (1994). Exopolysaccharide of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Elsevier Science Reviews.* 10: 63-67.
- Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Didembourg, C., Taminiau, B., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Tang, C.M. and Letesson, J.J. (2000). Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol. Microbiol.* 38: 543-551.

- LeVier, K., Phillips, R.W., Grippe, V.K., Roop II, R.M. and Walker, G.C. (2000). Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science*. 287: 2492-2493.
- Liu, M., Gonzalez, J.E., Willis, L.B. and Walker, G.C. (1998). A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *Ap. Env. Microbiol.* 64: 4600-4602.
- Lowrie, D.B., Silva, C.L., Colston, M.J., Ragno, S. and Tascon, R.E. (1997). Protection against tuberculosis by plasmid DNA vaccine. *Vaccine*. 15: 834-838.
- Luesink, E.J., van Herpen, R.E.M.A., Grossiord, B.P., Kuipers, O.P. and Vos, W.M. (1998). Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* 30: 789-798.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M. and Mekalanos, J.J. (1993). Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced during infection in host tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 669-673.
- Martínez de Tejada, G. and Moriyón, I. (1993). The outer membranes of *Brucella* ssp. are not barriers to hydrophobic permeants. *J. Bacteriol.* 175: 5273-5275.
- Matthysse, A.G., Yarnall, H.A. and Young, N. (1996). Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 178: 5302-5308.
- McQuiston, J.R., Vemulapalli, R., Inzana, T.J., Schurig, G.G., Sriranganathan, N., Fritzing, D., Hadfield, T.L., Warren, R.A., Lindler, L.E., Snellings, N., Hoover, D., Halling, S.M. and Boyle, S.M. (1999). Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect. Immun.* 67: 3830-3835.
- McQuiston, J.R., Vemulapalli, R., Inzana, T.J., Schurig, G.G., Sriranganathan, N., Fritzing, D., Hadfield, T.L., Warren, R.A., Snellings, N., Hoover, D., Halling, S.M. and Boyle, S.M. (1999). Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect. Immun.* 67: 3830-3835.
- Meibom, K.L., Kallipolitis, B.H., Ebricht, R.H. and Valentin-Hansen, P. (2000). Identification of the subunit of cAMP receptor protein (CRP) that functionally interacts with CytR in CRP-CytR-mediated transcriptional repression. *J. Bio. Chem.* 275: 11951-11966.

- Meyer, M. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. In: K. Nielsen & J.R. Ducan. *Animal Brucellosis*. CRC Press 1990. p.1-17.
- Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M.J., Bourg, G., Allaredet-Servent, A., Ramuz, M. (1993): Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* 175: 701-705.
- Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Jumas-Bilak, E., Guigue-Talet, P., Allardet-Servent, A., O'callaghan, D. and Ramuz, M. (1997). Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 179 : 3244-3249.
- Miyoshi, A. *Isolamento, identificação e análise molecular de um clone contendo os genes "virulence associated gene" (vacB) e "multidrug transporter" (yfkI) de Brucella abortus*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. 119p. (Dissertação de Mestrado, Genética).
- Moriyón, I. and Berman, D.T. (1982). Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J. Bacteriol.* 152: 822-828.
- Nascimento, S. Governo vai declarar guerra à brucelose. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 7 de novembro de 2000. Agrofolha, p. F1-F2.
- Oliveira, S.C. and Splitter, G.A. (1996). Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*. 14: 959-962.
- Oliveira, S.C., and Splitter, G.A. (1994). Subcloning and expression of the *Brucella abortus* L7/L12 ribosomal gene and T-lymphocyte recognition of the recombinant protein. *Infect. Immun.* 62: 5201-5204.
- Oliveira, S.C., Zhu, Y. and Splitter, G. (1994). Sequences of the *rplJL* operon containing the *L10* and *L7/L12* genes from *Brucella abortus*. *Gene*. 140: 137-138.
- Oñate, A.A., Vemulapalli, R., Andrews, E., Schurig, G.G., Boyle, S. and Folch, H. (1999). Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 67: 986-988.
- Ouhrani, S., Michaux, S., Sri Widada, J., Bourg, G., Tournebize, R., Ramuz, M. and Liautard, J.P. (1993). Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J. Gen. Microbiol.* 139 : 3265-3273.
- Plum, G. and Clark-Curtis, J.E. (1994). Induction of *Mycobacterium avium* gene expression following phagocytosis by human macrophages. *Infect. Immun.* 62: 476-483.

- Poester, F.P. (1999). Situación de la brucelosis animal en Brasil. Simposium Internacional de Brucelosis. Venezuela. Memorias: 199-211.
- Putman, M., van Veen, H.W. and Konings, W.N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 672-693.
- Rasool, O., Freer, E., Moreno, E. and Jarstrand, C. (1992). Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect. Immun.* 60: 1699-1702.
- Reuber, T.L. and Walker, G.C. (1993). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell.* 74: 269-280.
- Reuber, T.L., Reed, J., Glazebrook, J., Glucksmann, M.A., Ahmann, D., Marra, A. and Walker, G.C. (1991). *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: genetic analyses and symbiotic importance. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 636-641.
- Sangari, F. and Agüero, J. (1991). Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb. Pathog.* 11:443-446.
- Sangari, F. and Agüero, J. (1994). Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by detection of DNA polymorphism at the *ery* locus. *Vaccine.* 12: 435-438.
- Sangari, F.J. (1996). Molecular basis of *Brucella* pathogenesis: an update. *Microbiol. SEM.* 12: 207-218.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104-108
- Schurig, G.G., Roop, R.M., Bagchi, T., Boyle, S., Burhman, D. and Srirangathan, N. (1991). Biological properties of RB51. A stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28: 171-188.
- Scupham, A.J. and Triplett, E.W. (1997). Isolation and characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase-encoding gene, *galE*, from *Brucella abortus* 2308. *Gene.* 202: 53-57.
- Shine, J. and Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1342-1346.
- Simpson, C.L. and Russel, R.R.B. (1998). Identification of a homolog of CcpA catabolite repressor protein in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 66: 2085-2092.
- Smith, L.D. and Ficht, T.A. (1990). Pathogenesis of *Brucella*. *Critic. Ver. Microbiol.* 17: 209-230.

- Smith, L.D. and Heffron, F. (1987). Transposon Tn5 mutagenesis of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 55:2774-2776.
- Stryer, L. *Bioquímica*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992. p. 13-36.
- Tatum, F.M., Detilleux, P.G., Sacks, J.M. and Halling, S.M. (1992). Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis *in vitro* in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice. *Infect. Immun.* 60: 2863-2869.
- Tatum, F.M., Morfitt, D.C. and Halling, S.M. (1993). Construction of a *Brucella abortus* recA mutant and its survival in mice. *Microb. Path.* 14: 177-185.
- Tomii, K. and Kanehisa, M. (1998). A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Research*. 8: 1048-1059.
- Ugalde, J.E., Czibener, C., Feldman, M.F. and Ugalde, R.A. (2000). Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect. Immun.* 68: 5716-5723.
- Ugalde, R.A. (1999). Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, and endosymbionts. *Microbes and Infection*. 1: 1211-1219.
- Vemulapalli, R., Duncan, A.J., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., Toth, T.E. and Schurig, G.G. (1998). Cloning and sequencing of *yajC* and *secD* homologs of *Brucella abortus* and demonstration of immune responses to YajC in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect. Immun.* 66: 5684-5691.
- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D. and Grayon, M. (1985). *Brucella*, a monoespecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 292-295.
- Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC12 plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- Vizcaino, N., Cloeckert, A., Verger, J.M., Grayon, M. and Fernández-Lago, J. (2000). DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes and Infection*. 2: 1089-1100.
- Vizcaino, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S. and Fernández-Lago, J. (2000). Characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *Brucella abortus* strains: evidence for a locus involved in the synthesis of a polysaccharide. *Infect. Immun.* 67: 2700-2712.

- Walshaw, D.L. and Poole, P.S.** (1996). The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes. *Mol. Microbiol.* 21: 1239-1252.
- Weinstock, G.M.** (2000). Genomics and bacterial pathogenesis. *Genomics.* 6: 496-504.
- WHO – World Health Organization.** (1998). Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. The development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of a WHO Meeting, Geneva.
- Young, J. and Holland, I.B.** (1999). ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta.* 1461: 177-200.
- Zhan, Y. and Cheers, C.** (1998). Control of IL-12 and IFN- γ production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. *J. Immun.* 161: 1447-1453.

FIGURAS ANEXAS

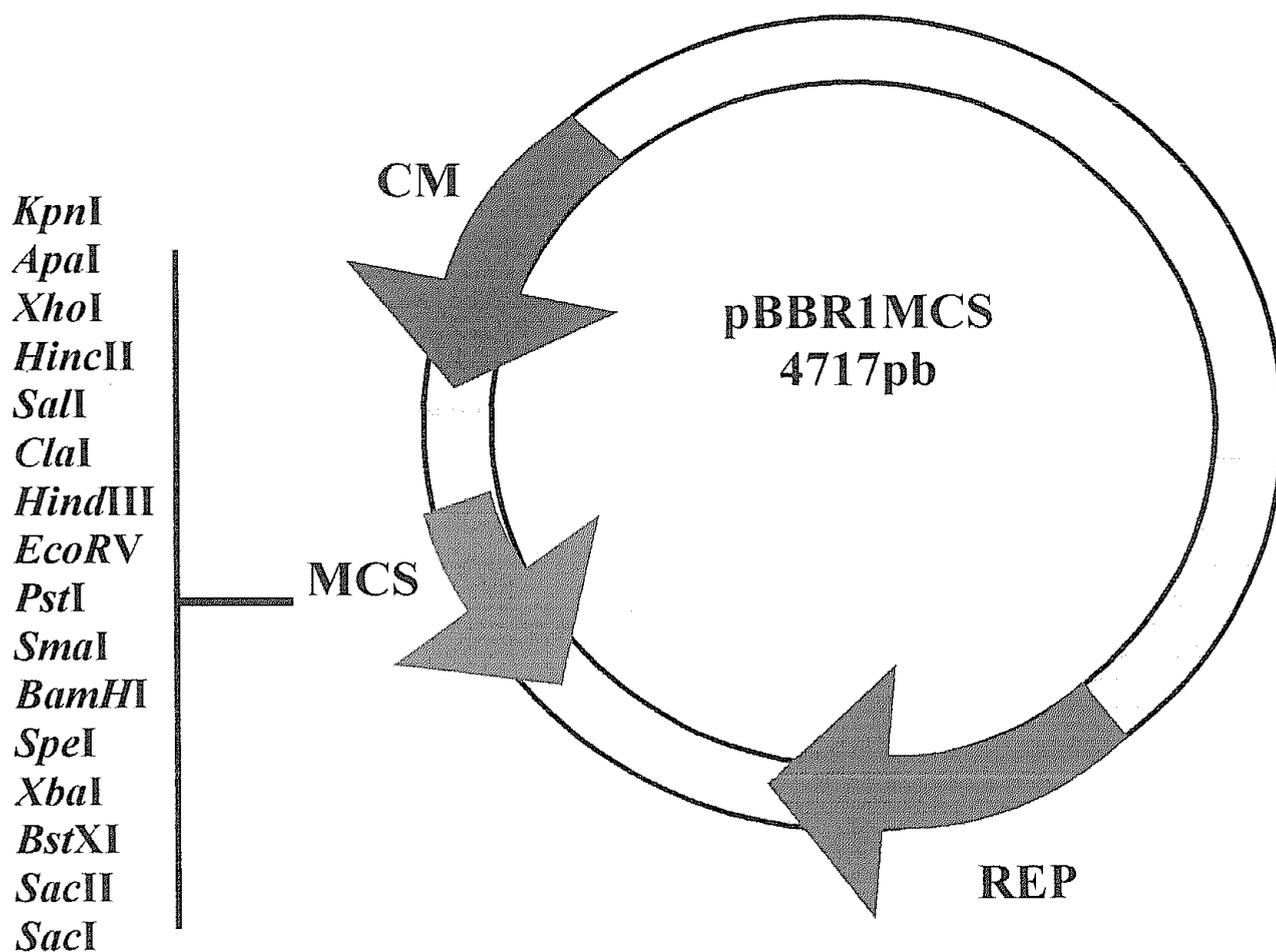


Figura 1: Mapa do vetor pBBR1MCS. Em vermelho está representado o gene necessário à replicação do plasmídeo, em verde o sítio múltiplo de clonagem (MCS) e as enzimas presentes no mesmo e em azul está representado o gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol.

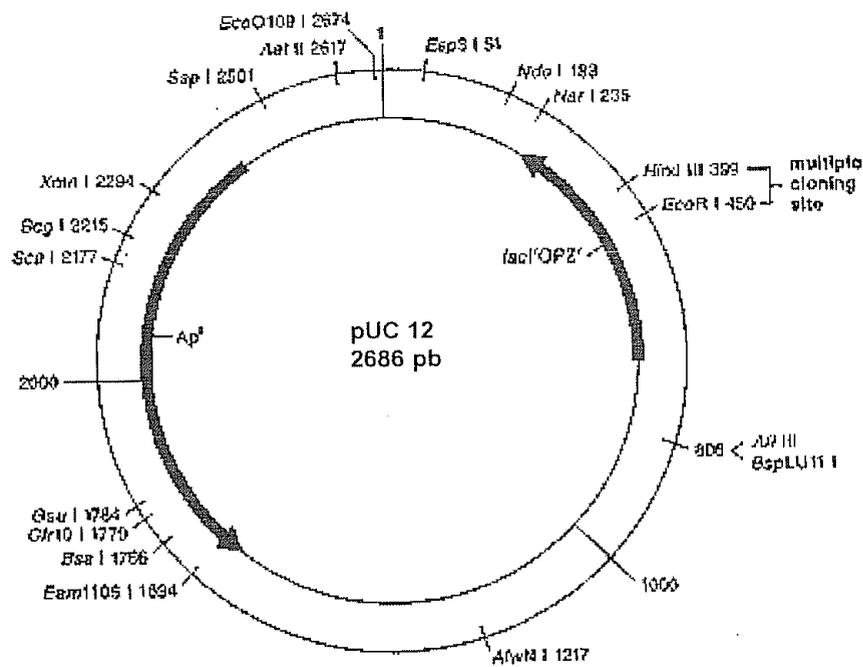


Figura 3: Mapa do vetor pUC12 (Vieira & Messing, 1982). O sitio de clonagem múltipla (MCS) deste vetor é composto pelas seguintes enzimas (nesta ordem como mostrado na figura): *EcoRI*, *SacI*, *SmaI* e *XmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *AccI* e *HincII* e *SalI*, *PstI*, *HindIII*.

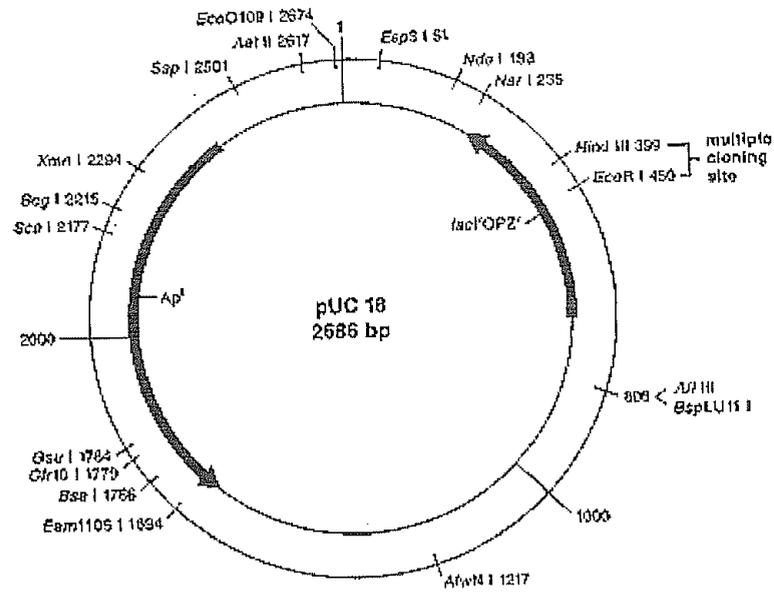


Figura 4: Mapa do vetor pUC18 (Amersham Pharmacia Biotech). O sitio de clonagem múltipla (MCS) deste vetor é composto pelas seguintes enzimas (nesta ordem como mostrado na figura): *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI* e *XmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *AccI* e *HincII* e *SalI*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*.

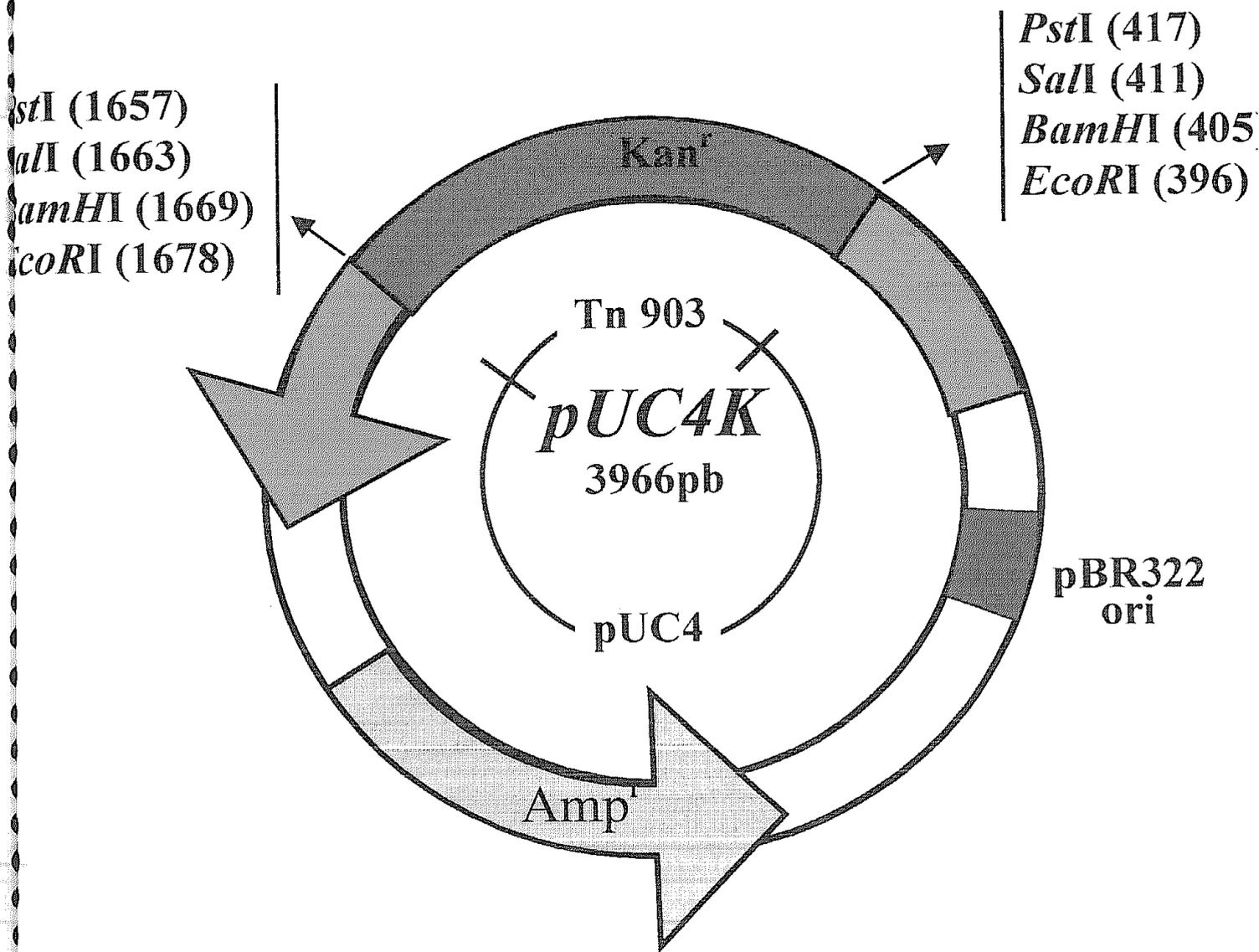


Figura 5: Mapa do vetor pUC4K (Amersham Pharmacia Biotech). As enzimas de restrição que liberam o cassete de canamicina estão representadas na figura, bem como seus sítios de corte. Em cinza está destacado o marcador de resistência à ampicilina e em azul o cassete de canamicina que confere resistência a este antibiótico. Em verde está representada a seqüência do gene lacZ e em vermelho a origem de replicação do vetor.

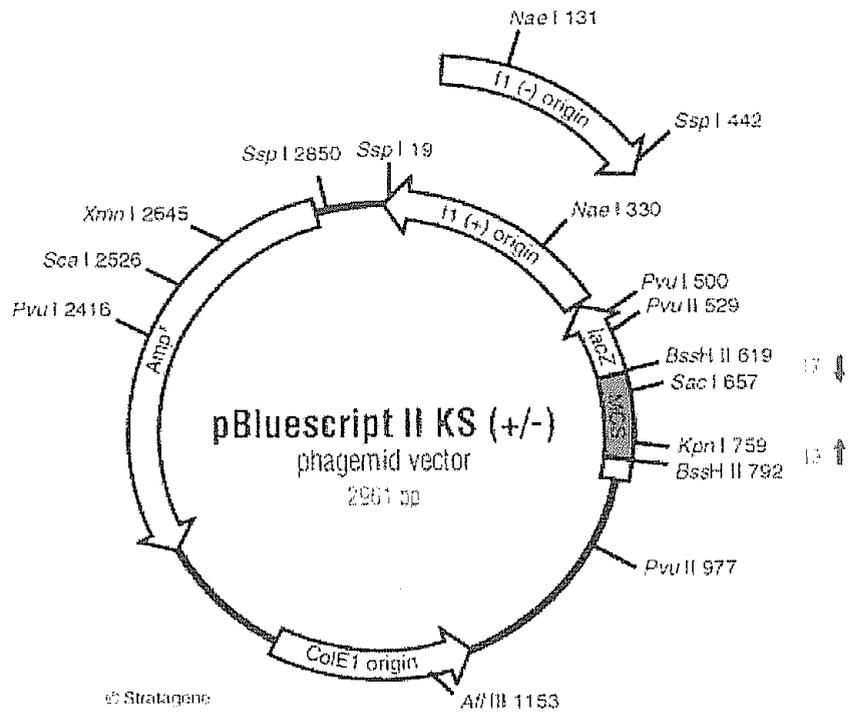


Figura 6: Mapa do vetor pBluescript II KS (+/-) (Stratagene)

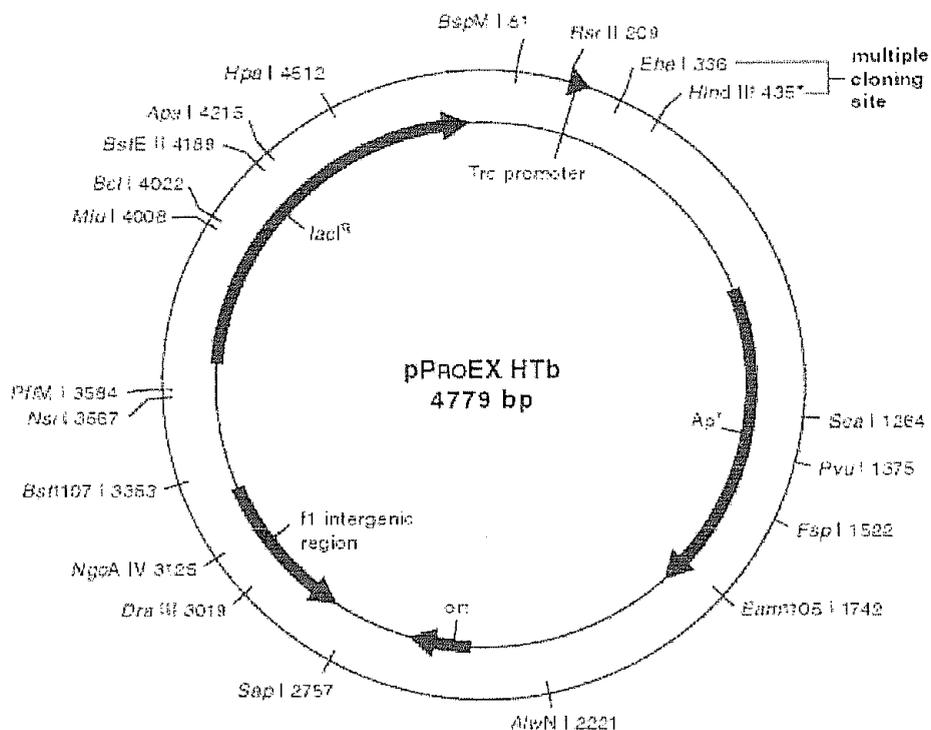


Figura 7: Mapa do vetor pProEX HTb (GIBCO BRL). O sitio de clonagem múltipla (MCS) deste vetor é composto pelas seguintes enzimas (nesta ordem como mostrado na figura): EheI, StyI e DsaI e NcoI, AvaI e BamHI, Kpn2I, EcoRI, StuI, SalI, SstI, SpeI, XmaI e NotI, NspI, XbaI, PstI, XhoI, SphI, KpnI, HindIII.

TABELAS ANEXAS

Tabela 2: Número de GSS depositadas no banco de dados, exemplificando alguns organismos. Em destaque está representado o número de GSS depositadas da *B. abortus* até o momento (janeiro de 2001).

Número de GSS depositadas no banco de dados: 2.148.783

<i>Espécies</i>	<i>Número de GSS depositadas</i>
<i>Homo sapiens</i> (homem)	866.209
<i>Mus musculus</i>	553.403
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	188.963
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	93.107
<i>Trypanosoma brucei</i>	90.540
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	76.019
<i>Arabidopsis thaliana</i>	61.265
<i>Entamoeba histolytica</i>	49.129
<i>Drosophila melanogaster</i>	44.787
<i>Fugu rubripes</i>	42.771
<i>Magnaporthe grisea</i> ("rice blast fungus")	12.674
<i>Trypanosoma cruzi</i>	12.245
<i>Leishmania major</i>	11.929
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7.637
<i>Cryptosporidium parvum</i>	7.081
<i>Glycine max</i> (soja)	3.718
<i>Paramecium tetraurelia</i>	2.987
<i>Medicago truncatula</i> ("barrel medic")	2.658
<i>Photobacterium luminescens</i>	2.349
<i>Giardia intestinalis</i>	2.345
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	2.275
<i>Brucella abortus</i>	1.994
<i>Plasmodium falciparum</i>	1.766
<i>Ciona intestinalis</i>	1.486
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	1.251
<i>Zea mays</i>	1.171
<i>Salmonella typhimurium</i>	895
<i>Plasmodium chabaudi</i>	767
<i>Gallus gallus</i> ("chicken")	587
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	455
<i>Brugia malayi</i>	387
<i>Planococcus lilacinus</i>	343
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	324
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	283
<i>Capra hircus</i> (cabra)	264
<i>Boophilus microplus</i>	257
<i>Schistosoma mansoni</i>	191

Tabela 3: Sítios utilizados nas análises computacionais do clone 64

Número do Programa	Sítio	Endereço
1	The National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
2	The National Center for Biotechnology Information - GSS	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbGSS/index.html
3	The National Center for Biotechnology Information – Blast N e Blast X	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
4	BCM HGSC: Search Launcher Home Page	http://hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher/
5	The National Center for Biotechnology Information – ORF Finder	http://ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
6	Pfam: Search Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Pfam/search.shtml
7	SOSUI Membrane domains	http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/sosui.cgi?/sosui_submit.html
8	Swiss Model	http://expasy.hcuge.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html
9	ExPASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.ch/
10	BCM Search Launcher: Sequence Utilities	http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-util/seq-util.html
11	FRUITFLY : PROMOTER	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
12	Clustalw	http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/
13	Theoretical pI/Mw for the protein sequence	http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html
14	PredictProtein	http://www.cmbi-hcidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html
15	RasMol	http://www.umass.edu/microbio/rasmol/getras.htm#raswin

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)