

THYARA FERREIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA CHAPERONA Hfq EM  
*Actinobacillus pleuropneumoniae*, O AGENTE CAUSAL DA  
PLEUROPNEUMONIA SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586c  
2016  
Silva, Thyara Ferreira da, 1990-  
Caracterização e expressão da chaperona Hfq em  
*Actinobacillus pleuropneumoniae*, o agente causal da  
pleuropneumonia suína / Thyara Ferreira da Silva. - Viçosa,  
MG, 2016.  
xi, 57f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Denise Mara Soares Bazzoli.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.49-57.

1. Suíno. 2. Doenças. 3. *Actinobacillus  
pleuropneumoniae*. 4. Proteínas. 5. Regulação de expressão  
gênica. 6. Imunologia veterinária. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de  
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 636.4

THYARA FERREIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA CHAPERONA Hfq EM  
*Actinobacillus pleuropneumoniae*, O AGENTE CAUSAL DA  
PLEUROPNEUMONIA SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 29 de fevereiro de 2016.

---

Eduardo de Almeida Marques da Silva

---

Miriam Teresinha dos Santos

---

Denise Mara Soares Bazzoli  
(Orientadora)

Dedico este trabalho a minha avó Mercês, que sempre me incentivou a ser uma pessoa melhor a cada dia. Aos meus pais, minha família e meus verdadeiros amigos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização do Mestrado.

À minha orientadora Professora Denise Mara Soares Bazzolli, por todos os ensinamentos, por permitir meu crescimento profissional na área e por me acompanhar nesses dois anos, sempre me incentivando a dar meu melhor tanto nas disciplinas, quanto dentro do laboratório.

Aos professores Eduardo e Míriam por participarem da banca de defesa e aos professores Leandro e Andréa pela co-orientação. Em especial ao professor Leandro que sempre foi muito solícito comigo nos momentos em que o procurei. Aos professores do Departamento de Microbiologia que contribuíram para meu crescimento profissional.

A todos os colegas e companheiros do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, em especial à Vanessa, Ana, Giarlã, Casley, Jonathan, Larissa e Hanna por tornarem os dias de trabalho uma alegria e pela ajuda no laboratório. Em especial ao Newton, que foi como um pai e sempre esteve ao meu lado me ajudando e dando força nos momentos mais difíceis, e sempre me passando seu magnífico conhecimento. A Josi, que fez de tudo por mim, não sei o que seria de mim sem ela nesses anos, sempre disposta a me ajudar e sempre ao meu lado também. A Kaliane, a pessoa mais bondosa que conheci nesses anos, que cuida de mim, que é minha amiga e que me aguenta todos os dias. Ao Lucas, que é um amigo especial de um coração imenso, os melhores conselhos vêm dele.

Aos colegas do laboratório de Micorriza por compartilharem o trabalho, conhecimentos e momentos de descontração. Em especial ao Paulo, que é um grande amigo, de um coração acolhedor e sincero. Ao Alan, que é o cara mais carismático que conheci na pós, com um coração bom e palavras sinceras. Ao Tomás, que é sempre

solícito e está sempre disposto a ajudar, sempre tentando apaziguar as situações e acalmar as pessoas.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer na pós-graduação, Isabelle, Aneli, Thamar, Conrado, Rita, Andres, Rodrigo, Samantha e Manu, que fizeram dos meus dias mais agradáveis, com viagens, piquiniques, barzinhos, reuniões, almoços no R.U., festinhas entre tantos momentos que pudemos compartilhar nesses 2 anos. Em especial ao Phill, que é o meu chileno favorito, um amor de pessoa e um amigo que vou levar comigo sempre. A Juliana Ângelo pela amizade, companheirismo, por ser essa pessoa sincera e amiga.

Aos meus pais Elizabeth e José Geraldo que sempre me apoiaram e me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos, sempre ao meu lado me induzindo a ser uma pessoa independente e responsável. À minhas irmãs Jéssica e Giane, pelos momentos bons, de briga, de alegria, de companheirismo de sufoco e pelo meu afilhado João Gabriel que está chegando esse mês pra trazer alegria á nossa família. À minha família, em especial à tia Neuza, Tio Lindinho e minha avó Mercês (in memorian) que sempre fizeram tudo por mim, sempre me ajudando e ao meu lado.

Aos meus amigos de Coimbra Laís, Lucas, Juninho, Meire, Dayane, Cris, Dany, Willian e Leandro, pela amizade e por todos os momentos que vivemos, sempre juntos, na alegria ou na tristeza, sempre. Em especial à Ariana, que dividiu apartamento comigo em Viçosa nesse período e é minha mãe, irmã, confidente, amiga e companheira. Aos amigos do Rio, Erika, Maria, Leticia, Débora, Carol, Jessica, Márcio e Rodrigo, por me lembrar como amizade nunca se perde e minha antiga co-orientadora e amiga Fernanda por ter me acompanhado nesse último ano, me aconselhando e abrindo meus caminhos.

A todos aqueles que acreditaram em mim e me deram todo apoio para chegar até aqui.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Pleuropneumonia suína e <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	3
2.2. Regulação da expressão gênica por pequenos RNAs mediada pela proteína Hfq .....	7
2.3. A chaperona de RNA: Hfq .....	8
3. HIPÓTESE .....	16
4. OBJETIVOS .....	16
4.1. Objetivo geral .....	16
4.2. Objetivos específicos .....	16
5. METODOLOGIA .....	17
5.1. Microrganismos, condições de cultivo e manutenção .....	17
5.2. Caracterização in silico da proteína Hfq de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	18
5.3. Obtenção da linhagem de <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipo 1 Shope 4074 (hfq::3XFLAG_cat) .....	19
5.4. Avaliação do crescimento das linhagens WT e hfq::3XFLAG de <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipos 1, 8 e 15 .....	21
5.5. Expressão da proteína Hfq em <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipos 1, 8 e 15 .....	22
5.5.1. Obtenção do extrato protéico e quantificação .....	22
5.5.2. SDS-PAGE e NuPAGE .....	23
5.5.3. Western Blotting .....	23
5.6. Análises estatísticas .....	24
6. RESULTADOS .....	25
6.1. Caracterização in silico da proteína Hfq de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	25
6.2. Obtenção da linhagem de <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipo 1 Shope 4074 (hfq::3XFLAG_cat) .....	31
6.3. Avaliação do crescimento das linhagens WT e hfq::3XFLAG de <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipos 1, 8 e 15 .....	32
6.4. Expressão da proteína Hfq por <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipos 1, 8 e 15 .....	35
7. DISCUSSÃO .....	41
8. CONCLUSÕES .....	47
9. REFERÊNCIAS .....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura cristalina do complexo Hfq/RydC.....	9
<b>Figura 2.</b> Dobramento e oligomerização do domínio LSm da proteína Hfq de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	10
<b>Figura 3.</b> Modelos de atividade da proteína Hfq.....	11
<b>Figura 4.</b> Plasmídeo utilizado na obtenção da linhagem <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> sorotipo 1 Shope 4074 hfq::3XFLAG_cat.....	19
<b>Figura 5.</b> Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Hfq nos diferentes sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	23
<b>Figura 6.</b> Estrutura tridimensional da proteína Hfq em <i>S. typhimurium</i> e <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	24
<b>Figura 7.</b> A proteína Hfq em diferentes espécies do gênero <i>Actinobacillus</i> .....	25
<b>Figura 8.</b> Alinhamento de sequências da proteína Hfq de diferentes famílias da classe Gammaproteobacteria.....	26
<b>Figura 9.</b> Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos da proteína Hfq de espécies das famílias Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae e Enterobacteriaceae.....	28
<b>Figura 10.</b> Confirmação da obtenção da linhagem de <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipo 1 hfq::3XFLAG_cat.....	29
<b>Figura 11.</b> Perfil do crescimento celular de <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipos 1, 8 e 15..	31
<b>Figura 12.</b> Expressão temporal e formas encontradas de Hfq em <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipo 1, 8 e 15.....	35
<b>Figura 13.</b> Expressão da proteína Hfq em <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipos 1, 8 e 15....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> utilizadas nesse estudo.....	16
<b>Tabela 2.</b> Número de acesso das sequências de aminoácidos correspondentes à proteína Hfq de diferentes espécies bacterianas utilizadas neste estudo.....	17
<b>Tabela 3.</b> Velocidade específica de crescimento de <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipos 1, 8 e 15.....	32

## RESUMO

SILVA, Thyara Ferreira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Caracterização e expressão da chaperona Hfq em *Actinobacillus pleuropneumoniae*, o agente causal da pleuropneumonia suína.** Orientadora: Denise Mara Soares Bazzoli. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira e Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Infecções que acometem o trato respiratório de suínos levam a significativas perdas econômicas na suinocultura mundial. Um dos principais patógenos respiratórios em suínos é a bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae*, o principal agente causal da pleuropneumonia. Atualmente podem ser encontrados 16 sorotipos de *A. pleuropneumoniae* com virulência distinta e complexa, sendo os principais fatores de virulência: exotoxinas Apx, lipopolissacarídeo (LPS), cápsula e a capacidade de formação de biofilme. O controle da doença é baseado no uso de antibióticos e cuidados no manejo da granja. A profilaxia pela imunização passiva ainda é ineficiente devido à dificuldade na obtenção de uma vacina contra todos os sorotipos encontrados. Assim, novas abordagens experimentais na elaboração de uma vacina eficiente associada a uma resposta imune protetora são essenciais porque podem representar novas alternativas na estratégia de controle da doença. A proteína Hfq é um componente central de regulação global pós-transcricional e participa diretamente na regulação da expressão de genes por facilitar a interação de RNAs pequenos com mRNAs alvos, sendo esta uma abordagem atual e relacionada ao controle da virulência em diversas bactérias patogênicas. Neste sentido, o estudo da chaperona de RNA Hfq é de extrema importância, uma vez que já foi demonstrado seu efeito pleiotrópico e impacto na virulência, na resposta a diferentes tipos de estresse e no crescimento celular de vários patógenos, incluindo *A. pleuropneumoniae*. Portanto, esse trabalho teve como objetivos: caracterizar *in silico* a proteína Hfq em *A. pleuropneumoniae* e analisar a expressão e a fase de maior abundância desta proteína ao longo do crescimento de *A. pleuropneumoniae*. As análises filogenéticas realizadas foram baseadas em análises de comparação de sequências de aminoácidos da proteína Hfq de diferentes membros da classe Gammaproteobacteria, na qual *A. pleuropneumoniae* está inserida. As demais análises foram conduzidas utilizando os sorotipos 1, 8 e 15 de *A. pleuropneumoniae*, sendo utilizadas as linhagens do tipo selvagem (WT) e hfq::3XFLAG. O alinhamento de sequências da proteína Hfq revelou uma identidade de 98% entre as proteínas Hfq de *A.*

pleuropneumoniae de diferentes sorotipos, além de demonstrar que Hfq de espécies de uma mesma família possuem maior relação filogenética. A análise da estrutura tridimensional da proteína em *A. pleuropneumoniae* demonstrou a presença de estruturas características da proteína presente em outros patógenos Gram-negativos, como uma  $\alpha$ -hélice e folhas  $\beta$ . A análise da velocidade específica de crescimento por ANOVA entre as linhagens WT e hfq::3XFLAG do mesmo sorotipo revelou que não há diferença de crescimento entre essas linhagens do mesmo sorotipo. Quanto à expressão de Hfq, foi detectado um maior acúmulo da proteína na fase estacionária de crescimento, no período de 6-8 horas, dependendo do sorotipo investigado, e que a expressão de Hfq foi diferencial entre os sorotipos analisados. Esses resultados revelaram que a proteína Hfq é conservada entre os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e possui estrutura tridimensional característica. Além disso, a inserção da etiqueta FLAG em Hfq não alterou o perfil de crescimento celular e há um maior acúmulo da proteína na fase estacionária de crescimento, sendo que os sorotipos apresentaram distribuição das formas diferencial entre os sorotipos e dinâmica de acordo com a fase de crescimento. Essa diferença pode estar relacionada aos diferentes perfis de virulência e de resposta a diferentes condições investigadas previamente, uma vez que a abundância nestes sorotipos apresentou distribuição temporal distinta.

## ABSTRACT

SILVA, Thyara Ferreira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Characterization and expression of the RNA chaperone Hfq in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia.** Adviser: Denise Mara Soares Bazzolli. Co-advisers: Leandro Licursi de Oliveira and Andrea de Oliveira Barros Ribon.

Infections that affect the respiratory tract of pigs lead to significant economic losses in the swine industry worldwide. One of the major respiratory pathogen in pigs is the bacterium *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the main causal agent of the pleuropneumonia. Currently, 16 serotypes can be found of *A. pleuropneumoniae* with distinct and complex virulence, with the main factors of virulence: exotoxin Apx, lipopolysaccharide (LPS), capsule and the biofilm formation capacity. Control of the disease is based on the use of antibiotics and care in the management of the farm. Prophylaxis by passive immunization is still inefficient because of the difficulty in getting a vaccine against all serotypes found. Thus, new experimental approaches in the development of an effective vaccine associated with a protective immune response are essential because they can represent new alternatives in the disease control strategy. The Hfq protein is a key component of the global post-transcriptional regulation and directly participates in the regulation of gene expression to facilitate the interaction of small RNAs with target mRNAs, which is a current approach and it relates to the control of virulence in many pathogenic bacteria. In this sense, the study of Hfq RNA chaperone is of extreme importance, since it has already demonstrated its pleiotropic effect and impact on virulence in response to different types of stress and cellular growth of various pathogens, including *A. pleuropneumoniae*. Therefore, this study aimed: to characterize in silico the Hfq protein in *A. pleuropneumoniae* and to analyze the expression and phase greater abundance of this protein throughout the growth of *A. pleuropneumoniae*. The phylogenetic analyzes were based on comparative analysis of amino acid sequences of protein Hfq of different members of the class Gammaproteobacteria, which *A. pleuropneumoniae* is inserted. The other analyzes were conducted using the serotypes 1, 8 and 15 of *A. pleuropneumoniae*, being used strains of wild-type (WT) and hfq::3XFLAG. The sequence alignment of Hfq protein sequences showed an identity of 98% between Hfq proteins of *A. pleuropneumoniae* of different serotypes, also demonstrating that Hfq species of the same family have a greater

phylogenetic relationship. The analysis of the three-dimensional structure of the protein in *A. pleuropneumoniae* demonstrated the presence of specific structures of protein present in other Gram-negative pathogens, how one  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -strands. The analysis of the specific growth rate by ANOVA between strains WT and hfq::3XFLAG of the same serotype showed that there is no difference in growth between the strains. As the expression of Hfq, a greater accumulation of protein in the stationary growth phase was detected in the period of 6-8 hours, depending on the serotype investigated, and the expression of Hfq was differential between serotypes analyzed. These results demonstrate that Hfq is conserved among serotypes of *A. pleuropneumoniae* and has a three-dimensional structure conserved. Moreover, the insertion of the FLAG tag on Hfq did not affect the cell growth profile and there is a greater accumulation of the protein in the stationary phase of growth, whereas serotypes showed the distribution of forms differential between serotypes and dynamically according to the growth stage. This difference may be related to different profiles of virulence and response to different conditions previously investigated, since these abundant serotypes showed distinct temporal distribution.

## 1. INTRODUÇÃO

A pleuropneumonia suína, causada pela bactéria Gram-negativa *A. pleuropneumoniae*, é uma das principais doenças respiratórias e está associada a significativas perdas econômicas na suinocultura em todo o mundo. A *pleuropneumoniae* pode ser encontrada na cavidade nasal e tonsilas de animais saudáveis, porém quando colonizam os pulmões podem levar a uma pleuropneumonia fibrinosa aguda, denominada pleuropneumonia suína. Essa bactéria apresenta vários fatores de virulência, como as toxinas Apx da família RTX, lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares, produção de biofilme e sistemas de captação de nutrientes, como sideróforos de ferro. Esses fatores favorecem a colonização e a persistência da bactéria durante a infecção.

O controle da pleuropneumonia baseia-se em terapia antimicrobiana e vacinação. O uso de antimicrobianos pode controlar a mortalidade de animais infectados em surtos de pleuropneumonia, porém, não controla a forma crônica, além de levar à resistência do patógeno a antibióticos comumente empregados em campo. A vacinação, portanto, é o método mais eficiente, entretanto, não existe nenhuma vacina comercial eficiente contra todos os sorotipos atualmente encontrados. Então, diferentes estratégias têm sido usadas com o intuito de se desenvolver alternativas profiláticas eficientes, e para isso estudos que envolvam análises de novos genes/proteínas relevantes na fisiologia, regulação e virulência da bactéria, podem contribuir no entendimento e representar um ponto de partida para a descoberta de novas alternativas de controle da pleuropneumonia suína.

Neste sentido, uma nova classe de reguladores, os pequenos RNAs reguladores (sRNAs), tem recebido grande atenção nos estudos atuais, sendo considerados potenciais alvos no combate a doenças infecciosas, no intermédio da modulação da patogenicidade ou da resposta inflamatória do hospedeiro. sRNAs são reguladores da expressão gênica, que modulam o nível da expressão de genes alvos, podendo permitir a regulação precisa do gene e adaptação rápida da fisiologia celular em resposta a mudanças específicas do ambiente. Atualmente, é claro o envolvimento dessas moléculas em vários níveis de regulação, como na formação de biofilme, na interação patógeno-hospedeiro e na evasão em relação ao sistema imune do hospedeiro. Concomitantemente ao grande número de estudos envolvendo sRNAs, há também um

grande interesse relacionado com a chaperona de RNA, a proteína Hfq, que é essencial à atividade de muitos sRNAs.

A proteína Hfq é um componente central de regulação global pós-transcricional, que participa diretamente na regulação da expressão de genes por facilitar interação de sRNAs específicos com mRNA alvo. Essa interação pode bloquear ou favorecer a tradução ou levar à degradação do mRNA alvo e de alguns sRNAs. Além disso, a própria Hfq pode proteger o sRNA de ribonucleases e levar a poliadenilação do mRNA, marcando-o para degradação. A interação entre sRNA, mRNA alvo e Hfq forma um complexo que age diretamente na regulação da expressão de genes alvos e estudos já demonstraram seu envolvimento na virulência de muitas bactérias patogênicas. Em diferentes bactérias patogênicas, mutantes hfq já foram descritos exibindo efeitos pleiotrópicos, incluindo atenuação na virulência e redução à sensibilidade a diferentes condições de estresse.

Diante do impacto financeiro da pleuropneumonia suína em todo o mundo e das informações em torno da regulação gênica mediada por Hfq citadas anteriormente, tem-se estimulado o estudo desta proteína em *A. pleuropneumoniae*, uma vez que não existem informações sobre esta proteína em qualquer patógeno respiratório de suínos, especificamente da família Pasteurellaceae, e esta proteína representa um importante fator de virulência em *A. pleuropneumoniae*, uma vez que mutantes hfq são completamente atenuados em um modelo alternativo *Galleria mellonella* e no hospedeiro natural, o porco. A ampliação do conhecimento a respeito da proteína Hfq em *A. pleuropneumoniae* pode representar uma contribuição na compreensão da virulência desta espécie.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Pleuropneumonia suína e *Actinobacillus pleuropneumoniae***

Atualmente, a carne suína é considerada a fonte proteica mais produzida e consumida em todo o mundo. Nesse cenário, a carne suína representa 40,41% da produção de carnes em todo o mundo, sendo também considerada a carne mais consumida em escala mundial (APS, 2015). O maior país produtor de carne suína é a China, sendo responsável por mais de 50% da produção, seguido pelos países da União Européia, Estados Unidos e Brasil. Apesar de ser o principal produtor, a China ocupa a quinta colocação no ranking de exportação mundial de carne suína, com o Brasil ocupando a quarta colocação (ABPA, 2015).

Nos últimos anos, houve um aumento nos estudos e investimentos na suinocultura brasileira, o que colaborou para aumentar o destaque do país no cenário mundial nesse setor (Rodrigues et al., 2009). Investimento na evolução genética para melhoramento da carne, sanidade, nutrição e bom manejo são aspectos importantes que contribuíram para a melhoria e aumento na produção e exportação de carne suína no Brasil (MAPA, 2015). A produção no país vem crescendo aproximadamente 4% ao ano, com Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul sendo os principais estados produtores, seguidos pelo Estado de Minas Gerais. As mesmas estimativas indicam que a produção de carne suína atinja uma média anual de 2,84% no período de 2008 a 2019 e que a exportação cresça de 10,1% em 2008 para 21% em 2019 (MAPA, 2015). Modelos de agropecuária intensiva são amplamente utilizados nesses sistemas, onde elevados investimentos tecnológicos têm resultado em altos índices de produtividade (Coelho et al., 2004). Por outro lado, este crescimento está associado ao fato de um maior número de animais permanecerem confinados em espaços reduzidos, o que favorece a disseminação de doenças infecciosas nos rebanhos (Menzel et al., 2014).

O elevado número de doenças do trato respiratório leva a expressivas perdas econômicas na suinocultura, o que promove altos índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo (de Jong et al., 2014; Menzel et al., 2014). Os principais patógenos que causam doenças respiratórias são membros da família Pasteurellaceae, como *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus parasuis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*, além da bactéria *Streptococcus suis*, que apesar de

não ser membro dessa família é também um importante patógeno das vias respiratórias de suínos (de Jong et al., 2014). Alguns vírus como o Influenza A e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) e a bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* também estão relacionados com doenças respiratórias em suínos que causam grandes perdas econômicas (Renukaradhya et al., 2015; Garcia-Morante et al., 2016).

A pleuropneumonia suína (PPS) é uma patologia endêmica considerada uma das mais importantes doenças respiratórias que acomete suínos (Wang et al., 2015). Essa doença afeta suínos de todas as idades e é caracterizada por broncopneumonia necrosante fibrino-hemorrágica e pleurite fibrinosa, e geralmente leva à morte do animal (Chiers et al., 2010). A doença pode ocorrer na forma superaguda, aguda e crônica, dependendo da imunidade do hospedeiro, do número de células que atinge o trato respiratório e da virulência do agente causal da infecção (Hensel et al., 1993; Bossé et al., 2002). Na forma superaguda, a infecção ocorre de forma rápida e agressiva, sendo que nesses casos o animal já é encontrado morto e por muitas vezes com sangue na boca e nas narinas. Na forma aguda, os sinais mais evidentes são febre, dispneia, letargia, com tosse profunda e intensa dificuldade respiratória, o que ocasiona a cianose pela falta de oxigenação do órgão afetado (Brauer et al., 2012). Na forma crônica, que é caracterizada por animais portadores assintomáticos ou que sobreviveram à forma aguda, os animais apresentam sinais menos agressivos como desenvolvimento atrasado e acessos esporádicos de tosse ou não apresentam nenhum sintoma (Sorensen et al., 2006). Nesse último caso, o animal é considerado um portador assintomático da doença e representa um transmissor da mesma para os demais suínos do rebanho, seja por via aerógena ou por contato direto (Torremorell et al., 1997; Jobert et al., 2000).

O agente etiológico primário da PPS é a bactéria *A. pleuropneumoniae*, que pode ser isolada a partir de cavidades nasais, tonsilas, cavidade média do ouvido e de pulmões de suínos infectados. Essa bactéria é considerada um parasita obrigatório do trato respiratório de suínos e não possui outro hospedeiro natural conhecido, assim, não sobrevive por muito tempo fora de seu hospedeiro natural (Bossé et al., 2002). O patógeno, que atinge principalmente o trato respiratório inferior, é inalado na forma de aerossol e atinge o pulmão, onde ocorrerá a colonização e produção de toxinas que levam a danos graves no tecido, conduzindo à doença clínica e à possivelmente morte do animal (Chiers et al., 2010).

*Actinobacillus pleuropneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa, cocobacilo, capsulado e anaeróbia facultativa. De acordo com o requerimento de NAD, esse patógeno é dividido em dois biotipos (Taylor, 1999). O biotipo 1 requer NAD para crescimento, enquanto o biotipo 2 não requer NAD, uma vez que são capazes de sintetizá-lo na presença de precursores (Niven & Lévesque, 1988). Até pouco tempo, a espécie ainda era subdividida em 15 sorotipos baseados nos antígenos polissacarídicos da cápsula, no entanto atualmente foi identificado e reconhecido um novo sorotipo, totalizando 16 sorotipos diferentes. (Blackall et al., 2002; Sárközi et al., 2015). Essa bactéria apresenta distribuição mundial, com prevalência de certos sorotipos em determinadas regiões, por exemplo, os sorotipos 8 e 6 são normalmente encontrados na América do Norte, sendo que o sorotipo 8 é amplamente relatado no Reino Unido e no País de Gales, onde o sorotipo 3 é raramente encontrado (O'Neill et al., 2010; Gottschalk & Lacouture, 2012).

Vários fatores de virulência já foram descritos em *A. pleuropneumoniae*, como fatores envolvidos na colonização, aquisição de nutrientes, evasão do sistema imune e destruição do tecido do hospedeiro (Lone et al., 2009). A formação de biofilme e as proteínas de adesão estão envolvidos na colonização da bactéria. Fatores de virulência envolvidos na aquisição de nutrientes englobam sideróforos para a captação de ferro, captação de maltose, entre outros (Chiers et al., 2010; Lone et al., 2009). Exotoxinas formadoras de poros na membrana da célula do hospedeiro ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV são secretadas e estão envolvidas na indução de lesão no hospedeiro. Além disso, lipopolissacarídeos (LPS) de membrana externa da parede celular também têm potencial de causar dano em células do hospedeiro, contribuindo para a lesão no tecido ao ativar a produção de citocinas inflamatórias por células do sistema imune do hospedeiro por meio da ligação a receptores Toll-like (Pulendran et al., 2001). A presença da cápsula polissacarídica favorece a bactéria durante a infecção, exercendo propriedade antifagocítica (Chiers et al., 2010).

Apesar de todos os sorotipos serem capazes de causar doença, existem diferenças na virulência e portanto, na severidade da doença (Klitgaard et al., 2010). Essa variação pode estar relacionada com a produção de diferentes combinações das toxinas Apx e fatores como a quantidade de polissacarídeo de superfície, que podem influenciar até mesmo na virulência entre isolados do mesmo sorotipo (Haesebrouck et

al., 2004; Jacques et al., 2004; Giménez-Lirola et al., 2014). Os sorotipos mais virulentos 1, 5, 9 e 11 produzem as toxinas ApxI e ApxII. Já as toxinas ApxII e ApxIII são encontradas nos sorotipos 2, 3, 4, 6, 8 e 15, considerados de virulência moderada. Os demais sorotipos produzem a toxina ApxII (sorotipos 7, 12 e 13) ou a toxina ApxI (sorotipos 10 e 14). Os sorotipos 10, 13 e 14 são raramente isolados em casos clínicos, enquanto os sorotipos 7 e 12 são considerados de moderada virulência (Frey, 1995; Frey, 2003; Klitgaard et al., 2010). A toxina ApxIV é produzida por todos os sorotipos e é utilizada como um marcador para confirmar infecção por *A. pleuropneumoniae* (Schaller et al., 2001).

*Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 1 é considerado altamente virulento e está comumente envolvido em surtos severos da doença com lesões pulmonares graves e alta mortalidade (Frey, 1995; Gottschalk et al., 2012). Esse sorotipo é mais encontrado na América do Norte e Japão, onde leva a altos índices de perda econômica no setor, justamente por ser altamente virulento (Klitgaard et al., 2010). Apesar de produzirem lesões pulmonares similares às geradas por sorotipos mais virulentos e exibirem alta atividade citotóxica, bactérias do sorotipo 8 geralmente provocam menor mortalidade e são considerados menos virulentas, apresentando, entretanto, alta morbidade. Esse sorotipo é amplamente difundido no Reino Unido, América do Norte e na região sudeste do Brasil (O'Neill et al., 2010; Rossi et al., 2013). Casos de pleuropneumonia causados por *A. pleuropneumoniae* do sorotipo 15, considerado de virulência moderada a baixa, tiveram aumento recente no Japão, com aumento de aproximadamente 15% na mortalidade de suínos no país por esse sorotipo (Ito & Sueyoshi, 2015), que é o mais encontrado também na Austrália (Klitgaard et al., 2010).

*Actinobacillus pleuropneumoniae* apresenta uma resposta adequada e rápida a alterações ambientais, sendo, portanto, essencial para a sobrevivência da bactéria durante a colonização e a instalação da infecção (Li et al., 2015b). Embora alguns aspectos da patogenicidade possam ser explicados pela produção de toxinas e captação de ferro do hospedeiro, alguns fatores envolvidos com a sobrevivência da bactéria e sua multiplicação rápida ainda permanecem desconhecidos (Lone et al., 2009). A descoberta do envolvimento de uma nova classe de reguladores gênicos, os RNAs reguladores, juntamente com a atividade da chaperona de RNA Hfq, podem desvendar a

rápida e precisa resposta da bactéria frente às variações no hospedeiro (Vogel & Luisi, 2011).

## **2.2. Regulação da expressão gênica por pequenos RNAs mediada pela proteína Hfq**

As bactérias possuem inúmeros mecanismos de regulação da expressão gênica em resposta às variações do ambiente. De acordo com a mudança do meio em que a bactéria se encontra, a célula deve ser capaz de responder aos estímulos externos rapidamente, coordenando a expressão gênica com a necessidade da célula. Portanto, a rápida resposta celular, que é conseqüentemente orquestrada pela regulação da expressão gênica, possibilita que as bactérias “percebam” e respondam de acordo com a necessidade da célula no ambiente em que se encontram (Caswell et al., 2014). No caso de bactérias patogênicas, a expressão de genes envolvidos na virulência e resposta ao estresse deve ser extremamente regulada e direcionada, uma vez que é necessária uma interação precisa e rápida com o hospedeiro. Atualmente, é consenso que uma estratégia pela qual um patógeno bacteriano regula a expressão de seus genes é através do uso de pequenos RNAs reguladores (sRNA), que modulam a expressão de genes alvos por intermédio de uma variedade de mecanismos moleculares mediada por uma chaperona de RNA conhecida como Hfq (Papenfort & Vogel 2010; Caswell et al., 2014; Feliciano et al., 2016).

Os sRNAs envolvidos com virulência já foram descritos em diferentes patógenos bacterianos de interesse humano e animal (Reddy et al., 2012; Harris et al., 2013; Ortega et al., 2014; Khandige et al., 2015; Pitman & Cho, 2015). Essas moléculas estão envolvidas na captura e assimilação de nutrientes, na formação de biofilme, na comunicação célula-célula, na resposta a diferentes condições de estresse (limitação de nutrientes, temperatura, pH, dano oxidativo), além de estarem relacionadas com o estabelecimento da interação patógeno-hospedeiro (Gripenland et al., 2010; Ortega et al., 2014). Muitos desses sRNAs controlam a expressão de genes alvos por ligação a sequências complementares ou parcialmente complementares em mRNAs específicos, assim alterando a estabilidade e/ou tradução do mRNA (Storz et al., 2011).

A classe mais estudada de pequenos RNAs reguladores compreende os sRNAs trans, que possuem complementariedade limitada e se ligam a múltiplos alvos através de pequenas e imperfeitas interações entre bases (Gripenland et al., 2010). Nesse caso, os alvos são codificados em sítios diferentes no genoma, (Waters & Storz, 2009; Michaux et al., 2014). Geralmente, a função de sRNAs trans é altamente dependente de chaperonas de RNA, que facilitam as interações entre os RNAs, devido à complementariedade limitada entre o sRNA e o mRNA alvo (Beisel & Storz, 2010). A chaperona de RNA mais bem descrita atualmente é a proteína Hfq, que além de favorecer a interação entre RNAs também é responsável por promover a estabilidade e aumento da meia vida de sRNAs (Storz et al., 2011; Vogel & Luisi, 2011).

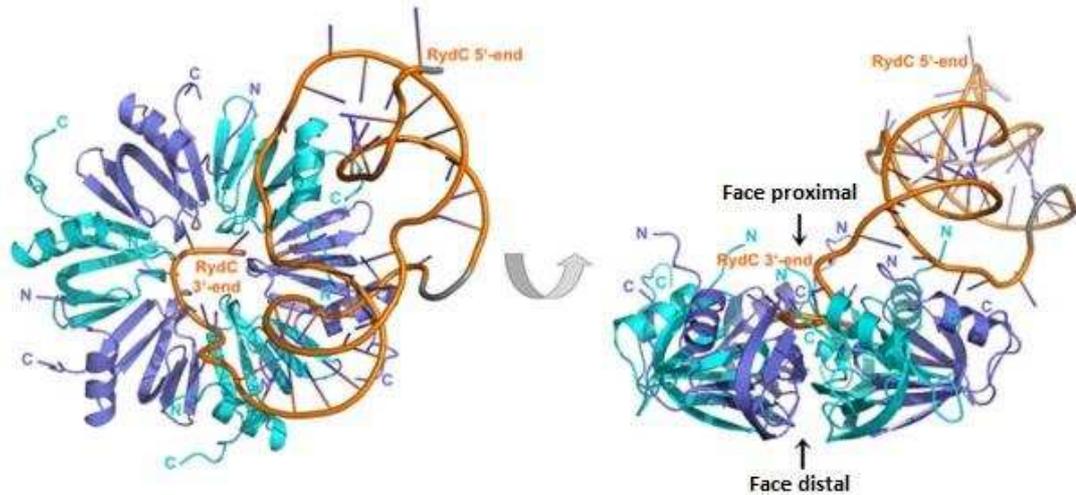
### **2.3. A chaperona de RNA: Hfq**

A proteína Hfq foi identificada pela primeira vez em 1972 como um fator do hospedeiro necessário para a replicação do fago Q $\beta$  em *Escherichia coli* (Franze de Fernandez et al., 1972). Nesse caso, Hfq liga-se à extremidade 3' rica em citosina da cadeia positiva do RNA viral, sendo requerida para o início da síntese da cadeia negativa do RNA viral (Franze de Fernandez et al., 1972; Miranda et al., 1997). O primeiro relato do efeito pleiotrópico dessa proteína foi observado com a construção de mutantes hfq em *E. coli*, que apresentou alterações fenotípicas como diminuição da taxa de crescimento, aumento do tamanho celular e sensibilidade à luz ultravioleta (Tsui et al., 1994). A partir da sequência primária de aminoácidos, estrutura e função, Hfq é considerada como pertencente à superfamília de proteínas (L)Sm, encontradas tanto em procariotos quanto em eucariotos (Mohanty et al., 2004; Scofield & Lynch, 2008). Além disso, foi também demonstrada sua participação na compactação do DNA como proteína de associação ao nucleóide (NAP) em bactérias (AliAzam et al., 1999).

A superfamília de proteínas (L)Sm engloba as proteínas Sm e Sm-like que são conhecidas como proteínas (L)Sm, sendo encontradas em todos os três domínios da vida (Sauer, 2013). Essas proteínas são caracterizadas pela presença de uma estrutura terciária denominada domínio LSm (Achsel et al., 2001). Em bactérias, a proteína Hfq é altamente conservada e amplamente distribuída entre as

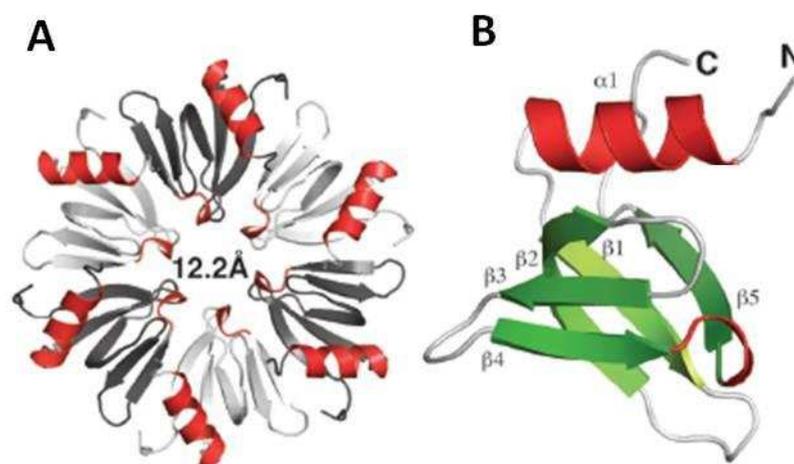
espécies, geralmente apresentando-se de forma hexamérica (Sauer, 2013). O domínio LSm é caracterizado por duas sequências conservadas conhecidas como Sm1 e Sm2 presentes na região N-terminal (NTR), sendo que a sequência Sm1 pode ser identificada em todas as proteínas (L)Sm, enquanto que Sm2 pode diferenciar entre as proteínas Hfq presentes em bactérias (Sauer, 2013). A sequência Sm1 compreende as três primeiras cadeias  $\beta$  e a sequência Sm2 abranje as cadeias  $\beta 4$  e  $\beta 5$ . A região NTR da proteína, que compreende aproximadamente o aminoácido 1 ao 72, é mais conservado entre as espécies e a região C-terminal (CTR) varia significativamente tanto na sequência de aminoácidos, quanto no tamanho (Arluison et al., 2002; Weichenrieder, 2014).

A região NTR apresenta dois sítios principais de ligação ao RNA que possuem preferências por sequências ricas em adeninas e uracilas. Esses sítios são conhecidos como distal e proximal e encontram-se em faces opostas da proteína (Figura 1) (Fortas et al., 2015). O sítio de ligação distal é conhecido por reconhecer e interagir com sequências ricas em adeninas e caudas poli-A presentes em extremidades 3', encontradas em mRNAs e intermediários de RNA para degradação, respectivamente. Já a face proximal liga-se preferencialmente às sequências internas ricas em uracilas e adeninas, relacionada com a interação com sRNAs (Link et al., 2009; Sauer, 2013). Portanto, Hfq providencia o pareamento de bases mRNA/sRNA pela interação de mRNAs na face distal e sRNAs na face proximal, favorecendo o contato entre essas moléculas (Sauer 2013; Weichenrieder, 2014). Um terceiro sítio de ligação ao RNA, chamado de sítio lateral, é importante para a atividade da proteína. No caso, essa região contribui na interação de sRNAs, permitindo a estabilidade do complexo (Sauer et al., 2012).



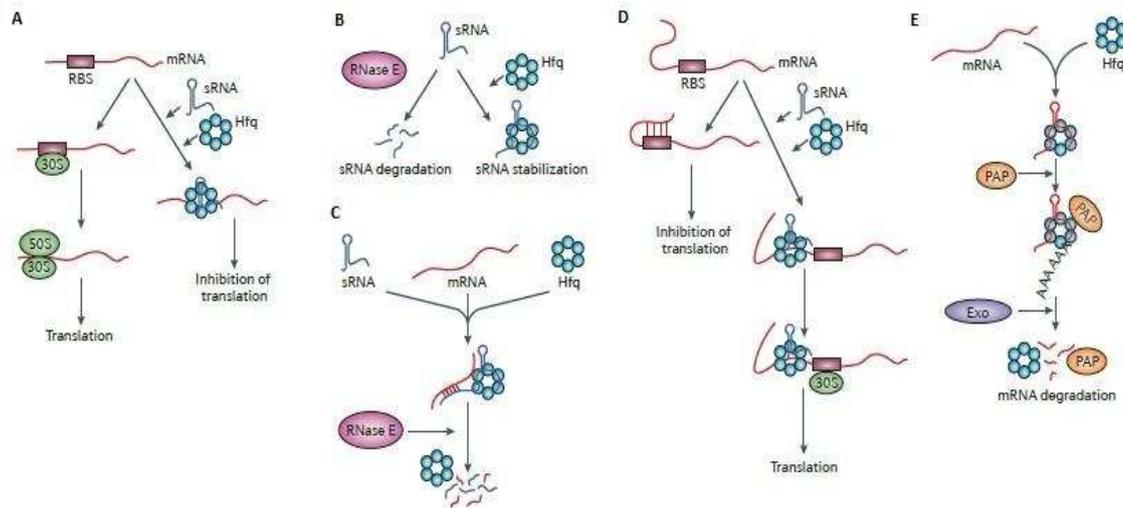
**Figura 1:** Estrutura cristalina do complexo Hfq/RydC. O sRNA RydC interage com Hfq na porção proximal da proteína através de interações com sequências internas ricas em uracilas e adeninas do sRNA. Fonte: Dimastrogiovanni et al., 2014.

Esses sítios de ligação presentes na proteína são formados pela região conservada NTR, com a região CTR estendendo-se para fora do core da proteína, de forma não estruturada (Beich-Frandsen et al., 2011). Essa região CTR, que ocupa cerca de 1/3 da proteína em *E. coli*, participa na formação do hexâmero e na estabilidade da proteína (Arluison et al., 2004; Vincent et al., 2012). Já sua relação na riborregulação ainda é controversa, uma vez que a falta de uma região CTR ainda permite a ligação de Hfq com alguns RNAs e medeia eficientemente a riborregulação. Entretanto, a falta de CTR pode afetar a regulação de outros sRNAs, uma vez que há presença de alguns resíduos dentro da CTR que interagem com alguns RNAs (Olsen et al., 2010; Salim et al., 2012). O modelo de Hfq está representado na Figura 2, tanto o domínio LS<sub>m</sub> da proteína, quanto sua forma oligomérica.



**Figura 2:** Dobramento e oligomerização do domínio LSm da proteína Hfq de *Salmonella typhimurium*. (A) Homohexâmero de Hfq, formado por interações entre as cadeias  $\beta 4$  e  $\beta 5$  de duas subunidades adjacentes, que permitem uma montagem polar com as porções N-terminais de cada monômero, localizadas na mesma face do oligômero. (B) Domínio LSm, presente em proteínas (L)Sm como Hfq, constituído por uma  $\alpha$ -hélice N-terminal ( $\alpha 1$ ), seguida de cinco cadeias  $\beta$  ( $\beta 1$ -5). Fonte: Weichenrieder, 2014.

A interação entre sRNA-mRNA alvo mediada por Hfq permite ou bloqueia o acesso do ribossomo ao sítio de ligação do ribossomo (RBS) ou o dúplice mRNA-sRNA pode ser marcado para a degradação (Chao & Vogel, 2010). Como pode ser observado na Figura 3, Hfq pode favorecer a ligação do sRNA na região 5'UTR (região não traduzida) do mRNA alvo bloqueando a tradução, ou essa ligação do sRNA na região 5'UTR pode desfazer estruturas secundárias que estão bloqueando RBS. Além disso, a ligação de Hfq com o sRNA pode protegê-lo da clivagem por ribonucleases, promover a clivagem de sRNAs e mRNAs alvos, ou estimular a poliadenilação de um mRNA, o que leva à degradação por uma exoribonuclease, sem o auxílio de sRNA (Vogel & Luisi, 2011).



**Figura 3:** Modelos de atividade da proteína Hfq. (A) A proteína Hfq favorece interação entre sRNA/mRNA alvo, sequestrando RBS e, assim, bloqueando a tradução. (B) Hfq fornece estabilidade ao sRNA, impedindo sua degradação por RNases. (C) Hfq favorece interação sRNA/mRNA alvo, direcionando ambos à degradação por RNase E. (D) Hfq permite a ocorrência da tradução por favorecer pareamento entre sRNA/mRNA, o que libera RBS e o acesso pelo ribossomo. (E) Hfq pode estimular a poliadenilação de mRNAs, direcionando-os para degradação. Fonte: Vogel & Luisi, 2011.

Muitas características estruturais da proteína Hfq já são bem definidas, como a formação de um anel homo-hexamérico, forma essa que exerce atividade durante processos celulares (Arluison et al., 2002; Vogel & Luisi, 2011). Estudos demonstraram que monômeros montam como hexâmeros em concentrações de 1  $\mu\text{M}$  de proteína, tornando-se muito estáveis acima dessas concentrações (Panja & Woodson, 2012). Além de formar hexâmeros, estruturas como multi-hexameros são encontradas quando há altas concentrações de proteína (aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ ), sendo que essa forma inibe sua atividade de ligação a RNAs (Lease & Woodson, 2004; Panja & Woodson, 2012).

Análises *in vitro* demonstraram que o hexâmero está em equilíbrio dinâmico com monômeros e com multi-hexameros em condições normais de crescimento (Panja & Woodson, 2012). Além disso, outros parâmetros demonstraram a ligação de Hfq a RNAs em concentrações menores das necessárias para a formação do hexâmetro, indicando a participação dos RNAs na montagem do oligômero, havendo ligação cooperativa (Panja & Woodson, 2012). Já na presença de altas concentrações de RNA como substrato, a formação de multi-hexameros é desfavorecida uma vez que Hfq interage mais fortemente com RNAs do que consigo mesma (Panja &

Woodson, 2012). Nesse caso, Hfq presumivelmente encontra-se ligada ao RNA ou ao nucleóide, o que favorece hexâmeros e desfavorece a formação de multi-hexâmeros (Fender et al., 2010; Panja & Woodson, 2012).

Além de sua função como chaperona de RNA, Hfq participa na compactação do DNA, juntamente com outras NAPs como Fis e HU (Talukder & Ishihama, 2015). Nesse caso, Hfq liga-se ao DNA com uma afinidade menor que com RNAs (Geinguenaud et al., 2011). Sua atuação baseia-se em sua atividade de ligação ao DNA, levando a curvaturas que favorecem a compactação e agindo, portanto, como um repressor global da transcrição para alguns genes. Essa curvatura ocorre de forma não específica de sequência (Ali Azam et al., 1999). Hfq apresenta dispersão heterogênea no nucleóide e estudos têm demonstrado a importância da proteína no metabolismo do DNA, gerando supercoiling negativo *in vivo*, ou exercendo papel na transcrição e replicação eventualmente em casos de transposição de elementos móveis (Jiang et al., 2015).

Já é bem descrita a importância de Hfq na resposta ao estresse, possuindo participação na regulação do gene *rpoS*, que codifica o fator sigma de fase estacionária ( $\sigma^S$ ) primário relacionado ao estresse (Soper & Woodson, 2008). Estudos já demonstraram a ausência do fator  $\sigma^S$  ou homólogos em *A. pleuropneumoniae* (Bossé et al., 2010). A expressão de *rpoS* é regulada pela formação de estruturas secundárias específicas (stem-loops) próximas ao sítio de início da tradução, bloqueando o acesso do ribossomo e, portanto, o início da tradução (Wang et al., 2011). Em situações de estresse, como por exemplo, em baixas temperaturas ou quando a célula atinge a fase estacionária, sRNAs como DsrA e RprA desfazem os loops que sequestram o sítio de início da tradução por pareamento de bases, permitindo o início da tradução do mRNA *rpoS*. O anelamento de DsrA e *rpoS*, por exemplo, requer o desenrolamento de stem-loops em ambos RNAs, o que é facilitado por Hfq. (Majdalani et al. 2001; Lease & Woodson, 2004). Além do fator  $\sigma^S$ , outros fatores sigma estão relacionados com a proteína Hfq, participando em processo da indução de estresse (Obregon et al., 2015).

O fator sigma relacionado com resposta ao estresse extra-citoplasmático ( $\sigma^E$ ) é induzido pelo acúmulo de proteínas de membrana mal dobradas no periplasma, atuando na manutenção da homeostase da célula (Li et al., 2015a). Essa ativação

ocorre através de cascatas proteolíticas que liberam o  $\sigma^E$  do fator anti-sigma RseA, que o sequestra na membrana interna da bactéria. Um  $\sigma^E$  livre liga-se ao core da RNA polimerase, reconhecendo promotores específicos no DNA e iniciando a transcrição (Osterberg et al., 2011). Em *E. coli*, mutantes hfq são deficientes na repressão da expressão de proteínas de membrana externa mediada por  $\sigma^E$  (Guisbert et al., 2007). Em *Salmonella*,  $\sigma^E$  é encontrado como regulador da expressão do gene hfq em condições de estresse. Além disso, foi mostrado que parte da regulação pós-transcricional mediada por  $\sigma^E$  é dependente de Hfq, com 20 a 30% dessa regulação sendo possivelmente resultado da atividade de Hfq (Li et al., 2015a). Bossé e colaboradores (2010) demonstraram que a formação de biofilme em *A. pleuropneumoniae* é regulada por  $\sigma^E$  e Hfq, onde Hfq reprime a expressão do operon pga relacionado com a formação de biofilme, em baixas concentrações de  $\sigma^E$ . Todos esses dados evidenciam a participação de Hfq na regulação por  $\sigma^E$  em diferentes condições.

Quanto a sua localização celular, aproximadamente 20% da proteína Hfq está associada ao nucleóide e o restante distribuída majoritariamente no citosol, com uma porção localizada próxima à membrana celular interna (Diestra et al., 2009; Jiang et al., 2015). Essa localização pode estar relacionada com a regulação da expressão de proteínas da membrana externa, durante a fase estacionária, onde ocorre uma alta concentração da proteína nessa região (Diestra et al., 2009). Hfq também aparece interagindo com outras proteínas como as ribossomais, supostamente associada com a maquinaria de tradução (Taluđer & Ishihama, 2015), com a RNA polimerase de *E. coli* (Sukhodolets & Garges, 2003) e com proteínas do citoesqueleto bacteriano, tendo envolvimento na regulação de proteínas de divisão celular (Zambrano et al., 2009).

Estudos sobre a concentração da proteína durante o crescimento celular são escassos. Kajitani e colaboradores (1994) demonstraram que há uma concentração entre 30000 a 60000 moléculas de Hfq por célula de *E. coli* e que a síntese da proteína é maior na fase exponencial do que na fase estacionária, com o aumento da proteína concomitante ao aumento na taxa de crescimento celular, sendo assim considerada uma proteína relacionada com o crescimento. Hfq ainda aparece exercendo sua própria regulação, sendo autorregulada em nível traducional, com a

própria Hfq ligando-se à região 5'UTR do mRNA hfq, inibindo a formação do complexo de início da tradução (Vecerek et al., 2005). Outra característica da proteína Hfq é sua capacidade de ciclagem com sRNAs (Wagner, 2013). No caso, a ligação Hfq/sRNA é forte e Hfq pode ligar-se a vários sRNAs diferentes e, concomitantemente, com taxas de dissociação muito lentas. Na medida que a célula necessita, um determinado sRNA aumenta sua concentração, o que pode sobrecarregar o sRNA que estava saturando Hfq anteriormente, e liberando o sítio de ligação para o próximo (Fender et al., 2010; Wagner, 2013).

Essas informações entre outras em torno da importância e papel de Hfq em *A. pleuropneumoniae* ainda permanecem indefinidas. Nesse sentido, estudos relacionados com a expressão de Hfq em *A. pleuropneumoniae* fazem-se necessários para entender o envolvimento desta proteína na regulação da expressão gênica nesse patógeno, e como esse aspecto pode estar relacionado com a virulência na bactéria, uma vez que já se sabe que a deficiência da mesma causa atenuação da virulência de *A. pleuropneumoniae* em um modelo alternativo (Pereira et al., 2015) e no hospedeiro natural (Zhou et al., 2008). Neste sentido, a abundância desta proteína nos diferentes sorotipos pode ajudar a explicar a diferença de virulência que não pode ser explicada somente pela produção de toxinas.

### **3. HIPÓTESE**

A expressão da proteína Hfq em *A. pleuropneumoniae* é diferencial de acordo com a fase de crescimento celular e é distinta entre os sorotipos deste patógeno.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo geral**

Investigar as características estruturais e a expressão da proteína Hfq em diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar in silico a proteína Hfq em *A. pleuropneumoniae*.
- Investigar a relação filogenética entre proteínas Hfq de famílias da classe Gammaproteobacteria.
- Obter uma linhagem de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 que expresse a proteína Hfq::3XFLAG.
- Comparar o crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15 linhagens selvagens e hfq::3XFLAG.
- Avaliar a expressão da proteína Hfq::3XFLAG ao longo do crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15.

## 5. METODOLOGIA

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, BIOAGRO, Departamento de Microbiologia na Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais.

### 5.1 Microrganismos, condições de cultivo e manutenção

As linhagens de *A. pleuropneumoniae* (Tabela 1) foram cultivadas em caldo/ágar infusão de cérebro e coração (Becton Dickinson (BD), São Paulo/SP - Brasil) suplementado com 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (BHI/NAD). As células foram cultivadas em placa contendo ágar BHI/NAD por 24 horas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram coletadas e suspensas em caldo BHI com 25% de glicerol e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para manutenção. A linhagem competente de *E. coli* DH5 $\alpha$  foi cultivada em caldo/ágar Luria Bertani (LB) (Himedia, Mumbai - Índia). As células foram cultivadas pelo crescimento em placa por 24 horas em ágar LB a 37 °C ou caldo LB por 24 horas sob agitação a 150 rpm a 37 °C. Em algumas condições, o antibiótico cloranfenicol foi utilizado na concentração de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Linhagens WT e hfq::3XFLAG de todos os sorotipos foram doadas pelo Professor Paul R. Langford - Imperial College/ London, exceto a linhagem hfq::3XFLAG\_cat sorotipo 1 que foi obtida nesse estudo.

**Tabela 1:** Linhagens de *A. pleuropneumoniae* utilizadas nesse estudo.

LINHAGENS	CARACTERÍSTICAS
<b>Sorotipo 1:</b> Shope 4074 (WT)	Linhagem referência do sorotipo 1 tipo selvagem
<b>Sorotipo 1:</b> Shope 4074 (hfq::3XFLAG_cat)	Linhagem contendo o cassete hfq marcado com a etiqueta 3XFLAG na região 3' e o gene (cat) que confere resistência à cloranfenicol.
<b>Sorotipo 8:</b> MIDG_2331 (WT)	Isolado clínico do sorotipo 8 tipo selvagem proveniente do Reino Unido.
<b>Sorotipo 8:</b> MIDG_2331 (hfq::3XFLAG)	Isolado clínico do sorotipo 8 com gene hfq marcado com a etiqueta 3XFLAG na região 3' do gene e livre de marcadores de seleção.
<b>Sorotipo 15:</b> HS143 (WT)	Linhagem referência do sorotipo 15 tipo selvagem
<b>Sorotipo 15:</b> HS143 (hfq::3XFLAG)	Linhagem referência do sorotipo 15 com gene hfq marcado com a etiqueta 3XFLAG na região 3' do gene.

## 5.2. Caracterização in silico da proteína Hfq de *A. pleuropneumoniae*

As sequências de aminoácidos correspondentes à proteína Hfq utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e os respectivos números de acesso estão dispostos na Tabela 2. As espécies utilizadas nas comparações filogenéticas são pertencentes às famílias Pasteurellaceae, Enterobacteriaceae e Vibrionaceae, sendo estas da classe Gammaproteobacteria, filo Proteobacteria. A escolha destas espécies está associada à relação filogenética entre elas, de acordo com a sequência de aminoácidos da proteína Hfq. Para as análises filogenéticas as sequências foram alinhadas utilizando o software MEGA6 (Tamura et al., 2013), a partir do ClustalW e a matriz Blossum (Thompson et al., 2002). A árvore de máxima verossimilhança foi gerada utilizando software MEGA6 e a significância foi acessada pelo método de bootstrap com 1000 repetições. A estrutura tridimensional da proteína Hfq de *A. pleuropneumoniae* predita nesse trabalho foi analisada pelo portal web Phyre2 para modelagem de proteínas, predição e análises (Kelley et al., 2015).

**Tabela 2:** Número de acesso das sequências de aminoácidos correspondentes à proteína Hfq de diferentes espécies bacterianas utilizadas neste estudo.

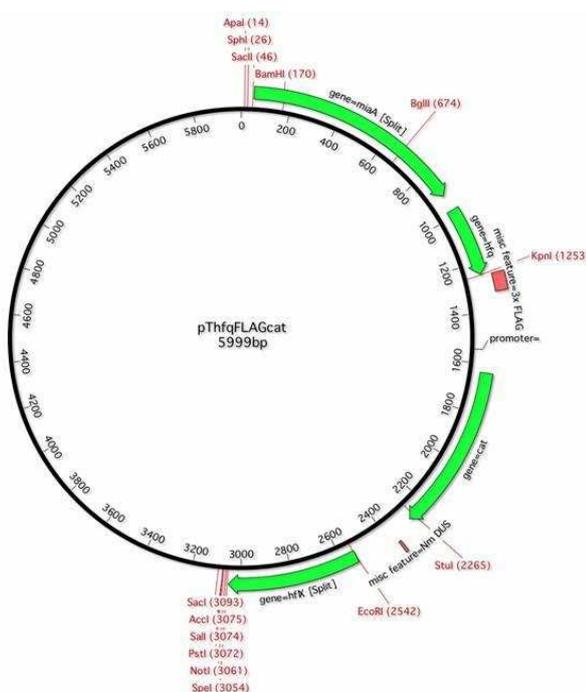
Família	Espécie	Código de acesso
Pasteurellaceae	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 1 str. 4074	EFM84424.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 2 str. 4226	EFM86688.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 3 str. JL03	ABY70553.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 4 str. M62	EFM88885.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 5 str. L20	ABN75035.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 6 str. Femo	EFL80970.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 7 str. AP76	ACE62701.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 8 MIDG 2331	CUU53407.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 8 str. 460	KIE88186.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 8 str. 518	KIE87989.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 8 str. 597	KIE94744.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 8 str. 780	KIE95015.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 8 str. 1022	KIE87793.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 8 str. 5651	KIE94049.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 9 str. CVJ13261	EFM93142.1

	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 10 str. D13039	EFM95360.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 11 str. 56153	EFM97466.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 12 str. 1096	EFM99672.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 13 str. N273	EFN01748.1
	<i>A. pleuropneumoniae</i> sor. 15 str. HS143	Não depositada
	<i>A. minor</i> str. 202	EEF15979.1
	<i>A. suis</i> str. ATCC 33415	AIJ31755.1
	<i>A. succinogenes</i> str. 130Z	ABR74355.1
Pasteurellaceae	<i>A. equuli</i>	WP_039197845.1
	<i>A. capsulatus</i>	WP_018650831.1
	<i>A. ureae</i>	WP_044024495.1
	<i>Haemophilus influenzae</i> str. 86-028NP	AAX87465.1
	<i>Pasteurella multocida</i>	AAQ13916.1
	<i>Mannheimia haemolytica</i> str. M42548	AGK00743.1
	<i>Aggregatibacter segnis</i> str. ATCC 33393	EFU68022.1
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> str. ATCC 33392	KFL98932.1
	<i>Escherichia coli</i> str. F11	EDV64841.1
	<i>Salmonella enterica</i> sor. Typhimurium	AJG36529.1
	<i>Yersinia pestis</i> KIM D27	EFA48356.1
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella pneumoniae</i> str. Kb140	EYB77682.1
	<i>Enterobacter aerogenes</i> str. EA1509E	CCG32177.1
	<i>Proteus vulgaris</i>	KGA55981.1
	<i>Shigella dysenteriae</i> str. 1012	EDX33268.1
	<i>Vibrio cholerae</i> str. V52	KNH48641.1
	<i>Aliivibrio wodanis</i>	CED70371.1
Vibrionaceae	<i>Listonella anguillarum</i> str. M3	AGU58663.1
	<i>Aliivibrio salmonicida</i> str. LFI1238	CAQ80461.1
	<i>Photobacterium phosphoreum</i> str. ANT-2200	CEO40488.1
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> str. RIMD 2210633	NP_799196.1

### 5.3. Obtenção da linhagem de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 Shope 4074 (hfq::3XFLAG\_cat)

A linhagem de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 Shope 4074 hfq::3XFLAG\_cat foi obtida de acordo com a metodologia proposta por Bossé e colaboradores (2014). No entanto, diferente das demais linhagens usadas neste trabalho, a transformação natural foi conduzida com um cassete contendo o gene hfq em fase com uma etiqueta 3XFLAG seguida de um gene que codifica resistência a cloranfenicol (gene cat) (Figura 4). Inicialmente, o plasmídeo pThfq\_FLAG\_cat foi usado para transformar *E. coli* DH5α e

os recombinantes foram selecionados em meio LB contendo 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloranfenicol. O plasmídeo foi obtido a partir do uso do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison/Wisconsin - USA), posteriormente linearizado com a endonuclease de restrição NotI (Roche, São Paulo/ SP - Brasil) e então 1 $\mu\text{g}$  de DNA linear foi usado para transformar naturalmente *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 linhagem referência Shope 4074, de acordo com as recomendações de Bossé e colaboradores (2014). A seleção dos transformantes de *A. pleuropneumoniae* foi feita em ágar BHI/NAD e cloranfenicol 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Figura 4:** Plasmídeo utilizado na obtenção da linhagem *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 Shope 4074 hfq::3XFLAG\_cat. O plasmídeo apresenta o gene hfq com uma cauda 3XFLAG inserida na região CTR do gene, em fase com um gene cat. A imagem foi gerada pelo software MacVector, 2013.

Para confirmar o sucesso da transformação, a técnica de PCR de colônia foi empregada utilizando primers específicos para os genes cat (confirmação da transformação) e apxIV (confirmação da espécie) que correspondem aos genes que conferem resistência a cloranfenicol e à toxina ApxIV, respectivamente. Os primers utilizados foram: cat\_f (5'GGT ACA AGC GGT CGG CAA TAG TTA CC3'), cat\_r (5'GGA AGT GCG GTA TGC CGT AAC3'), apxIV\_do (5'GAA TTC ACC TGA GTG

CTC ACC ACC3'), apxIV\_up (5'GAC GTA ACT CGG TGA TTG AT3'). Colônias transformantes obtidas a partir de ágar BHI/NAD - cloranfenicol 1 µg.mL<sup>-1</sup> foram suspensas em água padrão biologia molecular e submetidas a 96 °C por 10 minutos. A PCR foi realizada utilizando 1,25 U de DNA polimerase GoTaq (Promega, Madison/Wisconsin - USA) em volume final de 25 µL de reação, contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer (cat\_r/cat\_f ou apxIV\_up/apxIV\_do) e 5 µL da cultura fervida. Os ciclos empregados na técnica de PCR de colônia foram: Desnaturação inicial 94 °C por 3 minutos, anelamento dos primers a 60 °C (para apxIV) e 56 °C (para cat) por 45 segundos e um número de 35 ciclos com extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. Os amplicons obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os seguintes controles experimentais foram usados na PCR: DNA genômico de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 tipo selvagem (controle negativo), DNA genômico de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 Shope 4074 Δhfq::catsacB que possui o gene cat no genoma (controle positivo) e uma reação sem DNA (branco). Para reação de PCR para o gene apxIV foram utilizados os seguintes controles: DNA genômico de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 tipo selvagem (controle positivo), DNA total de *A. pleuropneumoniae* linhagem referência HS143 sorotipo 15 (controle positivo), DNA genômico de *E. coli* DH5α (controle negativo) e reação sem DNA (branco). Em todo o procedimento, as mesmas colônias foram utilizadas em todas as reações. Dentro da célula, esse plasmídeo linearizado sofrerá recombinação homóloga, permitindo a inserção do gene hfq contendo a etiqueta 3XFLAG em sua região C-terminal no genoma. Nesse caso, se não houver recombinação, o cassete será degradado, não sendo possível sua replicação autônoma dentro da célula.

#### **5.4. Avaliação do crescimento das linhagens WT e hfq::3XFLAG de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15**

As linhagens WT e hfq::3XFLAG correspondentes aos sorotipos 1, 8 e 15 foram cultivadas inicialmente em ágar BHI/NAD a 37 °C / CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas, para obtenção da massa celular utilizada nos experimentos. As colônias foram ressuspensas em PBS – Phosphate Buffer Saline (P4417 - Sigma-Aldrich, São Paulo/ SP - Brasil) com densidade óptica a 600 nm inicial de 0,1 e foram inoculadas em 100 mL de caldo BHI/NAD. A cultura foi mantida a 37 °C e em constante agitação de 150

rpm por 12 horas. O crescimento foi monitorado por medida da turbidez no aparelho Ultrospec 10 (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo/ SP - Brasil) sob comprimento de onda de 600 nm. Nas primeiras 5 horas, o crescimento foi investigado a cada 30 minutos e nas 7 horas restantes de 1 em 1 hora. Com o uso de aparato especializado, os sistemas permaneceram fechados e foi retirado apenas 1 mL de amostra/tempo, o que permitiu a manutenção das condições de crescimento e evitou possíveis contaminações. Esse procedimento foi realizado com réplicas experimentais e em triplicata biológica.

### **5.5. Expressão da proteína Hfq em *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15**

Os níveis intracelulares de Hfq foram determinados utilizando as linhagens hfq::3XFLAG de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15 em diferentes fases de crescimento em meio BHI/NAD a 37 °C, de acordo com as curvas obtidas no item 5.4. Colônias correspondentes às linhagens hfq::3XFLAG de cada sorotipo foram cultivadas por 24 horas em placas de ágar BHI/NAD e foram inoculadas em 50 mL de meio BHI/NAD, com densidade óptica inicial de 0,1. A cultura foi mantida a 37 °C e em constante rotação de 150 rpm por 12 horas. Em tempos determinados (1, 2, 3, 4, 6, 8 e 12 horas), alíquotas da cultura foram removidas para avaliação da abundância de Hfq por Western Blotting (descrito no item 5.5.3.). Por essa técnica foi possível determinar a concentração de Hfq nas diferentes fases de crescimento e o período de crescimento onde houve maior acúmulo da proteína. Para a detecção da proteína Hfq nesta análise, foi utilizado o anticorpo monoclonal ANTI-FLAG M2 (F1804- Sigma-Aldrich, São Paulo/ SP - Brasil).

#### **5.5.1. Obtenção do extrato protéico e quantificação**

As células cultivadas nas condições pré-determinadas anteriormente foram recolhidas por centrifugação a 9000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 9000 x g por 20 minutos. Após lavagem, foi adicionado 1 mL de tampão de lise (Tris 20mM e EDTA 1mM, pH 7,4), as células foram homogeneizadas manualmente e transferidas para tubos contendo beads (Matrix B – MpBio, Park Hilton/ Derby – United Kingdom), que foram levadas a homogeneizador Precellys 24 (Precellys, San Mateo/ Califórnia - USA) por 30 segundos a 4000 rpm. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e mantido a -80 °C até o momento de uso.

Para quantificação protéica de cada extrato, foi utilizado o método de Bradford (Bio-Rad, Hercules/ Califórnia – USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma curva com albumina soro bovino (BSA) (A4503 - Sigma-Aldrich, São Paulo/ SP - Brasil) foi utilizada para obtenção da curva padrão no comprimento de onda de 595 nm.

### **5.5.2. SDS-PAGE e NuPAGE**

Após quantificação, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Para análises comparativas de expressão de Hfq, foram usados 10 µg dos extratos protéicos totais dos sorotipos analisados correspondentes a cada tempo investigado. Às amostras (10 µg) foram adicionados tampão de amostra [52,5% água deionizada, 12,5% de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 10% glicerol, 20% SDS (10%) e 5% de azul de bromofenol (1%)] 4x, fervidos por 10 minutos e aplicadas em gel desnaturante SDS-PAGE 12% de 1 mm de espessura com empilhamento de 4%, preparado de acordo com Sambrook & Russel (2001). A corrida eletroforética foi conduzida a uma voltagem constante de 120V por 1 hora e 30 minutos em um sistema mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules/ Califórnia – USA). Após a corrida, os géis foram corados com solução Coomassie (0,50 g de coomassie, 180 mL de metanol e 20 mL de ácido acético) e descorado com solução descorante (ácido acético 8% e etanol 25%). Nesse caso, o gel apresenta SDS, além do tampão de corrida e de amostra, fornecendo assim uma condição desnaturante durante a separação das proteínas. Para análises de expressão de Hfq, 10 µg dos extratos proteicos totais de cada tempo dos sorotipos analisados foram separados em sistema de gel semi-desnaturante NuPAGE Bolt 4-12% Bis-Tris Plus (BG04120BOX – Thermo Fisher Scientific, Carlsbad/ Califórnia - USA), utilizando o aparato Bolt Mini Gel Tank (B4477599 - Thermo Fisher Scientific, Carlsbad/ Califórnia - USA), seguindo as instruções do fabricante. Nesse caso, o gel não possui SDS e apenas o tampão de corrida e de amostra que possuem, assim fornecendo uma condição semi-desnaturante durante a separação das proteínas. Em ambos os casos, foi utilizado o marcador pré-corado SeeBlue Plus2 (LC5925 - Thermo Fisher Scientific, Carlsbad/ Califórnia - USA).

### **5.5.3. Western Blotting**

A partir do extrato proteico total, foi avaliada a expressão da proteína Hfq::3XFLAG durante o crescimento celular de cada sorotipo analisado e foi comparada a expressão de Hfq::3XFLAG entre os sorotipos em condições desnaturantes

foi realizada. Após separação das proteínas por NuPAGE ou SDS-PAGE, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose iBlot 2 NC Regular Stacks (IB23001 - Thermo Fisher Scientific, Carlsbad/ Califórnia - USA), utilizando o sistema iBlot 2 de transferência semi-seca (IB21001 - Thermo Fisher Scientific, Carlsbad/ Califórnia - USA), seguindo as instruções do fabricante. Seguido à transferência, a membrana foi bloqueada com solução de BSA 3% por 10 horas. Após bloqueio, a membrana foi tratada com anticorpo primário monoclonal ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 (F1804 - Sigma-Aldrich, São Paulo/ SP - Brasil) por 45 minutos sob agitação leve, em temperatura ambiente. A membrana foi lavada com TBS – Tris-buffered saline (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) três vezes por 5 minutos e incubada com anticorpo secundário Anti-Mouse IgG peroxidase (A9044 - Sigma-Aldrich, São Paulo/ SP - Brasil) por 45 minutos sob leve agitação, em temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes em TBS com TWEEN 20 0,05% por 5 minutos e revelada utilizando reagente de detecção Amersham ECL (RPN2209 - GE Healthcare, São Paulo/ SP - Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

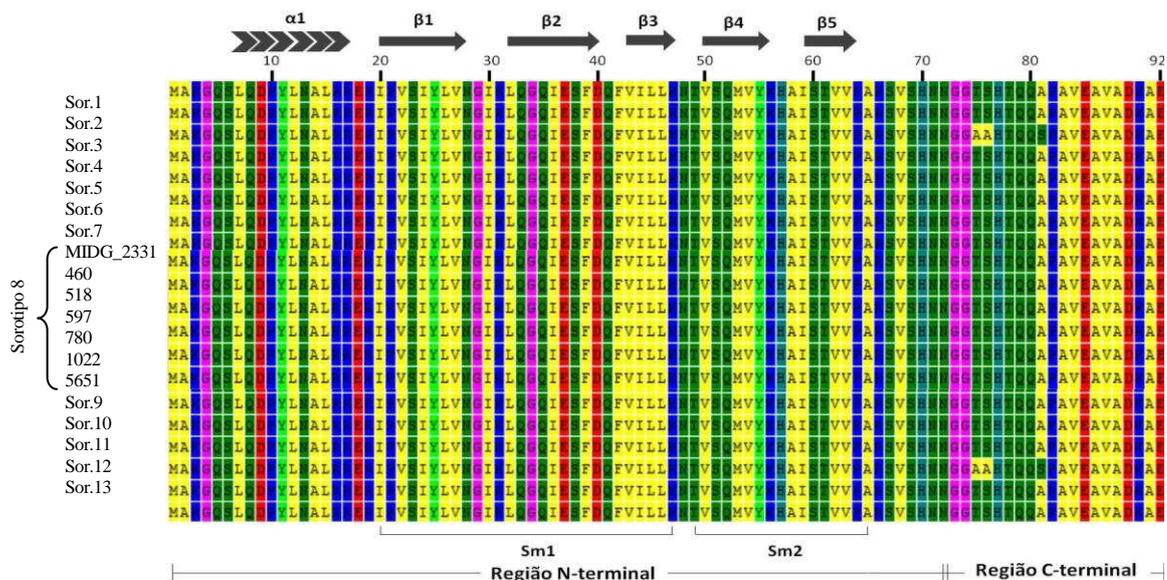
## **5.6. Análises estatísticas**

Para analisar o crescimento celular das linhagens WT e hfq::3XFLAG a média do coeficiente angular da equação da regressão linear, obtida a partir da fase exponencial das curvas de crescimento, foi expressa como velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e analisadas quanto à similaridade por ANOVA com nível de significância de 5%. A massa molecular do monômero e do oligômero de Hfq foi estimada com base na migração da mobilidade relativa da proteína em gel de poliacrilamida em condições semi-desnaturantes. A equação de regressão foi construída com base nas proteínas do padrão de massa molecular SeeBlue Plus2 (LC5925 - Thermo Fisher Scientific, Carlsbad/ Califórnia - USA). A densidade das bandas obtidas foi analisada pelo software Image J (Schneider et al., 2012), que permitiu a quantificação relativa do acúmulo da proteína Hfq em cada tempo de crescimento investigado.

## **6. RESULTADOS**

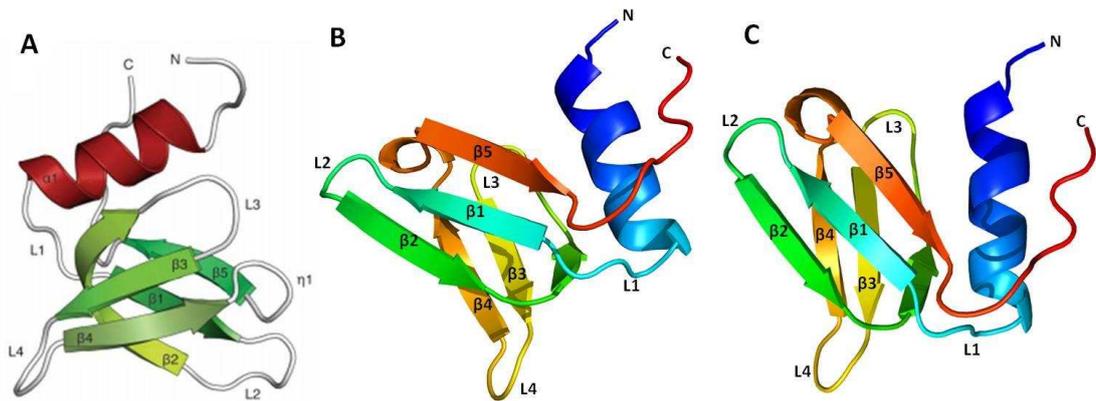
### **6.1. Caracterização in silico da proteína Hfq de *A. pleuropneumoniae***

A proteína Hfq de todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* apresenta 92 aminoácidos, ponto isoelétrico de 9,6 e massa molecular de aproximadamente 12 kDa, com os domínios Sm1 e Sm2 específicos da família desta proteína abrangendo uma porção de aproximadamente 70 aminoácidos da proteína. Por intermédio de análises comparativas entre os sorotipos e entre diferentes linhagens de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8, a partir de alinhamentos múltiplos de sequências utilizando software MEGA6 e ClustalW, pôde-se confirmar, como esperado, uma conservação de 98% em todo o alinhamento da sequência de Hfq entre os sorotipos e identidade de 100% entre as linhagens do sorotipo 8 (Figura 5). Esse resultado já era esperado, uma vez que são isolados do mesmo sorotipo, diferenciando apenas em aspectos fisiológicos e no padrão de virulência. Os sorotipos 1, 8 e 15 utilizados nesse trabalho apresentam 100% de identidade na sequência de aminoácidos e, portanto, possuem a proteína Hfq idêntica. Portanto, pode-se afirmar que a proteína é conservada entre os sorotipos da bactéria e entre diferentes isolados de um mesmo sorotipo de *A. pleuropneumoniae*.



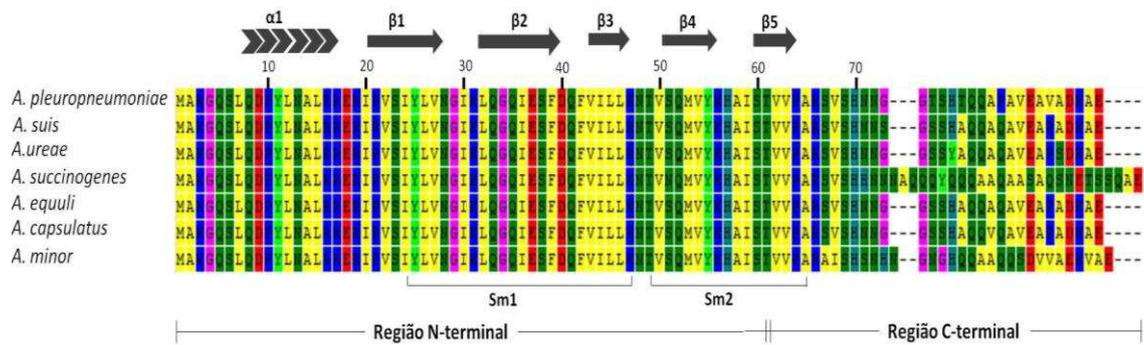
**Figura 5:** Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Hfq nos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. As posições são coloridas de acordo com o esquema de cores MEGA6/Clustal: glicinas são rosa; prolinas e aminoácidos polares positivos azuis; aminoácidos hidrofílicos em amarelo; aromáticos em verde fluorescente e ciano; polares negativos em vermelho; e polares neutros em verde. As estruturas secundárias retratadas correspondem áquelas observadas na estrutura cristalina de Hfq de *E. coli* (Sauter et al., 2003) com folhas  $\beta$  representadas como seta para a direita e  $\alpha$ -hélice como divisas para a direita. NTR e CTR estão representados na porção inferior da imagem, bem como os domínios Sm1 e Sm2. Os domínios e regiões de Hfq foram preditos pelo portal web Phyre 2.

A análise da estrutura tridimensional do monômero da proteína Hfq em *A. pleuropneumoniae* confirmou a presença do dobramento conservado composto por uma  $\alpha$ -hélice N-terminal seguida por cinco cadeias  $\beta$ , sendo os elementos da estrutura secundária separadas por cinco estruturas secundárias do tipo loops, e estes de tamanhos variados como já encontrado para outros micro-organismos como *Salmonella Typhimurium* (Figura 6). A região CTR variável é desordenada e estende-se para fora da estrutura. Analisando a estrutura da proteína Hfq com a calda 3XFLAG inserida em sua região CTR, pode-se notar que essa inserção não alterou a conformação da proteína. As substituições aparentes nos aminoácidos 75 e 76 de Hfq dos sorotipos 3 e 12 apresentados na Figura 3 não influenciaram na conformação da proteína, quando analisadas as respectivas estruturas tridimensionais (dados não mostrados). É importante ressaltar que a estrutura tridimensional predita para *Salmonella Typhimurium* (Sauer, 2013) foi obtida através de análises cristalográficas e que a estrutura obtida para *A. pleuropneumoniae* no presente trabalho foi predita por ferramenta baseada na web para prever e analisar a estrutura.



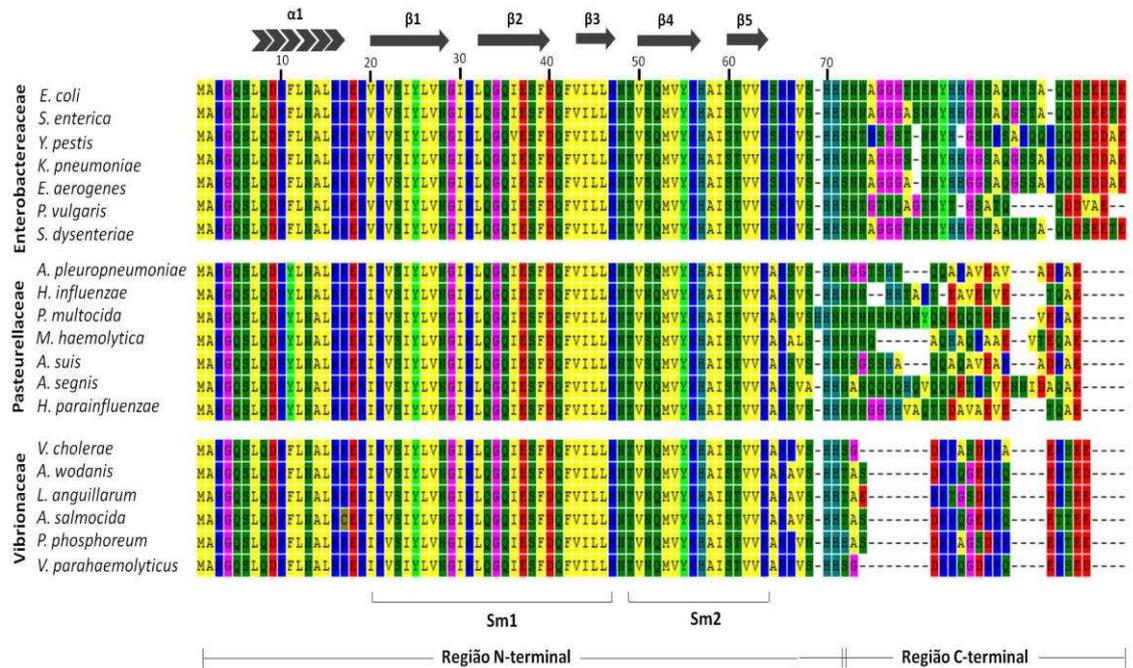
**Figura 6:** Estrutura tridimensional da proteína Hfq em *Salmonella Typhimurium* e *A. pleuropneumoniae*. (A) Estrutura tridimensional do monômero de *Salmonella Typhimurium* (Sauer, 2013). (B e C) Estrutura tridimensional predita do monômero de Hfq em *A. pleuropneumoniae* sem inserção de cauda 3XFLAG (B) e com cauda 3XFLAG inserida na região CTR (C). Domínio LSm, presente em proteínas (L)Sm como Hfq, constituído por uma  $\alpha$ -hélice N-terminal ( $\alpha 1$ ), seguida de cinco cadeias  $\beta$  ( $\beta 1$ -5), com os elementos de estrutura secundária separados por cinco loops de tamanhos variados (L1-5). Estruturas preditas pelo portal web Phyre2.

Nas diferentes espécies do gênero *Actinobacillus*, a proteína Hfq apresenta uma NTR conservada, sendo que as espécies apresentaram divergências significativas na região CTR da proteína (Figura 7). Nesta análise, foi possível verificar que *Actinobacillus succinogenes*, além de apresentar variação de sequência na região CTR, apresentou também uma sequência maior, com 99 aminoácidos, diferente das outras espécies que apresentam uma proteína Hfq de 92 aminoácidos. Essas espécies possuem hospedeiros variados e esse fator pode estar relacionado com a diferença na região CTR em número e composição. Diante dessa diversidade de hospedeiros e funções, quanto mais distante a espécie, maior é a variação na CTR, considerando que a NTR seja conservada entre os organismos.



**Figura 7:** A proteína Hfq em diferentes espécies do gênero *Actinobacillus*. As posições são coloridas de acordo com o esquema de cores MEGA6/Clustal: glicinas são rosa; prolinas e aminoácidos polares positivos azuis; aminoácidos hidrofílicos em amarelo; aromáticos em verde fluorescente e ciano; polares negativos em vermelho; e polares neutros em verde. As estruturas secundárias retratadas correspondem àquelas observadas na estrutura cristalina de Hfq de *E. coli* (Sauter et al., 2003) com folhas  $\beta$  representadas como seta para a direita e  $\alpha$ -hélice como divisas para a direita. NTR e CTR estão representados na porção inferior da imagem, bem como os domínios Sm1 e Sm2. Os domínios e regiões de Hfq foram preditos pelo portal web Phyre 2.

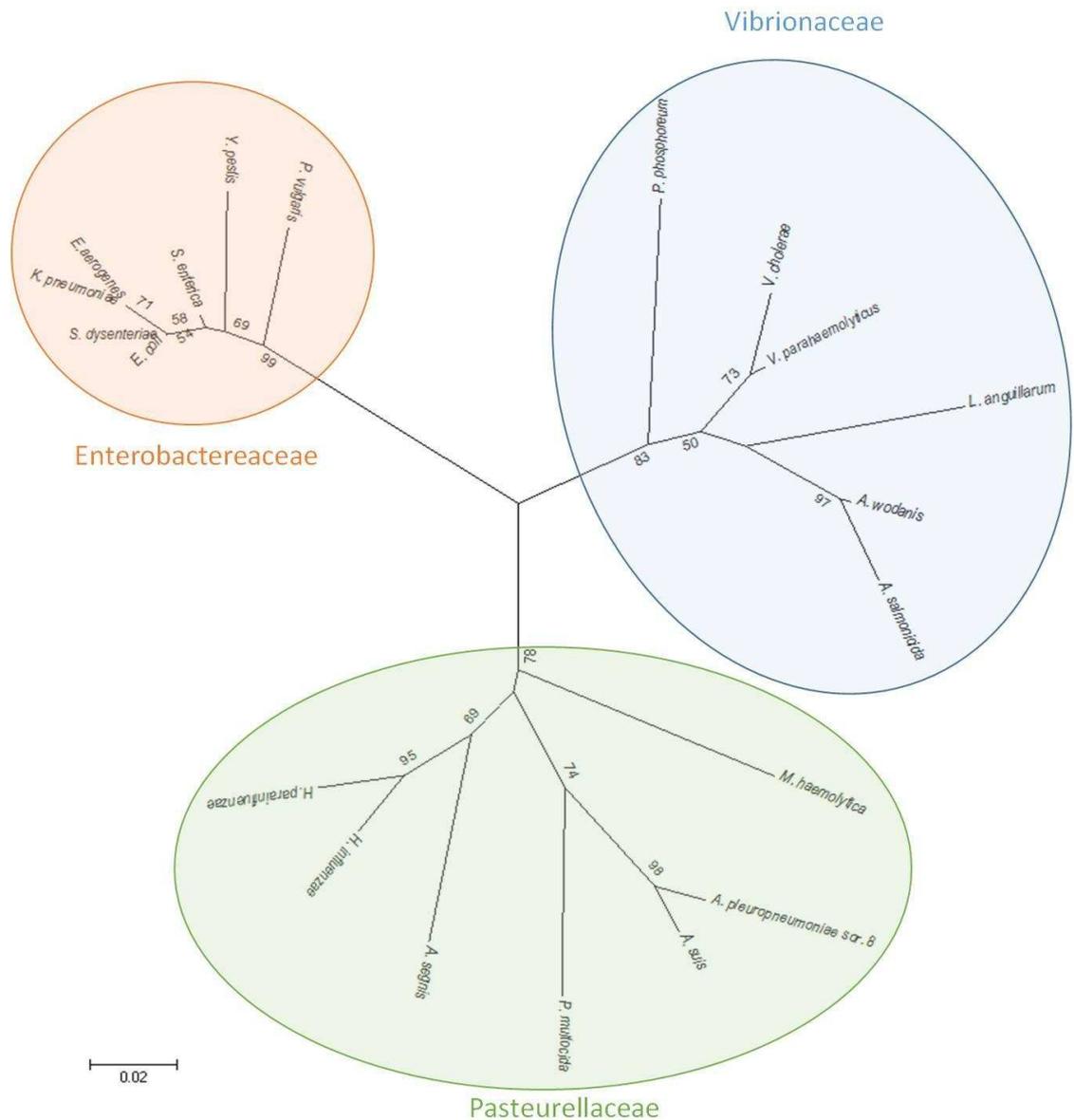
As seqüências de aminoácidos da proteína Hfq de espécies de interesse médico e veterinário da classe Gammaproteobacteria foram analisadas, e como esperado, foi verificada uma alta identidade/similaridade de aminoácidos na região NTR (Figura 8). Comparando-se as seqüências de Hfq de *A. pleuropneumoniae*, *E. coli* e *Vibrio cholerae*, 68 aminoácidos da região NTR foram idênticos, no entanto estas seqüências apresentam diferentes tamanhos, sendo a proteína Hfq de *E. coli* com 102 aminoácidos, a de *V. cholerae* com 87 aminoácidos e como apresentado anteriormente a de *A. pleuropneumoniae* com 92 aminoácidos. Como descrito na literatura, houve variações importantes na região CTR, tanto na composição quanto na extensão. Quando foi comparada a variação de aminoácidos e extensão da CTR dentro da mesma família, a diferença foi pequena. Esse resultado já era esperado uma vez que NTR engloba a região de atividade da proteína (domínios Sm1 e Sm2) e a região CTR muito variável, embora não se tenha um consenso sobre a sua função, esta pode ser espécie específica e regular a função da proteína.



**Figura 8:** Alinhamento de seqüências da proteína Hfq de diferentes famílias da classe Gammaproteobacteria. As posições são coloridas de acordo com o esquema de cores MEGA6/Clustal: glicinas são rosa; prolínas e aminoácidos polares positivos azuis; aminoácidos hidrofílicos em amarelo; aromáticos em verde fluorescente e ciano; polares negativos em vermelho; e polares neutros em verde. As estruturas secundárias retratadas correspondem áquelas observadas na estrutura cristalina de Hfq de *E. coli* (Sauter et al., 2003) com folhas  $\beta$  representadas como seta para a direita e  $\alpha$ -hélice como divisas para a direita. NTR e CTR estão representados na porção inferior da imagem, bem como os domínios Sm1 e Sm2. Os domínios e regiões de Hfq foram preditos pelo portal web Phyre 2.

A análise filogenética mostra a relação entre Hfq de membros da família Pasteurellaceae com espécies de outras famílias da classe Gammaproteobacteria, baseado na seqüência de aminoácidos de Hfq. A árvore apresentada na Figura 9 mostra a presença de um ancestral comum entre as espécies e que as proteínas Hfq alinhadas agrupam de acordo com a família, por exemplo, Hfq de *A. pleuropneumoniae* agrupa com Hfq de outras espécies da família Pasteurellaceae ou *E. coli* agrupa com outras espécies da família Enterobacteriaceae. A maioria das espécies analisadas da família Vibrionaceae se agrupou de acordo com seu hospedeiro. Patógenos humanos como *Vibrio parahemolyticus* e *V. cholerae* irradiaram do mesmo ramo da árvore, assim como os patógenos de vertebrados aquáticos *Aliivibrio wodanis* e *Aeromonas salmonicida*. Esse perfil se repete com as espécies da família Pasteurellaceae, com espécies patogênicas de suínos, como *A. pleuropneumoniae* e *A. suis*, dispersando do mesmo ponto, e patógenos humanos como *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus*

parainfluenzae se agrupando no mesmo clado. As espécies patogênicas em humanos da família Enterobacteriaceae apresentaram uma proximidade maior, com as ramificações mais estreitas, mostrando que provavelmente as características de Hfq dessas espécies são mais próximas. Além dessas características, espécies da família Vibrionaceae se agruparam mais próximas da família Pasteurellaceae, o que indica uma maior similaridade entre a proteína desses patógenos destas famílias.

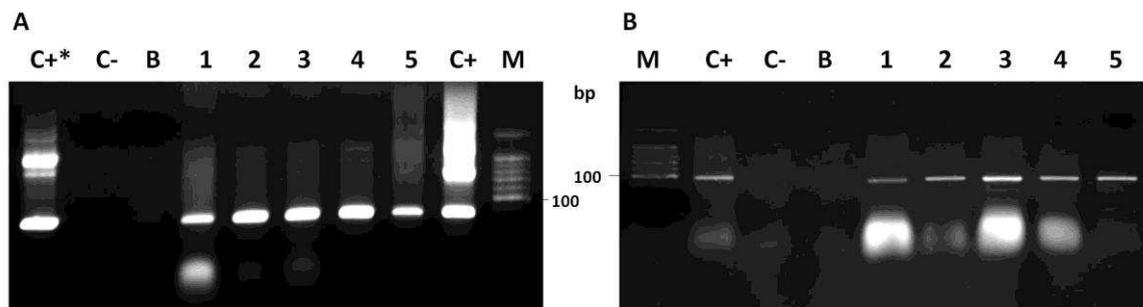


**Figura 9:** Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos da proteína Hfq de espécies das famílias Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae e Enterobacteriaceae. A árvore foi obtida a partir do software MEGA6 com significância acessada pelo método de bootstrap com 1000 repetições. Os números indicam a porcentagem de suporte, mas somente aqueles iguais ou superiores a 50%. As sequências utilizadas nesta análise estão listadas na Tabela 2.

## **6.2. Obtenção da linhagem de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 Shope 4074 (hfq::3XFLAG\_cat)**

A análise da expressão de proteínas de interesse é muito utilizada em estudos na busca do entendimento de mecanismos reguladores, ação e comportamento de determinada molécula no metabolismo celular. Uma forma de analisar a expressão de proteínas é utilizando técnicas de DNA recombinante, inserindo marcações na proteína de interesse para detecção, expressão e purificação da proteína recombinante. Nosso estudo teve como foco analisar a expressão de Hfq em três sorotipos diferentes: sorotipo 1, 8 e 15. O sorotipo 1, tido como altamente virulento, sorotipo 15, considerado de virulência moderada a baixa e o sorotipo 8 com virulência moderada e com predominância nas granjas de Minas Gerais, Brasil e no Reino Unido.

Em estudo anterior realizado pela professora Denise Mara Soares Bazzolli, obtiveram-se os recombinantes da proteína Hfq com a etiqueta 3XFLAG para os sorotipos 8 e 15, estes livres de marcadores de seleção, obtidos de acordo com a metodologia proposta por Bossé e colaboradores (2014). Para análise comparativa dos três sorotipos, fez-se necessária a obtenção de recombinante hfq::3XFLAG do sorotipo 1. Nesse trabalho, a transformação natural do sorotipo 1 Shope (WT) foi realizada, obtendo-se uma colônia transformante em ágar BHI/NAD com cloranfenicol  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo esta confirmada por PCR a partir da detecção dos amplicons correspondentes aos genes *cat*, presente no cassete inserido, e *apxIV*, presente no genoma de *A. pleuropneumoniae*, que expressam resistência a cloranfenicol e toxina ApxIV, respectivamente (Figura 10).



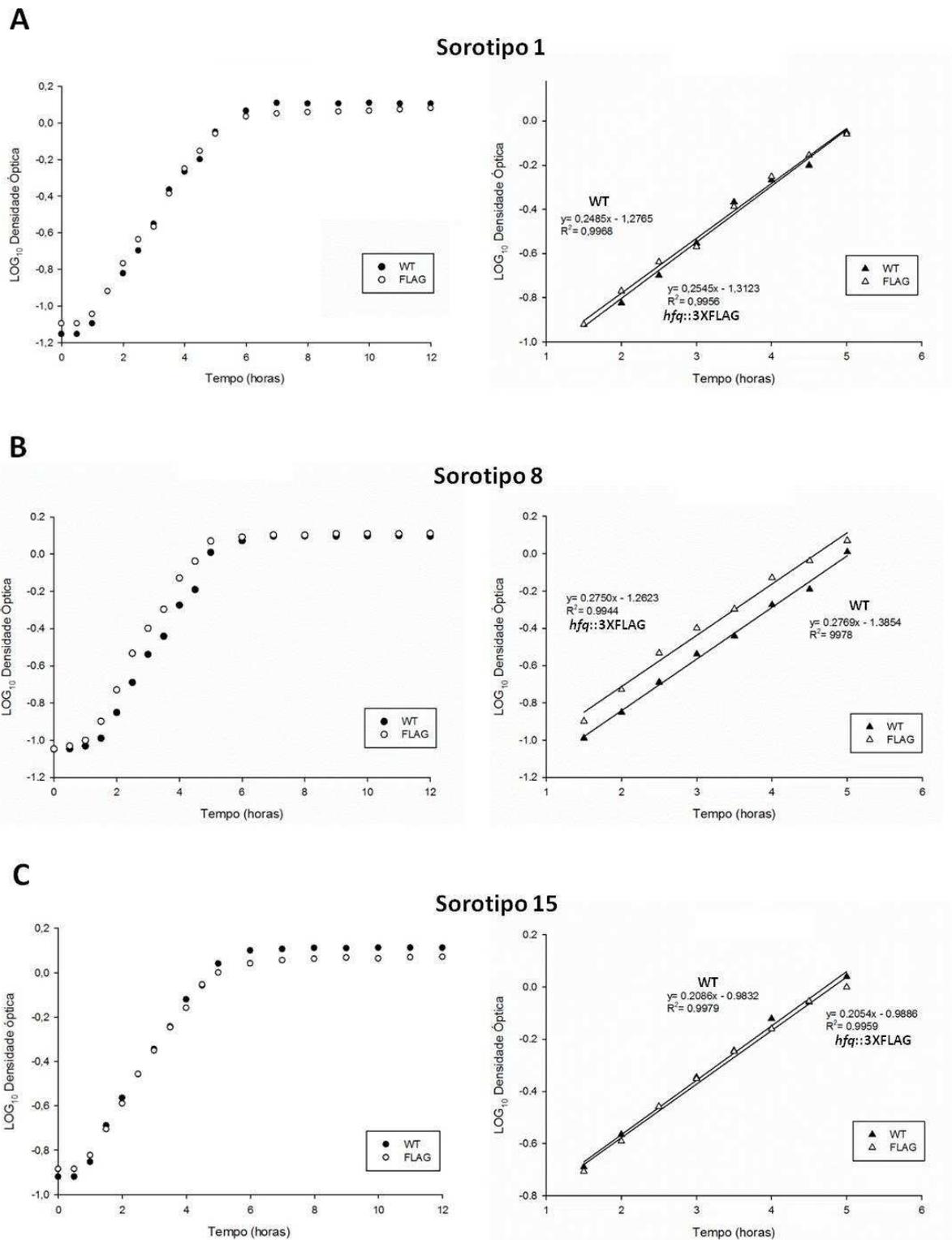
**Figura 10:** Confirmação da obtenção da linhagem de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 hfq::3XFLAG\_cat. **(A)** PCR de colônia utilizando os primers apxIV\_up e apxIV\_down para a toxina ApxIV. M: marcador 100 bp DNA Ladder (Promega), C+\*: controle positivo: DNA genômico de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 tipo selvagem e DNA total de *A. pleuropneumoniae* linhagem referência HS143 sorotipo 15, C-: controle negativo: DNA genômico de *E. coli* DH5 $\alpha$  e B: branco: reação sem DNA. **(B)** PCR de colônia utilizando os primers cat\_F e cat\_R. M: marcador 100bp DNA Ladder (Promega), C+ controle positivo: DNA genômico de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 Shope 4074  $\Delta$ hfq::catsacB que possui o gene cat no genoma, C- DNA genômico de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 tipo selvagem, B branco: reação sem DNA. 1-5 (ambas reações): diferentes colônias.

### 6.3. Avaliação do crescimento das linhagens WT e hfq::3XFLAG de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15

Neste estudo o crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15 linhagens selvagem (WT) e hfq::3XFLAG foi investigado, com o intuito de: i) investigar se a inserção da cauda FLAG influenciava no perfil de crescimento celular, quando comparado à linhagem WT dos sorotipos analisados e ii) investigar a expressão da proteína Hfq nos sorotipos 1, 8 e 15 e constatar se há diferença no perfil e no acúmulo de Hfq nesses sorotipos. Todas as linhagens recombinantes analisadas neste trabalho apresentam a cauda 3XFLAG inserida na extremidade carboxi-terminal da proteína Hfq (MAKGQSLQDPYLNALRRERIPVSIYLVN GIKLQGQIESFDQFVILLKNTVSQMVKHAISTVVPARVSHNNGGTSHTQQAP AVEAVADKAGTDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK), inserida após o último códon da ORF e é finalizada com o mesmo códon de parada usado para a finalização da tradução desta proteína nos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* investigados.

Como pode ser visualizado nas Figuras 11 e Tabela 3, todos os sorotipos investigados não apresentaram diferenças significantes em relação ao perfil de crescimento e à velocidade de crescimento quando comparadas as linhagens WT e

hfq::3XFLAG do mesmo sorotipo (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Quando comparada a velocidade específica de crescimento por ANOVA entre linhagens WT dos diferentes sorotipos e linhagens hfq::3XFLAG dos diferentes sorotipos, encontra-se um  $p < 0,05$ , indicando que o cada sorotipo apresenta uma velocidade de crescimento específica diferente, embora sem diferenças entre as linhagens WT e hfq::3XFLAG do mesmo sorotipo.



**Figura 11:** Perfil do crescimento celular de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15. As linhagens WT e *hfg::3XFLAG* correspondentes aos sorotipos 1 (A), sorotipo 8 (B) e sorotipo 15 (C) de *A. pleuropneumoniae* foram cultivadas por 12 horas em meio BHI/NAD a 150 rpm/37 °C. As figuras à esquerda representam a curva de crescimento em log da densidade óptica de células e à direita as velocidades específicas de crescimento de cada sorotipo, representadas pelo coeficiente angular da equação da regressão linear.

Apesar dos sorotipos apresentarem velocidades específicas de crescimento distintas entre si, o perfil do crescimento celular foi similar. As linhagens apresentaram uma fase lag de crescimento, uma fase log, onde pode-se determinar a velocidade específica de crescimento e fase estacionária. Essas duas últimas fases citadas ainda estão divididas em inicial, intermediária e tardia, de acordo com uma curva de crescimento bacteriana típica em um sistema fechado (Figura 11).

**Tabela 3:** Velocidade específica de crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15. Valores da velocidade específica de crescimento dos sorotipos analisados, obtidos a partir de três réplicas biológicas.

	Velocidade específica de crescimento (h <sup>-1</sup> )					
	Sorotipo 1		Sorotipo 8		Sorotipo 15	
	WT	hfq::3XFLAG	WT	hfq::3XFLAG	WT	hfq::3XFLAG
<b>Réplica 1</b>	0,2523	0,2554	0,277	0,2783	0,2046	0,2094
<b>Réplica 2</b>	0,2604	0,2565	0,2765	0,2732	0,2084	0,2132
<b>Réplica 3</b>	0,251	0,2336	0,2773	0,2734	0,2128	0,1936
<b>Média</b>	<b>0,2545</b>	<b>0,2485</b>	<b>0,2769</b>	<b>0,275</b>	<b>0,2066</b>	<b>0,2054</b>

#### 6.4. Expressão da proteína Hfq por *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15

A proteína Hfq, como descrito anteriormente, participa efetivamente da regulação da expressão gênica. Portanto, muito se sabe sobre sua estrutura, composição, atividade e expressão nos diferentes organismos. Entretanto, pouco se sabe sobre Hfq em *A. pleuropneumoniae* e sua respectiva expressão nesta bactéria. Com o objetivo de elucidar o perfil da expressão da proteína Hfq durante o crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15 a técnica de Western Blotting foi empregada.

Desta forma, as linhagens hfq::3XFLAG do sorotipo 1, 8 e 15, que foram cultivadas por 12 horas, e os extratos proteicos intracelulares correspondentes a cada fase de crescimento foram obtidos. As proteínas totais foram separadas em sistema de gel NuPAGE (Life Technologies) em condições semi-desnaturantes e analisadas por Western Blotting, utilizando anticorpo monoclonal Anti-FLAG. Como esperado, a proteína foi detectada apenas nas linhagens hfq::3XFLAG em todos os sorotipos investigados, confirmando a especificidade do anticorpo e a presença do epítipo nas proteínas Hfq de *A. pleuropneumoniae* (Figura 13). Em todos os sorotipos investigados,

a expressão de Hfq::3XFLAG foi avaliada nos seguintes tempos: 1, 2, 3 e 4 horas, que representam a fase log – início, intermediária e final; 6 horas que representa a fase estacionária inicial, 8 horas a fase estacionária intermediária e 12 horas a fase estacionária tardia.

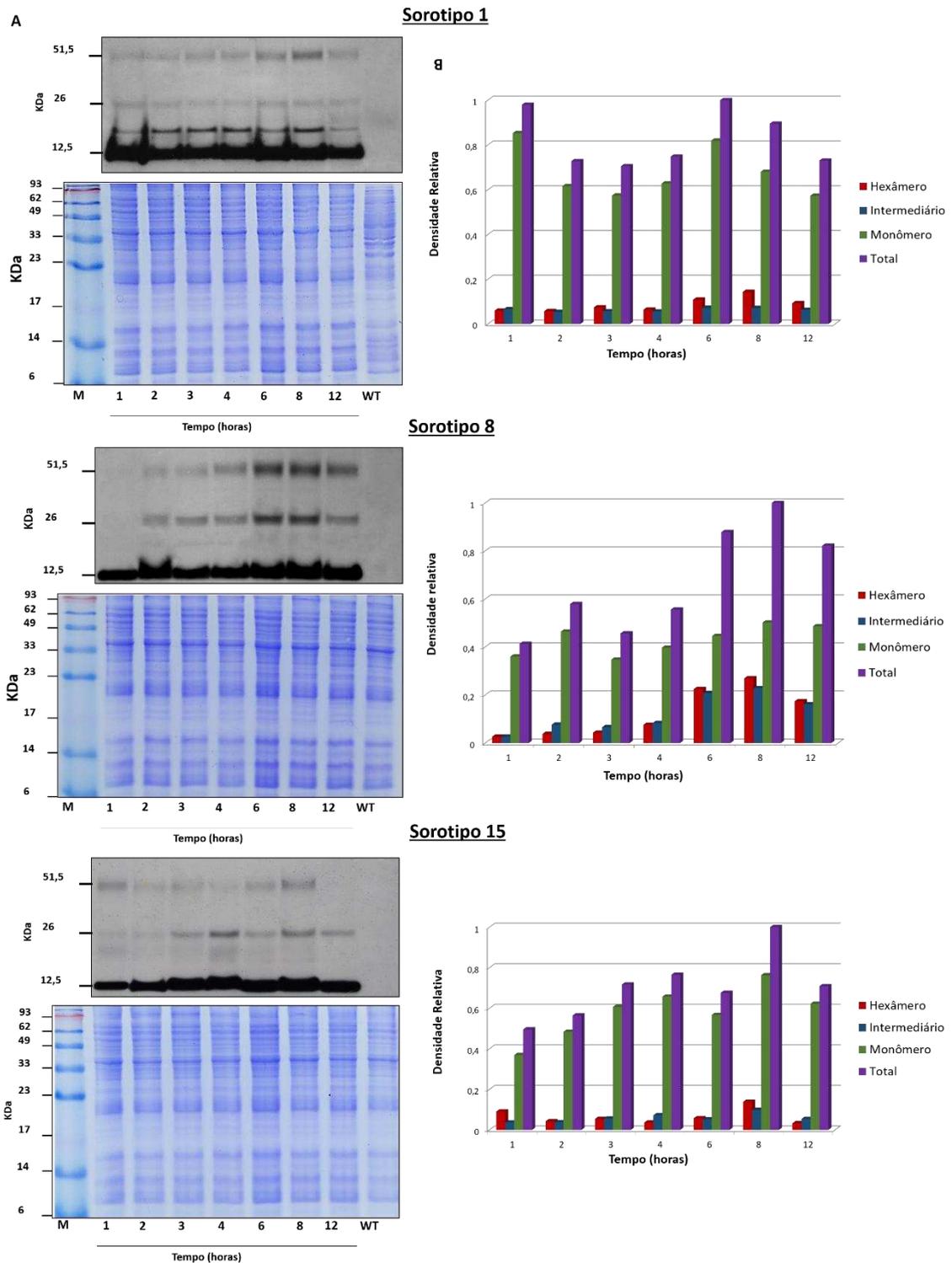
Por intermédio da avaliação da mobilidade relativa da proteína em gel de poliacrilamida em condições semi-desnaturantes, as massas moleculares do monômero e do oligômero de Hfq foi estimada baseadas na equação de regressão construída com base nas proteínas do padrão de massa molecular do marcador utilizado nas análises. O monômero apresentou massa molecular de 12,5 kDa, de acordo com a massa molecular predita para *A. pleuropneumoniae*, e o hexâmero com massa molecular de 51,5 kDa em todos os sorotipos. O uso do gel semi-desnaturante permitiu analisar a expressão de monômeros e hexâmeros. No sorotipo 1, há um equilíbrio no acúmulo de Hfq, tanto de monômeros quanto hexâmeros. Entretanto, houve maior acúmulo da proteína no tempo de 6 horas, que corresponde a fase estacionária inicial (Figura 12). No tempo de 1 hora, que corresponde à fase lag, já se pode verificar acúmulo da proteína. O acúmulo de monômeros variou durante o crescimento celular e a montagem do hexâmero também apresentou oscilação, com maior acúmulo no período de 6-8 horas de crescimento, correspondente à fase estacionária de crescimento.

Em relação ao sorotipo 8, verifica-se um maior acúmulo da proteína de Hfq nos tempos de 6 e 8 horas de crescimento, como observado no sorotipo 1, no entanto com um maior abundância da proteína no tempo de 8 horas (Figura 12). Nessa fase de crescimento, a célula encontra-se na fase estacionária e faz-se necessária a expressão de genes relacionados com o estresse, uma vez que a célula se encontra em um meio com baixa concentração de nutrientes, pH alterado, entre outros fatores. O monômero manteve-se praticamente constante durante todo o crescimento da bactéria, podendo ser observado um aumento gradual na formação de hexâmeros, que atinge o máximo no tempo de 8 horas, apesar de no período de 6-8 horas ter ocorrido um acúmulo equilibrado entre os monômeros e os hexâmeros de Hfq neste sorotipo.

No sorotipo 15 observou-se um aumento na expressão de Hfq conforme a progressão do tempo de crescimento, com uma maior expressão de proteína no tempo de 8 horas (Figura 12). Esse resultado, que corresponde à fase estacionária da bactéria, é similar ao encontrado em *A. pleuropneumoniae* do sorotipo 8 anteriormente analisado.

No sorotipo 15, a expressão de hexâmeros ocorre de forma quase estável, com uma expressão pouco mais acentuada nos tempos de 1 e 8 horas. Como mencionado anteriormente, há necessidade de uma maior expressão da proteína na fase estacionária, uma vez que mutantes no gene *hfq* apresentam deficiência na resposta ao estresse, e é justamente nesse momento que a célula sofre estresse nutricional, osmótico e entre outros.

Em nível de expressão durante o crescimento celular, os sorotipos apresentaram acúmulo e abundância de Hfq de forma diferenciada. O sorotipo 1 apresentou maior abundância de monômeros, que apresentou-se quase constante durante o crescimento celular, com formação de hexâmeros pouco mais acentuada no tempo de 6 e 8 horas. Além disso, esse sorotipo apresentou uma expressão significativa de monômeros na fase lag, o que não é aparente nos demais sorotipos, além de possuir maior abundância de Hfq na fase estacionária inicial. Nos sorotipos 8 e 15, o maior acúmulo de Hfq ocorre durante a fase estacionária intermediária. A montagem de hexâmeros no sorotipo 8 ocorre de forma gradual durante o crescimento, até atingir o máximo no tempo de 8 horas. No sorotipo 15, essa montagem ocorre mais evidente apenas no tempo de 8h. Em todos os casos analisados, houve, portanto, um maior acúmulo de Hfq e suas formas durante a fase estacionária de crescimento. Além do aparecimento das formas monomérica e hexamérica da proteína, foi detectada a presença de uma banda intermediária de 26 kDa.

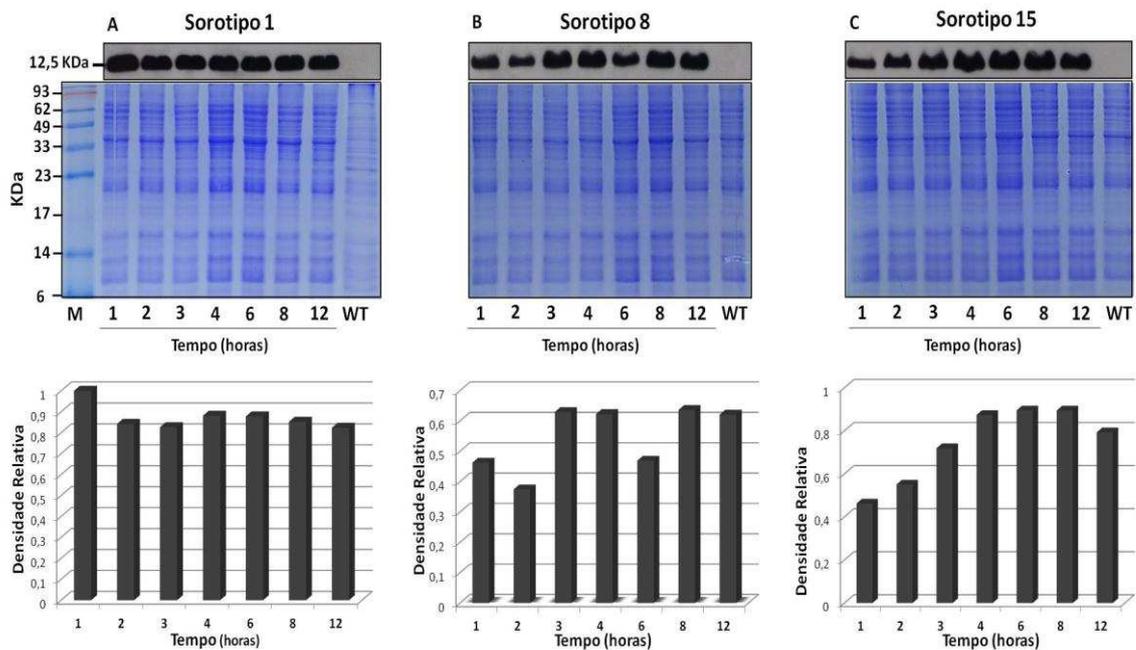


**Figura 12:** Expressão temporal e formas encontradas de Hfq em *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1, 8 e 15. (A) Sorotipo 1, (B) Sorotipo 8 e (C) Sorotipo 15: Western Blotting detectando Hfq::3XFlag (painel superior a esquerda), gel SDS-PAGE com as proteínas do Western Blotting coradas com azul de comassie, como controle de carregamento (painel inferior a esquerda) e quantificação relativa da proteína Hfq analisada por software Image J, baseado na imagem do Western Blotting (painel da direita). Amostras do sobrenadante foram preparadas a partir da bactéria cultivada em meio BHI/NAD a 37 °C por 12 horas. Tempo em horas e WT (selvagem). M: marcador See-blue Plus2 (Invitrogen).

Além de analisar o perfil de expressão de Hfq em *A. pleuropneumoniae* e qual o tempo em que há maior acúmulo da mesma, foi possível verificar a expressão da proteína Hfq em cada sorotipo e se o perfil de expressão ocorre de forma similar. Para isso, o extrato proteico total de todos os sorotipos foi quantificado novamente e foi realizado SDS-PAGE em gel desnaturante, para que todas as formas da proteína fossem desfeitas e apenas houvesse a presença de monômeros. Foi aplicada a mesma quantidade de proteína para todos os sorotipos e as corridas ocorreram nas mesmas condições. O Western Blotting foi realizado da mesma forma para todos os sorotipos.

Como resultado, pudemos observar um padrão de expressão diferencial entre os sorotipos investigados (Figura 13). No sorotipo 1, houve uma expressão constante da proteína desde o tempo de 1 hora até 12 horas de crescimento. No sorotipo 8, uma maior expressão foi observada no período de 3-4 horas e 8-12 horas de crescimento, que correspondem à fase log e estacionária, respectivamente. A expressão da proteína Hfq no sorotipo 15 tem seu aumento a partir de 3 horas, se mantendo constante até 12 horas de crescimento.

Como pode ser verificado na Figura 13, houve uma diferença significativa na expressão de Hfq entre os sorotipos. O sorotipo 1 é considerado o mais virulento entre os sorotipos investigados neste trabalho e este apresentou uma expressão constante e expressiva da proteína Hfq durante o crescimento a partir de 1 hora de crescimento. Os sorotipos 8 e 15, que são considerados de virulência moderada e moderada a baixa, respectivamente, apresentaram padrões distintos de expressão, que culminaram com o maior acúmulo da proteína Hfq na fase estacionária de crescimento, embora o sorotipo 15 mantenha o nível de Hfq constante a partir de 3 horas de crescimento e uma redução já verificada em 12 horas de crescimento.



**Figura 13:** Expressão da proteína Hfq em *A. pleuropneumoniae* sorotipos 1, 8 e 15. Western Blotting detectando Hfq::3XFLAG (painéis superiores) e gel SDS-PAGE com as proteínas do Western Blotting coradas com azul de comassie (painéis inferiores), mostrado como controle de carregamento. **(A)** Sorotipo 1 hfq::3XFLAG, **(B)** Sorotipo 8 hfq::3XFLAG e **(C)** Sorotipo 15 hfq::3XFLAG foram cultivados em meio BHI/NAD a 37 °C por 12 horas. 1 -12, correspondem aos tempos de crescimento investigados; WT: Extrato protéico correspondente às linhagens tipo selvagem. M: Marcador de massa molecular See-blue Plus2 (Invitrogen) (M) em kDa. Quantificação relativa da proteína Hfq, de cada sorotipo, analisada por software Image J, baseado na imagem do Western Blotting.

## 7. DISCUSSÃO

A chaperona Hfq é um efector central na regulação da expressão gênica, estando envolvida em controle do metabolismo celular e patogênese (Weichenrieder, 2014). A proteína Hfq é encontrada em todos os membros da família Pasteurellaceae, cujos genomas foram sequenciados, mas a função da proteína nos patógenos desta família tem sido pouco explorada, especialmente em patógenos de importância veterinária. Alguns trabalhos demonstraram a importância de Hfq em determinados membros da família Pasteurellaceae, como *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus ducreyi*, onde a mesma participa da regulação de genes de virulência e de crescimento celular, e facilita a infecção pelo patógeno (Hempel et al., 2013; Gangaiah et al., 2014). Subashchandrabose e colaboradores (2013) demonstraram o efeito pleiotrópico de Hfq em *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 e evidenciaram a sua importância no crescimento celular e na resposta a diferentes tipos de estresse. Entretanto, muitos aspectos sobre a proteína em *A. pleuropneumoniae* ainda não foram elucidados.

Análises filogenéticas envolvendo a proteína Hfq demonstram sua conservação e sua ampla distribuição em diferentes micro-organismos, no entanto, nenhuma informação a respeito desta proteína está disponível para a espécie *A. pleuropneumoniae* e outras espécies importantes envolvidas com doenças respiratórias em suínos. Como já mencionado anteriormente, a proteína Hfq possui uma região N-terminal (NTR) conservada (corresponde a aproximadamente 72 aminoácidos), enquanto a região C-terminal (CTR) apresenta-se de tamanho e composição variados entre as espécies (Sauter et al., 2003). Quanto à sua filogenia, Hfq divide-se em três clados, que são: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria/ Gammaproteobacteria e bactérias Gram-positivas de baixo GC. Gammaproteobacteria é uma classe de bactérias Gram-negativas do filo Proteobacteria, que abrange famílias abundantes em bactérias patogênicas como as das famílias Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae e Vibrionaceae (Sun et al., 2002).

Em *A. pleuropneumoniae*, a proteína apresenta-se altamente conservada em sua região NTR, com uma região CTR variável. A proteína apresentou identidade de 100% entre isolados do mesmo sorotipo e uma identidade de 98% entre os diferentes sorotipos, havendo apenas duas substituições. Nesse caso, os aminoácidos polares neutros serina e treonina foram substituídos por dois aminoácidos apolares neutros alanina na região CTR nos sorotipos 3 e 12. Provavelmente essas substituições não

influenciam na estrutura da proteína, uma vez que a formação das estruturas secundárias ocorre na região conservada NTR e a região CTR estende-se para fora da estrutura, não participando de interações responsáveis pela formação do hexâmero. Outros estudos são necessários para verificar se essas substituições influenciam na atividade da proteína durante a regulação da expressão gênica.

O monômero da proteína Hfq de patógenos como *E. coli*, *Francisella novicida* e *V. cholerae* apresenta uma estrutura tridimensional conservada composta por uma  $\alpha$ -hélice N-terminal seguida por cinco cadeias  $\beta$ , sendo os elementos da estrutura secundária separadas por cinco loops de tamanhos variados, com uma região CTR desordenada e estendendo-se para fora do dobramento (Vincent et al., 2012; Sauer, 2013; Weichenrieder, 2014). A estrutura tridimensional predita da proteína Hfq de *A. pleuropneumoniae* apresentou o mesmo dobramento com a mesma disposição acima, sendo que a mesma organização foi verificada para a proteína marcada com a cauda FLAG. Quando comparada a estrutura tridimensional de Hfq de *A. pleuropneumoniae* com a estrutura de Hfq de *Salmonella typhimurium* (Sauer, 2013) pode-se observar o aparecimento de uma sexta cadeia  $\beta$ . É provável que essa diferença seja observada uma vez que a estrutura observada por Sauer e colaboradores (2013) foi obtida através de análises cristalográficas, que são análises mais confiáveis e sólidas. Portanto, análises cristalográficas ou similares são necessárias para a confirmação da estrutura da proteína Hfq em *A. pleuropneumoniae* que mesmo apenas por predição utilizando ferramenta baseada na web demonstrou-se muito similar a de outros patógenos.

Em trabalhos recentes realizados por nosso grupo, foi demonstrada a presença da proteína na bactéria e sua relação com a resposta celular: mutante hfq de *A. pleuropneumoniae* demonstraram deficiência no crescimento, sensibilidade a condições de estresse e atenuação em modelo de infecção (Crispim, 2014). Mutantes hfq de outras bactérias, como as citadas anteriormente, apresentam fenótipo semelhante (Ding et al., 2004; Chambers & Bender, 2011; Kendall et al., 2011). A partir dessas informações, podemos sugerir que Hfq de *A. pleuropneumoniae* possui semelhanças com a proteína Hfq de outros patógenos Gram-negativos, tanto estruturalmente quanto funcionalmente, o que indica a importância dessa proteína para a virulência da bactéria.

A proteína Hfq de diferentes espécies do gênero *Actinobacillus* apresentaram região NTR conservada, mas a região CTR começa a variar, sendo esse aspecto

possivelmente relacionado ao hospedeiro de cada espécie. *A. suis* é uma bactéria comensal comum das amígdalas de suínos que sob condições desconhecidas podem invadir a corrente sanguínea de animais de todas as idades, resultando em quadros de meningite, artrite e pneumonia (Bujold & MacInnes et al., 2015). *Actinobacillus equuli* é residente comum de cavalos saudáveis, podendo causar septicemia em potros neonatais que pode evoluir para forma crônica, produzindo lesões nos rins articulações e pulmões (Huang et al., 2015). *Actinobacillus ureae* tem sido reportado em casos clínicos de meningite, conjuntivite aguda e bronquite crônica em humanos (de Castro et al., 2007; Ergin et al., 2007). *Actinobacillus succinogenes* é considerado um candidato promissor para indústria de produção de succinato em matérias-primas lignocelulósicas (Bradfield et al., 2015). Diante dessa diversidade, pode-se sugerir que conforme a espécie distancia de hospedeiro, a proteína começa a variar sua região CTR.

Por meio da comparação filogenética, espécies da família Pasteurellaceae se agruparam mais próximas dos membros da família Vibrionaceae. Isso pode ter ocorrido devido ao tamanho da proteína, sendo que enquanto Hfq de *A. pleuropneumoniae* possui 92 aminoácidos, Hfq de *E. coli* apresenta 102 aminoácidos e de *V. cholerae* possui 87. Provavelmente, um maior número de aminoácidos aumenta a diversificação da proteína, onde a diferença no número de aminoácidos entre *V. cholerae* e *A. pleuropneumoniae* é menor, comparado com *E. coli*, sendo que essa afirmação ainda deve ser analisada. Isso representa também o papel de CTR por aumentar a diversidade da proteína entre as famílias, uma vez que NTR é conservada. A diferença no tamanho da proteína não influencia na sequência e tamanho de NTR, mas na sequência CTR, que se apresenta variável no tamanho e composição. O contraste entre a conservação de NTR e a alta variabilidade de CTR sugerem que essas regiões estão sob processos seletivos evolutivos diferentes. Enquanto NTR está sob processo seletivo que preserva sua função, CTR passa por processo atribuído a diversificação funcional.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 5b linhagem L20 genoma referência (ABN75035.1) apresenta um genoma de 2,27Mb, *Escherichia coli* K-12 linhagem MG1655 genoma referência (NC\_000913.3) com 4,64 Mb e *V. cholerae* O1 biotipo El Tor linhagem N16961 genoma referência (NC\_002505.1) com 2,96 Mb. Quanto maior o genoma da bactéria, mais informação genética e, com isso, maior é a regulação da expressão de seus genes. Portanto, uma maior número de sRNAs é possivelmente mais

expresso de acordo com o tamanho do genoma, com aumento também no número de mRNAs alvo. Além de RNAs, a proteína Hfq está relacionada com essa proporção. Por NTR ser conservada, CTR varia e contribui para a diversidade da proteína.

As funções da CTR de Hfq ainda permanecem pouco entendidas. Em estudo recente em *E. coli*, foi verificado que a CTR possui propriedade intrínseca de se auto-organizar em estruturas fibrilares longas *in vitro* e a localização normal de Hfq dentro de estruturas associadas à membrana *in vivo* requerem esta região, com um papel central na interação com os RNAs alvos (Fortas et al., 2015). O hexâmero de Hfq de *V. cholerae* apresentou menor estabilidade do que o de *E. coli*. A interface criada por CTR em *E. coli* é ligeiramente diferente em *V. cholerae*, o que influencia na estabilidade da interface inter-subunidades. Além disso, foi mostrada a importância de CTR no reconhecimento do sítio de ligação de RNAs em *V. cholerae* (Vincent et al., 2015). A divergência de Hfq evidenciada na árvore filogenética assegura que a proteína está relacionada em nível de espécie dentro de uma família, mas que, principalmente quando há mudança de hospedeiro, a proteína começa a apresentar modificações que podem ser relevantes. No caso, é provável que espécies diferentes com mesmo hospedeiro natural possuem proximidade filogenética, mas quando se distancia o hospedeiro, há uma maior divergência na proteína.

Para analisar a função e importância de Hfq para um determinado organismo, autores têm utilizado mutantes para o gene *hfq*, impedindo a expressão da proteína (Bai et al., 2010; Chambers & Bender, 2011; Gangaiah et al., 2014). Alterações no crescimento, na maioria das vezes reduzido, sensibilidade aos estresses ácido, osmótico, nutricional e oxidativo, e até diminuição na virulência já foram demonstrados, evidenciando a importância da proteína na regulação de fatores relacionados com o metabolismo e respostas a diferentes condições (Harris et al., 2013; Crispim, 2014; Wang et al., 2014; Yang et al., 2015).

O avanço da tecnologia de DNA recombinante permitiu o estudo mais aprofundado de moléculas, mais especificamente de proteínas. Com tal finalidade, obtiveram-se linhagens recombinantes de *A. pleuropneumoniae* com uma cauda FLAG inserida no gene *hfq*, a fim de marcar a proteína para análises de expressão e purificação. Entretanto, a inserção dessa marcação não pode influenciar ou modificar o fenótipo da bactéria recombinante. O crescimento celular, portanto, foi utilizado para

avaliar se houve alguma modificação na proteína expressa com FLAG, uma vez que o crescimento celular é de alguma forma controlado por Hfq. Em todos os sorotipos, a velocidade específica de crescimento de WT e hfq::3XFLAG não apresentou diferença significativa, com nível de significância de 5%. Esse dado, em conjunto com a comparação entre as estruturas tridimensionais de Hfq de WT e hfq::3XFLAG indicam, portanto, que a inserção da cauda 3XFLAG não interfere na estrutura e fenótipo da bactéria, indicando que hfq::3XFLAG pode ser utilizado em análises posteriores.

Subashchandrabose e colaboradores (2013) também demonstraram o perfil fenotípico de mutantes hfq para o sorotipo 1. Além dos aspectos encontrados anteriormente, foi realizado ensaio in vivo utilizando suínos, demonstrando que a linhagem mutada não colonizava os pulmões, demonstrando o papel de genes induzidos in vivo por Hfq na patogênese da pleuropneumonia suína. Nosso grupo tem realizado trabalhos envolvendo a proteína Hfq e avaliação de sua importância em *A. pleuropneumoniae*. Um dos trabalhos demonstrou o efeito pleiotrópico que a proteína exerce em diferentes sorotipos da bactéria, utilizando mutantes hfq dos sorotipos 1, 8 e 15. Foi demonstrado que Hfq afeta o crescimento, a capacidade de aderência, a resistência a diferentes condições de estresse e a produção de possíveis fatores relacionados à virulência (Crispim, 2014). Outras análises realizadas por nosso grupo demonstraram in silico a presença de sRNAs em *A. pleuropneumoniae* (Rossi, 2015). Em vários outros organismos, sRNAs que interagem com Hfq têm-se demonstrado serem importantes na regulação de genes envolvidos na patogênese (Mann et al., 2012; Caswell et al., 2014; Ortega et al., 2014; Pitman & Chao, 2015). Portanto, a importância de Hfq e a presença de sRNAs sugerem a relação de Hfq com a virulência, uma vez que essas moléculas foram relacionadas com patogenicidade em outros micro-organismos e a ausência de Hfq em *A. pleuropneumoniae* demonstra a importância da proteína em aspectos relacionados com virulência.

Apesar de não haver na literatura, o presente trabalho demonstrou como ocorre a expressão da proteína e se há uma expressão de forma similar entre os sorotipos. A expressão de Hfq, em todos os sorotipos por nós analisados, ocorreu com maior acúmulo durante a fase estacionária (nos tempos de 6 horas e 8 horas). No sorotipo 8 ainda é mais evidente perceber que há um aumento na formação de hexâmeros até atingir o tempo de 8 horas. Isso é evidente uma vez que o hexâmero é considerado a

forma ativa da proteína, que exerce função na regulação celular. Nos outros sorotipos há também uma maior concentração de hexâmeros no tempo onde há maior acúmulo da proteína, mesmo que menos evidente e não ocorrendo de forma gradual. A presença de uma banda intermediária de 26 kDa pode estar relacionada com a associação de Hfq com outras proteínas como ribossomo ou RNA polimerase (Sukhodolets & Garges, 2003).

O gene *hfq* em *A. pleuropneumoniae* está localizado em um operon entre o gene *miaA*, que codifica uma transferase pirofosfatase delta (2)-isopentenil tRNA e gene *hflX*, que codifica a proteína HflX de ligação a GTP (Subashchandrabose et al., 2013). Esse operon é controlado por vários promotores, incluindo um promotor reconhecido pelo fator  $\sigma^E$  que está presente no gene *hfq*, interno ao gene *miaA*. O fator  $\sigma^E$  encontra-se ativado somente em condições de estresse, como demonstrado em *E. coli*, cuja expressão do gene *hfq* também é controlada por esse fator (Tsui et al., 1996). Li e colaboradores (2015a) demonstraram que em *Salmonella* o fator  $\sigma^E$  é encontrado como regulador da expressão de *hfq* em condições de estresse. Analisando a expressão da proteína Hfq em diferentes sorotipos, pode-se notar que houve uma maior expressão da proteína nos tempos de 6 horas e 8 horas, que correspondem à fase estacionária. Nesse momento do crescimento, a célula encontra diversos fatores estressantes, como a limitação de nutriente e a mudança de pH do meio. Provavelmente essa maior expressão nesses tempos está relacionada com a expressão do fator  $\sigma^E$ , que está ativo nessas condições e possivelmente aumenta a expressão de Hfq nessas condições.

Em *E. coli*, Hfq regula a expressão do fator sigma da fase estacionária ( $\sigma^S$ ), reprimindo a expressão desse fator (Lease & Woodson, 2004). Em *A. pleuropneumoniae* não existem homólogos do fator  $\sigma^S$ , o que contribui ainda mais para a hipótese que Hfq ser regulado por  $\sigma^E$  em condições de estresse, o que leva à superexpressão da proteína durante a fase estacionária, mediada por  $\sigma^E$ . Além disso, Li e colaboradores (2015a) demonstraram que parte da regulação pós-transcricional mediada por  $\sigma^E$  é dependente de Hfq em *Salmonella* sp. Em *A. pleuropneumoniae*, a formação de biofilme é regulada por  $\sigma^E$  (Bossé et al., 2010). Esses dados podem sugerir uma atuação compartilhada entre Hfq e  $\sigma^E$  na expressão de muitos genes, o que pode ser elucidado em trabalhos futuros.

Outro fato importante de Hfq em *A. pleuropneumoniae* observado em nossas análises é que sua expressão ocorre de forma diferenciada entre os sorotipos analisados. Já é claro que uma das principais diferenças entre os sorotipos é sua virulência, sendo uns mais virulentos que outros, mas como isso ocorre ainda permanece desconhecido. Provavelmente essa diferença pode estar relacionada com a regulação da expressão gênica ou a possibilidade de alguns genes estarem silenciados ou superexpressos. Pelo alinhamento, pudemos observar uma conservação de 98% da proteína entre os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, portanto, a diferença da expressão de Hfq entre os sorotipos ocorre em nível de regulação. É importante ressaltar que não houve diferença entre as sequências do operon onde está inserido o gene *hfq*, o que indica que a diferença na expressão desta proteína possa ser em nível pós-traducional.

Hfq, além de participar na regulação da expressão gênica mediada por RNAs, também participa da compactação do nucleóide. Acredita-se, portanto, que o fato da expressão da proteína ocorrer de forma diferente entre os sorotipos pode influenciar na virulência da bactéria. Uma vez que Hfq está relacionada com aspectos de resposta a fatores externos e na regulação de fatores de virulência como a formação de biofilme, é provável que o perfil de expressão de Hfq esteja relacionado com a virulência. Além disso, Hfq pode participar no silenciamento de alguns genes em um determinado sorotipo. É possível, por exemplo, que a célula necessite expressar mais Hfq pra manter um gene silenciado durante uma fase de crescimento ou em todo o crescimento celular. Análises mais específicas necessitam ser realizadas para verificar essas possibilidades. Com isso, alguns aspectos da regulação da expressão gênica em *A. pleuropneumoniae*, mediada por Hfq, começam a ser elucidados e podem contribuir no entendimento da virulência e do metabolismo celular da bactéria.

## **8. CONCLUSÕES**

Este trabalho investigou a expressão da proteína Hfq em diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. Análises *in silico* indicaram a conservação da proteína entre os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, em ambas as regiões, NTR e CTR. Além disso, foi demonstrado que não houve diferença fenotípica no crescimento celular entre as linhagens WT e *hfq::3XFLAG* dos sorotipos analisados, em todos os ensaios realizados

entre os sorotipos, indicando que a inserção de marcação em Hfq não alterou o perfil de crescimento celular. Análises de expressão da proteína demonstraram que nos sorotipos investigados há um acúmulo de Hfq na fase estacionária de crescimento e que essa expressão ocorre de forma diferenciada entre os sorotipos analisados. Portanto, conclui-se que a proteína Hfq de *A. pleuropneumoniae* é conservada, no entanto, pode estar relacionada aos diferentes perfis de virulência dos sorotipos investigados uma vez que a abundância nestes sorotipos apresentou distribuição temporal distinta.

## 9. REFERÊNCIAS

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal, São Paulo, 2015. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/>> Acesso em: 01 de nov. 2015.

Achsel T., Stark H., Lührmann R., 2001, The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo (U) specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 3685-3689.

AliAzam T., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A., 1999, Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol*. 181, 6361-6370.

APS, Associação Paranaense de Suinocultores, Curitiba, 2015. Disponível em: <http://www.apsonline.com.br/>> Acesso em: 01 de nov. 2015.

Arluison V., Derreumaux P., Allemand F., Folichon M., Hajnsdorf E., Regnier P., 2002, Structural Modelling of the Sm-like Protein Hfq from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 320, 705–712.

Arluison V., Folichon M., Marco S., Derreumaux P., Pellegrini O., Seguin J., et al., 2004, The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq increases the stability of the hexamer. *Eur J Biochem*. 271, 1258-1265.

Bai G., Golubov A., Smith E.A., McDonough K.A., 2010, The importance of the small RNA chaperone Hfq for growth of epidemic *Yersinia pestis*, but not *Yersinia pseudotuberculosis*, with implications for plague biology. *J Bacteriol*. 16, 4239-4245.

Beich-Frandsen, M., Vecerek, B., Konarev, P.V., Sjoblom, B., Kloiber, K., Hammerle, H., Rajkowitsch, L., Miles, A.J., Kontaxis, G., Wallace, B.A. et al., 2011, Structural insights into the dynamics and function of the C-terminus of the *E. coli* RNA chaperone Hfq. *Nucleic Acids Res*. 39, 4900–4915.

Beisel C. L. & Storz G., 2010, Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol. Rev*. 34, 866–882.

Blackall P.J., Klaasen H.L., van den Bosch H., Kuhnert P., Frey J., 2002, Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* 84, 47-52.

Bossé J.T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R., 2002, *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* 4, 225-235.

Bossé J.T., Sinha S., Li M.S., O'Dwyer C.A., Nash J.H., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R., 2010, Regulation of *pga* operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by  $\sigma^E$  and H-NS. *J Bacteriol*. 192, 2414-2423.

Bossé J.T., Soares-Bazzolli D.M., Li Y., Wren B.W., Tucker A.W., Maskell D.J., Rycroft A.N., Langford P.R.; BRaDP1T Consortium, 2014, The generation of

successive unmarked mutations and chromosomal insertion of heterologous genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* using natural transformation. *PLoS One*, 9, e111252.

Bradfield M.F., Mohagheghi A., Salvachúa D., Smith H., Black B.A., Dowe N., Beckham G.T., Nicol W., 2015, Continuous succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* on xylose-enriched hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*. 8, 181.

Brauer C., Hennig-Pauka I., Hoeltig D., Buettner F.F., Beyerbach M., Gasse H., Gerlach G.F., Waldmann K.H., 2012, Experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge in swine: comparison of computed tomographic and radiographic findings during disease. *BMC Vet Res*. 8, 47.

Bujold A.R., MacInnes J.I., 2015, Identification of putative adhesins of *Actinobacillus suis* and their homologues in other members of the family Pasteurellaceae. *BMC Res Notes*. 8, 675.

Caswell C.C., Oglesby-Sherrouse A.G., Murphy E.R., 2014, Sibling rivalry: related bacterial small RNAs and their redundant and non-redundant roles. *Front Cell Infect Microbiol*. doi: 10.3389/fcimb.2014.00151

Chambers J.R., Bender K.S., 2011, The RNA chaperone Hfq is important for growth and stress tolerance in *Francisella novicida*. *PLoS One* 6, e19797.

Chao Y., Vogel J., 2010, The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 13, 24-33.

Chiers K., De Waele T., Pasmans F., Ducatelle R., Haesebrouck F., 2010, Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet Res* 5, 41-65.

Coelho A.C., Vieira-Brito F.J., Vieira-Brito M.G., Rodrigues, J., 2004, Swine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* – diagnosis and strategies of control. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 99, 93-98.

Crispim J. S., Envolvimento da chaperona hfq na virulência de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

de Castro N., Pavie J., Lagrange-Xélot M., Bouvry D., Delisle F., Parrot A., Molina J.M., 2007, Severe *Actinobacillus ureae* meningitis in an immunocompromised patient: report of one case and review of the literature. *Scand J Infect Dis*. 39, 1076-1079.

de Jong A., Thomas V., Simjee S., Moyaert H., El Garch F., Maher K., Morrissey I., Butty P., Klein U., Marion H., Rigaut D., Vallé M., 2014, Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. *Vet Microbiol* 172, 202-215.

Diestra E., Cayrol B., Arluison V., Risco C., 2009, Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane. *PLoS One*. 4:e8301.

- Ding Y., Davis B.M., Waldor M.K., 2004, Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol.* 53, 345-354.
- Dimastrogiovanni D., Fröhlich K.S., Bandyra K.J., Bruce H.A., Hohensee S., Vogel J., Luisi B.F., 2014, Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein. *Elife.* 3:eLife.05375.
- Ergin C., Kaleli I., Kiliç I., 2007, Acute conjunctivitis caused by *Actinobacillus ureae*. *Pediatr Int.*49, 412-413.
- Feliciano J.R., Grilo A.M., Guerreiro S.I., Sousa S.A., Leitão J.H., 2016, Hfq: a multifaceted RNA chaperone involved in virulence. *Future Microbiol.* 11, 137-151.
- Fender A., Elf J., Hampel K., Zimmermann B., Wagner E.G., 2010, RNAs actively cycle on the Sm-like protein Hfq. *Genes Dev.* 24, 2621–2626.
- Fortas E., Piccirilli F., Malabirade A., Militello V., Trépout S., Marco S., Taghbalout A., Arluison V., 2015, New insight into the structure and function of Hfq C-terminus. *Biosci Rep.* 35, pii: e00190.
- Franze de Fernandez, M. T., Hayward, W. S. & August, J. T., 1972, Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* 247, 824-831.
- Frey J., 1995, Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* 3, 257–261.
- Frey J., 2003, Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Methods Mol Biol.* 216, 87–95.
- Gangaiah D., Labandeira-Rey M., Zhang X., Fortney K.R., Ellinger S., Zwickl B., Baker B., Liu Y., Janowicz D.M., Katz B.P., Brautigam C.A., Munson R.S. Jr, Hansen E.J., Spinola S.M., 2014, *Haemophilus ducreyi* Hfq contributes to virulence gene regulation as cells enter stationary phase. *MBio.* 5:e01081-13.
- Garcia-Morante B., Segalés J., Fraile L., Pérez de Rozas A., Maiti H., Coll T., Sibila M., 2016, *J Comp Pathol.* Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: a Comparative Review. 154, 125-134.
- Geinguenaud F., Calandrini V., Teixeira J., Mayer C., Liquier J., Lavelle C., Arluison V., 2011, Conformational transition of DNA bound to Hfq probed by infrared spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 1222–1229.
- Giménez-Lirola L.G., Jiang Y.H., Sun D., Hoang H., Yoon K.J., Halbur P.G., Opriessnig T., 2014, Simultaneous detection of antibodies against Apx toxins ApxI, ApxII, ApxIII, and ApxIV in pigs with known and unknown *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposure using a multiplexing liquid array platform. *Clin Vaccine Immunol.* 21, 85-95.

- Gottschalk M., 2012. Actinobacillosis. pp. 653–669. In: Diseases of Swine, 10th ed. (Straw B.E., Zimmerman J.J., D’allaire S. and Taylor, D.I. eds.), Wiley-Blackwell, Oxford.
- Gottschalk M., Lacouture S., 2012, Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes 3, 6, 8 and 15 isolated from diseased pigs in North America. Vet Rec. 174, 452.
- Gripenland J., Netterling S., Loh E., Tiensuu T., Toledo-Arana A., Johansson J., 2010, RNAs: regulators of bacterial virulence. Nat Rev Microbiol. 8, 857-866.
- Guisbert E., Rhodius V.A., Ahuja N., Witkin E., Gross C.A., 2007, Hfq modulates the sigmaE-mediated envelope stress response and the sigma32-mediated cytoplasmic stress response in Escherichia coli. J Bacteriol. 189, 1963-1973.
- Haesebrouck F., Pasmans F., Chiers K., Maes D., Ducatelle R., Decostere A., 2004, Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet. Microbiol. 100, 255–268.
- Harris J.F., Micheva-Viteva S., Li N., Hong-Geller E., 2013, Small RNA-mediated regulation of host-pathogen interactions. Virulence, 4, 785-795.
- Hempel R.J., Morton D.J., Seale T.W., Whitby P.W., Stull T.L., 2013, The role of the RNA chaperone Hfq in Haemophilus influenzae pathogenesis. BMC Microbiol. 13, 134.
- Hensel A., Windt H., Stockhofe-Zurwieden N., Lödding N., Koch W., Petzoldt K., 1993, A porcine aerosol infection model for studying dose dependent effects caused by Actinobacillus pleuropneumoniae bacteria. J. Aerosol. Med. 6, 73–88.
- Huang B.F., Kropinski A.M., Bujold A.R., MacInnes J.I., 2015, Complete genome sequence of Actinobacillus equuli subspecies equuli ATCC 19392(T). Stand Genomic Sci. 10:32.
- Ito H., Sueyoshi M., 2015, The genetic organization of the capsular polysaccharide biosynthesis region of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 15. J Vet Med Sci. 77, 483-486.
- Jacques M., 2004, Surface polysaccharides and iron-uptake systems of Actinobacillus pleuropneumoniae. Can J Vet Res 68, 81-85.
- Jiang K., Zhang C., Guttula D., Liu F., van Kan J.A., Lavelle C., Kubiak K., Malabirade A., Lapp A., Arluison V., van der Maarel J.R., 2015, Effects of Hfq on the conformation and compaction of DNA. Nucleic Acids Res. 43, 4332-4341.
- Jobert J.L., Savoye C., Cariolet R., Kobisch M., Madec F., 2000, Experimental aerosol transmission of Actinobacillus pleuropneumoniae to pigs. Can. J. Vet. Res. 64, 21–26.
- Kajitani M., Kato A., Wada A., Inokuchi Y., Ishihama, A., 1994, Regulation of the Escherichia coli hfq gene encoding the host factor for phage Q $\beta$ . J. Bacteriol. 176, 531–534.
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J., 2015, The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protoc. 10, 845-858.

- Kendall M.M., Gruber C.C., Rasko D.A., Hughes D.T., Sperandio V., 2011, Hfq virulence regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24. *J Bacteriol.* 193, 6843-6851.
- Khandige S., Kronborg T., Uhlin B.E., Møller-Jensen J., 2015, sRNA-Mediated Regulation of P-Fimbriae Phase Variation in Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 11:e1005109.
- Klitgaard K., Friis C., Angen O., Boye M., 2010, Comparative profiling of the transcriptional response to iron restriction in six serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with different virulence potential. *BMC Genomics.* 11-698.
- Lease R.A., Woodson S.A., 2004, Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J Mol Biol.* 344, 1211–1223.
- Li J., Nakayasu E.S., Overall C.C., Johnson R.C., Kidwai A.S., McDermott J.E., Ansong C., Heffron F., Cambronne E.D., Adkins J.N., 2015a, Global analysis of *Salmonella* alternative sigma factor E on protein translation. *J Proteome Res.* 4, 1716-1726.
- Li L., Chen Z., Bei W., Su Z., Huang Q., Zhang L., Chen H., Zhou R. 2015b, Catecholamines promote *Actinobacillus pleuropneumoniae* growth by regulating iron metabolism. *PLoS One* 10:e0121887.
- Link T.M., Valentin-Hansen P., Brennan, R.G., 2009, Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19292–19297.
- Lone A.G., Deslandes V., Nash J.H., Jacques M., Macinnes J.I., 2009, Modulation of gene expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposed to bronchoalveolar fluid. *PLoS One* 4, e6139.
- Majdalani N., Chen S., Murrow J., St John K., Gottesman S., 2001, Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol.* 5, 1382-1394.
- Mann B., van Opijnen T., Wang J., Obert C., Wang Y-D., Carter R., McGoldrick D.J., Ridout G., Camilli A., Tuomanen E.I., Rosch J.W., 2012, Control of Virulence by Small RNAs in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* 7:e1002788.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 24 out. 2015.
- Menzel A., Beyerbach M., Siewert C., Gundlach M., Hoeltig D., Graage R., Seifert H., Waldmann K.H., Verspohl J., Hennig-Pauka I., 2014, *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge in swine: diagnostic of lung alterations by infrared thermography. *BMC Vet Res* 10-199.
- Michaux C., Verneuil N., Hartke A., Giard J.C., 2014, Physiological roles of small RNA molecules. *Microbiology* 160, 1007-1019.
- Miranda G., Schuppli D., Barrera I., Hausherr C., Sogo J.M., Weber H., 1997, Recognition of bacteriophage Qbeta plus strand RNA as a template by Qbeta replicase:

role of RNA interactions mediated by ribosomal proteins S1 and host factor. *J Mol Biol.* 267, 1089-1103.

Mohanty, B.K., Maples, V.F. & Kushner, S.R., 2004, The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 54, 905-920.

Niven D.F., Lévesque M., 1988, V-factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2. *Int J Sys Bacteriol* 38, 319–320.

Obregon K.A., Hoch C.T., Sukhodolets M.V., 2015, Sm-like protein Hfq: Composition of the native complex, modifications, and interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1854, 950-966.

Olsen A.S., Moller-Jensen J., Brennan R.G., Valentin-Hansen P., 2010. C-Terminally truncated derivatives of *Escherichia coli* Hfq are proficient in riboregulation. *J. Mol. Biol.* 404, 173–182.

O'Neill, C., Jones, S. C., Bosse, J. T., Watson, C. M., Williamson, S. M., Rycroft, A. N., Kroll, J. S., Hartley, H. M. & Langford, P. R., 2010, Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars in England and Wales. *Vet Rec* 167, 661-662.

Ortega A.D., Quereda J.J., Pucciarelli M.G., García-del Portillo F., 2014, Non-coding RNA regulation in pathogenic bacteria located inside eukaryotic cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 4, 162.

Osterberg S., del Peso-Santos T., Shingler V., 2011, Regulation of alternative sigma factor use. *Annu Rev Microbiol.* 65, 37–55.

Panja S., Woodson S., 2012, Hexamer to monomer equilibrium of *E. coli* Hfq in solution and its impact on RNA annealing. *J Mol Biol.* 417, 406-412.

Papenfort K., Vogel J., 2010, Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe.* 8, 116-127.

Pereira M.F., Rossi C.C., de Queiroz M.V., Martins G.F., Isaac C., Bossé J.T., Li Y., Wren B.W., Terra V.S., Cuccui J., Langford P.R., Bazzolli D.M., 2015, *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Microbiology.* 161, 387-400.

Pitman S., Cho K.H., 2015, The Mechanisms of Virulence Regulation by Small Noncoding RNAs in Low GC Gram-Positive Pathogens. *Int J Mol Sci.* 16, 29797-29814.

Pulendran B., Kumar P., Cutler C.W., Mohamadzadeh M., Van Dyke T., Banchereau J., 2001. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol.* 167, 5067-5076.

Reddy J.S., Kumar R., Watt J.M., Lawrence M.L., Burgess S.C., Nanduri B., 2012, Transcriptome profile of a bovine respiratory disease pathogen: *Mannheimia haemolytica* PHL213. *BMC Bioinformatics.* 13, Suppl 15.

Renukaradhya G.J., Meng X.J., Calvert J.G., Roof M., Lager K.M., 2015, Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction. *Vaccine*. 33, 4069-4080.

Rodrigues G.Z., Gomes M.F.M., Cunha D.A., Santos V.F., 2009, Evolução da produção de carne suína no brasil: uma análise estrutural-diferencial. *Revista de Economia e Agronegócio*. 6, 343-366.

Rossi C.C., Identification of small regulatory RNAs and development of a molecular marker for the detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 2015. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

Rossi C.C., de Araújo E.F., de Queiroz M.V., Bazzolli D.M., 2013, Characterization of the *omlA* gene from different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: A new insight into an old approach. *Genet Mol Biol*. 36, 243-251.

Salim N.N., Faner M.A., Philip J.A., Feig, A.L., 2012, Requirement of upstream Hfq-binding (ARN)<sub>x</sub> elements in *glmS* and the Hfq C-terminal region for *GlmS* upregulation by sRNAs *GlmZ* and *GlmY*. *Nucleic Acids Res*. 40, 8021–8032.

Sambrook, J. & Russel, D. W., 2001, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sárközi, R., Makrai, L., Fodor, L., 2015, Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus Pleuropneumoniae*: Serovar 16. *Acta Vet Hung*. 63, 444-450.

Sauer E., 2013, Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA Biol*. 10, 610-618.

Sauer E., Schmidt S., Weichenrieder O., 2012, Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109, 9396- 9401.

Sauter C., Basquin J., Suck D., 2003, Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 31, 4091–4098.

Schaller A., Djordjevic S.P., Eamens G.J., Forbes W.A., Kuhn R., Kuhnert P., Gottschalk M., Nicolet J., Frey J., 2001, Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Vet. Microbiol*. 79, 47–62.

Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W., 2012, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9, 671-675.

Scofield D.G. & Lynch M. 2008, Evolutionary diversification of the Sm family of RNA-associated proteins. *Mol Biol Evol* 25, 2255-2267.

Soper T.J., Woodson S.A., 2008, The *rpoS* mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with *DsrA* sRNA. *RNA* 14, 1907-1917.

- Sorensen V., Jorsal S.E., Mousing J., 2006. Diseases of the respiratory system. In *Diseases of Swine*. 9th edition. Edited by Straw B.E., Zimmerman J.J., Allaire S.D., Taylor D.J. Washington: Blackwell Publishing, 149–177.
- Storz G., Vogel J., Wassarman K.M., 2011, Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell*. 43, 880-891.
- Subashchandrabose S., Leveque R.M., Kirkwood R.N., Kiupel M., Mulks M.H., 2013, The RNA chaperone Hfq promotes fitness of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during porcine pleuropneumonia. *Infect Immun* 81, 2952-2961.
- Sukhodolets M.V., Garges S., 2003, Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq. *Biochemistry*. 42, 8022–8034.
- Sun X., Zhulin I., Wartell R.M., 2002, Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Res*. 30, 3662–3671.
- Talukder A., Ishihama A., 2015, Growth phase dependent changes in the structure and protein composition of nucleoid in *Escherichia coli*. *Sci China Life Sci*. 9, 902-11.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S., 2013, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 12, 2725-2729.
- Taylor D.J., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in: Shaw B.E., D’Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, Blackwell Science, Oxford, 1999, pp. 343–354.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G., 2002, Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Wiley, Hoboken, New Jersey; c. 2, u. 2,3.
- Torremorell M., Pijoan C., Janni K., Walker R., Joo H.S., 1997, Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *Am. J. Vet. Res*. 58, 828–832.
- Tsui H.C., Feng, G., Winkler, M.E., 1996, Transcription of the *mutL* repair, *miaA* tRNA modification, *hfq* pleiotropic regulator, and *hflA* region protease genes of *Escherichia coli* K-12 from clustered  $\sigma^{32}$ -specific promoters during heat shock. *J Bacteriol* 178, 5719-5731.
- Tsui, H.C., Leung, H.C. & Winkler, M.E., 1994, Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 13, 35-49.
- Vecerek B., Moll I., Blasi U., 2005, Translational autocontrol of the *Escherichia coli* *hfq* RNA chaperone gene. *RNA* 11, 976–984.
- Vincent H.A., Henderson C.A., Ragan T.J., Garza-Garcia A., Cary P.D., Gowers D.M., Malfois M., Driscoll P.C., Sobott F., Callaghan A.J., 2015, Characterization of *Vibrio cholerae* Hfq provides novel insights into the role of the Hfq C-terminal region. *J Mol Biol*. 420, 56-69.

- Vincent H.A., Henderson C.A., Stone C.M., Cary P.D., Gowers D.M., Sobott F., Taylor J.E., Callaghan, A.J., 2012, The low-resolution solution structure of *Vibrio cholerae* Hfq in complex with Qrr1 sRNA. *Nucleic Acids Res.* 40, 8698–8710.
- Vogel J., Luisi B.F., 2011, Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol.* 9, 578-589.
- Wagner E.G., 2013, Cycling of RNAs on Hfq. *RNA Biol.* 4, 619-626.
- Wang L., Qin W., Ruidong Z., Liu S., Zhang H., Sun C., Feng X., Gu J., Du C., Han W., Langford P.R., Lei L., 2015, Differential gene expression profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during induction of primary alveolar macrophage apoptosis in piglets. *Microb Pathog.* 78, 74-86.
- Wang M.C., Chien H.F., Tsai Y.L., Liu M.C., Liaw S.J., 2014, The RNA chaperone Hfq is involved in stress tolerance and virulence in uropathogenic *Proteus mirabilis*. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0085626.
- Wang W., Wang L., Zou Y., Zhang J., Gong Q., Wu J., Shi Y., 2011, Cooperation of *Escherichia coli* Hfq hexamers in DsrA binding. *Genes Dev.* 25, 2106-2117.
- Waters L.S., Storz, G., 2009, Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136, 615–628.
- Weichenrieder O., 2014, RNA binding by Hfq and ring-forming (L)Sm proteins: a trade-off between optimal sequence readout and RNA backbone conformation. *RNA Biol.* 11, 537-549.
- Yang G., Wang L., Wang Y., Li P., Zhu J., Qiu S., Hao R., Wu Z., Li W., Song H., 2015, hfq regulates acid tolerance and virulence by responding to acid stress in *Shigella flexneri*. *Res Microbiol.* 166, 476-485.
- Zambrano N., Guichard P.P., Bi Y., Cayrol B., Marco S., et al., 2009, Involvement of HFq protein in the post-transcriptional regulation of *E. coli* bacterial cytoskeleton and cell division proteins. *Cell Cycle.* 15, 2470-2472.
- Zhou L., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R., 2008, An *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) hfq mutant is attenuated for virulence. In *Proceedings of the International Pasteurellaceae Society.*