

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

INSTITUTO BIOMÉDICO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Juliana Regina Ribeiro de Souza

**Impacto da mutação BCG Moreau-específica em PhoR na sua atividade
histidina kinase**

Rio de Janeiro

2016

Juliana Regina Ribeiro de Souza

**Impacto da mutação BCG Moreau-específica em PhoR na sua atividade
histidina kinase**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro como requisito parcial para obtenção do
grau de bacharel em Biomedicina

Área de concentração: Genética

Orientadora científica: Dra. Leila de Mendonça Lima

Coorientadora científica: Dra. Teca Calcagno Galvão

Orientadora acadêmica: Dra. Ana Teresa Nogueira Dumans

Rio de Janeiro

2016

Juliana Regina Ribeiro de Souza

**Impacto da mutação BCG Moreau-específica em PhoR na sua atividade
histidina kinase**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro como requisito parcial para obtenção do
grau de bacharel em Biomedicina

Área de concentração: Genética

_____ de _____ de 2016

Dra. Ana Teresa Nogueira Dumans – UNIRIO

Dra. Cláudia Jorge Nascimento – UNIRIO

MSc. Marcos Schwarz – IOC/FIOCRUZ

*“Existe no mundo um único caminho por onde só tu
podes passar. Onde leva? Não perguntes, segue-o.”*

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa concluída! Vários desafios, metas, sonhos, crescimento. Não foi fácil sair de casa e ir vencer as loucuras da cidade maravilhosa que tanto me encantou. Mais difícil ainda foi enfrentar a Alemanha, com seus diferentes costumes, uma nova língua e tão distante da minha vida! Mas tudo valeu a pena.

Agradeço à **Deus** pela força de sempre, por eu conseguir sempre caminhar e nunca desistir.

Aos meus **pais João Bosco e Katya** por acreditarem em mim, por sempre me apoiar, pelos empurrões, pelas lições, por serem meu porto seguro, meus heróis e estarem ao meu lado.

Ao meu **irmão Bruno** por ser meu melhor amigo, meu companheiro, pai da minha afilhada Sarah e meu sobrinho Arthur que tanto amo.

Aos meus **avós Lauro, Maria, Antônio e Maria Lúcia** por serem meus exemplos e estarem comigo em minhas vitórias, seja presencialmente ou no coração. Aos que já partiram, agradeço por senti-los sempre comigo.

Aos meus **familiares**: tios, primos e afilhados, meu muito obrigada por serem tão presentes.

Aos meus **amigos**, dos mais antigos aos mais atuais, agradeço pelos encontros e momentos felizes, conversas e compreensão.

À professora **Cláudia Nascimento** que acreditou em mim desde o primeiro semestre da graduação e me fez ter os primeiros contatos práticos com laboratórios, através da indicação pra aluna de iniciação científica e na monitoria de química.

À equipe do **departamento de Química da UNIRIO** e aos meus amigos e colegas conquistados ao longo dos meus 5 anos como monitora, meu muito obrigada por me fazerem ter experiência em dar aula, melhorar minha desenvoltura para falar em público e termos tidos tantos momentos juntos.

À equipe do **CNRMN – UFRJ** por terem me acolhido como aluna de iniciação científica, obtendo os primeiros conhecimentos de bancada.

À equipe do **Laboratório de Genética e Neurobiologia molecular da Otto von Guericke Universität**, por terem me recebido de forma acolhedora, me ensinando técnicas novas e tendo sempre muita paciência.

Às minhas **orientadoras institucionais Teca e Leila** por toda a ajuda oferecida, tanto conhecimento e inteligência compartilhados e por acreditarem em mim para desenvolver o projeto.

Aos amigos e colegas do LAGFB – Fiocruz, **Marcos, Pâmela, Helena, Rayane, Anael, Paloma, Renata Maia, Leandro, Sindy, Alessandra, Bianca, Renata Sá, Aline, Beatriz, Beto, Dona Neiva, Dona Sônia, Mariana, Ana Carolina**, que fizeram do meu dia a dia mais especial!

À plataforma de sequenciamento PDTIS pelas análises de sequenciamento realizadas.

Ao **Antônio Gonçalves** pela realização da parte experimental com camundongos.

À minha **orientadora acadêmica Ana Teresa** por ser excelente professora em genética, atenciosa e prestativa, principalmente na reta final da monografia.

À **banca examinadora** pela presença e avaliação deste trabalho

À **Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)**, que me conquistou desde o primeiro momento e só me fez ter certeza de que estava no lugar certo! Agradeço em especial todos os professores que contribuíram para minha formação.

Ao **Instituto Oswaldo Cruz** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Obrigada a todos que fazem parte da minha história!

RESUMO

Pela atenuação de um isolado clínico de *Mycobacterium bovis* obteve-se a vacina BCG, que foi distribuída ao redor do mundo, havendo propagação por passagem serial por anos até a implantação de lotes sementes. Como resultado, existe uma família de cepas BCG, com características fenotípicas e genotípicas diferentes. A cepa utilizada no Brasil é a BCG Moreau. Sua origem foi definida como sendo em 1927 e sua aplicação atualmente representa cobertura de 99% na população brasileira. Essa cepa apresenta uma interessante mutação não sinônima, D322G, na histidina kinase PhoR. Sistemas de dois componentes (SDC) são vias de tradução de sinal bacterianas, que consistem em uma histidina kinase (HK) e um regulador de resposta (RR). PhoR é uma HK que se autofosforila e transfere o grupo fosforil a PhoP, o RR deste SDC, que dispara a ativação dos genes no regulon. O SDC PhoP-PhoR é importante na virulência de *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*. Quando PhoP é inativado, há atenuação de *M. tuberculosis* fazendo com que a bactéria não se propague em modelos animais ou em macrófagos. Visto isso, nos propomos a averiguar se a mutação de PhoR específica a BCG Moreau tem impacto funcional, alterando sua atividade de HK. Os genes *phoR* de BCG Pasteur (cepa referência) e BCG Moreau e *phoP* de BCG Moreau foram amplificados por PCR com DNA polimerase de alta fidelidade, clonados com o método de Gibson em vetor de expressão heteróloga, clones foram obtidos após eletroporação em *Escherichia coli*. Foram identificados plasmídeos contendo *phoP* ou *phoR* (Moreau e Pasteur) por PCR de colônia, realizando posteriormente extração de plasmídeo, digestão direcional com as enzimas AflIII, BglIII, NcoI-XhoI e sequenciamento de DNA, expressão e teste de solubilidade e produção de anticorpos policlonais de *rPhoP*. Os testes de expressão e solubilidade foram realizados em várias estirpes de *E. coli* (BL21 (DE3), Origami (DE3) e RosettaGami (DE3)), temperaturas e meios. No entanto, não foi ainda identificada uma condição na qual as proteínas são produzidas em abundância em formas solúvel, o que seria necessário para os ensaios de autofosforilação de PhoR e ensaios de fosforilação de PhoP. PhoPinsolúvel foi purificada após solubilização com uréia e usada para obtenção de anticorpos policlonais a partir da inoculação em camundongos BalbC.

Palavras chaves: genômica funcional; micobactérias; mutação

ABSTRACT

From attenuation of a clinic isolate from *Mycobacterium bovis* it was obtained the BCG vaccine, which was then distributed all around the world, and it had been propagated through serial passages until the development of seed stocks. As a result of this process, there is a family of BCG strains, with phenotypic and genotypic differences. The Brazilian BCG strain is called Moreau. Its origin date from 1927 and its current administration represents a 99% Brazilian population coverage. This strain shows an interesting non-synonymous mutation, D322G, at histidine kinase *phoR*. Two component systems (TCS) are bacterial signal transduction pathways consisting in a histidine kinase (HK) and an answering regulator (AR). *PhoR* is a HK that autophosphorylate itself and transfer the phosphate group to *phoP*, the AR for this TCS, which triggers the gene regulation of its regulon. The TCS *PhoP-PhoR* is important in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* virulence. When *PhoP* is inactivated, we have *M. tuberculosis* attenuation, and so bacteria can't propagate in animal models or in macrophages. With that, we propose to investigate if the BCG-Moreau specific mutation in *PhoR* has a functional impact, changing its HK activity. The BCG Pasteur (reference strain) and BCG Moreau *phoR* genes and BCG Moreau *phoP* gene were amplified by PCR using a high fidelity DNA polymerase, then they were cloned using Gibson method in a heterologous expression vector, and then clones were obtained after *Escherichia coli* electroporation. It was identified plasmids containing *phoP* or *phoR* (Moreau and Pasteur) by colony PCR, and then it was performed a plasmid extraction, directional digestion with restriction enzymes (AflIII, BglII, NcoI-XhoI), DNA sequencing, expression and solubility tests and polyclonal antibodies production from r*PhoP*. Expression and solubility tests were done with several *E. coli* strains (BL21 (DE3), Origami (DE3) and RosettaGami (DE3)), in different temperatures and medium composition. However, it was not yet identified a condition in which recombinant protein is produced mainly in soluble form, which is necessary to the *PhoR* autophosphorylation assays and *PhoP* phosphorylation assay. Insoluble *PhoP* was purified after urea solubilization and it was used for polyclonal antibodies production after inoculation in BalbC mice.

Keywords: functional genomics, mycobacteria, mutation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Letalidade da tuberculose em 2014.....	2
Figura 2: <i>M. bovis</i> BCG cultivada em batata com bile de boi.....	3
Figura 3: Genealogia das estirpes da vacina BCG.....	4
Figura 4: Esquema de um sistema de dois componentes.....	6
Figura 5: Diversidade de SDCs e sinais cognatos em <i>Y. enterocolitica</i> e <i>P. luminescens</i>	7
Figura 6: Estrutura tridimensional de PhoP.....	9
Figura 7: Regulon de PhoP em <i>M. tuberculosis</i>	10
Figura 8: Estrutura do domínio citosólico da HK PhoR.....	11
Figura 9: Amplificação por PCR dos fragmentos <i>dephoP</i> e <i>phoR</i>	27
Figura 10: Vetor pET28a e sequência de seu promotor e MCS.....	28
Figura 11: Proteínas a serem produzidas após clonagem dos respectivos fragmentos em pET28a.....	28
Figura 12: Digestão de pET28a com NcoI e XhoI.....	29
Figura 13: Diagnóstico da clonagem de <i>phoR</i> e <i>phoP</i> por digestão com enzimas de restrição.....	30
Figura 14: Expressão de PhoRem <i>E.coli</i> BL21 DE3 a 37°C.....	32
Figura 15: Expressão de PhoR em <i>E.coli</i> BL21 DE3 a temperatura ambiente.....	33
Figura 16: Expressão de PhoR em <i>E.coli</i> Rosetta Blue DE3 a 37°C.....	34
Figura 17: Expressão de PhoP em <i>E.coli</i> BL21 DE3 à TA e 37°C.....	35
Figura 18: Westren Blot da expressão de PhoP em <i>E.coli</i> BL21DE3 (TA e 37°C)..	35

Figura 19: Expressão e teste de solubilidade de PhoP em <i>E.coli</i> Origami DE3 e RosettaGami DE3 a TA e 37°C.....	37
Figura 20: . Expressão de <i>phoR</i> em <i>E.coli</i> Origami DE3 e RosettaGami DE3 aTA e 37°C.....	38
Figura 21: Expressão de <i>rPhoR</i> em <i>E.coli</i> RosettaGami DE3 aTA e 37°C em meio overnight express.....	39
Figura 22: Comparação entre as proteínas deste trabalho e as purificadas por Gupta <i>et al.</i> (2008).....	41
Figura 23: Frações da purificação de PhoP em cromatografia por afinidade.....	42
Figura 24: Frações de PhoP purificada por fluxo gravitacional em coluna de níquel.....	42
Figura 25: Proteína PhoP purificada.....	43
Figura 26: Diferentes respostas dos camundongos na titulação de 1:1000 do soro policlonal anti-PhoP.....	44
Figura 27: Inoculação de boost com soro anti-PhoP aumenta sensibilidade de reconhecimento a PhoP recombinantes.....	44
Figura 28: Teste de titulação dos soros dos camundongos em extrato de <i>E.coli</i> ...	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos	14
Tabela 2: Dados sobre os genes e proteínas do trabalho.....	26
Tabela 3: Resumo dos resultados de clonagem, digestão por enzima de restrição, e sequenciamento.....	31
Tabela 4: Resumo das condições de expressão testadas e teste de solubilidade...40	

LISTA DE ABREVIações

°C - grau Celsius

µm - Micrômetro

aa - Aminoácidos

BCG - Bacilo de Calmette-Guérin

C+ - Controle positivo

C- - Controle negativo

CFU – Unidade formadora de colônia

cm - Centímetro

Da - Dalton

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DO - Densidade Ótica

E. coli- *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

FT – Flow through

g - Aceleração da gravidade

GYT - Glicerol, Levedura, Triptona

h - Hora

HIV - *Human immuno deficiency vírus*

HK – Histidina kinase

IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

IS6110 - Sequência de inserção 6110

kDa– Quilodalton

LAGFB – Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática

LB - Luria Bertani

LT – Lisado total

M – Molar

MCS - multiple cloning site

mg - Miligrama

min. - Minuto

mL– Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

mPa – milipascal

NI – Não induzido

nm - Nanômetro

ON - Overnight

P - Precipitado

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)

pb (s) - Par(es) de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PBS -*Phosphate Buffered Saline*

PDTIS - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

pH - Potencial Hidrogeniônico

pmol– picomol

RD - Região de diferença ou região de deleção

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

RR – Regulador de resposta

S - Sobrenadante

SDC – Sistema de dois componentes

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SOL - Solúvel

SNPs - Polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms*)

TAE – *Tris-acetate/EDTA electrophoresis buffer*

TB - Tuberculose

TBE - *Tris-Borate-EDTA*

TBS - *Tris Buffered Saline*

TBS-T - *Tris Buffered Saline* com Tween-20

TCA - Ácido tricloro acético

TCDC - Tauroquenoodeoxicolato de sódio

TEA - Trietanolamina

TEMED - N,N,N,N' - Tetrametiletenodiamina

TRIS - Tris-hidroxi-metil-amino-metano

TRITON X -100 -[(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol]

UFC - Unidades formadoras de colônia

v - Volts

v/v - Volume/volume

WB- *Western blot*

WHO - *World Health Organization*

μF - MicroFaraday

ng - Nanograma

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μm - Micrômetro

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características genômicas e vacinais das cepas de BCG.....	1
1.1.1 Tuberculose e BCG.....	1
1.1.2 Diferentes BCGs: diferenças genômicas.....	3
1.2 PhoP/PhoR.....	5
1.2.1 Sistema de dois componentes.....	5
1.2.2 PhoP/PhoR – Papel na virulência de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
1.2.3 Alterações em Histidina Kinase.....	12
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 Oligonucleotídeos.....	14
3.2 PCR.....	14
3.3 Clonagem.....	15
3.4 Expressão de PhoRM, PhoRP e PhoP.....	17
3.5 Western Blot.....	18

3.6	Teste de solubilidade de PhoRM, PhoRP e PhoP.....	19
3.7	Purificação de PhoP.....	19
3.8	Quantificação da proteína por método Qubit Protein Assay Kit.....	22
3.9	Produção de anticorpos policlonais contra rPhoP em camundongos.....	22
3.10	Potencialização da resposta imune com reforço de rPhoP.....	23
3.11	Verificação da eficiência de imunização através de Western Blot.....	23
3.12	Sangria total dos camundongos.....	24
3.13	Teste de titulação do anticorpo para cada camundongo.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Clonagem de PhoP e PhoR.....	26
4.2	Expressão de PhoR.....	31
4.3	Expressão de PhoP.....	34
4.4	Teste de expressão em diferentes cepas de E.coli.....	36
4.5	Purificação de PhoP insolúvel.....	41
4.6	Produção de soro policlonal anti-PhoP.....	43
5	CONCLUSÕES.....	46
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
7	ANEXOS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características genômicas e vacinais das cepas de BCG

1.1.1 Tuberculose e BCG

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa e transmissível causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*(Mtb), afetando principalmente os pulmões e tendo como principal reservatório o homem (Brasil, 2016). A transmissão é direta, de pessoa a pessoa, principalmente através do ar, com transmissão do bacilo através de tosse, espirro ou saliva (Nogueira *et al.*, 2012). Cerca de um terço da população do mundo tem TB latente, o que significa que as pessoas foram infectadas pela bactéria da tuberculose, mas ainda não estão doentes e não podem transmitir (WHO, 2016).

Trata-se de uma doença tratável e curável, mas continua sendo um grave problema na saúde global, por fatores como pobreza, falta de acesso ao diagnóstico e tratamento, a falta de adesão dos pacientes aos esquemas terapêuticos disponíveis, que tem duração mínima de seis meses; o aparecimento de estirpes de TB multiresistentes (MDR–TB , Multidrug–resistant Tuberculosis), que são definidas pela resistência aos fármacos isoniazida e rifampicina; e a co-infecção com o vírus HIV, visto que a TB é a principal causa de morte entre os pacientes HIV-positivos (Andrade *et al.*, 2008). As pessoas infectadas com a bactéria da tuberculose têm um risco de 10% de adoecer com tuberculose. No entanto, as pessoas com sistemas imunológicos comprometidos, como pessoas que vivem com HIV, desnutrição ou diabetes, ou pessoas que usam tabaco, têm um risco maior (WHO, 2016).

Quando uma pessoa desenvolve a forma ativa da tuberculose, os sintomas (como tosse, febre, suores noturnos, ou perda de peso) podem ser leves e durar por muitos meses. Isso pode levar a atrasos na procura de cuidados, e a ocorrência de transmissão aos outros. As pessoas com tuberculose ativa podem infectar 10-15 outras pessoas através do contato direto ao longo de um ano. Sem tratamento adequado, 45% das pessoas HIV-negativos com TB em média, e quase todas as pessoas HIV-positivas com TB morrerão (Nogueira *et al.*, 2012).

O sucesso dos tratamentos entre os novos casos é de 85%, mas há ocorrência de letalidade, variando principalmente entre os países, devido às grandes desigualdades no acesso aos serviços de saúde, incluindo os de detecção e tratamento da TB. Em 2014, a taxa de incidência de TB em países de baixa renda era 10 vezes maior do que em países de alta renda, enquanto a taxa de mortalidade por TB (entre pessoas HIV negativas) era quase 20 vezes maior. Nos países de alta renda, a proporção de letalidade (mortalidade dividida pela incidência) é em média de 6%. Em todo o mundo, a proporção de letalidade varia muito entre os países, indicando grandes desigualdades no acesso aos serviços de saúde, incluindo os de detecção e tratamento da TB (Figura 1) (WHO, 2016).

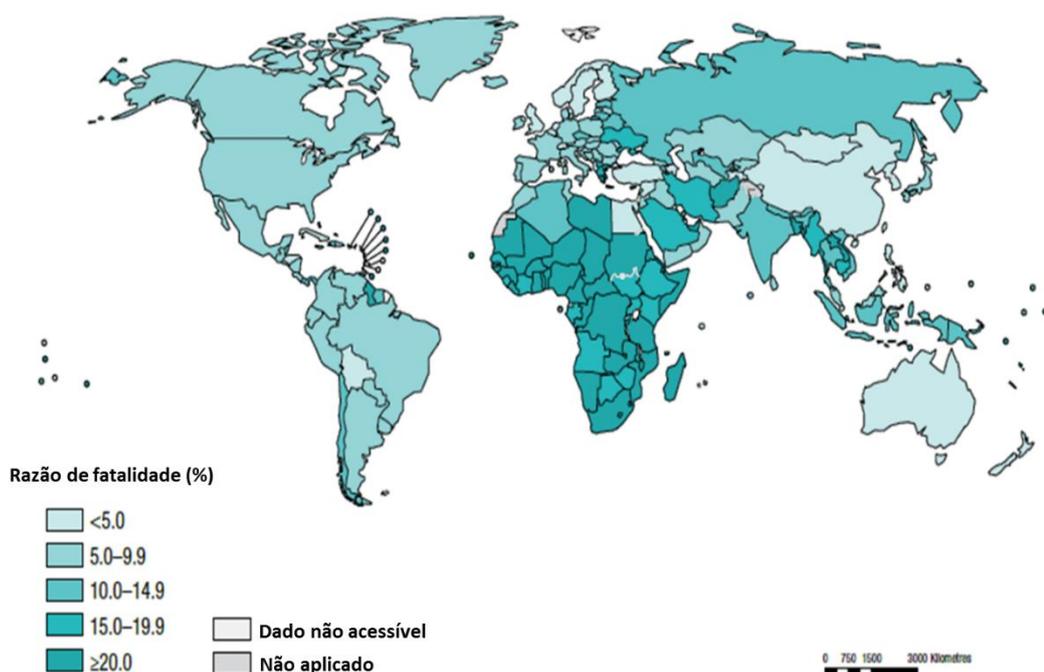


Figura 1: Letalidade da tuberculose em 2014. Proporção calculada pelo índice de mortalidade causada pela TB, incluindo mortes entre as pessoas HIV-positivas, dividido pela incidência de TB (WHO,2016).

A vacina disponível contra a tuberculose é a BCG, obtida pela atenuação de uma cepa de *Mycobacterium bovis*. Foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin no Instituto Pasteur no começo do século XX. Calmette obteve um organismo

mutado, depois de passagens *in vitro* da amostra de *M. bovis* cultivadas em batata impregnada de bile de boi (Figura 2), e Guérin observou, durante 13 anos, 230 passagens *in vitro*, nas quais se observava alterações na morfologia das colônias e perda gradual de virulência (Benévolo-de-Andrade *et al*, 2005).



Figura 2: *M. bovis* BCG cultivada em batata com bile de boi. *M. bovis* BCG Pasteur e Moreau foram cultivadas com um protocolo adaptado daquele usado por Calmette e Guérin (1908) (Fonte: Teca Galvão).

Em 1921 a vacina foi administrada pela primeira vez em humanos. Por ser uma vacina viva, diferentes condições de passagem foram utilizadas nos laboratórios de produção e a evolução *in vitro* do BCG prosseguiu ao longo das décadas. Emergiram sub-cepas distintas, incluindo a BCG Moreau que é a vacina administrada no Brasil (Liu *et al.*, 2009).

1.1.2 Diferentes BCGs: diferenças genômicas

Os diversos ensaios clínicos para avaliar a proteção conferida pela vacina BCG contra TB pulmonar, realizados a partir de 1930, mostram resultados de efetividade variando entre 0 a 80% (Grange *et al.*, 1983). As vacinas apresentam comprovada eficácia na prevenção da tuberculose pulmonar em crianças, porém, em adultos, sua eficácia é variável, devido a diferentes fatores ambientais, operacionais, demográficos e genéticos (Brosch *et al*, 2007).

cromossômicas do que as estirpes tardias, tais como BCG Praga, Glaxo, Dinamarca, Tice, Frappier, Connaught, Phipps e Pasteur (Brosch *et al.*, 2007).

A razão mais atribuída para a atenuação primária de BCG em relação a *M. bovis* é a perda do loco RD1, que foi deletado em todas as estirpes de BCG e afeta o sistema ESX-1, uma via de secreção de proteínas. Embora tenha sido demonstrado que a deleção de RD1 em *M. tuberculosis* leva à atenuação desta estirpe. Ainda assim, a complementação de BCG com esta região não restaura completamente a virulência para os níveis de tipo selvagem, sugerindo que outras mutações atenuantes podem ter ocorrido (Lewis *et al.*, 2003).

1.2 PhoP/PhoR

1.2.1 Sistema de dois componentes

Sistemas de dois componentes (SDC) são sistemas de transdução de sinais procarióticos altamente conservados que, na sua forma mais simples, consistem em um sensor histidina quinase (HK) e um regulador de resposta efetora (RR). As HKs e os RR têm uma organização de domínios conservada e seus genes comumente estão no mesmo operon. Em resposta a um sinal ambiental específico (como privação de carbono, nitrogênio ou magnésio, mudanças osmóticas ou muitos outros estímulos), a HK se fosforila e transfere o grupamento fosfato para o RR, que se torna ativado para realizar sua função de resposta (Figura 4). Na maioria dos casos, esta é a modulação da expressão gênica, geralmente por ligação ao DNA, que permite a adaptação bacteriana ao estímulo inicial (Ryndak *et al.*, 2008). Os genes regulados por um dado regulador compõem um regulon.

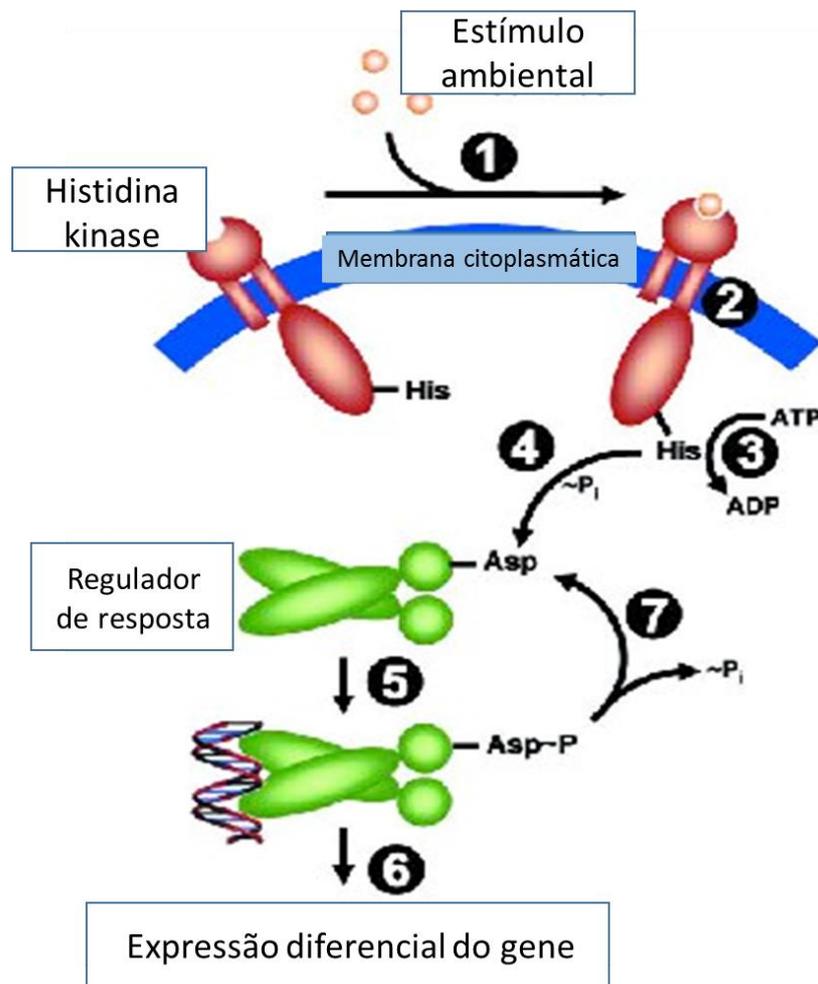


Figura 4: Esquema de um sistema de dois componentes. (Adaptado de MicrobiologyBytes, 2016)

Nos SDC micobacterianos os RR apresentam domínio de ligação a DNA, e a fosforilação aumenta a afinidade a seus sítios de ligação, permitindo mudanças na transcrição gênica (Bretl *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012).

Os SDCs são muito comuns e estão presentes em todas as bactérias. Algumas delas apresentam vários, como é o caso de *M. tuberculosis* que apresenta 11 SDC. São formados a partir dos mais variados estímulos ambientais e possuem diferentes interações entre os genes, sendo que a maioria das HK apresenta um domínio de membrana (Figura 5) (Zhou *et al.*, 2012).

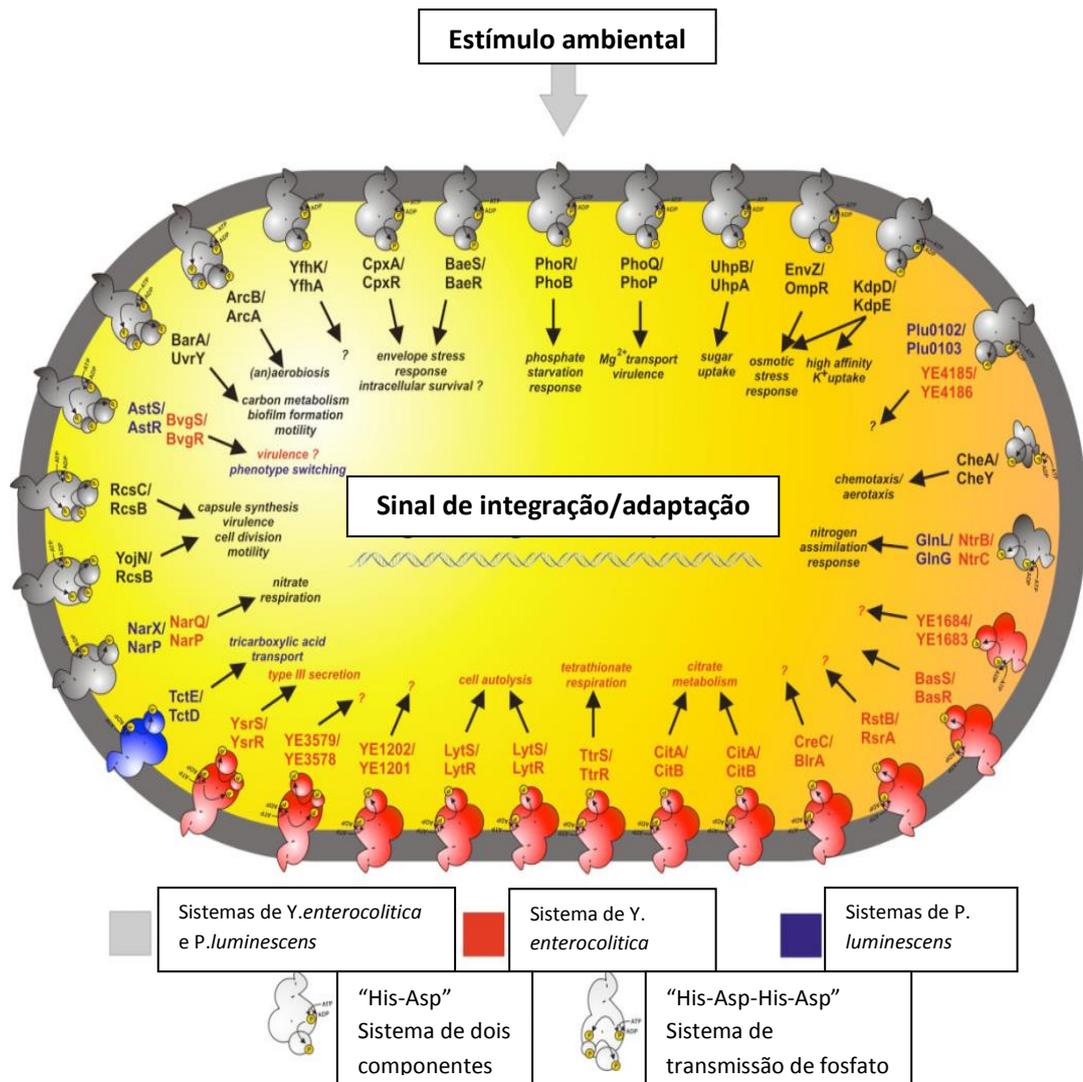


Figura 5: Diversidade de SDCs e sinais cognatos em *Y. enterocolitica* e *P. luminescens*. (Adaptado de Heermann e Fuchs, 2008)

Quando a HK vai transferir o grupamento fosfato para seu RR, ela deve de alguma forma garantir especificidade para que evite interferências prejudiciais para a transmissão de sinal dentro das células bacterianas. Para isso, existem três mecanismos: reconhecimento molecular, atividade de fosfatase e competição de substrato. O predominante é o reconhecimento molecular: a capacidade intrínseca de uma HK autofosforilada para reconhecer o seu parceiro cognato à exclusão de todos os parceiros não reconhecíveis (Podgornaia e Laub, 2013).

Os estudos funcionais e estruturais dos SDC são importantes, já que o conhecimento das interações moleculares pode impulsionar novas abordagens para descoberta de antibióticos e avanços na biologia sintética (Martinez *et al.*, 2016).

1.2.2 PhoP e PhoR – Papel na virulência de *Mycobacterium tuberculosis*

Dos SDCs no genoma de *M. tuberculosis*, PhoP/PhoR tem sido um dos mais estudados já que uma única mutação no domínio de ligação a DNA de *PhoP* resulta em atenuação. A atenuação da cepa *M. tuberculosis* H37Ra se deve a uma substituição de uma base que resulta numa alteração de um aminoácido na região de ligação de DNA de *PhoP* (Chesne-Seck *et al.*, 2008; Frigui *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008).

PhoP/PhoR é essencial para a virulência e crescimento intracelular de *M. tuberculosis*, visto que pelo menos 44 genes são regulados positivamente e 70 genes são regulados negativamente por este SDC. O regulon inclui quase 2% dos 4000 genes anotados no genoma (Walters *et al.*, 2006; Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008) e há indícios que entre os sinais que disparam sua ativação estão pH e Cl⁻, propiciando reconhecimento ao pH ácido do fagossoma e sinalizando à parada de sua fusão com o lisossoma (Abramovich *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013).

Um *Mtb* mutante sem este SDC tem defeitos de envelope celular (Xiaoyuan e Shuishu, 2014). A inativação de *phoP* resulta em atenuação de *Mtb*, elimina acumulação de alguns lipídeos complexos de parede celular (como sulfolipídeos e poliacyltrealose) (Walters *et al.*, 2006) e a secreção de ESAT-6 (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008), um fator de virulência com alto poder antigênico (Sorensen *et al.*, 1995; Harboe *et al.*, 1996). O mutante é prejudicado quando crescido em macrófagos e ratos BALB-C, no entanto, não é completamente eliminada e persiste *in vitro* em cultura de macrófagos e também em órgãos de rato (Pérez *et al.*, 2001).

A primeira vacina viva de *M. tuberculosis* a entrar em estágio clínico I de testes é um mutante *phoP* (Martin *et al.*, 2006; Arbues *et al.*, 2013).

O regulador de resposta PhoP pertence à subfamília OmpR/PhoB e é um fator de virulência essencial em *Mtb*, apresentando um alvo para o desenvolvimento de novas drogas anti-tuberculose e estirpes de vacina atenuadas. Sua estrutura é composta por um domínio receptor de N-terminal e um domínio de ligação de DNA C-terminal (Figura 6). Se liga ao DNA como um dímero de forma altamente cooperativa, reconhecendo repetições diretas de motivos de 7 pb com um espaçador de 4 pb (Xiaoyuan *et al.*, 2016).

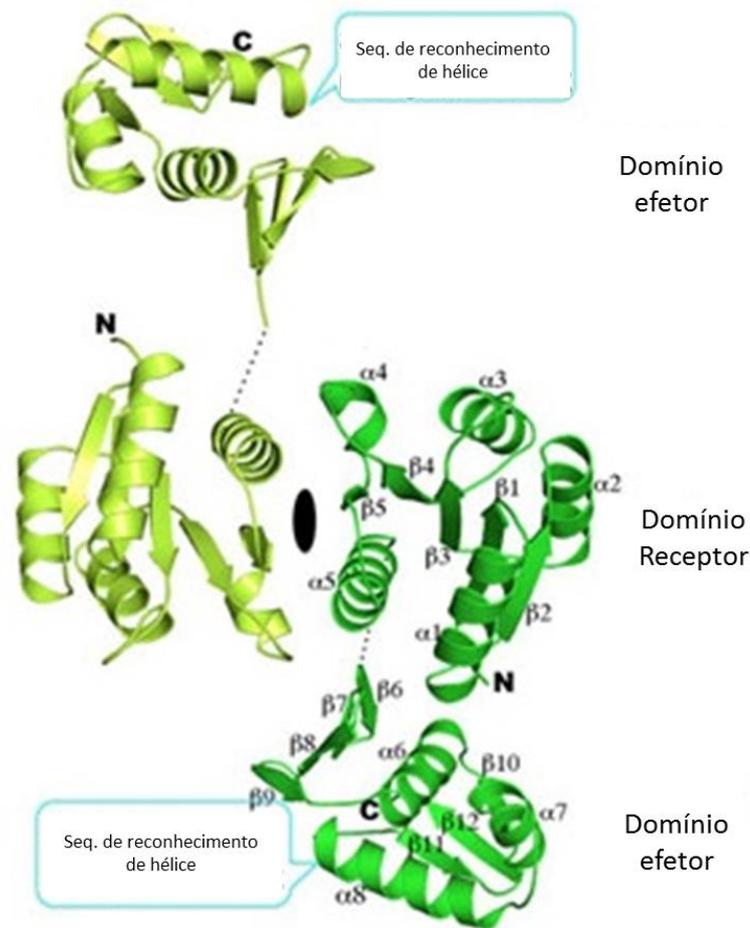


Figura 6: Estrutura tridimensional de PhoP gerado pelo programa PYMOL. Fita do dímero PhoP de comprimento total. PhoP dimeriza através de $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ do domínio receptor. Os terminais N e C para ambas as subunidades são marcados com N e C, respectivamente. Elementos estruturais secundários para uma das subunidades são rotulados (Adaptado de Menon, Wang, 2011).

No domínio receptor N-terminal ocorre a fosforilação e o recebimento de um grupamento fosfato da HK. Já no domínio C-terminal ocorre a ligação ao DNA pelo domínio hélice-volta-hélice de ligação a DNA. A fosforilação de PhoP aumenta a afinidade, mas não altera a especificidade da ligação ao DNA. (Xiaoyuan e Shuishu, 2014).

Os genes regulados positivamente por PhoP incluem os necessários para adaptação a hipóxia, os genes envolvidos na respiração aeróbica/anaeróbica, alguns dos genes da RD1, os genes que codificam as proteínas de resposta ao stress e genes envolvidos no metabolismo de lípidos. Entre os poucos genes regulados

negativamente por PhoP, encontramos o operon *ICL- fadB2-umaA1* (Figura 7) (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008).

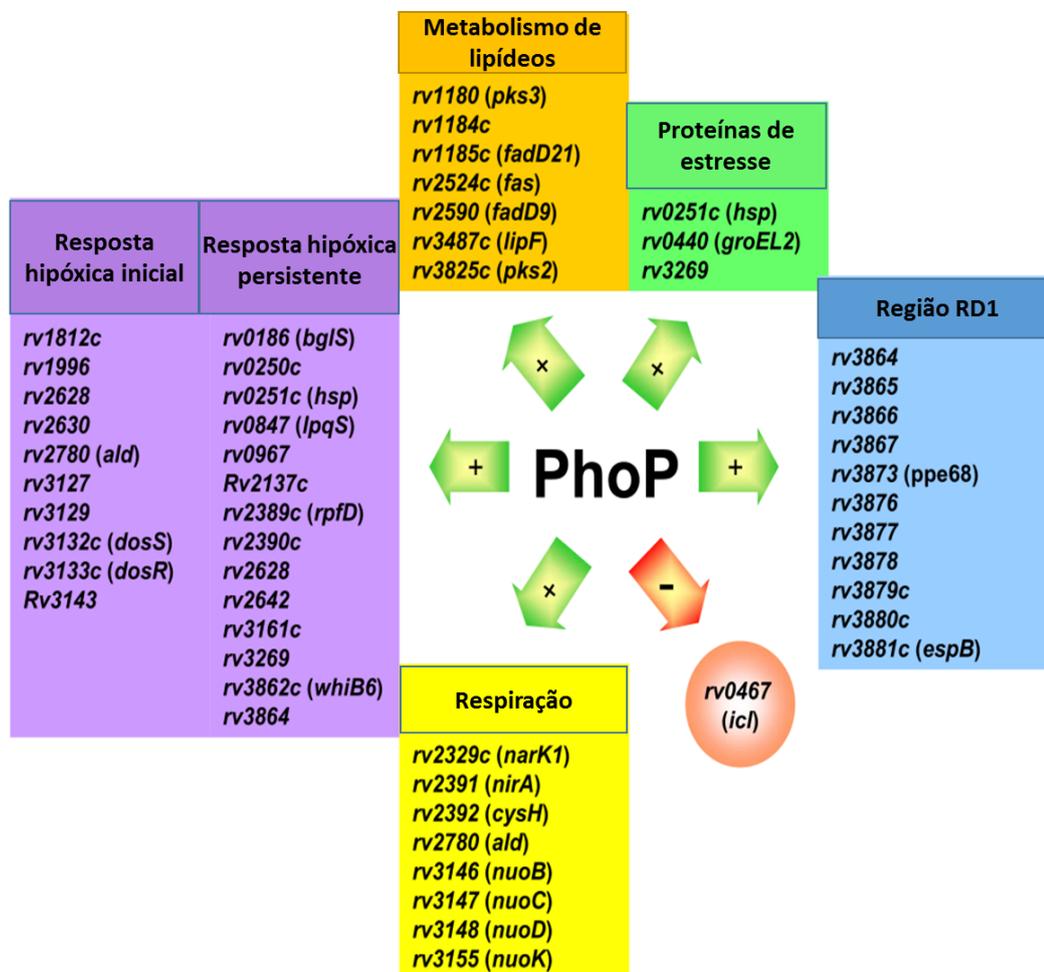


Figura 7: Regulon PhoP em Mtb. Alguns dos genes mais relevantes para a virulência e sobrevivência intracelular são listados e agrupados por função. Setas verdes e vermelhas indicam genes cuja expressão é positiva ou negativamente regulada por PhoP, respectivamente. (Adaptado de Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008).

A HK PhoR é o sensor que transmite sinais ambientais através da membrana celular por autofosforilação em seu domínio citosólico. O grupo fosfato é então transferido para o RR. Possui uma estrutura de domínio modular: um domínio sensor extracitosólico (PhoRe), um domínio transmembranar (PhoRTM), e um domínio citosólico (PhoRC). O domínio citosólico pode ser subdividido em um domínio HAMP (PhoRH), um domínio de dimerização (PhoRDD), e um domínio ATPase (PhoRa). Um domínio truncado (PhoRk) contendo ambos PhoRa e PhoRDD se espera que

tenha a atividade de kinase (Xiaoyuan e Shuishu, 2014). (Figura 8). Domínios HAMP são "regiões ligantes" encontradas em histidina kinases (H), adenilil ciclasas (A), e proteínas de quimiotaxia que aceitam metil(M) e fosfatos (P) (Hulko *et al*, 2006). Atualmente, mais de um quinto de histidina quinases e dois terços de receptores de quimiotaxia anotadas na base de dados contêm domínios HAMP(Koretke *et al.*, 2000).

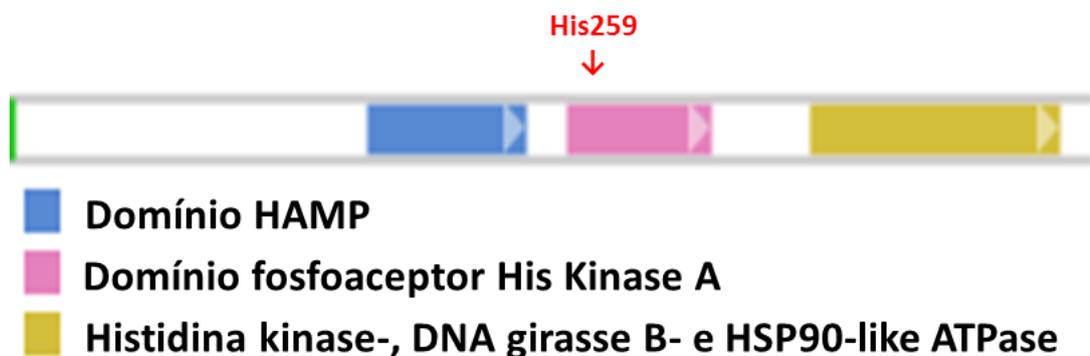


Figura 8: Estrutura do domínio citosólico da HK PhoR.(Adaptado de TBDB, 2016). A posição da histidina que é autofosforilada, His259, é indicada.

PhoPR é um regulador bem conhecido dos fenótipos patogênicos, incluindo a secreção do fator de virulência ESAT-6, a biossíntese de lipídios à base de aciltrehalose, e modulação de exportação antígeno, em membros do complexo de Mtb (MTBC). Polimorfismos evolutivamente conservados em PhoPR de *M. africanum*, *M. bovis*, ou *M. tuberculosis* H37Ra conferem perda de fenótipos funcionais. Alguns membros do complexo Mtb apresentam mutações compensatórias para neutralizar esses polimorfismos e, provavelmente, para manter o seu potencial patogênico. Algumas destas mutações de compensação incluem a inserção do IS6110 elemento a montante de phoPR numa determinada cepa de *M. bovis* que é capaz de transmitir tuberculose entre seres humanos ou polimorfismos em *M. africanum* e *M. bovis* que afetam a região reguladora do operon *espACD*, permitindo a secreção independente de *PhoPR* de ESAT-6 (Broset *et al*, 2015).

1.2.3 Alterações em Histidina Kinase

Vários estudos demonstram que alterações em histidina kinases de SDC podem desencadear diferentes consequências biológicas. Para exemplificar, podemos citar um estudo realizado em *E.coli* no qual foi identificado um mutante com deficiência de atividade fosfotransferase em que uma mutação, M228V, está localizada no domínio HAMP de CpxA (Martinez *et al*, 2016).

Segundo Martinez *et al* (2016), a modificação M228V induz localmente o aparecimento de grandes espaços vazios dentro do domínio HAMP, assim como uma perturbação do número de vazios em DHp (domínio de dimerização N-terminal e histidina fosfotransferase), desestabilizando a camada hidrofóbica entre HAMP e DHp. Os espaços vazios observados na DHp, devido à presença de duas valinas sucessivas, poderiam desempenhar um papel na abertura de CA (domínio C-terminal catalítico e de ligação a ATP) e induzir uma modificação das interações do grupamento de resíduos locais polares localizados na junção conectora de DHp e CA. Além disso, a mutação causa uma diminuição da interação de van der Waals entre as hélices alfa. O deslocamento de CA envolvido no local de auto-fosforilação é, portanto, favorecida: ele se move para além de DHp em cerca de metade das simulações no M228V *CpxA*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Definir se há alteração na atividade histidina kinase de PhoR de BCG Moreau devido à mutação específica a esta cepa, indicando assim possíveis diferenças na ativação de genes do regulon PhoP/PhoR, uma vez que não existem relatos na literatura de níveis diferenciais de expressão dos genes do regulon em BCG Moreau.

2.2 Objetivos específicos

1. Clonar, expressar e purificar a porção citoplasmática da histidina kinase PhoR de *M. bovis* BCG Pasteur e *M. bovis* BCG Moreau.
2. Clonar, expressar e purificar o regulador de resposta PhoP.
3. Produção de anticorpos policlonais de PhoP
4. Comparar as atividades de autofosforilação destas proteínas.
5. Caracterizar a capacidade de PhoR de Pasteur e Moreau de fosforilar PhoP.

(*forward* e *reverse*), e 13,5 µL de *Platinum PCR Supermix High Fidelity*. A ciclagem para reação de PCR foi a seguinte: desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 66°C, e 2 minutos a 68°C), e um passo adicional de 68°C por 4 minutos. Os fragmentos têm os seguintes tamanhos esperados: *phoP*, 744 pb e *phoRM* e *phoRP*, 882 pb.

Os resultados da amplificação foram analisados em gel de agarose 1% em TAE 1x, corado com brometo de etídio por 10 minutos, lavado em água milli Q por 10 minutos e observados no transiluminador de luz ultravioleta (240 nm) do equipamento GelDoc.

3.3 Clonagem

O vetor pET28a (Novagen) foi digerido com as enzimas de restrição Nco I e Xho I. As reações para uma enzima de restrição (Nco I ou Xho I) continham 5 µL de vetor (pET28a), 2 µL de tampão NEB 3 10x, 1 µL da enzima de restrição, 2 µL de BSA 10 mg/mL e 10 µL de água miliQ, com um volume final de 20 µL. A reação com as duas enzimas de restrição (Nco I e Xho I) continham 10 µL de vetor (pET28a), 4 µL de tampão NEB 3 1x, 1,5 µL de cada enzima de restrição, 4 µL de BSA 1 µg/mL e 19 µL de água miliQ, com um volume final de 40 µL. Incubou-se a 37°C por 1,5 h e armazenou-se a -20°C. A eficiência da digestão foi avaliada mediante eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1x, corado com brometo de etídio (10 µg/mL) por 10 minutos, lavado em água milliQ por 10 minutos e observados no equipamento GelDoc.

Os produtos de PCR foram inseridos em pET28a mediante reações de Gibson, empregando o *Gibson Assembly Master Mix* (New England Biolabs). O fornecedor recomenda uso de 0,02–0,5 pmol de fragmento de DNA para montagem de 1-2 fragmentos. As quantidades de DNA a serem usadas foram estimadas a partir da intensidade das bandas em gel de agarose, em comparação às de um padrão de peso molecular de concentração conhecida. O volume final da reação foi de 10 µL, e continha 5 µL de *Gibson Assembly Master Mix*, 5 µL de pET28a digerido, e 0,3 µL de fragmento de PCR. As amostras foram incubadas no termociclador a 50°C por 15 minutos e estocadas a -20°C.

As células eletrocompetentes foram preparadas a partir de *Escherichia coli* cepa Top10 da bacterioteca do LAGFB. O estoque foi replicado em placa de LB, sem antibiótico, para posteriormente uma colônia ser colocada em erlenmeyer com 20 mL de LB líquido. Após crescimento *overnight* com agitação (200 rpm) a 37°C, 10 mL deste cultivo *overnight* foi transferido para outro erlenmeyer contendo 190 mL de LB e a cultura foi crescida no agitador a 37°C até atingir OD_{600nm} entre 0,4-0,5, quando o erlenmeyer foi colocado em gelo por 30 minutos. Todos os procedimentos posteriores foram executados em gelo ou 4°C. O conteúdo foi dividido em 4 tubos de centrífuga de 50 mL cada e estes foram centrifugados a 2230 rpm, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 25 mL de água milliQ estéril e fria em cada tubo, juntou-se o conteúdo de forma a ter dois tubos de centrífuga com 50 mL cada, ressuspendeu-se o pellet e a centrifugação foi repetida. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com 25 mL de glicerol 10% (estéril) frio em cada tubo. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 5 mL de glicerol 10% frio em cada tubo de centrífuga, juntando em um único tubo. Centrifugou-se e desta vez, o pellet foi ressuspendido com 1 mL de GYT frio (10% glicerol, 0,125% extrato de levedura, 0,25% triptona). Fez-se uma medição espectrofotométrica a 600 nm, para a determinação da quantidade posterior de GYT a se adicionar, na diluição de 1:100 (10 µL de células com 990 µL de GYT). Centrifugou-se por 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se na quantidade adequada de GYT (volume da cultura x A₆₀₀ da diluição 1:100). Alíquotas de 50 µL foram estocadas em freezer -70°C.

As reações de Gibson foram eletroporadas, no equipamento Bio Rad Gene Pulser, com capacitância de 25 µFD, 2,5 volts e resistência de 200 OHMS, em *Escherichia coli* cepa Top10. Para isto, 1 µL de reação foi adicionado a 50 µL de células eletrocompetentes mantidas em gelo. Após eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio LB (Meio Luria-Bertani) à cubeta de eletroporação, e posteriormente, transferiu-se todo o conteúdo para um tubo de microcentrífuga, que foi incubado a 37°C por 1h na estufa para recuperação e expressão do gene de resistência pelas bactérias transformadas. As células foram plaqueadas em meio LB ágar com canamicina (50 µg/mL) e incubadas por 16 horas a 37°C.

Colônias resistentes a canamicina foram propagadas em meio líquido LB (com antibiótico) e o DNA plasmidial foi extraído de 1,5 a 3 mL de cultura usando

Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), seguindo as especificações do fornecedor. A presença de inserto foi detectada mediante PCR de colônia, usando a ciclagem já descrita na seção 3.2, e digestão com enzimas de restrição. O resultado foi avaliado por gel agarose 1% em TAE 1x, corado com Brometo de etídio por 10 minutos, lavado em água milliQ por 10 minutos e observados no equipamento GelDoc. O inserto presente nos plasmídeos foi sequenciado na Plataforma de Sequenciamento de DNA da Fiocruz (PDTIS). Para isso fez-se a reação de sequenciamento com 2 μ L de primer (FphoR, RphoR ou pET-F 1,6 μ M, no qual o pET-F anela no promotor T7, fazendo com que o inserto seja sequenciado sem contaminação), 3 μ L de água milliQ e 2,5 μ L da miniprep feita para a colônia crescida na placa após eletroporação.

3.4 Expressão de PhoRM, PhoRP e PhoP

Para expressão de cada proteína recombinante, a transformação por eletroporação foi feita inicialmente em cepas de *E.coli* BL21(DE3) (cedidas por Marcos Schwarz) utilizando os plasmídeos com inserto sequenciado. Uma colônia foi propagada em um cultivo de 10 mL (meio LB com canamicina) e foi crescida com agitação (200 rpm) a 37°C por 16 horas. Inoculou-se 50 mL de LB contendo canamicina com o volume do pré-cultivo para que a OD_{600nm} fosse igual a 0,05. O crescimento da cultura para indução foi monitorado através da DO a 600 nm. Quando as culturas atingiram 0,6 OD, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,5 mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), a partir de um estoque de 1 M. Amostras da cultura foram coletadas no tempo 0 (antes da adição do indutor) e em diferentes momentos. Também se testou a indução à temperatura ambiente. Neste caso, as células foram crescidas a 37°C até OD 0,6, transferidas para um agitador a 22°C e a indução foi feita como para 37°C.

Outras cepas de expressão de *E. coli* foram testadas: *E.coli* Origami e RosettaGami. Além do uso de outras cepas, testou-se também o meio *Overnight Express* (Merck). Para indução no meio, uma colônia foi usada para inocular 30 mL de meio, e após o crescimento com agitação por 16 h (37°C) ou 24 h (temperatura ambiente), leu-se a OD e coletou-se 4 tubos contendo 1,5 mL em cada.

O perfil de indução foi visualizado por eletroforese em géis de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). As amostras bacterianas foram resuspendidas em tampão de amostra 1x (62,5 mM Tris pH 7,5, 10% glicerol v/v, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol v/v, 0,002% azul de bromofenol) de forma que cada 10 μ l contivessem 0,2 OD_{600 nm}. Após incubação a 100°C por 3 minutos e centrifugação de 1 minuto, este volume foi aplicado em géis de SDS-PAGE 12% ou 15%. Durante a eletroforese, nos primeiros 15 minutos manteve-se a voltagem constante a 120 volts e o restante do tempo da eletroforese a 200 volts. Os géis foram corados com solução de coloração (etanol 30%, ácido acético glacial 7%, e *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,5%) e descorados com solução de descoloração (etanol 30%, ácido acético glacial 7%).

3.5 Western blot

As proteínas resolvidas em géis de SDS-poliacrilamida (12% ou 15%) foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, GE) em equipamento *Transblot SD SemiDry Transfer* (BioRad), a 15 V durante 30 minutos, segundo especificações do fabricante. Após a transferência, a membrana foi corada com *MemCode* (Pierce) para visualização e verificação da qualidade da transferência, descorada com solução *Erase* (Pierce) e em seguida bloqueada em 5% leite desnatado/TBS-Tween 20 0,1% por 3 horas com agitação. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS 1x (3 vezes por 5 min cada) e, em seguida, incubada durante 2 horas ou overnight a 4C, com agitação suave, com o anticorpo primário (anti-His – GE) na diluição 1:2500, em 5% leite desnatado/TBS-Tween 0,1%.

A membrana foi então lavada com TBS 1x/Tween 0,05% (3 vezes por 5 minutos cada) e TBS 1x (3 vezes por 5 min cada) antes da adição do anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, Pierce), diluído 1:10.000 em 5% leite desnatado/TBS 1x, incubada por mais 1 hora, com agitação suave e lavada como descrito acima. A revelação foi feita em câmara escura com o kit *Super Signal* (Pierce) e/ou com o kit *Westar supernova* (Cyanagen). A membrana foi incubada por 5 minutos com as soluções do kit, com 750 μ L de cada solução para o *Super Signal* e 400 μ L de cada solução para o *Westar*. E depois foi retirado o excesso do líquido, colocando-a no cassete com o filme por cima. Aguardou-se o

tempo necessário (as revelações feitas foram de 1, 10 e 30 minutos). O filme foi então colocado em solução reveladora (Kodak GBX) por 2 minutos, lavado com água corrente e posteriormente em solução fixadora (Kodak GBX) por mais 2 min, lavando em seguida com água corrente. Esperou-se secar para análise do resultado. Inicialmente utilizou-se o Kit Super Signal (Pierce) e caso não aparecesse o resultado desejado, utilizava-se o kit Westar supernova (Cyanagen).

3.6 Teste de solubilidade de PhoRM, PhoRP e PhoP

As amostras bacterianas após a indução da expressão da proteína recombinante foram lisadas em tampão de lise de *E. coli* (20 mM Tris-HCl pH7,5; 300 mM NaCl; 0,5% Triton X-100), no equipamento bead beater (Biospec) (3 pulsos de 1 minuto no bead beater, com descanso de 1 minuto, em gelo, entre ciclos). Amostras de lisado total (LT) foram separadas. O restante da amostra foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 15115 xg. O sobrenadante (S, fração solúvel) foi separado do precipitado (P, fração insolúvel). As frações TL e S foram precipitadas por adição de TCA para concentração final de 17%, seguido de agitação em sistema tipo *vortex* e incubação em gelo ou -20°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 15115 xg, e os precipitados lavados com acetona 1% TEA, seguido de lavagem com 1% acetona. Após secagem a temperatura ambiente, as amostras foram resuspendidas em tampão de amostra para proteínas 1x. Previamente à análise em gel de SDS-poliacrilamida, foram fervidas por 3 minutos.

3.7 Purificação de PhoP

A partir do crescimento bacteriano em placa contendo meio LB, inoculou-se 1 colônia isolada de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pEP (pET28a+ expressando a proteína PhoP de *M. bovis* BCG Pasteur) em 5 mL de meio LB com canamicina 25 µg/mL. Cultivou-se a 37°C sob agitação constante (200 rpm) durante o período de 16 hrs. Usando-se o pré-inóculo do dia anterior, fez-se um inóculo de 1% em volume final de 200 mL (2 mL), com meio LB com kanamicina 25 µg/mL. Cultivou-se sob as mesmas condições já descritas, até a cultura alcançar uma

OD_{600nm} entre 0,6-0,8. Nesse momento, induziu-se a expressão da proteína recombinante com adição de IPTG para a concentração final de 0,5 mM. Procedeu-se a indução por 16 hrs e cultivou-se sob as mesmas condições já descritas. Recuperou-se as bactérias após a indução através de centrifugação à 4°C, 3220 xg por 20 minutos. Procedeu-se a lise das bactérias utilizando-se o BeadBeater. A partir dessa etapa todos os procedimentos foram feitos no gelo, e com soluções também geladas. Para tal, o precipitado bacteriano foi ressuspensão em 10 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH7,5; 300 mM NaCl; 0,5% Triton X-100) e transferiu-se para frasco adequado do equipamento, de 30 mL, com 10 mL de suspensão bacteriana, e aproximadamente 10 mL de beads de vidro 0.1 mm. Adicionou-se as pérolas de vidro de 0,1 mm em volume similar ao da suspensão bacteriana. A lise foi feita com 3 pulsos no BeadBeater de 1 min cada, com intervalos de 1 min no gelo. Após a lise, recuperou-se cerca de 6 mL de lisado, que foi transferido para tubo em gelo. Lavou-se as pérolas com 4 mL de tampão de lise gelado, e juntou-se esse volume com o anterior, totalizando 10 mL de lisado. O lisado foi centrifugado à 4°C, 3220 xg por 20 minutos. Depois, separou-se o sobrenadante do precipitado. Como já observado em experimentos anteriores, sob as condições estudadas de indução da expressão, a proteína recombinante encontrava-se na fração insolúvel. Logo, procedeu-se à purificação da mesma a partir das proteínas presentes no precipitado após a centrifugação anterior. Inicialmente, lavou-se 3 vezes o precipitado com 10 mL de tampão de lavagem de corpos de inclusão (50 mM Tris-HCl pH8,5; 0,5% Triton X-100; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl). A lavagem foi feita com auxílio de Douncer. Após cada lavagem, centrifugou-se o material à 4°C, 3220 xg por 20 minutos. Após as lavagens, ressuspendeu-se o precipitado com solução de solubilização (8M ureia; 0,3 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH8,5) com auxílio de Douncer. Incubou-se o material em agitador do tipo “gangorra” durante 16 horas à 4°C. Após a incubação, adicionou-se 10 mL de tampão A de IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) (100 mM Tris-HCl pH7,5; 0,3 M NaCl; 5 mM imidazol) aos 10 mL de amostra, de maneira a se diminuir a concentração de ureia de 8 para 4 M. Centrifugou-se o material a 4°C, 3220 xg por 20 minutos. Preparou-se a coluna HisTrap HP 1 mL da GE Healthcare (pressão máxima de 0,3 mPa) para a purificação cromatográfica. Todas as soluções utilizadas durante a cromatografia devem ser filtradas e degaseificadas.

Tampão A com uréia: 100 mM Tris-HCl pH7,5, 0,3 M NaCl, 5 mM imidazol, 4 M uréia.

Tampão B com uréia: 100 mM Tris-HCl pH7,5, 0,3 M NaCl, 500 mM imidazol, 4 M uréia.

Adicionou-se os 20 mL de amostra em 4 M de ureia na coluna, em fluxo constante de 0,5 mL/min de tampão A. Coletou-se as proteínas não ligadas (*flowthrough*). Durante toda a purificação monitorou-se a absorvância a 280 nm e a condutância. Após a introdução da amostra na coluna, utilizou-se fluxo constante de 1 mL/min até o final da purificação. Lavou-se a coluna com tampão A com no mínimo 10 volumes de coluna (CV). Procedeu-se à eluição da proteína recombinante com um gradiente em degraus de concentrações crescentes de imidazol. Cada degrau foi de 5 volumes de coluna, e utilizou-se as seguintes concentrações de tampão B: 10%, 20%, 30%, 40% e 100%. Depois da eluição, lavou-se mais 5 volumes de coluna com tampão B. Durante toda a eluição coletou-se frações de 1 mL cada. De acordo com o cromatograma, selecionou-se as frações com absorvância a 280 nm e analisou-se a complexidade proteica em gel de poliacrilamida de 15%.

Juntaram-se as frações da purificação contendo *PhoP* em alto grau de pureza. A proteína foi dialisada para diminuir a concentração de ureia, em 500 mL de tampão (20 mM Tris-HCl pH7,5, 0,3 M NaCl, 5% Glicerol 50% vol/vol) contendo 2 M, 1 M, e 0 M ureia, com agitação a 4°C (no mínimo 2 h em cada tampão). Os tampões de diálise foram filtrados e acrescentou-se Triton 0,1M.

Uma nova purificação foi feita com a utilização de coluna de níquel, empacotada manualmente para purificação por fluxo gravitacional. 2 mL de resina *Chelating Sepharose Fast Flow* (Pharmacia) (50% slurry: 50% etanol 20% e 50% resina vol/vol) foram depositado delicadamente em uma coluna de plástico com capacidade de 10 mL, produzindo uma coluna de 1 mL. Efetuou-se a lavagem com 5 volumes de água miliQ, 5 volumes de 100 mM EDTA pH 8, 10 volumes de água miliQ, 5 volumes de 1 M imidazole, 5 volumes de Água MiliQ e 5 volumes de tampão de lavagem 1 (10 mM Tris-HCl pH7,5, 5% Glicerol 50% vol/vol, 50 mM NaCl, 0,1%

Triton vol/vol e 10 mM imidazole). Após a coluna empacotada e equilibrada, a proteína foi aplicada. Realizou-se a lavagem, primeiramente, com 5 volumes de coluna do Tampão de lavagem 1, e depois com 5 volumes do tampão de lavagem 2. (10 mM Tris-HCl pH7,5, 5% Glicerol 50% vol/vol, 50 mM NaCl, 0,1% Triton vol/vol e 50 mM imidazole). Realizou-se a eluição com 5 volumes de Tampão de Eluição 1, depois 5 volumes com o tampão de eluição 2 e por último 5 volumes com tampão de eluição 3. Coletou-se amostras de 1mL. 15 µL de cada passo da purificação (mais 5 µL de tampão de amostra para proteínas 4x) foram aplicados em gel de SDS-PAGE 15%.

3.8 Quantificação da proteína por método Qubit Protein Assay Kit

Seguindo as instruções do fabricante, fez-se, inicialmente, a solução A (199 µL Buffer e 1 µL reagente, vezes 5, totalizando 995 µL de Buffer e 5 µL reagente). Para a curva, fez-se a solução B (190 µL solução A + 10 µL reagente #1), a solução C (190 µL solução A + 10 µL reagente #2) e a solução D (190 µL solução A + 10 µL reagente #3). Para a amostra, colocou-se 199 µL de solução A + 1 µL da amostra. Agitou-se em sistema tipo *vortex* e incubou-se por 2 minutos a temperatura ambiente. No aparelho, calibrou-se a curva com as soluções padrões preparadas, seguida da leitura da amostra.

3.9 Produção de anticorpos policlonais contra rPhoP em camundongos

Para a produção de anticorpos policlonais, foram utilizados 5 camundongos BALB-C (licença CEUA L-020/2016 - IOC). Foram realizadas 3 inoculações de 10 µg de antígeno, com tempo de 2 semanas entre as doses. Nas duas primeiras inoculações 500 µL de rPhoP purificada (0,2 µg/µL) e 500 µL de Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma) foram agitados em sistema tipo *vortex* por cerca de 1 hora, para depois proceder-se à inoculação intraperitoneal de 100 µL de mistura em cada camundongo. A terceira inoculação foi feita com a proteína na presença

apenas de PBS (500 μ L PhoP + 100 μ L PBS 10x + 400 μ L água Milli Q), injetando também 100 μ L.

3.10 Potencialização da resposta imune com reforço de *rPhoP*

Após a observação da resposta dos camundongos, uma nova inoculação foi realizada. Dessa vez, também com proteína e PBS, fez-se inoculação de 100 μ L nas vias intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Aguardou-se 96 horas para proceder à sangria total.

3.11 Verificação da eficiência de imunização através de western blot

Inicialmente preparou-se um gel de poliacrilamida 15% com o pente único, e aplicou-se o marcador pré corado *Page Ruler* (Thermo Scientific) no primeiro poço e a proteína recombinante purificada no outro. Aplicou-se 37,5 μ L de proteína e 187,5 μ L tampão de amostra de proteína 1X com SDS, totalizando 225 μ L. Após eletroforese à voltagem constante de 200V, transferiu-se as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (a transferência foi realizada segundo protocolo descrito na seção 3.5 da metodologia.) Após a transferência, a membrana foi corada com MemCode (Pierce) para visualização e verificação da qualidade da transferência, descorada com Erase (Pierce) e em seguida bloqueada em 5% leite desnatado/TBS-T0,1% por 2 horas com agitação. Após o bloqueio a membrana foi lavada com TBS-T 0,1% três vezes e depois com TBS 1x mais três vezes. Com um bisturi cortou-se tiras de 0,5 cm de largura cada, e cada uma foi colocada numa caixa dividida e adicionada TBS para não ressecá-la. Foram cortadas 7 tiras: Camundongos de 1 a 5, controles negativos (sem anticorpo primário) e positivo (anti-his).

Com a membrana pronta, no biotério pingou-se o colírio anestésico (cloridrato de tetracaína 1%, cloridrato de fenilefrina 0,1%, Allergan) a um dos olhos de cada camundongo e com uma pipeta pasteur retirou-se um pequeno volume de sangue que foi colocado em um tubo de microcentrifuga. Após o procedimento, passou-se a pomada Epitezan (acetato de retinol 10000UL, aminoácidos 2,5%, metionina 0,5%, cloranfenicol 0,5%, Allergan) no olho. O sangue foi incubado por 30

minutos a temperatura ambiente para que houvesse a coagulação e posteriormente centrifugou-se a 2000 rpm. Coletou-se o sobrenadante (soro).

Incubou-se as tiras previamente preparadas com o anticorpo primário (soros coletados). A solução do anticorpo primário foi preparada como já descrito, porém com adição de extrato de *E.coli*, que é uma cultura lisada da bactéria crescida até a metade da fase log, com OD_{600nm} entre 0,4-0,6, para concentração final de 2,5% (v/v). Para cada tira foram adicionadas 500 µL de solução de anticorpo primário. Para um título de anticorpo de 1:1000, 0,5 µL do soro de cada camundongo foi adicionado na membrana correspondente. No controle negativo somente o leite foi adicionado e no positivo acrescentou-se 0,3 µL de anti-his (título de 1:3000). A incubação foi realizada com agitação em gangorra a 4°C por 16 horas. Após a incubação com anticorpo primário, foram então realizadas as lavagens (TBS-T 0,1% e TBS, três vezes cada) e a incubação com o anticorpo secundário anti-mouse (1:10000). Foram preparados 10 mL de 5% leite desnatado TBS-T 0,1% com 1 µL do anticorpo. A incubação foi feita por 1 hora e as lavagens foram novamente feitas (TBS-T 0,1% e TBS, três vezes cada). A revelação do western blot foi feita como já descrita na seção 3.5 da metodologia.

3.12 Sangria total dos camundongos

Foi aplicado em cada camundongo um anestésico de modo a sedar e paralisar o animal enquanto o coração continuasse batendo. Com uma seringa, o sangue foi retirado do coração lentamente (para não colabar) e colocado em um tubo de microcentrífuga. Após a retirada total do sangue, eutanasiou-se os camundongos por deslocamento cervical. O sangue foi então deixado na geladeira por 16 hrs para que houvesse a coagulação. Centrifugou-se a 0,4 xg; o soro (sobrenadante) foi recolhido e armazenado na geladeira. Um novo teste de anticorpos, com as tiras da membrana, foi realizado numa titulação de 1:1000, para observar a resposta dos camundongos.

3.13 Teste de titulação do anticorpo para cada camundongo

Inicialmente foi feito o gel, transferência para a membrana de nitrocelulose, e cortadas as tiras como já descrito na seção 3.12. Incubou-se as tiras previamente preparadas com o anticorpo primário (soros coletados). A solução do anticorpo primário foi preparada como já descrito, só que com adição de extrato de *E.coli* para concentração final de 2,5% (v/v). De acordo com a resposta dos camundongos, foram guardados três “pools” de soros que foram testados em titulações diferentes (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000). Foi feita uma diluição seriada com volume inicial de 1 mL com adição de 4 μ L de soro. Deu-se continuidade seguindo o procedimento também descrito na seção 3.12.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem de *phoP* e *phoR*

As características dos genes de *phoP* e *phoR* e as proteínas por eles codificadas estão descritas na Tabela 2. A região N terminal de PhoR é ancorada na membrana citoplasmática, dificultando sua expressão e purificação devido aos aminoácidos hidrofóbicos. Como descrito em Gupta *et al.* (2006), é possível expressar e purificar a região citoplasmática de PhoR (aminoácidos 193 a 485). Desta forma, esta é a região de *phoR* a ser clonada.

Tabela 2: Dados sobre os genes e proteínas do trabalho: Número de nucleotídeos dos genes, aminoácidos e tamanho da proteína para *phoP*, *phoR*, e cPhoR.

	Genoma			Plasmídeo		
	DNA (nt)	Proteína (aa)	Proteína (Da)	Produto de PCR (pb)	Proteína recombinante (aa)	Proteína recombinante (Da)
<i>phoP</i>	744	247	27514	793	256	28636
<i>phoR</i>	1458	485	52018	-	-	-
<i>phoR</i> C terminal	882	293	31284	931	303	32637

Para clonagem dos genes *phoP* (*phoP*) e da região de *phoR* codificando a porção citoplasmática de BCG Moreau (*phoRM*) e de BCG Pasteur (*phoRP*) foram desenhados oligonucleotídeos que permitissem a amplificação por PCR destas regiões e sua introdução no plasmídeo de expressão pET28a. Para minimizar a introdução de mutações durante a amplificação, utilizou-se polimerase de alta fidelidade (Platinum PCR SuperMix High Fidelity, Life Technologies) e 66°C como temperatura de anelamento. A amplificação de fragmentos com o tamanho esperado para *phoRM* e *phoRP* (842 pb) ocorreu nesta temperatura, porém não a de *phoP* (Figura 9a). Foi testado então um gradiente de temperaturas de anelamento (60°C,

63,3°C, 69,7°C e 72°C), com o aparecimento da banda de tamanho esperado para o fragmento *phoP* (744 pb) em todas as temperaturas (Figura 9b).

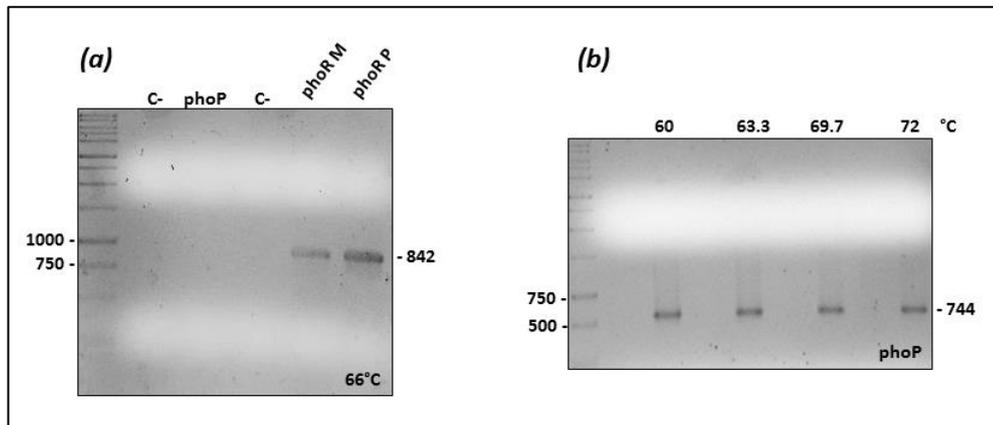


Figura 9. Amplificação por PCR dos fragmentos *phoP* e *phoR*. A) Amplificação de *phoRM* e *phoRP* com temperatura de anelamento de 66°C. Tamanhos esperados para *phoRM* e *phoRP*: 842 pb. C-, reação sem DNA molde. B) Amplificação por PCR de *phoP* com gradiente de temperaturas de anelamento. O gradiente testado (60°C, 63,3°C, 69,7°C e 72°C) resultou no aparecimento de bandas com o tamanho esperado de 744 pb.

O vetor selecionado, pET28a (Figura 10), é o sistema de expressão de proteínas em *E. coli* mais utilizado, uma vez que a transcrição a partir do promotor T7 é induzível e produz grande quantidade de proteínas. O vetor apresenta vários sítios de restrição que permitem a clonagem em fase dos genes de interesse, compondo uma MCS. Selecionamos os sítios de restrição NcoI e XhoI para a inserção dos fragmentos *phoP* e *phoR*, com geração de proteínas recombinantes contendo cauda de histidinas na região C-terminal (Figura 11). Os vetores com genes *phoRM* e *phoRP* serão chamados de pERM e pERP respectivamente, assim como o *dephoP* será chamado de pEP.

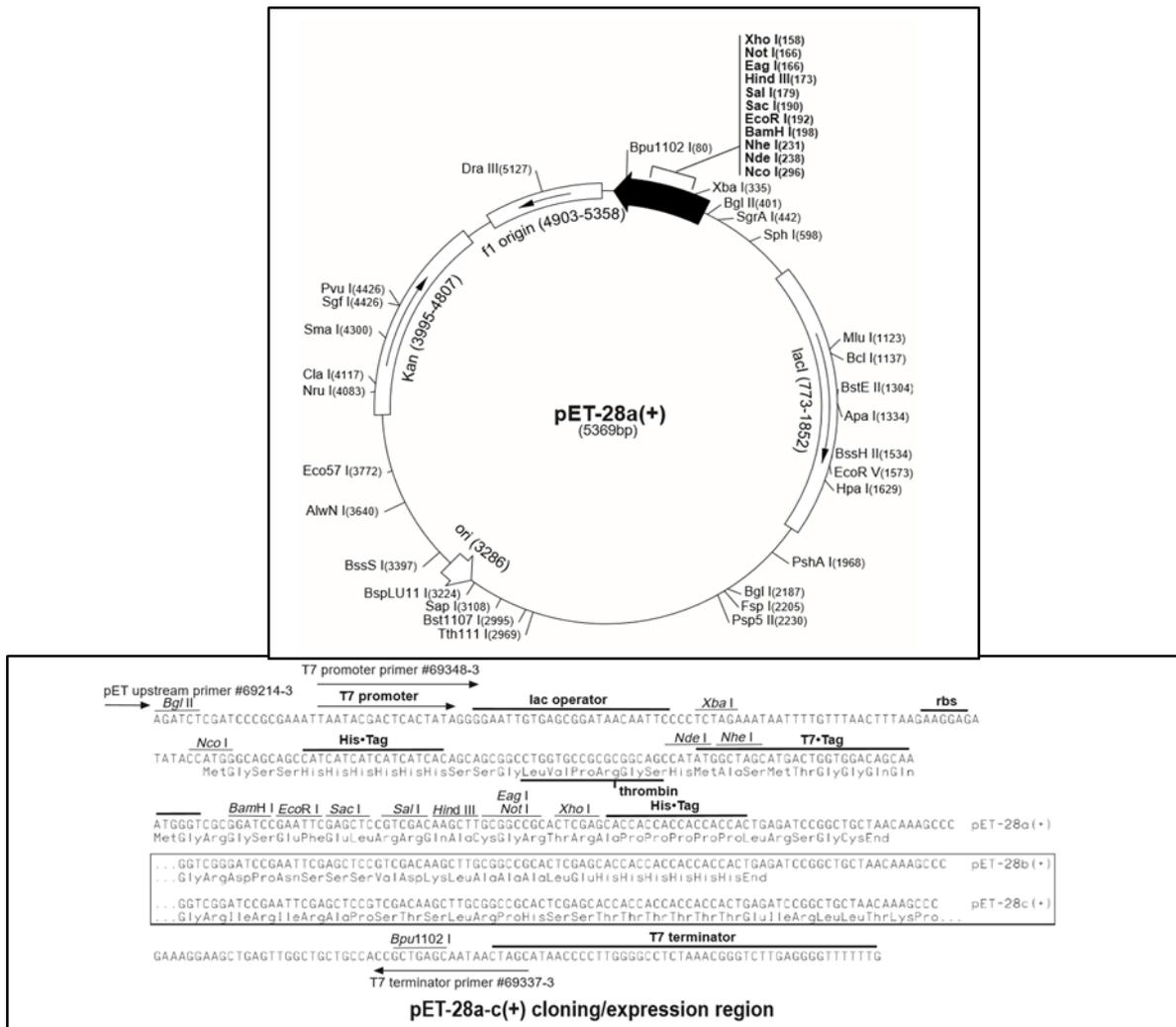


Figura 10. Vetor pET28a e sequência de seu promotor e MCS.

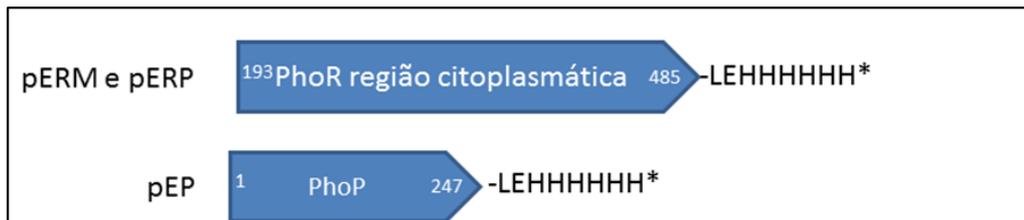


Figura 11: Proteínas a serem produzidas após clonagem dos respectivos fragmentos em pET28a. Para PhoR a clonagem é da região citoplasmática (aminoácidos 193-485) e PhoP a proteína completa (aminoácidos 1-247).

O plasmídeo pET28a, contendo 5.369 pares de bases, foi preparado para clonagem por digestão com enzimas de restrição (NcoI-XhoI), visualizada em gel de agarose 1% em TAE (Figura 12). A digestão com NcoI ou XhoI resultou em linearização do vetor, e a digestão com as duas enzimas gerou a banda que deve, portanto, ser resultado de digestão eficiente pelas duas enzimas. Contudo, as bandas obtidas estavam mais próximas de 6.000 pb, em vez do esperado 5369 pb, o que pode estar relacionado a uma migração distorcida na região. Um tempo maior de eletroforese ou o uso de um gel de menor porcentagem de agarose poderia resolver melhor fragmentos nesta faixa de tamanho.

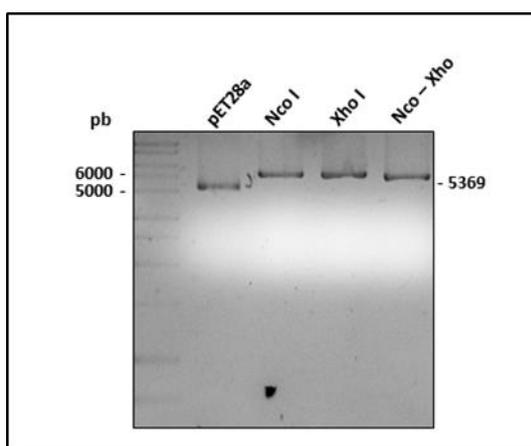


Figura 12: Digestão de pET28a com NcoI e XhoI. O plasmídeo pET28a foi digerido com enzimas de restrição e o DNA foi visualizado em gel de TAE 1x - agarose 1%.

A inserção dos fragmentos de PCR no plasmídeo pET28a digerido foi feita mediante uso da reação de Gibson (Gibson *et al.*, 2009), onde três enzimas (uma exonuclease, uma DNA polimerase e uma DNA ligase) usam as regiões complementares entre os fragmentos de DNA e catalisam a formação de ligações fosfodiéster entre os fosfatos das cadeias de DNA presentes na reação (plasmídeo e insertos). A eletroporação das reações de Gibson em *E. coli* Top10 produziu colônias resistentes à canamicina, algumas das quais foram usadas em reações de PCR com os primers do inserto. As colônias a partir das quais foi possível amplificar inserto foram usadas para inocular culturas em meio líquido, a partir das quais foi feita preparação de plasmídeo (miniprep) pelo método de lise alcalina. Os plasmídeos foram usados para “digestão diagnóstica”, em que a presença, posição e direção do inserto são checadas. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas

AflIII, ou BglIII, ou NcoI-XhoI, e os fragmentos obtidos eram dos tamanhos esperados. A Figura 13 mostra o resultado da digestão para pERM; a de pERP teve resultado equivalente. Para PhoR, a digestão por AflIII gerou fragmentos de 2.101pb e 4.017pb. BglIII lineariza formando uma banda de 6.118pb. NcoI-XhoI gera quatro fragmentos de 5.231pb, 620pb e mais dois que não aparecem no gel por serem de baixo peso molecular. Para PhoP, AflIII gera fragmentos de 1481pb, 2101pb, 2395pb. BglIII lineariza formando uma banda de 5.977pb e NcoI-XhoI gera um fragmento de 5.231pb e um outro de 746pb. As bandas visualizadas no gel após ocorrer a digestão são diferentes do vetor pET28a, que sem o inserto teria gerado banda de 5.369pb.

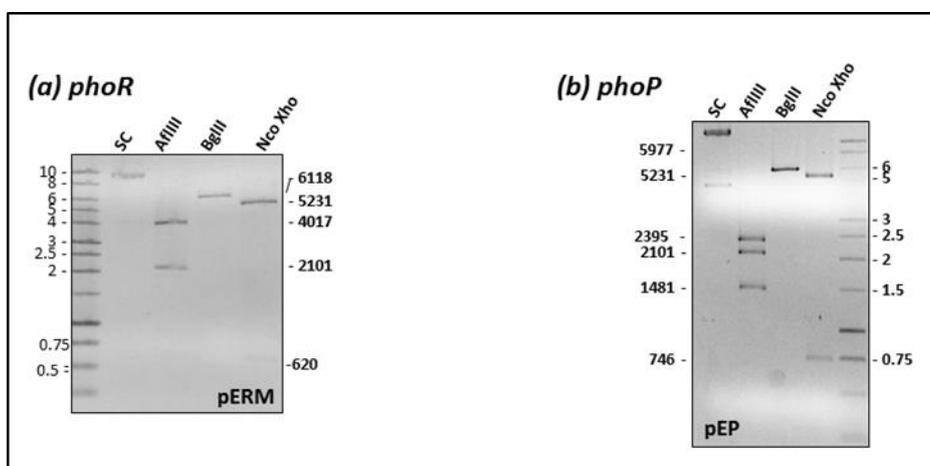


Figura 13: Diagnóstico da clonagem de *phoR* e *phoP* por digestão com enzimas de restrição. Os plasmídeos foram incubados com as enzimas de restrição e as digestões foram aplicadas em gel de TAE 1X – agarose 1%. SC, sem cortar. O marcador foi Promega 1Kb. Os tamanhos dos fragmentos esperados para cada digestão estão sinalizados.

Os resultados foram confirmados por sequenciamento dos plasmídeos. Para *phoRM* foi detectada a mutação específica da cepa BCG Moreau a525g/D322G em todas as minipreps e para *phoRP* não houve presença de nenhuma mutação, como esperado, podendo então dar prosseguimento para a expressão. Já para *phoP*, foram encontradas sequências com mutação. Em 3 minipreps foi encontrada a mutação a427g/N143D e em uma a mutação t575c/V192A, o que não era esperado, uma vez que foi utilizada uma DNA polimerase de alta fidelidade. Sequenciamos a

reação de PCR e a sequência obtida não mostrou bases com alteração. O mesmo PCR foi usado novamente em reações de Gibson, transformado, e os clones sequenciados apresentaram inserto sem mutação em *phoP*.

A Tabela 3 apresenta os dados referentes ao número de colônias (cfu, *colony forming units*) obtidas após eletroporação das reações de Gibson, número de colônias a partir das quais foram feitas minipreps, número de digestões diagnósticas, e que foram sequenciadas.

Tabela 3. Resumo dos resultados de clonagem, digestão por enzima de restrição, e sequenciamento. Resultados obtidos no processo de obtenção dos plasmídeos pERM, pERP e pEP, demonstrando o número de colônias obtidas após eletroporação das reações de Gibson em *E. coli* Top10; o número de minipreps feitas em colônias resistentes à canamicina; número de digestões diagnósticas e resultados do sequenciamento de DNA.

Gene	#cfu	Miniprep	Digestão	Sequência esperada	Sequência inesperada
phoRM	3	3	3	3	0
phoRP	50	3	3	3	0
phoP	23	9	3	4	4

4.2 Expressão de PhoR

Para expressão das proteínas inseriu-se os plasmídeos pERM e pERP na cepa *E. coli* BL21 DE3, que apresenta o gene da RNA polimerase do fago T7 no cromossomo. Neste sistema, a expressão desta RNA polimerase é regulada pelo repressor Lacl, de forma que os genes clonados nos vetores pET são induzidos na presença de IPTG. A condição padrão de teste de expressão foi 37°C em meio LB com agitação de 200 rpm. As culturas foram crescidas até OD 0.6, quando foram induzidas com IPTG 0,5 mM. Amostras foram coletadas antes da indução (NI, não induzido) e após intervalos. Aplicando as amostras em géis de SDS-PAGE 15% e corando com Coomassie Blue R250, não foi observada a indução em grande

quantidade de uma proteína de massa molecular esperada (32,6 kDa) (Figura 14a). O controle positivo utilizado (C+, expressão em *E. coli* BL21 DE3 de *rv1373* clonado em pET28a; plasmídeo de M. Schwarz) mostra que as condições de indução estão funcionando. Porém, as amostras de pERM e pERP apresentam uma banda tênue (indicada com uma seta) que não é observada na amostra não-induzida do controle positivo. Ao fazer um western blot com as amostras e uso de anticorpo anti-cauda de histidinas, foram observadas bandas de massa molecular próximas à esperada, mas em baixa quantidade (Figura 14b). Desta forma, nesta condição experimental, a expressão de PhoR parece ser basal, inclusive antes de indução por IPTG.

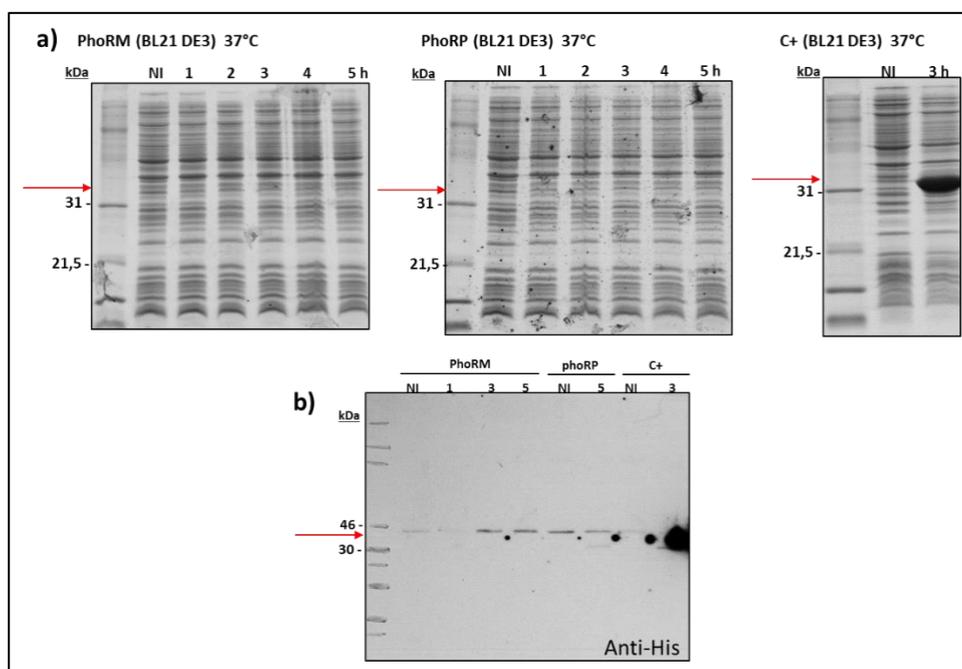


Figura 14. Expressão de PhoR em *E.coli* BL21 DE3 a 37°C. A) Expressão de PhoRM, PhoRP, e C+. NI: não induzido; 1-5, número de horas após indução; marcador Broad Range (Biorad). As amostras foram aplicadas em géis de SDS-PAGE 15%, e após eletroforese estes foram corados com Coomassie Blue R250. Uma leve ou tênue banda que pode corresponder a PhoRM e PhoRP é indicada pela seta vermelha. B) Western Blot com utilização de anticorpo anti-cauda de histidina, indicando pouca presença de proteína próxima ao tamanho esperado (32,6 kDa).

Como é necessária uma grande quantidade de proteínas para realizar a purificação, modificaram-se as condições nos protocolos no intuito de aumentar a

expressão. PhoRM e PhoRP foram então induzidas na mesma cepa de *E.coli* BL21DE3 com modificação da temperatura de indução: 22°C (TA, temperatura ambiente). Nos géis de SDS-PAGE 15% não foi visualizada nenhuma banda induzida após adição de IPTG (Figura 15a). No Western Blot, houve aparecimento de banda no tamanho esperado (como a 37°C), mas em níveis basais e aparentemente constantes, não mostrando expressão induzível (Figura 15b).

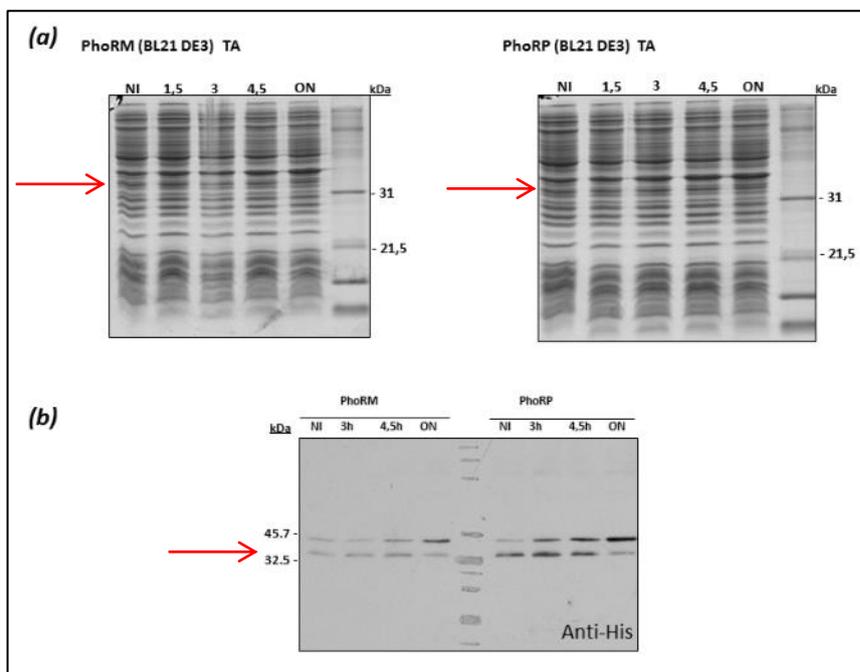


Figura 15. Expressão de PhoR em *E.coli* BL21 DE3 a temperatura ambiente. A) Géis de SDS-PAGE 15% corados com Coomassie Blue R250. Marcador Broad Range (Biorad). B) Western Blot com utilização de anticorpo anti-cauda de histidina. NI (Não induzido), 3h, 4,5h e ON (overnight). Marcador Page Ruler (Thermo Scientific).

Modificou-se novamente a condição, utilizando uma cepa diferente à inicial, sendo de *E. coli* Rosetta Blue DE3, mantendo a temperatura de 37°C. A cepa Rosetta Blue pode potencializar a expressão de proteínas heterólogas já que expressa tRNAs raros em *E.coli* (Catálogo da Merck). Nos géis de SDS-PAGE 12% não foi visualizada nenhuma banda do tamanho esperado (Figura 16a) e no Western Blot houve aparecimento de banda no tamanho esperado, assim como bandas adicionais, possivelmente de multímeros de PhoR, mostrando que não tem expressão induzível, mas aparece de forma basal (Figura 16b). As bandas de massa molecular mais altas poderiam corresponder a multímeros de PhoR. Uma vez que os

tRNAs raros são expressos desde um plasmídeo com origem de replicação compatível com a do pET28a, o crescimento destas cepas deveria ter sido feito na presença do antibiótico adicional. Como isto não foi feito, não é possível afirmar se PhoR pode ser expresso em maior quantidade e na forma solúvel nesta cepa. O resultado então, torna-se igual ao anterior

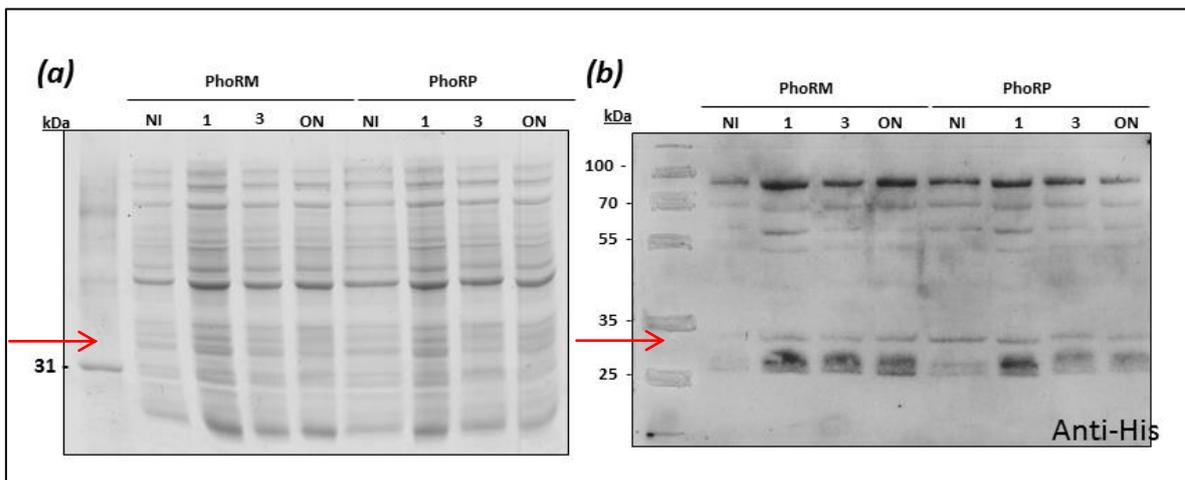


Figura 16. Expressão de PhoR em *E.coli* Rosetta Blue DE3 a 37°C. A) Demonstração dos géis de SDS-PAGE 12% corados com Coomassie Blue R250 B) Western Blot com utilização de anticorpo anti-his, indicando presença de proteína próxima ao tamanho esperado (32,6Kda) e de bandas adicionais, possivelmente multímeros de PhoR. O marcador usado é o Broad Range (BioRad).

4.3 Expressão de PhoP

O tamanho esperado da proteína é de 28,6 KDa e para a indução inicial de PhoP, realizada na cepa *E.coli* BL21 DE3 a 37°C, fez-se o teste de solubilidade para avaliar se a proteína produzida de forma basal está presente na fração solúvel ou insolúvel (Figura 17).

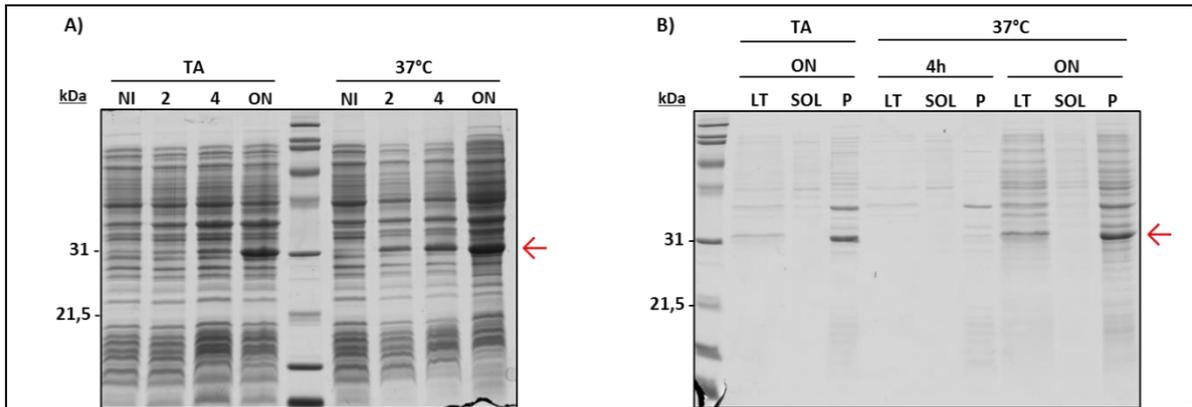


Figura 17. Expressão de PhoP em *E.coli* BL21 DE3 aTA e 37°C. A) Gel de SDS-PAGE15% corado com Coomassie Blue R250, seta em vermelho indicando banda acumulada após indução. B) Teste de solubilidade, indicando presença de proteína na fração insolúvel, com a banda próxima ao tamanho esperado (28,6 kDa). TA: temperatura ambiente; ON: overnight; LT: lisado total; SOL: fração solúvel; P: fração insolúvel. O marcador foi Broad Range (Biorad).

A cunho de obter confirmação a respeito de onde as proteínas se encontravam, foi realizado um Western Blot (Figura 18) utilizando o kit Westar supernova (Cyanagen), que é mais sensível, uma vez que não houve observação de bandas no kit Super Signal (Pierce). A incubação com o anticorpo anti-histidina mostrou bandas na região de massa molecular esperada para PhoP, majoritariamente na fração insolúvel.

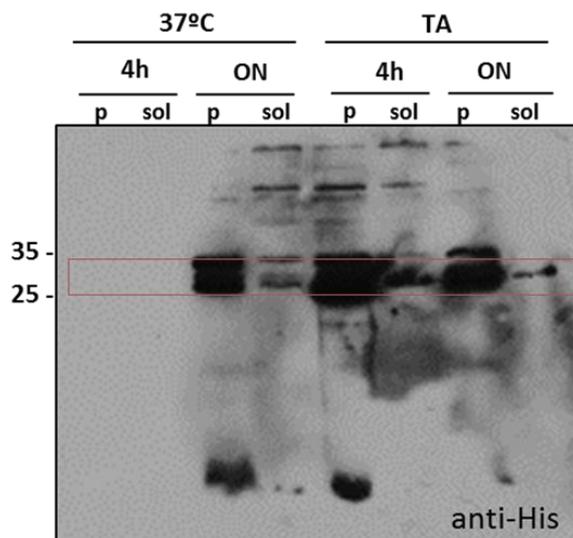


Figura 18. Western Blot da expressão de PhoP em *E.coli* BL21 DE3 à TA e 37°C. SOL: fração solúvel; P: fração insolúvel. A caixa vermelha indica a banda próxima ao tamanho esperado (28,6 kDa). Tempo de exposição de 1 hora e revelação com o kit Westar supernova.

4.4 Testes de expressão em diferentes cepas de *E. coli*

As modificações realizadas no protocolo de indução de PhoP e PhoR não levaram à produção de proteína solúvel. Desta forma, foram testadas mais condições de expressão: diferentes meios (LB e Overnight Express) e cepas (*E. coli* Origami DE3 e *E. coli* Rosetta DE3).

O meio overnight express (Novagen) apresenta um sistema de auto-indução, que permite a expressão regulada da proteína em *E.coli*, sem monitorar a cultura ou a adição de indutor do crescimento celular. A cepa *E.coli* Origami apresenta mutações no sistema redox da bactéria (nos genes tioredoxina redutase, *trxB*, e glutatona redutase, *Gor*, que aumentam a formação de ligação dissulfeto no citoplasma de *E. coli*). A cepa *E.coli* Rosetta combina as vantagens de duas cepas, Rosetta e Origami, melhorando a formação de ligações dissulfeto no citoplasma através de mutações no sistema redox, e potencializando a expressão de proteínas heterólogas já que expressa tRNAs raros em *E. coli*. O uso de cepas que devem aumentar a formação de pontes dissulfeto no citoplasma pode ser particularmente positivo para expressão de PhoR, já que a porção citoplásmica apresenta 20 cisteínas.

Para PhoP testada no meio overnight express com as cepas de *E.coli* Origami e Rosetta, conseguiu-se observar a indução (Figura 19a) e novamente, uma maior parte concentrada na fração insolúvel (Figura 19b).

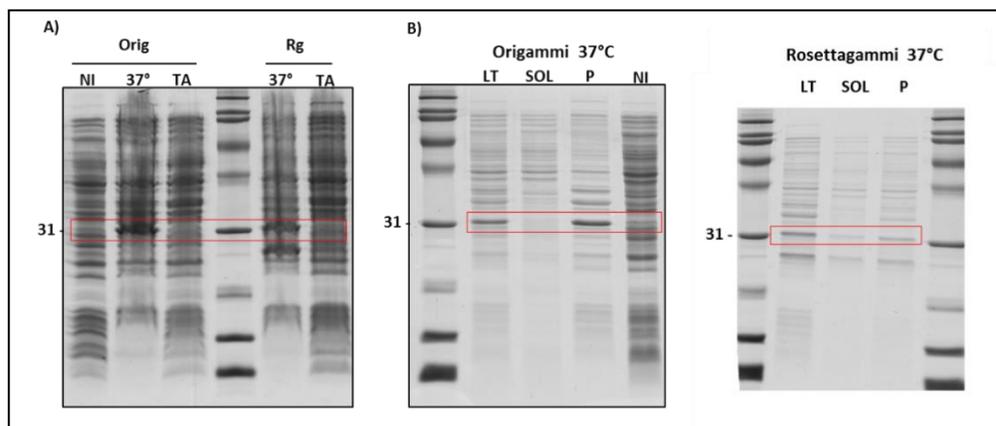


Figura 19. Expressão e teste de solubilidade de PhoP em *E.coli*Origami DE3 e Rosetta DE3 aTA e 37°C. A) Expressão de PhoP, em gel de SDS-poliacrilamida 15% corados com Coomassie Blue R250. B) Teste de solubilidade de PhoP. TA: temperatura ambiente; ON: overnight; LT: lisado total; SOL: fração solúvel; P: fração insolúvel. O marcador foi Broad Range (Biorad).A banda acumulada após indução a 37°C próxima ao tamanho esperado de PhoP (28,6Kda) está marcada em vermelho.

Para PhoR, no meio LB, as mesmas condições foram testadas e a expressão mais abundante aconteceu na cepa de *E.coli*Rosetta DE3 (Figura 20a). Ao realizar o teste de solubilidade, a fração solúvel continha uma banda intensa de massa molecular aproximada à esperada para PhoR (Figura 20b). Porém, ao realizar o Western Blot, as bandas detectadas pelo anticorpo anti-His estavam na fração insolúvel(Figura 20c). As bandas que aparecem no gel e no WB apresentam tamanhos parecidos, mas abaixo do esperado, de 32,6KDa. Não foi possível repetir este experimento para averiguar o porquê da diferença na fração em que PhoR se encontra entre o gel e o WB.

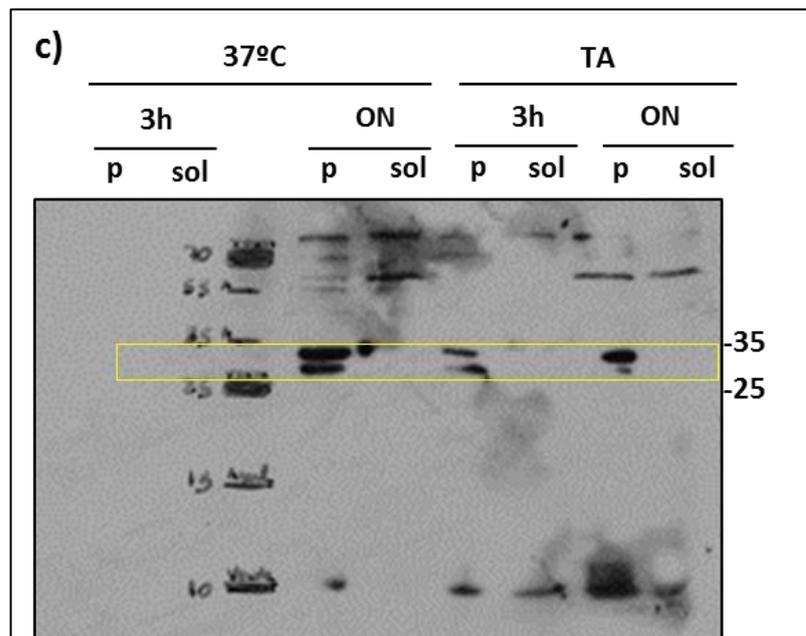
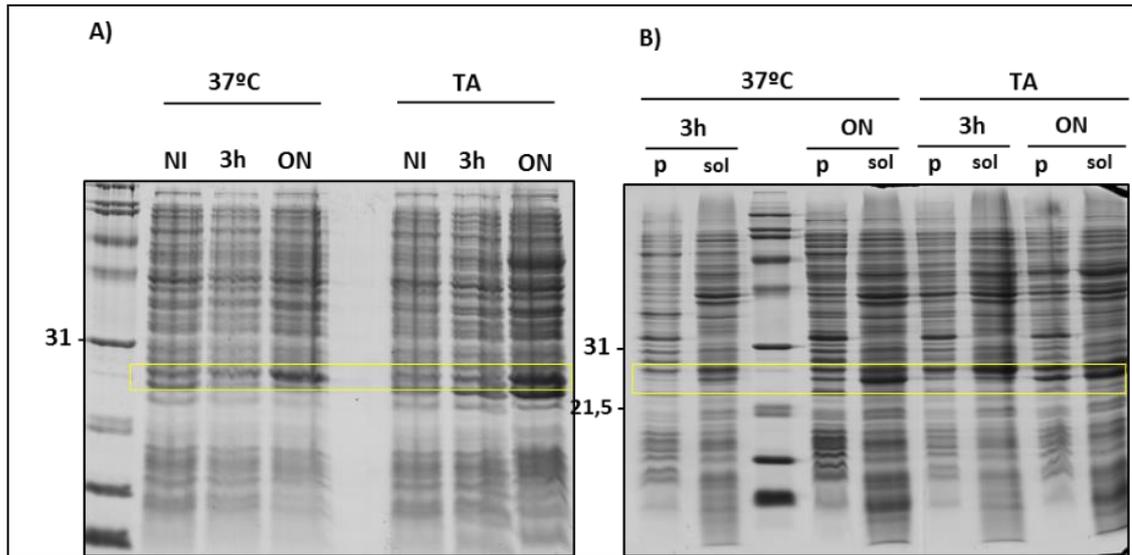


Figura 20. Expressão de PhoR em *E.coli*/RosettaGami DE3aTA e 37°C. A) Demonstração dos géis de SDS-PAGE 15% corados com Coomassie Blue R250, nos quais apresentam banda mostrando a indução, como indicado no retângulo amarelo. B) Teste de solubilidade, indicando presença de proteína na fração solúvel, com a banda próxima ao tamanho esperado (32,6 Kda). C) Western Blot com anticorpo primário anti-his 1:2500, mostrando a banda na fração insolúvel. O tempo de exposição foi de 1 hora com o kit Westar supernova. Amostra aplicada nos géis: 0,15OD em cada poço.

Testou-se também a expressão de PhoR no meio overnight express na cepa de *E. coli* Rossettagami. Houve aparecimento de banda no gel da indução, próximo ao tamanho esperado, à temperatura de 37°C (Figura 21a). Ao realizar o teste de solubilidade, a maior parte desta banda foi observada na fração solúvel (Figura 21b). Não foi possível repetir este experimento em maior escala para verificar se PhoR pode ser purificado em sua forma solúvel após expressão nesta condição.

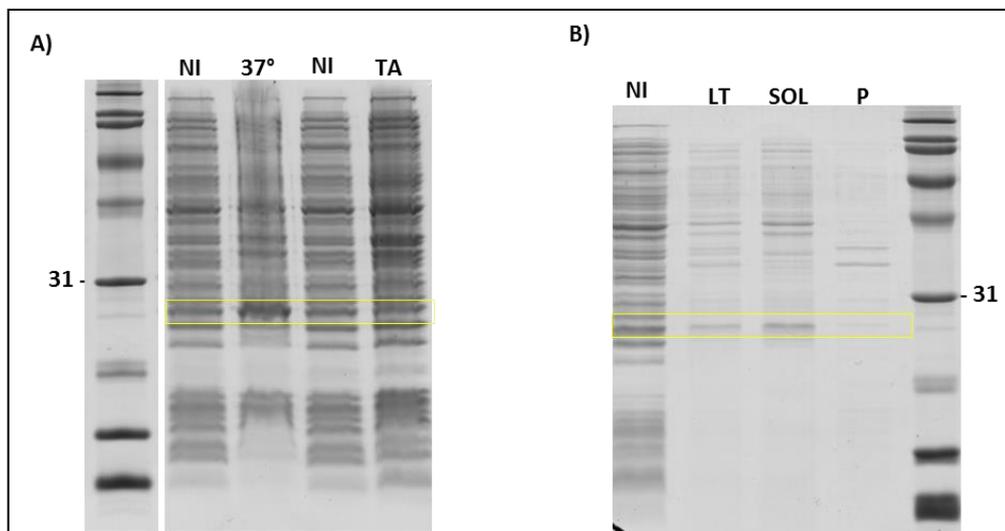


Figura 21. Expressão de PhoR em *E. coli* Rossettagami DE3 aTA e 37°C em meio Overnight express. A) Demonstração dos géis de SDS-poliacrilamida 15% corados com Coomassie Blue R250, nos quais apresentam banda mostrando a indução. B) Teste de solubilidade, indicando presença de proteína na fração solúvel, com a banda próxima ao tamanho esperado (32,6Kda) marcada em amarelo.

Os diferentes resultados observados encontram-se resumidos na tabela 4 mostrando as diferentes cepas utilizadas, os diferentes meios e temperaturas no que diz respeito à expressão das proteínas e teste de solubilidade.

Tabela 4: Resumo das condições de expressão testadas e teste de solubilidade.

Proteína	Meio	<i>E. coli</i>	TA	37°C	Sol	Ins
PhoP	LB	BL21 DE3	+	++	-	+
PhoR	LB	BL21 DE3	-	-	-	-
PhoR	LB	RosettaGami	+	+	Gel +	WB +
PhoP	ON-XP	Origami	-	+	-	+
PhoP	ON-XP	RosettaGami	-	+	+	+
PhoR	ON-XP	RosettaGami	+	++	++	+

O desejado é uma grande quantidade de proteína na fração solúvel. Em Gupta *et al.* (2006), a porção citoplasmática de PhoR foi purificada a partir da expressão em vetor pET (pET15b) com a cauda de histidina na porção N-terminal, o que gerou uma proteína recombinante com 21 aa adicionais (Figura 22), e obteve-se quantidade de proteína suficiente para realização de ensaios de fosforilação. O artigo não deixa claro se havia pouca proteína solúvel e se esta foi purificada e conseguiu-se, mesmo assim, realizar os experimentos, ou se havia realmente uma grande quantidade da proteína na fração solúvel como era objetivado. No presente trabalho, a cauda de histidina apresenta-se na porção C-terminal, gerando uma proteína recombinante com 8 aa adicionais. Acredita-se que essa diferença pode estar influenciando a solubilidade da proteína.

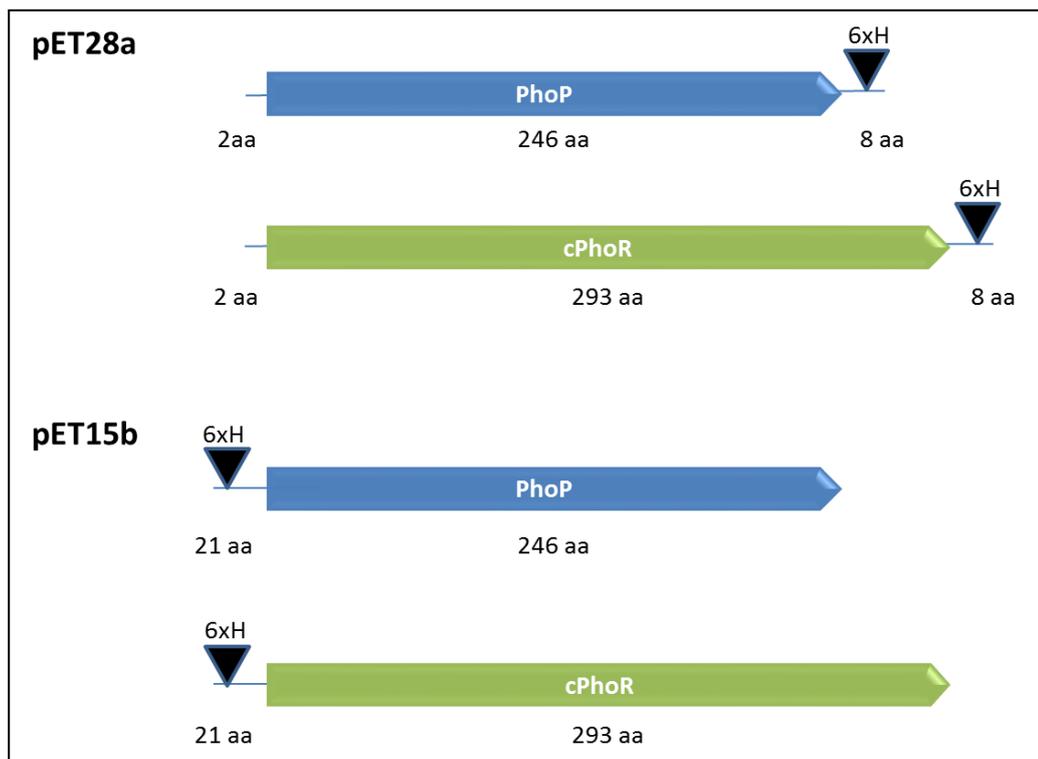


Figura 22. Comparação entre as proteínas produzidas pela clonagem feita neste trabalho (no vetor pET28a), com cauda de histidina C-terminal e aquela produzida por Gupta e colegas (2008) no vetor pET15b com cauda de histidina N-terminal.

4.5 Purificação de PhoP insolúvel

Dado que PhoP pôde ser expressa em grande quantidade na fração insolúvel, essa proteína foi purificada para imunizar camundongos e gerar anticorpos policlonais. O intuito é usar o soro anti-PhoP para avaliar a acumulação desta proteína em cepas de *M. bovis* BCG.

Para a purificação da proteína por sua cauda de histidina, usamos cromatografia de afinidade como descrito na metodologia. Utilizou-se o equipamento ÄKTApurifier, com coluna de cromatografia de afinidade a níquel (Figura 23). A fração solúvel obtida após lise na presença de uréia 4M foi clarificada e aplicada à coluna. Lavagens foram feitas e a proteína ligada foi eluída em um gradiente de imidazol.

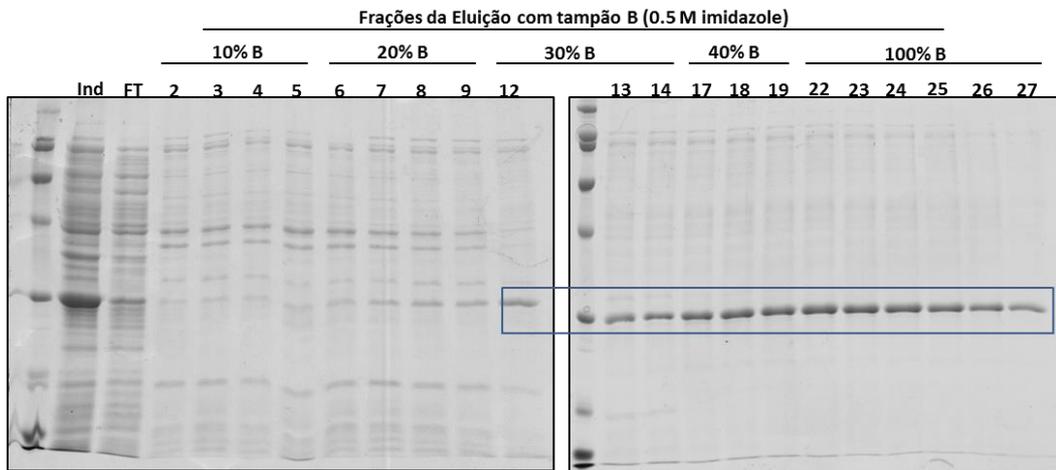


Figura 23. Gel 15% SDS-PAGE, mostrando as frações da purificação de PhoP. Ind: Induzido; FT: “Flowthrough” (proteína não ligada à coluna). Frações de 2 a 27 correspondendo à eluição em diferentes proporções de tampão B (10, 20, 30, 40, 100% imidazol).

As frações contendo PhoP apresentaram bandas adicionais. Para aplicação em nova coluna, foi necessário dialisar PhoP, para remover a uréia. As 11 frações com maior quantidade de proteína (frações 12-27) foram dialisadas sequencialmente em três tampões até reduzir significativamente a concentração de uréia. Feito isso, realizou-se uma nova purificação, desta vez em coluna de níquel por fluxo gravitacional (Figura 24).

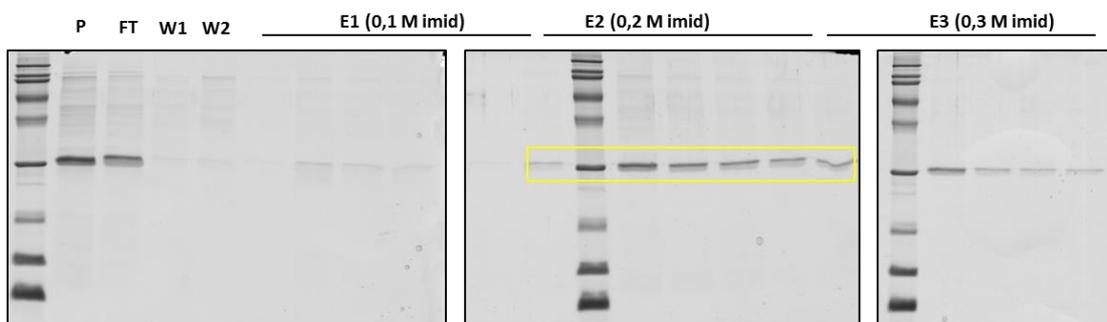


Figura 24. Gel 15% SDS-PAGE, mostrando as frações da proteína purificada por fluxo gravitacional em coluna de Níquel.

Foi feito um *pool*, escolhendo as 7 frações com maior quantidade de proteína e um gel foi corrido com um poço contendo 10 μ L e o outro 20 μ L, mostrando um

resultado sem contaminação (Figura 25). Após a purificação, foi realizada a dosagem, que determinou a concentração de 0,2 ug/ μ L.

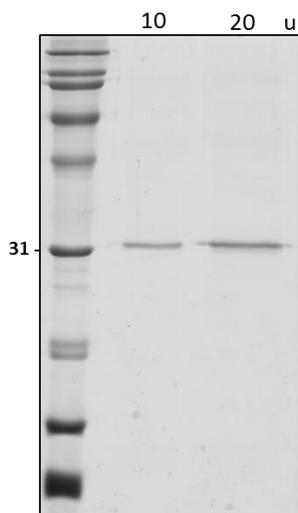


Figura 25. Gel 15% SDS-PAGE mostrando o resultado da purificação da proteína PhoP sem contaminação aparente.

4.6 Produção de soro policlonal anti-PhoP

Para que seja possível a imunização do camundongo, é necessária uma concentração de 0,2ug/ μ L. Com esta concentração, pode-se dar continuidade para obtenção de anticorpo policlonal através da inoculação em camundongo BALB-C. Inicialmente foram disponibilizados 6 camundongos e nos primeiros dias um faleceu sem motivo aparente. Foi realizado o protocolo como descrito na seção 3.12. Ao realizar a retirada do sangue do camundongo, o soro foi testado a uma titulação de 1:1000, juntamente com extrato de *E.coli*, havendo resposta em todos os camundongos. Pode-se observar que o camundongo 2 teve uma resposta superior quando comparado com os camundongos 1, 3, 4 e 5(Figura 26).

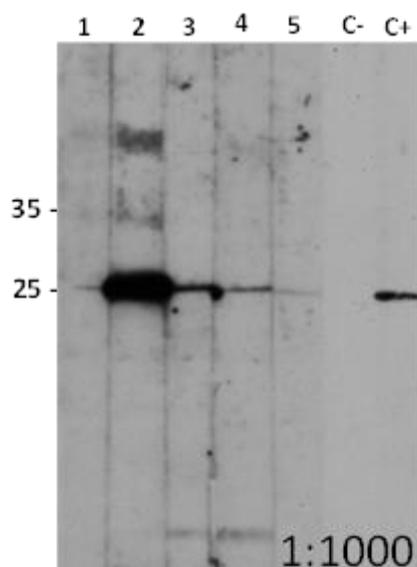


Figura 26: Western Blot com as tiras para cada um dos 5 camundongos, numa titulação de 1:1000, mostrando as diferentes respostas. O controle positivo foi realizado com o anticorpo anti-HIS, que identifica a cauda de histidina presente em PhoP. Foi utilizado extrato de *E.coli* durante a incubação da membrana com o soro.

A dose de reforço foi dada aos camundongos, desta vez com inoculação nas vias intraperitoneal, subcutânea e intramuscular na expectativa de aumento da resposta celular, o qual foi observado em todos os camundongos. (Figura 27).

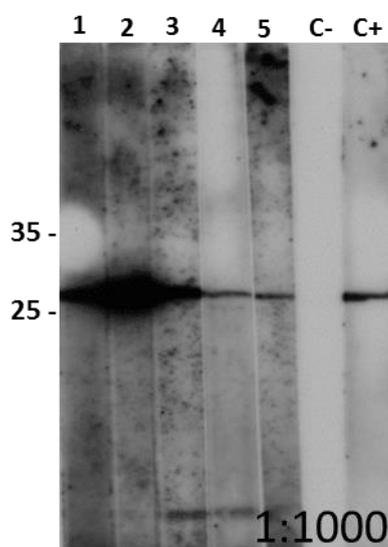


Figura 27: Western Blot com as tiras para cada um dos 5 camundongos, numa titulação de 1:1000, mostrando as diferentes respostas, agora aumentadas. O Controle positivo foi realizado com o anticorpo anti-His, que identifica a cauda de histidina presente em PhoP. Foi utilizado extrato de *E.coli* durante a incubação da membrana com o soro.

Foram feitos *pools* com as respostas semelhantes, de modo com que obtivéssemos o soro do camundongo 2, a junção dos camundongos 1 e 3 e junção do 4 e 5. Fez-se então, uma diluição seriada com as concentrações de 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 para avaliar a titulação dos soros obtidos (Figura 28).

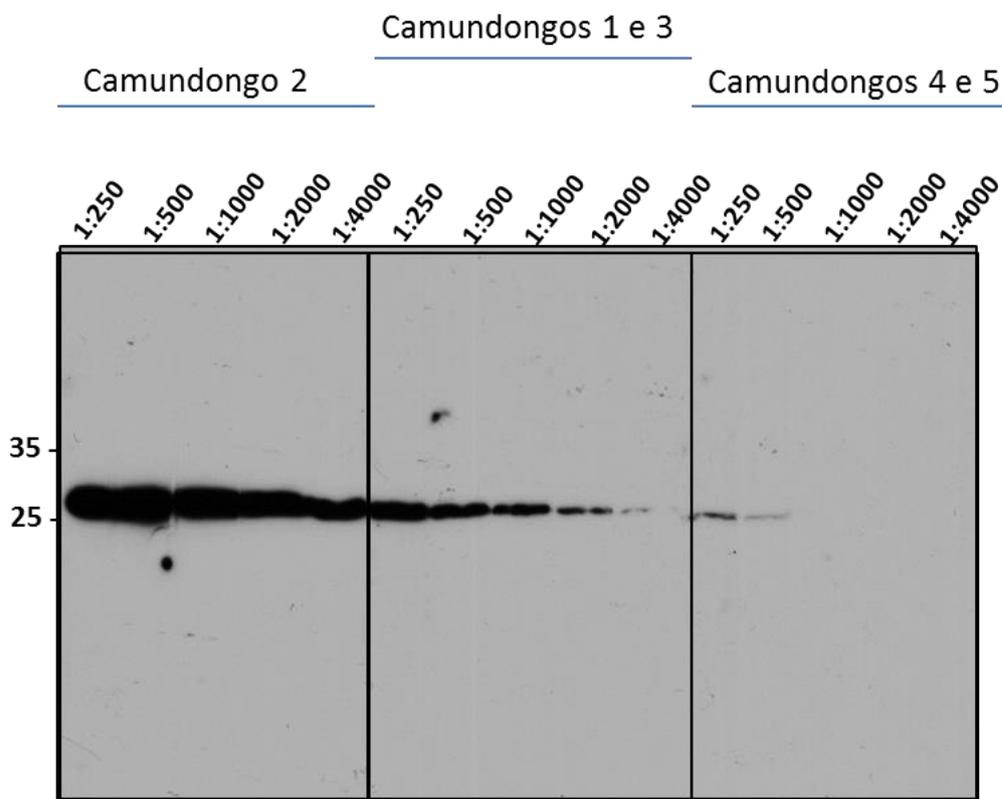


Figura 28: Teste de titulação dos soros dos camundongos na presença de extrato de *E.coli*. 0,75ug de PhoP recombinante foi aplicado a um gel de SDS-PAGE 15% e o western blot foi feito com diferentes diluições do soro poli-clonal anti-PhoP obtido a partir dos camundongos, na presença de extrato de *E.coli* (11,25 ug/mL).

Os anticorpos anti-PhoP devem ser testados em lisado de BCG. Uma vez que se consegue detectar PhoP, consegue-se medir os níveis da proteína em diferentes cepas de BCG (Pasteur e Moreau). Se ao realizar o western blot com lisado de BCG Pasteur e BCG Moreau, obtiver como resultado diferentes níveis de PhoP, pode ser consequência da mutação em PhoR. Espera-se que níveis de PhoP sejam proporcionais à atividade histidina kinase de PhoR, uma vez que eles se autorregulam.

5 CONCLUSÕES

A expressão e solubilidade de PhoP e PhoR foram testadas em diferentes cepas de *E. coli*, temperaturas e meios. Porém, não foram identificadas condições com abundante produção de proteína na fração solúvel. Ainda assim, a expressão de PhoR em *E.coli* RosettaGami DE3 em meio Overnight express pode ser suficiente para purificação e ensaios enzimáticos.

PhoP produzida na fração insolúvel foi purificada e usada para obtenção de anticorpos policlonais em camundongos BALB-C

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah, M. A et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Scientific Reports* 2015.Oct 21| 5:15443 | DOI: 10.1038/srep15443.

Abramovitch RB, Rohde KH, Hsu FF, Russell DG. *aprABC*: a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Mol Microbiol.* 2011 May;80(3):678-94.

Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Uranga S, Puentes E, Fernandez C, Parra A, Cardona PJ, Vilaplana C, Ausina V, Williams A, Clark S, Malaga W, Guilhot C, Gicquel B, Martin C. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine.* 2013 Oct 1;31(42):4867-73.

Behr MA, Schroeder BG, Brinkman JN, Slayden RA, Barry CE A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(12):3394-9;

Brasil. Portal da Saúde. Ministério da Saúde. Tuberculose. Disponível em <<http://portalsaudE.saudE.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/tuberculose>> Acessado em 07 de novembro de 2016.

Bretl DJ, Demetriadou C, Zahrt TC. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Dec;75(4):566-82.

Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5596–5601;

Calmette, A. e Guerin, X. 1908 Academie des Sciences

Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol.* 1999 Oct;34(2):257-67.

Chesne-Seck ML, Barilone N, Boudou F, Gonzalo Asensio J, Kolattukudy PE, et al. (2008) A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of

polyketide-derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Bacteriol* 190: 1329–1334.

Fournier B, Klier A, Rapoport G. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2001 Jul;41(1):247-61.

Frigui W, Bottai D, Majlessi L, Monot M, Josselin E, *et al.* (2008) Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 Secretion and Specific T Cell Recognition by PhoP. *PLoS Pathog* 4: e33.

Galagan JE, Minch K, Peterson M, Lyubetskaya A, Azizi E, Sweet L, Gomes A, Rustad T, Dolganov G, Glotova I, Abeel T, Mahwinney C, Kennedy AD, Allard R, Brabant W, Krueger A, Jaini S, Honda B, Yu WH, Hickey MJ, Zucker J, Garay C, Weiner B, Sisk P, Stolte C, Winkler JK, Van de Peer Y, Iazzetti P, Camacho D, Dreyfuss J, Liu Y, Dorhoi A, Mollenkopf HJ, Drogaris P, Lamontagne J, Zhou Y, Piquenot J, Park ST, Raman S, Kaufmann SH, Mohny RP, Chelsky D, Moody DB, Sherman DR, Schoolnik GK. The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature*. 2013 Jul 11;499(7457):178-83.

Gomes LH, Otto TD, Vasconcellos EA, Ferrão PM, Maia RM, Moreira AS, Ferreira MA, Castello-Branco LR, Degraive WM, Mendonça-Lima L. Genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. *J Bacteriol* 2011;193:5600-1.

Gonzalo Asensio J, Maia C, Ferrer NL, Barilone N, Laval F, Soto CY, Winter N, Daffé M, Gicquel B, Martín C, Jackson M. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 2006 Jan 20;281(3):1313-6.

Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westerveen J, Huygen K, Hernández-Pando R, Thole J, Behr M, Gicquel B, Martín C. PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *PLoS OnE*. 2008;3(10):e3496

Gupta S, Sinha A, Sarkar D. Transcriptional autoregulation by *Mycobacterium tuberculosis* PhoP involves recognition of novel direct repeat sequences in the regulatory region of the promoter. *FEBS Lett*. 2006 Oct 2;580(22):5328-38.

Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 1996 Jan;64(1):16-22.

Hutchings MI, Hong HJ, Buttner MJ. The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol. 2006 Feb;59(3):923-35.

Joung SM, Jeon SJ, Lim YJ, Lim J-S, Choi B-S, Choi I-Y, Yu JH, Na K-I, Cho E-H, Shin S-S, Park YK, Kim C-K, Kim H-J, Ryoo SW. Complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Korea, the Korean vaccine strain for substantial production. Genome Announc 2013;1:e00069-13.

Kalra M, Grover A, Mehta N, Singh J, Kaur J, Sable SB. Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculous *micE*. Clin Immunol 2007 Nov;125(2):173-83;

Koretke, K.K., Volker, C., Bower, M.L., and Lupas, A.N. (2003). In Histidine Kinases In Signal Transduction, M. Inouye and R. Dutta, eds. (New York: Academic Press), pp. 483–506

Lee AK1, Detweiler CS, Falkow S. OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. J Bacteriol. 2000 Feb;182(3):771-81.

Lee JS, Krause R, Schreiber J, Mollenkopf HJ, Kowall J, *et al.*(2008) Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. Cell Host Microbe 3: 97–103.

Lewis, K. N. et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. J Infect Dis 187, 117–123, doi: 10.1086/345862 (2003).

Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. Hum Vaccin. 2009 Feb;5(2):70-8;

Martin C, Williams A, Hernandez-Pando R, Cardona PJ, GormLey E, Bordat Y, Soto CY, Clark SO, Hatch GJ, Aguilar D, Ausina V, Gicquel B. The live *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. Vaccine. 2006 Apr 24;24(17):3408-19.

Martinez, M; Duclert-Savatier, N; Betton, J.M; Alzari, P.M; Nilges, M.; Malliavin, T.E. Modification in Hydrophobic Packing of HAMP Domain Induces a destabilization of the Auto-Phosphorylation Site in the HistidineKinase CpxA. Wiley Online Library. France. 2016 DOI 10.1002/bip.22864

Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ. A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jul;86(13):5054-8.

Nogueira et al. Tuberculose uma abordagem geral dos principais aspectos..Rev. Bras. Farm. 93(1): 3-9, 2012

Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. Tuber Lung Dis. 1999; 79(4):243-50;

Orduña P, Cevallos MA, de León SP, Arvizu A, Hernández-González IL, Mendoza-Hernández G, López-Vidal Y. Genomic and proteomic analyses of *Mycobacterium bovis* BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection. BMC Genomics 2011;12:493.

Pan Y, Yang X, Duan J, Lu N, Leung AS, Tran V, Hu Y, Wu N, Liu D, Wang Z, Yu X, Chen C, Zhang Y, Wan K, Liu J, Zhu B. Whole-genome sequences of four *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. J Bacteriol 2011;193:3152-3.

Pérez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martín C. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. Mol Microbiol. 2001 Jul;41(1):179-87.

Perry J, Koteva K, Wright G. Receptor domains of two-component signal transduction systems. Mol Biosyst. 2011 May;7(5):1388-98.

Podgornaia A., Laub, M. T. Determinants of specificity in two-component signal transduction. Current Opinion in Microbiology 2013, 16:156–162.

Quon KC, Marczynski GT, Shapiro L. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. Cell. 1996 Jan 12;84(1):83-93.

Ritz, N. et al. The influence of bacille Calmette-Guerin vaccine strain on the immune response against tuberculosis: a randomized trial. American journal of respiratory and critical care medicine 185, 213–222, doi: 10.1164/rccm.201104-0714OC (2012).

Rohde KH, Abramovitch RB, Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. Cell Host Microbe. 2007 Nov 15;2(5):352-64.

Sable SB, Verma I, Khuller GK. Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine 2005 Jul 14;23(32):4175-84.

Sambrook & Russell. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001

Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 2009;**27**:1710-6.

Sinha A, Gupta S, Bhutani S, Pathak A, Sarkar D. PhoP-PhoP interaction at adjacent PhoP binding sites is influenced by protein phosphorylation. *J Bacteriol.* 2008 Feb;**190**(4):1317-28.

Sola-Landa A1, Moura RS, Martín JF. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;**100**(10):6133-8.

Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995 May;**63**(5):1710-7.

Tan S, Sukumar N, Abramovitch RB, Parish T, Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis* responds to chloride and pH as synergistic cues to the immune status of its host cell. *PLoS Pathog.* 2013;**9**(4):e1003282.

Walters, S. B., Dubnau, E., Kolesnikova, I., Laval, F., Daffe, M., and Smith, I. (2006) The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR twocomponent system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 60, 312–330.

Wang Z, Potter BM, Gray AM, Sacksteder KA, Geisbrecht BV, Laity JH. The solution structure of antigen MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* defines a new family of beta-grasp proteins. *J Mol Biol* 2007 Feb 16;**366**(2):375-81;

Weldingh K, Rosenkrands I, Jacobsen S, Rasmussen PB, Elhay MJ, Andersen P. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun* 1998 Aug;**66**(8):3492-500;

World Health Organization (WHO). 2016. Disponível em <<http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/> Acessado em 07 dezembro 2016

Xiaoyuan He, Liqin Wang, Shuishu Wang. Structural basis of DNA sequence recognition by the response regulator PhoP in *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports* 6 (2016): 24442. PMC. Web. 7 Dec. 2016.

Zhou P, Long Q, Zhou Y, Wang H, Xie J. *Mycobacterium tuberculosis* two-component systems and implications in novel vaccines and drugs. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2012;22(1):37-52.

7 ANEXOS

Cepas bacterianas utilizadas nesse estudo

Cepa	Características	Fonte/referência
<i>E. coli</i> Top 10	<i>F mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-MCR</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galK rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta Blue DE3	<i>endA1 hsdR17</i> (r m) <i>supE44 thi1</i> <i>recA1 gyrA96 relA1 lac</i> (DE3) F' [<i>proA</i> <i>B lacI Z</i> Δ M15::Tn10] pRARE (Cam , Tet)	Novagen
<i>E. coli</i> Origami	Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA Pvull</i> <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'</i> [<i>lac lacI pro</i>] (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Str , Tet)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosettagami	Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA Pvull</i> <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'</i> [<i>lac lacI pro</i>] <i>gor522::Tn10 trxB</i> pRARE2 (Cam , Str , Tet)	Novagen
BCG Pasteur	<i>M.bovis</i> BCG cepa Pasteur	Instituto Pasteur
BCG Moreau	<i>M.bovis</i> BCG cepa Moreau	Fundação Ataulpho de Paiva

Plasmídeos utilizados nesse estudo

Plasmídeos	Características	Fonte/Referência
pET28a (5369 pb)	Kan ^R ; f1 ori; pBR322 ori; Lac1; P _{T7} ; His tag; T7 tag	Novagen

Meio LB (Luria-Bertani)

Bacto-Triptona (Difco [®])	10,0 g/L
Extrato de levedura (Difco [®])	5,0 g/L
NaCl (Merck [®])	10,0 g/L
pH (ajustado com NaOH 5 N)	7,2
Temperatura de estoque	TA

Esterilização por autoclavação: 15 minutos a 121 °C.

Fonte: Sambrook & Russell, 2001.

Solução de resuspensão celular

Tris-HCl	50 mM (pH = 7,5)
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/mL
Temperatura de estoque	TA

Fonte: *Wizard[®] Plus SV Minipreps – DNA purification system* (Promega), 2009.

Solução de lise celular

NaOH	0,2 M
SDS	1 % v/v
Temperatura de estoque	TA

Fonte: *Wizard[®] Plus SV Minipreps – DNA purification system* (Promega), 2009.

Tampão de amostra 6X

Responsável pelo fornecimento do aumento da densidade da amostra, da cor e da faixa do movimento constante e previsível do DNA.

Bromofenol azul*	0,25 % m/v
Xileno cianol FF	0,25 % m/v
Glicerol em H ₂ O Mili-Q®	30 % v/v
Temperatura de estoque	4 °C

Fonte: Sambrook & Russell, 2001.

Gel de agarose 1 %

Agarose	3 g
TBE 0,5 X	30 mL
H ₂ O Mili-Q®	q.s.p. 300 mL
Temperatura de estoque	TA

No preparo do gel, primeiramente deve-se esquentar a solução preparada e logo deixar esfriar até gelatinizar. O utilizado é de 1% devido ao tamanho do plasmídeo utilizado

Fonte: Sambrook & Russell, 2001.

Tampão (5X) para aplicação de amostras em gel de agarose

Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)
Xileno Cianol FF	0,25% (p/v)
Glicerol	30% (p/v)

GYT (Glicerol, Levedura, Triptona)

Glicerol	10 % v/v
Estrato de levedura	0,125 % m/v
Triptona	0,25 % m/v
H ₂ O Mili-Q [®]	q.s.p. 2,5 mL
Temperatura de estoque	4 °C

Esterilização mediante filtro de 0,22 µm.

Fonte: Sambrook & Russell, 2001.

TAE 10X

Tris-base	108 g/L
Ácido acético	55 g/L
EDTA 0,5 M (pH8,0)	40 mL /L

Soluções utilizadas para géis SDS-PAGE:

Tampão (1X) para aplicação de proteínas em gel SDS-PAGE

Tris-HCl (pH6,8)	62,5 mM
SDS	2%
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,002%
Glicerol	10% (v/v)

Tampão de corrida LaemmLi (5X)

Tris-base	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L

Preparo de géis SDS-PAGE:

Gel de separação 15%

Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,5 mL
Acrilamida 30% / Bis-acrilamida 0,8%	3,0 mL
SDS 10%	60 µL
APS 10%	60 µL
TEMED	6 µL
H ₂ O Milli-Q	qsp 6mL

Gel de empacotamento 4%

Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8)	0,5 mL
Acrilamida 30% / Bis-Acrilamida 0,8%	0,67 mL
SDS 10%	40 µL
APS 10%	40 µL
TEMED	4 µL
H ₂ O Milli-Q	qsp 4mL

Coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250

Etanol P.A	45,5%
Ácido acético glacial	9%
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad)	0,2%

Solução descorante

Etanol P.A.	5%
Ácido acético	7,5%

Solução de secagem

Etanol P.A.	20%
Glicerol	2%

Tampão TBS (10X)

1M Tris-HCl, pH 7,5	100 mL
NaCl	87g
H ₂ O	qsp 1000 mL

TBS-Tween

TBS 10x	100 mL
Tween 20	1mL
H ₂ O	qsp 1000 mL

Tampão de lise bacteriana

1M Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
KCl	100 mM
EDTA	5 mM

PBS 10X pH 7,2

NaH ₂ PO ₄	14,4 g/L
NaCl	80 g/L
KCl	2 g/L
KH ₂ PO ₄	2,4 g/L