



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	Clonagem e expressão de genes relacionados com a biossíntese de NAD e FAD de Mycoplasma hyopneumoniae.
Autor	AMANDA MALVESSI CATTANI
Orientador	IRENE SILVEIRA SCHRANK

Bactérias do gênero *Mycoplasma* compreendem um grupo de mais de 180 espécies que se caracterizam principalmente por seu tamanho diminuto, ausência de parede celular e por serem parasitas obrigatórios de uma ampla gama de organismos incluindo humanos, plantas e animais. Taxonomicamente, a ausência de parede celular é empregada para diferenciar micoplasmas das outras bactérias da classe *Mollicutes*, as quais são conhecidas por sua grande importância médica e veterinária. A espécie *Mycoplasma hyopneumoniae* encontra-se normalmente associada a suínos, sendo o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, que caracteriza-se por ser crônica porém não muito severa, podendo se agravar por infecções secundárias. Um controle relativo a essas infecções vem sendo feito através de programas de vacinação, porém a pneumonia enzoótica suína continua sendo um dos maiores problemas da indústria suinícola, gerando grandes perdas econômicas. Entre as proteínas codificadas pelo genoma de *M. hyopneumoniae*, muitas ainda não têm sua função caracterizada e continuam sem definição. Análises estruturais *in silico*, de proteínas anteriormente anotadas como hipotéticas (MHP7448_0278, MHP7448_0394 e MHP7448_0476), revelaram a presença de motivos proteicos relacionados a atividades metabólicas, como a rota de biossíntese de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), consideradas inexistentes em *M. hyopneumoniae* pela anotação do genoma. A fim de aprofundar os conhecimentos relacionados a essas proteínas o objetivo deste trabalho consiste em clonar e expressar as sequências gênicas de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448, possivelmente relacionadas à rota de síntese de NAD e FAD em vetores de expressão de *Escherichia coli*. A síntese dos *primers* se baseou na característica diferencial dos micoplasmas de apresentarem o códon TGA codificando triptofano, diferentemente de *E. coli*, onde esse códon é traduzido como códon de terminação. Para que a proteína possa ser expressa corretamente serão realizadas mutações sítio-dirigidas, utilizando os *primers* sintetizados, modificando os códons TGA para TGG. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEX-4T3 através da metodologia de recombinação homóloga. A confirmação dos clones recombinantes foi feita através de PCR, além de sequenciamento. Os clones confirmados foram transformados em linhagens de *E. coli* competentes e capazes de superexpressar proteínas. A condição ideal de indução da expressão foi determinada a partir de testes com linhagens celulares e condições de tempo e temperatura distintos. A purificação das mesmas foi realizada com o emprego de resina de glutationa. Os três genes foram amplificados, e clonados no vetor. Para o gene MHP7448_0394 uma colônia recombinante foi obtida. A clonagem com gene MHP7448_0278 teve como resultado três colônias recombinantes e para o gene MHP7448_0476 a clonagem ainda não foi realizada com sucesso. A confirmação de clones recombinantes ocorreu com o emprego de *primers* específicos na metodologia de PCR. Os clones, então, foram transformados em 5 linhagens de expressão de *E. coli* BL21 e a sua expressão foi induzida com a adição de 0,1 mM de IPTG. A indução do gene MHP7448_0394 parece ter sido mais eficiente nas linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE e *E. coli* BL21 (DE3) Star e para o gene MHP7448_0278 as induções mais eficientes ocorreram em *E. coli* BL21 (DE3) pLysE e *E. coli* BL21 (DE3) códon plus Rill. O teste de solubilidade proteica foi realizado nas duas melhores linhagens de expressão de MHP7448_0394 e como ambas mostraram a proteína na sua fração solúvel em condições padrões de indução, esta foi purificada a partir de cromatografia de afinidade. A proteína recombinante do gene MHP7448_0278 mostrou-se insolúvel nas condições padrões testadas. Novos testes com diferentes condições para avaliar a solubilidade da proteína codificada por MHP7448_0278 serão realizadas e as proteínas purificadas serão submetidas a ensaios enzimáticos para a possível predição da sua funcionalidade.