

# Clonagem e expressão de genes relacionados com a biossíntese de NAD e FAD de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Amanda Malvessi Cattani<sup>1</sup>; Irene Silveira Schrank<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia. Laboratório de Microrganismos Diazotróficos. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

## Introdução

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. 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, causando perdas econômicas às indústrias suínolas pelo mundo. 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, 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.

## Objetivo

Afim de aprofundar os conhecimentos relacionados às proteínas putativas FAD sintetase, ácido nicotínico fosforribosiltransferase e ácido nicotínico mononucleotídeo adeniltransferase o objetivo deste trabalho consiste em clonar e expressar essas sequências gênicas de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448, possivelmente relacionadas à rota de síntese de NAD e FAD em vetores de expressão de *Escherichia coli*.

## Materiais e Métodos

1 **Mutação Sítio dirigida (A → G) nos primers para síntese dos fragmentos de DNA. Modificação dos códons TGA para TGG, uma vez que em micoplasmas o códon TGA codifica triptofano, diferentemente de *E. coli*, onde esse é códon de termino da tradução (expressão heteróloga).**

2 **Utilização dos primers mutagênicos contendo sítios de restrição de EcoRI e XhoI, para a amplificação dos fragmentos de DNA através de PCR e sua posterior união por meio da mesma técnica, denominada *Overlapping PCR* – Fragmentos de DNA aptos para a clonagem.**

3 **Clonagem das ORFs por meio de recombinação homóloga realizada no vetor de expressão pGEX-4T3.**

4 **Os clones recombinantes 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.**

5 **Teste de solubilidade (Células lisadas através de sonicação) – avaliação se a proteína está sendo expressa na fração solúvel ou insolúvel do extrato celular**

6 **Purificação da proteína com o emprego de resina de glutatona através de cromatografia de afinidade – Proteína a ser purificada é fusionada a GST (Glutatona S-transferase). Todas as análises proteicas foram realizadas através de gel SDS-PAGE**

## Resultados e Discussão

Os genes selecionados para este estudo codificam proteínas anotadas como hipotéticas, mas possuem motivos proteicos relacionados a biossíntese de NAD e FAD. São eles: MHP7448\_0278 (biossíntese de FAD) – possível FAD sintetase, MHP7448\_0394 (biossíntese de NAD) possível Enzima ácido nicotínico fosforribosiltransferase (NAPRTase) e MHP7448\_0476 (biossíntese de NAD) possível Enzima ácido nicotínico mononucleotídeo adeniltransferase (NadD). Os três genes foram amplificados, e clonados no vetor, porém só foram obtidas colônias recombinantes até o momento para os genes MHP7448\_0394 e MHP7448\_0278. Os clones recombinantes foram transformados em 5 linhagens de expressão de *E. coli* e a indução da expressão ocorreu em condições padrões (0,1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C sob agitação). Os resultados da expressão para as proteínas codificadas pelos genes MHP7448\_0394 e MHP7448\_0278 são mostradas na figura 2. MHP7448\_0394 mostrou-se na fração solúvel e foi eficientemente purificada. Já MHP7448\_0278 apresentou-se na fração insolúvel em duas temperaturas de indução (37°C e 28°C), sendo necessárias novas avaliações.

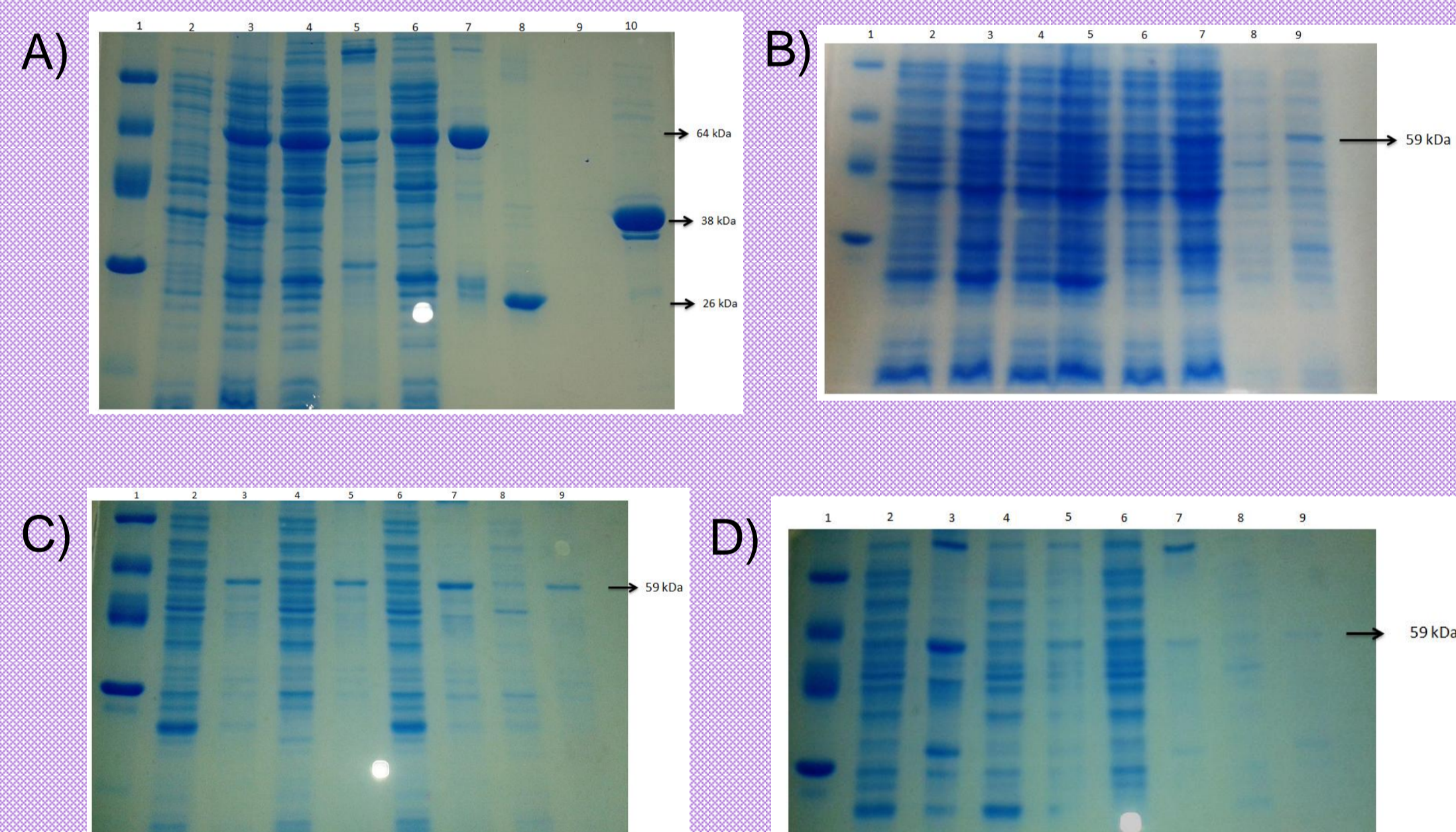


Figura 2: Resultado dos ensaios de expressão. (A) A proteína codificada pelo gene MHP7448\_394 mostrou uma melhor expressão na linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pLysE e a mesma encontrava-se na fração solúvel (FS) do extrato celular, sendo purificada eficientemente com rendimento de 5µg/µL em um total de 2 mL. (1) Marcador de peso molecular. (2) Células sem indução da expressão (CSI). (3) Células com Indução da expressão (CCI) nas condições padrões, (4) FS do extrato celular. (5) Fração insolúvel (FI). (6) FS após ligação à resina de glutatona. (7) Resina após a ligação (proteína de interesse + GST) com 64 kDa (8) Resina após clivagem com trombina – liberação de GST (26 kDa) (9) Resina após eluição com glutatona reduzida (10) Proteína de interesse purificada com tamanho de 38 kDa. (B) Indução em condições padrões de expressão para a proteína codificada pelo gene MHP7448\_278. (2), (4), (6) e (8) CSI e (3), (5), (7) e (9) CCI nas linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus Rill (Rill), *E. coli* BL21 (DE3) RP (RP), *E. coli* BL21 (DE3) pLysE (pLysE), *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta (Rosetta), respectivamente. (C) Teste de solubilidade para MHP7448\_0278 em condições padrões. (2), (4), (6) e (8) representando a FI do extrato celular e (3), (5), (7) e (9) mostrando a FS de RP, Rill, pLysE e Rosetta respectivamente. (D) Teste de solubilidade para MHP7448\_0278 a 28°C (2), (4), (6) e (8) representando a FI do extrato celular e (3), (5), (7) e (9) mostrando a FS de RP, Rill, pLysE e Rosetta respectivamente.

## Perspectivas

- Obtenção de clones por recombinação homóloga para o gene MHP7448\_0476;
- Testes com diferentes condições para avaliar a solubilidade da proteína codificada por MHP7448\_0278 e purificação da mesma;
- Ensaio enzimático para avaliar o comportamento das proteínas;