

Bonafini, R.B.^{1, 2}; Mizobuti, D. S.²; Pereira, R. F. C.^{1,3}; Amstalden, M. C. ^{1,4}; Lancelotti, M.¹(orientador)

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia – UNICAMP; ²Graduação em Farmácia, UNICAMP; ³Doutoranda no Departamento de Bioquímica – UNICAMP; ⁴Mestrado no Departamento de Bioquímica – UNICAMP

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Introdução e Objetivo

Neisseria meningitidis (meningococo) é uma bactéria gram-negativa considerada um membro comensal da nasofaringe humana que pode causar enfermidades invasivas como sépsis e meningite. Seu maior fator de virulência é o polissacarídeo capsular que classifica a espécie em 12 diferentes sorogrupos: A, B, C, 29E, H, K, I, L, X, Y, W135 e Z. Entretanto, os sorogrupos envolvidos em casos epidêmicos são os sorogrupos A, B, C, Y and W135. Tal polissacarídeo capsular é sintetizado pelo operon *syn* sendo composto por derivados do ácido siálico ou ácido N-acetil-neuramínico. O fenômeno relacionado com a variação capsular desta bactéria onde há uma transferência de material genético entre dois clones é conhecido como *switch*capsular, esse fenômeno gera alteração de sorogrupo. Neste trabalho realizou-se a análise da taxa de transformação com mutação do operon capsular da linhagem W135 ATCC em decorrência da inserção de cassetes de resistência em diferentes posições do gene *synG*.

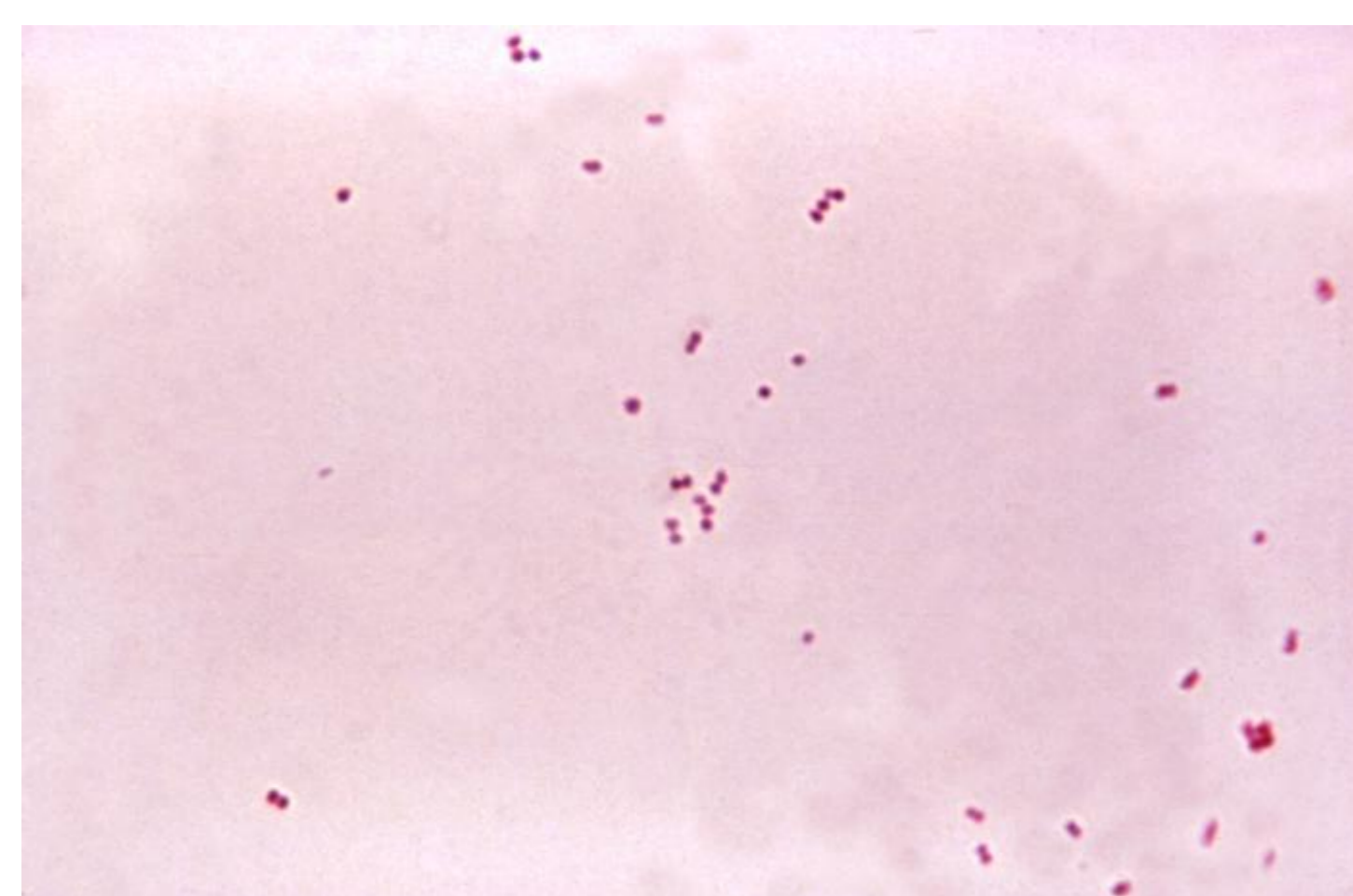


Figura 1: Visualização em microscópio de *N.meningitidis*. Coloração de Gram.



Figura 2: Visualização em microscópio eletrônico de *N. meningitidis*.

Métodos

- Os genes *synG* e seu gene adjacente *galE* foram amplificados.
- A partir destes, os plasmídios de interesse foram construídos conforme figura abaixo, clonados em *Escherichia coli* e, após sua extração, foram transferidos por transformação para *N. meningitidis*.
- Para comprovação de transferência genética os genes de interesse possuíam cassetes de resistência à antibióticos e, como os genes fusionados foram transformados com seus cassetes, utilizou-se suplementação dos meios com o antibiótico do cassete correspondente.

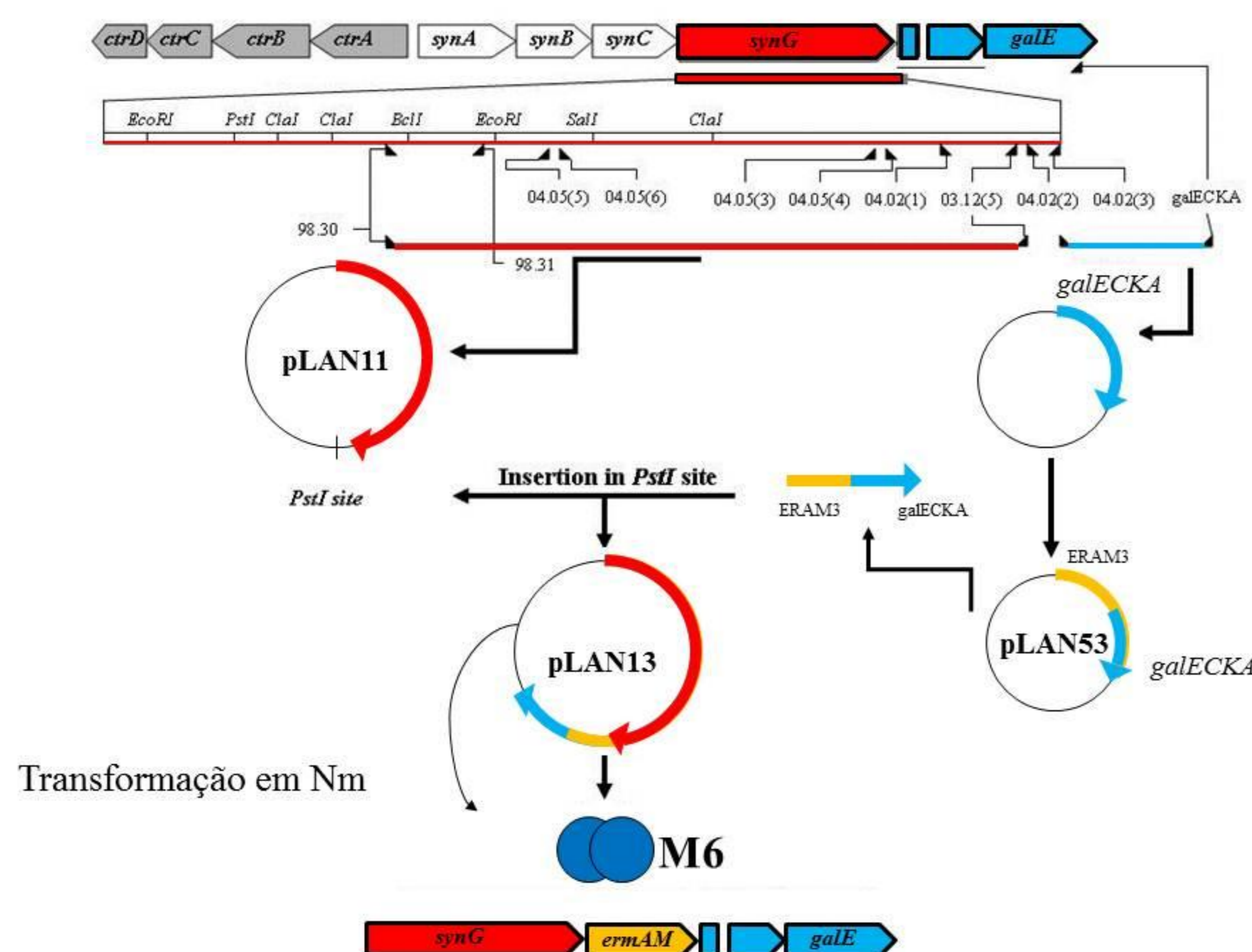


Figura 3: Representação esquemática da construção do plasmídio pLAN13 para a fusão transcricional *synG::ermAM* em *N. meningitidis* W135.

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas no projeto.

Linhagens	Características
<i>Escherichia coli</i> DH5	Nal ^R utilizada como receptora de plasmídios. F-, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-, mk-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>girA96</i> , <i>relA1</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	Sorogrupo W135, ATCC35559
<i>Neisseria meningitidis</i> W135 ref.	<i>N. meningitidis</i> de referência do sorogrupo W135.
<i>Neisseria meningitidis</i> W135 Marseille	<i>N. meningitidis</i> do sorogrupo W135 isolada na cidade de Marseille-France proveniente do surto W135 ST11 (ET37) Hajj.

Resultados e Discussão

Iniciou-se o projeto transformando *E. coli* DH5α utilizando plasmídios pLAN13 e pLAN03 construídos com seleção à Ampicilina (100 µg/mL) e Eritromicina (300 µg/mL). As bactérias foram então repicadas para meio LB contendo aqueles antibióticos e os plasmídios foram extraídos em média escala e reservados. Os plasmídios extraídos foram transformados em *N. meningitidis* W135 atcc gerando os mutantes Δ*synG* (transformação do pLAN13) e M6 (transformação do pLAN03).

Nesta transformação obtiveram-se os valores da Tabela 2:

Tabela 2: Frequência de replicação dos mutantes.

Linhagem	Taxa de transformação para cada 1.10 ⁸ UFC <i>N.meningitidis</i> W135atcc
pLAN03	6/2/1
pLAN13	2/1/0

Todavia, seguimos recuperando esses mutantes, extraindo novamente seus DNA's genômicos e novamente transformando os mesmos para a mesma cepa receptora de *N. meningitidis*. Tal procedimento foi realizado procurando aumentar a taxa de transformantes uma vez que é sabido que no meningococo a transformação utilizando DNA genômico favorece este aumento. De posse destes dois mutantes iniciamos uma nova transformação na mesma cepas para verificar o efeito desta mutação e a veracidade desta hipótese. Portanto, determinou-se que a taxa de transformação para mutantes M6 (pLAN 03) de *Neisseria meningitidis* sorogrupo para mutantes Δ*synG* (pLAN 13) descrito na Tabela 3, que segue:

Tabela 3: Taxa de replicação após transformações com DNA genômico.

Linhagem	Taxa de transformação para cada 1.10 ⁸ UFC <i>N.meningitidis</i> W135atcc
M6	77/52/57
Δ <i>synG</i>	231/387/256

Conclusão

Partindo da Tabela II podemos inferir que não houve diferença na transformação dos plasmídios inteiros desta bactéria frente à linhagem W135 atcc, uma vez que não houve diferença significativa na contagem do número de colônias. Entretanto, quando olhamos para os resultados da transformação com DNA genômico observamos que a mutação com DNA proveniente de Δ*synG* foi mais efetivo obtendo-se maiores taxas de transformantes do que a transformação realizada com o cassete inserido ao final do gene (M6) Portanto, verificamos que a inserção do cassete *ermAM* em diferentes pontos do gene *synG* é capaz de influenciar na obtenção ou não de transformantes deste sorogrupo de *N. meningitidis*.