

SALÃO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XXIX SIC




múltipla 
UNIVERSIDADE
inovadora  inspiradora

Evento	Salão UFRGS 2017: SIC - XXIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2017
Local	Campus do Vale
Título	Identificação dos genes da Escherichia coli patogênica aviária envolvidos na invasão de fibroblastos aviários por mutagênese marcada com assinatura (STM - Signature Tagged Mutagenesis)
Autor	JOÃO PEDRO STEPAN WAGNER
Orientador	FABIANA HORN

Identificação dos genes da *Escherichia coli* patogênica aviária envolvidos na invasão de fibroblastos aviários por mutagenese marcada com assinatura (STM - *Signature Tagged Mutagenesis*)

João Pedro Stepan Wagner, Fabiana Horn (orientadora) (UFRGS)

A cepa MT78 é uma ExPEC capaz de invadir células aviárias não fagocitárias e pode possuir genes que influenciam em sua virulência que ainda não foram descritos. A procura de genes que podem influenciar na virulência desta cepa foi criada por meio da técnica de STM (signature-tagged mutagenesis) uma biblioteca de 1710 mutantes aleatórios da MT78 (Daniel B. Pavanelo, manuscrito em preparação) que foram triados a procura de atenuação da capacidade de invasão e adesão a células não fagocitárias. Entre os mutantes atenuados, um dos mutantes perdeu o gene para a enzima periplasmática trealase, e o outro perdeu o gene para a enzima fosfo- β -glicosidase B (*bgl*).

O mutante nulo para o operon *bgl* foi testado quanto a sua capacidade de adesão e de invasão a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32. Verificou-se que a capacidade de adesão do mutante foi reduzida para menos da metade da capacidade da cepa selvagem (45%), enquanto a capacidade de invasão teve uma redução ainda mais acentuada, 32% da capacidade da cepa selvagem. Além de testes com células, foram realizados testes *in vivo* em camundongos de 5 semanas, onde verificou-se uma redução na capacidade de colonização da bexiga 48 h após a inserção da bactéria via uretra.

Meu trabalho consiste em complementar o mutante MT78 Δ *bgl*. Para isso, amplificarei o operon *bgl* a partir do ADN da cepa selvagem WT MT78, porém por ser um fragmento muito extenso (8,3 kb) e as tentativas de amplificação pelo protocolo normal de PCR terem falhado, o fragmento será amplificado em 4 trechos separados de aproximadamente 2 kb e que possuem complementaridade de bases entre si em suas extremidades. Em uma única reação de PCR serão adicionados os 4 trechos que ao se ligarem serão replicados em um único fragmento de 8,3kb.

Após a amplificação o fragmento do operon *bgl* será digerido pelas enzimas de restrição *SacI* e *XhoI*, assim como o plasmídeo PgpTn7-cm, extraído com um kit de uma DH5 α que contém esse plasmídeo. Utilizando uma enzima T4 ligase será feita uma reação de ligação contendo os fragmentos digeridos do operon *bgl* e do plasmídeo PgpTn7-cm e após verificada a ligação o plasmídeo PgpTn7Bgl-cm irá ser inserido por choque térmico em uma DH5 α pir quimiocompetente.

As colônias recombinantes serão selecionadas, o plasmídeo PgpTn7bgl-cm será extraído e a cepa MGN-617 será transformada com ele, e então conjugada com a cepa mutante MT78 Δ *bgl* contendo o plasmídeo pSTNSK que codifica uma transposase. A MGN-617 doará o plasmídeo PgpTn7bgl-cm e a transposase codificada no plasmídeo pSTNSK irá inserir o operon *bgl* no cromossomo do mutante. O mutante complementado será então selecionado em um meio com ausência de DAP (Ácido Diaminopimélico) e a 42°C, o que impedirá respectivamente o crescimento da cepa MGN-617 e a replicação do plasmídeo pSTNSK, e na presença dos antibióticos canamicina ao qual o mutante é resistente e cloranfenicol, cujo gene de resistência está presente no fragmento inserido com o *bgl*. O mutante complementado será então submetido a ensaios de adesão e invasão e testes de aglutinação em levedura, para confirmar a recuperação do fenótipo da WT MT78.