

440

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO FATOR  $\Sigma 70$  DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE EM ESCHERICHIA COLI.** Shana de Souto Weber, Irene Silveira Schrank, Sergio Ceroni da Silva (orient.) (UFRGS).

Mesmo com a conclusão do seqüenciamento do genoma de várias espécies de Mycoplasmas, pouco se sabe sobre controle da expressão gênica nesses microrganismos. Recentemente, *Mycoplasma hyopneumoniae* (MH), espécie causadora da pneumonia micoplásmica suína, teve seu genoma totalmente seqüenciado. Os dados obtidos mostraram que, apesar de possuir apenas um fator  $\sigma$ , há grande variabilidade nas regiões promotoras, indicando que os sinais de promoção e regulação da transcrição devem diferir significativamente de outras bactérias. Embora existam ferramentas de bioinformática que auxiliam na determinação de seqüências regulatórias, estas são limitadas pela falta de promotores experimentalmente caracterizados nesse gênero. Para desenvolver um sistema que permita definir os promotores de MH em *Escherichia coli*, é que este trabalho tem como objetivo a clonagem e expressão do gene *rpoD* de *M. hyopneumoniae*, uma vez que os fatores  $\sigma^{70}$  dessas duas bactérias são diferentes. Como essa CDS possui três códons UGA – os quais em *Mycoplasma* codificam triptofano, mas em *E. coli* são lidos como códon de terminação –, está sendo utilizada uma estratégia de mutagênese sítio-dirigida baseada em PCR. Inicialmente, o gene *rpoD* foi amplificado por PCR a partir do DNA cromossomal da cepa 7448 de MH; o fragmento de 1475pb foi clonado em pUC18 e seqüenciado para confirmar sua integridade. Após, utilizando o plasmídeo pUC18 $\sigma$ mh e *primers* contendo as mutações (TGA→TGG) necessárias, o gene foi amplificado em 4 partes diferentes:  $\sigma$ A (229pb),  $\sigma$ B (390pb),  $\sigma$ C (394pb) e  $\sigma$ D (581pb). Em seguida foram feitas duas PCRs, uma utilizando como DNA molde  $\sigma$ A e  $\sigma$ B para amplificação de  $\sigma$ AB (590pb), e outra utilizando  $\sigma$ C e  $\sigma$ D para obtenção de  $\sigma$ CD (947pb). Os amplicons  $\sigma$ AB e  $\sigma$ CD servirão de DNA molde para a amplificação de  $\sigma$ ABCD (1475pb). As mutações serão confirmadas por seqüenciamento. Futuramente, a CDS mutada será clonada em pET-23d. (PIBIC).