

Construção de mutantes inativados de genes de produção de lipopolissacarídeos (LPS) em sorogrupos de *Neisseria meningitidis*.

Tobias Garcez de Jesus Junior*, **Marcelo Lancellotti**.

Resumo

Neisseria meningitidis são bactérias que causam infecções tais como a meningite. Elas são naturalmente competentes para a transformação com troca de DNA entre cepas. A patogenia está relacionada com lipopolissacarídeo (LPS) na membrana celular. Mutantes na biossíntese de LPS mantém uma estrutura pré-membrana responsável pela integridade da membrana dos mutantes. Tais mutantes são úteis para avaliar a patogenicidade. Foi realizado a construção de mutantes de *N. meningitidis* com gene de produção LPS inativados.

Palavras-chave:

Neisseria, LPS, biotecnologia.

Introdução

Neisseria meningitidis é uma bactéria gram-negativa exclusiva do trato respiratório humano que causa infecções assintomáticas ou invasivas como meningite e/ou septicemia. São naturalmente competentes para transformação com troca de DNA entre cepas. A patogenia dessas bactérias está relacionada, sobretudo, à produção de endotoxinas, denominadas lipopolissacarídeos (LPS), localizados na membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Os mutantes com erros na biossíntese de LPS mantêm um mínimo pré-lípido A estrutural, isto é, a primeira parte a ser sintetizado e que se acredita ser necessária para a manutenção da integridade da membrana externa. Esses mutantes são úteis para avaliar atividades patogênicas e desenvolver hipóteses na construção de outros trabalhos, por isso a obtenção desses mutantes seria de grande interesse. Assim, este projeto tem como objetivo a construção de mutantes bacterianos de *N. meningitidis* com genes de produção de LPS inativados- *lpxA* e *rfaD*.

Resultados e Discussão

Mutações em *Neisseria meningitidis* por inativação do gene *lpxA* é pouco estudado, mas bem elucidado em estudos prévios, evidenciando que nessa bactéria patogênica, uma completa deficiência de LPS pode tornar viável um mutante obtido pela inativação por inserção do gene *lpxA*. O gene *rfaD* codifica a ADP-L-glicero-D-mannoheptose epimerase, enzima envolvida na biossíntese do LPS precursor ADP-L-glicero-D-mannoheptose. Este oligopolissacarídeo contribui para a fixação dos meningococos às células epiteliais humanas. Dessa maneira, a viabilidade de mutantes com o gene *rfaD* revela que tal gene não compreende um fundamental para a continuidade de vida celular. A literatura apresenta gonococos (*Neisseria gonorrhoeae*) viáveis, mas mutações em meningococos ainda não foram detalhadas.

Das linhagens de *Neisseria meningitidis* utilizadas no trabalho, realizou-se transformação bem sucedida com a formação de colônias de mutantes com o vetor *rfaD* das seguintes cepas:

Linhagem

N. meningitidis C2135

N. meningitidis W135atcc

N. meningitidis Y USA

N. meningitidis W135
Marseille

Características

Sorogrupo C,
BIOMERIEUX C2135
Sorogrupo W135, ATCC
35559
N. meningitidis isolada
em surtos epidêmicos
nos Estados Unidos
Sorogrupo W135 da
coleção do Instituto
Adolfo Lutz

Conclusões

A partir dos resultados positivos, acredita-se que há chances reais de considerar que os genes *lpxA* e *rfaD* não são fundamentais para a sobrevivência da *Neisseria meningitidis*, não sendo portanto genes essenciais. Em virtude disso, ao inativá-los com cassete de resistência, a continuidade da vida celular permanece viável, visto que o meningococo fora passível de transformação, identificado pelo aparecimento de colônias de transformadas em meio de cultura seletivo para mutantes específicos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador Marcelo Lancellotti pelo aprendizado em ciências bem como pelas lições de vida. À pós-doutoranda Daisy Machado por todo auxílio e dedicação durante o período do trabalho e à doutoranda Thais Holtz pela paciência e colaboração durante os experimentos.

Steeghs, L., den Hartog, R., den Boer, A., Zomer, B., Roholl, P. and van der Ley, P. (1998) Meningitis bacterium is viable without endotoxin. *Nature* 392, 449^450.

Steeghs, L., de Cock, H., Evers, E., Zomer, B., Tommassen, J. and van der Ley, P. (2000) Outer membrane composition of a lipopolysaccharide-deficient *Neisseria meningitidis* mutant. *EMBO J.* 20, 6937^6945.

Drazek, E.S., Stein, D.C., Deal, C.D. (1995) A mutation in the *Neisseria gonorrhoeae* *rfaD* homolog results in altered lipooligosaccharide expression. *J. Bacteriol.*