



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDA DE PACE

**“ESTUDO DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO VI
EM UMA LINHAGEM DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA
PARA AVES (APEC)”**

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Fernanda De Pace</u> <u>[Assinatura]</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microrganismos .

Orientador(a): Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Co-Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA*BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP*

P114e	<p>Pace, Fernanda de</p> <p>Estudo de genes do Sistema de Secreção Tipo VI em uma linhagem de <i>Escherichia coli</i> patogênica para aves (APEC) / Fernanda de Pace. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadores: Wanderley Dias da Silveira, Eliana Guedes Stehling. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Sistema de Secreção Tipo VI. 2. <i>Escherichia coli</i> patogênica aviária. 3. Patogenicidade. I. Silveira, Wanderley Dias da, 1956-. II. Stehling, Eliana Guedes. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
--------------	--

Título em inglês: Study of Type VI Secretion System genes in an avian pathogenic *Escherichia coli* strain (APEC).

Palavras-chave em inglês: Type VI Secretion System; Avian pathogenic *Escherichia coli*; Pathogenicity.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Wanderley Dias da Silveira, Luciana Maria de Hollanda, Fabiana Horn, Marcelo de Carvalho Ramos, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo.

Data da defesa: 03/03/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 03 de março de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a) .Wanderley Dias da Silveira (Orientador)



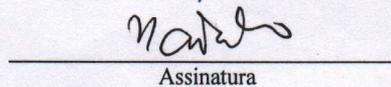
Assinatura

Profa. Dra. Luciana Maria de Hollanda



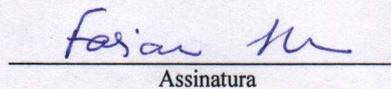
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos



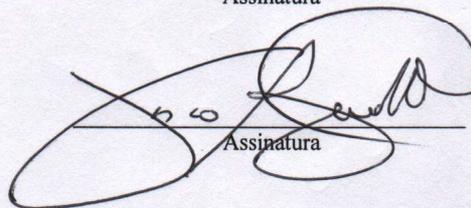
Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Horn



Assinatura

Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo



Assinatura

Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Assinatura

Profa. Dra, Janaína Luiza Leite Garbim

Assinatura

Agradecimentos

Agradeço à vida e a toda beleza, curiosidade, felicidade e amor, que lhe são intrínsecos. Agradeço à vida, também, por ter me ensinado que cada um de nós é um universo.

Agradeço às Ciências Biológicas, o curso mais perfeito que poderia ter escolhido, por ter me despertado ainda mais paixão e fascínio por tudo que vive.

Agradeço a toda minha família, que sempre me apoiou. Aos meus pais Regina Marta Bomfim de Pace e Luiz Roberto de Pace e meu querido irmão Luciano de Pace. Aos meus tios Teresa Cristina de Pace Bittencourt Pinto e Ulisses Bittencourt Pinto, que me ajudaram de uma maneira fundamental para chegar até aqui e à minha avó Teresa Colturato de Pace, pelo carinho incondicional.

Agradeço ao meu marido, Eduardo Bodnariuc Fontes, que esteve comigo em todos os momentos, me apoiando, incentivando e trazendo muita alegria para o meu dia a dia.

Agradeço ao meu orientador Wanderley Dias da Silveira e aos amigos muito especiais do laboratório de Biologia Molecular Bacteriana: Cristiane Mabilon, Jacqueline Boldrin de Paiva, Janaina Luíza Leite Garbim, Thaís Galvão, Telma Piascesi, Monique Tiba Ribeiro, Fernanda Laroza Paganelli, Murillo Lino Bution, Victor Maturana, Eliana Guedes Stehling, Gerson Nakazato, Izildinha Coli, Ricardo Destéfano e Sandra Queiróz, pela amizade, prontidão em ajudar e pelas boas risadas.

Agradeço à pessoa que foi minha orientadora e amiga nos Estados Unidos, Vanessa Sperandio e toda sua equipe: Darya Terekhova, Alline Pacheco, Cristiano Moreira, Christopher Parker, Benjamin Habdas e Jacqueline Njoroge, que tiveram um papel fundamental no desenvolvimento deste trabalho, por compartilharem conhecimento científico e amizade.

Ao meu orientador da Universidade da África do Sul, Prof. Dr. Wolf Brandt.

Aos amigos Luciana Maria de Hollanda e Marcello Lancellotti pelas ajudas científicas e espirituais, pelos ótimos conselhos e saudosas risadas.

A todos os meus amigos, um agradecimento caloroso por fazerem parte da minha vida de uma maneira tão boa, contribuindo substancialmente para o meu sucesso profissional e pessoal.

Às agências CAPES (n° 4062-08-6) e FAPESP (n° 07/50432-3), que financiaram o projeto.

*“Ver um mundo num grão de areia
E um céu numa flor silvestre,
Ter o infinito na palma da sua mão,
E a eternidade numa hora”.*

Willian Blake

Resumo

Linhagens de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) causam infecções extra-intestinais e são responsáveis por significativas perdas econômicas na indústria avícola mundial. Recentemente, foram descritos isolados de APEC geneticamente relacionados a diversas outras *E.coli* extraintestinais (ExPEC) de origem humana, indicando a possibilidade das mesmas constituírem risco zoonótico para humanos. Alguns dos conhecidos fatores de virulência de APEC incluem adesinas, sistema de aquisição de ferro, citotoxinas, entre outros. Nesse trabalho, demonstramos que a linhagem de APEC SEPT 362, isolada do fígado de uma ave apresentando sinais clínicos de septicemia, expressa o Sistema de Secreção Tipo VI (SST6), causa rearranjo do citoesqueleto de células epiteliais cultivadas *in vitro*, é capaz de aderir e invadir células HeLa e é viável dentro de macrófagos. Para estudar o envolvimento do SST6 na patogênese da linhagem SEPT362, foram deletados três genes desse sistema: *hcp*, que codifica para uma proteína estrutural e secretada, *clpV*, que codifica para uma ATPase e *icmF* (intracellular multiplication factor), gerando três mutantes, respectivamente. Todos os mutantes demonstraram uma diminuição nos processos de adesão e invasão a células HeLa, formação de biofilme e virulência *in vivo*. Estudos de transcriptoma mostraram que a expressão da fímbria tipo 1 encontra-se diminuída nesses mutantes, o que poderia ser responsável pela diminuição do processo de adesão e invasão às células epiteliais. Nesse trabalho, demonstramos que o SST6 é importante para o processo de patogenicidade, visto que todos os mutantes tiveram sua virulência atenuada em experimentos realizados *in vivo* com uma significativa diminuição de características relacionadas à patogenicidade *in vitro*. Esses resultados demonstram que os genes estudados do SST6 influenciam a expressão da fímbria tipo 1 e contribuem para a patogênese desta linhagem APEC.

Palavras chave: *Escherichia coli*, Patogenicidade, Sistema de Secreção Tipo VI

Abstract

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains frequently cause extraintestinal infections and are responsible for significant economic losses in the poultry industry worldwide. APEC isolates are closely related to human extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains and may also act as pathogens for humans. Known APEC virulence factors include adhesins such as type 1 fimbriae and curli, iron acquisition systems, and cytotoxins, among others. Here we demonstrated that APEC strain SEPT362, isolated from a septicemic hen, expresses a type VI secretion system (T6SS), causes cytoskeleton rearrangements, invades epithelial cells, replicates within macrophages, and causes lethal disease in chicks. To assess the contribution of the T6SS to SEPT362 pathogenesis, we generated three mutants, Δhcp (which encodes a protein suggested to be both secreted and a structural component of the T6SS), $\Delta clpV$ (encoding the T6SS ATPase) and $\Delta icmF$ (intracellular multiplication factor). All mutants showed decreased adherence and invasion to HeLa cells and decrease in several other pathogenicity related characteristics. Transcriptome studies showed that the level of expression of type 1 fimbriae was decreased in these mutants, which may account for the diminished adhesion and invasion of epithelial cells. The T6SS seems to be important for the disease process, given that both mutants (Δhcp and $\Delta clpV$) were attenuated in an infection model in chicks. These results suggest that the T6SS influences the expression of type 1 fimbriae and contributes to the pathogenesis of this APEC strain pathogenesis.

Key words: *Escherichia coli*, Patogenicity, Type VI Secretion System

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	11
O Sistema de Secreção Tipo VI.....	13
A proteína ClpV.....	15
As proteínas Hcp e VgrG	16
A proteína Icm-F.....	18
Objetivos	20
Material e Métodos	21
Características da linhagem estudada.....	21
Reações de PCR e iniciadores para detecção e seqüenciamento dos genes do SST6	23
Construção dos mutantes Δhcp , $\Delta icmF$ e $\Delta clpV$	25
Construção do plasmídio pKD46 com a inserção do cassete de cloranfenicol.....	29
Preparação de células competentes, transformação e eletroporação.....	31
Reações de ligação.....	31
Construção das linhagens complementadas dos mutantes	31
Reações de cortes com as enzimas BamHI e SalI.....	33
Verificação da expressão de genes <i>clpV</i> , <i>hcp</i> e <i>icmF</i> , na presença e na ausência de células HeLa	33
Verificação da expressão do gene <i>clpV</i> <i>in vivo</i>	34
Cultivo de células HeLa	34
Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real).....	35
Extração de RNA total	37
Síntese de cDNA e preparação dos fragmentos marcados para o microarranjo	37
Microarranjo e análise dos dados.....	41
Número de acesso para os dados dos microarranjos	41
Adesão bacteriana a células epiteliais	42
Teste de motilidade	42
RNA slot blots	43

Teste de invasão celular	44
Teste de viabilidade em macrófagos	44
Extração de proteínas de membrana	45
Preparo do gel de poliacrilamida	46
Descoloração e digestão dos peptídeos	47
Análise em MALDI-TOF	47
Teste para visualização do citoesqueleto de actina (Fluorescent Actin Staining - FAS)	47
Teste para verificação de formação de Biofilme	48
Experimento de patogenicidade <i>in vivo</i>	49
Análises estatísticas	49
Resultados	50
A linhagem SEPT 362 expressa o Sistema de Secreção Tipo VI	50
Construção dos mutantes isogênicos e complementos.....	52
O SST6 contribui para a aderência de SEPT362 a células HeLa.....	54
O Sistema de Secreção Tipo VI contribui para a invasão de SEPT362 a células epiteliais	57
Teste para a análise do rearranjo do citoesqueleto de actina (Fluorescein Actin Test – FAS)	58
O Sistema de Secreção Tipo VI influencia na formação de biofilme	61
O gene <i>icmF</i> pode regular a motilidade	62
O Sistema de Secreção Tipo VI é importante para a virulência <i>in vivo</i>	65
Discussão	67
Conclusões	74
Futuros Trabalhos	75
Referências Bibliográficas	76

Introdução

O Brasil é, atualmente, o maior exportador mundial e o terceiro maior produtor de carne de frango, estando atrás apenas dos Estados Unidos e da China (Associação de Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango) (ABEF, 2011). Este cenário demonstra a importância que a indústria avícola representa para as economias interna e exportadora brasileiras, gerando empregos e alimentos de alto valor protéico com relativo baixo custo. A indústria avícola apresenta fatores que podem afetar significativamente os seus rendimentos, causar diminuição da produtividade e, por conseguinte, aumento de custo. Entre esses fatores, destacam-se as infecções causadas por microrganismos patogênicos (vírus, bactérias e fungos) e, principalmente, pela bactéria *Escherichia coli*, agente significativo de morbidade e mortalidade (GROSS, 1991).

Escherichia coli é um bacilo gram negativo, anaeróbio facultativo, cuja temperatura ideal de crescimento varia entre 25°C e 37°C, podendo crescer até a 45°C, e em faixas de pH entre 4,4 e 9,0 (REED *et al.*, 1994). O gênero *Escherichia*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, possui diferentes grupos antigênicos, os quais são caracterizados por diversas combinações do antígeno O (antígeno lipopolissacarídico somático constituinte da membrana externa), antígeno K (antígeno polissacarídico capsular) e antígeno H (antígeno protéico flagelar), o que origina aproximadamente 181 sorotipos, descritos atualmente (PIATTI & BALDASSI, 2007). Algumas linhagens de *E. coli* fazem parte da microbiota normal do trato intestinal do hospedeiro, sendo benéficas para os mesmos. Entretanto, há uma grande variedade de infecções entéricas e extraintestinais causadas por estes microrganismos em diversos tipos de hospedeiros (RON, 2006).

As denominadas *Escherichia coli* patogênicas para aves (APECs) estão associadas a diversas doenças, entre as quais, destacam-se: septicemia, síndrome da cabeça inchada, onfalite e celulite.

A septicemia, doença causada pela linhagem em estudo, é uma doença infecciosa sistêmica que inclui inflamação dos sacos aéreos, pericardite e perihepatite, com a falência de múltiplos órgãos das aves infectadas (RODRIGUEZ-SIEK *et al.*, 2005).

Entre os fatores de virulência já descritos mais estudados em amostras APEC, estão as fímbrias do tipo 1 e P, aerobactina, produção de cápsula, lipopolissacarídeo (LPS), colicina V, proteínas relacionadas à resistência ao soro e sistemas de aquisição de ferro (EWERS *et al.*, 2007).

Há, porém, diversos outros mecanismos de virulência conhecidos em *Escherichia coli* e em outros patógenos bacterianos em geral. Um exemplo muito significativo é a secreção de certas proteínas no meio exterior à bactéria e, também, diretamente no interior das células do hospedeiro (ECONOMOU *et al.*, 2006).

Os mecanismos moleculares pelos quais proteínas são secretadas por bactérias gram-negativas e positivas envolvem estruturas macromoleculares protéicas, os chamados sistemas de secreção, que podem ser mais ou menos complexos em termos de composição e regulação (BOYER *et al.*, 2009). Estes complexos macromoleculares são capazes de influenciar a resposta do hospedeiro ao agente infeccioso, liberando fatores de virulência para o ambiente extracelular, ou os translocando para o interior de células hospedeiras. Para serem secretadas, as proteínas necessitam destes sistemas para tornar possível o processo de atravessar a membrana interna, o espaço periplasmático e a membrana celular externa de bactérias gram-negativas (THANASSI & HULTGREN, 2000).

Os sistemas de secreção de proteínas exercem importantes funções na virulência e sobrevivência bacteriana dentro de células eucarióticas, assim como na adaptação ao ambiente, sendo amplamente distribuídos entre as bactérias (ECONOMOU *et al.*, 2006).

Em bactérias gram-negativas há seis classes de sistemas de secreção de proteínas (Sistemas de Secreção Tipo I a VI) os quais têm sido caracterizados por mediar o transporte de proteínas para o exterior celular bacteriano. Os sistemas de secreção tipo I, III, IV e VI exportam proteínas através das membranas interna e externa, em um único passo. Outras proteínas são exportadas previamente para o espaço periplasmático via sistemas Sec ou Tat (reconhecem sequência N-terminal hidrofóbica e aminoácidos básicos de sequência N-terminal de proteínas, respectivamente) e, então, translocadas através da membrana externa via sistemas de secreção tipo II ou tipo V (TSENG *et al.*, 2009).

Bactérias gram-positivas também dispõem dos mesmos sistemas de secreção encontrados em bactérias gram-negativas e possuem, ainda, um sistema específico deste grupo, o Sistema de Secreção Tipo VII. Apesar de bactérias gram-positivas possuírem somente uma membrana, algumas espécies de *Mycobacterium*, possuem uma parede celular externa constituída por lipídeos, chamada micomembrana. Por esta razão, bactérias que pertencem a este grupo possuem o sistema de secreção tipo VII, capaz de transportar proteínas através desta parede celular (TSENG *et al.*, 2009).

O Sistema de Secreção Tipo VI

O enfoque deste trabalho é o Sistema de Secreção Tipo VI (SST6), recentemente descrito, o qual influencia na interação com o hospedeiro, promove sucesso na infecção e auxilia na adaptação ao ambiente (BOYER *et al.*, 2009; TSENG *et al.*, 2009; BINGLE *et al.*, 2008; FILLOUX *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008).

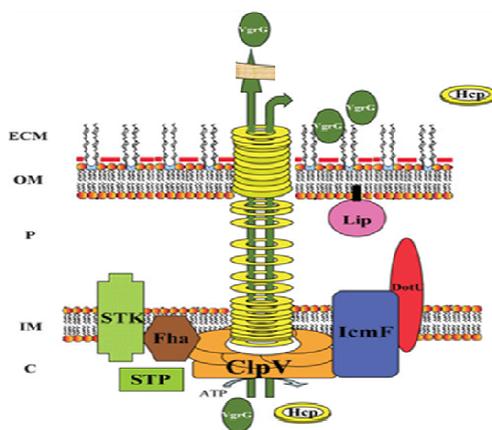
O “cluster” do SST6 é composto por 15 a 20 genes, conservados tanto em bactérias patogênicas quanto em não patogênicas (FILLOUX *et al.*, 2008; BOYER *et al.*, 2009). Uma ampla análise de genomas bacterianos identificou um grupo de 13 proteínas conservadas, que constitui o chamado “núcleo” do SST6 e um conjunto de proteínas não conservadas, com funções regulatórias e acessórias. Subclasses do SST6 diferenciam-se no conteúdo dessas proteínas acessórias, sugerindo que este sistema evoluiu para se adaptar a vários microambientes e ao desenvolvimento de funções especializadas (CASCALES, 2008; BINGLE *et al.*, 2008). Em *Pseudomonas aeruginosa* estes genes acessórios codificam elementos de uma via de regulação pós-transcricional que modulam a atividade do Sistema de Secreção através de mudanças do estado de fosforilação da proteína Fha1 (MOUGOUS *et al.*, 2007), o que estimula o funcionamento do SST6. Em outras espécies já foram caracterizados mecanismos regulatórios do operon do SST6 que envolvem ativadores transcricionais da família AraC ou ainda Sigma 54. Em muitos casos, estes elementos regulatórios são também codificados dentro do operon (FILLOUX *et al.*, 2008).

Apesar da clara importância do SST6 na patogênese bacteriana, muitas bactérias que possuem este sistema não são patógenos, nem simbiotes. Trabalhos prévios demonstram que o SST6 agiria, também, limitando a replicação bacteriana ou virulência, favorecendo relações comensais ou mutualísticas entre bactérias e seus hospedeiros. Um exemplo da contribuição do SST6 favorecendo uma colonização em longo prazo, foi uma mutação no locus *sciS* (que codifica parte do SST6), de *Salmonella typhimurium*, a qual resultou em aumento da replicação bacteriana dentro de macrófagos e aumento na virulência em modelos *in vivo* (PARSONS & HEFFRON, 2005). Fato similar ocorreu em *Helicobacter hepaticus* (CHOW & MAZMANIAN, 2010). Entretanto, o SST6 também poder ser requerido para a virulência de patógenos humanos e de outros animais, como *Vibrio cholerae*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fransciella tularensis*, e em patógenos de plantas, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum* e *Xanthomonas oryzae* (BINGLE *et al.*, 2008; SHRIVASTAVA & MANDE, 2008; FILLOUX *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008; CASCALES, 2008). Em bactérias patogênicas já foi demonstrado que este sistema de secreção está relacionado a diversas características da virulência, como a resistência à predação por amebas em *Vibrio cholerae* e *Burkholderia cenocepacia* (AUBERT *et al.*, 2008; PUKATZKI *et al.*, 2006), virulência global do patógeno *Edwardsiella tarda* (RAO *et al.*, 2004) e inibição da atividade fagocítica de macrófagos em *Aeromonas hydrophila* (SUAREZ *et al.*, 2008). Também pode ser requerido para uma eficiente colonização de raiz pelas bactérias fixadoras de nitrogênio *Mesorhizobium loti* e *Rhizobium leguminosarum* (BINGLE *et al.*, 2008; BLADERGROEN *et al.*, 2003). Alguns exemplos de bactérias não simbiotes que possuem genes do SST6 são *Myxococcus xanthus*, *Dechloromonas aromatica* e *Rhodopirellula baltica*, sugerindo que o mesmo pode contribuir, também, para a adaptação ambiental. Um trabalho recente sugere, ainda, que o SST6 pode mediar interações antagônicas entre bactérias, sendo que em uma competição bacteriana, seria favorecida a espécie que o possuísse (JANI & COTTER, 2010).

Apesar de terem sido realizados diversos estudos sobre o SST6, as funções exatas dos genes deste sistema ainda são especulativas. Acredita-se que as proteínas que não são secretadas, podem ser tanto componentes estruturais do aparato de secreção, quanto auxiliar

no transporte de proteínas de alguma outra forma, como por exemplo, fornecendo a energia necessária para translocar os substratos através do canal de secreção (FILLOUX *et al.*, 2008).

Os componentes do SST6 que foram parcialmente caracterizados, até o momento, incluem uma ATPase ClpV (caseinolytic protease V – membro da família de proteínas Hsp100/Clp), um gene homólogo de Icm-F (intracellular multiplication F - proteína transmembrana que estabilizaria o complexo protéico na membrana) e as proteínas estruturais e secretadas Hcp (hemolysin coregulated protein – que forma o tubo hexamérico transmembrana através do qual as proteínas são secretadas) e VgrG (Valine-glycine repeat protein – estrutura pontiaguda localizada acima do tubo Hcp, que supostamente perfuraria a célula hospedeira, para a secreção das proteínas efetoras) (BINGLE *et al.*, 2008; FILLOUX *et al.*, 2008; CASCALES, 2008). A maioria destes componentes estudados não é secretada, mas é necessária para a secreção do efetor VgrG, que é, supostamente, estrutural e secretado (BINGLE *et al.*, 2008; CASCALES, 2008).



(Figura explicativa retirada de FILLOUX *et al.*, 2008)

A proteína ClpV

ATPases são frequentemente utilizadas por sistemas de secreção para fornecerem energia para o processo do transporte. No caso do SST6, o gene *clpV* pertence a uma

superfamília de ATPases a qual energiza a formação de um canal hexamérico, através do qual proteínas são transportadas num mecanismo também dependente de hidrólise de ATP (BINGLE *et al.*, 2008; CASCALES, 2008). O gene *clpV* é um membro da família Hsp100/Clp. As proteínas desta família agem em uma rede de controle de qualidade de proteínas em células procarióticas para desagregar, degradar e redobrar proteínas mal formadas ou agregadas (SCHLIEKER *et al.*, 2005). A proteína ClpV, aparentemente, não possui atividade de desagregação, mas é capaz de realizar a função de transporte e redobramento de proteínas (BINGLE *et al.*, 2008; FILLOUX *et al.*, 2008; CASCALES, 2008, SCHLIEKER *et al.*, 2005). Em um estudo anterior, foi demonstrado que a mutação de *clpV* em *Pseudomonas aeruginosa*, ou mesmo a perda da região protéica responsável pela atividade ATPásica, é suficiente para abolir a capacidade de secreção deste sistema (MOUGOUS *et al.*, 2006).

Um trabalho apresentado por Bonemann e colaboradores (2009) desafiam este conceito, por sugerir outro papel para a proteína ClpV de *Vibrio cholera* no SST6. Os dados sugerem que Hcp e VgrG não interagem com ClpV. Os autores demonstraram que ClpV interagiria com duas proteínas não caracterizadas do SST6, VipA e VipB (complexos tubulares que integram o SST6), as quais são citosólicas e não secretadas. VipA e VipB seriam capazes de formar microtúbulos e a atividade de ClpV resultaria na clivagem de grandes complexos de VipA-B em pequenos complexos, que formariam o canal de secreção. Este processo de “desmontagem” requereria o reconhecimento de VipA-B pela porção N-terminal de ClpV. Esta seria uma teoria a mais sobre a montagem do canal de secreção do sistema.

As proteínas Hcp e VgrG

Hcp (hemolysin coregulated protein) é uma proteína que forma anéis hexaméricos, que se sobrepõem para dar origem ao tubo transmembrana através do qual as proteínas são secretadas, enquanto VgrG (Valine-glycine repeat protein) é uma proteína que forma uma estrutura pontiaguda localizada na extremidade superior do tubo Hcp e que, supostamente,

perfuraria a célula hospedeira, para a secreção das proteínas bacterianas efetoras no interior da mesma (BINGLE *et al.*, 2008; FILLOUX *et al.*, 2008; CASCALES, 2008).

Análises das sequências de proteínas VgrG confirmam que algumas regiões C-terminal das mesmas possuem domínios que mostram similaridades com adesinas ou proteínas com funções enzimáticas (CASCALES, 2008), enquanto outras extensões C-terminal possuem uma variedade de domínios conservados que estão implicados em várias funções biológicas, incluindo a ligação ao citoesqueleto de actina da célula hospedeira e degradação da camada de peptidoglicano (PUKATZKI *et al.*, 2009). Quando expresso em células eucarióticas, o domínio de VgrG que favorece essa ligação na actina, causa colapso do citoesqueleto da célula hospedeira (SHEAHAN *et al.*, 2004). Esta interação entre VgrG e actina é direta e requer ATP como fonte de energia (PUKATZKI *et al.*, 2007). Este conjunto de proteínas da família VgrG, que contém domínios não estruturais, que exercem um papel na patogênese, são chamados VgrGs “evoluídos” (PUKATZKI *et al.*, 2007). Estas características, porém, não são gerais, pois uma grande quantidade de organismos que contém SST6 não codifica proteínas VgrGs “evoluídas” (PUKATZKI *et al.*, 2009).

Proteínas homólogas de Hcp e VgrG têm sido detectadas em sobrenadantes de cultura celular da maioria das bactérias que possui SST6 e em fluidos de células eucarióticas infectadas, sugerindo que essas proteínas são também exportadas (FILLOUX *et al.*, 2008). Mutações em genes *hcp* ou *vgrG*, em *V. cholerae* e *Edwardsiella tarda*, previnem a secreção de Hcp e VgrG, respectivamente, reforçando a hipótese de que essas proteínas são componentes secretáveis do aparato (FILLOUX *et al.*, 2008). Há evidências, em *V. cholerae*, de que uma das proteínas VgrG secretada, que possui atividade de ligação no citoesqueleto de actina, *in vitro*, tenha a função de realizar uma possível translocação para dentro de macrófagos, por um mecanismo dependente de SST6 (PUKATZKI *et al.*, 2007). Este estudo reforça a hipótese que as proteínas VgrGs formam um complexo que pode agir como uma estrutura que penetra a membrana, transportando o domínio efetor de VgrG para o citoplasma do hospedeiro. Contudo, ainda não é claro se VgrG age como um transportador ou como um efetor sob condições fisiológicas, ou se ambas as funções são igualmente importantes (PUKATZKI *et al.*, 2007).

Recentes cristalografias de proteínas das famílias de Hcp e VgrG demonstraram que elas apresentam grande similaridade com as proteínas do tubo e da cauda de bacteriófagos, sendo que estes sistemas seriam estruturalmente e evolutivamente relacionados (LEIMAN *et al.*, 2009; PELL *et al.*, 2009). De acordo com esse modelo, muito similar ao proposto para *Vibrio cholerae*, o SST6 seria uma cauda de bacteriófago invertida (LEIMAN *et al.*, 2009; PELL *et al.*, 2009) e as estruturas Hcp e VgrG formariam um pilus na superfície bacteriana. As moléculas de VgrG possuiriam duas funções, uma seria como parte integrante da estrutura, sendo localizada no final do tubo Hcp e responsável pela perfuração da membrana da célula eucariótica, e outra como molécula efetora injetada dentro desta mesma célula, conforme já sugerido por alguns autores (PUKATZKI *et al.*, 2007; BINGLE *et al.*, 2008; FILLOUX *et al.*, 2008; CASCALES, 2008).

A proteína Icm-F

Os genes *icm-F-like* contêm vários domínios transmembrana, localizados na membrana interna bacteriana, sendo essenciais para replicação intracelular em várias linhagens (BINGLE *et al.*, 2008; SEXTON *et al.*, 2004). A proteína IcmF, segundo o modelo proposto por Cascales (2008), seria uma proteína transmembrana que, supostamente, interagiria com a parte citosólica do SST6, assim como com a ATPase ClpV (CASCALES, 2008). IcmF apresenta uma proteína homóloga constituinte do sistema de secreção dot/icm, inicialmente caracterizado em *Legionella pneumophila*. Neste sistema, IcmF interagiria com a proteína DotU, formando um complexo DotU/IcmF, com a função de montar e estabilizar o complexo responsável pela secreção de fatores de virulência (VANRHEENEN *et al.*, 2004).

Devido à provável importância que o SST6 tem para a patogênese de diversos agentes bacterianos e ao fato de que nada relacionado a este tipo de sistema já tenha sido descrito em qualquer linhagem de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC), neste trabalho verificamos se estes genes estariam presentes na linhagem SEPT362 e se os mesmos

poderiam estar relacionados às características de patogenicidade apresentadas por esta linhagem. Assim, após identificarmos, por PCR e seqüenciamento dos nucleotídeos, a presença dos genes *icm-F*, *clpV* e *hcp* do SST6 na linhagem SEPT 362, realizamos a exclusão dos genes, gerando três mutantes, e verificamos as características que os mesmos apresentam em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* e a correlação com a patogenicidade apresentada por esta linhagem bacteriana.

Objetivos

O Sistema de Secreção Tipo VI foi recentemente descrito (PUKATZKI *et al.*, 2006; MOUGOUS *et al.*, 2006) e vem sendo relacionado como importante à virulência, vários tipos de interação bactéria – célula hospedeira e adaptação a uma grande variedade de ambientes.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se o SST6 apresenta propriedades relacionadas aos processos de patogênese existentes na linhagem APEC SEPT362, através da construção de linhagens mutantes. Nestas linhagens mutantes foram realizados testes *in vitro* (adesão e invasão celular, viabilidade dentro de macrófagos, análise do rearranjo do citoesqueleto de actina em células hospedeiras, análise do perfil protéico, formação de biofilme e motilidade) e *in vivo* (análise da patogenicidade), para a correlação dos dados obtidos.

Assim, o presente trabalho visou, pela primeira vez em uma linhagem APEC (SEPT362), elucidar ações do SST6 relacionadas à patogenicidade e, ao mesmo tempo, descrever possíveis funções de seus componentes relacionadas à expressão gênica global.

Material e Métodos

Características da linhagem estudada

A linhagem patogênica SEPT362 (SOROTIPO OR:H10), isolada do fígado de uma ave (galinha poedeira) com quadro clínico de septicemia, possui 5 plasmídios, com 2,7 MDa, 4,7 MDa, 43 MDa, 56 MDa e 88 MDa cada e resistência aos antibióticos Estreptomicina (100µg/ml), Ampicilina (100µg/ml) e Tetraciclina (50µg/ml). A partir dessa linhagem selvagem, foram deletados três genes (*hcp*, *icmF* e *clpV*) do SST6, gerando três mutantes, conforme descrito na tabela 1.

SEPT362	<i>Escherichia coli</i> septicêmica, linhagem selvagem
Δhcp	Linhagem mutante, com deleção do gene <i>hcp</i>
$\Delta icmF$	Linhagem mutante, com deleção do gene <i>icmF</i>
$\Delta clpV$	Linhagem mutante, com deleção do gene <i>clpV</i>
$\Delta hcpC$	Linhagem com deleção do gene <i>hcp</i> , complementada
$\Delta icmFC$	Linhagem com deleção do gene <i>hcp</i> , complementada
$\Delta clpVC$	Linhagem com deleção do gene <i>hcp</i> , complementada

Tabela 1. Linhagens estudadas no trabalho

Meios de cultura utilizados

- Luria-Bertani (LB):

Para 1 L de meio de cultura: Triptona - 1g; Extrato de Levedura - 0,5g; NaCl - 1g, pH 7,4

- DMEM: Dulbecco's modified eagle medium (DMEM 1x, Invitrogen®)

1000mg/L D-glicose; 584mg/L L-glutamina; 110mg/L piruvato de sódio;

Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, 50 ml de cultura bacteriana foram cultivados por 18 horas, sem agitação, em meio LB, a 37°C. As células foram centrifugadas e ressuspensas em 3 ml de tampão de isolamento (0,15M Tris/HCl; 0,1M EDTA – pH 8,0). A esse volume foram adicionados 500µl de solução SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sódio, diluído em água deionizada autoclavada). A amostra foi incubada a 65°C por 5 minutos e, a seguir, adicionados à mesma, 6 ml de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (23:24:1). A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 14000rpm a 4°C, por 5 minutos. A camada aquosa foi descartada e ao volume restante adicionados, cuidadosamente, 10 ml de solução de etanol 95% gelado. O sedimento formado foi removido com um bastão de vidro e dissolvido em tampão TE (10mM Tris/HCl; 1mM EDTA). Para a remoção de RNA, foram adicionados 4µl de RNase (10µg/µl) a 300µl da extração de DNA e a amostra incubada a 37°C por 3 horas. Para re-precipitação, ao DNA genômico tratado com RNase, foram adicionados 900µl de solução de re-precipitação (88% isopropanol; 0,2M acetato de potássio). A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 6000rpm e lavada com solução de etanol 70% gelada. O sedimento foi seco ao ar livre e ressuspensão em 300µl de tampão TE.

Com este DNA gênômico foi realizado o seqüenciamento, utilizando-se os mesmos iniciadores utilizados para a PCR de identificação dos genes do sistema de secreção tipo VI, na linhagem septicêmica 362. O seqüenciamento inicial dos genes foi realizado para a exata construção dos iniciadores utilizados para a técnica de deleção “Lambda Red”, abaixo descrita.

Reações de PCR e iniciadores para detecção e seqüenciamento dos genes do SST6

Para a identificação dos genes do sistema de secreção tipo VI na amostra SEPT362, foram realizados experimentos de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da Polimerase), com a enzima Platinum® Taq polymerase (Invitrogen®), conforme descrito na tabela 2. Os ciclos utilizados nas reações de detecção e os iniciadores utilizados nas reações de detecção e seqüenciamento dos nucleotídeos estão descritos na tabela 3 e 4, respectivamente.

Componentes	Concentração Final
10x Tampão de PCR	1 x
Solução de dNTP 10mM	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	1,5mM
Iniciadores (10µM cada)	0,2µM cada
DNA	100ng
Platinum® Taq DNA Polimerase	1,5 unidade
Água deionizada autoclavada	q.s.p 50µl

Tabela 2. Componentes utilizados nas reações de PCR para identificação dos genes estudados do SST6

Fase	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	94°C	2 minutos
Desnaturação	94°C	30 segundos
Pareamento	Genes <i>clpV</i> e <i>icmF</i> : 51°C <i>hcp</i> : 50°C	30 segundos
Extensão	72°C	Genes <i>clpV</i> e <i>icmF</i> : 3 minutos <i>hcp</i> : 1 minuto

Tabela 3. Ciclos das reações de PCR para identificação dos genes estudados do SST6.

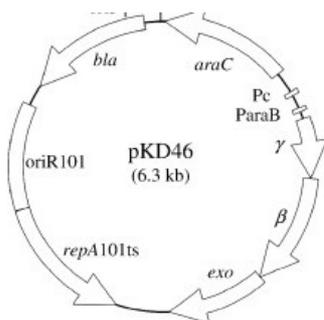
Gene	Iniciadores utilizados para detecção e sequenciamento dos genes do SST6 na amostra estudada
<i>hcp</i>	Direto: ATGGCGAATTTAATTTATTTAACAC Reverso: ACTTAAAAAAGACGATCTTCCCATAAAC
<i>icmF</i>	Direto: ATGGTCATCGGCCCGGC Reverso: ACTCAGTACAGTGTGTCTGAC
<i>clpV</i>	Direto: ATGATCCAGATTGATCTTCC Reverso: ACTCATAAAACCGTTTCATCCT

Tabela 4. Iniciadores utilizados para detecção e sequenciamento dos genes do SST6.

Construção dos mutantes Δhcp , $\Delta icmF$ e $\Delta clpV$

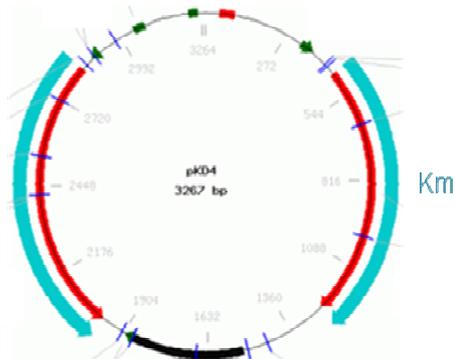
Os genes *hcp*, *icmF* e *clpV* foram excluídos do cromossomo da linhagem de *E. coli* em estudo, através da técnica de “lambda red”, conforme descrito por Datsenko e Wanner (2000).

Resumidamente, no primeiro passo, eletroporou-se o plasmídio pKD46 (plasmídio que expressa a enzima recombinase, que nesse trabalho teve que ser modificado com a inserção de um cassete de cloranfenicol - abaixo descrito - devido a impossibilidade de seleção bactéria selvagem possuir resistência à ampicilina, resistência original do plasmídio pKD46) na linhagem selvagem SEPT362.



Plasmídio pKD46. Doublet *et al.*, 2008.

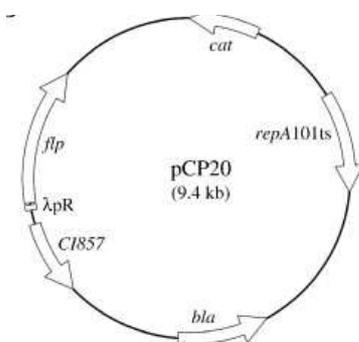
Em um segundo passo, utilizando-se o plasmídio pDK4 como molde, o cassete do gene da canamicina foi amplificado por PCR (tabela 5 e 6). Os iniciadores (descritos na tabela 7) para a amplificação do cassete de canamicina continham em suas extremidades, sequências de 50 nucleotídeos, homólogas aos genes que se desejava excluir. As reações de amplificação do cassete foram submetidas à eletroforese, recortadas do gel de agarose e purificadas, para, então, serem eletroporadas dentro da bactéria selvagem previamente eletroporada com o plasmídio pKD46.



Plasmídio pKD4. Datsenko & Wanner, 2000.

Após esse passo, as células foram plaqueadas em LB-ágar com canamicina (para seleção dos mutantes que sofreram recombinação homóloga e receberam o cassete de canamicina no lugar do gene alvo) e crescidas a 42°C, para perderem o plasmídio pKD46 (que possui uma origem de replicação termo-sensível). Para a confirmação da recombinação homóloga e perda do plasmídio pKD46, colônias resistentes à canamicina e sensíveis ao cloranfenicol foram selecionadas.

No passo seguinte, o plasmídio “helper” pCP20 foi eletroporado em todas as linhagens mutantes, pois este plasmídio contém uma recombinase (*flp*) que é responsável pela eliminação dos nucleotídeos que estão entre as regiões FRT, encontradas flanqueando o cassete de resistência à canamicina, presente no interior do gene agora recombinado.

Plasmídio pCP20. Doublet *et al.*, 2008.

Esta eliminação do cassete de canamicina favorece uma mutação apolar, garantindo que a expressão dos genes adjacentes à esta mutação não será prejudicada. Nas etapas de recombinação (entrada) e retirada do cassete de canamicina do interior do gene excluído, foram feitas PCRs e sequenciamentos dos genes, para a confirmação das corretas mutações apolares.

Para a construção dos fragmentos de DNA que foram utilizados na recombinação homóloga para geração das linhagens mutantes Δhcp , $\Delta icmF$ e $\Delta clpV$, foram realizadas as reações de PCR utilizando-se a enzima Platinum® *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen®), conforme descrito na tabela 5. Os ciclos dessas reações e os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 6 e 7, respectivamente.

Componente	Concentração Final
10x <i>Pfx</i> tampão de amplificação	1 x
Solução 10mM dNTP	0,3 mM cada
50mM MgSO ₄	1 mM
Iniciadores (10µM cada)	0,3µM cada
DNA utilizado	100ng
Platinum® <i>Pfx</i> DNA polimerase	1,5 unidades
Água deionizada autoclavada	q.s.p. 50µl

Tabela 5. Componentes utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA para recombinação homóloga.

Fase	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	94°C	2 minutos
Desnaturação	94°C	15 segundos
Pareamento	Genes <i>clpV</i> e <i>icmF</i> : 60°C F <i>hcp</i> : 58°C	30 segundos
Extensão	68°C	2 minutos

Tabela 6. Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos de DNA para recombinação homóloga.

Gene a ser deletado	Iniciadores utilizados para recombinação homóloga
<i>clpV</i>	<p>Direto:GTTGCGCCAGGCGCTGACGGTGGAGAACTACACAACCGCCCGTTCTG CAGGTGTAGGCTGGGAGCTGCTTC</p> <p>Reverso:CGCGAGACGGTGTGTTTCTCCTGGAATTCGGACATATTGATGGTGGT CAG CATATGAATATCCTCCTTA</p>
<i>hcp</i>	<p>Direto:ATGCTCCCATATAATTGACTCATAACTGAAAGAACTGACTCTTCGGG TTGTGTAGGCTGGGAGCTGCTTC</p> <p>Reverso:TGATAATCAAGGGCTCATTTCAAGTGGTTGTTTCATCACAACCATCCA TTGCATATGAATATCCTCCTTA</p>
<i>icmF</i>	<p>Direto:CGCTGATGCGGATATCCTGCATCGCCGTCTGTGGGAACATGCCCTCGG CTGTGTAGGCTGGGAGCTGCTTC</p> <p>Reverso:TCTGTTTGCTGAAGAAGATGTCACGGATTTTCTGCGCAGTTTCCAGT TGCCATATGAATATCCTCCTTA</p>

Tabela 7. Iniciadores utilizados para amplificação do fragmento de DNA para a recombinação homóloga. *Em **vermelho**, iniciadores utilizados para amplificação do gene da canamicina; em preto, 50 nucleotídeos de homologia com gene a ser recombinado.

Construção do plasmídeo pKD46 com a inserção do cassete de cloranfenicol

O plasmídeo pKD46, que carrega o gene da recombinase e que deve ser introduzido na bactéria na qual será realizada a recombinação homóloga, foi modificado para esse experimento. Uma vez que ampicilina (resistência original do plasmídeo pKD46) é uma das resistências encontradas em SEPT362, a seleção de bactérias receptoras do plasmídeo pKD46 seria impossibilitada, caso não houvesse inserção de um cassete de resistência a outro antibiótico. Para isso, o cassete de resistência ao antibiótico cloranfenicol foi amplificado,

utilizando-se o plasmídio pACYC184 como molde. Os componentes utilizados nessa reação de PCR estão descritos na tabela 2. Os ciclos e os iniciadores utilizados estão descritos nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Fase	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	94°C	2 minutos
Desnaturação	94°C	15 segundos
Pareamento	55°C	30 segundos
Extensão	72°C	1 minuto

Tabela 8. Ciclos da reação de PCR para amplificação do cassete de cloranfenicol.

Iniciadores utilizados na amplificação do cassete de cloranfenicol
Direto: ACGGAAGATCACTTCGCA
Reverso: GCGTTTAAGGTCAACAATAACTGC

Tabela 9. Iniciadores utilizados na amplificação do cassete de cloranfenicol.

O plasmídio pKD46 foi, então, digerido com a enzima de restrição XmnI, para a qual o plasmídio possui um único sítio de restrição, localizado logo após o promotor do gene *bla* (ampicilina). *bla* foi previamente retirado do plasmídio. O gene de resistência ao cloranfenicol foi purificado do gel, pelo kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen), segundo protocolo do fabricante, ligado ao plasmídio pKD46 e transformado na linhagem competente de *E.coli* estudada, conforme descrito abaixo. As linhagens SEPT362, receptoras do plasmídio, foram então crescidas em placas de LB adicionadas de 100µg/ml do antibiótico cloranfenicol.

Preparo de células competentes, transformação e eletroporação

A preparação de células competentes, transformação e eletroporação foram realizadas segundo Sambrook *et al.* (2001).

Reações de ligação

Todas as reações de ligação citadas no trabalho foram realizadas utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs®), incubadas a 16°C por 14 horas, segundo protocolo do fabricante.

Construção das linhagens complementadas dos mutantes

Para a construção das linhagens complementadas dos mutantes, foi utilizado o plasmídeo pACYC184, de baixo número de cópias, como vetor de expressão. Os genes a serem complementados foram amplificados com as seqüências dos nucleotídeos correspondentes ao início e ao fim dos genes, flanqueados por sítios de restrição das mesmas enzimas que foram utilizadas para cortar o vetor plasmidial (BamHI e SalI – reação abaixo descrita). Os componentes das reações de PCR estão descritos na tabela 5, os ciclos descritos na tabela 6 e iniciadores indicados na tabela 10. Após serem amplificadas e submetidas à eletroforese, as bandas dos genes foram recortadas e purificadas do gel de agarose, utilizando-se o kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen®), segundo protocolo do fabricante. Após esta purificação, os fragmentos foram, novamente, digeridos com as enzimas de restrição BamHI e SalI e, em seguida, purificados do gel de agarose. O plasmídeo pACYC184 foi digerido com as mesmas enzimas de restrição e, também, submetido à eletroforese e purificação do gel de agarose, utilizando-se o mesmo kit Qiagen®. A reação de ligação foi incubada a 16°C por 14

horas, utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs®). Esta reação de ligação foi submetida à eletroforese e os plasmídios corretamente ligados, recortados e purificados do gel de agarose, utilizando-se o kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen®). Para a confirmação de que os genes seriam inseridos em quadro de leitura correto, para que o promotor do cassete de tetraciclina pudesse garantir a expressão do gene complementado, foram feitos seqüenciamentos dos plasmídios complementados. Após ter sido realizada a eletroporação dos plasmídios complementados nas respectivas bactérias mutantes, foi feita a seleção das bactérias complementadas em placa de LB- agar (LB adicionado de 1% de ágar) suplementadas com 50µg/ml do antibiótico cloranfenicol. Para a verificação da expressão do gene complementado, foram realizadas reações de PCR em tempo real

Genes a serem complementados	Iniciadores
<i>clpV</i>	Direto: TACGGATCCACATGATCCAGATTGATCTTCC Reverso: TAAAGTCGACACTCATAAAACCGTTTCATCCT
<i>hcp</i>	Direto: TACGGATCCACATGGCGAATTTAATTTATTTAACAC Reverso: TAAAGTCGACACTTAAAAAAGACGATCTTCCCATAAAC
<i>Icm-F</i>	Direto: TACGGATCCACATGGTCATCGGCCCGGC Reverso: TAAAGTCGACACTCAGTACAGTGTGTCTGAC
<i>vgrG</i>	Direto: TACGGATCCACATGTCAACCGGATTACGTTTCA Reverso: TAAAGTCGACACATGTCAACCGGATTACGTTTCA

Tabela 10. Iniciadores utilizados nas reações de complementação das linhagens mutantes. *Em **vermelho**, sítios de restrição para as enzimas utilizadas. Em amarelo, nucleotídeos que indicam o início da transcrição.

Reações de cortes com as enzimas BamHI e SalI

Para a reação de complementação dos genes excluídos nas linhagens mutantes, foram realizados cortes duplos no plasmídeo pACYC184, utilizando-se simultaneamente as enzimas BamHI e SalI (New England Biolabs®), pois ambas possuem uma eficiência de 100% com o mesmo tampão (NEB3), nas seguintes condições: 1x tampão de digestão; 100µg/ml de BSA (Albumina de Soro Bovino); 10 unidades de enzima de restrição; 1 µg de DNA; Água miliQ autoclavada para 50µl de reação, em uma hora de incubação a 37°C.

Verificação da expressão de genes *clpV*, *hcp* e *icmF*, na presença e na ausência de células HeLa

Culturas bacterianas das linhagens selvagem e mutantes foram crescidas por 18 horas, aerobicamente em meio LB, a 37°C, sem agitação. Foram, a seguir, diluídas 1:100 em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - 1x Líquido, Baixa Concentração de Glicose (1000mg/L) – Invitrogen®) e crescidas a 150rpm até atingirem uma densidade óptica (D.O.₆₀₀) de 0,8. O RNA de triplicatas biológicas foram extraídos utilizando-se o RiboPure-Bacteria RNA isolation kit (Ambion®), de acordo com protocolo do fabricante. Para comparações entre a expressão de genes do SST6 na presença e ausência de células eucarióticas, garrafas de 75 cm³, previamente cultivadas *in vitro* com células HeLa em meio DMEM foram infectadas com 1x10⁷ células bacterianas. Garrafas sem células HeLa foram utilizadas como controle negativo. Após um período de 3 e 6 horas de infecção, as bactérias foram recuperadas (como descrito para o teste de adesão bacteriana) e o RNA extraído.

Verificação da expressão do gene *clpV* *in vivo*

Para avaliar a expressão do gene *clpV* durante uma infecção em aves SPF (“Specific Pathogen Free”) White Leghorn de 21 dias de idade, foi realizado teste de patogenicidade *in vivo* (conforme descrito adiante), injetando-se 10^7 bactérias no saco aéreo torácico direito de cada ave. Após 24 horas de infecção, pericárdio e saco aéreo foram recuperados de um grupo de oito animais infectados com a linhagem selvagem SEPT362. O RNA foi extraído destas estruturas, conforme acima descrito, com um passo prévio de maceração dos órgãos em nitrogênio líquido. Controles negativos de PCRs foram realizados com RNA extraído do pericárdio e saco aéreo de aves não infectadas, para garantir que não houve nenhuma reação cruzada dos iniciadores utilizados com RNA mensageiro de células eucarióticas que estavam presentes na reação.

Cultivo de células HeLa

Para o cultivo das células HeLa foi utilizado o meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO, Invitrogen®). A cada dois dias as células eram lavadas três vezes com PBS 1x (Tampão Fosfato Salina - NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, e pH de 7,4) a 37°C e o meio DMEM substituído por um novo. Assim que a garrafa 75 cm³ atingiu uma confluência de 90%, foram adicionados 2 ml de tripsina (GIBCO – Invitrogen®) e deixados por 5 minutos à temperatura ambiente, para que as células HeLa se desprendessem da superfície à qual estavam aderidas. As células foram, a seguir, homogeneizadas, divididas em 3 reservatórios iguais ao original (no caso de replicação celular), ou passadas para placas de cultura celular (para testes *in vitro*), sendo nesse caso, distribuído 1 ml para cada poço.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

Os iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real foram construídos utilizando-se o programa computacional Primer Express v1.5 (Applied Biosystems®). Os componentes, os ciclos e os iniciadores utilizados nas reações estão descritos nas tabelas 11, 12 e 13, respectivamente. Os experimentos foram realizados utilizando-se a reação de único passo no sistema de detecção ABI 7500 (Applied Biosystems®, EUA). A eficiência da amplificação de cada par de iniciador foi verificada utilizando-se curvas padrões de concentrações de RNA conhecidas. O gene *rpoA* (subunidade A da RNA polimerase) foi utilizado como controle endógeno.

A coleção de dados foi analisada utilizando-se o programa *ABI Sequence Detection 1.3* (Applied Biosystems®, EUA). Os dados foram normalizados aos níveis do gene *rpoA* e analisados usando um comparativo crítico *threshold* (C_T) como descrito no *Applied Biosystems Bulletin number 2*. Os níveis de expressão dos genes estudados em diferentes fases de crescimento foram comparados utilizando-se o método de quantificação relativa (WALTERS & SPERANDIO, 2006). Os dados das PCRs em tempo real estão apresentados como as diferenças (*n-fold*) dos níveis de expressão quando comparados com os níveis da amostra SEPT362 (selvagem) ou com a amostra EHEC 86-24, de acordo com o experimento realizado. Barras de erros representam os desvios padrões (SD) do valor $_C_T$ (WALTERS & SPERANDIO, 2006). Significâncias estatísticas foram determinadas por Teste T. Um valor $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Componentes	Quantidades
2xSYBR master mix (Applied Biosystems)	10µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems)	1µl
Rnase Inhibitor (Applied Biosystems)	1µl
Água livre de DNase e RNase (Ambion)	6µl
Mix de iniciadores direto e reverso	50nM
RNA	100ng
Total	20µl

Tabela 11. Componentes utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Ciclo	Temperatura	Tempo
1 ciclo	48°C	30 minutos
1 ciclo	95°C	10 minutos
40 ciclos	95°C	15 segundos
1 ciclo	60°C	1 minuto

Tabela 12. Ciclos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Genes	Iniciadores
<i>clpV</i>	Direto: CATGACAGAAGACGCCCGTA Reverso: CGCAGCGCCAGCCCTTCAAT
<i>hcp</i>	Direto: GCTGAAACAGCACATTGATC Reverso: CTTTGCCTAATAAGGGTGATGC
<i>icmF</i>	Direto: CAACGCCTGTACCTTACGCC Reverso: AGCCAGCCGAGGGCATGT
<i>rpoA</i>	Direto: GCGCTCATCTTCTTCCGA Reverso: CGCGGTCGTGGTTATGTG

Tabela 13. Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Extração de RNA total

Culturas das linhagens SEPT362, Δhcp , $\Delta clpV$ e $\Delta icmF$ foram crescidas aerobicamente em meio LB, a 37°C, por 18 horas e diluídas 1:100 em DMEM. As novas culturas foram crescidas sob agitação (150rpm), a 37°C, até atingirem a densidade óptica de 0,8 a 600nm. O RNA de cada linhagem foi extraído utilizando-se o kit RiboPure bacterial RNA isolation kit (Ambion®, USA), conforme protocolo do fabricante.

Síntese de cDNA e preparação dos fragmentos marcados para o microarranjo

Para se verificar a expressão gênica global das linhagens estudadas, foram realizados experimentos de microarranjo. Para este experimento, inicialmente é extraído o RNA das amostras estudadas e logo após, a partir deste RNA, é realizada a síntese do cDNA (em razão da maior estabilidade da molécula de DNA, quando comparada com a de RNA). O procedimento de síntese de cDNA, para a realização de experimentos de microarranjo, foi iniciado com 10µg de RNA total de cada linhagem, que foram extraídos conforme descrito anteriormente. A primeira reação foi montada para uma hibridização RNA - iniciador, conforme indicado na tabela 14 (segundo o protocolo Affymetrix).

Componente	Volume	Concentração final
RNA total	10µg	0,33µg/µl
75ng/µl iniciadores randômicos	10µl	25ng/µl
Controles Poly-A RNA	2µl	variável
Água livre de nucleases	q.s.p. 30µl	
Volume total	30µl	

Tabela 14. Reação para hibridização RNA - iniciador, para construção de fragmento de cDNA.

A reação de hibridização RNA - iniciador foi feita com as seguintes temperaturas:

- 70 °C por 10 minutos
- 25 °C por 10 minutos

Após esse passo de hibridização RNA - iniciador, foi realizada a reação de síntese de cDNA, conforme descrita na tabela 15.

Componentes	Volume	Concentração final
RNA/ Iniciador hibridizados	30µl	
5x First Strand Buffer	12µl	1 x
100mM DTT	6µl	10mM
10mM dNTPs	3µl	0,5mM
SUPERase.in (20U/µl)	1,5µl	0,5U/µl
SuperScript II (200U/µl)	7,5µl	25U/µl
Volume total	60µl	

Tabela 15. Componentes da reação de síntese do cDNA.

A reação foi incubada nas seguintes temperaturas:

- 25°C por 10 minutos
- 37°C por 60 minutos
- 42°C por 60 minutos
- Inativação do SuperScript II a 70°C por 10 minutos

Após a síntese de cDNA, houve a remoção de RNA, com a adição de 20µl de NaOH 1N, com incubação a 65°C por 30 minutos e adição de 20µl de HCl 1N para neutralizar a reação.

Após a eliminação de qualquer traço de RNA, foi feita a purificação do cDNA com a utilização do kit MiniElute PCR Purification Columns (Qiagen®). Os cDNAs foram quantificados através de um espectrofotômetro Nanodrop® e a concentração de cada amostra foi determinada como sendo maior que 1,5µg.

Para que pudessem ser devidamente hibridizados (hibridação por complementariedade de bases) com as sondas constituintes do aparelho de microarranjo, todo cDNA deveria ser previamente fragmentado. Os componentes da reação de fragmentação das moléculas de cDNA estão descritos na tabela 16.

Componentes	Volume	Concentrações
10xone-phor-all buffer	2µl	1x
cDNA	10µl	
DNase I	x	0,6U/µg de cDNA
Água livre de nucleases	Qsp 20µl	
Volume total	20µl	

Tabela 16. Componentes da reação para fragmentação das moléculas de cDNA.

A reação foi incubada a 37°C por 10 minutos e a DNase I inativada a 98°C por 10 minutos.

Para a análise da digestão do cDNA, que deveria conter fragmentos entre 50 e 200 pares de base, as amostras foram aplicadas em um gel gradiente (4% a 20%) de agarose. A corrida foi feita a 150V por aproximadamente 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado com SYBR gold (Invitrogen®) e os tamanhos dos fragmentos digeridos analisados.

O cDNA fragmentado foi aplicado diretamente à reação final de marcação do cDNA, conforme descrito na tabela 17. Esta marcação ocorre para garantir a devida detecção da hibridização no aparelho de microarranjo.

Componentes	Volume
5x reaction buffer	10µl
GeneChip DNA labeling reagent, 75mM	2µl
Terminal Deoxynucleotidyl transferase	2µl
cDNA fragmentado	20µl
Água livre de nucleases	16µl
Volume total	50µl

Tabela 17. Reação de marcação do cDNA, para detecção da hibridização no microarranjo.

A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos e após esse tempo, foram adicionados 2µl de EDTA 0,5M para parar a reação.

Para a verificação da eficiência da marcação, foi realizado o seguinte procedimento:

Para cada reação a ser testada, foram separadas duas alíquotas de 200ng cada, do cDNA fragmentado e marcado com biotina. A uma das alíquotas foram adicionados 5µl de NeutrAvidin (invitrogen®) (2mg/ml) e a reação incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. As duas reações foram aplicadas a um gel gradiente de agarose (4% a 20%), que depois da eletroforese, foi corado com SYBR gold (invitrogen®) e analisado. Foi observado que a neutravidina se ligou à biotina, o que determinou que a reação estava pronta para a hibridização no microarranjo.

Microarranjo e análise dos dados

O Affymetrix GeneChip *E. coli* Genome 2.0 array foi utilizado para comparar a expressão gênica da linhagem SEPT362 (selvagem) com as linhagens mutantes Δhcp , $\Delta clpV$ e $\Delta icmF$. O GeneChip *E. coli* Genome 2.0 array inclui aproximadamente 10000 sondas para todos os 20366 genes presentes em quatro linhagens de *E. coli*: K-12 (MG1655), CFT073 (linhagem uropatogênica), EDL933 (linhagem enterohemorrágica), e O157:H7-Sakai (linhagem enterohemorrágica) (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/ecoli2.affx>). Todo o processamento, marcação e hibridização do RNA previamente purificado foram realizados como descrito pelo manual *Affymetrix Gene Expression Technical Manual* (http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx), conforme descrito acima. Os resultados foram estudados pelo programa de análise Genechip da *Affymetrix*, sendo os dados obtidos comparados para a análise da expressão gênica, diminuída ou aumentada dos diversos genes.

Número de acesso para os dados dos microarranjos

Todos os dados dos microarranjos podem ser acessados através do banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO), pelo número de acesso GSE21893.

Adesão bacteriana a células epiteliais

Para testes qualitativos e quantitativos, linhagens de *E.coli* foram avaliadas quanto às suas habilidades de adesão a células HeLa, segundo protocolo previamente descrito (TORRES *et al.*, 2002), com algumas modificações. Resumidamente, as linhagens bacterianas foram crescidas em meio LB por 18 horas, a 37°C e 1×10^7 bactérias foram adicionadas, em quadruplicata, aos poços das placas de cultura celular de 12 poços, previamente cultivadas *in vitro* com células HeLa, em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Após a adição das bactérias, o experimento foi realizado por 3 horas, a 37°C, em uma estufa com 5% de CO₂. Uma das réplicas da cultura celular foi lavada três vezes com tampão PBS 1x, fixada com metanol 100% e corada com corante Giemsa (0,75%), para avaliação microscópica. As outras três réplicas foram lavadas e lisadas com Triton X-100 (0,1%) diluído em tampão PBS 1x e plaqueadas em meio LB-ágar para a quantificação do número de células bacterianas aderidas. Os dados da aderência foram expressos como a média das unidades formadoras de colônias (UFC) da triplicata. Diferenças estatísticas foram expressas em valor de P, conforme determinado por Teste T.

Teste de motilidade

Para o teste de motilidade foram preparadas placas de meio LB semi-sólido em uma concentração de 0,3% de ágar, sendo as linhagens semeadas, por picada, com uma agulha esterilizada. Estas placas foram mantidas a 37°C para serem analisadas nos períodos de 8h, 12h e 16 horas após o cultivo inicial. Para a avaliação da capacidade de motilidade, os diâmetros dos halos de crescimento formados foram medidos em milímetros e cada linhagem foi comparada com a selvagem. Para analisar o motivo do fenótipo não móvel da linhagem $\Delta icmF$, foram verificadas as expressões de alguns genes flagelares, por PCR em tempo real, conforme previamente descrito (SPERANDIO *et al.*, 2002).

RNA slot blots

As culturas bacterianas foram crescidas por 18 horas, aerobicamente, a 37°C e diluídas 1:100 em DMEM. A seguir, estas culturas foram cultivadas sob agitação (150 rpm) até atingirem uma densidade óptica (D.O.₆₀₀) 0,8. O RNA da linhagem selvagem e dos mutantes foi extraído utilizando-se o RiboPure-Bacteria RNA isolation Kit (Ambion®, USA), conforme protocolo do fabricante. Para preparação dos RNA slot blots foram utilizados 1µg do RNA total, em triplicata. O RNA foi desnaturado por 60 minutos em 1M de glyoxal, 0,1M MOPS (morpholine propanesulfonic acid) pH 6,8 a 65°C, e aplicado sobre uma membrana de Nylon, utilizando o aparato Biorad® dot blot. Os poços foram lavados com 500µl de SSC 20x (Standard Saline Citrate: 3 M NaCl, 300 mM tri-sodium citrate, pH 7,0). As membranas foram hibridizadas com diferentes sondas de DNA utilizando UltraHyb™, da Ambion, a 42°C. Inicialmente, foram lavadas com SSC 2x/ 0,1% SDS e, a seguir, com 0,2x SSC/0,1% SDS a 42°C e expostas a filme de raio X. As sondas de DNA *fimA* e *rpoA* (controle negativo) foram geradas por PCR com *Taq* DNA polimerase amplificando-se esses genes, com os iniciadores descritos na tabela 18. Essas sondas foram marcadas por extensão de iniciadores aleatórios, utilizando o Ready-to-go DNA labelling beads, da Amershan® e $\alpha^{32}P$ -CTP, conforme as instruções dos fabricantes.

Genes	Iniciadores
<i>fimA</i>	Direto: GGAAAGCAGCATGAAAATTAAACTC REVERSO: TAGGTTATTGATACTGAACCTTGAA
<i>rpoA</i>	Direto: GCGCTCATCTTCTTCCGA Reverso: CGCGGTCGTGGTTATGTG

Tabela 18. Iniciadores utilizados nas reações de RNA slot blots, para a verificação da expressão dos genes desejados.

Teste de invasão celular

Células HeLa previamente cultivadas em meio DMEM adicionado de 10% de Soro Fetal Bovino, foram infectadas com as linhagens SEPT 362 e mutantes com uma MOI (multiplicity of infection) de 100:1, conforme descrito anteriormente (FIERER *et al.*, 1993; FINLAY *et al.*, 1991; PFEIFER *et al.*, 1999). Após 90 minutos de interação bactéria - célula HeLa, em uma estufa a 37°C e 5%CO₂, as células foram tratadas com 50 µg/ml de gentamicina por 90 minutos para matar qualquer bactéria extracelular. A seguir, as células foram lavadas com PBS 1x a 37°C e incubadas por 3 horas com meio DMEM fresco. As células foram, a seguir, lisadas com uma solução de Triton X-100 a 1%, (diluído em PBS 1x), por 5 minutos. Foram feitas diluições seriadas das bactérias, que foram plaqueadas em LB-ágar para determinação de unidade formadora de colônia (UFC).

Teste de viabilidade em macrófagos

Para testar a viabilidade das bactérias selvagem e mutantes dentro de macrófagos, foi utilizada a linhagem de macrófagos J774. Essa linhagem foi cultivada por 18 horas numa placa de cultura celular de 24 poços, numa estufa a 5% CO₂, a 37°C, em meio DMEM suplementado com glutamina (1%). As linhagens bacterianas foram crescidas em caldo LB durante 18 horas, a 37°C e opsonizadas com soro de camundongo 20%, a 37°C, por 15 minutos e adicionadas numa concentração de 1×10^7 , em quadruplicata, a macrófagos em meio DMEM fresco. Após 30 minutos de interação bactéria/célula eucariótica, bactérias não aderentes foram removidas com três lavagens com PBS 1x e expostas a 50µg/ml de gentamicina, por 90 minutos, para matar qualquer bactéria extracelular. Após esse período, a placa foi novamente lavada por três vezes e incubada por mais 3 horas, com meio DMEM fresco. As células foram lisadas com Triton X-100 1% (diluído em PBS 1x) e diluições seriadas das bactérias foram plaqueadas em LB-ágar para quantificação de UFC (VANRHEENEN *et al.*, 2004; ZUSMAN *et al.*, 2004; SEXTON *et al.*, 2004).

Extração de proteínas de membrana

As linhagens bacterianas foram crescidas por 18 horas, a 37°C e diluídas 1:100 em 100ml de meio LB e novamente cultivadas sob agitação (150rpm), a 37°C até atingirem a densidade óptica ($D_{0.600}$) 0,8. A seguir, as células foram centrifugadas a 8000rpm por 15 minutos e lavadas por ressuspensão em tampão TE (Tris 20mM pH 7,5, EDTA 1mM) por duas vezes, sendo a seguir, ressuspendidas em 1ml de TE adicionado de 1mg/ml de lisozima. As amostras foram mantidas em gelo por 15 minutos e sonicadas, também em gelo, por 3 vezes, de 15 segundos cada. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo, o qual foi centrifugado por 1 hora a 60000rpm. Ao sedimento, onde se encontrariam somente as proteínas de membrana, foi adicionado tampão TE, novamente centrifugado por 1 hora a 60000rpm e, a seguir, ressuspendido com 50 μ l de ULB (Urea lyses buffer – 7M uréia, 2M tiouréia, 2% CHAPS - 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate).

Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida 12% para eletroforese de proteínas foi preparado em duas partes, conforme abaixo descrito:

- Empacotamento

Solução de acrilamida 30% - bisacrilamida 2,7%	0,67ml
Tris HCl pH 6,8	0,5ml
SDS10%	0,04ml
Água destilada q.s.p.....	100ml
Persulfato de amônio 10%	0,04ml
TEMED (Tetrametiletilenodiamina).....	0,004ml

- Separação

Solução de acrilamida 30% - bisacrilamida 2,7%	8,0ml
Tris HCl pH 8,8	5,0ml
SDS10%	0,2ml
Água destilada q.s.p.....	6,6ml
Persulfato de amônio 10%	0,2ml
TEMED (Tetrametiletilenodiamina).....	0,008ml

Descoloração e digestão dos peptídeos

Para análise e identificação das proteínas em MALDI-TOF, as bandas de interesse foram cortadas do gel de poliacrilamida (cortes de aproximadamente 1cm x 1mm). Cada fragmento foi cortado em pequenos pedaços de aproximadamente 1mm e, para serem descorados, foram adicionados 50µl de solução 1 (2:1 acetonitrila, 25mM NH₄HCO₃), por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionados 50µl de solução 2 (25mM NH₄HCO₃), por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e os dois primeiros passos repetidos. Após o procedimento de descoloração dos fragmentos, esses foram secos em centrífuga “speed vac” por 30 minutos. Para a digestão com tripsina, os fragmentos foram rehidratados em 12 µl de solução 3 (12,5ng/µl de tripsina – Promega® - em 50mM de NH₄HCO₃). As amostras foram mantidas a 37°C, por 16 horas e então levadas para análise em MALDI-TOF.

Análise em MALDI-TOF

Um volume de 1µl de cada amostra foi adicionado a 1µl de matriz MALDI-TOF (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid – CHCA) em uma placa de ouro para amostra de MALDI p100 e completamente secas (ambiente), para permitir a cristalização da matriz e dos peptídeos. O aparelho utilizado foi um Voyager-DE™ PRO Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems®), com uma voltagem de aceleração de 20kV e intensidade do laser de 1900-2000. Os picos coletados foram analisados no programa Protein Prospector (UCFS), utilizando-se o banco de dados Swiss prot 2008.06.10.

Teste para visualização do citoesqueleto de actina (Fluorescent Actin Staining - FAS)

Para a visualização do rearranjo do citoesqueleto de actina das células hospedeiras, devido à infecção bacteriana, foi utilizado o teste FAS, conforme descrito por Knutton *et al.* (1989), com algumas modificações. Culturas celulares bacterianas selvagem e mutantes foram

crecidas aerobicamente, por 18 horas, em LB a 37°C. Essas bactérias foram utilizadas para infectar monocamadas confluentes de células HeLa, cultivadas em lamínulas de vidro, a 37°C e CO₂ a 5%. As células HeLa foram infectadas com 10⁷ bactérias, por 3 horas, a 37°C e 5% de CO₂. As lamínulas foram fixadas com solução de formaldeído 2% (diluída em PBS 1x pré aquecido a 37°C), lavadas com PBS 1x, permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 (diluído em PBS 1 X pré aquecido a 37°C) por 4 minutos e tratadas com FITC-faloidina (1µg/ml) por 20 minutos a 37°C, para visualização do acúmulo de actina. 500nM de iodeto de propídio foram adicionados para corar as bactérias e então as lamínulas foram lavadas com 2x SSC (200mM NaCl, 30mM citrato de sódio, pH 7,0). As amostras foram visualizadas por imunofluorescência, utilizando-se um microscópio Zeiss Axiovert. Foram examinadas três lamínulas para cada linhagem e as imagens salvas para o estudo do rearranjo do citoesqueleto de actina.

Teste para verificação de formação de Biofilme

Para verificar a capacidade de formação de biofilme nas linhagens selvagem e mutantes, foram realizados testes em triplicata, de acordo com Christensen *et al.* (1985), com algumas modificações. Culturas bacterianas foram crescidas por 18 horas em LB, a 37°C e, a seguir, inoculadas em meio DMEM, diluídas 1:100, em placa de cultura celular de 24 poços, em um volume final de 1000µl. As placas foram incubadas a 37°C em uma estufa de CO₂ a 5%, por 24 horas. No final do período de incubação, o meio de cultura foi aspirado e o provável crescimento bacteriano aderido ao fundo da placa foi lavado por três vezes com PBS. A formação de biofilme foi fixada com 1000µl de etanol 75% em cada poço, por 10 minutos e lavado por três vezes com PBS 1x para remoção do etanol. A coloração foi realizada utilizando-se uma solução 0,5% de cristal violeta, por 5 minutos. Depois de quatro lavagens com PBS, as placas foram secas à temperatura ambiente e o cristal violeta solubilizado com adição de 1000µl de etanol 95% em cada poço. Após dois minutos, 150 µl desta solução foram transferidos para uma placa microtiter e a absorbância determinada espectrofotometricamente

a 570nm com um enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA Multiskan®EX – Thermo Isher Scientific, EUA). Todos os passos foram realizados à temperatura ambiente.

Experimento de patogenicidade *in vivo*

Para a verificação da alteração da patogenicidade das linhagens mutantes, foram realizados testes de patogenicidade *in vivo*, em aves de corte linhagem Cobb de 1 dia de idade. O teste foi realizado segundo de Pace *et. al*, 2010. As linhagens selvagem e mutantes foram crescidas durante a noite em meio LB, a 37°C e, a seguir, lavadas duas vezes e ressuspensas em 0,85% (5,0ml) de solução salina esterilizada. Um total de 10⁹ UFC/ml de cada linhagem foi injetada dentro do saco aéreo direito de grupos de dezesseis aves de 1 dia de idade. Os grupos foram observados durante um período de sete dias e a sobrevivência analisada a cada 12 horas.

Análises estatísticas

Os dados foram expressos como médias das repetições e desvios padrões. Grupos bacterianos em todos os testes foram comparados utilizando-se o Teste-T para amostras independentes. Diferenças foram consideradas significativas com o $P < 0,05$. Análises estatísticas foram realizadas com o BioEstat versão 5.0.

Resultados

A linhagem SEPT 362 expressa o Sistema de Secreção Tipo VI

A linhagem APEC septicêmica, denominada SEPT362, possui os mecanismos de virulência ainda pouco conhecidos.

Neste trabalho, a detecção dos genes estudados foi realizada por experimentos de PCRs e seqüenciamentos de DNA. Foram também comparados os transcriptomas da linhagem SEPT362 com a já estudada *Escherichia coli* Enterohemorrágica EHEC 86-24, para a identificação da expressão dos genes *hcp*, *clpV* e *icmF*, assim como para verificação da expressão de outros possíveis genes relacionados à virulência. A linhagem EHEC 86-24 pertence ao departamento de Microbiologia e Bioquímica, da Universidade do Texas, Southwestern Medical Center, onde os experimentos foram realizados. Conforme previamente descrito para outras linhagens de APEC, SEPT362 expressa fímbrias tipo I, curli, entre outras, assim como várias toxinas e sistemas de aquisição de ferro. Por experimentos de PCR em tempo real (Figura 1A), confirmamos os resultados do microarranjo, que demonstraram que a linhagem SEPT362 expressa genes do SST6 em níveis significativamente maiores do que a linhagem EHEC 86-24. A transcrição dos genes *hcp*, *clpV* e *icmF* foram, respectivamente, 5,0 vezes, 3,5 vezes e 2,0 vezes maiores na linhagem SEPT362 do que na linhagem EHEC 86-24.

Pelo fato de que o SST6 vem sendo descrito como mais expresso na presença do hospedeiro (FILLOUX *et al.*, 2008), foram realizados experimentos que demonstraram que, na linhagem SEPT362, esse sistema é expresso tanto *in vitro*, na presença de células HeLa, quanto durante uma infecção *in vivo* (Figura 1C). A figura 1B demonstra que a expressão dos genes *hcp*, *clpV* e *icmF* é aumentada em 3 horas e ainda mais em 6 horas após a infecção de células HeLa. Juntos, esses dados demonstram que a linhagem SEPT362 expressa o Sistema de Secreção Tipo VI e que esse sistema é mais expresso na presença de células eucarióticas e ainda mais durante um processo de infecção *in vivo*.

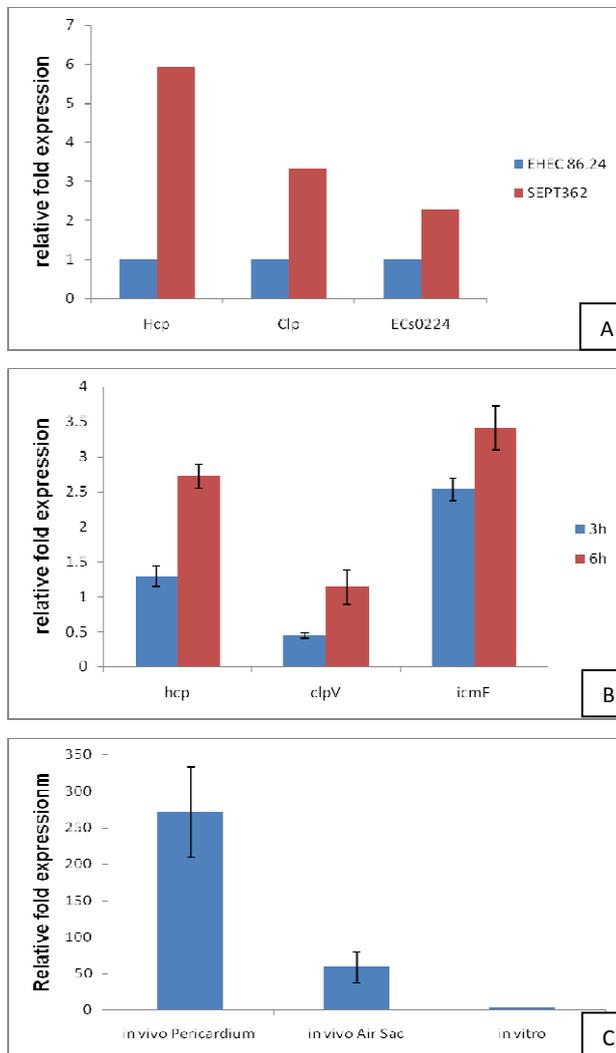


Figura 1

A - Comparação da transcrição dos genes *hcp*, *clpV* e *icmF* *in vitro*, nas linhagens SEPT362 e EHEC 86-24.

B - Transcrição dos genes *hcp*, *clpV* e *icmF* *in vitro*, na presença de células HeLa, 3h e 6h após a infecção.

C - Transcrição do gene *clpV* em diferentes órgãos, comparado com a expressão *in vitro*. O resultado sugere que o SST6 é extremamente mais expresso *in vivo*, em aves de 21 dias de idade.

Construção dos mutantes isogênicos e complementos

Para avaliar a relação de genes do Sistema de Secreção Tipo VI com características de virulência, foram construídos três mutantes, excluindo-se os genes *hcp* (responsável pela montagem de um canal formado por anéis hexaméricos, através do qual a secreção é transportada), *clpV* (ATPase, responsável por energizar o processo de montagem do aparato, assim como o transporte de proteínas) e *icmF* (proteína transmembrana que possivelmente interage com a parte citosólica do aparato de secreção). Para a exclusão desses genes, foi utilizada a técnica de “lambda red”, previamente descrita. Após a construção dos mutantes, houve a construção do vetor pACYC184 com os genes que haviam sido deletados do cromossomo da linhagem selvagem, para complementação das linhagens mutantes. A figura 2 mostra os géis de agarose para a verificação das deleções de cada mutante. A figura 3 mostra os gráficos referentes aos PCRs em tempo real que foram realizados para a confirmação da expressão dos genes complementados.

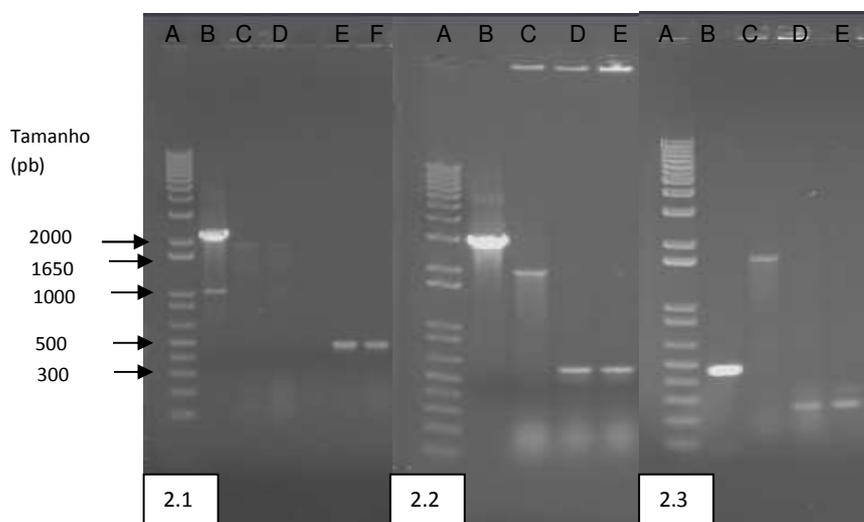


Figura 2. Géis de agarose (1%) mostrando a recombinação homóloga e exclusão dos genes estudados

2.1 – Construção do Mutante *clpV*: A – marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); B – Gene *clpV* selvagem; C e D – recombinação homóloga com cassete de canamicina; E e F – Mutação resolvida (retirada do cassete de canamicina - favorecimento de mutação apolar, deleção do gene *clpV*)

2.2– Construção do Mutante *icmF*: A – marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); B – Gene *icmF* selvagem; C – recombinação homóloga com cassete de canamicina; D e E – Mutação resolvida (retirada do cassete de canamicina – favorecimento de mutação apolar, deleção do gene *icmF*)

2.3 – Construção do Mutante *hcp*: A – marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); B – Gene *hcp* selvagem; C – recombinação homóloga com cassete de canamicina; D e E – Mutação resolvida (retirada do cassete de canamicina – favorecimento de mutação apolar, deleção do gene *hcp*)

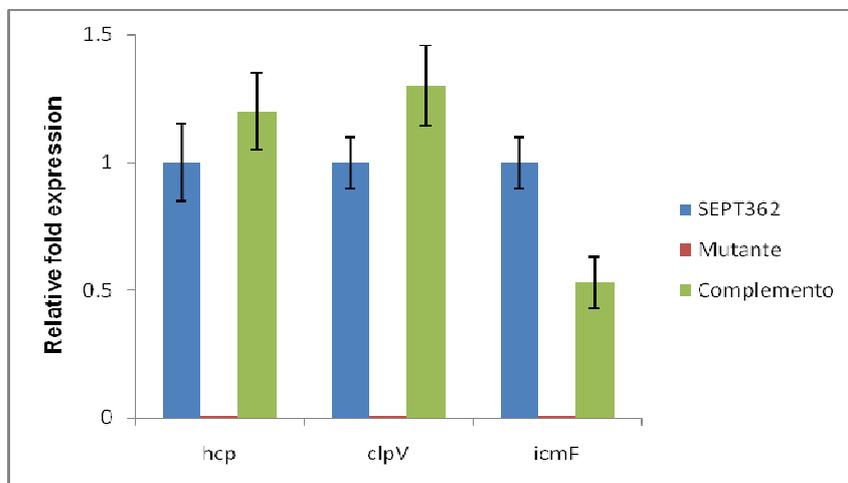


Figura 3 - Comparação da transcrição dos genes *hcp*, *clpV* e *icmF*, nas linhagens selvagem, mutantes e complementos.

O SST6 contribui para a aderência de SEPT362 a células HeLa

Para avaliar a contribuição dos genes *hcp*, *clpV* e *icmF* no processo de adesão bacteriana às células eucarióticas, foi realizado o teste de adesão, conforme descrito anteriormente. Conforme mostrado nas Figuras 4 e 5, todos os mutantes mostraram uma significativa redução na aderência a células HeLa ($P < 0,01$), quando comparados à adesão da linhagem selvagem. A complementação dos mutantes restaurou a aderência aos níveis da amostra selvagem. Esses dados sugerem que o SST6 está envolvido na habilidade de SEPT362 em aderir a células epiteliais.

Sabe-se, atualmente, que várias adesinas contribuem para a patogênese de APEC e que as mais estudadas, até o presente momento, são as fímbrias tipo 1, P, curli e “temperature-sensitive hemagglutinin” (Tsh) (RODRIGUEZ-SIEK *et al.*, 2005; EWERS *et al.*, 2007). As análises dos microarranjos mostraram que a linhagem SEPT362 expressa fímbrias tipo 1 e curli e que, nos mutantes, a expressão da fímbria tipo 1 é muito diminuída (Figura 6A), enquanto que para a fímbria curli não há alteração. Experimentos de RNA slot

blot (figura 6B), confirmaram estes resultados, mostrando que nos mutantes a expressão da fímbria tipo 1 está drasticamente diminuída, o que sugere que as expressões do SST6 e da fímbria tipo 1 são coordenadas.

Considerando-se que genes fimbriais podem ser adjacentes aos “clusters” do SST6 haveria a possibilidade de que a falta de expressão dos genes da fímbria tipo 1 poderia ser devido a efeitos polares na mutação. Porém, nesse caso, esta possibilidade está descartada, pois foram realizadas deleções apolares nos mutantes, construídos utilizando-se a técnica de “lambda red”, e as chamadas “cicatrices” (retirada do gene da canamicina) deixadas nos genes excluídos foram seqüenciadas, para assegurar que nenhum efeito polar (prejuízo da função de genes adjacentes em razão da deleção do gene alvo) poderia ocorrer. Além disso, para mais uma garantia de que não houve nenhum efeito polar, as adesões puderam ser complementadas com os genes *clpV*, *hcp* e *icmF* em trans.

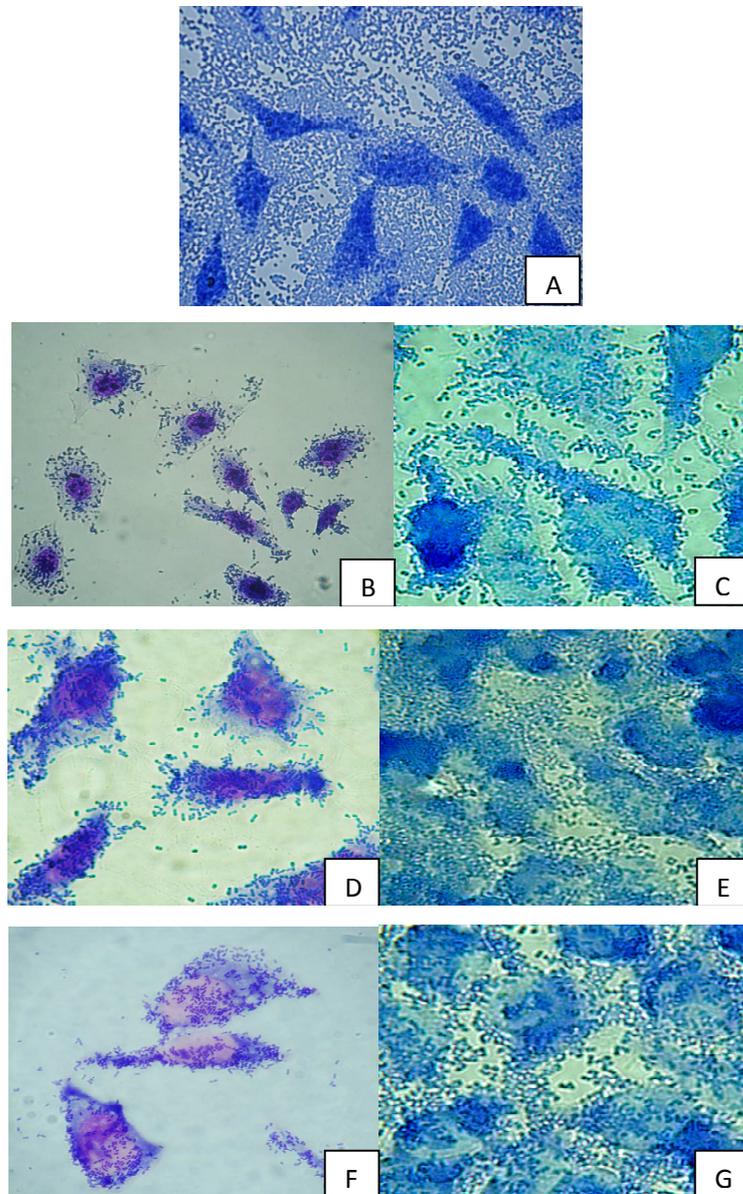


Figura 4. Adesão das linhagens estudadas a células HeLa.

- A- Adesão da linhagem selvagem SEPT366 a células HeLa;
- B- Adesão da linhagem mutante Δhcp a células HeLa;
- C- Adesão da linhagem mutante complementada $\Delta hcp C$ a células HeLa;
- D- Adesão da linhagem mutante $\Delta clpV$ a células HeLa;
- E- Adesão da linhagem mutante complementada $\Delta clpV C$ a células HeLa;
- F- Adesão da linhagem mutante $\Delta icmF$ a células HeLa;
- G- Adesão da linhagem mutante complementada $\Delta icmF C$ a células HeLa.

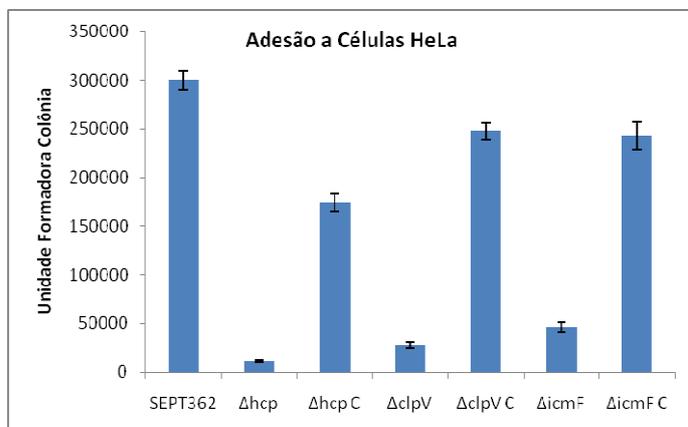


Figura 5. Adesão das linhagens estudadas a células HeLa, em meio DMEM. Os números são apresentados em Unidades Formadoras de Colônias.

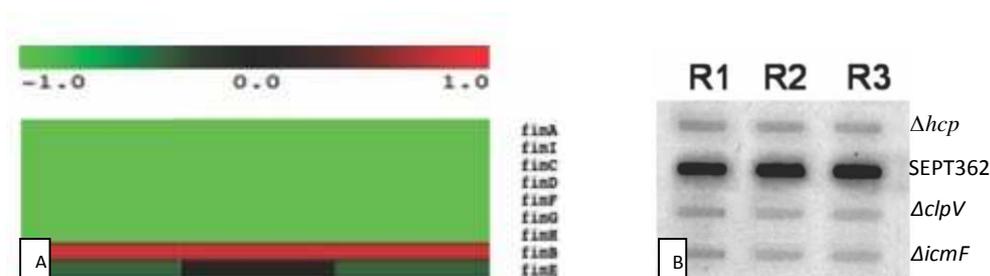


Figura 6. Heat map e RNA slot blots, mostrando a expressão de genes estudados.

A-Heat Map mostrando as expressões (obtidas no microarranjo) dos genes da fímbria tipo 1 nos mutantes $\Delta icmF$, $\Delta clpV$ e Δhcp .

B- RNA slot blot mostrando a expressão do gene *fimA* (subunidade principal da fímbria tipo 1), com três repetições (R1, R2 e R3).

O Sistema de Secreção Tipo VI contribui para a invasão de SEPT362 a células epiteliais

Em razão da linhagem APEC SEPT362 ser capaz de invadir células epiteliais e de já ter sido demonstrado que o SST6 afeta a polimerização da actina de células hospedeiras (PUKATZKI *et al.*, 2007; LEIMAN *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2009), foi avaliada uma possível

contribuição do SST6 na invasão a células HeLa. Os resultados demonstraram que esse sistema de secreção possui um papel na invasão celular de SEPT362. No mutante Δhcp observa-se uma diminuição significativa, de uma ordem de magnitude, na invasão a células HeLa, comparada com a linhagem selvagem, característica esta que pôde ser complementada com esse gene em trans. Curiosamente, conforme demonstrado na figura 7, a linhagem $\Delta clpV$ invade mais que a linhagem Δhcp , porém, ainda, em uma proporção menor que a linhagem selvagem. Estes resultados demonstraram que este sistema de secreção, presente em SEPT362, exerce um papel na invasão a células HeLa. Já a linhagem $\Delta icmF$ apresenta uma drástica redução na invasão a células HeLa, perfil diferente do observado para os outros mutantes, o que sugere que o gene *icmF* pode estar relacionado à invasão celular, independentemente do SST6.

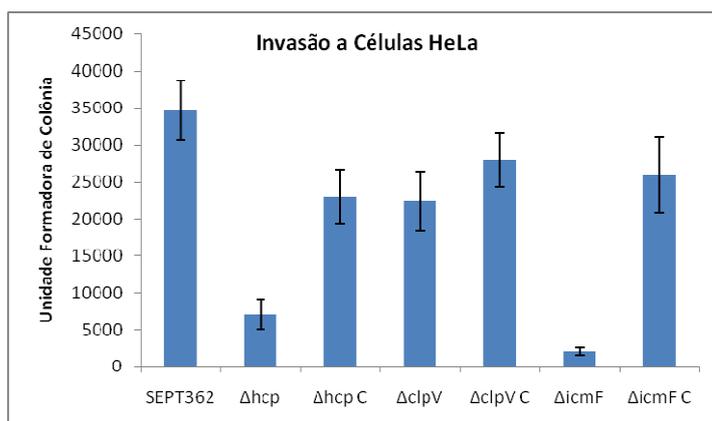


Figura 7. Invasão das linhagens estudadas às células HeLa, em meio DMEM. Os números são apresentados em Unidades Formadoras de Colônias.

Teste para a análise do rearranjo do citoesqueleto de actina (Fluorescein Actin Test – FAS)

À medida que o rearranjo de actina na célula hospedeira é fundamental para a invasão bacteriana e que o SST6 contribui para a invasão a células epiteliais (Figura 7), foram realizados testes para a verificação do rearranjo do citoesqueleto de actina em células HeLa

durante a infecção da linhagem selvagem e dos mutantes. A linhagem SEPT362 induz a formação de estruturas parecidas com pregas no citoesqueleto de células HeLa, assim como o mutante $\Delta icmF$. Estas estruturas possuem certa similaridade, mas não são as conhecidas lesões “attaching and effacing”, provocadas pelo Sistema de Secreção Tipo III. Já nos mutantes $\Delta clpV$ e Δhcp , foi verificado que o nível de rearranjo do citoesqueleto é significativamente menor do que o causado pela SEPT 362 (Figura 8). Sabe-se que proteína VgrG (proteína que provavelmente forma a estrutura pontiaguda da superfície do Sistema de Secreção Tipo VI) possui um domínio C-terminal que pode ligar-se à actina da célula hospedeira (BINGLE *et al.*, 2008; FILLOUX *et al.*, 2008; PUKATZKI *et al.*, 2009). Sugere-se, que as linhagens mutantes $\Delta clpV$ e Δhcp não sejam capazes de formar esta estrutura no final do canal de secreção, fazendo com que a actina não sofra as alterações que ocorrem na presença do canal íntegro (linhagem selvagem SEPT362). Curiosamente, o mutante $\Delta icmF$ não apresenta o mesmo padrão de modificação de actina sofrido pelos mutantes $\Delta clpV$ e Δhcp , por isso, sugere-se que, ao contrário dos genes *clpV* e *hcp*, este não possua relação direta com o efector VgrG, o qual proporciona alterações no citoesqueleto.

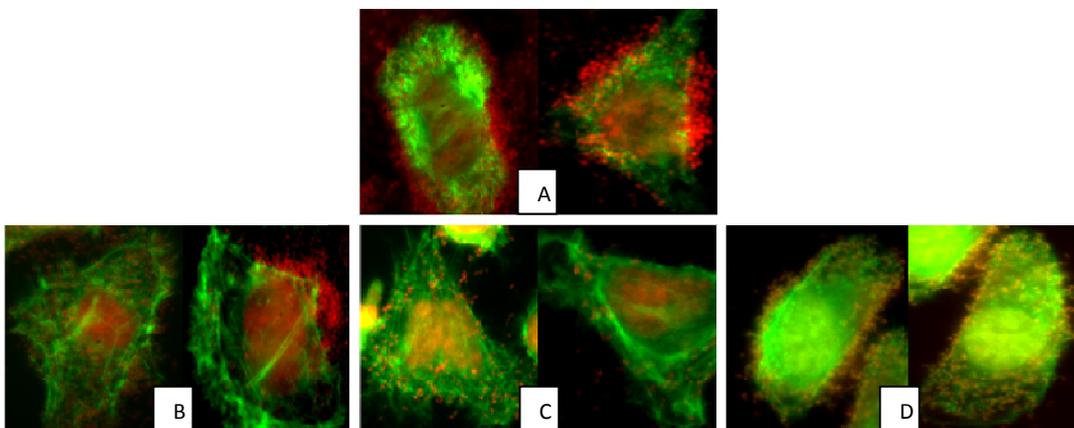


Figura 8. Alteração do arranjo do citoesqueleto de actina em células HeLa devido à infecção pelas linhagens selvagem e mutantes.

A - linhagem SEPT362

B - linhagem Δhcp

C - linhagem $\Delta clpV$

D - linhagem $\Delta icmF$

Viabilidade dentro de macrófagos

Muitas bactérias que causam doenças septicêmicas são capazes de sobreviver à fagocitose e se multiplicarem dentro de macrófagos (GRASSL & FINLAY, 2008).

Os resultados do teste de viabilidade dentro de macrófagos revelaram que a linhagem SEPT362 sobrevive e é viável dentro de macrófagos e que nas linhagens mutantes Δhcp e $\Delta clpV$ essa característica não foi modificada, portanto, sugere-se os genes *hcp* e *clpV* não participam dos processos de viabilidade intracelular. Porém, observou-se que o mutante $\Delta icmF$ apresentou uma significativa redução na viabilidade dentro de macrófagos (Figura 9). Trabalhos anteriores também demonstraram essa relação (VANRHEENEN *et al.*, 2004; ZUSMAN *et al.*, 2004; SEXTON *et al.*, 2004), o que concorda com os resultados aqui apresentados.

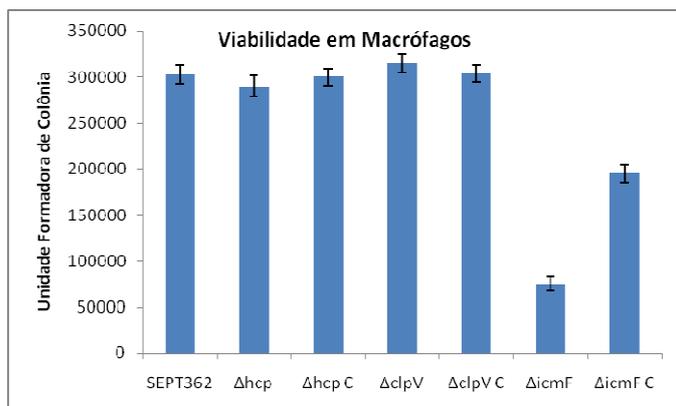


Figura 9. Viabilidade das linhagens estudadas dentro de macrófagos J744.

O Sistema de Secreção Tipo VI influencia na formação de biofilme

Como mostrado na figura 10, as mutações dos genes do Sistema de Secreção Tipo VI fizeram com que houvesse uma diminuição na formação de biofilme pelas linhagens estudadas, quando comparadas com a selvagem SEPT362. Os presentes dados corroboram trabalhos anteriores que também mostraram uma relação entre o Sistema de Secreção Tipo VI e capacidade de formação de biofilme (AUBERT *et al.*, 2008; SCHWARS *et al.*, 2010; BERNARD *et al.*, 2010). As linhagens complementadas puderam, parcialmente, recuperar o padrão de produção de biofilme da amostra selvagem, com exceção da linhagem $\Delta clpV C$, que recuperou essa capacidade totalmente. O fato das linhagens complementadas não alcançarem exatamente o mesmo padrão da linhagem selvagem pode ocorrer devido a diferenças nas dosagens gênicas, devido ao fato dos genes terem sido clonados dentro de plasmídio, e não mais fazerem parte do genoma da bactéria.

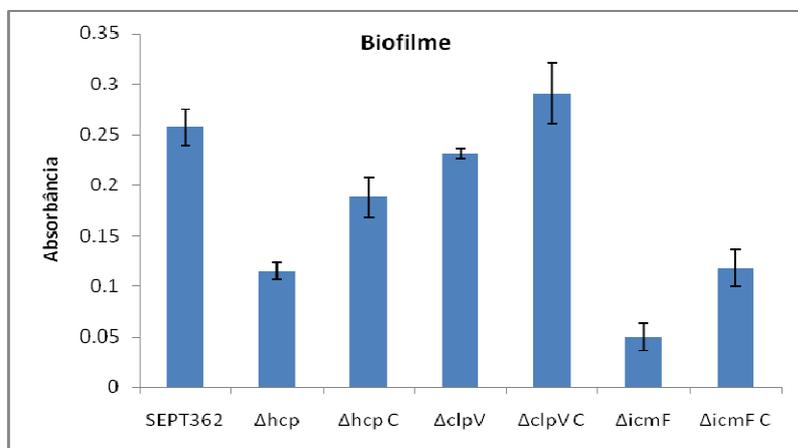


Figura10. Formação de biofilme em superfície abiótica pelas linhagens estudadas.

O gene *icmF* pode regular a motilidade

O teste de motilidade mostrou que a linhagem $\Delta icmF$ perdeu completamente sua capacidade de se mover (Figuras 11 B e C), enquanto que nos outros mutantes, essa característica não foi significativamente alterada (Figura 11 A). Para verificar o porquê do mutante $\Delta icmF$ ter perdido esta característica, foram analisadas as expressões de alguns genes que compõem a cascata de montagem flagelar, por PCR em tempo real (Figura 11 D). Os resultados demonstraram que os genes flagelares *flhC*, *flhD*, *flgM*, *fliA* e *motA* tiveram suas expressões diminuídas pelo menos 10 vezes no mutante $\Delta icmF$, quando comparadas com a expressão da linhagem selvagem SEPT362. Dados do microarranjo (Figura 11 E) também demonstram a diminuição da expressão destes genes na linhagem mutante. Analisando-se as expressões de alguns reguladores globais e da cascata flagelar, constatou-se que a expressão de *ompR* (outer membrane protein R) não sofreu mudanças estatisticamente significativas, enquanto que a expressão de CRP (cyclic AMP receptor protein) foi de quase 0,5 vez menor na linhagem $\Delta icmF$, quando comparada à selvagem SEPT362. Estes dados indicam que a deleção do gene *icmF* pode ter influenciado na expressão da CRP, que também é um regulador da cascata flagelar ou ainda, que a própria IcmF pode ser um dos reguladores. A complementação restaurou o padrão de motilidade da linhagem selvagem.

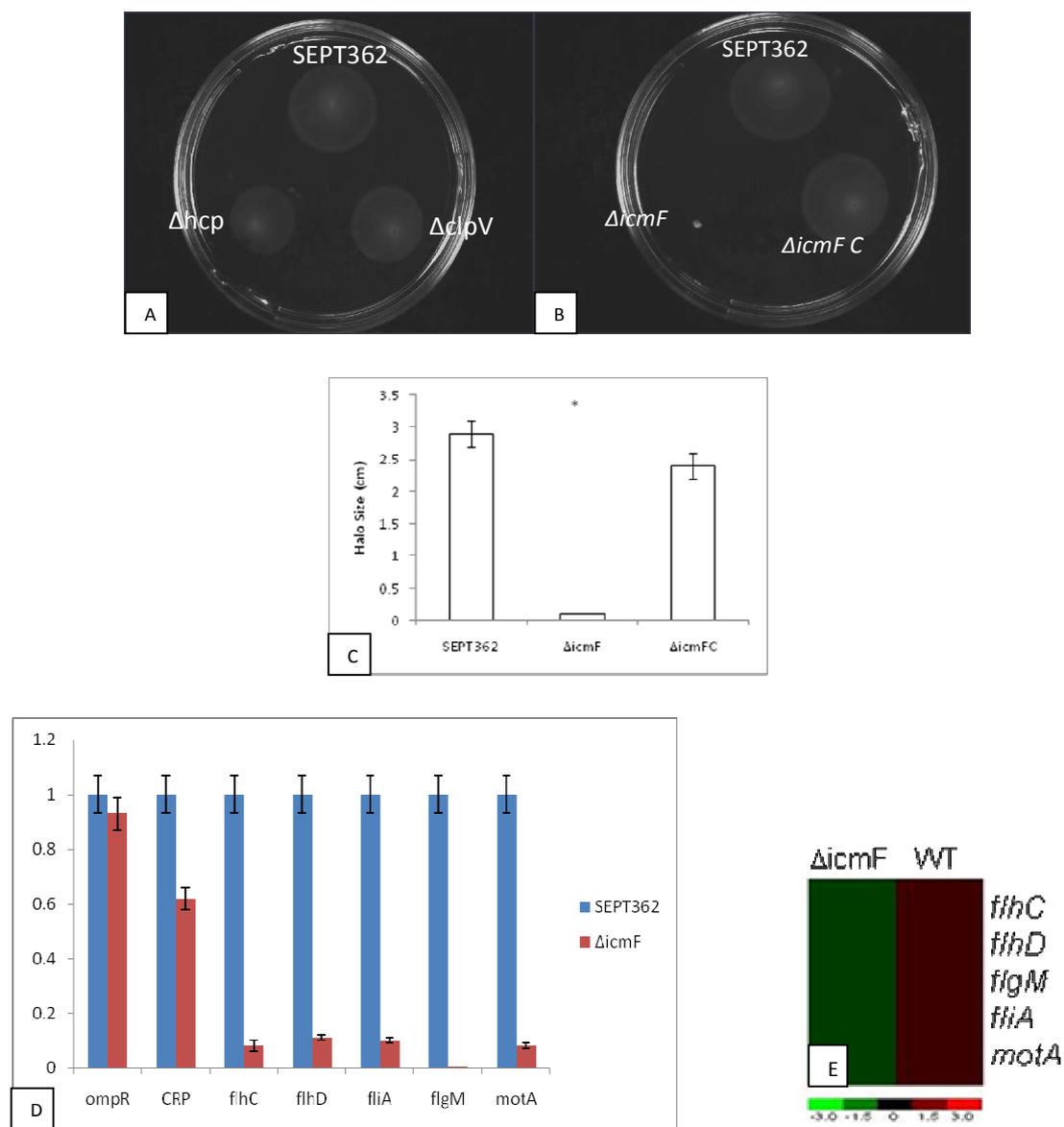


Figura 11. Verificação da motilidade das linhagens estudadas

A e B – padrões de motilidade das linhagens estudadas

C - Medições dos alos de motilidade das linhagens selvagem (SEPT362), mutante $\Delta icmF$ e complemento $\Delta icmFC$.

D – Expressão dos genes relacionados à montagem flagelar nas linhagens SEPT362 e $\Delta icmF$.

E – Heat Map mostrando o resultado da expressão dos genes responsáveis pela montagem do flagelo, de acordo com experimentos de microarranjo.

Foram analisados também os perfis das expressões das proteínas de membrana da linhagem selvagem SEPT362 e das amostras mutantes. Na figura 12, constatamos que a amostra *ΔicmF* deixou de expressar uma proteína de 51KDa, que por meio da técnica de MALDI-TOF, foi identificada como sendo a flagelina, o que reforça os resultados relacionados à motilidade. Ainda no perfil protéico das proteínas de membrana, observa-se que uma proteína de 55KDa está ausente na amostra *ΔclpV*. Através de MALDI-TOF esta proteína foi identificada como Glicose-6-fosfato-1-desidrogenase, que atua nos metabolismos dos carboidratos. Esta enzima catalisa o primeiro passo no metabolismo da pentose, que gera ribose para síntese de nucleosídeos e NADPH para o metabolismo redutivo e para reações reparadoras (CSONKA & FRAENKEL, 1997). Sugere-se então, que *clpV* contribua para a energização celular deste processo. Não foi encontrado nada na literatura que relacione a deficiência de glicose-6-fosfato-1-desidrogenase com patogenicidade bacteriana. Para não mudar o foco do trabalho, optamos por não investigar os efeitos metabólicos desta proteína na linhagem mutante *ΔclpV*. Trabalhos futuros poderão ser realizados para a abordagem deste tema.

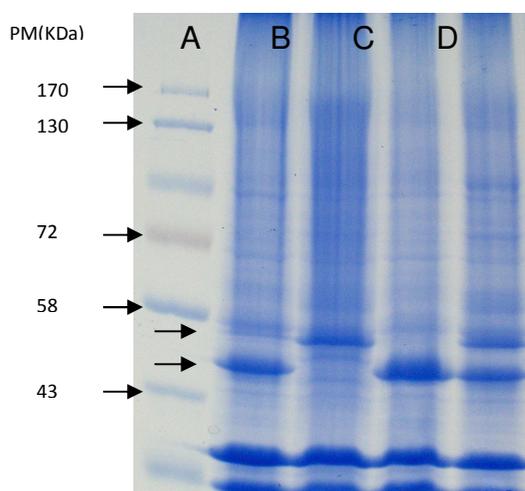


Figura 12. Perfil das proteínas de membrana

A - Marcador de peso molecular (Fisher® BioReagents EZ-Run Prestained Protein Ladder); B - SEPT362 ; C - *ΔicmF*; D - *ΔclpV*; E - *Δhcp*;

O Sistema de Secreção Tipo VI é importante para a virulência *in vivo*

Em razão de várias características relacionadas à patogenicidade terem sido atenuadas nos mutantes estudados, foi investigado se esse sistema de secreção também contribuiria para a patogenicidade *in vivo* (Fig. 13). Para isso, um grupo de 16 pintos SPF machos, para cada linhagem, foi infectado com as amostras selvagem, mutantes e os complementos. Os resultados demonstraram que dentro de 24 horas 43,75% dos pintos infectados com SEPT362 sobreviveram, e 2 dias pós-infecção, somente 12,5% desses animais permaneceram vivos, até o sétimo dia de experimento, quando foram sacrificados. Dos pintos infectados com a linhagem mutante Δhcp , foi observado que 87,5% sobreviveram até o segundo dia, 62,5% sobreviveram até o dia 3, 56,25% até o dia 4, 43,75% até o dia 5, e 25% se mantiveram vivos até o último dia do experimento, quando foram sacrificados. Para animais infectados com o mutante $\Delta clpV$, foi observado que 93,75% sobreviveram no primeiro dia, 68,75% sobreviveram até o terceiro dia, 62,5% sobreviveram até dia 4, 50% até o dia 6 e 43,75% sobreviveram até o último dia do experimento.

A análise estatística desses dados indicam que os mutantes Δhcp e $\Delta clpV$ apresentaram uma significativa atenuação na patogenicidade *in vivo* e que o mutante $\Delta clpV$ apresenta uma atenuação ainda maior do que o mutante Δhcp , supostamente por participar da energização de outros mecanismos metabólicos, além do SST6. Quanto ao mutante $\Delta icmF$, observou-se que 75% dos pintos sobreviveram ao primeiro dia de experimento. Nos segundo e terceiro dias de experimento, 37,5% dos pintos sobreviveram, e no quarto dia sobreviveram 31,5%. Do quinto dia até o último dia de experimento, 18,75% permaneceram vivos. Apesar de ter havido uma pequena redução na patogenicidade do mutante $\Delta icmF$, esta não foi estatisticamente significativa. Nenhuma mortalidade foi observada para o grupo controle (não infectados).

A complementação dos mutantes *in trans* recuperou parcialmente o fenótipo da linhagem selvagem, sendo mais patogênicos do que os mutantes, mas não tão virulentos como a SEPT362. Isso pode acontecer devido ao fato de que esses genes complementados foram clonados dentro de plasmídios e a diferente cinética de infecção dos complementos pode ser

devido à diferença das dosagens gênicas, assim como a manutenção dos plasmídios durante a infecção.

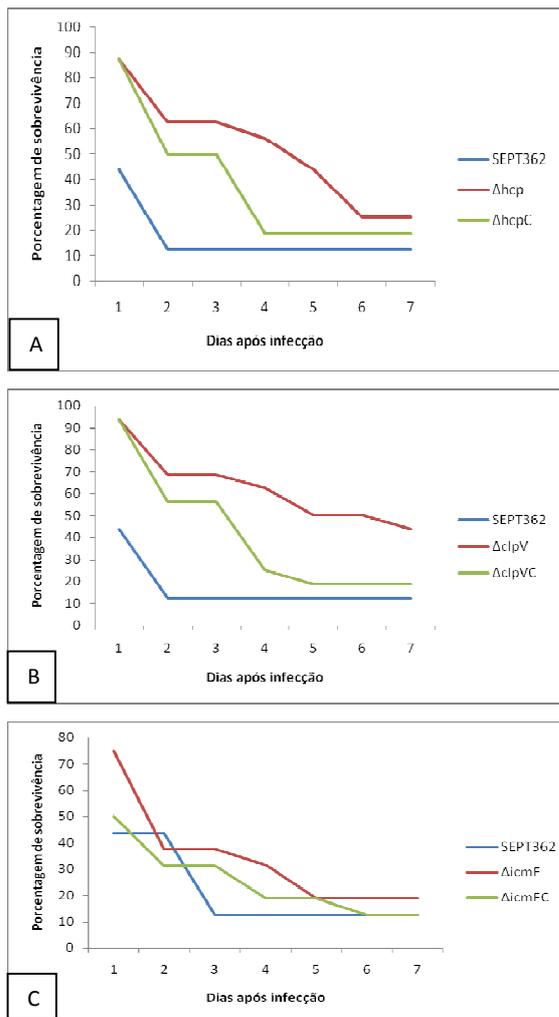


Figura 13. Teste de sobrevivência em pintos SPF de um dia de idade infectados com 10^9 bactérias das linhagens estudadas.

A - Teste comparando a patogenicidade da linhagem Δhcp com a linhagem SEPT362

B - Teste comparando a patogenicidade da linhagem $\Delta clpV$ com a linhagem SEPT362

C - Teste comparando a patogenicidade da linhagem $\Delta icmF$ com a linhagem SEPT362

Discussão

Infecções causadas por *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) resultam em perdas econômicas significativas na indústria avícola mundial. Além disso, as APECs pertencem a um grupo de *E.coli* extraintestinais e vêm sendo consideradas como potenciais patógenos para seres humanos, por apresentarem uma grande similaridade genômica com outras ExPECs patogênicas, como UPEC (*Escherichia coli* Uropatogênica) e NMEC (*Escherichia coli* causadora de meningite em recém-nascidos) (MOULIN-SCHOULEUR *et al.*, 2007; JOHNSON & NOLAN, 2009).

As *Escherichia coli*, assim como outras bactérias, formam uma enorme diversidade de associações, mutualísticas ou patogênicas, com uma vasta gama de hospedeiros. A secreção de proteínas tem um importante papel na modulação dessas interações. Dentre as várias ferramentas utilizadas pela bactéria para influenciar a resposta do hospedeiro, aparatos que secretam proteínas e toxinas são cruciais para virulência e sobrevivência bacteriana dentro do hospedeiro (ECONOMOU *et al.*, 2006; JANI & COTTER, *et al.*, 2010; BINGLE *et al.*, 2008).

Em bactérias gram-negativas, onde a secreção protéica e de outros subprodutos envolve a translocação por entre as membranas interna e externa, atualmente são conhecidos seis classes de sistemas de secreção de proteínas.

O Sistema de Secreção Tipo VI (T6SS) foi recentemente descrito e está presente em uma grande diversidade de bactérias patogênicas, comensais e simbiontes, que interagem com células eucarióticas e entre si (BOYER *et al.*, 2009; SHRIVASTAVA & MANDE *et al.*, 2008; CASCALES, 2008; JANI & COTTER, 2010). Por essa razão, escolhemos investigar a existência e estudar o papel de genes do SST6 na patogênese de uma linhagem de *Escherichia coli* septicêmica para aves. Para a verificação da presença do SST6 na amostra de APEC estudada neste trabalho (SEPT 362), foram feitas PCRs de identificação para os genes *hcp*, *clpV* e *icmF*, constituintes do Sistema de Secreção em estudo. Depois de identificados, foram realizados experimentos de PCR em tempo real e microarranjos para verificação e confirmação da expressão dos mesmos (Figura 1A).

Estes genes foram, então, deletados do genoma da amostra selvagem SEPT362, gerando três mutantes, Δhcp , $\Delta clpV$ e $\Delta icmF$.

Foi demonstrado, pela primeira vez, que os genes *hcp*, *clpV* e *icmF*, do SST6 podem influenciar na expressão da fímbria tipo 1, estão envolvidos nos processos de adesão e invasão, formação de biofilme, rearranjo do citoesqueleto de células hospedeiras e são importantes para patogenicidade *in vivo*, sugerindo que há um forte papel na patogênese de APEC.

Concordando com o fato de que a expressão do SST6 aumenta na presença de células hospedeiras (BERNARD *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2000; SHALOM *et al.*, 2007), foi verificado que os níveis da expressão dos genes estudados do SST6 aumentam significativamente na presença de células HeLa (Figura 1B) e ainda mais durante uma infecção *in vivo* (Figura 1C), o que sugere que este sistema participa do processo infeccioso.

Uma importante característica que também foi observada, é que as linhagens mutantes tiveram sua adesão a células HeLa muito diminuída em relação à linhagem selvagem (Figuras 4 e 5). Após analisados os microarranjos e “slot blots” realizados através da expressão dos RNAs destes mutantes (Figuras 6A e B), constatou-se que, para todos os mutantes, todos os genes constituintes do operon da fímbria tipo 1 tiveram suas expressões drasticamente diminuídas. Esta fímbria, produzida por muitas linhagens de *E.coli*, é um apêndice que promove a aderência bacteriana a células eucarióticas, sendo o operon responsável pela montagem desta fímbria, composto por 9 genes (BAHRANI-MOUGEOT *et al.*, 2002; BOUDEAU *et al.*, 2001; GUNTHER *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 2007). Os resultados sugerem que a diminuição da capacidade de adesão dos mutantes a células HeLa foi, possivelmente, devido à baixa expressão da fímbria tipo 1. Esta fímbria é importante na virulência, estando envolvida nos processos de adesão e invasão de células eucarióticas, colonização da traquéia e trato intestinal (EDELMAN *et al.*, 2003; BAHRANI-MOGEOUT *et al.*, 2002; LA-RAGIONE *et al.*, 2000). Estes resultados sugerem que a não expressão da fímbria tipo 1 poderia contribuir também na alteração da virulência das linhagens mutantes. Experimentos de microarranjo demonstram que estes mutantes ainda expressam normalmente outras fímbrias, como a curli, o que explica o baixo nível da capacidade de adesão ainda existente nas

linhagens bacterianas mutantes. Estes dados revelam que, apesar do SST6 influenciar na expressão da fímbria tipo 1, não altera a expressão de outras fímbrias, o que sugere que a associação do SST6 com a fímbria tipo 1 é específica.

Também é fundamental ressaltar que a fímbria tipo 1 exerce um importante papel na formação do biofilme, e que, conforme mostrado no presente e em prévios trabalhos, o SST6 também está envolvido com esta característica (BERNARD *et al.*, 2010; ASCHTGEN *et al.*, 2008; ENOS-BERLAGE *et al.*, 2005; WAITE *et al.*, 2006). Sugere-se então, que o decaimento na formação de biofilme nestes mutantes (Figura 10) tenha também relação com a baixa expressão da fímbria tipo 1.

Além de fímbrias, sabe-se que linhagens de *Escherichia coli* normalmente sintetizam flagelo, o que facilita a propulsão e quimiotaxia bacterianas (APEL & SURETTE *et al.*, 2008) estando sua presença, provavelmente, envolvido com a promoção de uma adesão estável e colonização de mucosas (OTTEMAN & MILLER, 1997).

Para analisar a razão pela qual o mutante *icmF* teve sua motilidade abolida, foram analisadas as expressões de vários genes que participam da montagem flagelar, como estruturais ou reguladores, para verificar se a expressão poderia ter sido interrompida em algum passo específico.

Para uma breve explicação sobre a montagem flagelar, no topo da hierarquia da expressão gênica para montagem do flagelo está o operon formado pelos genes *flhD* e *flhC*. A expressão deste operon é requerida para a expressão de todos os outros operons constituintes da cascata flagelar. O operon de classe II está sob direto controle do operon *flhD-flhC*, e contém, entre outros, o gene regulatório *fliA*, que é requerido para a expressão do operon de classe III e de alguns genes que estão nos estágios inicial e intermediário da cascata de montagem flagelar (LIU & MATSUMURA *et al.*, 1994). Além do *fliA*, há outros reguladores, como o *flgM*, que reprime a expressão de alguns genes flagelares (GILLEN & HUGHES, 1991). Na classe III ainda encontra-se o gene *motA* (proteína motora A), que ajuda na movimentação flagelar.

Nos experimentos realizados para analisar em qual passo a cascata de montagem flagelar poderia ter sido interrompida por conta da deleção do gene *icmF*, foram analisadas, por PCR em tempo real e experimentos de microarranjo, as expressões dos genes *flhD*, *flhC*, *flgM*, *fliA* e *motA* (Figuras 11 D e E). Os resultados demonstraram que a expressão destes genes foi drasticamente diminuída em $\Delta icmF$, comparado com a expressão da linhagem selvagem. Estes dados confirmam que o gene *icmF* possui relação com a motilidade, pois a deleção do mesmo prejudica a expressão de genes flagelares.

Adicionalmente, foram analisadas a expressão dos reguladores globais CRP (cyclic AMP receptor protein) e OmpR (outer membrane protein R), que também regulam a expressão de genes responsáveis pela montagem flagelar. Os resultados mostram que a expressão de *ompR* não foi alterada, porém a expressão de CRP está levemente menor. Estas análises sugerem que o gene *icmF* poderia, de alguma forma, interagir com CRP, e a deleção deste gene alteraria a expressão do regulador, o que interferiria na expressão de genes responsáveis pela montagem do flagelo.

De acordo com estes resultados, observa-se que algumas proteínas regulatórias (como CRP, entre outras), são comuns para estruturas importantes que são expressas durante a colonização e no progresso da infecção, constituindo vários sistemas que agiriam integradamente para promover um processo infeccioso de sucesso. Assim como demonstrado no trabalho de Syed *et al* (2009), que o sistema regulatório flagelar de *Vibrio cholerae* modula a expressão de genes não flagelares, como adesinas e fatores de virulência (SYED *et al.*, 2009), sugerimos que a deleção de um único gene poderia desestabilizar estes supostos sistemas integrados, alterando certas características que contribuiriam para a patogenicidade bacteriana.

Considerando-se que *icmF* já tenha sido previamente relacionado com motilidade (DAS *et al*, 2002) outra hipótese é que a própria IcmF poderia ser mais um regulador da cascata flagelar e a exclusão desta proteína levaria a alteração da expressão dos genes para a montagem do flagelo. Trabalhos adicionais para a confirmação desta hipótese ainda necessitam ser estabelecidos.

Adicionalmente, notou-se que o mutante *icmF* foi o que apresentou uma maior redução na formação de biofilme, decaindo quase 80% em relação à linhagem selvagem (Figura 10). Ao mesmo tempo, este mutante apresentou a motilidade abolida (Figura 11B), conforme já demonstrado. De acordo com Pratt & Kolter (1998), a motilidade é também importante tanto para a interação inicial quanto para o movimento ao longo da superfície na formação de biofilme. Foi também demonstrada, em uma linhagem de *Vibrio cholerae*, esta relação entre motilidade e formação de biofilme, na qual genes regulatórios da cascata flagelar podem regular positivamente a formação de biofilme (SYED *et al.*, 2009). Assim, sugere-se que o mutante *icmF* apresenta a menor taxa de formação de biofilme por não apresentar tanto a expressão da fímbria tipo 1 quanto a expressão de genes flagelares.

Em relação à invasão a células epiteliais, demonstrou-se que, embora em diferentes graus, esta foi diminuída em todos os mutantes (Figura 7), fato que, mais uma vez, possivelmente se relacione à diminuição da expressão da fímbria tipo 1, previamente caracterizada por contribuir para este processo em *E.coli* (BOUDEAU *et al.*, 2001; MULVEY *et al.*, 1998; MOBLEY *et al.*, 1987).

Quanto ao rearranjo do citoesqueleto de actina, este foi muito mais notável nos mutantes $\Delta clpV$ e Δhcp , enquanto nenhuma mudança significativa ocorreu no mutante $\Delta icmF$, comparado com o padrão de arranjo de actina da célula HeLa quando infectada com a linhagem selvagem SEPT 362 (Figura 8). Este rearranjo de actina pelos mutantes $\Delta clpV$ e Δhcp pode ter ocorrido possivelmente pelo fato dos mesmos interagirem diretamente com VgrG, que, conforme previamente demonstrado, além de ser uma proteína estrutural do SST6, possui propriedades efetoras, capazes de rearranjar o citoesqueleto de actina da célula hospedeira (BINGLE *et al.*, 2008; FILLOUX *et al.*, 2008; PUKATZKI *et al.*, 2009). Já o gene *icmF*, que segundo o modelo de Filloux, 2008, estaria localizado ao lado do aparato, não apresentaria esta interação direta com a proteína VgrG, o que faria com que a exclusão deste gene não alterasse a função efetora de VgrG, de rearranjo de actina do hospedeiro.

Foi demonstrado, também, que a linhagem selvagem SEPT362 é capaz de se replicar dentro de macrófagos. Porém, dentre os mutantes, somente a linhagem $\Delta icmF$ exibiu uma diminuição nesta característica (Figura 9), o que corrobora trabalhos anteriores, que mostram

que *icmF* é importante para a replicação bacteriana dentro de macrófagos e outras células eucarióticas, como demonstrado em *Legionella Pneumophila* e *Salmonela enterica* (KIRBY *et al.*, 1998; PURCELL & SHUMAN *et al.*, 1998; VANRHENNEN *et al.*, 2004). Este resultado sugere que o SST6 pode não ter relação com multiplicação dentro de macrófagos, sendo que somente o gene *icmF* atuaria nesta característica, independentemente do sistema de secreção.

Trabalhos anteriores relacionam o SST6 com virulência e diversas outras associações com as células hospedeiras em várias espécies bacterianas. Em *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas aeruginosa*, o SST6 é requerido para associações com *Dictyostelium discoideum* (PUKATZKI *et al.*, 2006; PUKATZKI *et al.*, 2002), e o SST6 de *P. aeruginosa* parece contribuir para a patogênese desta bactéria em pacientes que apresentam quadro de fibrose cística (MOUGOUS *et al.*, 2006). Em modelos experimentais *in vivo*, utilizando-se ratos infectados por *Aeromonas hydrophila*, a proteína Hcp é secretada dentro do hospedeiro, via SST6, contribuindo para a virulência (SUAREZ *et al.*, 2008). Este processo também foi observado em hamsters infectados por *Burkholderia mallei* (SCHELL *et al.*, 2007). Adicionalmente, em *Edwardsiella tarda*, o T6SS é essencial para virulência em peixes (ZHENG & LEUNG, 2007).

Neste trabalho, embora a linhagem mutante $\Delta icmF$ tenha apresentado uma pequena queda na virulência *in vivo*, esta não foi estatisticamente significativa (Figura 13 C). Uma grande diferença observada neste mutante em relação às linhagens $\Delta clpV$ e Δhcp é que a motilidade foi totalmente abolida. Para elucidar a relação entre motilidade e virulência, verificamos que estudos anteriores relatam que Toll like receptors (TLRs) são receptores celulares constituintes do sistema imune e que são capazes de identificar uma infecção através do reconhecimento de proteínas presentes nos microrganismos e assim, dar início às respostas do sistema imune. O Toll like receptor 5 (TLR5) especificamente detecta a flagelina, proteína flagelar, que é conhecida também por ser um importante fator de virulência (FEUILLET *et al.*, 2006). Uma explicação para o fato de que a virulência é discretamente diminuída, porém não em uma proporção estatisticamente significativa na linhagem $\Delta icmF$, é o fato deste mutante não apresentar a flagelina. A falta desta proteína resultaria no não reconhecimento desta linhagem pelo TLR5, afetando assim, o desenvolvimento de uma resposta inflamatória neste

momento, o que poderia conter esta infecção em uma fase inicial. A falta do flagelo nesta linhagem poderia ser vantajosa para a bactéria, evitando a percepção do sistema imune (via TLR5) na progressão da infecção sistêmica. No entanto, a linhagem não possui o gene *icmF*, que, conforme demonstrado neste trabalho, contribui para importantes características relacionadas à virulência, como adesão e invasão, viabilidade dentro de macrófagos e formação de biofilme. Essas características resultam em um balanço intermediário entre as virulências apresentadas pelos demais mutantes e pela linhagem selvagem, uma vez que a não expressão do flagelo levaria a um aumento da virulência e, por outro lado, a falta do gene *icmF* contribuiria para a diminuição da mesma, por proporcionar uma atenuação das características relacionadas à patogenicidade.

Em relação aos demais mutantes, demonstramos que os genes *clpV* e *hcp* do SST6 contribuem significativamente para a virulência desta linhagem de APEC em aves (figuras 13B e 13C), adicionando então esta especializada via secretória ao grande repertório de características de virulência de APEC.

Conclusões

Os genes aqui estudados, apresentam claramente uma relação com a regulação de certas características relacionadas à patogênese de APEC, como a fímbria tipo 1 e o flagelo. A diminuição nas capacidades de adesão, invasão e formação de biofilme pelas linhagens mutantes ocorreu provavelmente devido a não expressão da fímbria tipo 1. Sugere-se que há uma “comunicação” através de possíveis reguladores transcricionais e pós transcricionais comuns, entre SST6 e outros mecanismos de patogenicidade, a fim de se promover uma infecção sincronizada e de sucesso.

Com este trabalho, pôde-se concluir que o recente descrito Sistema de Secreção Tipo VI tem um importante papel na patogênese e virulência bacteriana da linhagem APEC estudada.

Futuros Trabalhos

Estudos futuros vão ampliar o conhecimento do papel do SST6 na patogênese de APEC e investigar os mecanismos moleculares associados com a montagem e funções metabólicas deste sistema. Analisar a frequência do SST6 em APEC e associá-lo com a patogenicidade seria um importante passo para elucidar a principal função deste sistema em APEC.

Estudos envolvendo proteômica também poderiam esclarecer ainda mais as supostas e as já definidas funções dos genes que compõem o SST6.

A grande associação do SST6 com a patogênese bacteriana faz com que este sistema seja um alvo atrativo para terapêutica e desenvolvimento de futuras drogas antibacterianas.

Referências Bibliográficas

ABEF – associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. Disponível em: <<http://WWW.abef.com.br>>. Acesso em 20 jan. 2011.

Apel, D.; Surette, M. G. Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochimica et biophysica acta*. v. 1778, p.1851-1858, 2008.

Aschtgen, M. S.; Bernard, C. S.; De Bentzmann, S.; Lloubes, R.; Cascales, E. SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* v.190, p.7523–7531, 2008.

Aubert, D.F.; Flannagan, R.S.; Valvano, M.A. A Novel Sensor Kinase-Response Regulator Hybrid Controls Biofilm Formation and Type VI Secretion System Activity in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun.* v. 76, p.1979-1991, 2008.

Bahrani-Mougeot, F. K.; Buckles, E. L.; Lockatell, C. V.; Hebel, J. R.; Johnson, D. E.; Tang, C. M.; Donnenberg, M. S. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* v.45, p.1079 -1093, 2002.

Bernard, C.S.; Brunet, Y.R.; Gueguen, E.; Cascales, E. Nooks and Crannies in type VI secretion regulation. *J. Bacteriol.* v.192, p. 3850-3860, 2010.

Bingle, L.E.; Bailey, C.M.; Pallen, M.J. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol.* v.11, p.3-8, 2008.

Bladergroen, M.R., Badelt, K. and Spaink, H.P. Infection blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Mol. Plant–Microbe Interact.* v.16, p. 53–64, 2003.

Bönemann, G.; Pietrosiuk, A.; Diemand, A.; Zentgraf, H.; Mogk, A. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for Type VI protein secretion. *Embo J.* v.28, p.315–325, 2009.

Boudeau, J.; Barnich, N.; Darfeuille-Michaud, A. Type 1 pilimmediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* v.39, p.1272–1284, 2001.

Boyer, F.; Fichant, G.; Berthod, J.; Vandebrouck, Y.; Attree, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomins resources? *BMC genomics.* v.10, p.104, 2009.

Cascales, E. The type VI secretion toolkit. *EMBO reports.* v.9, p.735-741, 2008.

Chow, J.; Mazmanian, S.K. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe.* v.7, p.265-276, 2010.

Christensen, G. D.; Simpson, W. A.; Younger, J. J.; Baddour, L. M; Barrett, F. F.; Melton, D. M.; Beachey, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiol.* v.22, p.996-1006, 1985.

Csonka, L.N.; Fraenkel, D.G. Pathways of NADPH formation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* v. 252, p.3382-3391, 1997.

Das, S.; Chakraborty, A.; Banerjee, R.; Chaudhuri, K. Involvement of *in vivo* induced *icmF* gene of *Vibrio cholera* in motility, adherence to epithelial cells and conjugation frequency. *Bioch. Bioph. Res Com.* v.295, p.922-928, 2002.

Das, S.; Chakraborty, A.; Banerjee, R.; Roychoudhury, S.; Chaudhuri K. Comparison of global transcription responses allows identification of *Vibrio cholerae* genes differentially expressed following infection. *FEMS Microbiol. Lett.* v.190, p.87-91, 2000.

Datsenko, K.A.; Wanner, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.97, p.6640-6645, 2000.

de Pace, F.; Nakazato, G.; Pacheco, A.; Boldrin de Paiva, J.; Sperandio, V.; Dias da Silveira, W. The Type VI Secretion System plays a role in type 1 fimbriae expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect immun.* v.78, p. 4990 - 4998. 2010.

Doublet, B.; Douard, G.; Targant H.; Meunier D.; Madec J.Y.; Cloeckaert, A. Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J. Microb. Methods.* v. 75, p. 359-361. 2008.

Economou, A.; Christie, P.J.; Fernandez, R.C.; Palmer, T.; Plano, G.V.; Pugsley, A.P. Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol.* v.62, p.308-319, 2006.

Edelman, S.; Leskela, S.; Ron, E.; Apajalahti, J.; Korhonen, T.K. *In vitro* adhesion of avian pathogenic *Escherichia coli* O:78 strain to surfaces of the chicken intestinal tract and to ileal mucus. *Vet. Microbiol.* v.91, p.41-56, 2003.

Enos-Berlage, J. L.; Guvener, Z. T.; Keenan, C. E.; McCarter, L. L. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* v.55, p.1160-1182, 2005.

Ewers, C.; Li, G.; Wilking, H.; Kiessling, S.; Alt, K.; Antao, E.M.; Laturus, C.; Diehl, H.; Glodde, S.; Homeier, T.; Bohnke, U.; Steintuck, H.; Philipp, H.C.; Wieler, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how close are they? *Int. J. Med. Microbiol.* v.287, p. 163-76, 2007.

Feuillte, V.; Medjane, S.; Mondor, I.; Demaria, O.; Pagni, P.P.; Galán, J.E.; Flavel, R.A.; Alexopoulou, L.; Involvement of toll like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 103, p.12487-12492, 2006.

Fierer, J. L.; Eckmann, F.; Fang, C.; Pfeifer, B. B.; Finlay, C.; Guiney, D. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophages and nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* v.61, p.5231–5236, 1993.

Filloux, A.; Hachani, A.; Bleves, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology.* v.154, p.1570-1583, 2008.

Finlay, B. B.; Ruschkowski, S.; Dedhar, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* v.99, p.283-296, 1991.

Gillen, K. L.; Hughes, K. T. Negative regulatory loci coupling flagellin synthesis to flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. bacteriol.* v.173, p.2301-2310, 1991.

Grassl, G. A.; Finlay, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* v.24, p.22-26, 2008.

Gross, W.B. Colibacillosis: Disease of Poultry. 9th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 138-144, 1991.

Gunther, I. N.; Snyder, J. A.; Lockatell, V.; Blomfield, I.; Johnson, D. E.; Mobley, H. L. Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. *Infect. Immun.* v.70, p.3344–3354, 2002.

Jani, A.J.; Cotter, P.A. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microb.* v.8, p.2-6, 2010.

Johnson, T.J.; Nolan, L.K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* v.73, p. 750 – 774, 2009.

Khan, N. A.; Kim, Y.; Shin, S.; Kim, K. S. FimH-mediated *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Cell.Microbiol.* v.9, p.169–178, 2007.

Kirby, J. E.; Vogel, J. P.; Andrews, H. L.; Isberg, R. R. Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol microbiol.* v.27, p.323-336, 1998.

Knutton, S.; Baldwin, T.; Williams, P. H.; McNeish, A. S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* v.57, p.1290-1298, 1989.

La Ragione, R.M.; Sayers, A.R.; Woodward, M.J. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiol. Infect.* v.124, p.351-363, 2000.

Leiman, P.G.; Basler, M.; Ramagopal, U.A.; Bonanno, J.B.; Sauder, J.M.; Pukatzki, S.; Burley, S.K.; Almo, S.C.; Mekalanos, J.J. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.106, p.4154-4159, 2009.

Liu, X.; Matsumura, P. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J bacteriol.* v.176, p.7345-7351, 1994.

Ma, A. T.; McAuley, S.; Pukatzki, S.; Mekalanos, J. J. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cell. *Cell.* v.5, p.234-243, 2009.

Mobley, H. L.; Chippendale, G. R.; Tenney, J. H.; Hull, R. A.; Warren, J. W. Expression of type 1 fimbriae may be required for persistence of *Escherichia coli* in the catheterized urinary tract. *J. Clin. Microbiol.* v.25, p.2253–2257, 1987.

Mougous, J.D.; Cuf, M.E.; Raunser, S.; Shen, A.; Zhou, M.; Gifford, C.A.; Goodman, A.L.; Joachimiak, G.; Ordonez, C.L.; Lory, S.; Walz, T.; Joachimiak, A.; Mekalanos, J.J. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science.* v.312, p.1526-1530, 2006.

Mougous, J.D.; Gifford, C. A.; Ramsdell, T. L.; Mekalanos, J. J. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Cell Biol.* v.9, p.797-803, 2007.

Moulin-Schouleur, M., M. Reperant, S. Laurent, A. Bree, S. Mignon-Grasteau, P. Germon, D. Rasschaert, and C. Schouler. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol.* v.45, p.3366-3376, 2007.

Mulvey, M.A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* V. 4, p.257-271.

Ottemann, K. M.; Miller, J. F. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol. microbiol.* v.24, p.1109-1117, 1997.

Parsons, D.A.; Heffron, F. *sciS*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect. Immun.* v.73, p.4338-4345, 2005.

Pell, L.G.; Kanelis, V.; Donaldson, L.W.; Howell, P.L.; Davidson, A.R. The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.106, p.4160-4165, 2009.

Pfeifer, C. G.; S. L. Marcus, O.; Steele-Mortimer, L. A.; Knodler, A.; Finlay, B. *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* v.67, p.5690–5698, 1999.

Piatti, R.M.; Baldassi, L. Prevalência de *Escherichia coli* O78:K80 na microbiota de aves da região oeste do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.* v. 74, p. 357- 359, 2007.

Pratt, L. A.; Kolter, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol microbiol.* v.30, p.285-293, 1998.

Pukatzki, S.; Kessin, R. H.; Mekalanos, J. J. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* v.99, p.3159-3164, 2002.

Pukatzki, S.; Ma, A.T.; Revel, A.T.; Sturtevant, D.; Mekalanos, J.J. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad USA.* v.104, p.15508-15513, 2007.

Pukatzki, S.; Ma, A.T.; Sturtevant, D.; Krastins, B.; Sarracino, D.; Nelson, W.C. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.103, p.1528–1533, 2006.

Pukatzki, S.; McAuley, S.B.; Miyata, S.T. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector domains. *Curr Opin Microbiol.* v.12, p.11-17, 2009.

Purcell, M.; Shuman, H. A. The *Legionella pneumophila* icmGCDJBF genes are required for killing of human macrophages. *Infect. immun.* v.66, p.2245-2255,1998.

Rao, P.; Yamada, Y.; Tan, Y.; Leung, K.Y. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *E. tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol.* v.53, p.573–586, 2004.

Reed, G. H. Foodborne Illnes (Part 8) *Escherichia coli*, dairy, food and environmental sanitation. v. 14, p. 329 – 330, 1994.

Rodriguez-Siek, K.E.; Giddings, C.W.; Doetknot, C. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* p.241, 2005.

Ron, E.Z. Host apecificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Cur Opin Microbiol.* v.9, p.28-32, 2006.

Sambrook, J; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring harbor Laboratory Press, NY, p.1584, 2001.

Schell, M. A.; Ulrich, R. L.; Ribot, W. J.; Brueggemann, E. E.; Hines, H. B.; Chen, D.; Lipscomb, L.; Kim, H.S.; Mrazek, J.; Nierman, W. C.; Deshazer, D. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol. Microbiol.* v.64, p.1466–1485, 2007.

Schlieker, C.; Zentgrafer, H.; Dersch, P.; Mogk, A. ClpV, a unique Hsp100/Clp member of pathogenic bacteria. *Biol Chem.* v.386, p. 1115-1127, 2005.

Schwarz, S.; West, E.; Boyer, F.; Chiang, W.C.; Carl, M.A.; Hood, R.D. *Burkholderia* Type VI Secretion Systems Have Distinct Roles in Eukaryotic and Bacterial Cell Interactions. *Plos Path.* In press. 2010.

Sexton, J.A.; Miller, J.L.; Yoneda, A.; Kehl-Fie, T.E.; Vogel J.P. *Legionella pneumophila* DotU and IcmF are required for stability of the Dot/Icm complex. *Infect Immun.* v.72, p. 5983–5992, 2004.

Shalom, G.; Shaw, J. G.; Thomas, M. S. *In vivo* expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiol.* v.153, p.2689 – 2699, 2007.

Sheahan, K.L.; Cordero, C.L.; Satchell, K.J. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholera* RTX toxin that covalently cross-link actin. *Proc Natl Acad USA*. v.101, p.9798-9803, 2004.

Shrivastava, S.; Mande, S.S. Identification and functional characterization of gene components of Type VI secretion system in bacterial genomes. *PLoS ONE*. v.3, p.2955, 2008.

Sperandio, V.; Torres, A. G.; Kaper, J.B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol microbiol*. v.43, p.809-821, 2002.

Suarez, G.; Sierra, J.; Sha, J.; Wang, S.; Erova, T.; Fadl, A. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog*. v.44, p.344–361, 2008.

Syed, K. A.; Beyhan, S.; Correa, N.; Queen, J.; Liu, J.; Peng, F.; Satchell, K.J.F.; Yildiz, F.; Klose, K.E. The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J. Bacteriol*. v.191, p. 6555-6570, 2009.

Thanassi, D.G.; Hultgren, S.J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol*. v.12, p. 420-30, 2000.

Torres, A. G.; Giron, J.A.; Perna, N.T.; Burland, V.; Blattner, F.R.; Avelino-Flores F.; Kaper, J.B. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun*. v.70, p.5416-5427, 2002.

Tseng, T.T.; Tyler, B.M.; Setubal, J.C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the gene ontology. *BMC microbiology*. v.103, p.1528–1533, 2009.

VanRheenen, S.; Duménil, G.; Isberg, R.R. IcmF and DotU Are Required for Optimal Effector Translocation and Trafficking of the *Legionella pneumophila* Vacuole. *Infect Immun.* v.72, p.5972-5982, 2004.

Waite, R. D.; Paccanaro, A.; Papakonstantinou, A.; Hurst, J. M.; Saqi, M.; Littler, E.; Curtis, M. A. Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles. *BMC Genomics* v.7, p.162, 2006.

Walters, M.; Sperandio, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* v.74, p.5445–5455, 2006.

Wu, H.Y.; Chung, P.C.; Shih, H.W.; Wen, S.R.; Lai E.M. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* v.190, p.2841-2850, 2008.

Zheng, J.; Leung, K. Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Mol. Microbiol.* v.66, p.1192–1206, 2007.

Zusman, T.; Feldman, M.; Halperin, E.; Segal G. Characterization of the *icmH* and *icmF* Genes Required for *Legionella pneumophila* Intracellular Growth, Genes That Are Present in Many Bacteria Associated with Eukaryotic Cells. *Infect Immun.* v.72, p.3398-3409, 2004.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada *Estudo de genes do Sistema de Secreção Tipo VI em uma linhagem de Escherichia coli patogênica para aves (APEC)*:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança;

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:
Comissão de ética no uso de animais CEUA/Unicamp, sob Protocolo(s) nº 2202-1.

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Serranda Pave
Aluno: *Serranda Pave*
Wanderley Dias da Silveira
Orientador: *wanderley dias da silveira*

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Profa. Ana Maria Aparecida Guaraldo
Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP