

BC/31000
IB/81203



UNICAMP

T/Unicamp

B681m

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA DE MICRORGANISMOS
NÍVEL DOUTORADO.

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULARES DO SISTEMA
MINITRANSPOSON Tn5 PARA INTEGRAÇÃO DE GENES HETERÓLOGOS EM
LINHAGENS VACINAIS $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ DE *Salmonella typhimurium*.

ALUNO: MARCELO BROCCHI

ORIENTADOR: PROF. DR. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA.

Este exemplar corresponde a versão final
da tese defendida por () candidato (a)
Marcelo Brocchi
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Wanderley Dias da Silveira
07/02/97

Tese apresentada ao Departamento de
Genética e Evolução para a obtenção do
Título de Doutor em Genética- Área de
Concentração: Genética de Microrganismos.

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	1112
V.	1112
TON. DE	31000
PROC.	882/97
C	<input type="checkbox"/>
E	<input checked="" type="checkbox"/>
PRECED.	7/11/97
DATA	07/01/97
N.º	070000089249

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

B681m

Brocchi, Marcelo

Modificação e caracterização moleculares do sistema minitransposon Tn5 para integração de genes heterólogos em linhagens vacinais $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *Salmonella typhimurium* / Marcelo Brocchi. - - Campinas, SP : [s.n], 1997.

Orientador : Wanderley Dias da Silveira.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Salmonela. 2. Vacinas bacterianas.
3. Enterotoxinas. I. Silveira, Wanderley Dias da.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 7 de fevereiro de 1997

BANCA EXAMINADORA:

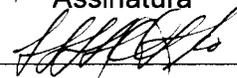
TITULARES:

Prof. Dr. Adilson Leite



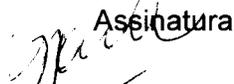
Assinatura

Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro



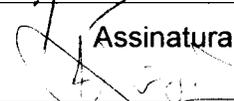
Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano



Assinatura

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo



Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Edmar Chartone de Souza

Assinatura

Prof(a) Dr(a) Yoko Bomura Rosato

Assinatura

ÍNDICE GERAL

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. <i>Salmonella</i> como Agente Patogênico.....	4
2.2. Mecanismos de Patogenicidade.....	5
2.2.1. Adesão a Células Epiteliais da Mucosa Intestinal.....	5
2.2.2. Invasão de Células Eucarióticas.....	6
2.2.3. Capacidade de Sobrevivência a Fatores Adversos.....	9
2.2.4. Gastroenterites Causadas por <i>Salmonella</i>	12
2.2.5. Produção de Toxinas.....	12
2.2.6. Presença de Plasmídio de Virulência.....	13
2.3. Vacinas contra Salmonelose.....	14
2.4. Mutações que Atenuam a Virulência. Utilização de Linhagens Atenuadas como Carreadoras de Epítomos Antigênicos para o GALT.....	14
2.4.1. Mutantes <i>galE</i>	15
2.4.2. Mutantes <i>aro</i>	15
2.4.3. Mutantes <i>phoP/phoQ</i>	16
2.4.4. Mutantes <i>cya/crp</i>	16
2.4.5. Outras Mutações.....	17
2.5. Fatores que Influenciam a Resposta Imunológica contra Antígenos Carreados por <i>Salmonella</i>	17
2.6. Sistemas para Integração de Genes Heterólogos no Cromossomo de <i>Salmonella</i>	20
2.6.1. Sistemas Baseados em Recombinação Homóloga.....	20
2.6.2. Sistemas Baseados em Transposição.....	20
2.7. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	21
2.8. <i>Vibrio cholerae</i>	24
2.9. A Toxina LT-K63.....	27
3. Objetivos.....	29
4. Material.....	30
4.1. Linhagens Bacterianas e Plasmídios.....	30
4.2. Meios de Cultura e Condições de Cultivo.....	33

4.3. Soluções de Uso Geral.....	37
4.4. Soluções para Biologia Molecular.....	38
4.5. Soluções para Extração de Plasmídios em Pequena Escala.....	42
4.6. Soluções para Extração de Plasmídios em Grande Escala.....	44
4.7. Soluções para Extração de DNA Genômico.....	45
4.8. Soluções para Transformação Bacteriana.....	46
4.9. Soluções para Eletroporação de Bactérias.....	47
4.10. Soluções para Hibridação de Colônias Bacterianas Usando Sondas Radioativas.....	48
4.11. Solução para Detecção de Colônias Produtoras de LT-K63 Usando Anticorpos.....	49
4.12. Soluções para Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	50
4.13. Soluções para "Immunoblots".....	53
4.14. Soluções para Tratamento, Transferência e Imobilização do DNA em Membranas de nylon.....	55
4.15. Soluções para Marcação Radioativa de Sondas com α ³² P.....	56
4.16. Soluções para Hibridação de DNA e Lavagem de Filtros.....	57
4.17. Soluções para Eletroforese em Campo Pulsado.....	57
4.18. Soluções para Processamento de Órgãos de Camundongos.....	59
4.19. Soluções para ELISA.....	60
5. Métodos.....	61
5.1. Extração e Purificação de DNA Plasmidial.....	61
5.1.1. Mini-Preparações.....	61
5.1.2. Maxi-Preparações e Purificação de DNA Plasmidial por Ultracentrifugação em Gradiente de Cloreto de Césio.....	62
5.2. Reações de Digestão com Enzimas e Restrição e Ligações entre Fragmentos de DNA.....	64
5.3. Purificação de Fragmentos de DNA Digeridos com Enzimas de Restrição.....	64
5.4. Estratégia de Clonagem.....	66
5.5. Identificação de Clones Positivos em Populações de Bactérias Transformantes..	72
5.6. Conjugação Bacteriana.....	72
5.7. Identificação de Colônias Produtoras das Toxinas LT e LT-K63 Usando Anticorpos Anti-LT.....	73

5.8. Preparações de Proteínas Totais de Transconjugantes de <i>Salmonella</i>	74
5.9. Preparações de Proteínas Periplasmáticas de Transconjugantes de <i>Salmonella</i>	74
5.10. SDS-PAGE.....	75
5.11. Análise de Lipopolissacárideos (LPS).....	75
5.12. "Immunoblots".....	75
5.13. Preparações de DNA Genômico de <i>Salmonella</i>	76
5.14. Eletroforese de Campo Pulsado.....	77
5.15. Imobilização de DNA em Membranas de Nylon.....	78
5.16. Hibridação de DNA Imobilizado em Membranas de Nylon com Sondas Radioativas.....	79
5.17. Fragmentos de DNA Utilizados como Sondas.....	80
5.18. Seqüenciamento de DNA.....	81
5.19. Imunização de Camundongos BALB/c com Linhagens Recombinantes de <i>Salmonella</i>	82
5.20. Coleta do Soro e Muco Intestinal de Camundongos BALB/c Imunizados.....	82
5.21. Processamento dos Órgãos e do Muco Intestinal de Camundongos BALB/c.....	83
5.22. Persistência de Linhagens Recombinantes de <i>Salmonella</i> nos Tecidos de Camundongos BALB/c.....	84
5.23. ELISA.....	85
5.23.1. Detecção de IgG Sérica anti-LT ou Anti- <i>Salmonella</i>	85
5.23.2. Detecção de IgA Total nas Secreções Intestinais.....	86
5.23.3. Detecção e Determinação do Título de IgA Anti-LT e Anti- <i>Salmonella</i> Específicas.....	86
5.23.4. Cálculo do Título de Anticorpos.....	87
5.24. Toxicidade de LT em Cultura de Células Y1 e Teste de Neutralização.....	87
5.25. Obtenção e Comparação de Seqüências de DNA.....	87
5.26. Análises Estatísticas.....	87
5.27. Determinação do Peso Molecular de Fragmentos de DNA.....	88
6. Resultados.....	89
6.1. Obtenção de Transconjugantes de <i>S. typhimurium</i>	89
6.2. Análise da Expressão das Toxinas CT, LT e LT-K63 em Transconjugantes de <i>S. typhimurium</i>	90
6.3. Montagem da Toxina LT em <i>S. typhimurium</i>	98
6.4. Caracterização Molecular dos Transconjugantes.....	99

6.4.1. Presença do Plasmídio pUT.....	99
6.4.2. Quanto à Inserção do <i>Operon It-k63</i>	99
6.4.3. Presença do gene <i>asd</i>	104
6.4.4. Hibridação com Seqüências do Plasmídio pUT.....	104
6.4.5. Presença do Plasmídio de Virulência.....	106
6.4.6. Seqüenciamento da Extremidade 5' do Fragmento LT-K63 (BamHI/ Sall).....	107
6.5. Caracterização Fenotípica dos Transconjugantes.....	109
6.6. Mapeamento Parcial do <i>Operon It-k63</i>	109
6.6.1. Mapeamento Parcial do <i>Operon It-k63</i> nos Transconjugantes Derivados de <i>S. typhimurium</i> X3987 UK-1.....	111
6.6.2. Mapeamento Parcial do <i>Operon It-k63</i> nos Transconjugantes Derivados de <i>S. typhimurium</i> SR11 X4072 e X4217.....	112
6.6.3. Mapeamento Parcial do <i>Operon eltAB</i> nos Transconjugantes Derivados de <i>S. typhimurium</i> LT2.....	114
6.7. Invasão e Persistência de Linhagens Recombinantes de <i>S. typhimurium</i> nos Tecidos Animais.....	119
6.8. Imunização de Camundongos BALB/c.....	123
6.9. Estabilidade da Expressão de LT-K63 “in vivo”.....	130
6.10. Neutralização da Atividade Tóxica de LT para Células Y1.....	131
7. Discussão.....	133
8. Conclusões.....	144
9. Resumo.....	145
10. “Abstract”.....	146
11. Referências.....	147

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Linhagens Bacterianas Utilizadas Neste Estudo.....	31
TABELA 2. Plasmídios Usados Neste estudo.....	32
TABELA 3. Teste de Toxicidade de Extratos periplasmáticos de Transconjugantes de <i>S. typhimurium</i> LT2, Obtidos com o Plasmídio pUT/Cm:LT, Produtores da Toxina LT.....	98
TABELA 4. Mapa de Restrição da Linhagem <i>S. typhimurium</i> LT2 para as Enzimas XbaI e AvrII.....	110
TABELA 5. Características Fenotípicas e Moleculares com Relação ao Mapeamento de <i>eltAB</i> ou <i>lt-k63</i> em Diferentes Transconjugantes.....	118
TABELA 6. Títulos IgG e IgA Anti-LT Individuais.....	126
TABELA 7. Estabilidade da Expressão da Toxina Mutante LT-K63 em Linhagens Recombinantes de <i>S. typhimurium</i>	130

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema do Plasmídio pUT/Cm:LT.....	66
FIGURA 2. Construção do Plasmídio pUT/asd.....	68
FIGURA 3. Oligonucleotídeos Adaptadores Utilizados para a Construção do Plasmídio pUT/asd.....	69
FIGURA 4. Esquema dos Plasmídios pUT/asd:LT-K63 e LT-K63i.....	70
FIGURA 5. Plasmídios pUT/asd Quiméricos Contendo o <i>Operon ct-k63</i> Inserido no Único Sítio NotI.....	71
FIGURA 6. Posição dos “Primers” Utilizados para Amplificar os Fragmentos LT e PSC que Foram Utilizados como Sondas Moleculares.....	81
FIGURA 7. Porcentagem de Transconjugantes de <i>S. typhimurium</i> Resistentes à Ampicilina.....	91
FIGURA 8. “Western blot” de Extratos Protéicos e Periplasmáticos de Transconjugantes da Linhagem <i>S. typhimurium</i> LT2, Resistentes ao Cloranfenicol.....	93
FIGURA 9. “Western blot” de Extratos Protéicos de Transconjugantes <i>S. typhimurium</i> X3987 e X4217 Contendo o <i>Operon It-k63</i>	95
FIGURA 10. “Western blot” de Extratos Protéicos de Transconjugantes <i>S. typhimurium</i> X3987 e X4072 Contendo o <i>Operon It-k63</i>	96
FIGURA 11. Comparação da Expressão de LT-K63 entre Transconjugantes e Linhagens de <i>S. typhimurium</i> X3987 Transformada com Plasmídios Quiméricos de Baixo e Alto Número de Cópias.....	97

FIGURA 12. "Southern blot" de DNA Genômico de Transconjugantes <i>S. typhimurium</i> X3987 e LT2, Digeridos com as Enzimas de Restrição Sall e XhoI e Hibridados com Sonda Molecular LT Específica.....	101
FIGURA 13. "Southern blot" de DNA Genômico de Transconjugantes <i>S. typhimurium</i> X4217 e X4550, Digeridos com as Enzimas de Restrição Sall e XhoI e Hibridados com Sonda Molecular LT Específica.....	102
FIGURA 14. "Southern blot" de DNA Genômico de Transconjugantes <i>S. typhimurium</i> X4072, Digeridos com Sall e Hibridados com Sonda Molecular LT Específica.....	103
FIGURA 15. "Southern blot" de DNA Genômico de Transconjugantes <i>S. typhimurium</i> X3987, X4217 e X4550, Digerido com Sall ou Sall e XhoI, Hibridados com as Sondas LT e ASD.....	105
FIGURA 16. "Southern blot" de DNA Genômico de Transconjugantes <i>S. typhimurium</i> linhagens X3987 e LT2, Digerido com as Enzimas de Restrição Sall e XhoI e Hibridados com a Sonda Molecular SPVB.....	108
FIGURA 17. Eletroforese de Campo Pulsado de DNA Genômico de <i>S. typhimurium</i> transconjugantes LT2-2C, X3987-3D, 6D e X4072-8B e 27F, Digerido com XbaI. Hibridação com Sonda LT.....	115
FIGURA 18. Eletroforese de Campo Pulsado de DNA Genômico de Transconjugantes de <i>S. typhimurium</i> LT2 e X3987 Digerido com XbaI ou AvrII. Hibridação com Sonda LT.....	116
FIGURA 19. Eletroforese de Campo Pulsado de DNA Genômico de Transconjugantes de <i>S. typhimurium</i> LT2 e X4072 Digerido com XbaI ou AvrII. Hibridação com Sondas LT e PSC.....	117
FIGURA 20. Persistência de Linhagens de <i>S. typhimurium</i> nas Placas de "Peyer"....	121

FIGURA 21. Persistência de Linhagens de <i>S. typhimurium</i> no Baço.....	122
FIGURA 22. Título de Anticorpos IgG Anti-LT.....	124
FIGURA 23. Título de Anticorpos IgG Anti- <i>Salmonella</i>	125
FIGURA 24. Título de Anticorpos IgA anti-LT-K63	127
FIGURA 25. Título de Anticorpos IgA Anti-Antígenos de <i>Salmonella</i>	129
FIGURA 26. “Southern blot” de DNA Genômico de Colônias Transconjugantes X3987-18A, X4072-27F e X4217-10E, Antes e Após Passagem pelas Placas de “Peyer” e Baço de Camundongos BALB/c. O DNA Genômico Foi Digerido com as Enzimas de Restrição Sall e XhoI e Hibridados com as Sondas LT e PUT.....	132

À minha família
Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e esposa, pelo inestimável apoio, ajuda, incentivo, amizade e compreensão ao longo da realização de todo este trabalho.

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação, incentivo, dedicação e amizade.

Ao diretor Científico do IRIS Dr. Rino Rappuoli, pela amizade, sugestões técnicas e análise crítica do trabalho, além da concessão do uso das facilidades do IRIS para a condução deste trabalho.

À chefe do Departamento de Biologia Molecular do IRIS, Dr. Maria Luisa Melli, pelas sugestões técnicas e pela amizade.

Às Dr(as). Emanuela Palla e Cesira L. Galeotti pelo apoio técnico, científico e pelas sugestões e críticas.

À minha esposa Lúcia Helena Vicentim, pela ajuda técnica nas análises estatísticas.

Às Dr(as) Maria Grazia Pizza e Maria Rita Fontana pelo fornecimento de plasmídios e anticorpos, além das importantes sugestões e críticas. Ao Dr. Roberto Manetti pelo fornecimento da toxina LT purificada.

Ao Dr. Roy Curtiss III ("Department of Biology, Washington University, St. Louis-Missouri") pelo fornecimento de linhagens de *S. typhimurium* e pelas sugestões e críticas.

Ao grande amigo Dr. Franco Bertini, pela grande amizade, apoio, incentivo e ajuda em todos os momentos difíceis.

Aos grandes amigos Dr. Giuliano Bensi e Dr. Roberto Petracca pela amizade e sugestões técnicas.

Aos técnicos bioteristas do IRIS, Fabrizio Zappalorto, Marco Tortoli, Roberto Dini, Luigi Villa, Luigi Cleongonelli e Maria Rossi pela inestimável ajuda nos experimentos envolvendo animais vivos.

Às Dr(as). Maria Giuseppina Covone, Annalisa Di Tommaso, Teresa de Magistris e Inês Chen, pela inestimável ajuda técnica nos experimentos de imunização e análise dos resultados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia- UNICAMP, Sergio de Mendonça e Fabiana Fantinatti, pela amizade e discussões técnicas. Aos demais amigos do Lab.

Alessandra, Eunice, Marcelo, Paulo, Paromita, Fabiane e Marcos pela inestimável amizade.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia-IB-Unicamp, pela concessão do uso das dependências e facilidades do Departamento.

Aos Professores Doutores Adilson Leite, Antônio Fernando Pestana de Castro e Edmar Chartone de Souza, pela participação na pré-banca e banca examinadora desta tese.

Ao Professor Doutor João Lúcio de Azevedo pela participação na banca examinadora desta tese.

Ao Professor Doutor Tomomasa Yano e à Professora Doutora Yoko Bomura Rosato pela participação como suplentes da banca examinadora desta tese.

Aos amigos do "Dipartimento di Biologia Molecolare-IRIS" Dr(es) Stefano Ricci, Davide Ambrozetti, Enzo Scarlato, Maurizio Comanducci, Maurizio Orlandini, Federico Galvagni, Salvatore Oliviero, Antonello Covacci, Ricardo Manetti, Stefano Censini, Ben Mulder e as Dr(as). Valeria Carinci, Daniela Tornese, Daniela Burroni, Sabrina Bertini, Ana Chiara Mustilli, Chiara, Xiang e Egle Solito, pelo companheirismo e amizade.

A todo o pessoal do Departamento de Informática IRIS, em especial aos amigos Mário Domenighini e Adriano Mainardi por manterem o E-mail sempre funcionando.

A todo o pessoal administrativo do IRIS, em especial à Laura Baretini, Sandra Granai, Antonella, Catherine Mallia, Roberto Carignani e Pellegrini Quarentotti.

Aos Dr(es). GianMaria Rossolini e Franco Gabrielli, Professores dos Departamentos de Biologia Molecular das "Università degli Studi di Siena e di Pisa", respectivamente, pelas críticas, sugestões e amizades.

Ao CNPq-Projeto Rhae, CAPES, FAEP e à Organização das Nações Unidas pela concessão de Bolsas de Estudos.

1. INTRODUÇÃO

Infecções diarreicas causadas por *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC), *Vibrio cholerae* e alguns sorotipos de *Salmonella* continuam sendo importantes causas de mortalidade e morbidade em diversas regiões do mundo e, principalmente, em localidades subdesenvolvidas e com precárias condições sanitárias (Black, 1993). *Salmonella typhi* é o agente etiológico causador da febre tifóide, uma infecção sistêmica grave no homem (Groisman et al., 1990). O desenvolvimento de vacinas que visem o controle destas infecções é, portanto, de extrema importância. Linhagens atenuadas de *Salmonella* são utilizadas como carreadoras de epítopos antigênicos para o sistema imunológico associado ao intestino (Cárdenas & Clements, 1992; Curtiss et al., 1994). Estas linhagens, quando administradas por via oral, induzem potente resposta imunológica humoral e celular contra antígenos de *Salmonella* e contra antígenos expressos nestas (Cárdenas & Clements, 1992; Curtiss et al., 1994). Desta maneira, linhagens atenuadas de *Salmonella* que expressem antígenos comuns de *V. cholerae* e *E. coli* do tipo ETEC são potenciais candidatas para serem utilizadas como vacinas multifatoriais no controle de infecções causadas por estes microrganismos.

Algumas linhagens de *S. typhimurium* causam, em camundongos, infecções que em muitos aspectos assemelham-se à febre tifóide humana. Desta forma, os resultados obtidos em tais infecções vêm sendo utilizados como modelo animal para estudos de mecanismos de patogenicidade, desenvolvimento de vacinas e testes de imunogenicidade. Na grande maioria dos trabalhos descritos na literatura, a clonagem e expressão de genes heterólogos em linhagens vacinais de *Salmonella* são alcançadas através da utilização de plasmídios. Em muitos casos, no entanto, a utilização de plasmídios está associada à instabilidade e à incapacidade das linhagens recombinantes de induzirem resposta imunológica no hospedeiro, contra o antígeno heterólogo (Cárdenas & Clements, 1992). Nestes casos, acredita-se que a ausência de resposta imunológica seja devida à perda do plasmídio e, conseqüentemente, da capacidade de produzir o antígeno heterólogo, após poucos ciclos de replicação no interior dos tecidos do hospedeiro. Existem várias maneiras de estabilizar a expressão de proteínas heterólogas em *Salmonella*: (1) utilização de sistemas letais balanceados onde a estabilização é baseada na introdução de plasmídios contendo genes essenciais para a sobrevivência da célula bacteriana (Nakayama et al., 1988; Galán et al., 1990; Morona et

al., 1994); (2) fusões entre o gene estrutural heterólogo e promotores cuja expressão é ativada no interior do organismo do hospedeiro, como é o caso do promotor *nirB* (Chatfield et al., 1992) e, (3) integração do gene heterólogo no cromossomo bacteriano.

A integração de genes heterólogos no cromossomo de *Salmonella* é realizada através do uso de sistemas baseados em recombinação homóloga, utilizando-se seqüências alvo específicas, como é o caso dos genes *aroC* e *aroD* ou do *operon* histidina (Hone et al., 1988b; Strugnell et al., 1990); ou ainda, através da utilização de elementos de transposição (Flynn et al., 1990; Herrero et al., 1990). Nesta última metodologia, Herrero et al. (1990) descreveram a construção de um sistema baseado na utilização do mini-elemento de transposição Tn5, inserido em um plasmídio suicida. Este sistema foi utilizado com sucesso para a construção de linhagens recombinantes de *Pseudomonas putida* contendo integrações randômicas de um gene que confere resistência à canamicina em seu genoma.

Neste trabalho descreveram-se a modificação e a utilização do sistema de minitransposons Tn5, para a integração do *operon It-k63* no genoma de linhagens atenuadas de *S. typhimurium*. O *operon It-k63* codifica uma proteína mutante, não tóxica, da toxina termo-lábil (LT), esta última produzida por algumas amostras de *E. coli* do tipo ETEC (Pizza et al., 1994b). A toxina LT é composta por dois tipos de subunidades protéicas chamadas A e B (Betley et al., 1996). A subunidade A é a subunidade catalítica responsável pela ativação da adenilato ciclase, pelo efluxo de íons e água para a luz intestinal e conseqüentemente, pelo quadro diarréico verificado em mamíferos infectados com a bactéria (Betley et al., 1996). O mutante *It-k63* foi construído por substituição do *códon* serina 63 pelo *códon* lisina, no gene codificador da subunidade A (Pizza et al., 1994b). A proteína LT-K63 foi proposta como antígeno contra infecções diarréicas causadas por *V. cholerae* e *E. coli* do tipo ETEC. Adicionalmente, este mutante exibiu atividade adjuvante para o sistema imunológico (Di Tomaso et al., 1995).

O sistema de minitransposons foi modificado para possibilitar a inserção do *operon It-k63* em linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium*, que apresentam deleções nos genes codificadores para adenilato ciclase (*cya*), receptor de AMPc (*crp*) e aspartato- β -semialdeído desidrogenase (*asd*). Estas linhagens são atenuadas com relação à virulência e têm sido utilizadas na construção de vacinas multifatoriais (Curtiss et al., 1994). Os resultados obtidos e o potencial uso do sistema de minitransposons Tn5 para a construção de linhagens vacinais de *Salmonella* são apresentados e discutidos. A

expressão de LT-K63 em diferentes linhagens recombinantes de *Salmonella* e a capacidade destas de induzirem resposta imunológica humoral foram também avaliadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Salmonella* como Agente Patogênico

O gênero *Salmonella* pertence a família *Enterobacteriaceae* e segundo Le Minor & Popoff (1987) e Reeves et al. (1989), é constituído por apenas duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira constituída por seis subespécies ou seja, *S. enterica* subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Entretanto, Holt et al. (1994) renomearam *S. enterica* como *S. choleraesuis* e a dividiram em seis subespécies: *choleraesuis*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Por ainda apresentar discrepâncias, estes sistemas de classificação taxonômica em *Salmonella* ainda não são adotados completamente e muitos autores ainda hoje utilizam o antigo sistema de classificação antigênica de Kauffmann (1978), baseado nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Neste último sistema, cada sorovariedade é considerada uma espécie diferente. Desta forma, *S. enterica* subespécie *enterica*, sorovariedade Typhimurium, é simplesmente denominada *S. typhimurium* pelo sistema de Kauffmann. Atualmente são conhecidos mais de 2300 sorovarietades diferentes de *Salmonella* (Popoff et al., 1995). Nesta revisão e no decorrer da descrição deste trabalho, será adotado o sistema de classificação de Kauffmann (1978).

Em relação à patogenicidade, *Salmonella* sp pode causar, em mamíferos, infecções com diferentes graus de gravidade, que vão desde gastroenterites até infecções sistêmicas graves, dependendo da espécie, sorovariedade bacteriana e do tipo de hospedeiro envolvidos (Groisman et al., 1990). *S. typhi* é o agente causador da febre tifóide, uma infecção sistêmica grave, no homem (Groisman et al., 1990). *S. typhimurium* e *S. enteritidis* são freqüentemente isoladas de casos de gastroenterites em humanos (Groisman et al., 1990). Em camundongos, *S. typhimurium* pode causar um tipo de infecção que, em muitos aspectos, é semelhante à febre tifóide humana. Por apresentar esta característica, infecções causadas por *S. typhimurim*, em camundongos, vêm sendo utilizadas como modelo animal para a febre tifóide humana, para estudos de mecanismos de patogenicidade, caracterização de mutantes atenuados com relação à virulência, análise e estudos da resposta imunológica e desenvolvimento de vacinas (Salyers & Whitt, 1994).

2.2. Mecanismos de Patogenicidade

A infecção por *Salmonella* sp ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados. Uma vez ingerida, a *Salmonella* inicia a infecção aderindo e invadindo células da mucosa intestinal, preferencialmente células M (Jones et al., 1994). Estas células epiteliais, encontradas no epitélio que recobre as placas de Peyer (Staats et al., 1994), são especializadas na captura de antígenos da luz intestinal e “apresentação” destes para células do sistema linfático associado ao intestino (GALT, do inglês “gut-associated lymphoid tissues”). A partir das células M, *Salmonella* sp pode invadir e proliferar em células do GALT (macrófagos principalmente) e, subseqüentemente, alcançar e proliferar em órgãos internos do hospedeiro como linfonodos, fígado, baço e corrente sanguínea (Groisman et al., 1990).

Os mecanismos envolvidos com a patogenicidade de *Salmonella* sp estão longe de serem totalmente elucidados. Isto se deve, principalmente, à existência de diferentes etapas, extra e intracelulares, do ciclo infeccioso deste microrganismo, envolvendo a expressão e a regulação temporal precisa de diferentes genes ou grupos gênicos.

2.2.1. Adesão a Células Epiteliais da Mucosa Intestinal

Linhagens de *S. typhimurium* e *S. typhi* expressam fímbria do tipo I (Ernst et al., 1990; Rossolini et al., 1993). Estas fímbrias são encontradas em vários gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e promovem a adesão às células eucarióticas através da ligação a resíduos de D-manose sendo a adesão, inclusive, bloqueada por este carboidrato (Glegg & Gerlach, 1987). Algumas evidências demonstram que em *Salmonella* sp, a expressão deste tipo de fímbria promove a adesão a células HeLa e a eritrócitos de ratos (Ernst et al., 1990; Rossolini et al., 1993; Bäumler et al. 1996b). A produção de fímbria do tipo I parece, no entanto, não essencial para a patogenicidade de *Salmonella* sp (Ernst et al., 1990; Rossolini et al., 1993).

Recentemente, Bäumler & Heffron (1995) descreveram a presença, a 78 minutos no cromossomo de *S. typhimurium*, do operon *lpf* (do inglês “long polar fimbriae”). Este operon, composto pelos genes *lpfABCDE*, está ausente do genoma de *E. coli* K-12, e é responsável pela expressão da fímbria Polar Longa (LP, do inglês “long polar”). Bäumler et al. (1996a e b) demonstraram que esta fímbria promove a adesão de *S. typhimurium* a células HEP-2 e a células do intestino de camundongos. Nestas últimas, a adesão é dirigida preferencialmente às células M nas Placas de Peyer. Linhagem contendo

mutação no gene *lpfC*, apresenta aderência reduzida a células M e DL₅₀ cinco vezes maior que a apresentada pela linhagem parental selvagem (Bäumler et al. 1996a). Estes resultados sugerem uma função importante do operon *lpf* na patogenicidade de *S. typhimurium* e na adesão e invasão preferencial de células M, exibida por estas bactérias.

Uma terceira fímbria, chamada PE (“plasmid encoded”), foi descrita em linhagens de *S. typhimurium* (Friedrich et al. 1993; Bäumler et al. 1996c). Esta fímbria é codificada pelo locus *pef* (“plasmid encoded fimbriae”), localizado no plasmídeo de virulência. Uma linhagem de *S. typhimurium* contendo mutação em *pefC*, um dos genes responsáveis pela expressão desta fímbria, apresenta capacidade reduzida de adesão às microvilosidades intestinais de camundongos e é defectiva na capacidade de causar secreção de fluídos em camundongos recém-nascidos (Bäumler et al. 1996c).

Concluindo, *Salmonella* sp apresenta a capacidade de expressar diferentes fímbrias e estas, por sua vez, dirigem a adesão e posterior invasão de tipos celulares específicos presentes na mucosa intestinal do hospedeiro.

2.2.2. Invasão de células eucarióticas

A invasão de células eucarióticas por *S. typhimurium*, envolve a formação de apêndices protéicos na superfície bacteriana chamados “invasomos”. Estes apêndices estão envolvidos com a indução de modificações fisiológicas na célula hospedeira, mais precisamente com rearranjos do citoesqueleto, resultado de um acúmulo de proteínas tais como a actina, α -actina, talina, tubulina, tropomiosina e ezirina, na região de contato e envolvendo a célula bacteriana (Ginocchio et al., 1994). O resultado destas alterações é a formação de protrusões (“ruffles”) da membrana citoplasmática da célula hospedeira, através das quais a bactéria ganha acesso ao interior da mesma (Francis et al., 1993). Estas alterações na membrana citoplasmática assemelham-se às alterações induzidas por uma variedade de estímulos, incluindo a ação de fatores de crescimento e a ativação de oncogenes (Galán, 1994).

Os invasomos formam-se na superfície da célula bacteriana aproximadamente quinze a trinta minutos após o contato com a célula hospedeira e são perdidos ou reabsorvidos em concomitância com a formação das protrusões (Ginocchio et al., 1994). Contato íntimo entre a célula bacteriana e a hospedeira é necessário para a indução da formação dos invasomos e a perda ou absorção destes também é fundamental para a

formação das protrusões celulares e, conseqüentemente, invasão (Ginocchio et al., 1994).

O aumento da concentração intracelular de íons cálcio está envolvido diretamente com a formação dos "ruffles" e com a invasão da célula hospedeira (Pace et al., 1993). Este é causado pela ativação de canais de cálcio na membrana citoplasmática. Se diferentes vias de transdução de sinais bioquímicos, envolvendo diferentes receptores de membrana externa, em diferentes tipos celulares, estão envolvidos neste processo, esta é ainda uma questão a ser respondida. No entanto, a ativação da enzima MAP Quinase (MAPK do inglês "mitogen-activated protein kinase") por fosforilação de um resíduo de tirosina, parece ser o ponto de convergência chave para todas as alterações observadas na célula hospedeira (Galán, 1994). Após ativada, Map Quinase, presumivelmente, ativa, por sua vez, a fosfolipase A2 (PLA2). Como resultado da ativação de PLA2, ácido aracdônico é produzido e subseqüentemente convertido em leucotrieno D4 (LTD4) que direta ou indiretamente ativa os canais de cálcio, causando um influxo de íons cálcio para o interior da célula (Pace et al., 1993). Recentemente, Rosenshine et al. (1994) determinaram que um fator presente no sobrenadante de culturas de *S. typhimurium* era capaz de fosforilar MAP Quinase e que isto também ocorria quando o sobrenadante da cultura do mutante *invA* não invasivo (ver adiante), era utilizado. Estes resultados refletem a complexidade dos sinais bioquímicos entre a célula bacteriana e a célula alvo envolvidos neste mecanismo.

As bases genéticas e moleculares da invasão de células eucarióticas por *Salmonella* sp são complexas e ainda existem muitos aspectos a serem elucidados. Um grande número de genes de *Salmonella* envolvidos com a invasão de células de mamíferos foram identificados (Behlau & Miller, 1993; Elsinghorst et al., 1989; Galán et al., 1992; Groisman & Ochman, 1993; Hueck et al., 1995; Jones & Falkow, 1994; Kaniga et al., 1995; Lee et al., 1992; Stone et al., 1992). Muito interessante, é a localização de grande parte destes a 63 centissomos (Cs) do cromossomo de *S. typhimurium* (1 Cs equivale a 48Kb). Esta região do cromossomo compreende uma seqüência de 40Kb, não presente no genoma de *E. coli* K12 e parece portanto, constituir uma "Ilha de Patogenicidade" (Mills et al., 1995). Esta região é composta por 4 loci, locus *inv* ("invasion"), locus *spa* ("surface presentation antigens"), locus *sip* ("*Salmonella* invasion proteins") e locus *prg* ("*PhoP* repressed genes"), além de alguns genes acessórios (revisado por Galán, 1996). Curiosamente, embora inversão de alguns trechos estejam presentes, os genes nesta região são ordenados identicamente e apresentam

similaridade com os genes *mxi*, *spa* e *ipa*, presentes no plasmídio de virulência de *Shigella* (Groisman & Ochman, 1993; Maurelli, 1994; Hueck et al., 1995). Além do mais, estes genes de *Salmonella* e *Shigella* apresentam similaridade com genes do plasmídio de virulência de *Yersinia* e com genes envolvidos na secreção e montagem de componentes flagelares em diferentes bactérias (Mills et al., 1995). Os produtos gênicos destes *loci* estão envolvidos com a secreção de proteínas necessárias à invasão de células eucarióticas, no caso de *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e de genes estruturais formadores do flagelo em outras bactérias. Juntos, estes *loci* compõem o sistema de secreção tipo III, *sec* independente (Galán, 1996).

Em *Salmonella*, o *locus inv* está ligado à secreção e montagem dos invasomos e mutações não polares em genes deste *locus* inibem a invasão de células de mamíferos (Ginocchio et al., 1994). Mutações em *invA* e *invE* estão ligadas à incapacidade de reabsorção ou perda dos apêndices necessários à invasão, uma característica que, como citada anteriormente, impede a formação dos “ruffles” e, conseqüentemente, a invasão (Ginocchio et al., 1994). Mutantes *invG* e *invC* foram incapazes de formar os apêndices (Ginocchio et al., 1994). O gene *invC* codifica para uma ATPase que possivelmente esta ligada à hidrólise de ATP e ao fornecimento de energia necessária à formação dos invasomos (Eichelberg et al., 1994). A única proteína, codificada pelo *locus inv*, que é secretada para o meio de cultura, é a proteína InvJ mas, a função desta na fisiologia da invasão, ainda não foi elucidada (Zierler & Galán, 1995). O último *locus* desta região a ser descrito foi o *locus sip*, sigla que em inglês significa “*Salmonella* invasion proteins” (Kaniga et al., 1995; Hermant et al., 1995; Hueck et al., 1995). Os genes *sipABCD* parecem formar um operon e apresentam similaridade com os genes *ipaABCD* (“invasion protein antigens”) presentes no plasmídio de virulência de *Shigella* sp. Em *Shigella* sp, as proteínas Ipa são as responsáveis pelo processo invasivo (Goldberg & Sansonetti, 1993). As proteínas Sip, portanto, são possivelmente as responsáveis pela indução das modificações fisiológicas e estruturais na célula eucariótica hospedeira e participam estruturalmente da formação dos invasomos sendo, desta forma, proteínas alvo do sistema de secreção codificado pelos *loci inv*, *spa* e *prg*.

Em *Salmonella* sp, a transcrição dos genes necessários à invasão é induzida por crescimento em condições anaeróbicas (Jones & Falkow, 1994). Mutantes constitutivos para a expressão destes genes foram isolados após mutagênese com transposons (Lee et al., 1992). Neste estudo, as inserções dos transposons estavam concentradas em um *locus* que foi chamado *hil* (do inglês “hyper invasive mutants”). Mutantes *hil* diferem-se

das linhagens selvagens pela expressão constitutiva e portanto, não indutiva, dos genes ligados à invasão (Lee et al., 1992). A anaerobiose é um dos fatores conhecidos que afetam o grau de “supercoiling” do DNA genômico bacteriano e este, por sua vez, altera a expressão de diferentes genes (Dorman, 1995). Galán e Curtiss (1990) demonstraram que a expressão do gene *invA* é alterada com a modificação do grau de “supercoiling” do DNA. Jones & Falkow (1994) descreveram o gene *orgA* (“oxigen regulated gene”), um dos genes do *locus hil*, que é ativado por baixas tensões de oxigênio. Posteriormente, foi demonstrado que o *locus hil* está localizado dentro da “ilha de virulência” e é composto pelo gene *hilA*, pelo operon *prgHIJK* que codifica para fatores importantes para invasão, e pelo gene *orgA* (Pegues et al., 1995; Hueck et al., 1995). A transcrição destes genes está sob o controle negativo de PhoP, um regulador transcricional cuja função na patogenicidade será discutida posteriormente. Recentemente, o papel regulatório deste *locus* na indução da invasão em condições anaeróbicas foi elucidado. O gene codificador de uma proteína regulatória, chamado *hilA*, foi descrito como responsável pelo fenótipo hiperinvasivo e como ativador transcricional da expressão de genes importantes para a invasão (Bajaj et al., 1995). A proteína HilA apresenta similaridade com proteínas da família de ativadores transcricionais OmpR-ToxR, o que reforça a idéia do papel deste gene na ativação de importantes fatores de patogenicidade.

2.2.3. Capacidade de sobrevivência a fatores adversos.

Bactérias enteropatogênicas apresentam, invariavelmente, capacidade de resistir a diferentes fatores adversos, encontrados tanto no meio ambiente como no interior do organismo hospedeiro. Estes fatores envolvem variações bruscas de temperatura, osmolaridade, pH e baixa disponibilidade de fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio e ferro. *Salmonella* sp apresenta diferentes mecanismos para sobreviver a estas condições, que envolvem a síntese de sistemas para a captação de nutrientes essenciais, presentes em poucas quantidades, principalmente no interior do organismo hospedeiro, além da expressão regulada de proteínas que garantem a sobrevivência da célula bacteriana a estas condições extremas (revisado por Foster & Spector, 1995).

Após a invasão de células da mucosa intestinal, *Salmonella* sp é capaz de invadir células do sistema reticulo-endotelial, principalmente macrófagos, por um processo que envolve a formação dos invasomos e de protrusões na célula alvo. Em macrófagos, a invasão por *Salmonella* ocorre através de um processo chamado macropinocitose que leva à formação de um grande fagossomo (SP) do inglês “spacious phagosomes”

(Alpuche-Aranda et al., 1994), formado como o resultado de uma massiça absorção de fluidos. A formação dos SP é principalmente observada na invasão de macrófagos por *Salmonella* e é uma estrutura característica da invasão destas células retículo-endoteliais não observada na fagocitose de outras espécies bacterianas (Apuche Aranda et al., 1993). Desta forma, a formação dos SP é induzida por *Salmonella* e, possivelmente, está associada à sobrevivência destas no interior dos macrófagos (Apuche Aranda et al., 1993). A capacidade de formação e manutenção destas estruturas também tem sido associada com a especificidade de infecção do hospedeiro apresentada pelos diferentes sorotipos de *Salmonella* (Pascopella et al., 1995; Apuche-Aranda et al., 1995).

No interior dos macrófagos, nos SP, a bactéria *Salmonella* está sujeita a condições adversas como pH ácido, ataque de metabólicos tóxicos de oxigênio e nitrogênio e a presença de polipeptídios catiônicos com atividade bactericida, comumente chamados defensinas (Ouellette et al., 1994). Neste ambiente hostil, foi estimado que a expressão de genes codificadores de ao menos 40 proteínas bacterianas é induzida (Abshire & Neidhardt, 1993). Um dos *locus* responsáveis pela indução de alguns destes genes é o *locus* PhoP/PhoQ. Este *locus* codifica proteínas que fazem parte da família de ativadores transcricionais com dois componentes, uma proteína sensora-kinase transmembrânica que, uma vez ativada por fatores ambientais, ativa através de fosforilação um ativador transcricional citoplasmático. Este último seletivamente ativa ou inibe a expressão de um grupo específico de genes. Desta família fazem parte, além de PhoP/PhoQ, as proteínas EnvZ/OmpR em *Escherichia coli* e *Salmonella* sp, BvgA/BvgS em *Bordetella pertussis*, ToxR em *Vibrio cholerae*, entre outras (Gross et al., 1989).

PhoQ é a proteína sensora que, ativada por fatores presentes nos SP, autocatalisa a fosforilação de sua extremidade carboxi-terminal voltada para o citoplasma celular (Véscovi et al., 1994). Uma vez fosforilada, a extremidade carboxi-terminal catalisa a transferência do grupo fosfato para PhoP, o regulador transcricional (Véscovi et al., 1994). PhoP é inativo em sua forma não fosforilada mas, uma vez fosforilado (PhoP-P), é ativado o que, por sua vez, ativa ou inibe a expressão de diferentes grupos gênicos. Até o momento foram descritos 17 genes ativados por PhoP que coletivamente são chamados *pag* para "PhoP activated genes". Os produtos de alguns genes *pag* estão envolvidos com a sobrevivência da bactéria no interior dos SP e mutantes onde a expressão de PhoP/PhoQ é abolida ou, mutações em muitos dos genes *pag*, apresentam diminuição da capacidade de sobrevivência no interior dos SP

(Véscovi et al., 1994). Os genes cuja expressão é inibida por PhoP-P são chamados coletivamente *prg* para “PhoP repressed genes” (Véscovi et al., 1994). Curiosamente, mutantes PhoP constitutivos (PhoP^c), são menos eficientes na capacidade de invadir células eucarióticas (Behlau & Miller, 1993). De fato, mutantes de *Salmonella* PhoP^c, apresentam deficiência na secreção de diferentes proteínas para o meio extra-celular (Pegues et al., 1995). Desta forma, alguns dos genes *prg* provavelmente estão envolvidos com a invasão de células eucarióticas, promovendo a secreção de proteínas importantes para o processo invasivo.

Uma das proteínas Pag mais bem estudadas é a PagC. Esta é uma proteína de superfície que apresenta similaridade com a proteína Ail de *Yersinia* e Rck, codificada por um gene do plasmídeo de virulência de *Salmonella* (Véscovi et al., 1994). Mutantes *pagC* apresentam capacidade reduzida de sobreviver no interior dos SP nos macrófagos (Miller et al., 1993). O gene *phoN* foi um dos primeiros a ser descrito, cuja transcrição é ativada por PhoP. Este gene codifica uma fosfatase ácida não específica (Groisman et al., 1992). O fato de *phoN* ser ativado por *phoP* indicaria uma função deste na sobrevivência nos SP mas mutantes *phoN* não são atenuados com relação à virulência (Fields et al., 1989). Este resultado indica que PhoN não é essencial à sobrevivência da bactéria no interior dos macrófagos. Seqüências homólogas a *phoN* foram encontradas somente em outras duas bactérias Gram-negativas e, possivelmente, este gene foi adquirido por transmissão horizontal, em tempos remotos (Groisman et al., 1992). De fato, o conteúdo de G/C de *phoN* é menor do que a média descrita para genes de *Salmonella* (Groisman et al., 1992).

Recentemente, Vescovi et al. (1996) demonstraram que o sinal extracelular responsável pela ativação de PhoQ são íons Mg²⁺. Estes autores demonstraram que a expressão de genes regulados por PhoP/ PhoQ é inversamente proporcional à concentração deste íon. Este é um achado muito interessante pois aos íons, tradicionalmente, estavam associadas funções de mensageiros secundários ou na atuação como cofatores de reações químicas. Estes últimos resultados, no entanto, demonstraram a ação de Mg²⁺ como primeiro mensageiro na transdução de sinais de uma reação em cascata.

Outros *regulons* importantes para a sobrevivência de *Salmonella* no interior de fagossomos dos macrófagos é o *regulon* formado pelos genes *sap* (“sensitive to antimicrobial peptides”) e pelo *operon pmr* (“polimixina resistance”). Estes genes estão

envolvidos com a codificação de proteínas ligadas à resistência contra defensinas (Parra-Lopez et al., 1993; Roland et al., 1993; 1994).

2.2.4. Gastroenterites causadas por *Salmonella*.

Alguns sorotipos de *Salmonella* que não *S. typhi* ou *S. paratyphi*, são freqüentemente relacionados a infecções intestinais em humanos (Groisman et al., 1990). Dentre estes, os mais freqüentes são *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Os mecanismos de virulência implicados nestas infecções só recentemente começaram a ser elucidados. Com a utilização de células epiteliais intestinais T84 de origem humana, que formam uma monocamada de células polarizadas em superfícies apical e basolateral, McCormack et al. (1993, 1995) desenvolveram um sistema modelo para a gastroenterite humana causada por *Salmonella*. Estes autores descreveram que a gastroenterite causada por *S. typhimurium* em humanos está relacionada à capacidade destas em estimular a migração de neutrófilos através da camada epitelial possivelmente por meio de uma nova via de transdução de sinais. A migração destas células imunológicas, em última instância, causa a inflamação e danificação da mucosa intestinal, o que leva à diarreia.

2.2.5. Produção de toxinas.

Foi descrita a produção de uma enterotoxina termo-lábil (LT) por uma linhagem de *S. typhimurium* (Prasad et al., 1990). O gene cromossômico codificador desta toxina em *Salmonella*, chamado "*Salmonella* toxin gene" (*stn*), foi clonado e a seqüência de nucleotídeos determinada (Chopra et al., 1994). O gene *stn* é formado por uma seqüência de 749 pb e codifica uma proteína (Stn) de 29073 Daltons. A toxina Stn não apresenta similaridade em seqüência de aminoácidos e nucleotídeos com as enterotoxinas LT e CT, produzidas por linhagens de *E. coli* enterotoxigênicas e *Vibrio cholerae*, respectivamente. Curiosamente, no entanto, quando purificada de clones recombinantes de *E. coli*, Stn apresentou a capacidade de ativar a produção de AMP cíclico (AMPc), atividade esta semelhante à exibida pelas enterotoxinas LT e CT citadas. A atividade biológica de Stn foi também inativada por antissoro policlonal anti-CT, indicando a existência de alguns epítomos antigênicos em comum entre estas duas toxinas (Prasad et al., 1990). "Imunoblots" realizados a partir de extratos celulares totais e periplasmáticos de linhagens *S. typhimurium* LT2 selvagem e atenuadas contendo deleções nos genes *cya*, *crp* e *asd*, utilizando antissoro policlonal anti-toxina LT-I, não

foram capazes de detectar, nestas linhagens, a toxina Stn (Brocchi et al.,manuscrito em preparo; Covone et al.,manuscrito em preparo). Desta forma, a função desta toxina na virulência deve ainda ser elucidada.

Em adição à Stn, outras enterotoxinas termo-lábeis produzidas por *Salmonella* foram descritas (Sears & Kapper, 1996). Estas toxinas foram capazes de aumentar a secreção no teste de alça ligada de coelhos, causar alongamento em células CHO em cultura e aumentar a permeabilidade de células da epiderme de ratos, mas as funções destas na patogenicidade ainda devem ser elucidadas.

A produção de uma hemolisina por *S. typhimurium*, e por isso chamada de salmolisina (Sln), em concomitância com sua caracterização como um importante fator de virulência, foi descrita por Libby et al. (1994). Curiosamente, esta proteína apresenta similaridade com as proteínas regulatórias MprA de *E. coli* e PecS de *Erwinia chrysanthemi*. Esta observação fez surgir a hipótese de que, na verdade, este gene codifique um ativador transcricional (Dehoux & Cossart, 1995). Maiores esclarecimentos com relação a estes resultados são, portanto, fundamentais para a elucidação da função desta “hemolisina” em *Salmonella*.

2.2.6. Presença do Plasmídio de virulência.

Com a exceção de *S. typhi*, outras *Salmonellas* apresentam, quase invariavelmente, plasmídios de alto peso molecular (Guiney et al., 1994). Estes plasmídios foram, inicialmente, denominados plasmídios crípticos mas, atualmente, muitas características, incluindo a codificação de fatores de virulência, são atribuídos a genes presentes nestes plasmídios. Em *S. typhimurium*, diferentes isolados analisados, quase invariavelmente, apresentam um plasmídio de 60 MD também conhecido como plasmídio de virulência (Sanderson, 1995). Plasmídios de alto peso molecular também foram descritos para *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, entre outras (Guiney et al., 1994). Embora heterogêneos com relação ao peso molecular e seqüência de nucleotídeos, estudos de hibridação evidenciaram algumas regiões com alto grau de homologia. Uma destas regiões, de 7,8 kb, define o locus Spv (“*Salmonella* plasmid *virulence*”) que codifica cinco proteínas que parecem estar envolvidas na multiplicação da bactéria no interior do organismo hospedeiro mas não com a invasão de células eucarióticas (Gulig & Curtiss III, 1987). Outros genes de virulência também foram mapeados no plasmídio de *S. typhimurium*, como os genes *rck* (“*r*esistance to *c*omplement *k*illing”), que codifica uma proteína de membrana externa de 17-kDa que

possivelmente inibe a lise bacteriana mediada pelo sistema complemento (Hefferman et al., 1992), o gene *traT*, comumente associado à resistência ao soro (Sukupolvi et al., 1990) e do *locus pef*, que codifica a produção de uma fímbria (discutido anteriormente), localizado entre as duas origens de replicação deste plasmídeo (Friedrich et al., 1993).

2.3. Vacinas contra a Salmonelose.

A utilização de linhagens de *Salmonella* mortas, por diferentes tratamentos físicos ou químicos, em imunizações orais ou parenterais, é extremamente restrita devido ao fato destas serem pouco imunogênicas e não serem capazes de ativar uma eficiente resposta imunológica secretória a nível da mucosa intestinal (Cárdenas & Clements, 1992). Desta forma, a utilização de linhagens vivas atenuadas, que persistem e multiplicam-se por um breve período, nos tecidos do organismo hospedeiro, é necessária à indução de uma resposta imunológica mais efetiva. Este fato, associado à capacidade de invadir e proliferar em células do sistema retículo endotelial, faz de *Salmonella* sp um atrativo agente carregador de epítomos antigênicos para o desenvolvimento de vacinas multi-fatoriais.

2.4. Mutações que Atenuam a Virulência. Utilização de Linhagens Atenuadas Como Carreadoras de Epítomos Antigênicos para o GALT.

Uma série de mutantes atenuados de *Salmonella* sp com relação à virulência foram descritos e alguns propostos como vacinas vivas atenuadas (revisões são encontradas nas referências Cárdenas & Clements, 1992 e Curtiss et al., 1994). O desenvolvimento destes mutantes é uma difícil tarefa pois tais linhagens devem ser suficientemente atenuadas para assegurar a não patogenicidade e a incapacidade de causar infecções sistêmicas nas doses utilizadas e, ao mesmo tempo, devem ser capazes de proliferar e persistir no organismo hospedeiro por tempo suficiente para induzir uma efetiva resposta imunológica. As mutações responsáveis pela atenuação devem ser altamente estáveis de forma que a probabilidade de reversão desta característica seja nula.

Bacon et al (1950) foram os primeiros a investigar a não virulência de mutantes auxotróficos de *S. typhi*, observando que mutantes com requerimentos para purinas, ácido *p*-aminobenzoico (PABA) e aspartato, apresentavam reduzida virulência a camundongos. Desde então, esforços foram somados no sentido de construir linhagens vivas atenuadas que constituíssem bons carreadores de epítomos antigênicos. Segue-se uma breve descrição das principais mutações que atenuam a virulência.

2.4.1. Mutantes *galE*. Germanier & Furer (1971) foram os primeiros a demonstrarem a avirulência e a imunogenicidade de mutantes *galE* de *S. typhimurium* em camundongos e, posteriormente, propuseram a utilização da linhagem de *S. typhi* mutante *galE* Ty21a como vacina viva atenuada (Germanier & Furer, 1975). O gene *galE* codifica a enzima UDP-glicose-4-epimerase que catalisa a isomerização reversível de UDP-glicose em UDP-galactose. Mutações no gene *galE* acarretam deficiência na produção de lipopolissacarídeos (LPS) completos que são sintetizados a partir de UDP-galactose. Quando quantidade suficiente de galactose é adicionada ao meio de cultura, tais mutantes produzem LPS completos mas as células bacterianas sofrem lise devido ao acúmulo de galactose-1-fosfato e UDP-galactose a níveis tóxicos para a célula. Inicialmente, acreditou-se que *S. typhi* Ty21a era atenuada devido à mutação *galE* e a deficiência em produzir a cápsula bacteriana (Vi), uma outra característica apresentada por este mutante. Contrariamente, Hone et al (1988a) demonstraram que deleções nos genes *galE* e *vi* não eram suficientes para atenuar a virulência de *S. typhi* Ty. De fato, o mutante Ty21a foi obtido através de mutagênese com N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidina, um agente mutagênico não específico, sendo portanto a atenuação desta linhagem provavelmente devida a outras mutações ainda não caracterizadas. Mesmo assim, esta é a única linhagem de *S. typhi* liberada para ser usada como vacina viva (Cárdenas & Clements, 1992).

2.4.2. Mutantes *aro*. Hoiseth & Stocker (1981) foram os primeiros a isolarem mutantes de *S. typhimurium* com mutações em genes da via biossintética dos aminoácidos aromáticos (genes *aro*) utilizando mutagênese com transposon Tn10. Estes autores demonstraram que mutações no gene *aroA* eram associadas à diminuição da virulência. Posteriormente, linhagens contendo mutações em outros genes da mesma via biossintética foram obtidas e foram, invariavelmente, avirulentas e imunogênicas

(Dougan et al., 1988). Em seqüência, mutantes análogos de *S. typhi* foram construídos (Hone et al., 1991).

Mutações que interrompem a via biossintética dos aminoácidos aromáticos provocam, em *Salmonella*, auxotrofia para 2,3-dihidroxibenzoato e para o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), substratos não disponíveis nos tecidos de mamíferos. No entanto, a avirulência parece ser devida principalmente à auxotrofia para PABA (Curtiss & Kelly, 1987).

As observações de que em animais de laboratório a administração de dieta de PABA é capaz de restituir a virulência de mutantes *aro* (Bacon et al., 1951) associada à presença de PABA em alimentos, levam a seguinte pergunta: Existe a possibilidade de reversão fenotípica de mutantes *aro* se usados em programas de imunização em massa, em tais regiões ?

2.4.3. Mutantes PhoP/PhoQ. Como mencionado anteriormente, os genes *phoP/phoQ* são envolvidos com a ativação de genes importantes para a resistência aos fatores adversos presentes no interior dos fagossomos dos macrófagos e células polimorfonucleares e, ainda, com a inibição de genes que controlam a invasão de células eucarióticas. Desta forma, não é surpreendente que mutantes *phoP* nulos ou *phoP* constitutivos sejam atenuados (Miller et al., 1993; Behlau & Miller, 1993; Véscovi et al., 1994). Da mesma forma, mutações em *PagC* também atenuam a virulência em *Salmonella* (Miller et al., 1993; Véscovi et al., 1994). Recentemente, Hohmann et al. (1995) descreveram a construção de um vetor suicida que permite a inserção estável de genes heterólogos em *pagC*, e a fusão gênica entre as seqüências estruturais do antígeno e o promotor de *pagC*.

2.4.4. Mutantes *cya crp*. AMP cíclico (AMPC) e o receptor para AMP cíclico (CRP) são reguladores gerais necessários à transcrição de muitos genes e operons envolvidos com o transporte e quebra de catabólitos (Curtiss & Kelly, 1987). Sistemas usados para o transporte de fontes de carbono estão todos sob o controle positivo de AMPC como também várias aminoácido-permeases (Curtiss & Kelly, 1987). Além do mais, a concentração de AMPC no interior das células influencia a lisogenização por fagos temperados, a síntese de pili ou fímbrias, de flagelo e de ao menos uma proteína de membrana externa, *OmpA* (Movva et al., 1981). Curtiss & Kelly (1987), descreveram a construção de linhagens de *Salmonella* com deleções nos genes codificadores para

adenilato ciclase (*cya*) e para o receptor de AMPc (*crp*). Estas linhagens $\Delta cya \Delta crp$ foram atenuadas na virulência, imunogênicas e propostas como candidatas a vacinas vivas orais. Paralelamente, um sistema de estabilização da expressão de antígenos heterólogos "in vivo" foi desenvolvido (Galán et al., 1990). Utilizando este sistema de expressão, que será descrito no próximo tópico, várias linhagens recombinantes expressando diferentes determinantes antigênicos, de diferentes origens foram construídas e utilizadas com sucesso na indução de resposta imunológica (Doggett et al., 1993; Curtiss et al., 1994; Redman et al., 1994, 1995; Schödel et al., 1994).

As concentrações de AMPc encontrada nos tecidos e em células de mamíferos (0.1 a 1 μ M) são muito inferiores às necessárias para que mutantes *cya* exibam o fenótipo selvagem (0.1 a 1 mM). De qualquer forma, a inclusão da mutação *crp* previne qualquer benefício que a célula bacteriana poderia obter pela captação de AMPc dos tecidos invadidos. Desta forma, a possibilidade de reversão de mutantes *cya/crp* para o fenótipo selvagem é praticamente inexistente o que faz estas linhagens seguras para a utilização como vacinas vivas e como carregadoras de epítomos antigênicos ao GALT.

2.4.5. Outras Mutações. Mutações nos genes *ompR* (Pickard et al., 1994), *htrA* (Johnson et al., 1991), *h-ns* (Harrison et al., 1994) atenuaram a virulência em *Salmonella*. Mutantes sensíveis à temperatura e atenuados na virulência também foram descritos. Uma característica destes últimos é a alta frequência de reversão ao fenótipo parental, o que limita o uso destes mutantes como vacinas vivas (Cárdenas & Clements, 1992).

2.5. Fatores que Influenciam a Resposta Imunológica Contra Antígenos carregados por *Salmonella*.

A determinação dos fatores que influenciam a resposta imunológica a antígenos carregados por *Salmonella* ainda é motivo de muita discussão. Diferentes autores demonstraram que para alguns antígenos o fator determinante da efetividade da resposta imunológica é a quantidade deste, produzida pela bactéria recombinante, sendo a localização do antígeno na mesma um fator de menor importância (Leclerc et al., 1994; Wick et al., 1994). Hess et al. (1996), entretanto, demonstraram que para alguns antígenos, a secreção destes pela linhagem vacinal é necessária para a indução de proteção. Adicionalmente, Karem et al. (1995) obtiveram diferentes resultados com

relação à resposta imunológica contra o mesmo antígeno, quando este foi expresso a partir de promotores constitutivos ou indutíveis, e em linhagens de *S. typhimurium* contendo diferentes mutações atenuantes. Coletivamente, estes dados sugerem a existência de vários fatores que determinam o tipo de resposta imunológica induzida, sua efetividade, e seu potencial protetor. Estes fatores dependem não somente das características do antígeno e da linhagem vacinal de *Salmonella*, mas também da via de imunização e como o antígeno é apresentado e processado pelo sistema imunológico. A grande questão é que os fatores envolvidos na resposta imunológica contra antígenos carregados por vetores vivos ainda são pouco compreendidos (Leclerc et al., 1994). A perfeita compreensão destes fatores não só permitirá o desenvolvimento de vacinas mais efetivas como também permitirá a modulação do tipo de resposta requerida através da utilização de vacinas especificamente formuladas para a sensibilização de células e/ou fatores imunitários específicos.

Um dos fatores importantes na determinação da eficiência da resposta imunológica contra antígenos carregados por *Salmonella* é a estabilidade de expressão destes "in vivo" (Hone et al., 1988b). A utilização de plasmídios com marcas de resistência a antibióticos para esta finalidade está, freqüentemente, associada com instabilidade e com a segregação de células livre de plasmídios e, conseqüentemente, incapazes de produzir o antígeno, após poucos ciclos de replicação (Hone et al., 1988b).

Uma das formas de estabilizar tal expressão é a construção de proteínas antigênicas híbridas onde a expressão está sob o controle de promotores indutíveis em condições específicas e encontradas, preferencialmente, no interior do organismo hospedeiro. Este é o caso do promotor de *nirB*, indutível em condições anaeróbicas ou microaerófilas (Chatfield et al., 1992) ou dos promotores de *pagC/D* mencionados anteriormente.

Outra forma de estabilização da expressão é o desenvolvimento de sistemas letais balanceados (Galán et al., 1990; Morona et al., 1994). A lógica destes sistemas está na complementação em "trans" de mutações em genes essenciais para a sobrevivência da bactéria, através da introdução de plasmídios contendo o gene selvagem ativo como também o(s) gene(s) codificador(es) da proteína antigênica. Desta forma, segregantes bacterianos livres de plasmídio são rapidamente eliminados garantindo-se a colonização dos tecidos hospedeiros apenas por células bacterianas contendo o plasmídio. Um destes sistemas faz uso do gene *asd*, que codifica a enzima aspartato- β -semialdeído-dehidrogenase, uma enzima da via biossintética da lisina que

apresenta, como composto intermediário, o ácido diaminopimélico (DAP). O DAP é um importante constituinte da parede bacteriana em bactérias Gram-negativas e mutantes *asd* lisam-se após poucos ciclos de replicação (Galán et al., 1990). Deleções no gene *asd* foram introduzidas em linhagens $\Delta cya \Delta crp$ de *Salmonella* juntamente com a criação de vetores plasmidiais *asa*⁺, com diferentes origens de replicação e diferentes número de cópias (Galán et al., 1990).

Outra forma de estabilizar a expressão é a integração do gene heterólogo no cromossomo bacteriano (Hone et al., 1988b). Tais integrações são geralmente estáveis e alguns sistemas deste tipo foram descritos em *Salmonella*. Para tal finalidade, dois tipos de sistemas gerais vêm sendo utilizados: (1) sistemas baseados na utilização de recombinação homóloga e (2) sistemas baseados na utilização de transposons. A grande diferença entre estes dois sistemas é que o primeiro gera integrações em pontos específicos do genoma enquanto o último, dependendo do tipo de transposon utilizado, gera integrações aleatórias.

A escolha do sistema de estabilização a ser utilizado está relacionada principalmente ao tipo de antígeno e da linhagem bacteriana a serem manipulados.

Um grande avanço para os sistemas de recombinação homóloga foi a construção de plasmídios suicidas como o pGP704 (Miller & Mekalanos, 1988) e o pCVD442 (Donnenberg & Kaper, 1991). Estes plasmídios podem ser mobilizados e transferidos por conjugação para diferentes Enterobactérias, não sendo capazes de replicar nestas últimas. A incapacidade de replicação é conferida pela presença da origem de replicação do plasmídio R6K, que necessita da proteína π para a sua ativação. A grande maioria das Enterobactérias não produzem esta proteína e estes plasmídios replicam-se somente em linhagens particulares que produzam tal proteína. A presença da sequência de mobilização do plasmídio RP4 permite que tais plasmídios sejam transferidos por conjugação, para células bacterianas receptoras. O plasmídio pCVD442 apresenta ainda o gene *sacB* que confere sensibilidade à sacarose, sendo um fator importante para a eliminação de seqüências do plasmídio suicida integradas no genôma bacteriano.

2.6. Sistemas de Integração de Genes Heterólogos no Cromossomo de *Salmonella*.

2.6.1. Sistemas baseados em recombinação homóloga. Algumas seqüências alvo do genoma de *Salmonella* já foram utilizadas com o propósito de inserir seqüências heterólogas. Um destes sistema faz uso do operon histidina, que foi utilizado para a expressão do fator de colonização K88 (Hone et al., 1988b) de amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), e da subunidade B da toxina termo-lábil (LT) de ETEC (Cárdenas & Clements, 1993a). Este sistema, desenvolvido originalmente por Hone et al. (1988b), envolve a realização de passos intermediários de eliminação de plasmídios utilizados no processo de integração. Outras seqüências alvo utilizadas para tal finalidade são os genes *aro* (Strugnell et al., 1990). Neste sistema, a integração de seqüências heterólogas está associada à atenuação da virulência já que mutantes Aro são atenuados. Recentemente, os genes *pagC* e *pagD* foram utilizados como seqüências alvo (Hohman et al., 1995). Neste sistema, as inserções são igualmente atenuantes mas, engenhosamente, foram projetadas de tal forma a permitirem que a transcrição do gene heterólogo, após integração cromossômica, estivesse sob o controle dos promotores dos genes *pagC* ou D. Desta forma, tais proteínas heterólogas são produzidas quase exclusivamente no interior dos macrófagos. Estes mesmos autores, utilizando este sistema para a expressão de PhoA, uma fosfatase alcalina de *E. coli*, descreveram a indução de altos títulos de imunoglobulina IgG (Hohman et al., 1995).

2.6.2. Sistemas baseados em transposição. Estes sistemas utilizam-se das propriedades de transposição dos transposons Tn5 e Tn10. Estes foram modificados para conter as seqüências mínimas que permitem a inserção estável de genes heterólogos em *Salmonella* e, por isso, são chamados de mini elementos de transposição. A estabilidade está ligada à presença do gene codificador para a transposase (*tnp*) fora do cassete de transposição, impedindo assim a integração deste gene juntamente com o cassete de transposição. O cassete de transposição é caracterizado pela presença de um único sítio Not I e por um gene de seleção, flanqueados pelas seqüências reconhecidas pela Tnp para catalisar o processo de transposição (terminações I e O). O sítio Not I é utilizado para a clonagem dos genes heterólogos. Os genes de seleção geralmente codificam proteínas que conferem resistência a antibióticos, metais pesados ou herbicidas.

Tanto a transdução, baseada na utilização de um bacteriófago λ (Flynn et al., 1990), como a conjugação, baseada na utilização do plasmídio suicida pGP704 modificado (De Lorenzo & Timmis, 1994), foram utilizadas para a mobilização dos minielementos de transposição em Enterobactérias. O plasmídio pGP704, como mencionado anteriormente, replica-se somente em linhagens particulares que produzem a proteína π e portanto, em *Salmonella*, funciona como um plasmídio suicida. Além disso, o plasmídio pGP704 pode ser mobilizado por conjugação.

2.7. *Escherichia coli* Enterotoxigênica

O grupo das *E. coli* enteropatogênicas é composto por vários subgrupos que, apesar de apresentarem características distintas com relação aos mecanismos de patogenicidade, apresentam algumas características em comum como: (1) a codificação de importantes fatores de virulência a partir de genes plasmidiais; (2) dentro de cada subgrupo, a prevalência de alguns sorotipos O:H; (3) a presença de interação característica com a mucosa intestinal; (4) e a produção de enterotoxinas ou citotoxinas. Até o momento, foram descritos 5 subgrupos de *E. coli* enteropatogênicas tendo-se como base, as diferentes propriedades de virulência, diferentes interações com a mucosa intestinal, distintos quadros clínicos, epidemiológicos e distintos sorotipos O:H (Levine, 1987). São eles: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), e *E. coli* Enteroaderente (EAEC). Este último subgrupo foi reclassificado como *E. coli* Enteroagregativa (EAaggEC), devido a fatores específicos de virulência e, principalmente, ao tipo de adesão apresentado por estas à células Hep-2 em cultura (Savarino, 1993).

Dentre estes subgrupos as *E. coli* do tipo ETEC e EPEC estão entre os principais causadores de infecções diarreicas, em diferentes mamíferos, principalmente em regiões subdesenvolvidas (Levine, 1987).

Linhagens de ETEC apresentam a capacidade de produzir dois tipos de toxinas chamadas termo-lábil (LT) e termo-estável (ST). Estas toxinas formam grupos heterogêneos sendo a toxina LT subdividida nos tipos LT-I e LT-II, o mesmo acontecendo com a toxina ST, subdividida em ST-I e ST-II (Betley et al., 1986).

A toxina LT-I apresenta similaridade à toxina colérica (CT) produzida por *Vibrio cholerae* em seqüência de nucleotídeos, estrutura e modo de ação (Betley et al., 1986). Ambas toxinas apresentam atividade de ADP-ribosil-transferase, que causa a ativação da adenilato ciclase associada à membrana. Estas toxinas são compostas por dois tipos de subunidades, chamadas **A** e **B**. Na formação da holotoxina, 5 subunidades **B** estão ligadas não covalentemente a uma subunidade **A** (Spangler, 1992). A subunidade **B** apresenta receptores que reconhecem e ligam a holotoxina a glicoproteínas presentes na superfície de células da mucosa intestinal (Spangler, 1992). Uma vez ligadas à membrana, a subunidade **A** é transportada para o citoplasma celular, por um processo ainda não bem caracterizado (Spangler, 1992). Este processo é acompanhado pela proteólise da subunidade **A**, formando os polipeptídios **A1** e **A2**. O polipeptídio **A1**, que apresenta a atividade catalítica de ADP-ribosil-transferase é, por isso, capaz de ativar a adenilato ciclase. A ativação de adenilato ciclase leva ao aumento na concentração de AMPc, o qual está relacionado a um desbalanço no transporte de íons através da membrana citoplasmática, ao refluxo de água da célula para a luz intestinal e, conseqüentemente, à diarréia observada após infecções por ETEC ou *V. cholerae*. As toxinas LT-I e CT são altamente imunogênicas e anticorpos anti-LT ou CT são capazes de conferir proteção contra infecções por ETEC ou *V. cholerae* (Levine & Kapper, 1993).

A toxina ST-I está, também, subdividida em dois subtipos, ST-Ip e ST-Ih, produzidos por amostras de ETEC de origem suína ou humana, respectivamente. Estas são polipeptídios pequenos de 18 (ST-Ip) ou 19 (ST-Ih) aminoácidos que apresentam a capacidade de ativar a Guanil ciclase (Field et al., 1978). A ativação da Guanil ciclase leva ao aumento na concentração de GMP cíclico (GMPc) intracelular e a um desbalanço no transporte de íons através da membrana citoplasmática causando, assim, o refluxo de água para a luz intestinal e a conseqüente diarréia (Field et al., 1978). Por ser um pequeno polipeptídio, a toxina ST é fracamente imunogênica mas, quando acoplada a proteínas carregadoras, pode tornar-se imunogênica (Clements, 1990). Uma série de trabalhos descrevem a construção de proteínas híbridas entre a subunidade **B** da toxina LT ou CT (LT_B ou CT_B) e a toxina ST, utilizando técnicas de Biologia Molecular. Em alguns destes, a resposta imunológica contra ambas toxinas foram descritas (Clements, 1990; Aitken & Hirst, 1993; Nashar et al., 1993). Mais recentemente, Clements & Cárdenas (1993b) descreveram a expressão de um gene híbrido entre LT_B e ST em linhagem atenuada de *Salmonella dublin*. Neste trabalho, anticorpos contra LT_B mas não

contra ST foram detectados por ELISA, embora atividade de neutralização contra o efeito biológico de ST estivesse presente no soro de animais imunizados.

Um outro importante fator de virulência apresentado por amostras de ETEC é a produção de adesinas, que podem ser fímbrias ou não e são, por isto, denominadas fatores de colonização. Estas adesinas conferem a estas bactérias a capacidade de reconhecer receptores, aderir e colonizar a mucosa intestinal, resistindo aos movimentos peristálticos de limpeza do intestino (Moon, 1990). Diferentes fímbrias já foram descritas em amostras de ETEC de diferentes origens animais e uma das principais características destas estruturas protéicas é conferir à célula bacteriana, especificidade com relação ao tipo de hospedeiro infectado (Moon, 1990). Esta especificidade é devida ao tipo de receptor celular reconhecido pela subunidade estrutural da fímbria.

A expressão, regulação, secreção, ancoragem e montagem da subunidade estrutural das fímbrias na superfície da célula bacteriana é realizada por fatores protéicos codificados por genes geralmente associados fisicamente, formando *operons* (Moon, 1990).

A capacidade de invasão de células da mucosa intestinal não é, em essência, um fator de patogenicidade de ETEC. Entretanto, dois *loci* gênicos chamados *tia* e *tib*, recentemente descritos, conferem a estes microrganismos a capacidade de invadir células epiteliais intestinais provenientes, principalmente, da porção ileocecal e do cólon humano (Elsinghorst et al., 1989; Elsinghorst & Kopecko, 1992). Estes *loci* parecem estar presentes exclusivamente em linhagens de ETEC mas a importância destes para a patogenicidade, se existe alguma, está ainda por ser determinada (Elsinghorst & Weitz, 1994).

Tanto as fímbrias como as toxinas LT e ST, esta última quando acoplada a proteínas carregadoras, são imunogênicas e vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de vacinas contra infecções diarréicas causadas por ETEC (Walker, 1992). Anticorpos anti-LPS também são importantes na imunização de animais contra estas infecções. Considera-se uma vacina ideal, aquela que expresse o maior número possível de epítomos ou estruturas antigênicas, encontradas em diferentes isolados de ETEC. Desta forma, o principal problema encontrado para o desenvolvimento de vacinas efetivas contra infecções diarréicas causadas por este grupo de microrganismos é a existência de diferentes tipos de fímbrias e sorotipos O:H, imunogenicamente distintos, entre as diversas linhagens.

2.7. *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae é o agente etiológico causador da cólera, uma grave infecção intestinal diarréica em humanos, que ocorre principalmente em áreas subdesenvolvidas (Manning, 1992; Levine & Kapper, 1993). Um dos principais fatores de virulência de *V. cholerae* é a produção da toxina colérica (CT) que, como já mencionado, apresenta similaridade à toxina LT, produzida por algumas amostras de ETEC (Betley et al., 1986). Além de CT foram descritas em *V. cholerae* outras duas enterotoxinas que possivelmente contribuem com a virulência. A toxina ZOT (“zonula occludens toxin”), descrita por Baudry et al. (1992), afeta a estrutura das junções intercelulares diminuindo assim a resistência do tecido intestinal. A toxina ACE (“accessory cholera enterotoxin”), que apresenta similaridade com ATPases de células eucarióticas, parece estar ligada com a secreção de fluidos para a luz intestinal (Trucksis et al., 1993). Interessante é a localização dos genes CT, ZOT e ACE, além do gene *cep* (“core encoded pilin”), que codifica para uma pilina, em um fragmento de DNA de 4,5 kb chamado “core” de virulência. Este fragmento, por sua vez, é flanqueado por duas ou mais cópias de uma seqüência repetitiva, chamada RS1 (Pearson et al., 1993). Algumas evidências sugerem que a seqüência RS1 codifica um sistema de recombinação sítio específica (Pearson et al., 1993) existindo assim a possibilidade de transferência e integração do “core” de virulência para outras linhagens de *V. cholerae*, por recombinação sítio específica.

Como outras enterobactérias, *V. cholerae* apresenta a capacidade de aderir e colonizar a mucosa intestinal. Esta capacidade é conferida pela produção de fímbrias ou adesinas. Diferentes tipos de adesinas foram descritos em diferentes linhagens de *Vibrio cholerae*, dentre estas estão diferentes hemaglutininas e proteínas de membrana externa (Manning, 1992). Recentemente, Sperandio et al. (1995) clonaram o gene *ompU* de *V. cholerae* e identificaram-no como um importante fator de colonização. A principal pilina identificada em linhagens patogênicas de *Vibrio cholerae* é Tcp (toxin co-regulated pili). Esta pilina tem sido identificada como um importante fator de virulência (Herrington et al., 1988).

Os diferentes fatores de virulência em *Vibrio cholerae*, como na maioria das bactérias enteropatogênicas, são finamente regulados. Um destes regulons é composto pela proteína regulatória ToxR. Esta proteína, localizada na membrana interna, faz parte da família de sensores-ativadores transcricionais que ativam a expressão de diferentes genes em determinadas condições ambientais (Gross et al., 1989). Na presença de

fatores ambientais específicos, encontrados principalmente “in vivo”, ToxR em interação com uma outra proteína regulatória, ToxS, ativa a expressão de diferentes fatores de virulência, dentre estes a toxina colérica, o operon *tcp* (revisado por DiRita, 1992), e a proteína OmpU (Sperandio et al., 1995). Um outro ativador transcricional, ToxT, responsável pela ativação de alguns fatores de virulência, também apresenta sua transcrição controlada por ToxR (DiRita, 1992; 1994).

Willians et al. (1993) demonstraram que a proteína HlyU, a qual regula positivamente a expressão do gene *hlyA*, que codifica para uma hemolisina em *V. cholerae* biotipo El Tor, parece também controlar a expressão de outros genes importantes para a virulência, ainda não identificados. O gene *hlyU* pode, portanto, formar um outro *regulon* de virulência em *V. cholerae* (DiRita, 1994).

Diferentes vacinas, parenterais ou orais, compostas de toxóides, extratos de LPS, ou de vibriões mortos ou vivos atenuados, foram propostos e testados como vacinas na imunização contra *V. cholerae* (Levine & Kapper, 1993). Destes estudos, ficou demonstrado que vacinas orais são mais efetivas na indução de resposta imunológica protetora (Levine & Kaper, 1993; Manning, 1992). Desta forma, esforços foram concentrados no desenvolvimento de vacinas orais mortas ou vivas atenuadas.

Triagens conduzidas em Bangladesh, durante três anos, para avaliar a efetividade de vacinas compostas por vibriões mortos (WCV) ou por uma combinação de vibriões mortos e 1 mg da subunidade B da toxina CT (CT_B), evidenciaram a baixa efetividade destas, cerca de 50%, na proteção contra infecções causadas por *V. cholerae*, embora, em muitos dos indivíduos imunizados, a proteção tenha sido de longa duração (Clements et al., 1990). Estes resultados encorajaram alguns laboratórios a desenvolverem linhagens vivas atenuadas. Inicialmente, tais vacinas eram, quase invariavelmente, baseadas no desenvolvimento de linhagens de *V. cholerae* contendo deleções no gene codificador da subunidade A da toxina CT (CTX_A), a subunidade catalítica. A linhagem CVD 103-HgR, derivada da linhagem 569B de biotipo Clássico foi, dentre as linhagens atenuadas desenvolvidas e testadas, a menos reatogênica (Levine & Kaper, 1993). Esta linhagem foi desenvolvida através da deleção de 94% da seqüência codificadora de CTX_A. Subseqüentemente, para facilitar o isolamento e identificação da linhagem vacinal no meio ambiente, um gene que confere resistência ao mercúrio foi inserido no *locus hlyA* (Levine et al., 1988). Embora bem tolerada, pouco reatogênica e altamente efetiva contra infecções causadas por *V. cholerae* biotipo Clássico, esta linhagem foi menos efetiva na proteção contra infecções causadas por *V. cholerae*

biotipo El Tor (cerca de 60%) (Levine et al., 1988). Na tentativa de desenvolvimento de linhagens atenuadas, biotipo El Tor, um problema freqüentemente encontrado foi a alta reatogenicidade, mesmo quando em adição à deleção do gene *ctxA*, os genes *zot* e *ace* foram deletados (Tacket et al., 1993). Estes resultados indicam a existência de outros fatores de virulência produzidos por linhagens patogênicas de *V. cholerae*, ainda não identificados ou, como sugerido por Levine et al. (1988), o próprio ato de colonizar a mucosa intestinal seria suficiente para causar a reatogenicidade observada em indivíduos vacinados.

Em 1993, foi constatada uma importante alteração na epidemiologia da cólera. Estudos epidemiológicos conduzidos na Índia e em Bangladesh descreveram a ocorrência de um grande número de infecções diarreicas, causadas por um novo sorogrupo de *V. cholerae* (Albert et al., 1993; Ramamurthy et al., 1993). Este novo sorogrupo foi designado O139 ou alternativamente “Bengal”, para indicar sua origem em região próxima à baía de Bengal, na Índia. Antes destas descrições, somente linhagens pertencentes ao sorogrupo O1 tinham sido associadas com epidemias de cólera. A rápida propagação deste sorogrupo nas populações locais, principalmente entre indivíduos adultos, em regiões endêmicas para *V. cholerae* O1, indicaram que a imunidade contra este último sorogrupo não era efetiva na proteção contra infecções causadas pelo novo sorogrupo O139 assim como todas as linhagens vacinais contra cólera previamente descritas (Albert et al., 1994). Desta forma, existe a necessidade do desenvolvimento de novas linhagens vacinas pertencentes ao sorogrupo O139.

Recentemente, Waldor & Mekalanos (1994) descreveram a construção da linhagem vacinal “Bengal 3”, pertencente ao sorogrupo O139. Nesta linhagem, toda a seqüência de DNA contendo o “core” de virulência e as seqüências RS1 foram deletadas, eliminando assim a possibilidade de reaquisição destes fatores de virulência por recombinação sítio específica. Além disso, esta linhagem foi manipulada molecularmente para conter deleção no gene *recA* e, paralelamente, expressar a subunidade B de CT a partir do promotor *htpG*, induzido em condições de “stress”. A mutação em *recA* diminui, efetivamente, a possibilidade de reaquisição, por recombinação homóloga, de genes de virulência e diminui, ainda, a possibilidade de sobrevivência da bactéria recombinante no meio ambiente. Mutantes *recA*⁻ são mais sensíveis à luz ultra-violeta.

2.8. A Toxina LT-K63

Durante muito tempo, acreditou-se que a grande maioria dos anticorpos neutralizantes contra a toxina termo-lábil (LT-I) e a toxina colérica (CT) fossem dirigidos contra a subunidade B, sendo a subunidade A fracamente imunogênica. Desta forma, na formulação de vacinas contra ETEC ou *V. cholerae* foi utilizada, quase invariavelmente, a subunidade B, não tóxica (Levine & Kapper, 1993). Recentemente, Pizza et al. (1994a), contrariamente aos resultados anteriores descritos na literatura, determinaram que 25% dos anticorpos neutralizantes contra a toxina LT-I eram dirigidos contra a subunidade A. Resultados similares foram obtidos quando um mutante da toxina colérica, o mutante CT-K63, foi utilizado (Fontana et al., 1995). A discrepância destes estudos com os resultados previamente descritos está associada à utilização ou não do adjuvante de "Freund" nos esquemas de imunização com a toxina purificada. De fato, quando este adjuvante não é utilizado observa-se um aumento na quantidade de anticorpos dirigidos contra a subunidade A (Pizza et al., 1994a; Fontana et al., 1995).

A construção de uma série de mutantes para a subunidade A, não tóxicos, foram descritos tanto para LT-I como para CT (Pizza et al., 1994b; Fontana et al., 1995). Dentre estes, os mutante *lt-k63* e *ct-k63*, onde o resíduo de serina 63 foi substituído por lisina, foram altamente estáveis e imunogênicos (Pizza et al., 1994a; Fontana et al., 1995). A inclusão dos mutante LT-K63 e CT-K63 na formulação de vacinas preexistentes contra ETEC ou cólera, poderá aumentar a eficácia das mesmas (Rino Rappuoli, comunicação pessoal). O desenvolvimento de linhagens de *V. cholerae* atenuadas e manipuladas de forma a expressar a proteína CT-K63 já está em andamento (GuanCai, dados não publicados).

As toxinas LT e CT estão entre os mais poderosos adjuvantes do sistema imunológico já descritos até o momento (Douce et al., 1995) mas a utilização para tal finalidade era restrita, pois tais toxinas exibem sua toxicidade em concentrações tão baixas quanto 5 pg/ml (Pizza et al., 1994a). O desenvolvimento de mutantes atóxicos não só permitirá o estudo dos mecanismos envolvidos neste efeito adjuvante como também permitirá o desenvolvimento de vacinas vivas que apresentem aumento em suas propriedades de indução do sistema imunológico. Os mutantes LT-K63 e CT-K63 parecem ser bons candidatos para esta finalidade. Imunizações de camundongos com LT-K63 pelas vias intra-nasal e intra-vaginal induziram resposta IgG sérica e IgA secretória contra este antígeno (Di Tommaso et al., 1996). Em adição, a imunização de

camundongos pelas mesmas vias com Ovoalbumina (Ova) somente ou Ova e LT-K63, resultaram em resultados completamente diversos (Di Tommaso et al., 1996). Grupos de camundongos imunizados somente com Ova não apresentaram resposta imunológica enquanto que camundongos imunizados com Ova e LT-K63 exibiram resposta humoral IgG sérica e IgA secretória dirigidas contra a Ova. (Di Tommaso et al., 1996). Estes resultados demonstram o potencial uso do mutante LT-K63 e possivelmente de CT-K63, como adjuvantes do sistema imunológico.

Foram descritas a construção de linhagens recombinantes atenuadas de *Salmonella* expressando a subunidade B das toxinas LT-I e CT ou fusões destas com a toxina ST (Clements & El-Morshidy, 1984; Clements et al., 1986; Cárdenas & Clements, 1993a e b). Estas linhagens são potenciais vacinas trivalentes contra infecções entéricas causadas por *Salmonella*, *E. coli* enterotoxigênicas e *V. cholerae*. A disponibilidade dos mutantes LT e CT-K63 abre uma nova perspectiva no desenvolvimento de vacinas contra tais infecções que é o desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Salmonella* que produzam, ao invés da subunidade B, a holotoxina LT ou CT-K63. Estas linhagens recombinantes teriam a vantagem de induzir resposta imunológica contra a holotoxina e contra a subunidade B. Adicionalmente, tais linhagens teriam a capacidade de produzir um potente mas não tóxico adjuvante do sistema imunológico, as proteínas LT ou CT-K63.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos: (1) caracterização molecular do sistema de minitransposon Tn5 (De Lorenzo & Timmis, 1994) na integração ao acaso de genes heterólogos no genoma das linhagens *S. typhimurium* LT2 e mutantes Δcya Δcrp Δasd de *S. typhimurium* UK1 e SR11; (2) modificação deste sistema de transposição para possibilitar a inserção estável de genes heterólogos em linhagens Δcya Δcrp Δasd de *S. typhimurium*. Esta modificação consistiu na substituição, no plasmídeo pUT/Sm, do gene de resistência à Estreptomicina pelo gene *asd* de *S. typhimurium*; (3) verificar se a toxina LT selvagem é montada corretamente em sua estrutura final AB5 quando expressa em *S. typhimurium*; (3) construção de linhagens recombinantes vacinais Δcya Δcrp de *S. typhimurium* contendo integrações ao acaso do *operon* *lt-k63* no genoma e capazes de expressar elevados níveis da toxina mutante LT-K63. Tais linhagens são modelos para estudos de imunogenicidade e desenvolvimento de vacinas; (4) Caracterização da resposta humoral em camundongos BALB/c imunizados oralmente com algumas linhagens recombinantes.

4. MATERIAL

4.1. Linhagens bacterianas e plasmídios.

As linhagens bacterianas e os plasmídios utilizados neste estudo estão relacionados nas tabelas I e II, respectivamente.

As linhagens de *E. coli* utilizadas foram a JM109, a CC118 λ pir e a SM10 λ pir. A linhagem JM109 foi utilizada para a transformação e amplificação do plasmídio pUC18 (NotI) e derivados. A linhagem CC118 λ pir foi utilizada para a transformação e amplificação do plasmídio pUT e derivados. A linhagem SM10 λ pir foi utilizada como doadora na transferência por conjugação, de plasmídios pUT quiméricos, para linhagens de *S. typhimurium*.

A linhagem *S. typhimurium* LT2 foi utilizada para a inserção genômica dos *operons* selvagens *eltAB* e *toxAB* codificadores das toxinas LT e CT, respectivamente, através da utilização do plasmídio suicida pUT/Cm.

As linhagens de *S. typhimurium* X3987, X4072, X4217 e X4550 são mutantes atenuados contendo deleções nos genes *cya*, *crp* e *asd*. Estas linhagens foram utilizadas para a inserção do *operon* mutante *lt-k63* utilizando-se o plasmídio suicida pUT/*asd*. As linhagens X3988 e X3989, gentilmente cedidas pela Dr. Maria Giusepina Covone (IRIS-Siena), foram obtidas pela transformação de X3987 com os plasmídios pYA3074:LT-K63 e pYA3137:LT-K63. Estas linhagens foram utilizadas como referência para a produção de LT-K63 em experimentos de “Western blot”.

A linhagem X3985 é um mutante $\Delta cya \Delta crp$ mas é prototrófico para Aspartato- β -semialdeído desidrogenase (Asd+). Esta linhagem foi utilizada como controle nos estudos de invasão e persistência nos tecidos de camundongos BALB/c.

Todos os fragmentos de DNA a serem subclonados no único sítio NotI dos plasmídios pUT foram primeiramente subclonados no plasmídio pUC18 (NotI). Estas subclonagens tiveram por finalidade a criação do sítio NotI nas extremidades destes fragmentos. O plasmídio pUT/Sm foi utilizado na construção do plasmídio pUT/*asd*. Neste, o gene de resistência a estreptomicina foi substituído pelo gene *asd*. O gene *asd* foi amplificado por PCR a partir do plasmídio pYA3137.

TABELA 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.

Bactéria	Genótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	F' <i>traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/ e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17(r-k-) relA1 supE44 recA1</i>	Woodcock et al., 1989
CC118λ.pir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 λ.pir phage lysogen</i>	Herrero et al., 1990
SM10λ.pir	<i>Km^r thi-1 thr leu tonA lacY supE recA1 λ.pir phage lysogen</i>	Miller and Mekalanos, 1988.
<i>S. typhimurium</i>		
LT2	Linhagem selvagem	Lilleengen, 1948.
X3985 UK-1	<i>pStV1⁺ Δcya-12 Δ[zid-62::Tn10] Δcrp-11 Δ[znb:Tn10]</i>	Curtiss et al., não publicado.
X3987 UK-1	<i>pStV1⁺ Δcya-12 Δcrp-11 ΔasdA1 Δ[zhf-4::Tn10]</i>	Curtiss et al., não publicado.
X4072 SR-11	<i>pStSR100⁻ gyrA1816 Δcya-1 Δcrp-1 ΔasdA1</i>	Nakayama et al., 1988
X4217 SR-11	<i>pStSR101⁺ gyrA1816 Δcya-1 Δcrp-1 ΔasdA1</i>	Schödel et al., 1994
X4550 SR-11	<i>pStSR100⁺ gyrA1816 Δcya-1 Δcrp-1 ΔasdA1</i>	Schödel et al., 1994
X3988	X3987 transformada com o plasmídio pYA3074:LT-K63	Covone et al., não publicado
X3989	X3987 transformada com o plasmídio pYA3137:LT-K63	Covone et al., não publicado
X3987 18A	X3987 contendo o gene <i>lt-k63</i> inserido no plasmídio pStV1	Este estudo
X4072 27F	X4072 contendo inserção cromossômica do gene <i>lt-k63</i>	Este estudo
X4217 10E	X4217 contendo o gene <i>lt-k63</i> inserido no plasmídio pStSR101	Este estudo

TABELA II: Plasmídios usados neste estudo

Plasmídios	Características	Referência
pBlue Script KS(LT)	Ap ^r , plasmídio pBlue Script com <i>operon eltAB</i> inserido entre os sítios SmaI/HindIII.	Pizza et al., 1994
pBlue Script KS(LT-K63)	Ap ^r , plasmídio pBlue Script com o <i>operon lt-k63</i> inserido entre os sítios SmaI/HindIII.	Pizza et al., 1994
pUC18 (Not I)	Ap ^r , plasmídio pUC18 contendo NotI/polylinker /NotI as MCS	Herrero et al., 1999
pYA3137	Asd ⁺ , plasmídio de expressão com origem de replicação do pUC18	Curtiss et al., publicado
pYA3074:LT-K63	Asd ⁺ , plasmídio de expressão com origem de replicação do pSC101. O <i>operon lt-k63</i> foi inserido entre os sítios BamHI/Sall.	Covone et al., publicado
pYA3137:LT-K63	Asd ⁺ , plasmídio pYA3137 com o <i>operon lt-k63</i> inserido entre os sítios BamHI/Sall.	Covone et al., publicado
pUT/Sm	Ap ^r Sm ^r , plasmídio suicida com mini-Tn5 e Sm ^r como marca de seleção	De Lorenzo et 1990
pUT/Cm	Ap ^r Cm ^r , plasmídio suicida com mini-transposon Tn5 e Cm ^r como marca de seleção	De Lorenzo et 1990
pUT/asd	Ap ^r Asd ⁺ , plasmídio suicida com mini-transposon Tn5 e Asd ⁺ como marca de seleção	Este estudo

Ap^r: Resistente à Ampicilina.

Sm^r: Resistente à Estreptomicina.

Cm^r: Resistente ao Cloranfenicol.

Asd⁺: Contêm o gene *asd* (Asparato-β-semialdeido-desidrogenase).

4.2. Meios de cultura e condições de cultivo

Todos os meios de cultura, a menos que especificado, foram preparados com água destilada e esterilizados por autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

O meio LB (“Luria Broth”) ou LA (“Luria Ágar”) (Sambrook et al., 1989) foram utilizados rotineiramente no cultivo das linhagens bacterianas.

Nos experimentos de conjugação entre *E. coli* SM10 λ pir e *S. typhimurium* LT2, as linhagens bacterianas foram cultivadas em meio NB (“Nutrient broth”).

O meio mínimo (Curtiss & Kelly, 1987) foi utilizado para a seleção de transconjugantes de *S. typhimurium* e para a verificação de diferentes marcas de auxotrofia em diferentes linhagens de *E. coli* e *S. typhimurium*. Meio mínimo contendo maltose ao invés de glicose foi utilizado para verificar a deficiência para AMP cíclico.

O meio MacConkey (DIFCO) foi utilizado para o re-isolamento de linhagens de *S. typhimurium* dos órgãos de camundongos BALB/c e na diferenciação destas de outros gêneros bacterianos lactose positivos.

O meio Ektoen (DIFCO) foi utilizado para verificar a pureza de linhagens e diferenciar *Salmonella* de outras *Enterobacteriaceae*. O princípio deste meio está na diferenciação entre bactérias produtoras ou não de H₂S. *Salmonella* sp são produtoras de H₂S (Holt et al., 1994). A combinação de tiosulfato com citrato de amônio férrico, presentes no meio, faz com que colônias bacterianas produtoras de H₂S apresentem coloração preta.

Os meios SOB e SOC foram utilizados para o crescimento das linhagens de *E. coli* em experimentos de transformação.

Os antibióticos Ampicilina (Ap), Estreptomicina (Sm), Cloranfenicol (Cm), Tetraciclina (Tc) e Ácido nalidixico (Nal), quando requeridos, foram adicionados ao meio de cultura para resultar as concentrações finais de 100µg/ml, 50µg/ml, 30µg/ml, 12,5µg/ml e 40µg/ml, respectivamente. O ácido diaminopimélico (DAP) utilizado na concentração final de 50µg/ml, foi adicionado ao meio de cultura para o cultivo de linhagens Δ asd. Para o cultivo das linhagens Δ asd de *S. typhimurium* em meio mínimo, além do DAP foram adicionados os aminoácidos L-Isoleucina (20µg/ml), DL-Metionina (20µg/ml) e DL-Treonina (80µg/ml), nas concentrações finais indicadas.

4.2.1. Meio LB ("Luria Broth") (Sambrook et al., 1989).

Triptona (DIFCO).....	10g
Extrato de Levedura (DIFCO).....	5g
NaCl (MERCK).....	10g
Água destilada q.s.p.....	1000ml

Os solutos foram dissolvidos em 800ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH (10N). O volume foi completado para 1000ml com água destilada. O meio foi distribuído em frascos, nos volumes apropriados, e esterilizado por autoclavagem.

4.2.2. Meio LA ("Luria Ágar")

Ao meio LB foi adicionado 1,5% de ágar (DIFCO) como descrito em Sambrook et al. (1989). Este meio foi esterilizado por autoclavagem e distribuído em placas.

4.2.3. Meio LB modificado (Curtiss & Kelly, 1987)

Este meio foi feito adicionando-se 0,1% de glicose (concentração final) ao meio LB, após este ter sido autoclavado.

4.2.4. Meio Mínimo Ágar (Curtiss & Kelly, 1987).

Solução de sais de meio mínimo.....	100,0ml
Solução de MgCl ₂ (1M).....	0,4ml
Solução de glicose 20%.....	10,0ml
Água destilada q.s.p.....	1000,0ml

A 890ml de água destilada contendo 1,5% de ágar (DIFCO), esterilizada por autoclavagem e resfriada a 50°C, foram adicionadas as soluções de sais de meio mínimo, de cloreto de magnésio e de glicose, nos volumes indicados. Com exceção da

solução de glicose, esterilizada por filtração, as demais soluções foram esterilizadas por autoclavagem. Após homogeneização, o meio foi distribuído em placas de "Petri".

4.2.5. Solução de sais de meio mínimo

NH ₄ Cl.....	50g
NH ₄ NO ₃	10g
Na ₂ SO ₄	20g
K ₂ HPO ₄	90g
KH ₂ PO ₄	30g
Água destilada q.s.p.....	1000ml

Após a completa dissolução dos sais em 700ml de água destilada, o pH foi determinado e se necessário ajustado para 6,8-6,9 com NaOH. O volume da solução foi completado para 1000ml com água destilada, distribuído em volumes de 100ml, e autoclavado.

4.2.6. Meio NB- "Nutrient broth" (DIFCO)

Este meio foi preparado dissolvendo-se 8g de meio NB (em pó) em 900ml de água destilada. Após completa dissolução, o volume foi completado para 1000 ml com água destilada, dispensado em erlenmeyers nos volumes apropriados e esterilizado por autoclavagem.

4.2.7. Meio MacConkey-Ágar (DIFCO)

Este meio foi preparado dissolvendo-se em 800ml de água destilada, 50g de meio em pó. Após completa dissolução, o volume foi completado para 1000ml com água destilada, distribuído em volumes de 100 a 500ml e esterilizado por autoclavagem.

4.2.8. Meio Ektoen (DIFCO)

Este meio foi preparado dissolvendo-se em 800ml de água destilada, 76g do meio em pó. A mistura foi aquecida e mantida a 80°C, com agitação branda, para a completa dissolução. Após dissolução, o meio foi vertido em placas esterilizadas e utilizado após solidificação. Este meio não deve ser autoclavado.

4.2.9. Meio SOB (Sambrook et al., 1989).

Triptona.....	20,0g
Extrato de Levedura.....	5,0g
Cloreto de Sódio.....	0,5g
Solução de KCl (250mM).....	10,0ml
Água destilada q.s.p.....	1000,0ml

Após a completa dissolução dos solutos em 900ml de água destilada, foi adicionada a solução de KCl no volume indicado. O pH foi ajustado para 7,0 com solução 10N de NaOH. O volume foi completado para 1000ml com água deionizada e o meio foi esterilizado por autoclavagem. Momentos antes do uso, 5ml de solução 2M de MgCl₂ foram adicionados.

4.2.10. Meio SOC (Sambrook et al., 1989).

Para a preparação do meio SOC foi adicionada glicose, na concentração final de 20mM, ao meio SOB. Esta concentração foi alcançada adicionando-se a 1000ml de meio SOB, 5 ml de uma solução 1M de glicose.

4.3. Soluções de uso geral

Estas soluções foram preparadas com água deionizada e, quando necessário, foram esterilizadas por autoclavagem ou filtração, conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

4.3.1. Solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 10N.

NaOH.....4g
Água deionizada q.s.p.....100ml.

As pastilhas de NaOH foram dissolvidas em 80ml de água deionizada. O volume foi completado com água deionizada para 100ml e a solução foi conservada à temperatura ambiente.

4.3.2. Solução de Ácido Clorídrico (HCl) 10N.

HCl concentrado.....862ml
Água deionizada q.s.p.....1000ml

Após homogeneizada, esta solução foi conservada à temperatura ambiente.

4.3.3. Solução tampão fosfato-salina (PBS) 10X.

NaCl.....80,0g
KCl.....2,0g
Na₂HPO₄.....14,4g
KH₂PO₄.....2,4g
Água deionizada q.s.p.....1000,0ml

Os sais foram dissolvidos em 800ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl 10N e o volume ajustado para 1000ml. Esta solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada à temperatura ambiente.

4.3.4. Solução tampão fosfato de sódio pH7,5.

Solução 1M de Na ₂ HPO ₄	80,9ml
Solução 1M de NaH ₂ PO ₄	19,1ml

As soluções de Na₂HPO₄ e de NaH₂PO₄ foram preparadas e autoclavadas separadamente. Estas foram então misturadas nos volumes indicados, homogeneizadas e dispensadas em frascos esterilizados. Esta solução tampão foi conservada a 4°C.

4.4. Soluções para Biologia Molecular

Preparadas conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

4.4.1. Solução tampão Tris-HCl 1M pH 8,0.

Trisma-base (MERCK).....	121,1g
Água deionizada q.s.p.....	1000,0ml

O trisma-base foi dissolvido em 800ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 8,0 com solução 10N de HCl. O volume foi completado para 1000ml com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada a 4°C.

4.4.2. Solução de Tris-HCl 1M pH 7,5

Trisma-base (MERCK).....	12,11g
Água deionizada q.s.p.....	100,00ml

O trisma-base foi dissolvido em 80ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 7,5 com solução de HCl 10N. O volume foi completado para 100ml com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada a 4°C.

4.4.3. Solução tampão Tris-HCl 1M pH 6,8

Trisma-base (MERCK).....121,1g
Água deionizada q.s.p.....1000,0ml

O trisma-base foi dissolvido em 800ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 6,8 com solução de HCl 10N. O volume foi completado para 1000ml com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada a 4°C.

4.4.4. Solução de Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) 0,5M pH8,0

EDTA.....186,12g
Água deionizada q.s.p.....1000,00ml

O EDTA foi dissolvido em 800ml de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com solução de NaOH 10N. O volume foi completado para 1000ml com água deionizada. A solução foi distribuída em volumes de 200 a 500ml, esterilizada por autoclavagem e conservada a 4°C.

4.4.5. Solução Tampão T.E pH 8,0 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA).

Solução 1M Tris-HCl pH 8,0.....1,0ml
Solução 0,5M EDTA pH 8,0.....0,2ml
Água deionizada q.s.p.....100,0ml

Após a mistura de todos os compostos, esta solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada a 4°C.

4.4.6. Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 20%.

SDS.....20g
Água deionizada q.s.p.....100ml.

O SDS foi dissolvido com agitação sob aquecimento em 50ml de água deionizada. Após a completa dissolução, o volume foi completado para 100ml com água deionizada e a solução conservada à temperatura ambiente.

4.4.7. Solução de Etanol a 70%

Etanol PA (MERCK).....70ml
Água deionizada q.s.p.....30ml

Esta mistura foi homogeneizada por agitação e conservada a -20°C.

4.4.8. Solução de fenol saturado com tampão Tris-HCl (0,1M) pH 8,0

Fenol ultrapuro (MERCK) equilibrado a pH 8,0.....1000,00ml
Solução de Tris-HCl (0,1M) pH 8,0.....100,00ml
 β -mercaptoetanol.....0,02mg
Hidroxiquinoleína.....1,00g

Esta solução foi preparada conforme descrito por Sambrook et al. (1989).

4.4.9. Solução de brometo de etídio (SIGMA) a 10mg/ml.

Brometo de etídio.....100mg
Água deionizada q.s.p.....10ml

Após a completa dissolução do brometo de etídio em 8ml de água deionizada, o volume foi completado para 10ml com água deionizada e a solução mantida a 4°C em frasco escuro ou envolto em papel alumínio.

4.4.10. Solução estoque de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside (X-gal) a 20mg/ml.

X-gal.....	20mg
Dimetilforfamida.....	1ml

Após dissolução do X-gal em dimetilformamida, esta solução foi distribuída em alíquotas de 200 μ l, em tubos de microcentrífuga envoltos com papel alumínio. As alíquotas foram conservadas a -20°C.

4.4.11. Solução estoque de isopropil- β -D-galactoside (IPTG) a 20mg/ml.

IPTG.....	0,2g
Água deionizada q.s.p.....	10,0ml

Após a completa dissolução do IPTG em 8ml de água deionizada, o volume foi completado para 10ml com água deionizada. A solução foi esterilizada por filtração, dividida em alíquotas de 1ml, e estocada a -20°C.

4.4.12. Solução de proteinase K a 20mg/ml.

Proteinase K (SIGMA).....	20mg
Água deionizada q.s.p.....	1ml

A proteinase K foi dissolvida em água deionizada esterilizada, na concentração e volumes indicados e estocada a -20°C.

4.4.13. Solução PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) 0,1M

PMSF (SIGMA).....	17,4mg
Álcool Isopropanol.....	1,0ml

Após a dissolução do PMSF em isopropanol, a solução foi estocada a -20°C.

4.4.14. Solução de Ribonuclease A (RNAase A) a 10mg/ml.

RNAase A.....	10mg
Solução 10mM Acetato de sódio pH5,2.....	1ml

A RNAase A foi dissolvida em 0,9ml de solução de acetato de sódio 10mM pH5,2. A solução foi aquecida a 100°C, em banho maria, por 15 minutos e deixada esfriar à temperatura ambiente. O pH foi ajustado com 0,1ml de solução 1M de Tris-HCl pH7,4 e a solução conservada a -20°C.

4.5. Soluções para extração de plasmídios em pequena escala ("Mini-preps")

A menos que especificado, estas soluções foram preparadas conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

4.5.1. Solução I (25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM glicose e 4mg/ml de Lisozima).

Solução Tris-HCl (1M) pH 8,0.....	2,5ml
Solução de EDTA (0,5M) pH 8,0.....	2,0ml
Solução de glicose (1M).....	5,0ml
Água deionizada q.s.p.....	100,0ml

Após completa homogeneização, esta solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4°C. Lisozima, na concentração final de 4mg/ml, foi adicionada momentos antes do uso.

4.5.2. Solução II (0,2N de NaOH e 1% de SDS).

Solução de NaOH (10N).....2ml
Solução de SDS a 20%.....5ml
Água deionizada q.s.p.....100ml
Esta solução foi preparada momentos antes do uso.

4.5.3. Solução III (3M de potássio e 5M de acetato)

Solução de acetato de potássio (5M).....60,0ml
Ácido acético glacial.....11,5ml
Água deionizada q.s.p.....28,5ml

Após completa homogeneização, esta solução foi conservada a 4°C.

4.5.4. Solução de fenol ácido (Rappuoli et al., não publicado).

Fenol ultrapuro (MERCK).....500ml
Acetato de sódio 50mM.....50ml

O fenol foi liquefeito por aquecimento a 68°C e então 500ml de fenol foram misturados com 500ml de solução 50mM de acetato de sódio pH 4,0. A mistura foi mantida sob agitação constante por um período de 1 hora e depois mantida em repouso para a formação das fases aquosa e fenólica. A fase aquosa foi dispensada e o processo de homogeneização-equilíbrio repetido por mais três vezes ou até o pH da fase fenólica ser igual a 4,0. Após extração da ultima fase aquosa, 50ml de solução 50mM de acetato de sódio pH 4,0 foram adicionados. Esta solução foi então distribuída em

volumes de 50ml, em frascos escuros ou envoltos com papel alumínio e conservada a 4°C.

4.6. Soluções para Extração de plasmídios em grande escala ("Maxi-prep")

Estas soluções foram preparadas conforme descrito no livro de protocolos do "Istituto Ricerche Immunobiologiche Siena"-IRIS-Itália (Rappuoli et al., não publicado).

4.6.1. Solução I (50mM Tris-HCl pH 8,0; 25% Sacarose).

Solução de Tris-HCl (1M) pH 8,0.....	5ml
Sacarose.....	25g
Água deionizada q.s.p.....	100ml

Esta solução foi esterilizada por filtração e conservada a 4°C.

4.6.2. Solução II (2% Triton X-100; 63mM EDTA; 50mM Tris-HCl pH 8,0).

Solução Triton X-100 (MERCK).....	2,0ml
Solução de EDTA (0,5M) pH8,0.....	12,6ml
Solução de Tris-HCl (1M) pH8,0.....	5,0ml
Água deionizada q.s.p.....	100,0ml

Após completa homogeneização, esta solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada a 4°C.

4.6.3. Solução de Lisozima a 10mg/ml (10mg/ml de Lisozima; 250mM de Tris-HCl pH8,0).

Lisozima.....	100,0mg
Solução de Tris-HCl (1M).....	2,5ml

Água deionizada q.s.p.....10,0ml

A lisozima foi dissolvida em 8ml de água deionizada contendo 2,5ml de solução 1M de Tris-HCl pH8,0 (250mM final). O volume foi então completado para 10ml com água deionizada. Esta solução, preparada momentos antes do uso, foi esterilizada por filtração.

4.6.4. Solução de Isopropanol (50%) saturado com NaCl (1M) e água.

Isopropanol.....400ml

Solução de NaCl (4M).....200ml

Água deionizada.....200ml

O isopropanol foi inicialmente saturado com água deionizada e posteriormente com NaCl. A mistura foi homogeneizada por agitação durante 10 minutos e depois mantida em repouso para a formação das duas fases. Esta solução foi armazenada à temperatura ambiente.

4.7. Soluções para Extração de DNA genômico (Rossolini et al., 1993).

4.7.1. Solução de suspensão (20% Sacarose; 50mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM EDTA)

Sacarose.....20g

Solução de Tris-HCl (1M) pH 8,0.....5ml

Solução de EDTA (0,5M) pH 8,0.....10ml

Água deionizada q.s.p.....100ml

Em 45ml de água deionizada foram adicionados os volumes requeridos de Tris-HCl e EDTA. Após a homogeneização desta solução, a sacarose foi adicionada e completamente dissolvida por agitação. O volume desta solução foi completado para

100ml com água deionizada e esta foi esterilizada por filtração. A solução foi distribuída em volumes de 10ml e conservada a 4°C.

4.7.2. Solução de lise (50mM NaCl; 1% Sarcosil de sódio; 50µg/ml proteinase K)

Solução de NaCl (5M).....	1,00ml
Solução de sarcosil de sódio a 35%.....	2,86ml
Água deionizada q.s.p.....	100,00ml

Esta solução foi esterilizada por autoclavagem. Somente momentos antes do uso, no volume total a ser utilizado, a proteinase K foi adicionada, na concentração final de 50µg/ml, a partir de uma solução estoque de 20mg/ml.

4.8. Soluções para Transformação Bacteriana (Hanahan, 1985).

4.8.1. Solução de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 0,1M

MgCl ₂ .6H ₂ O.....	10,17g
Água deionizada q.s.p.....	500,00ml

Após a completa dissolução do MgCl₂ em 450ml de água deionizada, o volume foi completado para 500ml com água deionizada. A solução foi distribuída em volumes de 125ml e esterilizada por autoclavagem. Esta solução foi conservada a 4°C.

4.8.2. Solução de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) 0,1M

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	7,35g
Água deionizada q.s.p.....	500,00ml

Após a completa dissolução do CaCl₂ em 450ml de água deionizada, o volume foi completado para 500ml com água deionizada, distribuído em volumes de 125ml e esterilizado por autoclavagem. Esta solução foi conservada a 4°C.

4.8.3. Solução de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) 0,1M com glicerol

CaCl ₂	1,47g
Glicerol.....	15,00ml
Água deionizada q.s.p.....	100,00ml

O CaCl₂ foi dissolvido completamente em 70ml de água deionizada e 15ml de glicerol foram adicionados. O volume foi completado para 100ml com água deionizada, distribuída em volumes de 25ml e a solução esterilizada por autoclavagem. Esta solução foi conservada a 4°C.

4.9. Soluções para Eletroporação de Bactérias (Fiedler & Wirth, 1988).

4.9.1. Solução tampão HEPES 1mM.

Solução tampão HEPES 1M (MERCK) pH 7,0.....	1ml
Água deionizada.....	1000ml

Após ser homogeneizada, esta solução foi esterilizada por filtração e conservada a 4°C.

4.9.2. Solução de Glicerol a 10%.

Glicerol (MERCK).....	100ml
Água deionizada q.s.p.....	1000ml

Após completa homogeneização, esta solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada a 4°C.

4.10. Soluções para hibridação de colônias bacterianas usando sondas radioativas (Sambrook et al., 1989).

4.10.1. Solução de desnaturação (1,5M NaCl; 0,5M NaOH)

NaCl.....	17,53g
NaOH.....	4,00g
Água deionizada q.s.p.....	200,00ml

Os solutos foram dissolvidos em 150ml de água deionizada. Após completa dissolução, o volume foi completado para 200ml com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada em frascos plásticos a 4°C.

4.10.2. Solução de neutralização (1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl pH 7,5).

NaCl.....	17,53g
Solução Tris-HCl (1M) pH 7,5.....	100,00ml
Água deionizada q.s.p.....	200,00ml

O NaCl foi dissolvido em 50ml de água deionizada e 100ml da solução Tris-HCl foram adicionados. O volume foi completado para 200ml com água deionizada e a solução, após autoclavagem, foi conservada a 4°C.

4.10.3. Solução de SSC ("Standard saline citrate") concentrada 2X

Solução estoque de SSC 20X.....	20ml
Água deionizada q.s.p.....	200ml

Após homogeneizada, esta solução foi autoclavada e conservada a temperatura ambiente.

4.11. Soluções para detecção de colônias produtoras de LT-K63 usando anticorpos (Lyons & Nelson, 1984).

4.11.1. Solução de desnaturação (1% SDS; 0,2N NaOH).

Solução de SDS a 20%.....	5ml
Solução 10N de NaOH.....	2ml
Água deionizada q.s.p.....	100ml

O NaOH foi dissolvido em 90ml de água deionizada esterilizada e o SDS foi adicionado. O volume foi completado para 100ml com água deionizada esterilizada e a solução conservada à temperatura ambiente.

4.11.2. Solução neutralizadora (10mM tampão Fosfato de sódio pH7,5, 140mM NaCl, 0,05% Tween 20).

Solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH7,5.....	100,0ml
NaCl.....	8,18g
Tween 20.....	0,5ml
Água deionizada q.s.p.....	1000,0ml

Em 800ml de água deionizada foram adicionados o NaCl e a solução tampão fosfato. Após completa dissolução do NaCl, Tween 20 foi adicionado e o volume completado para 1000ml com água deionizada. A solução foi dispensada em volumes de 200ml, autoclavada e conservada a 4°C.

4.11.3. Solução tampão PBS com 0,1% de Triton X-100

Solução tampão PBS 10X.....	10,0ml
Triton X-100 (MERCK).....	0,1ml
Água deionizada q.s.p.....	100,0ml

O PBS e o Triton X-100 foram homogeneizados em 80ml de água deionizada esterilizada e o volume completado para 100ml com água deionizada. Esta solução foi preparada em frascos esterilizados momentos antes do uso.

4.11.4. Solução tampão de pré-coloração (50mM Tris-HCl pH 6,8).

Solução de Tris-HCl (1M) pH 6,8.....	10ml
Água deionizada.....	190ml

Esta solução após ser homogeneizada foi conservada a 4°C.

4.11.5. Solução de coloração

Solução Tris-HCl (50mM) pH6,8.....	20ml
Solução de 4-cloro-1-naftol a 0,3%.....	5ml
Água oxigenada 30% (MERCK).....	7µl

Os compostos foram adicionados na ordem indicada. A solução de 0,3% de 4-cloro-1-naftol foi preparada dissolvendo-se 30mg deste composto em 10ml de metanol. Todas estas soluções foram preparadas momentos antes do uso.

4.12. Soluções para eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Sambrook et al., 1989).

4.12.1. Tampão de amostra 4X (8% SDS; 20% β-mercaptoetanol; 40% Glicerol; 250mM Tris-HCl pH 6,8; 1mg de Azul de bromofenol).

SDS (MERCK).....	0,80g
β-mercaptoetanol.....	2,00ml
Glicerol.....	4,00ml
Tris-HCl (1M) pH 6,8.....	2,50ml

água deionizada q.s.p.....10,00ml
Azul de bromofenol.....0,001g

Sob capela, o SDS foi dissolvido em 2,5ml de Tris-HCl e 2ml de β -mercaptoetanol. Em seguida, foram adicionados 4ml de glicerol e o volume completado para 10ml com água deionizada. A seguir, foi adicionado o azul de bromofenol, "adi libitum". A solução foi conservada a 4°C em tubos de propileno envoltos com papel alumínio. Momentos antes do uso, esta solução foi aquecida a 60°C para a completa ressuspensão dos solutos.

4.12.2. Solução de acrilamida e bis-acrilamida (30% Acrilamida; 0,8% Bis-Acrilamida).

Acrilamida (Pharmacia ou MERCK).....30,0g
Bis-acrilamida (Pharmacia ou MERCK).....0,8g
Água deionizada q.s.p..... 100,0ml

Após a completa dissolução dos solutos em 80ml de água deionizada, a solução foi filtrada em papel de filtro e armazenada a 4°C em recipientes de vidro envoltos com papel alumínio.

4.12.3. Solução tampão Tris-HCl (1,876M) pH 8,8 para gel de separação

Trisma base.....227,18g
Água deionizada q.s.p..... 1000,00ml

O Trisma foi dissolvido em 700ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 8,8 com solução 10N de NaOH. O volume foi completado para 1000ml com água deionizada, a solução foi distribuída em volumes de 200ml, autoclavada e conservada a 4°C.

4.12.4. Solução tampão Tris-HCl (0,6M) pH 6,8 para o gel de empacotamento.

Trisma base.....77,76g
Água deionizada q.s.p.....1000,00ml

O Trisma foi dissolvido em 700ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 6,8 com solução 10N de NaOH. O volume foi completado para 1000ml com água deionizada, a solução dividida em volumes de 200ml, autoclavada e conservada a 4°C.

4.12.5. Solução de persulfato de amônio a 10%

Persulfato de amônio (MERCK).....1g
Água deionizada q.s.p.....10ml

Esta solução foi mantida em tubos de propileno, a 4°C, por até um mês.

4.12.6. Solução tampão de corrida (25mM Trisma; 192mM Glicina; 0,1% SDS).

Trisma base.....6,0g
Glicina.....28,8g
SDS 20%.....10,0ml
Água destilada q.s.p.....1000,0ml

Os solutos foram completamente dissolvidos em 1000ml de água deionizada esterilizada. O volume foi completado para 2000ml e a solução conservada à temperatura ambiente.

4.12.7. Solução coloração de Coomassie (0,2% Coomassie, 50% Metanol, 7% Ácido acético).

Coomassie R250 (SIGMA).....0,2g

Metanol (MERCK).....	50,0ml
Ácido acético glacial (MERCK).....	7,0ml
Água deionizada q.s.p.....	100,0ml

O metanol e o ácido acético foram misturados nas quantidades indicadas e o volume completado para 100ml com água deionizada. O coomassie R250 foi adicionado e dissolvido nesta solução. A solução foi então filtrada em papel de filtro e estocada à temperatura ambiente.

4.12.8. Solução de descoloração (20% Metanol, 7% Ácido acético).

Metanol (MERCK).....	200ml
Ácido acético glacial (MERCK).....	70ml
Água deionizada q.s.p.....	1000ml

Esta solução foi homogeneizada e conservada à temperatura ambiente.

4.13. Soluções para "Immunoblots" (Sambrook et al., 1989).

4.13.1. Tampão de transferência (25mM Trisma; 192mM Glicina; 20% Metanol).

Trisma base.....	3,0g
Glicina.....	14,4g
Metanol.....	200,0ml
Água deionizada q.s.p.....	1000,0ml

A glicina e o trisma base foram dissolvidos em 600ml de água deionizada. O metanol foi então adicionado e o volume completado para 1000ml com água deionizada. Em lugar de metanol, foi utilizado algumas vezes o etanol, com resultados similares. Esta solução foi preparada momentos antes do uso.

4.13.2. Solução bloqueadora (1X PBS; 3% leite desnatado; 0,1% Triton X-100).

Solução de PBS 10X.....	25,0ml
Leite desnatado.....	15,0g
Triton X-100.....	0,5ml
Água deionizada q.s.p.....	500,0ml

Esta solução foi preparada momentos antes do uso e conservada, se necessário, por algumas horas a 4°C.

4.13.3. Solução de lavagem (1x PBS; 0,1% Triton X-100).

Solução de PBS 10X.....	20,0ml
Triton X-100.....	0,2ml
Água deionizada q.s.p.....	200,0ml

Esta solução foi preparada momentos antes do uso.

4.13.4. Solução tampão de pré-coloração (50mM Tris-HCl pH 6,8).

Solução de Tris-HCl (1M) pH 6,8.....	10ml
Água deionizada.....	190ml

Esta solução após ser homogeneizada foi conservada a 4°C.

4.13.5. Solução de coloração

Solução Tris-HCl 50mM.....	20ml
Solução de 4-cloro-1-naftol a 0,3%.....	5ml
Água oxigenada 30% (MERCK).....	7µl

Os compostos foram adicionados na ordem indicada. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso.

4.14. Soluções para tratamento, transferência e imobilização de DNA em membranas de nylon (Smith & Summers, 1980).

4.14.1. Solução de desnaturação (0,5N de NaOH e 0,5M de NaCl).

NaOH (MERCK).....	4,00g
NaCl (MERCK).....	5,85g
Água deionizada q.s.p.....	200,00ml

O NaOH e o NaCl foram dissolvidos em 150ml de água deionizada. O volume foi então ajustado para 200ml. Esta solução foi autoclavada e conservada à temperatura ambiente.

4.14.2. Solução de neutralização (0,5M Tris-HCl pH7,5, 2M de NaCl).

Solução de Tris-HCl (1M) pH 7,5.....	50,0ml
NaCl (MERCK).....	11,7g
Água deionizada q.s.p.....	100,0ml

O NaCl foi dissolvido em 40ml de água deionizada e 50ml de solução de Tris-HCl 1M foram adicionados. O volume foi completado para 100ml com água deionizada. Esta solução foi autoclavada e conservada a 4°C.

4.14.3. Solução SSC ("Standard Saline citrate") concentrada 20X (3M NaCl, 0,3M Citrato de sódio)

NaCl (MERCK).....	352g
Citrato de sódio.....	176g

Água deionizada q.s.p.....2000ml

Os solutos foram dissolvidos em 1500ml de água deionizada. Quando necessário, o pH da solução foi ajustado para 7,0 com solução 10N de NaOH. O volume foi, então, completado para 2000ml e distribuído em volumes de 500ml. Esta solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada à temperatura ambiente.

4.15. Soluções para marcação radioativa de sondas com α -³²P (Feimberg & Vogelstein, 1984).

4.15.1. Tampão de Marcação.

Solução de Tris-HCl (1M) pH 8,0.....500,0 μ l
Solução de MgCl₂ (1M).....50,0 μ l
 β -mercaptoetanol.....7,2 μ l
Solução de dGTP (0,1M).....2,0 μ l
Solução de dTTP (0,1M).....2,0 μ l
Solução de HEPES (2M) pH 6,6.....1028,0 μ l

Após a adição e homogeneização de todos os componentes, este tampão foi conservado a -20°C.

4.15.2. Solução de hexadeoxiribonucleotídeos pd(N) 6.

hexadeoxiribonucleotídeos (Boehringer Mannheim).....90U
Tampão TE pH 8,0.....1ml

Esta solução foi estocada a -20°C.

4.16. Soluções para hibridação de DNA e lavagem de filtros (Church & Gilbert, 1984).

4.16.1. Solução de pré-hibridação e hibridação (0,5M de Na_2HPO_4 ; 7% SDS e 1mM de EDTA).

Solução de Na_2HPO_4 (1M) pH7,2.....	50,0ml
Solução de SDS 20%.....	35,0ml
Solução de EDTA (0,5M).....	0,2ml
Água deionizada q.s.p.....	100,0ml

Esta solução foi preparada momentos antes do uso.

4.16.2. Solução de lavagem (40mM de Na_2HPO_4 ; 1% SDS e 1mM de EDTA).

Solução de Na_2HPO_4 (1M) pH7,2.....	40ml
Solução de SDS 20%.....	5ml
Solução de EDTA (0,5M).....	2ml
Água deionizada q.s.p.....	1000ml

Esta solução também foi preparada momentos antes do uso.

4.17. Soluções para eletroforese em campo pulsado (Liu & Sanderson, 1992).

4.17.1. Tampão de ressuspensão (10mM Tris-HCl pH7,2; 20mM NaCl; 100mM EDTA).

Solução Tris-HCl 1M pH 7,2.....	10ml
Solução 1M de NaCl.....	2ml
Solução EDTA 0,5M pH8,0.....	20ml
Água deionizada q.s.p.....	100ml

Em 60ml de água deionizada foram adicionadas as soluções de Tris, EDTA e o NaCl. Após completa homogeneização, o volume foi completado para 100ml com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e conservada a 4°C.

4.17.2. Solução de agarose "Low melting" (LM) a 2%.

Agarose LM.....1g
Tampão de ressuspensão.....50ml

Esta solução, preparada momentos antes do uso, foi esterilizada por autoclavagem e mantida a 50°C até seu uso.

4.17.3. Solução de lisozima (2mg/ml)

Lisozima (SIGMA).....2mg
Tampão de ressuspensão.....1ml

Esta solução foi preparada momentos antes do uso e esterilizada por filtração.

4.17.4. Tampão Proteinase K (250mM EDTA pH 9,0; 0,5% Sarcosil, 0,5mg/ml proteinase K)

EDTA.....9,30g
Solução Sarcosil de sódio 35%.....14,28ml
Proteinase K.....0,05g
Água deionizada q.s.p.....100,00ml

O EDTA foi dissolvido em 70ml de água deionizada ajustando-se o pH para 9,0 com solução 10N de NaOH. Após a adição do sarcosil, o volume foi completado para 100ml e a solução foi autoclavada. Somente momentos antes do uso a proteinase K foi adicionada.

4.17.5. Tampão Fluoreto de fenilmetilsulfonil (10mM Tris-HCl pH7,5; 1mM EDTA, 1mM PMSF).

Solução tampão TE.....10ml
Solução 0,1M PMSF.....100µl

Esta solução foi preparada momentos antes do uso.

4.17.6. Solução de preservação (250mM EDTA pH 9,0; 0,5% Sarcosil)

A composição desta solução é igual à do item anterior (3.16.4) exceto pela ausência de proteinase K.

4.18. Soluções para processamento de órgãos de camundongos (Curtiss & Kelly, 1987).

4.18.1. Placas de "Peyer" e baço.

Meio mínimo com sacarose

Em 70ml de água destilada foram dissolvidos 15g de sacarose e adicionados 10ml de sais de meio mínimo (preparado como descrito anteriormente). O volume foi completado para 100ml com água destilada e a solução esterilizada por filtração em filtros Nalgene de 250ml e membrana de 0,25µm. Esta solução foi mantida a 4°C.

4.18.2. Muco intestinal

O muco intestinal foi processado em solução salina com 0,5mM de PMSF. Esta solução foi preparada como segue:

NaCl.....0,800g
Água deionizada q.s.p.....100,000ml

O NaCl foi dissolvido em 100ml de água deionizada, a solução distribuída em volumes de 20ml e esterilizada por autoclavagem. Momentos antes do uso, 1ml desta solução foi transferido para tubos de propileno e 5 μ l de uma solução 0,1M de PMSF foram adicionados.

4.19. Soluções para ELISA (Pizza et al., 1994a).

4.19.1 Solução bloqueadora (1% BSA; 0,05% Tween 20 em tampão PBS pH7,2)

Tampão PBS 10X.....	100,0ml
BSA.....	10,0g
Solução Tween 20.....	0,5ml
Água deionizada q.s.p.....	1000,0ml.

4.19.2. Solução de incubação (0,1% BSA; 0,05% Tween 20 em tampão PBS pH7,2)

Tampão PBS 10X.....	100,0ml
BSA.....	1,0g
Solução Tween 20.....	0,5ml
Água deionizada q.s.p.....	1000,0ml

4.19.3. Solução lavagem (0,05% Tween 20 em tampão PBS pH7,2)

Tampão PBS 10X.....	100,0ml
Solução Tween 20.....	0,5ml
Água deionizada q.s.p.....	1000,0ml

Todas estas soluções foram preparadas momentos antes do uso.

5. MÉTODOS

5.1. Extração e purificação de DNA plasmidial

5.1.1. Mini-preparações (Sambrook et al., 1989).

Estas preparações foram utilizadas para a verificação do padrão de restrição dos diferentes clones plasmidiais construídos neste trabalho.

As amostras bacterianas CC118 λ pir e SM10 λ pir, contendo os plasmídios pUT e derivados, foram sempre cultivadas a 30°C em 4ml de meio LB com Amp, com agitação constante (150rpm), por aproximadamente 18 horas. Todas as outras amostras bacterianas foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 37°C, em 4ml de meio LB com os antimicrobianos apropriados. Um volume de 1,5ml de cada cultura foi centrifugado (13000 rpm por 2 minutos) para a sedimentação das células bacterianas. Os sobrenadantes foram dispensados e cada sedimento ressuspendido em 100 μ l de solução I. As suspensões foram mantidas por 5 minutos em gelo. Em seguida, 200 μ l de solução II foram adicionados pela parede dos tubos e as misturas homogeneizadas por inversão. Após 4 minutos em gelo, 150 μ l de solução III foram adicionados, também pela parede dos tubos, e as misturas novamente homogeneizadas por inversão. Os tubos foram, então, mantidos em gelo por 15 minutos antes de serem submetidos a nova centrifugação (13000 rpm) por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante (400 μ l) de cada tubo foi recuperado e transferido para novo tubo de microcentrífuga. Estas preparações plasmidiais foram tratadas com fenol ácido e clorofórmio para a extração de proteínas.

Aos 400 μ l do sobrenadante foi adicionado igual volume de fenol ácido. Após homogeneização por agitação em "vortex", as preparações foram centrifugadas (13000 rpm) a 4°C por 5 minutos, para a separação das fases aquosa e fenólica. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e a estes, foram adicionados igual volume de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Estas misturas foram homogeneizadas em "vortex", e as fases separadas por centrifugação como no procedimento anterior. Este último procedimento foi repetido uma segunda vez e após a transferência da fase aquosa para um novo tubo, 2,5 volumes (V) de etanol a -20°C foram adicionados. As misturas foram homogeneizadas por inversão dos tubos e incubadas a -20°C por 1 hora. Após este

período, O DNA plasmidial foi sedimentado por centrifugação (13000 rpm, 15 minutos). O sobrenadante foi dispensado e o sedimento lavado com 500 μ l de etanol 70% a -20°C. Após centrifugação (13000 rpm, 5 minutos) a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos, após secos, ressuspensos em 50 μ l de solução de tampão TE com RNase A. As preparações foram incubadas a 37°C por 30 minutos e utilizadas imediatamente para a digestão com enzimas de restrição, ou armazenadas a -20°C para uso posterior.

5.1.2. Maxi-preparações e purificação de DNA plasmidial por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério.

Estas preparações foram utilizadas para a extração e purificação de grandes quantidades de DNA plasmidial, vetores de clonagem ou dos diversos plasmídios quiméricos construídos neste estudo. A técnica utilizada, baseada na lise bacteriana e desnaturação do DNA cromossômico com Triton X-100, seguiu o protocolo desenvolvido pelo Dr. Rino Rappuoli (comunicação pessoal) do "Istituto Ricerche Immunobiologiche di Siena" na Itália.

Uma pré-cultura bacteriana em 4 ml de meio LB, contendo os antimicrobianos necessários, foi cultivada a 37°C com agitação, por um período entre 8 e 12 horas. Em seguida, 2,5 ml desta cultura foram adicionados a 500ml de meio LB em "Erlenmeyers" de 2 litros, contendo os antimicrobianos necessários. Estas culturas foram incubadas a 37°C com agitação (150 a 200 rpm), por um período de aproximadamente 16 horas. Como nas mini-extrações, quando se tratavam de preparações envolvendo as linhagens CC118 λ pir e SM10 λ pir, estas foram cultivadas a temperaturas entre 30 e 32°C.

Após o período de incubação, as células bacterianas foram sedimentadas por centrifugação a 6000 rpm, por 20 minutos e a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 8,4ml de solução I. Após incubação por 5 minutos no gelo, 1,4ml de solução de lisozima foi adicionado às ressuspensões e estas, após serem homogeneizadas, foram mantidas em gelo por 5 minutos. Em seguida, 4,6ml de solução de EDTA (250mM pH8,0) e 9,6ml de tampão de lise foram adicionados e homogeneizados. Os tubos foram mantidos por um período entre 15 a 30 minutos no gelo, dependendo do andamento da reação de lise, que foi monitorada através da observação da viscosidade da mistura. As preparações foram posteriormente

centrifugadas a 15000 rpm, por 60 minutos e a 4°C. Os sobrenadantes foram recuperados e transferidos para provetas esterilizadas. O volume, se necessário, foi ajustado para 25ml com água deionizada. Os extratos de DNA plasmidial foram, então, transferidos para tubos de propileno de 50ml contendo 25g de cloreto de céσιο (MERCK). Após a completa dissolução do cloreto de céσιο, por inversões brandas do tubo, 2,5ml de brometo de etídio (solução 10mg/ml) foram adicionados, homogeneizados, e estas misturas transferidas para tubos de centrifuga. Após centrifugação a 3000 rpm à temperatura ambiente, as películas que se formaram na superfície da solução, foram removidas com o auxílio de uma pipeta "Pasteur". Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ultracentrífuga "Quick Seal" de 50ml. O volume do tubo, se necessário, foi completado com parafina. Após serem balanceados e selados, estes tubos foram submetidos à centrifugação de 42000 rpm por 20 horas e a 20°C (rotor Vti50).

A banda correspondente ao DNA plasmidial, visualizada utilizando-se aparelho de luz ultra-violeta (UV) portátil, foi aspirada com uma seringa de 5ml e agulha de 18G. O DNA recuperado foi imediatamente transferido para tubo "Quick Seal" de 6ml. Estes tubos foram, por sua vez, balanceados, selados e novamente submetidos à ultracentrifugação a 55000 rpm por 20 horas e a 20°C. A banda correspondente ao plasmídeo foi novamente aspirada e transferida para tubos de propileno de 15ml. O brometo de etídio foi extraído por repetidas extrações com solução de isopropanol saturado com água e NaCl. Três a quatro volumes desta solução foram adicionados à solução de DNA plasmidial e misturados por inversão branda dos tubos, várias vezes. Os tubos foram então centrifugados a 3000 rpm, à temperatura ambiente, e a fase superior, alcóolica, foi descartada. Este processo foi repetido por mais três ou quatro vezes ou até que a solução aquosa estivesse límpida. A solução de DNA foi transferida para tubos de vidro e 4,5V de etanol a 77%, previamente resfriado a -20°C, foram adicionados. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a -20°C por 2 a 3 horas. O DNA foi sedimentado por centrifugação a 8000 rpm por 30 minutos e a 4°C. O sedimento foi seco, ressuspenso em 2 ml de solução 0,3M de acetato de sódio pH 5,2 e 2,5V de etanol foram adicionados e homogeneizados. As preparações foram incubadas por 2 a 3 horas a -20°C. O DNA foi precipitado por centrifugação nas condições descritas anteriormente. O sedimento, após seco, foi dissolvido em 500µl de tampão TE. A

concentração de DNA foi determinada pela medição da densidade ótica (DO), conforme descrito por Sambrook et al. (1989).

5.2. Reações de digestão com enzimas de restrições e ligações entre fragmentos de DNA.

As digestões com enzimas de restrições foram realizadas seguindo-se as recomendações do fabricante. O tampão de restrição universal TA (O'Farrell et al., 1980) foi utilizado em todas as reações com enzimas de restrição. Nas reações de ligação foi utilizada a enzima T4 DNA ligase, seguindo-se as recomendações do fabricante (Boehringer Mannheim).

5.3. Purificação de fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição.

As colunas "Chroma Spin 30" (Clontec) foram utilizadas para a purificação dos vetores de clonagem, após digestão com enzimas de restrição. Estas colunas retêm fragmentos de DNA lineares de até 30 pares de bases (pb), além de proteínas, o que as torna úteis na separação de vetores plasmidiais de fragmentos do sítio "polilinker". Foi utilizado o protocolo descrito pelo fabricante.

Fragmentos de DNA a serem clonados foram purificados por eletroforese e separação em géis de agarose seguida de purificação em colunas "Chroma Spin 10", em lâ de vidro ou utilizando-se membranas NA-45 DEAE celulose (Schleicher & Schuell). Fragmentos de até 2kb foram purificados com membrana de DEAE celulose. Fragmentos maiores ligam-se mais fortemente a esta membrana e por isso, são eluídos destas com menor eficiência. Fragmentos maiores que 2kb foram, portanto, purificados pelo outros dois métodos de purificação. Em todos estes experimentos, o tampão TAE foi utilizado pois purificações realizadas com tampão TEB resultam em menor rendimento na quantidade de fragmento purificado.

(1) Purificação utilizando colunas "Chroma Spin 10": A amostra de DNA digerida foi submetida a eletroforese em gel de agarose. A concentração de agarose utilizada foi baseada no tamanho dos fragmentos a serem separados e purificados (Sambrook et al., 1989). Foram digeridos aproximadamente 5µg de DNA para cada purificação. Após a

corrida eletroforética, a banda de interesse foi visualizada com luz U.V. portátil e a região do gel correspondente extraída com um bisturi esterilizado. O bloco de agarose foi cortado em blocos menores e depositados na superfície da resina. O mesmo protocolo descrito pelo fabricante para soluções líquidas de DNA foi utilizado para a purificação do DNA em gel de agarose. A solução aquosa eluída foi precipitada com 0,1 V de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5V de etanol e o sedimento, após ter sido seco, foi dissolvido em água miliQ esterilizada.

(2) Purificação utilizando lã de vidro: A lã de vidro foi deixada em banho de "biding silane" (Pharmacia Biotech) em capela até a total evaporação do produto. Em seguida, a lã de vidro foi deixada por 3 horas em estufa a 180°C. O fundo de tubos "eppendorf" de 500µl foi perfurado com uma agulha incandescente e nestes, foi depositada a lã de vidro. Os pedaços de agarose contendo os fragmentos de DNA foram depositados na superfície da lã de vidro e os tubos, por sua vez, colocados dentro de tubos "eppendorf" de 1,5ml. A seguir, estes foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos. Após esta centrifugação, 50µl de tampão TE foram adicionados na superfície da lã de vidro e as preparações recentrifugadas a 5000 rpm por 3 minutos. A solução aquosa eluída foi precipitada com acetato de amônio e etanol. Para a precipitação, ½ V de acetato de amônio 7,5M e 3V de etanol absoluto a -20°C foram adicionados, misturados por inversão, e a mistura foi mantida a -80°C por 20 minutos. O DNA foi precipitado por centrifugação (13000 rpm) a 4°C por 30 minutos. O sedimento foi lavado com etanol gelado a 70% e após ter sido seco, foi dissolvido em tampão TE ou água deionizada.

(3) Purificação utilizando membranas NA-45 DEAE celulose: As membranas foram preparadas e armazenadas conforme descrito pelo fabricante (Schleicher & Schuell). Após a completa separação das bandas de DNA em gel de agarose, uma tira da membrana NA-45 foi inserida em uma incisão feita no gel, imediatamente abaixo da banda de interesse. Para assegurar a pureza do DNA recuperado, outra tira de membrana foi adicionada em incisão logo acima da banda. O gel foi recolocado na cuba e a eletroforese continuada até a completa ligação do DNA à membrana. Este procedimento foi monitorado com o auxílio de luz UV portátil. O DNA foi eluído da membrana utilizando-se o protocolo descrito pelo fabricante.

5.4. Estratégia de Clonagem.

O plasmídio pUT/Cm foi utilizado para a inserção genômica dos genes codificadores das toxinas LT e CT na linhagem *S. typhimurium* LT2.

O *operon eltAB*, que codifica a toxina LT, está em um fragmento de DNA de aproximadamente 1900 pb, flanqueado pelos sítios BamHI e Sall, no plasmídio quimérico pBS:LT (Pizza et al., 1994b). Este plasmídio foi digerido com as referidas enzimas e o fragmento LT subclonado no plasmídio pUC18 (NotI) utilizando os mesmos sítios de restrição. Esta subclonagem possibilitou a recuperação do fragmento LT através de digestão com NotI e a subclonagem deste no único sítio NotI do plasmídio pUT/Cm. Este plasmídio quimérico pUT/Cm:LT (Figura 1) foi utilizado para a inserção do *operon eltAB* em *S. typhimurium* LT2.

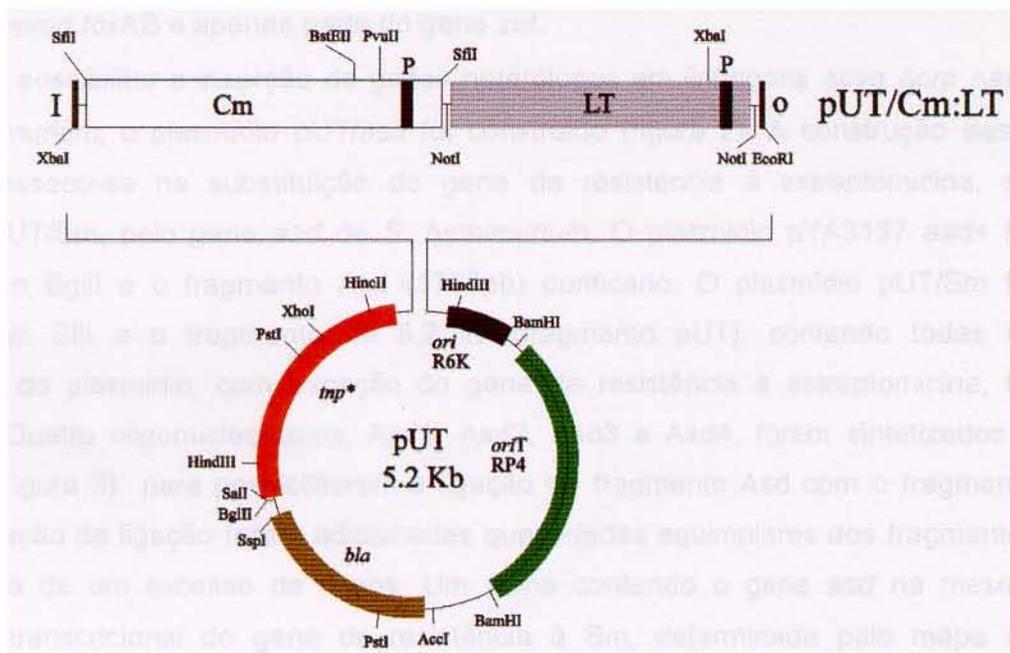


FIGURA 1. Esquema do plasmídio pUT/Cm:LT. O *operon eltAB* foi inserido no único sítio NotI do plasmídio pUT/Cm. I- Terminação I; O- Terminação O; Cm- Resistência ao Cloranfenicol; *oriT* RP4: Origem de transferência (conjugação) do plasmídio RP4; *ori* R6K: Origem de replicação do plasmídio R6K; *tnp*- Transposase; *bla*: Resistência à Ampicilina; P: Sítio promotor.

O *operon toxAB*, que codificada a toxina colérica (CT), está em um fragmento de DNA EcoRI / PstI de 5,2 kb, no plasmídeo quimérico pGEM3 (Fontana et al., 1995). O *operon toxAB* foi subclonado no plasmídeo pUC 18 (NotI) utilizando-se duas estratégias diferentes. Na primeira estratégia, o fragmento EcoRI / PstI de 5,2Kb foi subclonado no vetor pUC18 (NotI) utilizando-se estes mesmos sítios de restrição. Posteriormente, este fragmento foi recuperado através de digestão com NotI e subclonado no sítio Not I de pUT/Cm, criando-se o plasmídeo pUT/Cm: CT. Na segunda estratégia, o plasmídeo pGEM3 foi digerido com HaeIII, o que possibilitou a recuperação do *operon toxAB* em um fragmento de DNA de aproximadamente 3000 pb. Este foi subclonado em pUC18 (NotI) e posteriormente em pUT/Cm, criando-se o plasmídeo pUT/Cm:CTr. Ambos plasmídios pUT/Cm(CT e CTr) foram utilizados para a inserção do *operon toxAB* no genoma de *S. typhimurium* LT2. O fragmento CT, além do *operon toxAB*, contém os genes *cep*, *ace* e *zot*, que codificam diferentes fatores de virulência (Pearson et al., 1993). O fragmento Ctr contém o *operon toxAB* e apenas parte do gene *zot*.

Para possibilitar a inserção de genes heterólogos em linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium*, o plasmídeo pUT/*asd* foi construído (figura 2). A construção deste plasmídeo baseou-se na substituição do gene de resistência à estreptomicina, do plasmídeo pUT/Sm, pelo gene *asd* de *S. typhimurium*. O plasmídeo pYA3137 *asd+* foi digerido com BglII e o fragmento Asd (1789pb) purificado. O plasmídeo pUT/Sm foi digerido com SfiI e o fragmento de 5,2 kb (fragmento pUT), contendo todas as sequências do plasmídeo, com exceção do gene de resistência à estreptomicina, foi purificado. Quatro oligonucleotídeos, Asd1, Asd2, Asd3 e Asd4, foram sintetizados e anelados (Figura 3) para possibilitarem a ligação do fragmento Asd com o fragmento pUT. Na reação de ligação foram adicionadas quantidades equimolares dos fragmentos na presença de um excesso de oligos. Um clone contendo o gene *asd* na mesma orientação transcricional do gene de resistência à Sm, determinada pelo mapa de restrição do plasmídeo, foi selecionado e chamado pUT/*asd* (Figuras 2 e 5). Este plasmídeo foi utilizado para a inserção do gene mutante *It-k63* em *Salmonella*.

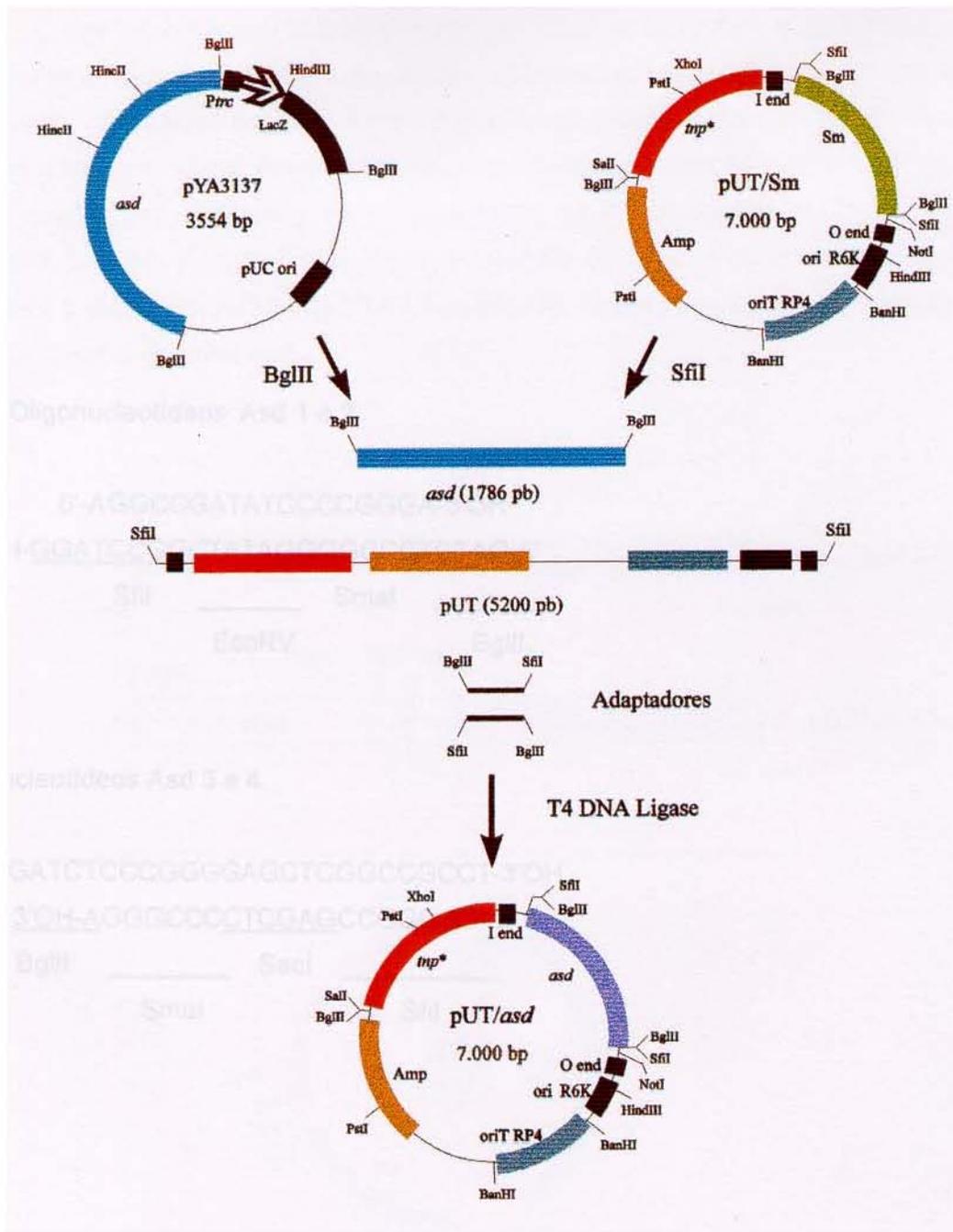


FIGURA 2. Construção do plasmídeo pUT/*asd*. A estratégia de construção detalhada está descrita no texto. *P_{trc}*- Promotor *trc*; *asd*: Aspartato-β-semialdeído desidrogenase; *tnp**- Transposase Tn5; Amp: Ampicilina; Sm: Estreptomicina; I e O "end": Repetições invertidas I e O; *ori* R6K: Origem de replicação do plasmídeo R6K; *ori*T: Origem de transferência (conjugação).

O *operon* mutante *lt-k63* foi descrito por Pizza et al. (1994a e b). Este *operon* foi construído através de mutação sítio dirigida, utilizando-se como base o plasmídio pBS:LT e portanto, as mesmas enzimas BamHI e Sall foram utilizadas para as subclonagens em pUC18 (NotI) e pUT/asd. Foram selecionados clones contendo este *operon* inserido nas duas orientações possíveis. Estes plasmídios foram chamados pUT/asd:LT-K63 e pUT/asd:LT-K63i (Figura 4 e 5). Para a inserção do *operon* mutante em *Salmonella*, somente o plasmídio pUT/asd:LTK-63 foi utilizado. Neste plasmídio, a transcrição do *lt-k63* é a mesma do gene *asd*.

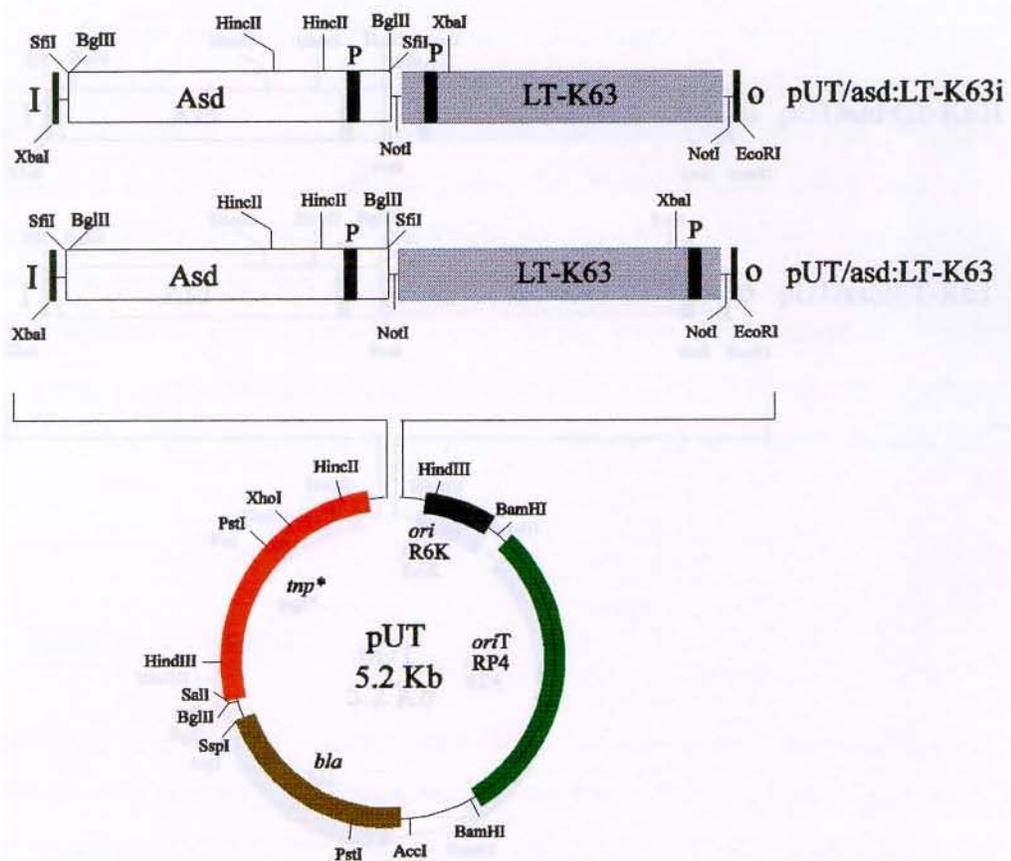


FIGURA 4. Esquema dos plasmídios pUT/asd:LT-K63 e LT-K63i. O *operon* *lt-k63* foi inserido no único sítio *NotI* do plasmídio pUT/asd. Plasmídios recombinantes contendo as duas orientações possíveis deste *operon* foram selecionados. I- Terminação I; O- Terminação O; *ori*T RP4: Origem de transferência (conjugação) do plasmídio RP4; *ori* R6K: Origem de replicação do plasmídio R6K; *tnp**- Transposase; *bla*: Resistência à Ampicilina; P- Sítio promotor.

A construção do *operon ct-k63* foi descrito por Pizza et al. (1994) e Fontana et al. (1995). Este *operon* foi subclonado nos sítios BamHI e Sall do plasmídio pUC18 (NotI) e posteriormente no sítio Not I do plasmídio pUT/*asd*. Plasmídios contendo as duas orientações possíveis do *operon ct-k63* foram construídos. Estes plasmídios, esquematizados na figura 5, não foram utilizados até o momento, para a inserção de *ct-k63* em *Salmonella*.

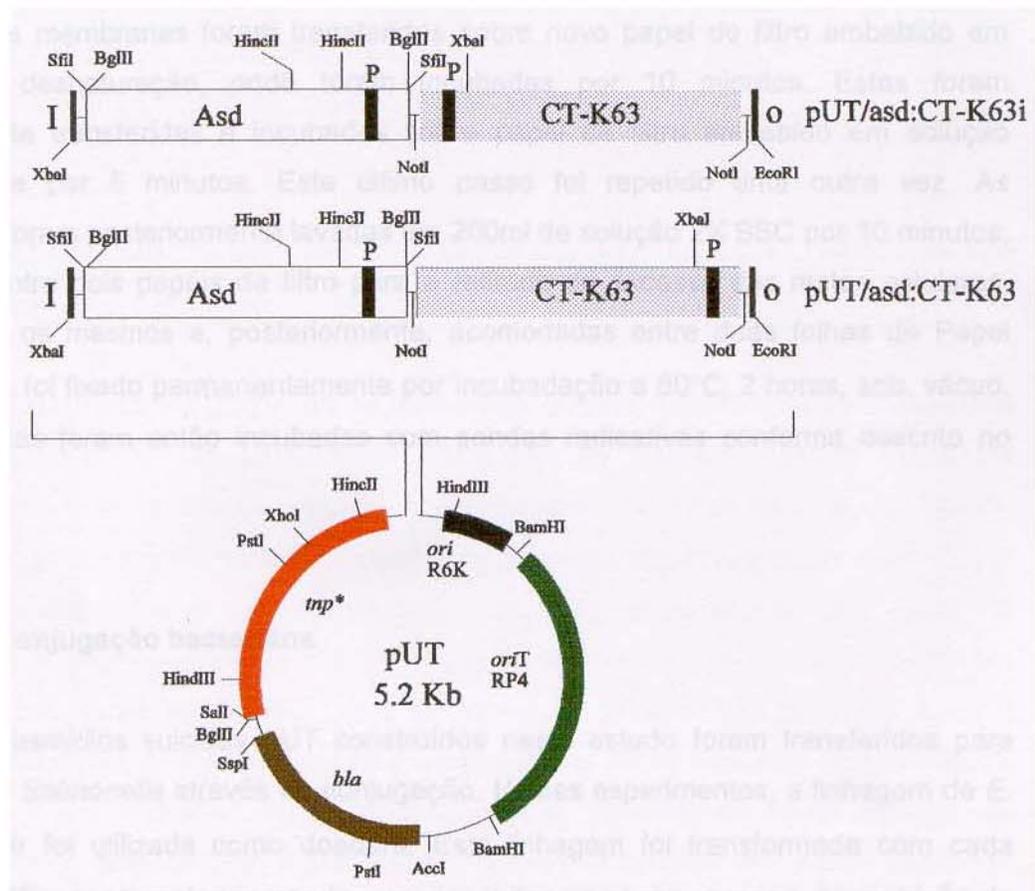


FIGURA 5. Plasmídios pUT/*asd* quiméricos contendo o *operon ct-k63* inserido, nas duas orientações possíveis, no único sítio NotI. Detalhes sobre a construção destes plasmídios estão descritos no texto. Até o momento, nenhum destes foi utilizado para a inserção do *operon ct-k63* em *Salmonella*.

5.5. Identificação de clones positivos em populações de bactérias transformantes

Clones bacterianos contendo plasmídios quiméricos foram identificados através de hibridação de colônias com sondas radioativas (Sambrook et al., 1989). As bactérias foram crescidas em meio LA por aproximadamente 18 horas e a seguir mantidas por 30 minutos a 4°C. Uma membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell) foi depositada sobre o meio de cultura em cada placa, as quais foram incubadas a 4°C por 15 minutos. As membranas foram cuidadosamente retiradas e transferidas, com a face contendo as bactérias voltada para cima, sobre papel de filtro embebido em solução 10% SDS. Após 5 minutos, as membranas foram transferidas sobre novo papel de filtro embebido em solução de desnaturação, onde foram incubadas por 10 minutos. Estas foram posteriormente transferidas e incubadas sobre papel de filtro embebido em solução neutralizadora por 5 minutos. Este último passo foi repetido uma outra vez. As membranas foram posteriormente lavadas em 200ml de solução 2X SSC por 10 minutos, prensadas entre dois papéis de filtro para a retirada do excesso dos restos celulares, secas sobre os mesmos e, posteriormente, acomodadas entre duas folhas de Papel 3MM. O DNA foi fixado permanentemente por incubação a 80°C, 2 horas, sob vácuo. As membranas foram então incubadas com sondas radioativas conforme descrito no item 5.15.

5.6. Conjugação bacteriana

Os plasmídios suicidas pUT construídos neste estudo foram transferidos para linhagens de *Salmonella* através de conjugação. Nestes experimentos, a linhagem de *E. coli* SM10 λ pir foi utilizada como doadora. Esta linhagem foi transformada com cada plasmídio pUT a ser transferido sendo que, em todos os casos, o mapa de restrição do plasmídio foi confirmado após a transformação. No caso dos plasmídios pUT/Cm:LT, pUT/Cm:CT e CTr a linhagem receptora foi *S. typhimurium* LT2. No caso do plasmídio pUT/asd:LTK63, as *S. typhimurium* receptoras foram as linhagens X3987, X4072, X4217 e X4550.

Este experimento foi realizado conforme protocolo descrito em Miller (1972). As linhagens doadora e receptoras foram crescidas em meio NB ou LB a 30-32°C por um

período de aproximadamente 12 horas. Estas culturas foram então diluídas em meio NB ou LB, 1/20 no caso da doadora e 1/10 no caso da receptora. Um ml de cada diluição foi misturado em tubo de polipropileno e a cultura incubada a 30-32°C sem agitação. Aliquotas de 200µl foram separada e inoculadas em placas de meio mínimo sólido, a partir de 6 horas de incubação e a cada 2 horas. Amostras foram coletadas até 18 horas de incubação, quando a cultura restante foi centrifugada (13000 rpm, 3 minutos), ressuspensa em volume apropriado de meio NB ou LB e inoculadas em placas de meio mínimo. As placas foram incubadas a 37°C por um período de até 5 dias para a coleta das colônias transconjugantes. As colônias transconjugantes foram re-isoladas em placas com meio LA e duplicatas de cada re-isolado analisadas com relação à resistência à ampicilina, à capacidade de crescimento em placas com meio mínimo e ao fenótipo exibido quando crescidas nos meios MacConkey e Ektoen.

5.7. Identificação de colônias produtoras das toxinas LT e LT-K63 usando anticorpos anti-LT.

As linhagens transconjugantes de *Salmonella* obtidas foram inicialmente testadas para a produção de LT ou LT-K63 por hibridação de colônias, usando anticorpos policlonais anti-LT. O protocolo utilizado neste experimento foi o de Lyons & Nelson (1984) com algumas modificações. As células bacterianas foram cultivadas a 37°C, por 18 horas, em membranas de nitrocelulose colocadas sobre placas com meio LA (crescimento em aerobiose) ou em meio BHI-ágar (anaerobiose). Para o crescimento em anaerobiose, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (OXOID). Após o período de incubação, as membranas foram transferidas sobre papel de filtro embebido em solução de desnaturação. Após incubação (5 a 10 minutos) nesta solução, as membranas foram lavadas com água deionizada para a retirada dos restos celulares. Estas foram posteriormente incubadas por 40 minutos em tampão fosfato 10mM pH7,5, sendo que a solução tampão foi trocada uma vez após os primeiros 20 minutos de incubação. As membranas foram posteriormente incubadas à temperatura ambiente por 6 horas, em tampão fosfato contendo diluição apropriada de anticorpo policlonal anti-toxina LT. Após 4 lavagens de 10 minutos cada, em tampão fosfato, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente, por 3 horas, em solução tampão fosfato contendo diluição 1: 2000 de anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (Kapell).

Após este período de incubação, as membranas foram novamente lavadas 4 vezes (20 minutos cada) em tampão fosfato, 1 vez em PBS com 0,1% Triton X-100 (1 hora) e reveladas com kit ECL de luminescência (Amersham), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os resultados foram registrados em filmes para luminescência (Amersham).

As membranas foram, também, posteriormente reveladas com solução de 4-cloro-1-naftol. Antes da coloração, as membranas foram lavadas 2 vezes (20 minutos cada) em tampão Tris-HCl 0,05M pH6,8. As membranas foram imediatamente fotografadas para a preservação dos resultados.

5.8. Preparações de proteínas totais de transconjugantes de *Salmonella*

Preparações de proteínas totais foram utilizadas para verificar a expressão das toxinas CT, LT e LT-K63 nos diferentes transconjugantes de *S. typhimurium*. A metodologia utilizada foi basicamente a descrita em Sambrook et al. (1989).

As amostras de *S. typhimurium* foram cultivadas a 37°C, sob agitação constante (150rpm), em 4 ml de meio LB até o final da fase logarítmica de crescimento. A quantidade de células foram ajustadas, para cada amostra, através da determinação e ajuste da densidade óptica a 600 nm. As células contidas em 1ml destas culturas foram sedimentadas por centrifugação (13000 rpm por 3 minutos). Os sedimentos foram suspensos em 100µl de solução tampão de amostra e aquecidos a 100°C por 5 minutos. As preparações foram novamente centrifugadas (13000 rpm, 3 minutos) e o sobrenadante transferido para novos tubos. As amostras foram imediatamente analisadas em SDS-PAGE ou conservadas a -20°C para análise posterior.

5.9. Preparações de proteínas periplasmáticas de transconjugantes de *Salmonella*.

O protocolo utilizado foi o descrito por Pizza et al. (1990). As amostras de *Salmonella* foram cultivadas em 10ml de meio LB até o final da fase logarítmica. As células foram sedimentadas por centrifugação (6000rpm, 20 minutos, 4°C), suspensas em 300µl de tampão de suspensão (50mM Tris-HCl pH 8,0; 25% de sacarose) e

transferidas para tubos de microcentrifuga. A esta suspensão foram adicionados 6µl de polimixina B (solução 50mg/ml). A mistura de reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora e novamente centrifugada (13000 rpm, 10 minutos). O sobrenadante foi transferido para tubos novos e conservados a -20°C. Antes de serem analisados por SDS-PAGE, sobrenadante e tampão de amostra foram misturados nas proporções apropriadas e incubados por 5 minutos a 100°C.

5.10. SDS-PAGE

Os extratos protéicos totais ou periplasmáticos foram separados por SDS-PAGE como descrito por Sambrook et al. (1989). Foram utilizados géis com 12,5% a 15% de acrilamida, dependendo da necessidade. As bandas protéicas foram visualizadas após coloração com coomassie blue R250 e os géis fotografados para a preservação dos resultados.

5.11. Análise de Lipopolissacárides (LPS).

Os lipopolissacárideos de diferentes transconjugantes de *S. typhimurium* foram analisados quando ao perfil eletroforético. As preparações de LPS foram realizadas pelo método de tratamento com proteinase K descrito em detalhes por Helander (1985). Após serem preparadas, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE (gel 15%) e os LPS visualizados por coloração com prata após oxidação com ácido periódico, como descrito por Tsai e Frasch (1982).

5.12. “Imunoblots”.

Os “Imunoblots” foram realizados conforme descrito por Sambrook et al. (1989) com algumas modificações. As membranas de nitrocelulose (“NitroBind-Micron Separation inc-MSI) foram cortadas nas dimensões exatas do gel e submersas em água deionizada ou tampão de transferência no mínimo 15 minutos antes do início do experimento. Para este experimento, géis de SDS-PAGE foram sempre preparados em

duplicata, sendo que um dos géis, após o termino da corrida eletroforética, foi corado normalmente. Após a separação das bandas protéicas em SDS-PAGE e tratamento das membranas de nitrocelulose, o sistema de transferência foi montado como descrito por Sambrook et al. (1989). Para a transferência, foi usado tampão Tris-Glicina-etanol, aplicando-se uma corrente de 150 mA por aproximadamente 1,5 horas. As membranas foram transferidas para recipientes com PBS-Tween com 0,3% de leite desnatado (tampão de incubação) e incubada nesta solução por 40 minutos, tendo-se trocado a solução uma vez, após os primeiros 20 minutos. Subsequentemente, diluição apropriada de anticorpo primário em 20ml de tampão de incubação foi adicionada e a reação incubada à temperatura ambiente durante toda a noite. Três lavagens de 20 minutos cada, com tampão de incubação, foram realizadas. Após estas lavagens, a membrana foi incubada à temperatura ambiente, por 2 horas, em 20ml de tampão de incubação contendo anticorpo secundário (Kapell) conjugado com peroxidase (diluição 1:2000). Após três lavagens em solução tampão de incubação e 1 lavagem de 1 hora em PBS contendo 0,1% de Tween 20, as bandas foram visualizadas através de reação com kit ECL de luminescência (Amersham). Nestes experimentos, filmes próprios para a detecção de luminescência foram utilizados (Amersham). As bandas foram posteriormente visualizadas por reação com 4-cloro-1-naftol. Para isso, as membranas foram lavadas por 1 hora em solução de Tris-HCl pH6,8 tendo-se trocado a solução após os primeiros 30 minutos de incubação. As membranas foram imediatamente fotografadas para a preservação dos resultados.

5.13. Preparações de DNA genômico de *Salmonella*.

Estas preparações de DNA genômico foram utilizadas nos experimentos de hibridação para a caracterização molecular das diferentes linhagens de *S. typhimurium* recombinantes. O protocolo utilizado foi o descrito em Rossolini et al. (1993).

As linhagens de *S. typhimurium* foram incubadas a 37°C, com agitação, em 3 ml de meio LB, por aproximadamente 16 horas. As células bacterianas foram sedimentadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram dispensados e os sedimentos suspensos em 300µl de solução de suspensão (50mM de tris-HCl pH 8,0; 50mM de EDTA; 20% de sacarose). As preparações foram então incubadas em gelo por 10 minutos e, em seguida, 600µl de solução de lise foram adicionados (50mM de NaCl;

1% de sarcosil de sódio; 50µg/ml de proteinase K) e homogeneizados através de seguidas pipetagens. As preparações foram posteriormente incubadas em banho-maria a 37°C, por 2 horas. As preparações foram purificadas por extração com fenol-clorofórmio- álcool isoamílico. O DNA genômico foi precipitado com 1V de isopropanol à temperatura ambiente. Após a adição do isopropanol, os tubos foram invertidos várias vezes e imediatamente centrifugados a 10000 rpm à temperatura ambiente, por 20 segundos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500µl de etanol (70%) a -20°C. Os sedimentos foram secos e dissolvidos em 200 a 1000µl de tampão TE com 50µg/ml de RNase A. O RNA da preparação foi digerido por incubação a 37°C (30 minutos) e as preparações analisadas em gel de agarose para a determinação da concentração. Estas preparações foram conservadas a -20°C.

Para a digestão com enzimas de restrição, 1 a 2µg de DNA genômico foram utilizados. As reações foram conduzidas à temperatura apropriada por aproximadamente 5 horas. Após a separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados. O DNA foi imobilizado em filtros de nylon e hibridados com sondas de DNA radioativas específicas.

5.14. Eletroforese de campo pulsado

Preparações de DNA genômico de *Salmonella* para eletroforese de campo pulsado foram realizadas basicamente como descrito por Liu & Sanderson (1992), com algumas modificações. Culturas crescidas durante toda a noite em meio LB foram diluídas 1/30 em 10ml do mesmo meio e crescidas a 37°C, com aeração, até a fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 3 horas). Três ml de cada uma destas culturas foram centrifugados (10 minutos a 5000 rpm) para a sedimentação das células. Os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos suspensos em 1 ml de tampão de suspensão e imediatamente misturadas com 1ml de solução de agarose "low melting point". As suspensões foram aspiradas para dentro de tubos plásticos (3mm de diâmetro) e mantidas por 30 minutos a 4°C, até a solidificação da agarose. As amostras, já em forma de filetes de agarose, foram transferidas para tubos de propileno e imersas em solução de lisozima. Após 2 horas de incubação a 37°C, a solução de lisozima foi descartada e os filetes imersos em solução de proteinase K. Os filetes foram incubados,

nesta solução, a 50°C por 48 horas. A solução de proteinase K foi descartada, os filetes imersos em solução de PMSF e incubados a 50°C por 1 hora. Após este período de tempo, a solução de PMSF foi trocada por nova solução e os filetes incubados nas mesmas condições por mais 1 hora. Após o tratamento com PMSF, os filetes foram lavados duas vezes com tampão TE e estocados a 4°C em solução de preservação.

Antes da digestão com enzimas de restrição, os filetes de agarose foram cortados em pequenos blocos, suficientes para preencher a canaleta do gel. Cada bloco foi transferido para tubos de microcentrífuga, lavados 3 vezes (20 minutos cada) em tampão TE (pH8,0) à temperatura ambiente e 1 vez em tampão de restrição TA (2X) por 20 minutos a 4°C. O tampão TA (2X) foi então substituído por 50µl de tampão TA (1X) e a enzima adicionada para a concentração final de 0,2U/µl. A digestão foi realizada a 37°C por 18 horas.

O gel foi preparado com solução autoclavada de 1% de agarose (Beckman) em tampão TAFE (Beckman). O sistema utilizado foi o sistema para eletroforese vertical de campo pulsado da Beckman. Após o período de incubação com enzimas de restrição, os blocos de agarose foram transferidos com uma pinça, para as canaletas do gel. As canaletas foram seladas com solução 1% de agarose em TAFE. As condições de corrida foram:

- Estágio 1: Pulsos de 4 segundos (170V/mA) durante 30 minutos;
- Estágio 2: Pulsos de 10 segundos (150V/mA) durante 2 horas;
- Estágio 3: Pulsos de 50 segundos (150V/mA) durante 10 horas;
- Estágio 4: Pulsos de 150 segundos (150V/mA) durante 10 horas;
- Estágio 5: Pulsos de 120 segundos (120V/mA) durante 20 horas;
- Estágio 6: Pulsos de 30 segundos (120V/mA) durante 10 horas.

O gel foi corado com brometo de etídio, fotografado, e o DNA imobilizado em filtros de nylon para hibridação com sondas específicas.

5.15. Imobilização do DNA em membranas de nylon

A imobilização do DNA em membranas de nylon foi realizada basicamente como descrito por Smith e Summers (1980).

Após a eletroforese e visualização das bandas com brometo de etídio, os géis foram fotografados ao lado de régua UV fluorescente. Para a transferência e imobilização, o gel foi incubado por 30 minutos, sempre com agitação branda, em solução de desnaturação (0,5M NaOH; 0,5M NaCl), 30 minutos em solução neutralizadora (0,5M Tris-HCl pH7,5; 2M NaCl) e 30 minutos em solução 20X SSC. Enquanto se procedia a esta última incubação, duas membranas de nylon ("Magnacharge-Micron Separation inc-MSI") foram cortadas com dimensão levemente maior que o gel e imersas em água deionizada esterilizada. Aproximadamente 10 minutos antes da montagem do sistema de transferência, as membranas foram transferidas para solução 20X de SSC. O sistema de transferência foi montado conforme descrito por Smith & Summers (1980). A transferência foi conduzida por, no mínimo, 2 horas.

Antes do sistema de transferência ser desmontado, a posição das canaletas do gel foram assinaladas, nas membranas, com lápis preto. As membranas foram lavadas por 10 minutos em solução 2X de SSC e acomodadas entre duas folhas de papel 3MM. Estas foram incubadas por 2 horas a 80°C, sob vácuo. Após este período de incubação, as membranas foram expostas à luz UV por 30 segundos, para a imobilização permanente do DNA à membrana. As membranas assim preparadas foram utilizadas nos experimentos de hibridação.

5.16. Hibridação de DNA imobilizado em membranas de nylon, com sondas radioativas.

Estes experimentos foram realizados como parte da caracterização molecular das diferentes linhagens recombinantes de *Salmonella* construídas. Como em todos os casos as sondas moleculares eram 100% homólogas aos genes alvo, condições de máxima estringência foram utilizadas. O protocolo assim como as soluções de pré-hibridação, hibridação e lavagem foram os descritos em Church & Gilbert (1984). As membranas foram incubadas em solução de pré-hibridação a 65°C por no mínimo 1 hora. Após este período de incubação, a solução de pré-hibridação foi substituída pela solução de hibridação e a sonda adicionada. A reação foi conduzida a 65°C à noite. Na manhã seguinte, as membranas foram lavadas em solução de lavagem a 65°C. A eficiência deste processo foi monitorada com medidor "geiger" avaliando-se a quantidade de

radiação presente na solução de lavagem e na membrana. O tempo de exposição a filmes radiográficos foi proporcional à quantidade de radiação presente nos filtros.

Os fragmentos de DNA a serem utilizados como sonda foram purificados em gel de agarose ou obtidos por reação de PCR, usando oligos específicos. Os fragmentos de PCR foram purificados em coluna ("Chroma Spin-10"). A marcação com α - ^{32}P foi realizada com Kit de marcação "Oligo Labeling Kit" (Pharmacia LKB). Seguiu-se as recomendações do fabricante com uma única modificação, o tampão de reação foi preparado em laboratório para possibilitar a utilização de α - ^{32}P -dATP e α - ^{32}P -dCTP. Após reação de incorporação, as sondas foram purificadas em coluna Chroma Spin-10 e as atividades foram estimadas utilizando-se contador Geiger.

5.17. Fragmentos de DNA utilizados como sondas

Sonda LT. Obtida por reação de PCR utilizando dois "primers" internos ao gene LT, para amplificar um fragmento de 1059pb. Os "primers" utilizados foram: LT1- 5'-CCCCAGATGAAATAAACGTTTC-3' e LT2- 5'-GTTTTTCATACTGATTGCCGCATT-3'. A posição destes no *operon eltAB* é apresentada na Figura 6. O plasmídeo pUC18:LT-K63 foi utilizado como molde.

Sonda PSC. Obtida por reação de PCR utilizando os "primers" pSC1- 5'-GAAGTCAGAGCCTGAGCAGGA-3' e PSC2- 5'-CTGTCGCCATTTGCATATAATGGCG-3', para amplificar um fragmento de 470pb. A posição dos "primers" no *operon eltAB* é demonstrada na Figura 6. O plasmídeo pUC18:LT-K63 foi utilizado como molde.

Sonda ASD. Esta sonda foi obtida através da digestão do plasmídeo pYA3137 com BglII e a purificação do fragmento Asd de 1786 pb.

Sonda PUT. Inicialmente, preparação purificada do plasmídeo pUT/Km foi utilizada como sonda. Os resultados foram confirmados através da preparação da sonda PUT. Esta foi preparada digerindo-se o plasmídeo pUT/Km com as enzimas XbaI e EcoRI, para a eliminação do gene de resistência e das repetições do transposon Tn5. O fragmento pUT de aproximadamente 5,2Kb foi purificado em gel de agarose.

Sonda SPVB. Esta sonda foi obtida aplicando-se por reação de PCR um fragmento de 865pb interno ao gene *spvB*. Os primers utilizados foram: SPVB1- 5'-ATGTTGATACTAAATGGTTTTTCA-3' e SPVB2- 5'-GGGCGAGCCAGCTGTTCTGAGC

AG-3' . Este fragmento foi amplificado usando o plasmídio de virulência pSTLT de *S. typhimurium* LT2.

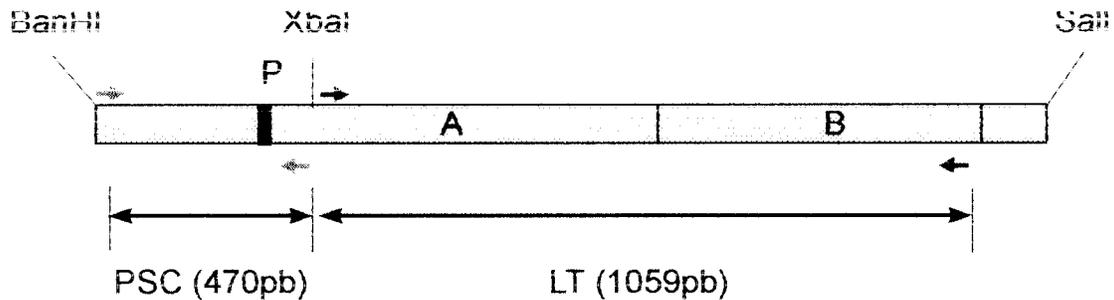


FIGURA 6. Posição dos “primers” (representados por setas) utilizados para amplificar os fragmentos LT (setas azuis) e PSC (setas verdes) que foram, por sua vez, utilizados como sondas moleculares.

5.18. Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento da extremidade 3' do *operon It-k63*, foi utilizado o “T7 Sequencing™ Kit” da Pharmacia, seguindo-se a metodologia do fabricante. O DNA foi marcado com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$. As bandas de DNA foram separadas em gel de poliacrilamida 6% e visualizadas após sensibilização de filmes radiográficos. A exposição foi feita a -70°C em cassetes contendo intensificadores de sinal. As chapas radiográficas foram reveladas em máquina reveladora Kodak. A sequência foi obtida a partir do plasmídio pUC18 (NotI), contendo o *operon It-k63* inserido entre os sítios BamHI e Sall. O oligonucleotídeo sintético CTGTCGCCATTTGCATATAATGGCG, homólogo à região amino-terminal do gene *eltA*, foi utilizado como “primer”.

5.19. Imunização de camundongos BALB/c com linhagens recombinantes de *Salmonella*.

Foram utilizados 35 camundongos BALB/c por grupo de imunização. A cultura e preparo das células foram realizados conforme descrito anteriormente (Curtiss & Kelly, 1987).

As linhagens de *S. typhimurium* X3987-18A, X4072-27F e X4217-10E foram incubadas sem agitação, durante à noite, a 37°C em 10ml de meio LB modificado. Na manhã seguinte, 2ml de cada cultura foram adicionados em "Erlenmeyers" com 60ml de meio LB modificado. Esta nova cultura foi incubada a 37°C com agitação constante (200 rpm) até DO₆₀₀ atingir 0,7. As bactérias foram então transferidas para tubos de centrifuga de 250ml e centrifugadas por 10 minutos a 3000rpm, a 4°C. Os sobrenadantes foram dispensados e as células ressuspensas em 60ml de tampão PBS. As células foram sedimentadas novamente por centrifugação, nas mesmas condições anteriores, e ressuspensas em 12ml de PBS (1/5 do volume inicial). Diluições em série da última resuspensão foram plaqueadas em meio LA para a determinação da UFC (unidade formadora de colônia) de cada resuspensão bacteriana.

Com o auxílio de uma seringa (3ml) e agulha apropriadas, 200µl das ressuspensões bacterianas (aproximadamente 10⁹ UFC) foram oralmente inoculadas em camundongos BALB/c. Foram ministrados dois inóculos orais, espaçados de 14 dias cada.

5.20. Coleta do soro e muco intestinal de camundongos BALB/c imunizados

Na figura a seguir está representado o esquema utilizado para a imunização oral e coleta de soro e muco intestinal de camundongos BALB/c. No total foram utilizados 35 animais por grupo de imunização. Em cada ponto de amostragem, além da coleta do soro de todos animais, 7 camundongos por grupo foram sacrificados para retirada dos órgãos e do muco intestinal. O processamento deste material está descrito no próximo tópico.

Imunizações orais



0	14	21	28	35	50	65	Dias
		↑	↑	↑	↑	↑	

Coleta sangue (todos animais) e sangria branca (7 animais)

A coleta de sangue foi realizada a partir da região sub-ocular. Foram coletados aproximadamente 500µl de sangue de cada animal. Para a coleta do soro, o sangue foi incubado a 37°C por aproximadamente 2 horas e, a seguir, a 4°C por uma hora ou até a formação do coágulo. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 1500rpm e a 4°C. O soro foi transferido para tubos de microcentrífuga novos e armazenado a -20°C.

5.21. Processamento dos órgãos e do muco intestinal de camundongos BALB/c.

Os órgãos de camundongos BALB/c foram processados conforme descrito em Curtiss & Kelly (1987). Os animais foram anestesiados e sacrificados em câmara com éter etílico. O sangue foi coletado da região ocular de cada animal. Cirurgicamente, foram retirados os intestinos e baço de cada animal. Os baços foram imediatamente transferidos para solução de meio de cultura mínimo com 15% de sacarose e mantidos nesta solução, em gelo, até posterior processamento. As placas de "Peyer" foram removidas cirurgicamente dos intestinos e imediatamente transferidas para solução de meio mínimo com sacarose (15%) e mantidas em gelo até posterior processamento. Os intestinos foram cortados em segmentos menores e friccionados com uma pinça esterilizada para a coleta do muco. Este foi transferido e homogeneizado imediatamente em solução salina com 0,5mM de PMSF e mantido em gelo até posterior processamento.

Os baços e as Placas de "Peyer" foram macerados completamente em meio de cultura mínimo com sacarose. Diluições foram inoculados em placas de MacConkey com 1% de lactose para a determinação da UFC total por órgão. Algumas colônias de *Salmonella* re-isoladas dos tecidos animais foram testadas quanto à presença do gene *It-*

k63 por hibridação de colônias e quanto à expressão desta toxina por "imunoblot" de colônias.

O muco intestinal foi processado para a posterior determinação do título de imunoglobulinas IgA. O muco em salina foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos. A estas preparações foram adicionados 5µl de solução 0,1M de PMSF e 0,1% (concentração final) de azida sódica. As preparações foram mantidas a -20°C até uso posterior.

5.22. Persistência de linhagens recombinantes de *Salmonella* nos tecidos de camundongos BALB/c.

Este experimento foi realizado para determinação da capacidade de linhagens recombinantes de *S. typhimurium* de invadir e persistir nos tecidos animais. O protocolo utilizado foi basicamente o descrito por Curtiss & Kelly (1987). Neste experimento, foram testadas as linhagens X3987-18A e X4217-10E, que foram as amostras que apresentaram maior capacidade de expressão da toxina LT-K63 "in vitro". A linhagem $\Delta cya \Delta crp asd+$ X3985 foi utilizada como controle.

As linhagens foram cultivadas e processadas como descrito no item "Imunização de camundongos BALB/c". Uma única dose de aproximadamente 10^9 UFC de bactérias foi inoculada oralmente no dia zero. O esquema deste experimento está representado na figura abaixo. Foram utilizados no total 25 camundongos por cada grupo sendo que, em cada ponto de amostragem, foram sacrificados 5 animais por grupo.

Inóculo via oral

↓

0	3	6	10	17	32	Dias
	↑	↑	↑	↑	↑	

Coleta e processamento de órgãos (5 animais/ ponto; total 25 animais/grupo)

O baço e as Placas de "Peyer" foram processados conforme descrito anteriormente. Diluições destas preparações foram inoculadas em placas com

MacConkey contendo 1% de lactose para a determinação da UFC. Após incubação por 18 horas a 37°C, o número de colônias bacterianas foi determinado.

5.23. ELISA

A resposta de anticorpos IgG e IgA contra antígenos de *Salmonella* e contra a toxina LT-K63 foi avaliada por ELISA. Os protocolos utilizados foram basicamente os descritos por Pizza et al. (1995a) e Di Tommaso et al. (1995). Em todos os experimentos foram utilizadas placas "Greiner" de média afinidade e 96 poços. A toxina LT purificada, utilizada como antígeno, foi gentilmente fornecida pela Dra. Maria Grazia Pizza (IRIS-Siena). Os antígenos de *Salmonella* foram preparados conforme descrito por Fayolle et al. (1994).

5.23.1. Detecção de IgG sérica anti-LT ou anti-*Salmonella*.

As placas foram incubadas por 2 horas, a 37°C, com 0,1ml de LT purificada (2µg/ml em PBS) ou antígenos de *Salmonella* (diluição 1/100 em tampão carbonato pH9,4). As placas foram bloqueadas por incubação (2 horas a 37°C) em 0,2ml de solução bloqueadora (1% BSA; 0,05% Tween 20 em PBS). Diluições seriadas do soro de camundongos BALB/c foram adicionadas, para um volume final de 0,1ml por poço, em tampão de incubação (0,1% BSA; 0,05% Tween 20 em PBS). As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C no caso de reações envolvendo LT, ou a 4°C por toda a noite, no caso da reações envolvendo antígenos de *Salmonella*. Este protocolo foi otimizado após vários testes utilizando-se diferentes condições e tempos de incubação. A quantidade de 0,1ml de anti-corpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina foi adicionado (diluição de 1:2000) em tampão de incubação. Esta última reação foi incubada por 2 horas a 37°C. O título de anticorpos foi determinada através da utilização do Kit ELISA da Sclavo Diagnósticos (Milano), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os resultados foram coletados após 30 minutos da adição do substrato, pela determinação da DO a 405nm. O substrato utilizado para estas reações foi o pNPP (p-Nitrofenil Fosfato).

Entre todos os passos de troca de soluções de incubação as placas foram lavadas por três vezes em solução de PBS com 0,05% Tween 20.

5.23.2. Detecção de IgA total nas secreções intestinais.

Para a detecção de IgA total nas secreções intestinais, as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C com 0,1ml de imunoglobulina anti-IgA (SIGMA) de camundongos (cadeia α -específica) em tampão carbonato pH9,6, na concentração de 1 μ g/ml. As placas foram bloqueadas nas mesmas condições descritas no item anterior. Diluições seriadas do muco intestinal foram adicionados no volume de 0,1ml por poço, em tampão de incubação (0,1% BSA; 0,05% Tween 20 em PBS). As placas foram incubadas com esta solução por 2 horas a 37°C e a seguir com 0,1ml por poço de anti-IgA (SIGMA) de camundongo conjugado com biotina (cadeia α -específica) na diluição de 1:5000, em tampão de incubação. Esta última solução foi substituída com 0,1ml de streptoavidina (SIGMA) conjugada com fosfatase alcalina (diluição 1:10000) em tampão de incubação. Após 1 hora de incubação a 37°C, a reação foi corada com Kit ELISA da Sclavo Diagnósticos (Milano) e a leitura efetuada a 405nm, após 15 minutos da adição do substrato. O substrato utilizado para estas reações foi o pNPP (p-Nitrofenil Fosfato).

Como no protocolo para titulação de IgG, entre cada passo de incubação ou troca de soluções, as placas foram lavadas três vezes com solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20.

5.23.3. Detecção e determinação do título de IgA anti-LT e anti-*Salmonella* específicas.

O protocolo utilizado foi basicamente o mesmo descrito para determinação do título de IgA total. No entanto, ao invés de anti-IgA, a toxina LT (2 μ g/ml) ou os antígenos de *Salmonella* foram aderidos à placa. Estes antígenos foram ligados à placa por incubação de 2 horas a 37°C. Os passos seguintes foram iguais ao protocolo anterior.

5.23.4. Cálculo do título de anticorpos

Foram considerados positivos valores de DO_{405} três vezes maiores que o pré-imune e maiores que 0,1.

5.24. Toxicidade de LT em cultura de células Y1 e teste de neutralização.

A metodologia utilizada foi realizada conforme descrito por Pizza et al. (1994a). As placas com células Y1 foram gentilmente cedidas por Maria Grazia Pizza (IRIS-BIOCINE-Itália). Preparações de proteínas periplasmáticas de *Salmonella* foram diluídas em série no meio de cultura apropriado e aplicadas às células em cultura. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 4,5% de CO_2 e a morte celular avaliada após 48 horas de incubação.

Para o teste de neutralização, realizado essencialmente como descrito por Pizza et al. (1994a), diluições seriadas do soro de camundongos BALB/c foram incubadas por 2 horas a 37°C, em meio de cultura apropriado, contendo 15µg/ml de toxina LT selvagem. As diluições foram aplicadas em placas de cultura de células Y1 e o efeito tóxico verificado após 45 horas de incubação a 37°C.

5.25. Obtenção e comparação de seqüências de DNA.

Seqüências de DNA ou aminoacídicas foram obtidas do banco de dados da "European Molecular Biology Organization" (EMBO), utilizando-se as facilidades do Centro de Computação do "Istituto Ricerche Immunobiologiche Siena"- Siena-Itália. A comparação entre seqüências de DNA foi efetuada utilizando-se o programa FASTA, disponível no banco de dados da EMBL.

5.26. Análises estatísticas.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o método de t-student caudal. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

5.27. Determinação do peso molecular de fragmentos de DNA.

O peso molecular de fragmentos de DNA foi determinado utilizando-se o programa "Eletro", elaborado e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Adilson Leite do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP. Este programa permite a construção de curvas padrão relativas a migração de fragmentos de DNA de pesos moleculares conhecidos, o que possibilita estimar o peso molecular de um dado fragmento de DNA.

6. RESULTADOS

6.1. Obtenção de transconjugantes de *S. typhimurium*.

Os plasmídios pUT/Cm, contendo os *operons eltAB* e *toxAB*, foram eletroporados na linhagem de *S. typhimurium* LT2. Nenhum eletrotransformante foi isolado nos diversos experimentos realizados, utilizando-se diferentes condições de eletroporação. Resultados semelhantes foram obtidos por De Lorenzo e colaboradores (comunicação pessoal) usando este sistema de minitransposons. Possivelmente, o tempo decorrido entre a introdução do plasmídio e sua perda não é suficiente para que ocorra a transposição. Com base nestes resultados, nos experimentos posteriores, plasmídios pUT quiméricos foram mobilizados e transferidos por conjugação para as linhagens de *S. typhimurium*. Neste último caso, recombinantes foram obtidos.

Os plasmídios pUT/Cm quiméricos (pUT/Cm:CT, CTr e LT) foram utilizados para a inserção dos *operons eltAB* e *toxAB* no genoma de *S. typhimurium* LT2. Os transconjugantes foram selecionados em meio mínimo sólido com Cm. O plasmídio pUT/asd:LT-K63 foi utilizado para a inserção do *operon* mutante *lt-k63* no genoma de linhagens atenuadas $\Delta cya \Delta asd \Delta crp$ de *S. typhimurium*. Os transconjugantes foram selecionados em meio mínimo sólido. A seleção de recombinantes neste último caso foi baseada na reversão da auxotrofia para o DAP.

A frequência de conjugação/transposição foi baixa sendo que, por experimento de conjugação, foram isolados entre 15 e 20 transconjugantes. Cada experimento de conjugação consistiu na mistura de 1ml de culturas bacterianas doadora e receptora, crescidas a 30°C com agitação constante (150rpm), durante toda a noite. A cultura mista foi então incubada a 30°C (sem agitação) e alíquotas de 200µl retiradas em diferentes espaços de tempo e inoculadas no meio seletivo apropriado. Detalhes deste experimento são descritos em Material e Métodos (item 5.6).

Um total de 300 transconjugantes, provenientes das diferentes linhagens de *S. typhimurium*, foram analisados quanto a pureza em meio MacConkey e Ektoen. Estes meios permitem verificar se os transconjugantes isolados estão contaminados com outros gêneros bacterianos. Os mesmos transconjugantes foram também analisados quanto a resistência à Amp (Amp^r). A resistência à Amp demonstra a ocorrência de

recombinação homóloga e não de transposição. Nestes casos, ocorre a integração de outras seqüências do plasmídio pUT, além do cassete de transposição.

A freqüência de transconjugantes resistentes à Amp foi variável e dependente da linhagem de *S. typhimurium* utilizada. A porcentagem de transconjugantes de *S. typhimurium* LT2 resistentes à Amp foi baixa (5,5%), independente do plasmídio pUT quimérico utilizado. Este resultado está de acordo com resultados descritos na literatura (Herrero et al., 1990). A média geral de transconjugantes $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium* resistentes à Amp foi elevada (32,34%) e contrasta com os resultados obtidos previamente. As freqüências individuais de transconjugantes resistentes à Amp são apresentadas no gráfico da Figura 7. Diferença significativa também foi notada entre as linhagens UK1 (X3987) e SR11 (X4072, X4217 e X4550). As freqüências foram de 26,1% e 43,4% em média, respectivamente.

A ocorrência de recombinação homóloga é uma característica indesejável e limita a utilização deste sistema para a integração de genes heterólogos em *Salmonella*, visando a construção de linhagens vacinais. Estas integrações são, muito provavelmente, decorrentes da baixa freqüência de transposição e da presença de seqüências homólogas entre os plasmídios pUT quiméricos e o genoma de *Salmonella*. A menos que especificado, os transconjugantes que foram analisados posteriormente são sensíveis à Ampicilina.

6.2. Análise da expressão das toxinas CT, LT e LT-K63 em transconjugantes de *S. typhimurium*.

Os transconjugantes de *S. typhimurium* LT2 Cm^r e Amp^r foram analisados quanto à expressão das toxinas selvagens LT e CT. Inicialmente, a produção destas toxinas foi avaliada por "Immunoblot" de colônias. As colônias transconjugantes foram crescidas aeróbica e anaerobicamente. O objetivo deste experimento foi comparar o nível de expressão das toxinas entre os diferentes transconjugantes e verificar se uma condição encontrada por *Salmonella* sp no interior do organismo hospedeiro ou seja, a anaerobiose, poderia influenciar o nível de expressão. Os transconjugantes que apresentaram maior capacidade de expressão destas toxinas foram posteriormente caracterizadas por "Western blot".

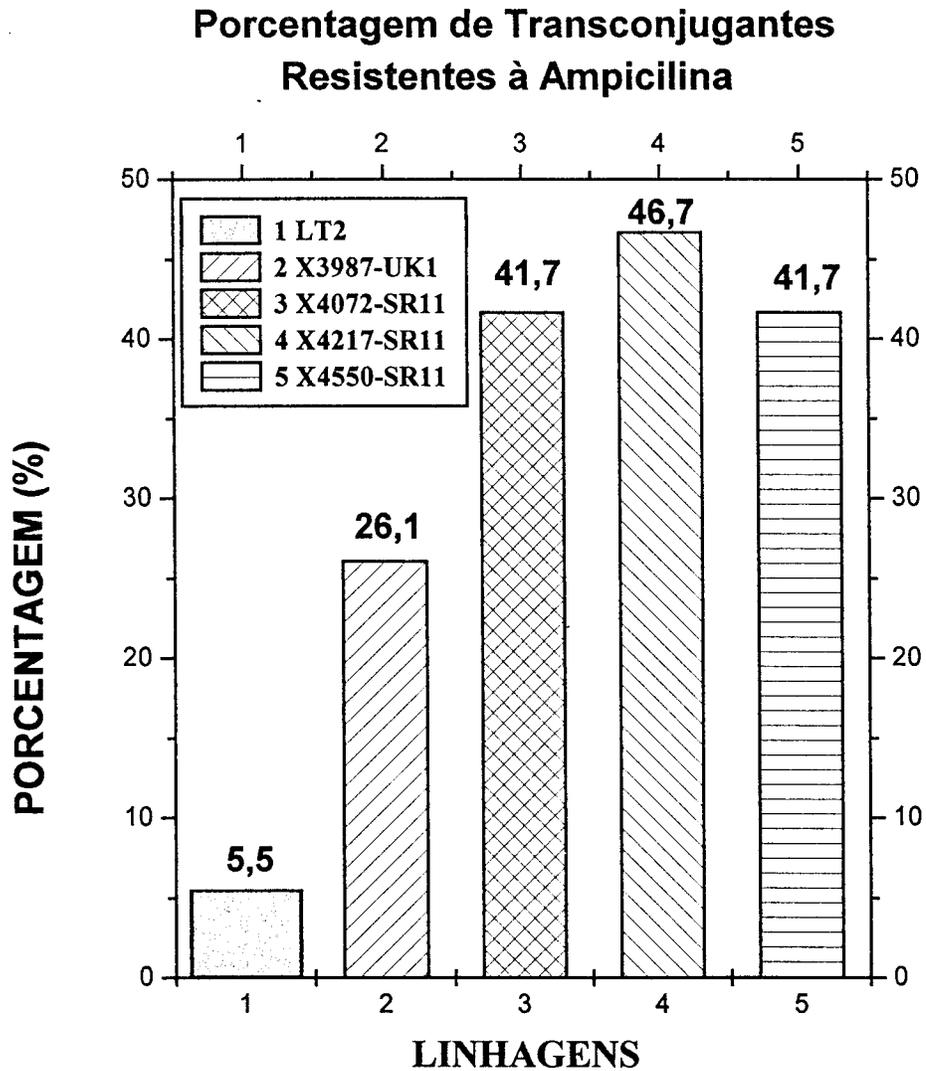


FIGURA 7. Porcentagem de transconjugantes de *S. typhimurium* resistentes à Ampicilina. Os transconjugantes foram isolados em placas contendo meio mínimo após conjugação com *E. coli* SM10 λ pir carregando plasmídios pUT recombinantes.

Nenhuma colônia transconjugante Cm^r, obtida com o plasmídio pUT/Cm:CT, produziu a toxina CT em níveis detectáveis por “immunoblot” (dados não mostrados). Somente 1 entre 15 transconjugantes foi positivo para a produção de CT, quando o plasmídio pUT/Cm:CT^r foi utilizado (dados não mostrados). Nestes dois plasmídios quiméricos, a expressão de CT é regulada pelo seu próprio promotor, cuja transcrição depende dos ativadores transcricionais ToxR e S. Estas proteínas regulatórias não estão presentes em *Salmonella* sp. Desta forma, a baixa ou a ausência da expressão de CT a níveis detectáveis é provavelmente devido a não produção dos reguladores ToxR e S. Um dado importante, entretanto, pôde ser tirado destes experimentos. A expressão de CT em um dos transconjugantes analisados é provavelmente devida à presença de um promotor a montante à inserção do mini-transposon.

Colônias de *S. typhimurium* LT2 transconjugantes (Cm^r), isoladas após conjugação com *E. coli* SM10λpir (pUT/Cm:LT), invariavelmente produziram a toxina LT. Não foram observadas grandes variações na quantidade de toxina expressa após crescimento em condições de aerobiose ou anaerobiose mas grandes variações foram observadas quando diferentes transconjugantes foram comparados. A Figura 8 demonstra experimento de “Western blot” onde proteínas totais e periplasmáticas de alguns transconjugantes foram reagidos com anticorpo policlonal anti-LT.

A toxina LT, quando expressa em linhagens de *E. coli*, permanece associada à célula e se localiza principalmente no espaço periplasmático (Betley et al., 1986). Grande quantidade da toxina LT está igualmente localizada no espaço periplasmático de *S. typhimurium* (Figura 8). Estes dados já haviam sido observados por Clements et al. (1986) na expressão da subunidade B de LT (LTB) em *Salmonella*. Em conjunto, estes dados indicam que o peptídeo sinal de LT é reconhecido por fatores de secreção de *S. typhimurium*.

A linhagem *S. typhimurium* LT2-2C, por apresentar maior expressão de LT quando comparada a outros transconjugantes, foi selecionada para posteriores caracterizações.

A expressão da toxina LT-K63 nos transconjugantes das linhagens X3987, X4072, X4217 e X4550 foi analisada por “immunoblots” de colônias crescidas em condições aeróbicas e anaeróbicas. Todas as linhagens DAP⁺ analisadas apresentaram capacidade de expressar LT-K63. O nível de expressão, no entanto, foi diferente em diferentes transconjugantes. O crescimento em condições aeróbica ou anaeróbica não evidenciou alterações consideráveis na expressão da toxina mutante. Os

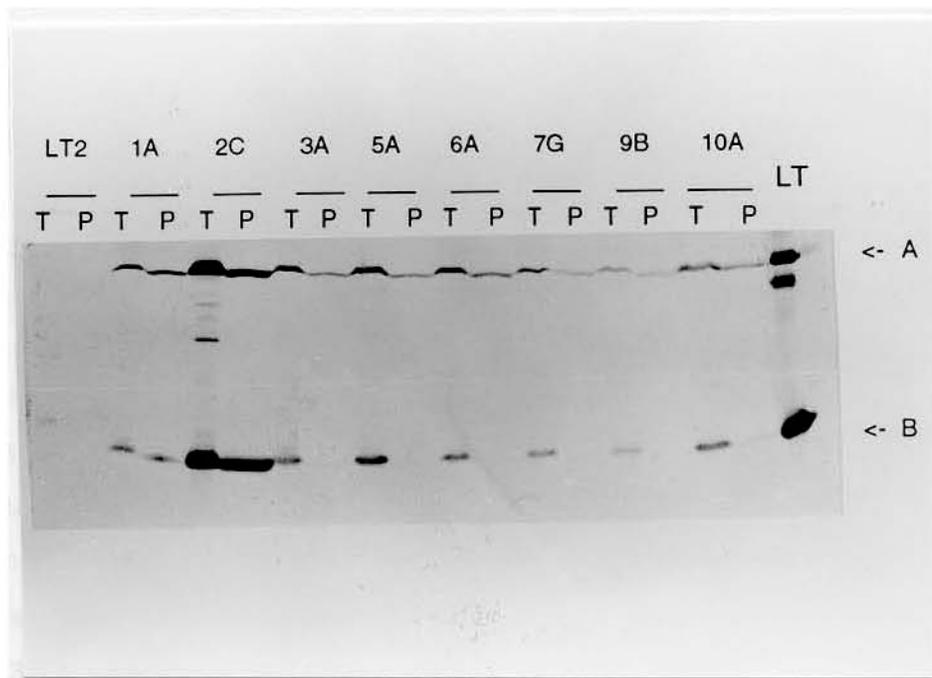


FIGURA 8. “Western blot” de extratos protéicos totais (T) e periplasmáticos (P) de diferentes transconjugantes da linhagem *S. typhimurium* LT2 resistentes ao Cloranfenicol. Os transconjugantes foram isolados após conjugação com *E. coli* SM10 λ pir contendo o plasmídeo pUT/Cm:LT. As culturas foram incubadas até o fim da fase logarítima e a quantidade de células bacterianas ajustada pela determinação da densidade ótica (DO) a 600nm. O anticorpo policlonal anti-LT, utilizado como anticorpo primário neste experimento, foi gentilmente cedido por Maria Grazia Pizza (IRIS-Siena-Itália). As letras A e B indicam as subunidades protéicas A e B da toxina LT, respectivamente.

transconjugantes que dentro da população selecionada, apresentaram maior nível de expressão da toxina, foram selecionados para posteriores análises.

A Figura 9 demonstra um “Western blot” utilizando anticorpo policlonal anti-LT, de transconjugantes das linhagens X3987 e X4217, previamente selecionados para altos níveis de expressão de LT-K63. Resultados similares foram obtidos com transconjugantes X4550 (dados não mostrados). Entre 30 a 50% dos transconjugantes destas três linhagens apresentaram médios ou altos níveis de expressão da toxina mutante, quando comparados com transconjugantes de baixa expressão.

Resultados diferentes foram obtidos quando a linhagem X4072 foi utilizada. Poucos isolados dentro da população de transconjugantes apresentaram alta capacidade de expressão da toxina LT-K63 (10%). A linhagem X4072 é derivada de X4217 através da cura do plasmídio de virulência (Schödel et al., 1994). Desta forma, estas duas linhagens são isogênicas, a não ser pela presença ou ausência deste plasmídio.

A Figura 10 apresenta um “Western blot” comparando a expressão de LT-K63 entre diferentes transconjugantes de X4072, X3987 e LT2-2C. Como pode ser observado, os transconjugantes X3987 produzem níveis de toxina comparáveis ao mutante LT2-2C. Estes níveis são maiores do que o expresso pelo transconjugante X4072-27F embora este tenha sido, entre os transconjugantes X4072, o que apresentou maior capacidade de produção de LT-K63. Os transconjugantes X4072-8B e 17B produziram baixa quantidade de LT-K63. A expressão da toxina mutante nos diferentes transconjugantes é proveniente da integração genômica de uma única cópia do *operon lt-k63*. Desta forma, as diferenças observadas provavelmente são decorrentes da transcrição de promotores presentes a montante deste *operon*.

O efeito do número de cópias do *operon lt-k63* na expressão da toxina mutante foi avaliado e comparado com a expressão exibida por transconjugantes, através de “Western blot” (Figura 11). As linhagens *S. typhimurium* X3988 e X3989 foram construídas por transformação de X3987 com os plasmídios pYA3074:LT-K63 e pYA3074:LT-K63, respectivamente. A expressão de LT-K63 nestas linhagens é derivada de 8 cópias (plasmídio pYA3074:LT-K63) e 200 cópias (plasmídio pYA3074:LT-K63) do *operon lt-k63* por cromossomo, aproximadamente. Os transconjugantes X3987-18A e LT2-2C exibem expressão intermediária entre X3988 e X3989. O transconjugante X4072-27F apresenta expressão comparável a X3988. Nas condições utilizadas, este teste não foi sensível o suficiente para detectar a expressão de LT-K63 no transconjugante X3987-6D (Figura 11).

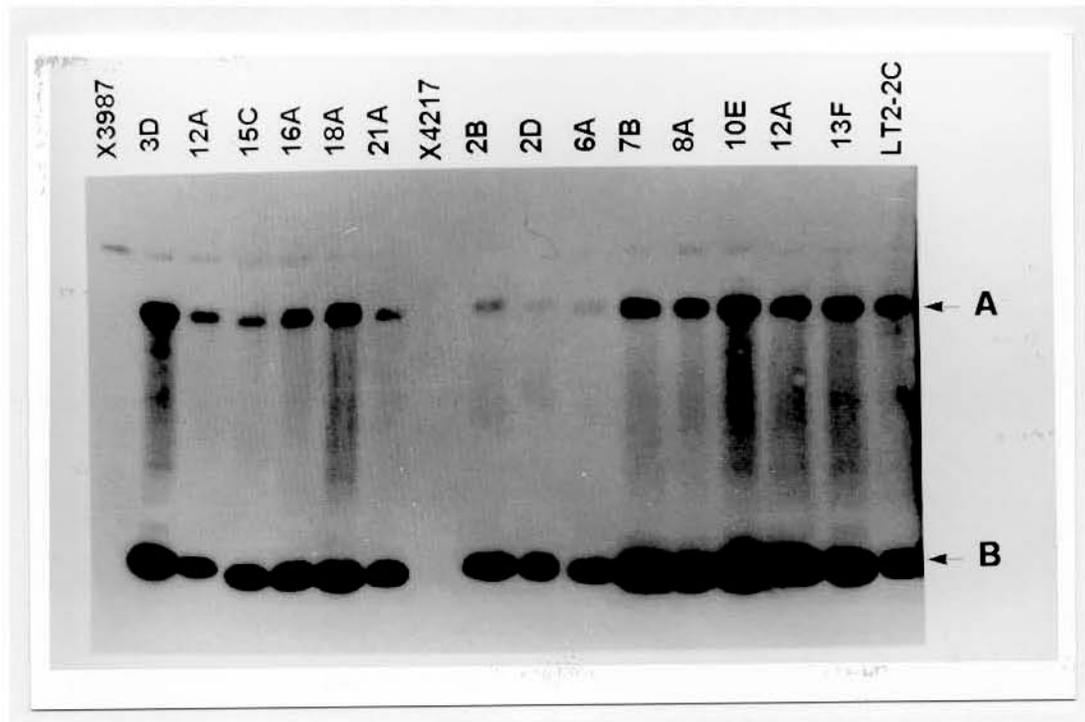


FIGURA 9. Extratos protéicos de proteínas totais de transconjugantes *S. typhimurium* X3987 e X4217 Asd+, isolados após conjugação com *E. coli* SM10 λ pir contendo o plasmídeo pUT/asd:LT-K63. As culturas foram incubadas até o final da fase logarítima e o número de células bacterianas ajustada através da determinação da DO_{600nm}. O anticorpo policlonal anti-LT foi gentilmente cedido por Maria Grazia Pizza (IRIS-Siena-Itália). A e B indicam as subunidades protéicas A e B da toxina LT, respectivamente.

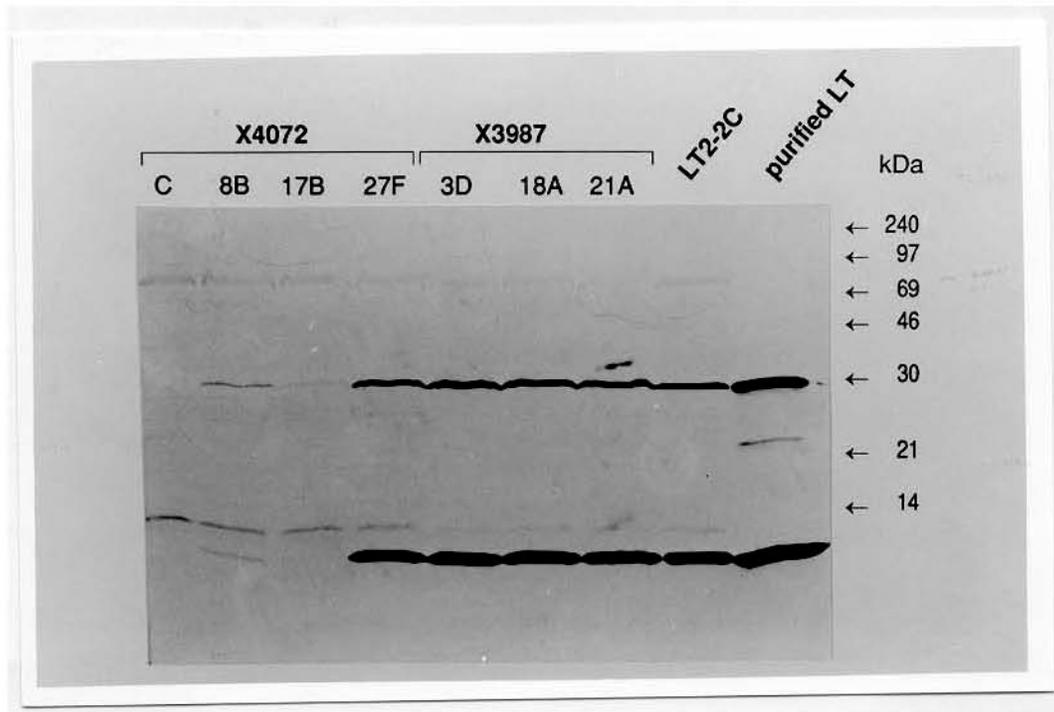


FIGURA 10. Extratos protéicos de proteínas totais de transconjugantes *S. typhimurium* X3987 e X4072 Asd+, isolados após conjugação com *E. coli* SM10 λ pir contendo o plasmídeo pUT/asd:LT-K63. As culturas foram incubadas até o final da fase logarítima e o número de células bacterianas ajustada através da determinação da DO_{600nm}. O anticorpo policlonal anti-LT foi gentilmente cedido por Maria Grazia Pizza (IRIS-Siena-Itália).

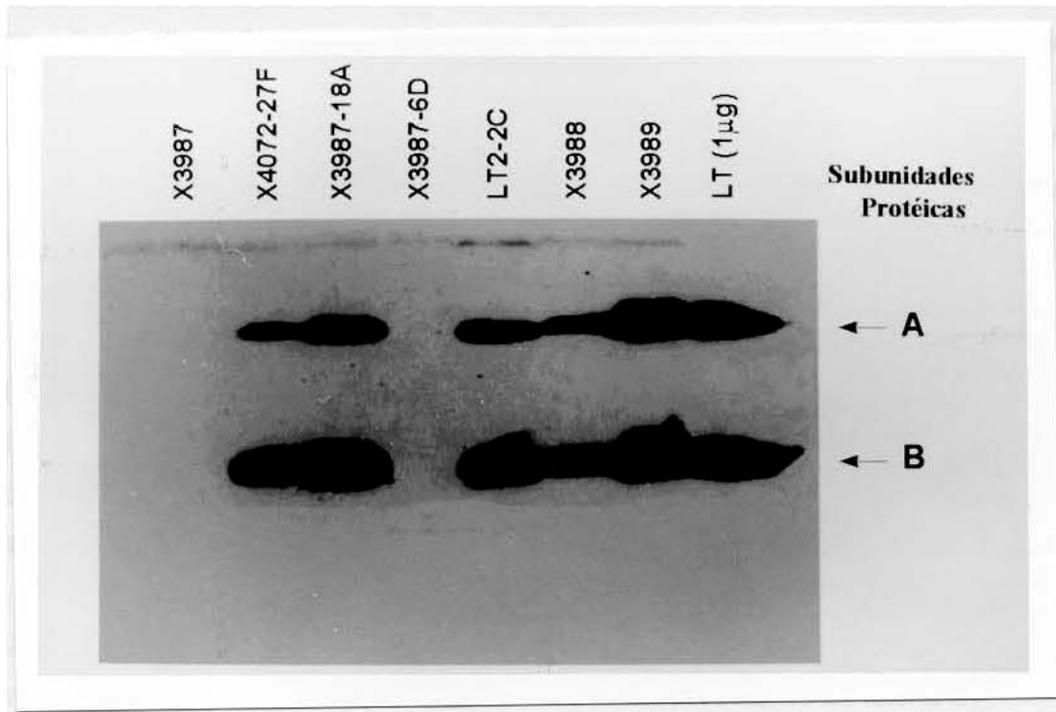


FIGURA 11. Comparação da expressão de LT-K63 entre transconjugantes e as linhagens de *S. typhimurium* X3988 e X3989, transformadas com os plasmídios quiméricos pYA3074:LT-K63 (baixo número de cópias) e pYA3137:LT-K63 (alto número de cópias), respectivamente. Extratos protéicos de proteínas totais foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e reagidos com anticorpo policlonal anti-LT, gentilmente cedido por Maria Grazia Pizza (IRIS-Siena-Itália). As culturas bacterianas foram incubadas até o final da fase logarítima e o número de células ajustado através da determinação da DO_{600nm} . A e B indicam as subunidades protéicas A e B da toxina LT, respectivamente.

6.3. Montagem da toxina LT em *S. typhimurium*.

A utilização de linhagens recombinantes de *Salmonella* como carreadoras de proteínas heterólogas para o sistema imunológico exige que tais proteínas adquiram sua conformação estrutural nativa. Proteínas com conformação diferente da nativa quase sempre exibem alterações em epítomos antigênicos que comprometem a eficiência da resposta imunológica.

A toxicidade exibida pela toxina LT em cultura de células adrenais Y1 é dependente de sua estrutura terciária AB5. Desta forma, um método para verificar a montagem correta de LT em *S. typhimurium* é verificar se extratos protéicos de linhagens recombinantes, produtoras de LT, são tóxicos a células Y1 em cultura.

Extratos periplasmáticos de três transconjugantes *S. typhimurium* LT2 produtores de LT (LT2-1A, 2C e 5A) foram analisados quanto à toxicidade. Os resultados são exibidos na Tabela 3. Extrato periplasmático de *S. typhimurium* LT2 foi utilizado como controle negativo. Foi verificado efeito tóxico nos extratos de todas as linhagens recombinantes. O título de toxicidade foi dependente da quantidade de toxina produzida.

Tabela 3: Teste de toxicidade de extratos periplasmáticos de transconjugantes de *S. typhimurium* LT2, obtidos com o plasmídio pUT/Cm:LT, produtores da toxina LT.

Linhagens	Diluições ¹										
	ND ²	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/512	1/1024	1/2048
LT2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LT2-1A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
LT2-2C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LT2-5A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Neste experimento, preparações de proteínas periplasmáticas foram tratadas com tripsina e aplicadas (diferentes diluições) em cultura de células Y1. A morte celular foi avaliada após 48 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 4,5% de CO₂. Os sinais positivos indicam diluições onde a toxicidade foi observada. Extrato periplasmático da linhagem *S. typhimurium* LT2 foi utilizado como controle negativo.

1. Diluições seriadas dos extratos periplasmáticos em meio de cultura de células Y1.

2. ND: Não diluído

Estes resultados preliminares indicam que a toxina LT em *Salmonella*, é corretamente montada em sua estrutura final AB5.

6.4. Caracterização Molecular dos Transconjugantes.

Devido ao grande número de transconjugantes e ao objetivo do trabalho, as caracterizações moleculares foram concentradas nos transconjugantes $\Delta cya \Delta crp$ de *S. typhimurium*. Outras linhagens foram incluídas como controle ou quando necessárias.

6.4.1. Presença do plasmídio pUT

Preparações de DNA plasmidiano de diversos transconjugantes foram analisadas para verificar a possibilidade da presença episomal do plasmídio pUT/asd:LT-K63. Um total de 50 transconjugantes derivados das diferentes linhagens de *S. typhimurium* foram analisados. Em nenhum destes foi detectada a presença do plasmídio. Desta forma, o plasmídio pUT funciona como suicida em *S. typhimurium*.

6.4.2. Quanto a inserção do operon *lt-k63*.

Uma característica do transposon Tn5 é não exibir preferência com relação ao sítio de inserção (Berg, 1989). Desta forma, a utilização deste transposon para a inserção de genes heterólogos no genoma bacteriano é esperada ocorrer ao acaso. Assim sendo, para caracterizar a casualidade de inserções do operon *lt-k63*, DNA genômico de diferentes transconjugantes foram digeridos com Sall, os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, imobilizados em membranas de nylon e hibridados com sonda molecular LT específica. A enzima Sall foi escolhida porque não existem sítios internos desta no gene *lt-k63* mas sim, em sua extremidade 3'. Surpreendentemente, em todos transconjugantes X3987, X4217 e X4550 selecionados para elevada expressão de LT-K63, a sonda LT hibridou com um fragmento de aproximadamente 22Kb (Figura 15A). A membrana desta Figura foi também reagida com a sonda ASD. O único transconjugante analisado neste experimento, que produz baixos níveis de LT-K63 é o X3987-6D.

Para melhor analisar estes resultados, DNA genômico destes transconjugantes foi digerido com Sall e XhoI e em seguida, hibridados com sonda LT. A enzima XhoI foi escolhida por ser relativamente rara no genoma de *Salmonella* e por digerir o plasmídeo pUT/asd:LT-K63 em um único sítio, externo ao *operon It-k63* (Figura 4). A Figura 12 mostra como exemplo o resultado obtido com os transconjugantes 3D, 6D, 18A e 21A, derivados da linhagem de *S. typhimurium* X3987 e os transconjugantes LT2-1A, 2C e 5A, derivados de *S. typhimurium* LT2. Neste experimento, dois grupos podem ser diferenciados: (1) transconjugantes produtores de níveis relativamente altos de LT ou LT-K63 cuja sonda LT hibrida com fragmento de aproximadamente 12Kb (transconjugantes X3987-3D, 18A, 21A e LT2-2C e; (2) produtores de baixos níveis de LT ou LT-K63, onde a sonda LT reconhece fragmentos de pesos moleculares heterogêneos (transconjugantes X3987-6D, LT2-1A e 5A). A Figura 13 exibe os resultados obtidos com transconjugantes X4217 e X4550. Os únicos transconjugantes desta Figura que exibem expressão de altos níveis de LT-K63 são X4217-10E e LT2-2C. A sonda LT reconheceu fragmentos de peso molecular semelhante nestes dois transconjugantes.

Embora não conclusivos, estes resultados sugerem que transconjugantes cuja característica é a alta expressão de LT-K63 apresentam o *operon It-k63* inserido em uma região específica do genoma, comum a todos.

Os resultados obtidos com transconjugantes X4072 foram diversos. DNA genômico de transconjugantes derivados desta linhagem foram digeridos com Sall e hibridados com sonda LT. Os resultados estão descritos na Figura 14. Fragmentos de tamanho heterogêneos, em pares de bases, foram reconhecidos pela sonda LT. Dentre os transconjugantes analisados neste experimento, o único que apresenta maior capacidade de expressão de LT-K63 é X4072-27F. Vale ressaltar que, embora transconjugantes derivados desta linhagem apresentem um padrão de hibridação com a sonda LT mais heterogêneo do que as demais, foi observada também a repetição de bandas em diferentes transconjugantes. Estas observações associadas à alta porcentagem de transconjugantes resistentes à Ampicilina (Figura 7), derivados desta linhagem, sugerem que integrações também podem ter ocorrido em sítios preferenciais de recombinação ("hot spots"). Como discutido anteriormente, tais integrações são provavelmente devidas a processo de recombinação homóloga.

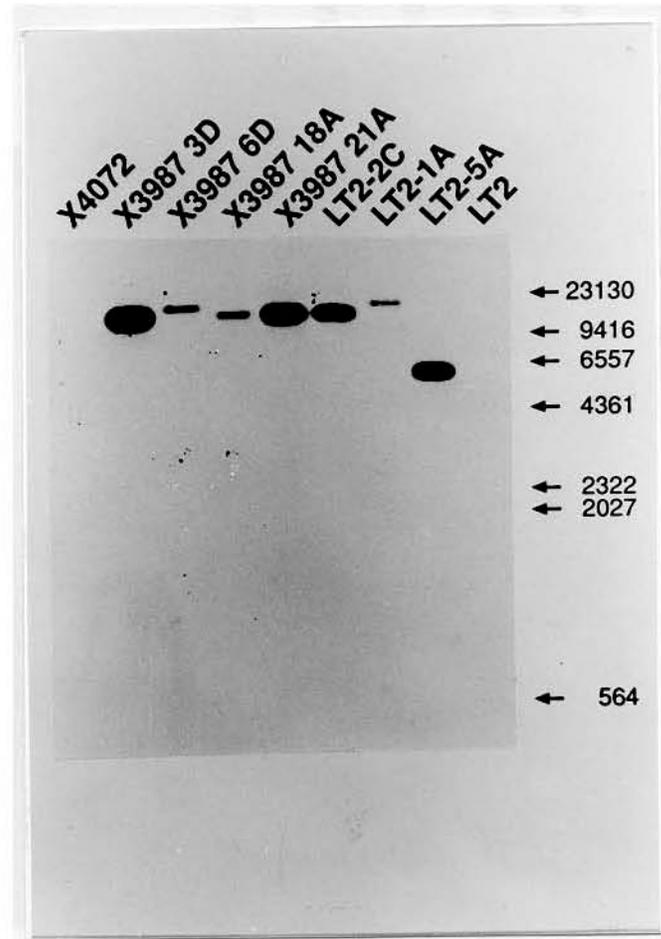


FIGURA 12. "Southern blot" de DNA genômico de transconjugantes de *S. typhimurium* X3987 e LT2, digeridos com as enzimas de restrição Sall e XhoI e hibridados com sonda LT específica. Os transconjugantes X3987-3D, 18A, 21A e LT2-2C são produtores de altos níveis de LT-K63. Os transconjugantes X3987-6D, LT2-1A e LT2-5A são produtores de baixos níveis de LT-K63.

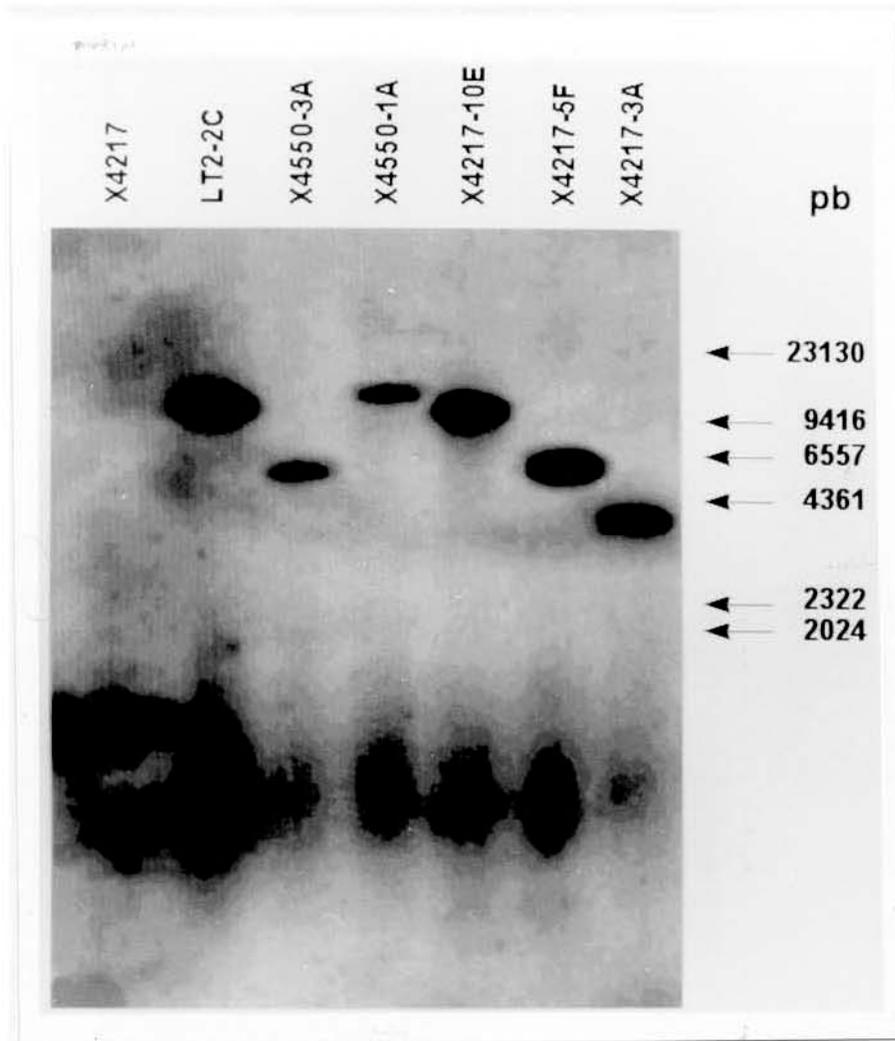


FIGURA 13. "Southern blot" de DNA genômico de transconjugantes de *S. typhimurium* X4217 e X4550, digeridos com as enzimas de restrição Sall e XhoI e hibridados com sonda LT específica. Os transconjugantes LT2-2C e X4217-10E são produtores de altos níveis de toxinas LT e LT-K63, respectivamente.

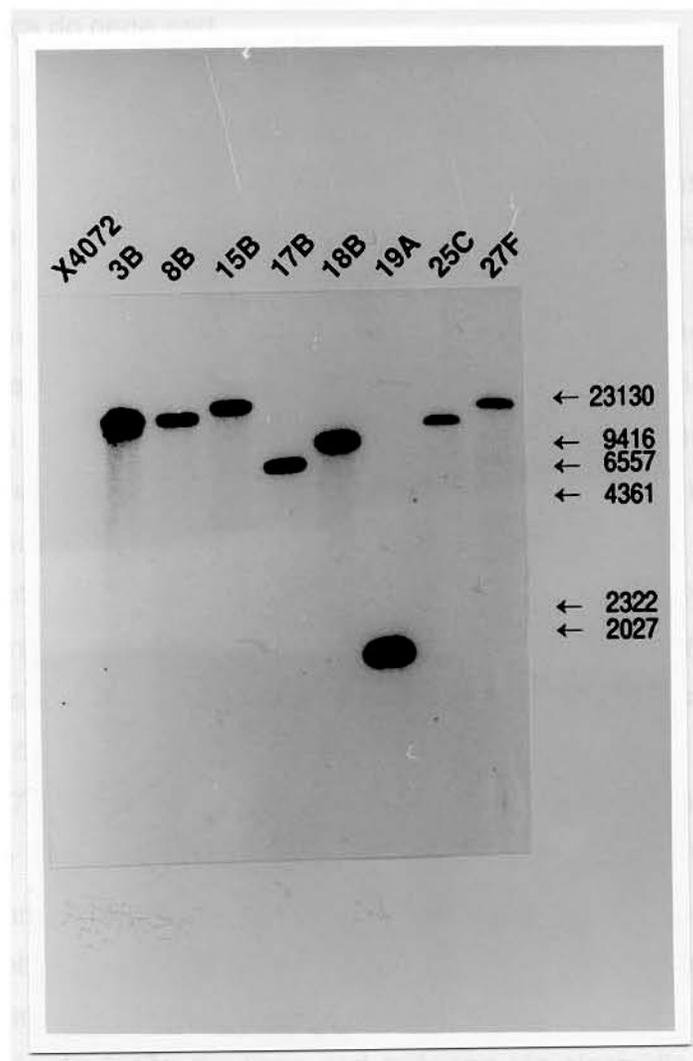


FIGURA 14. "Southern blot" de DNA genômico de transconjugantes de *S. typhimurium* X4072, digeridos com *Sall* e hibridados com sonda LT específica. O único a apresentar elevada expressão de LT-K63 é o transconjugante X4072-27F.

6.4.3. Presença do gene *asd*.

A introdução de deleções no gene *asd* em linhagens $\Delta cya \Delta crp$ de *S. typhimurium*, para criação de um sistema de estabilização de genes heterólogos, foi previamente descrita (Galán et al., 1990). Não existem, no entanto, dados na literatura demonstrando a extensão destas deleções.

Neste trabalho, foi descrita a modificação do sistema minitransposon Tn5 para possibilitar a utilização do gene *asd* na construção e seleção de linhagens recombinantes. Esta seleção foi baseada na re-introdução deste gene em linhagens Δasd de *S. typhimurium* e em consequência, na reversão de auxotrofia para o DAP. Para comprovar a re-introdução do gene *asd* nos transconjugantes, DNA genômico destes foram hibridados com sonda molecular *asd* específica. Em todos os casos, os transconjugantes foram positivos enquanto que as linhagens de *S. typhimurium* Δasd parentais foram negativas. Como exemplo, a Figura 15 mostra o resultado da hibridação de DNA genômico de transconjugantes da Figura 12 em adição a transconjugantes derivados de X4217 e X4550, com a sonda ASD. As membranas utilizadas neste experimento haviam sido previamente reagidas com a sonda LT. As linhagens X3987, X4072 e X4217 foram utilizadas como controle negativo. Comparando-se as Figuras 12 e 15B, pode-se observar o aparecimento de bandas extras nesta última, que correspondem ao gene *asd*. Estes resultados demonstram que a reversão da auxotrofia ao DAP foi devida à introdução do gene *asd* exógeno via plasmídio pUT/*asd*:LT-K63. Adicionalmente, estes resultados demonstram que as deleções no gene *asd* nas linhagens parentais, envolvem toda a região estrutural do mesmo.

6.4.4. Hibridação com seqüências do plasmídio pUT.

Até o momento, o único fator considerado para a diferenciação entre eventos de transposição e recombinação homóloga nos transconjugantes, foi a resistência à Ampicilina. A ocorrência de um único "crossing over" entre o plasmídio pUT e o DNA bacteriano leva a integração da seqüência inteira deste plasmídio e consequentemente do gene de resistência à Ampicilina (gene *bla*). Estes transconjugantes são portanto resistentes a este antibiótico. A ocorrência de duplo "crossing over" entretanto, pode originar transconjugantes onde o gene *bla* não esteja integrado. Desta forma, a simples verificação da sensibilidade à Ampicilina não prova que o evento responsável pela

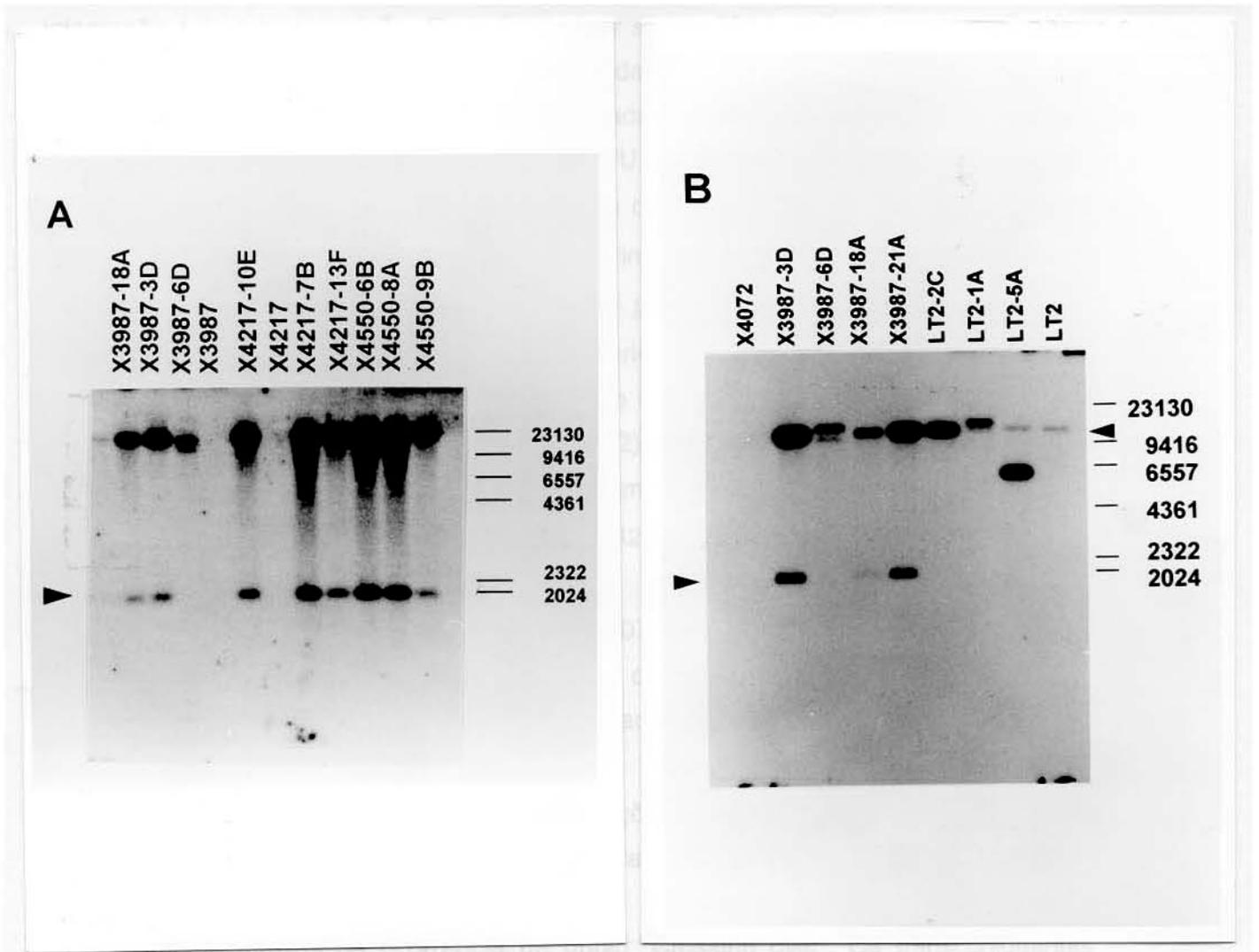


FIGURA 15. "Southern blot" de DNA genômico de transconjugantes *S. typhimurium* X3987, X4217, X4550 e LT2 digeridos com Sall (painel A) ou Sall e XhoI (painel B) e hibridados com a sonda ASD. As membranas haviam sido previamente reagidas com a sonda LT. As setas indicam a posição dos fragmentos hibridados com a sonda ASD.

integração seja a transposição. Para determinar se seqüências do plasmídio pUT além do cassete de transposição estavam integradas no genoma, DNA genômico dos transconjugantes das figuras 12, 13 e 14 foram analisados por "Southern blot" usando-se como sonda o plasmídio pUT/Km e a sonda PUT. O único entre os transconjugantes derivados da linhagem X3987 que não hibridou com esta sonda, foi X3987-6D (dados não mostrados). Foram analisados, neste experimento, os transconjugantes X3987-3D, 6D, 18A e 21A. O resultado desta hibridação para o transconjugante X3987-18A é apresentado na Figura 26 e será discutido posteriormente. O transconjugante X3987-6D é diferente dos demais em relação à expressão da toxina LT-K63 (baixa; Figura 11) e com relação a inserção do gene *lt-k63* (Figura 12). DNA genômico dos transconjugantes *S. typhimurium* LT2-1A e 5A não hibridaram com esta sonda enquanto que o DNA do transconjugante LT2-2C hibridou. O DNA de X4217-10E também foi positivo para este teste (Figura 26).

DNA genômico dos transconjugantes X4072-8B, 15B e 19A não hibridaram com as sondas pUT/Km e PUT, enquanto que o DNA dos demais transconjugantes da Figura 14 hibridaram (dados não mostrados). O resultado deste teste para o transconjugante X4072-27F é apresentado na Figura 26.

Estes resultados sugerem que as integrações do genes *lt-k63* e *asd* em parte dos transconjugantes sensíveis à Ampicilina ocorreram por um processo de recombinação homóloga. Nestes, seqüências do plasmídio pUT foram integradas no genoma provavelmente através da ocorrência de duplo "Crossing over". Os transconjugantes negativos para estas hibridações não contêm seqüências do plasmídio pUT integradas o que sugere que as inserções ocorreram por transposição.

6.4.5. Presença do plasmídio de virulência.

As linhagens X3987, X4217 e X4550 apresentam um plasmídio de alto peso molecular (90Kb) que está envolvido com a virulência (Gulig e Curtiss, 1987). Este plasmídio é, portanto, denominado plasmídio de virulência. A linhagem X4072 não apresenta este plasmídio (Shödel et al., 1994) e, portanto, é mais atenuada com relação à virulência do que as demais linhagens $\Delta cya \Delta crp$ de *S. typhimurium* utilizadas. Apesar de estável, foi verificado que colônias livres de plasmídio originam-se após sucessivas culturas. O *locus* de virulência melhor caracterizado nestes plasmídios é o *locus spv*. Um

dos genes deste *locus* (*spvB*) foi amplificado por PCR e usado como sonda molecular para verificar a presença deste plasmídio em transconjugantes. Foram analisados diversos transconjugantes tendo sido as linhagens parentais utilizadas como controle. DNA genômico de todos transconjugantes derivados de *S. typhimurium* LT2, X3987, X4217 e X4550 hibridaram com a sonda *spvB*. Como exemplo, a Figura 16 exhibe o resultado obtido com transconjugantes X3987 e LT2. Neste experimento, a linhagem X4072 foi utilizada como controle negativo. Invariavelmente, os transconjugantes X4072, assim como a linhagem parental, não hibridaram com esta sonda.

Estes resultados sugerem que o plasmídio de virulência não foi perdido durante as manipulações das linhagens. A sonda utilizada (*spvB*) foi dirigida contra uma seqüência específica deste plasmídio e, portanto, não se pode descartar a possibilidade de que outras seqüências do plasmídio de virulência, não presentes no *locus spv*, estejam integradas no DNA cromossômico de *S. typhimurium* X4072 e transconjugantes.

6.4.6. Seqüenciamento da extremidade 5' do fragmento LT-K63 (BamHI/ Sall).

Usando o banco de dados (Programa FASTA) da EMBO, a existência de seqüências homólogas entre o plasmídio pUT/*asd*:LT-K63 e o genoma de *Salmonella* foi analisada. Foi detectada a existência de similaridade entre a extremidade 5' do gene LT (código de acesso M61015) e seqüência do plasmídio pSC101 de *Salmonella* (código de acesso X01654). Para determinar se esta seqüência de DNA estava presente no plasmídio pUT/*asd*:LT-K63, 300pb (pares de bases) da extremidade 5' do *operon It-k63* foram seqüenciados. A seqüência obtida foi depositada no banco de dados do IRIS ("Istituto Ricerche Immunobiologiche Siena"-Siena-Itália) e analisada quanto à similaridade com seqüências do banco de dados da EMBO. A presença de similaridade entre a extremidade 5' de *It-k63* e seqüência do plasmídio pSC101 foi confirmada. Dos 300pb seqüenciados, 136bp apresentaram similaridade (98,5% de identidade) com um quadro de leitura aberto, supostamente pertencente à origem de mobilização do plasmídio pSC101 (Bernardi & Bernardi, 1984). Foram ainda encontradas similaridades (80,7% de identidade) com a origem de mobilização do plasmídio ColE1 (código de acesso X15873) além da seqüência 5' de LT. A existência de seqüências com alto grau de similaridade entre um plasmídio de *Salmonella* (pSC101) e a extremidade 5' do

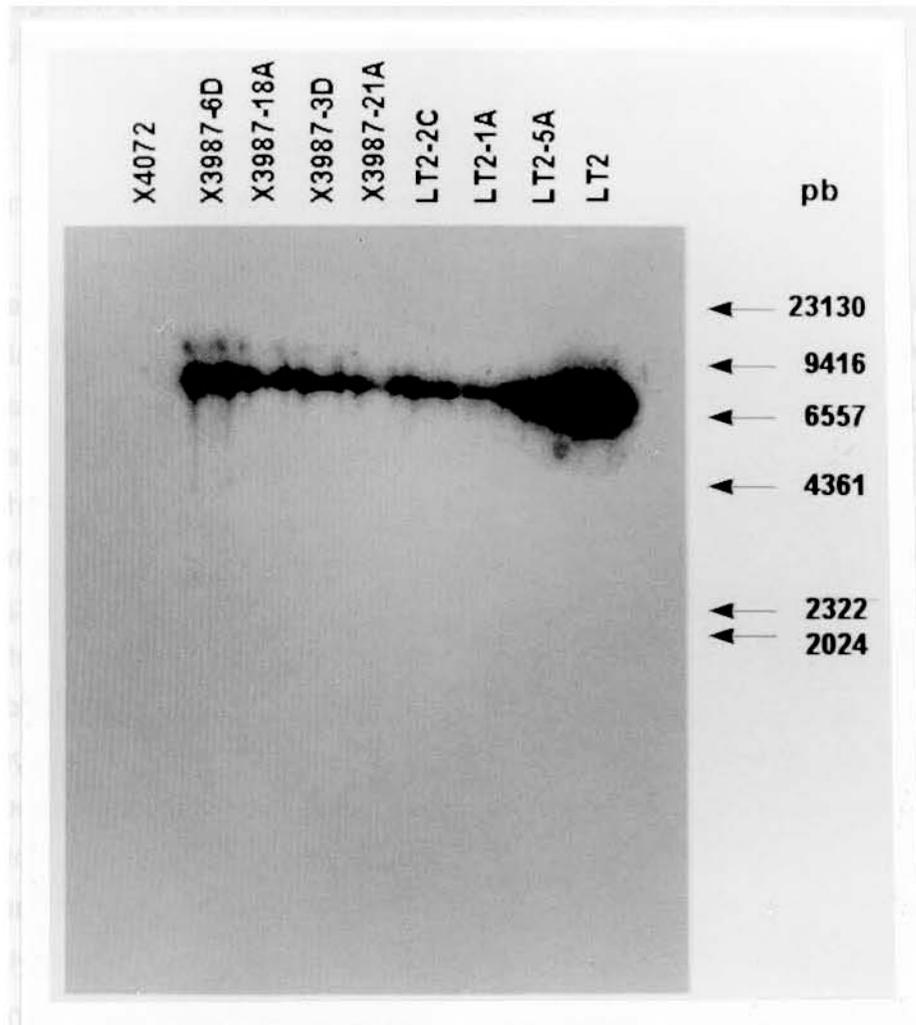


FIGURA 16. "Southern blot" de DNA genômico de transconjugantes *S. typhimurium* X3987 e LT2, digeridos com Sall e XhoI e hibridados com sonda SPVB. A linhagem *S. typhimurium* X4072 foi utilizada como controle negativo.

operon It-k63 sugerem que tais seqüências possam estar envolvidas nas recombinações entre o plasmídio pUT/*asd*:LT-K63 e o plasmídio de virulência de *S. typhimurium*.

6.5. Caracterização fenotípica dos transconjugantes.

A presença de lipopolissacarídeos completos (LPS lisos) é importante para a manutenção da imunogenicidade e capacidade de *S. typhimurium* em persistir nos tecidos do hospedeiro (Cárdenas & Clements, 1992). Seguidos cultivos em meios de cultura artificiais e diferentes técnicas de manipulação genética podem propiciar a seleção de linhagens com LPS incompletos (LPS rugosas). Como os transconjugantes de *S. typhimurium* foram submetidos a tais manipulações, o perfil eletroforético de LPS foi avaliado por SDS-PAGE e comparado com a linhagem parental. Todos os transconjugantes avaliados foram idênticos à linhagem parental e exibiram LPS lisos (dados não mostrados).

A mutação para adenilato ciclase (*cya*), responsável pela atenuação da virulência nestas linhagens, foi verificada nos diferentes transconjugantes, através da capacidade de crescimento em placas com meio mínimo contendo maltose como única fonte de carbono. Mutantes *cya* e/ou *crp* de *S. typhimurium* são incapazes de fermentar maltose (Curtiss & Kelly, 1987). Todos os transconjugantes Δcya Δcrp testados, assim como as respectivas linhagens parentais, foram incapazes de crescer em placas contendo maltose como única fonte de carbono. Resultado contrário foi obtido com a linhagem *S. typhimurium* LT2, que foi usada como controle positivo.

6.6. Mapeamento Parcial do *operon It-k63*.

O mapa de restrição do genoma de *S. typhimurium* LT2 para as enzimas XbaI e BlnI (AvrII), resolvido por eletroforese de campo pulsado (PFGE), foi previamente descrito (Liu & Sanderson, 1992; Liu et al., 1993) e é apresentado na Tabela 4. Nesta linhagem, existem poucos sítios de reconhecimento para estas enzimas (24 sítios XbaI e 12 para AvrII ou seu isoesquizômero BlnI). Os plasmídios pUT/Cm:LT e pUT/Asd:LT-K63 (Figuras 1 e 4) apresentam dois sítios XbaI, sendo um deles interno ao gene *eltA* (*ItkA*), e dois sítios AvrII, localizados nas repetições invertidas do mini-elemento de transposição

TABELA 4. Mapa de restrição da linhagem *S. typhimurium* LT2 para as enzimas XbaI e AvrII. Extraído de Liu et al. (1993).

Enzima XbaI			Enzima AvrII		
Designação do fragmento	Tamanho do fragmento (em Kb)	Posição no Mapa (em Centissomos)	Designação do fragmento	Tamanho do fragmento (em Kb)	Posição no Mapa (em Centissomos)
X	708	98,6 a 13,0	A	1580	91,0 a 23,9
A	800	13,0 a 29,7	B	790	23,9 a 40,3
B	49	29,7 a 30,7	C	830	40,3 a 57,5
C	243	30,7 a 35,8	D	180	57,5 a 61,3
D	457	35,8 a 45,3	E	590	61,3 a 73,7
E	224	45,3 a 50,0	F	4,1	73,7 a 73,8
F	104	50,1 a 52,1	G	1,8	73,8 a 73,8
G	225	52,1 a 56,8	H	543	73,8 a 85,1
H	35	56,8 a 57,5	I	1,8	85,1 a 85,1
I	20	57,5 a 59,7	J	90	85,1 a 87,0
J	76	57,5 a 59,7	K	145	87,0 a 90,0
K	6,6	57,5 a 59,7	L	46	90,0 a 91,0
L	<1	57,5 a 59,7	pSLT	90	Plasmídio
M	675	59,7 a 73,8			
N	233	73,8 a 78,6			
O	72	78,6 a 80,1			
P	70	80,1 a 81,6			
Q	48	81,6 a 85,0			
R	65	81,6 a 85,0			
S	32	81,6 a 85,0			
T	18	81,6 a 85,0			
U	6,4	85,0 a 85,1			
V	275	85,1 a 91,0			
W	365	91,0 a 98,8			
pSLT	90	Plasmídio			

Tn5. Desta forma, a comparação dos perfis eletroforéticos dos transconjugantes com os das linhagens parental e LT2 foi utilizada para o mapeamento parcial do *operon eltAB* ou *lt-k63*. DNA genômico de transconjugantes foram digeridos com as enzimas XbaI e AvrII, separados por eletroforese de campo pulsado e hibridados com as sonda LT (Figuras 17 e 19) e PSC (Figuras 18 e 19).

O perfil de PFGE de DNA genômico da linhagem *S. typhimurium* LT2 para as enzimas XbaI e AvrII foi idêntico ao descrito previamente na literatura (Liu et al., 1993). Poucos sítios destas enzimas foram observados nas linhagens X3987, X4072 e X4217. Os perfis eletroforéticos destas linhagens foram, no entanto, diferentes do apresentado por *S. typhimurium* LT2, embora alguns sítios parecem conservados (Figuras 17A, 18A e 19A).

6.6.1. Mapeamento parcial do *operon lt-k63* nos transconjugantes derivados de *S. typhimurium* X3987 UK-1.

Os experimentos de “Southern blot” utilizando as sondas LT e PSC (Figuras 17 e 18) demonstraram que a inserção do *operon lt-k63* nas linhagens X3987 3D, 18A e 21A ocorreu no plasmídio de virulência. Após digestão com XbaI, o fragmento de 90Kb que corresponde a este plasmídio é visível na linhagem parental mas não nos transconjugantes. Bandas de 70 e 40Kb foram reconhecidas pela sonda PSC nos transconjugantes 3D e 18A enquanto que bandas de 90 e 40Kb foram reconhecidas por esta sonda no transconjugante 21A (Figura 18B). Possivelmente, o reconhecimento de duas, ao invés de uma única banda, é devido a ocorrência de digestão parcial. Com exceção de X3987-6D, a sonda LT não hibridou com o transconjugante X3987-3D (Figura 17B) ou com os demais transconjugantes X3987, quando DNA genômico destes foi digerido com XbaI (dados não mostrados). A explicação para este fato é a presença de dois sítios para esta enzima, flanqueando o *operon lt-k63* e o gene *asd* (Figura 4) Para verificar esta hipótese, DNA genômico das amostras LT2-2C, X4072-27F, X3987-3D, 6D, 18A e 21A foi digerido com XbaI, os fragmentos separados em gel de agarose 0.8%, transferidos para membrana de nylon e hibridados com sonda LT. Um único fragmento de 3100kb foi reconhecido por esta sonda nos transconjugantes X4072-27F, X3987-3D, 18A e 21A mas não nos transconjugantes LT2-2C e X3987-6D (dados não

mostrados). Durante a condução da eletroforese pulsada, este fragmento de 3100kb foi, portanto, eliminado do gel, o que explica os resultados anteriores.

Após digestão com *AvrII*, foi observada diminuição de intensidade da banda de 90Kb nas amostras transconjugantes, quando comparadas à linhagem parental (Figura 18A). Esta observação sugere que esta banda dupla é composta pelo plasmídio de virulência e por um fragmento cromossômico de igual tamanho. De fato, esta observação foi feita anteriormente para a linhagem *S. typhimurium* LT2 (Liu et al., 1993). Estes resultados confirmam as observações precedentes com a enzima *XbaI*, indicando que a inserção do *operon It-k63* ocorreu no plasmídio de virulência. Quando DNA genômico destes transconjugantes, digerido com *AvrII*, foi hibridado com a sonda LT (dados não mostrados) e PSC (Figura 18B), uma única banda, com aproximadamente 27Kb, foi reconhecida.

O transconjugante X3987-6D é o único, entre os analisados, que apresenta inserção do *operon It-k63* no cromossomo. Na Figura 17 (painel A) é possível observar a presença do plasmídio de virulência (90Kb) e a ausência de um fragmento com peso molecular semelhante ao fragmento C (243Kb) do mapa cromossômico (enzima *XbaI*, Tabela 4) de *S. typhimurium* LT2 (Liu et al., 1993). Este fragmento foi digerido internamente por *XbaI* e gerou outro, reconhecido pela sonda LT, que comigrou com os fragmentos N, G e E (Figura 17B). O fragmento C compreende uma região que vai de 30 a 35 Centissomos (Cs) do mapa de *S. typhimurium* LT2 (Liu et al., 1993). Desta região fazem parte os genes *tppB* (tripeptídeo permease B) e *ompD* (membrana de proteína externa D). Entretanto, com os dados disponíveis, não é possível afirmar que o fragmento de DNA envolvido com a integração de *It-k63* em X3987-6D corresponda ao fragmento C de *S. typhimurium* LT2.

6.6.2. Mapeamento parcial do *operon It-k63* nos transconjugantes derivados de *S. typhimurium* SR11 X4072 e X4217.

Transconjugante X4072-8B. Nenhuma modificação do perfil eletroforético para a enzima *XbaI* foi observada entre este transconjugante e a linhagem parental. A sonda LT hibridou em região onde várias bandas (220 a 250Kb) comigraram (Figura 19B). A sonda PSC hibridou com uma banda menor, de aproximadamente 40Kb (Figura 19C). O perfil eletroforético para a enzima *AvrII* foi, no entanto, diferente do observado para a linhagem parental (Figura 19A). Curiosamente, os fragmentos de 830 e 790Kb foram digeridos,

originando fragmentos de menor tamanho. Este resultado sugere a ocorrência de uma recombinação envolvendo os 2° e 3° fragmentos de maior peso molecular. As sondas LT e PSC nesta última digestão, reconheceram fragmento de aproximadamente 365Kb (Figura 19C). Estes resultados não permitiram uma identificação precisa do sítio de inserção do *operon It-k63* nesta amostra.

-Transconjugante X4072-17B. Na digestão com XbaI, o fragmento maior de 708Kb foi digerido, resultando em um fragmento de 590Kb, reconhecido pela sonda LT. Um fragmento menor, de aproximadamente 118Kb, foi reconhecido pela sonda PSC (Figura 19A, B e C). Na digestão com AvrII, fragmento de 1200Kb foi digerido, resultando fragmentos de 740 e 460Kb sendo este último, reconhecido pelas sondas LT e PSC (Figura 19A, B e C). A comparação destes resultados com o mapa de restrição do cromossoma de *S. typhimurium* LT2, sugerem que a inserção de *It-k63* ocorreu entre 0 e 5 Centissomos, numa seqüência compreendida entre os *loci thr* (0 Cs) e *pan* (4.5 Cs).

-Transconjugante X4072-27F. A comparação dos perfis eletroforéticos para a enzima XbaI, entre este transconjugante e a linhagem parental, sugere que a inserção ocorreu em um fragmento de aproximadamente 365Kb. Este foi digerido internamente originando fragmentos de 160 e 210Kb. A sonda LT reconheceu um fragmento de baixo peso molecular enquanto que a PSC, um fragmento de 210Kb (Figura 19A, B e C).

A digestão com AvrII demonstra a diminuição do fragmento maior (1200Kb) resultando em fragmentos de 1000 e 170Kb, aproximadamente. As sondas LT e PSC reconhecem, nestas digestões, fragmento de aproximadamente 27Kb (Figura 19A, B e C). Estes dados, quando comparados ao mapa de restrição de *S. typhimurium* LT2, sugerem que a inserção do *operon It-k63* ocorreu entre 92 e 96 centissomos, próximo aos genes *melAB* (93.8 Cs), *phoN* (94.2 Cs) e *purA* (95.1 Cs). Esta posição é próxima à origem de replicação *oriC* (84.1 Cs) do cromossomo bacteriano.

O perfil eletroforético do DNA genômico da linhagem X4217 também foi analisada por eletroforese de campo pulsado, após digestão com as enzimas XbaI e AvrII. A única diferença do perfil eletroforético desta com o da linhagem X4072 foi a presença do plasmídio de virulência (dados não mostrados). Estes resultados eram esperados pois a linhagem X4217 é derivada de X4072 e difere desta última somente pela presença do plasmídio de virulência (Schödell et al., 1994). O perfil eletroforético do transconjugante X4217-10E também foi avaliado, demonstrando que a inserção do *operon It-k63* também ocorreu no plasmídio de virulência (dados não mostrados).

6.6.3. Mapeamento parcial do *operon eltAB* nos transconjugantes derivados de *S. typhimurium* LT2.

-Transconjugante *S. typhimurium* LT2-2C. A inserção do *operon eltAB* nesta linhagem ocorreu no plasmídio de virulência (Figuras 17, 18 e 19). A hibridação com sonda LT (digestão XbaI) evidenciou dois fragmentos de 90 e 40Kb (Figuras 17B e 19B). Estes resultados podem ser explicados pela ocorrência de digestão parcial. A hibridação com a sonda PSC evidenciou um fragmento de 40kb (digestão XbaI) (Figura 19C) e 27Kb (digestão AvrII) (Figuras 18B e 19C).

-Transconjugante *S. typhimurium* LT2-1A e 5A. Estes transconjugantes não foram extensivamente analisados por eletroforese de campo pulsado. Os dados disponíveis confirmam que o *operon eltAB* foi inserido no DNA cromossômico de ambas as amostras.

Estes resultados demonstram a presença de um sítio preferencial de inserção do *operon lt-k63* no plasmídio de virulência de *S. typhimurium*. A inserção é mediada por recombinação homóloga e não transposição (discutido no item 6.4.4) e está associada com a expressão elevada de LT-K63. Inserções do mesmo *operon* em X4072 ocorreram no cromossomo e em diferentes posições, ao menos nos transconjugantes analisados por PFGE. A Tabela 4 exibe um resumo das características fenotípicas e moleculares dos transconjugantes analisados em detalhe.

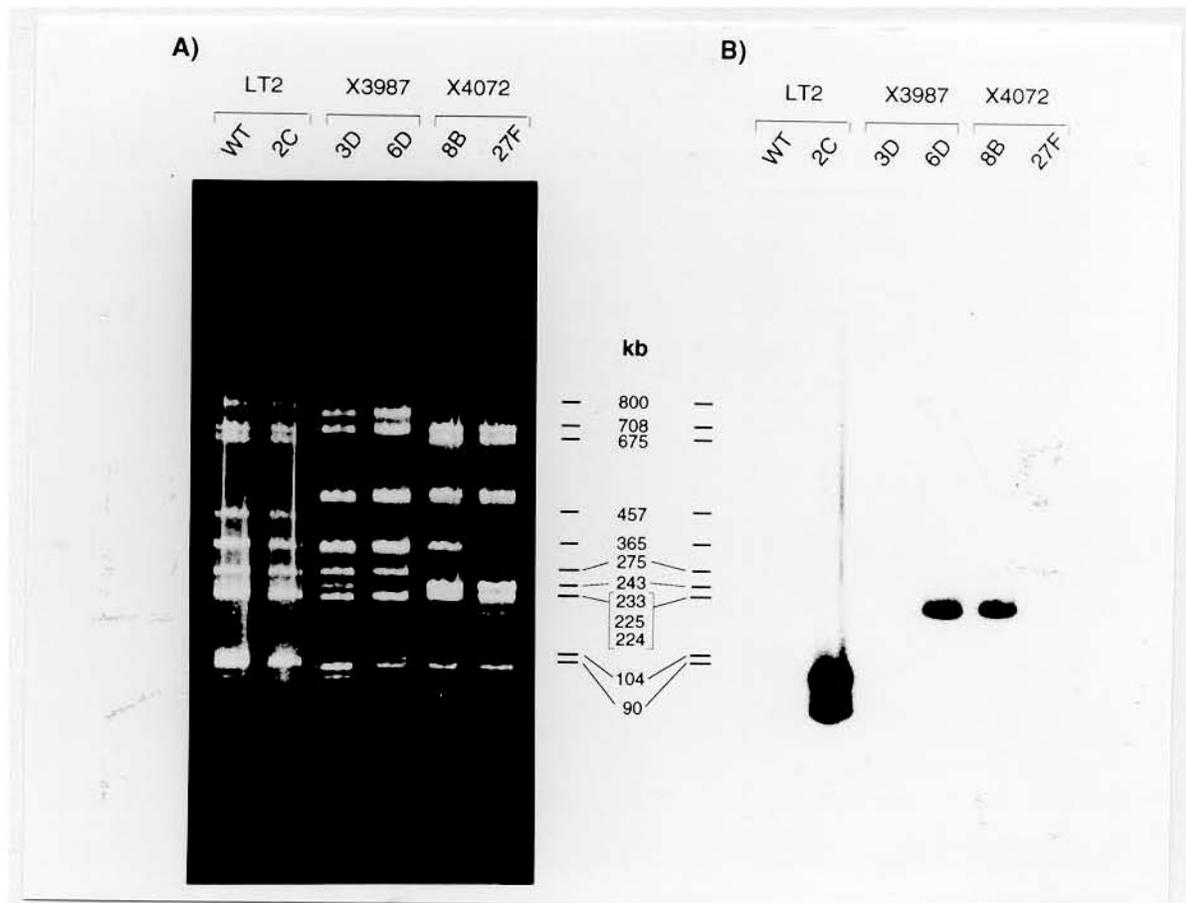


FIGURA 17. (A) Eletroforese em campo pulsado de DNA genômico de *S. typhimurium* LT2, transconjugantes LT2-2C, X3987-3D, 6D e X4072-8B e 27F, digeridos com XbaI. (B) O gel do painel A foi transferido para membrana de nylon e hibridado com sonda LT.

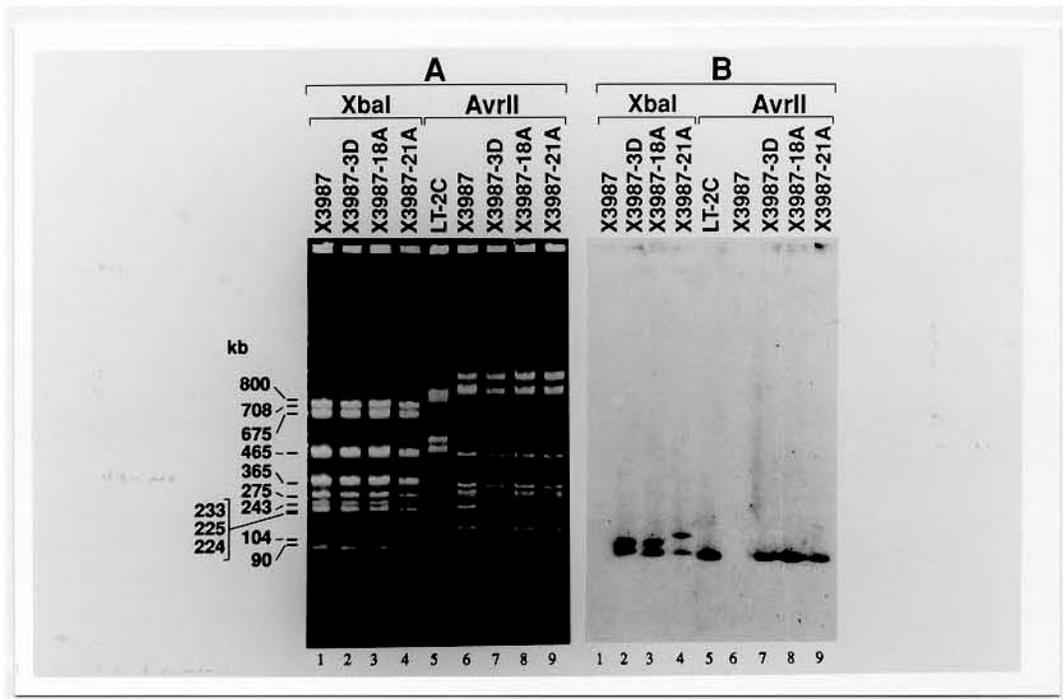


FIGURA 18. (A) Eletroforese em campo pulsado de DNA genômico de transconjugantes de *S. typhimurium* LT2 e X3987 digerido com XbaI ou AvrII. (B). O gel do painel A foi transferido para membrana de nylon e hibridado com sonda PSC.

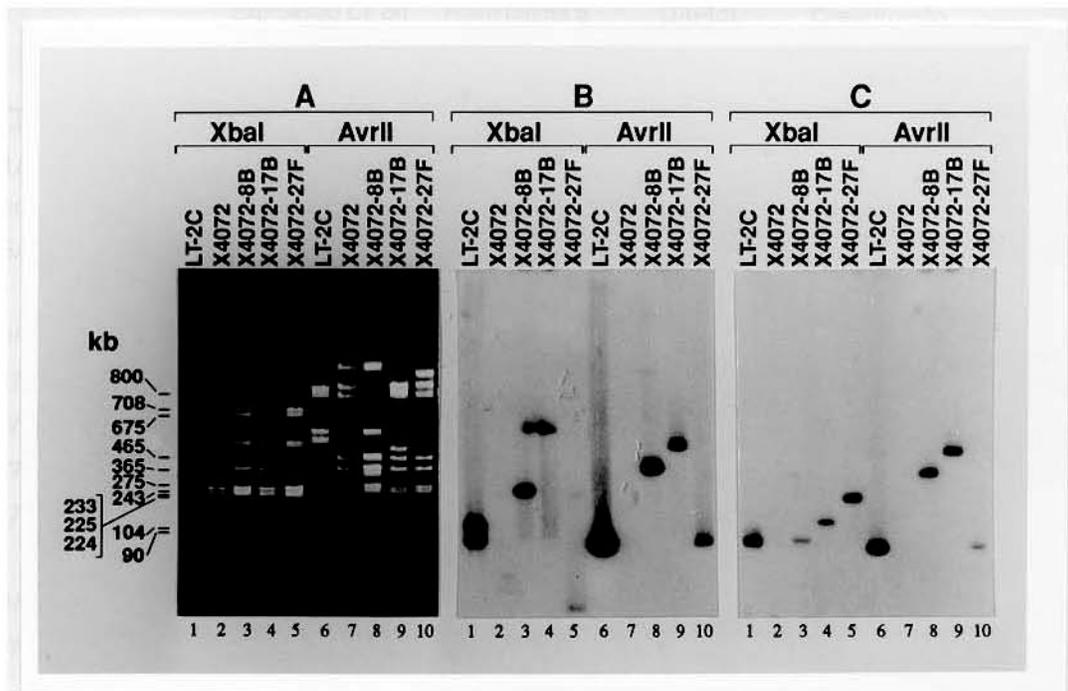


FIGURA 19. (A) Eletroforese em campo pulsado de DNA genômico de transconjugantes de *S. typhimurium* LT2 e X4072 digerido com XbaI ou AvrII. (B) O gel do painel A foi transferido para membrana de nylon e hibridado com sonda LT ou (C) com sonda PSC.

TABELA 5. Características fenotípicas e moleculares, com relação ao mapeamento de *eltAB* ou *lt-k63*, de diferentes transconjugantes.

Linhagens	Características Fenotípicas				Posição do <i>operon eltAB</i> ou <i>lt-k63</i>	
	Expressão LT ou LT-K63 (a)	Resistência a antibióticos (b)		DAP(c)		Crescimento em Meio Mínimo (d)
		Amp	Cm			
<i>S. typhimurium</i> LT2	-	-	-	+	+	
LT2-1A	+	-	+	+	+	Cromossomo
LT2-2C	+++++	-	+	+	+	Plasmídio vir. (e)
LT2-5A	++	-	+	+	+	Cromossomo
<i>S. typhimurium</i> X3987	-	-	ND	-	-	
X3987-3D	+++++	+	ND	+	+	Plasmídio vir. (e)
X3987-6D	+/-	-	ND	+	+	Cromossomo
X3987-18A	+++++	-	ND	+	+	Plasmídio vir. (e)
X3987-21A	+++++	-	ND	+	+	Plasmídio vir. (e)
<i>S. typhimurium</i> X4217	-	-	ND	-	-	
X4217-10E	+++++	-	ND	+	+	Plasmídio vir. (e)
<i>S. typhimurium</i> X4072	-	-	ND	-	-	
X4072-8B	+	-	ND	+	+	Cromossomo
X4072-17B	+/-	-	ND	+	+	Cromossomo
X4072-27F	++++	-	ND	+	+	Cromossomo

(a) Produção de LT ou LT-K63: Os sinais + e - indicam a produção e não produção respectivamente, de LT ou LT-K63. Os sinais positivos não indicam valores absolutos, estes são valores relativos para indicar o nível de LT ou LT-K63 produzido.

(b) Sinais positivos e negativos referem-se à resistência ou sensibilidade, respectivamente, a 100µg/ml de Ampicilina (Amp) e a 45µg/ml de Cloranfenicol (Cm). ND: Não determinado.

(c) Os sinais + e - indicam a produção ou não do ácido diaminopimélico, respectivamente.

(d) Os sinais + e - indicam capacidade ou não de crescimento em meio mínimo.

(e) Plasmídio vir- Plasmídio de virulência.

Os transconjugantes selecionados para o imunização de camundongos BALB/c estão em negrito.

6.7. Invasão e persistência de linhagens recombinantes de *S. typhimurium* nos tecidos animais.

O uso potencial dos transconjugantes X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F como vacinas vivas orais foi avaliado. Estes transconjugantes foram selecionados por apresentarem alta capacidade relativa de expressão da toxina LT-K63 e por serem Ampicilina sensíveis. Além disto, estes são derivados de diferentes linhagens parentais, UK1 (X3987-18A) e SR11 (X4072-27F e X4217-10E) e apresentam o *operon It-k63* inserido no plasmídeo de virulência (X3987-18A e X4217-10E) ou no cromossomo (X4072-27F). Após imunização oral de camundongos BALB/c, com duas doses de aproximadamente 10^9 UFC, células bacterianas dos três transconjugantes foram isoladas das placas de “Peyer” e baço destes animais. Estes resultados demonstram que os três transconjugantes foram capazes de invadir e proliferar nos tecidos do hospedeiro.

O efeito da inserção do *operon It-k63* na capacidade dos transconjugantes X3987-18A e X4217-10E de colonizarem e persistirem nos tecidos de camundongos BALB/c foram analisados em detalhe. Uma única dose de aproximadamente 10^9 UFC foi inoculada oralmente no dia 0 e a UFC no baço e placas de “Peyer” determinada nos dias 3, 6, 9, 17 e 32. A linhagem $\Delta cya \Delta crp$ X3985 foi utilizada como controle. Os resultados obtidos para as placas de “Peyer” e baço são apresentados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Foram observadas diferenças significativas na UFC obtida das placas de “Peyer”, entre as três linhagens, no período que vai do 3º ao 9º dia de amostragem. As diferenças de dosagem em UFC dos inóculos podem, em parte, explicar estes resultados. Entretanto, as diferenças observadas foram demasiadamente grandes para serem explicadas somente pela dosagem. As linhagens X3985 e X3987 são ambas derivadas de *S. typhimurium* UK-1. Uma das características que as diferenciam é a deleção do gene *asd* nesta última. A linhagem X3985 apresentou, no período inicial do experimento (dias 0 a 9), maiores valores de UFC nas placas de “Peyer”, quando comparada com as linhagens X3987-18A e X4217-10E. As causas destas diferenças podem ser várias: (1) inserção do gene *It-k63* em gene(s) plasmidiano(s) que não impedem mas alteram a capacidade dos transconjugantes de invadirem e/ou persistirem nos tecidos animais; (2) Expressão da toxina mutante LT-K63 a níveis tóxicos para a célula; (3) Efeito de posição/expressão do gene *asd* e (4) diferenças na capacidade

destas de invadirem e/ou persistirem nos tecidos do hospedeiro. Em conjunto, estes resultados demonstram que as linhagens recombinantes testadas mantêm a capacidade de invadir e proliferar nos tecidos de camundongos BALB/c.

As curvas de crescimento das linhagens X3987-18A e X3985 nas placas de "Peyer", embora com valores nitidamente diversos, apresentaram o mesmo comportamento, com pico de UFC observado no terceiro dia após o inóculo oral e decréscimo da UFC nos dias seguintes de análise. A curva de crescimento do transconjugante X4217-10E, no entanto, apresentou-se de forma diferente (Figura 20). O pico da UFC foi observado no nono dia de experimentação, embora com valores nitidamente inferiores aos observados no terceiro dia, pelas outras duas linhagens. Como mencionado anteriormente, as linhagens X3985 e X3987 são ambas derivadas da linhagem UK1 enquanto que X4217 é derivada da linhagem SR11. Desta forma, estes resultados podem ser decorrentes a diferenças fisiológicas de invasibilidade e ou crescimento bacteriano, herdadas das linhagens parentais.

As curvas de crescimento referentes à UFC no baço, embora apresentassem diferenças significativas para alguns valores, refletiam variações temporais na colonização deste órgão. O pico da UFC para as três linhagens foi observado no 9º dia e após 32 dias ainda era possível isolar bactérias do baço dos animais (Figura 21).

PLACAS DE "PEYER"

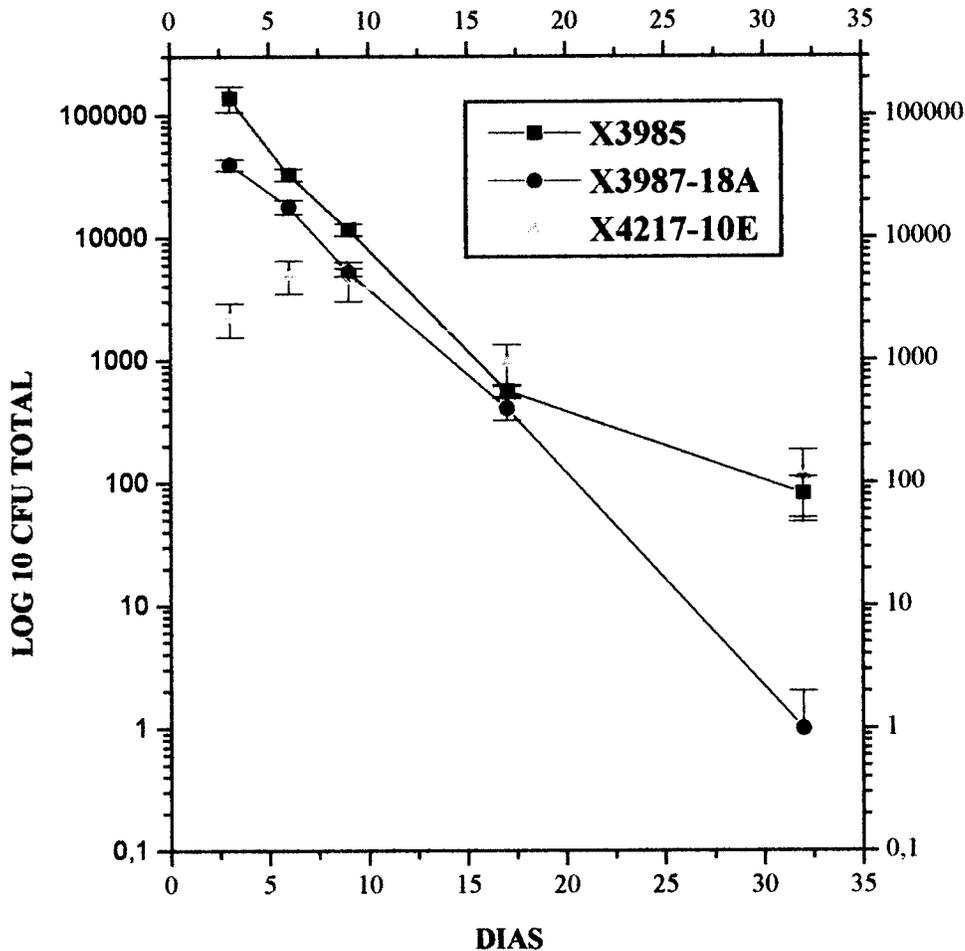


FIGURA 20. Persistência de linhagens de *S. typhimurium* nas Placas de "Peyer". Uma única dose das linhagens X3985 ($3,1 \times 10^9$ UFC), X3987-18A ($2,3 \times 10^9$ UFC) e X4217-10E ($1,85 \times 10^9$ UFC) foi inoculada oralmente no dia 0. Foram utilizados 25 camundongos BALB/c por grupo (linhagem). Cinco camundongos por grupo foram sacrificados nos dias 3, 6, 9, 17 e 21. As Placas de "Peyer" foram retiradas cirurgicamente, homogeneizadas em meio mínimo líquido e diluições foram plaqueadas, em duplicata, sobre placas com MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas e as UFC determinadas. Os resultados são expressos como a média aritmética de cinco camundongos por amostragem. As barras verticais correspondem ao erro padrão de cada amostragem.

BAÇO

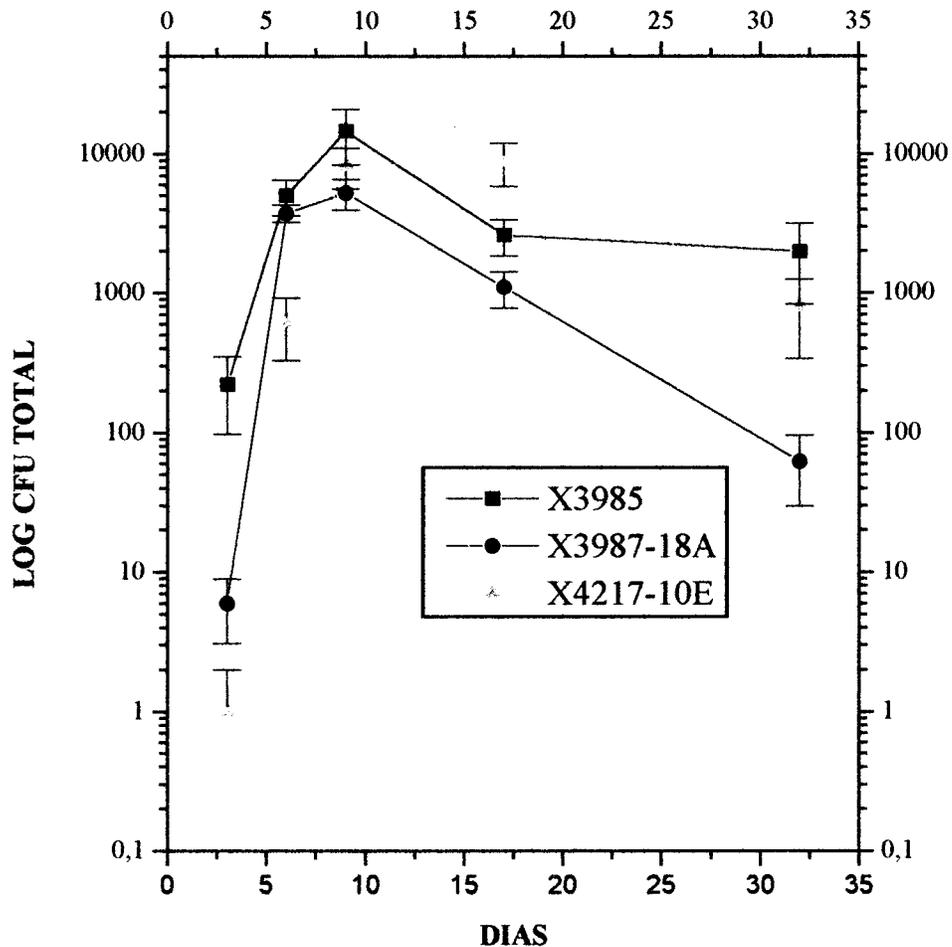


FIGURA 21. Persistência de linhagens de *S. typhimurium* no baço. Uma única dose das linhagens X3985 ($3,1 \times 10^9$ UFC), X3987-18A ($2,3 \times 10^9$ UFC) e X4217-10E ($1,85 \times 10^9$ UFC) foi inoculada oralmente no dia 0. Foram utilizados 25 camundongos BALB/c por grupo (linhagem). Cinco camundongos por grupo foram sacrificados nos dias 3, 6, 9, 17 e 21. Após esplenectomia, o órgão foi homogeneizado em meio mínimo líquido e diluições, em duplicata, foram plaqueadas em MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas e as UFC determinadas. Os resultados são expressos como a média aritmética de cinco camundongos por amostragem. As barras verticais correspondem ao erro padrão de cada amostragem.

6.8. Imunização de camundongos BALB/c.

Camundongos BALB/c foram imunizados com duas doses orais (10^9 UFC) nos dias 0 e 14. O soro e as secreções intestinais foram coletadas em intervalos semanais após a segunda imunização ("booster"). As médias dos títulos de IgG sérica anti-LT e anti-*Salmonella*, determinados por ELISA, são apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente. Os valores são apresentados como médias aritméticas de sete camundongos por ponto de amostragem e por amostra bacteriana. As barras verticais referem-se ao desvio padrão da média. Os títulos de IgG sérica anti-LT foram baixos nas 3 primeiras semanas de análise. Na quinta e principalmente, na oitava semana, foi verificado aumento considerável do título IgG em alguns animais. Este aumento foi mais evidente no grupo de camundongos imunizados com a linhagem X3987-18A. As diferenças entre grupos de camundongos imunizados com as diferentes linhagens, entretanto, não foram significativas para nenhum ponto de amostragem. Estes resultados são devidos a grande variação do título de anticorpos anti-LT observada dentro de um mesmo grupo de camundongos. A Tabela 5 exibe o título de anticorpos anti-LT individuais, determinado por ELISA, para as 3^o, 5^o e 8^o semanas, em camundongos imunizados com as linhagens de *Salmonella*.

Os títulos de IgG anti-*Salmonella* não apresentaram diferenças significativas embora estes tenham sido maiores, em média, nos grupos imunizados com as linhagens X3987-18A e X4217-10E (Figura 23). Estes resultados eram esperados já que a linhagem X4072-27F não contém o plasmídeo de virulência e, portanto, apresenta capacidade reduzida em colonizar e persistir nos tecidos do hospedeiro. As variações observadas no título de anticorpos anti-*Salmonella*, dentro de cada grupo de camundongos, foram menores do que as observadas com relação ao título anti-LT.

Os títulos de IgA secretória específica e total, presentes nas secreções intestinais de camundongos imunizados com X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F, foram determinados. Embora detectáveis, as quantidades de IgA específica, dirigida contra o mutante LT-K63 e contra antígenos de *Salmonella*, foram baixas nos três grupos de imunização (Figuras 24 e 25).

Os maiores títulos de anticorpos IgA anti-LT foram verificados na 2^o semana após o "booster", decrescendo nas semanas seguintes. Curiosamente, os melhores resultados foram observados no grupo de camundongos imunizados com X4072-27F (Figura 24).

TÍTULOS IgG ANTI-LT

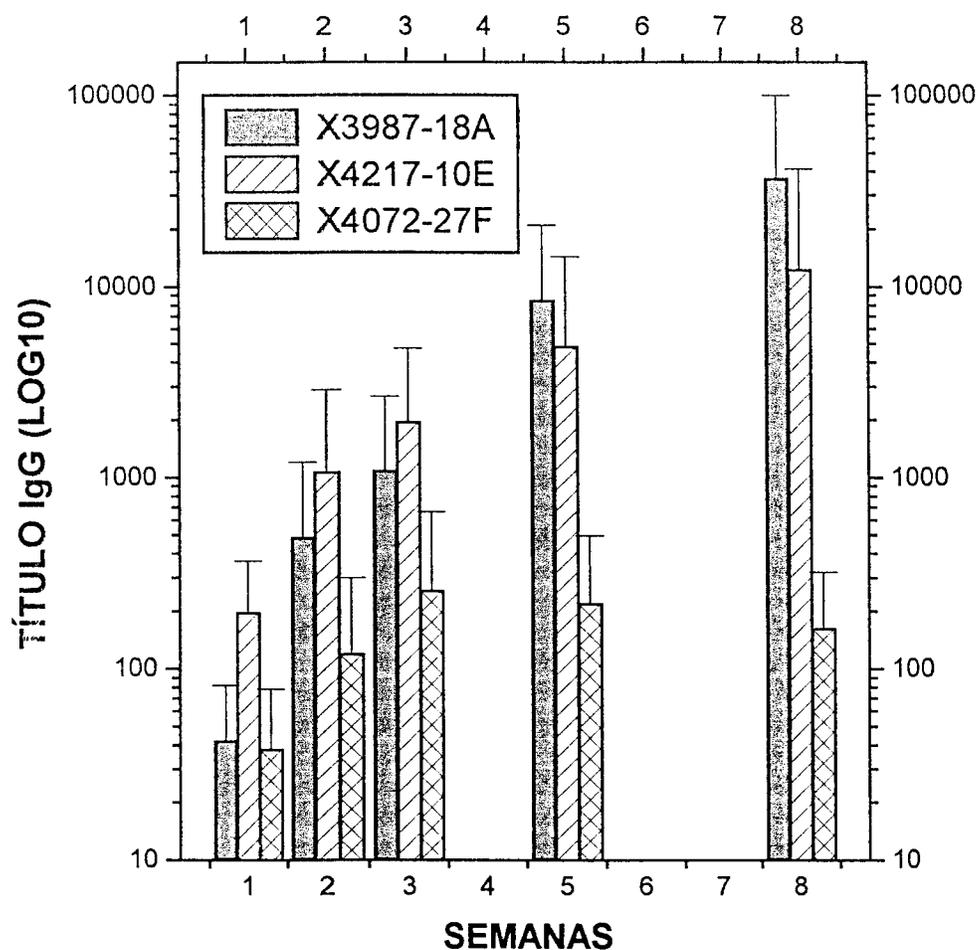


FIGURA 22. Título de anticorpos IgG anti-LT determinado por ELISA. Camundongos BALB/c foram inoculados oralmente com duas doses de 10^9 UFC, com as linhagens X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F, nos dias 0 e 14. O soro foi coletado 1, 2, 3, 5 e 8 semanas após a segunda dose ("booster"). Os dados referem-se à média aritmética de 7 camundongos por ponto de amostragem. As barras verticais referem-se ao desvio padrão da média. Para a determinação do título de anticorpos foram considerados positivos valores três vezes maiores que o soro pré-imune. Para efeito de cálculo, valores inferiores a 0,1 (DO_{405}) não foram considerados.

TÍTULO IgG ANTI-*Salmonella*

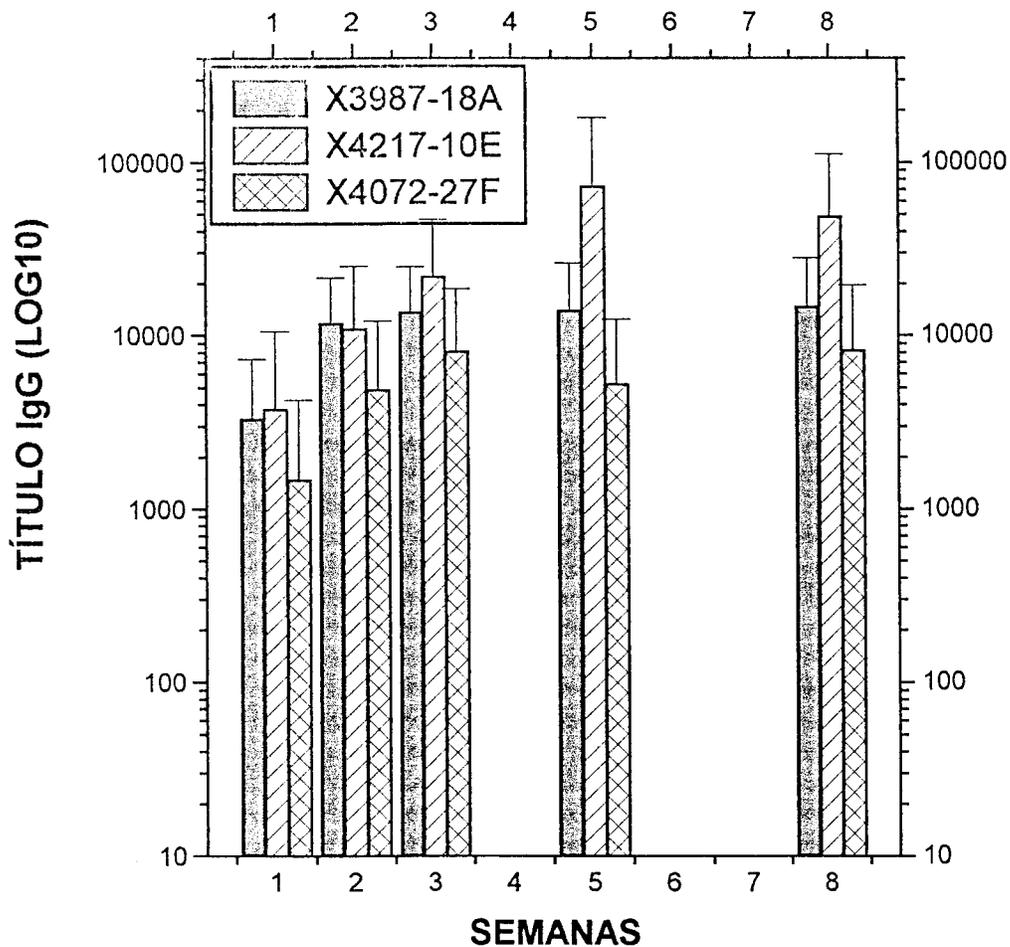


FIGURA 23. Título de anticorpos IgG anti-*Salmonella* determinado por ELISA. Camundongos BALB/c foram inoculados oralmente com duas doses de 10^9 UFC, com as linhagens X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F, nos dias 0 e 14. O soro foi coletado 1, 2, 3, 5 e 8 semanas após a segunda dose ("booster"). Os dados referem-se à média aritmética de 7 camundongos por ponto de amostragem. As barras verticais referem-se ao desvio padrão da média. Para a determinação do título de anticorpos foram considerados positivos valores três vezes maiores que o soro pré-imune. Para efeito de cálculo, valores inferiores a 0,1 (DO_{405}) não foram considerados.

TABELA 6. Títulos IgG e IgA anti-LT individuais, determinados por ELISA, exibidos por camundongos BALB/c imunizados com as linhagens vacinais X3987-18A (camundongos 1 a 7), X4217-10E (camundongos 8 a 14) e X4072-27F (camundongos 15 a 21).

Camundongos	Título IgG anti-LT*			Título IgA anti-LT*
	3º semana	5º semana	8º semana	8º semana
1	105	2270	28090	7,7
2	2400	18200	22010	19
3	119	52	0	8,4
4	4428	35330	190000	1420
5	0	0	0	0
6	86	97	0	1
7	444	3540	18225	0
Média±err.pad	1083±596	8498±4719	36904±23976	208±187
8	2050	706	820	8,1
9	8592	4288	1120	5,9
10	502	27834	83300	7,2
11	495	384	0	7,7
12	1437	575	130	0
13	64	0	68	8,3
14	554	212	132	0
Média±err.pad	1956±1050	4857±3582	12224±10967	5,3±1,4
15	0	32	0	3
16	0	0	0	0
17	177	205	407	0
18	72	75	44	0
19	1215	406	214	8,9
20	0	0	365	0
21	333	813	109	6,8
Média±err.pad	257±154	219±105	163±59	2,67±1,42

* Títulos determinados por ELISA. Foram considerados valores de DO₄₀₅ três vezes maiores que o pré-imune e $\geq 0,1$. Valores expressos como média aritmética \pm erro padrão (err.pad.).

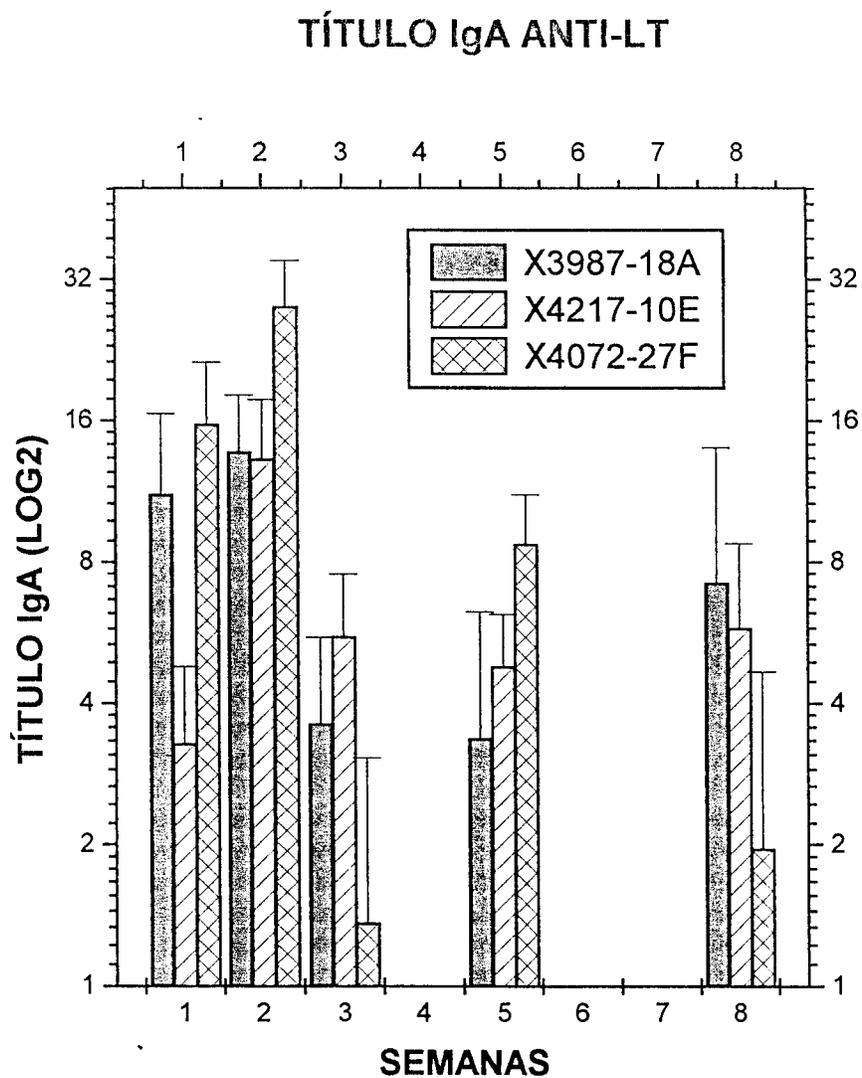


FIGURA 24. Título de IgA anti-LT-K63, presente nas secreções intestinais de camundongos BALB/c imunizados com as linhagens X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F. Os valores apresentados referem-se à média aritmética de 5 camundongos. As barras verticais referem-se ao desvio padrão da média. Para o cálculo do título de anticorpos, foram considerados valores três vezes maiores que o controle e nunca inferiores a DO_{405} igual a 0,1.

As diferenças entre as médias dos títulos IgA foram significativas, em alguns casos, principalmente nas primeiras 4 semanas (Figura 24). As diferenças entre os grupos de camundongos imunizados com X3987-18A e X4217-10E foram significativas somente na 1ª semana. As diferenças entre os grupos imunizados com X3987-18A e X4072-27F foram significativas na 2ª e 5ª semanas. Com exceção da 8ª semana, as diferenças observadas entre os grupos imunizados com X4217-10E e X4072-27F foram significativas.

Os títulos de anticorpos IgA anti-*Salmonella* alcançaram o topo na 5ª semana após o “booster”, em camundongos imunizados com X3987-18A e X4072-27F. Camundongos imunizados com X4217-10E apresentaram maiores títulos na 8ª semana após o “booster” (Figura 25). As diferenças observadas entre os grupos de camundongos imunizados com X3987-18A e X4217-10E não foram significativas. As diferenças entre os grupos imunizados com X3987-18A e X4072-27F foram significativas na 3ª e 8ª semanas. Com exceção da 8ª semana, as diferenças observadas entre os grupos imunizados com X4217-10E e X4072-27F foram significativas.

A porcentagem de IgA específica, anti-LT ou anti-antígenos de *Salmonella*, em relação a IgA total, foi invariavelmente baixa em todos os grupos de camundongos. As maiores porcentagens de IgA anti-LT foram observadas na 1ª e 2ª semanas, mas estas não ultrapassaram o valor de 0,05% e foram maiores no grupo de camundongos imunizados com a linhagem vacinal X4072-27F (dados não mostrados). As maiores porcentagens de IgA anti-antígenos de *Salmonella* foram observadas a partir da 2ª semana em todos os grupos de camundongos, mas não ultrapassaram a 0,1% da porcentagem total.

TÍTULO IgA ANTI-*Salmonella*

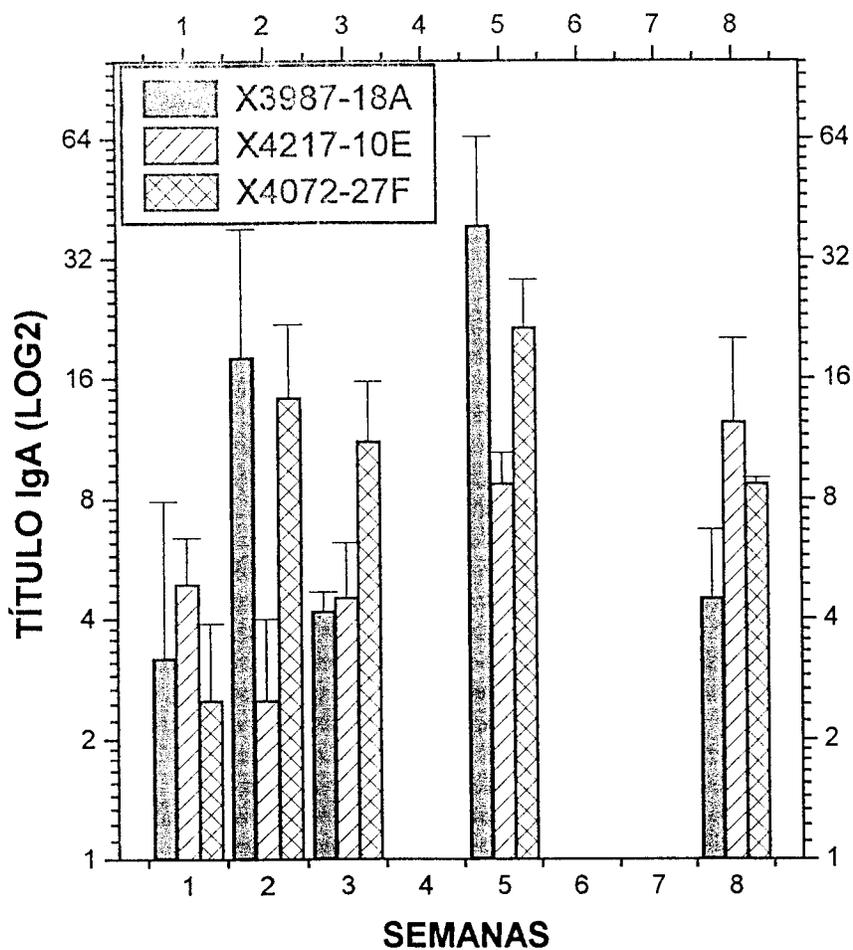


FIGURA 25. Título de IgA anti-antígenos de *Salmonella*, presente nas secreções intestinais de camundongos BALB/c imunizados com as linhagens X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F. Os valores apresentados referem-se à média aritmética de 5 camundongos. As barras verticais referem-se ao desvio padrão da média. Para o cálculo do título de anticorpos, foram considerados valores três vezes maiores que o controle e nunca inferiores a DO_{405} igual a 0,1.

6.9. Estabilidade da expressão de LT-K63 “in vivo”.

Colônias bacterianas das linhagens X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F foram re-isoladas das placas de “Peyer” e do baço de camundongos BALB/c imunizados. A pureza de cada colônia foi verificada através da análise do fenótipo, após cultivo em placas com meio mínimo-ágar, MacConkey e Ektoen. O DNA de colônias selecionadas desta forma foi hibridado com sonda LT marcada com α -³²P. Extratos protéicos totais foram reagidos com antissoro policlonal anti-LT, como descrito em Métodos. Aproximadamente 100 colônias de cada linhagem foram analisadas, incluindo colônias isoladas das placas de “Peyer” e do baço, em até 5 semanas após a segunda imunização. Na Tabela 7 estão os resultados deste experimento.

TABELA 7. Estabilidade da expressão da toxina mutante LT-K63 em linhagens recombinantes de *S. typhimurium*. Colônias bacterianas foram re-isoladas das placas de “Peyer” e do baço de camundongos BALB/c e analisadas quanto à presença do *operon lt-k63* e quanto à capacidade de expressar a toxina mutante.

LINHAGENS	NÚMERO DE COLÔNIAS ISOLADAS E TESTADAS			NÚMERO DE COLÔNIAS POSITIVAS		ESTABILIDADE (%)
	PLACAS DE “PEYER”	BAÇO	TOTAL	SONDA LT	EXPRESSÃO LT	
X3987-18A	38	52	90	90	90	100
X4217-10E	51	51	102	102	102	100
X4072-27F	62	36	98	98	98	100

Como pode-se observar, a expressão de LT-K63 foi estavelmente mantida “in vivo” nas três linhagens analisadas.

DNA genômico de duas amostras de cada linhagem vacinal, provenientes das placas de "Peyer" e do baço de camundongos BALB/c imunizados, respectivamente, foram extraídos, digeridos com as enzimas Sall e XhoI, os fragmentos separados em gel de agarose 0,8% e transferidos para membrana de nylon. A seguir, foram hibridados com as sondas LT e PUT. DNA genômico das linhagens vacinais, transconjugantes X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F, digeridos com as mesmas enzimas, foram utilizados como controle. Um único fragmento de 12Kb foi visualizado em todas as amostras, após a hibridação com a sonda LT, incluindo o transconjugante X4072-27F e isolados. Fragmentos de 12, 6,3 e 4,1kb foram reconhecidos pela sonda PUT (Figura 26). Estes resultados demonstram a estabilidade relacionada ao posicionamento do *operon It-k63* no genoma dos diferentes transconjugantes. Em adição, o fragmento Sall/XhoI reconhecido pela sonda LT na linhagem vacinal X4072-27F apresenta tamanho idêntico ao observado para as outras duas linhagens vacinais.

6.10. Neutralização da atividade tóxica de LT para células Y1.

Soros de camundongos BALB/c imunizados com as linhagens X3987-18A, X4072-27F e X4217-10E foram avaliados quanto à capacidade de neutralizar o efeito tóxico de LT selvagem para cultura de células Y1. Estes soros foram avaliados individualmente ou em conjunto. Infelizmente, em nenhum caso, foi observada atividade neutralizante, mesmo quando soros que exibiram altos títulos de IgG anti-LT-K63 foram usados. Soros de camundongos BALB/c imunizados via intraperitoneal com a toxina LT-K63 foram utilizados como controle. Neste último caso, atividade neutralizante foi observada.

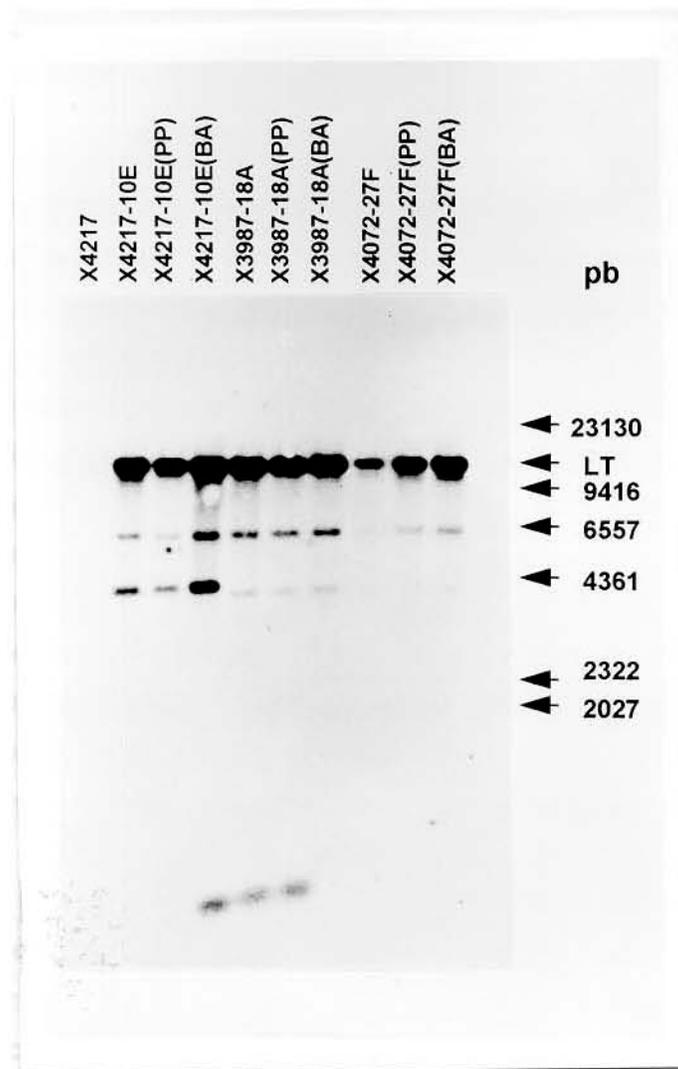


FIGURA 26. "Southern blot" de DNA genômico de colônias transconjugantes X3987-18A, X4072-27F, X4217-10E antes e após passagem pelas placas de "Peyer" (PP) e baço (BA) de camundongos BALB/c. O DNA genômico foi digerido com Sall e XhoI e hibridado com a sonda PUT. Em experimento paralelo, a sonda LT hibridou com um único fragmento de 12kb cuja posição é indicada na Figura.

7. DISCUSSÃO

As mucosas orgânicas (intestinal, respiratória e urogenital) humanas apresentam uma superfície 200 vezes maior do que a pele e são colonizadas ou funcionam como porta de entrada para a infecção de diferentes microrganismos. Desta forma, a ativação do sistema imunológico ligado às mucosas é necessária para a proteção contra estes microrganismos, principalmente nos estágios iniciais da infecção. Com algumas exceções, a administração de antígenos solúveis é ineficiente na ativação de efetiva resposta imunológica e, em alguns casos, a indução de tolerância foi relatada (Challaconbe & Tomasi, 1980). Para resolver este problema, diferentes estratégias foram desenvolvidas, por exemplo, para a condução e apresentação de antígenos ao sistema imunológico associado ao intestino (GALT). A administração oral do antígeno em conjunto com agentes adjuvantes foi e vem sendo utilizada. Entre estes adjuvantes, as enterotoxinas LT e CT estão entre os mais potentes. A administração destas toxinas em conjunto com antígenos pouco imunogênicos é capaz de induzir resposta imunológica humoral, mediada principalmente por células T “helper” 2 (Th2) contra o antígeno em questão (Marinaro et al., 1995). Um empecilho na utilização destas toxinas, no entanto, é a toxicidade exibida por estas, mesmo em baixas concentrações. Outras estratégias envolvem a utilização de lipossomos, microesferas e microrganismos mortos ou atenuados como carreadores e apresentadores de antígenos ao GALT (revisado por Staats et al., 1994 e Walker, 1994).

Salmonella sp iniciam a infecção por aderir e invadir células da mucosa intestinal, preferencialmente células M (Jones et al., 1994). Esta característica faz deste grupo bacteriano um eficiente carreador de antígenos para o GALT. Desde os trabalhos iniciais de Bacon et al. (1950) demonstrando a atenuação da virulência em mutantes auxotróficos de *Salmonella*, muito conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade deste microrganismo foram acrescentados e muitas outras mutações que atenuam a virulência foram descritas. Estas linhagens atenuadas de *Salmonella* vem sendo utilizadas como carreadoras de antígenos para o GALT, com diferentes graus de sucesso, na ativação de resposta humoral e celular (revisado por Cárdenas & Clements, 1992; Curtiss et al., 1994).

Linhagens $\Delta cya \Delta crp$ de *S. typhi* e *S. typhimurium* foram propostas como vacinas vivas orais contra infecções causadas por estes microrganismos (Curtiss et al., 1994).

Linhagens recombinantes derivadas destas, capazes de expressarem proteínas heterólogas das mais variadas origens, foram propostas como vacinas orais multifatoriais (Clements & Cárdenas, 1992; Curtiss et al., 1994). Recentemente, Pizza et al. (1994a) e Fontana et al. (1995) descreveram a construção de mutantes não tóxicos de LT e CT, utilizando técnica de mutação sítio dirigida. Dentre estes, os mutantes LT-K63 e CT-K63 foram estáveis, imunogênicos e surpreendentemente, mantiveram a capacidade de adjuvância do sistema imunológico (Di Tommaso et al., 1995). O desenvolvimento destes promissores mutantes não só possibilita o uso destes como adjuvantes do sistema imunológico mas abre, também, a possibilidade de uso para aumentar a eficiência de vacinas já existentes contra infecções causadas por *E. coli* enterotoxigênica e *V. cholerae*. Neste sentido, uma interessante metodologia é o desenvolvimento de linhagens atenuadas de *Salmonella* com capacidade de expressar e carrear estas toxinas ao GALT.

O objetivo deste trabalho foi a construção de linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium* contendo inserções genômicas randômicas do operon *lt-k63*, e a posterior caracterização da capacidade destas em induzirem resposta imunológica após administração via oral. Estas linhagens servem como modelo para o desenvolvimento futuro de linhagens vacinais de *S. typhi*. Ao contrário da grande maioria dos trabalhos, onde a expressão do antígeno heterólogo é alcançada através da utilização de plasmídios, optou-se pela construção de linhagens contendo inserções cromossômicas. Foi objetivo deste trabalho, portanto, determinar se linhagens de *Salmonella* contendo uma única cópia do operon *lt-k63*, eram capazes de induzir resposta imunológica humoral anti-LT-K63. Embora a quantidade de proteína heteróloga produzida pela célula bacteriana seja mais baixa, esta estratégia evita a instabilidade de expressão, verificada na utilização de plasmídios (Cárdenas & Clements, 1992). Além disso, o emprego de vacinação em massa utilizando linhagens bacterianas vivas atenuadas, implica na liberação desta ao meio ambiente. A transferência de genes de linhagens vacinais para bactérias do meio ambiente ainda é um tema não investigado extensivamente mas, em teoria, possível. Neste contexto, a utilização de linhagens contendo genes heterólogos integrados no cromossômo são mais seguras do que linhagens contendo os mesmos em plasmídios, mesmo quando os plasmídios utilizados não são mobilizáveis por conjugação. Está é uma importante questão a ser considerada na construção de linhagens vacinais.

Ao contrário da grande maioria dos trabalhos descritos na literatura, que utilizam sistemas de recombinação homóloga para a integração de genes heterólogos no cromossomo de *Salmonella* (Hone et al., 1988b; Strugnell et al., 1990), neste trabalho optou-se por um sistema de transposição. A principal diferença entre estes, é que o primeiro gera integrações em posições definidas do genoma, escolhidas a “priori”, enquanto que o uso de sistemas de transposição, ao menos teoricamente, gera integrações ao acaso.

A utilização de transposição para a integração de genes heterólogos em linhagens vacinais de *Salmonella* foi primeiramente descrita por Flynn et al. (1990). Estes autores desenvolveram um sistema onde o gene heterólogo é clonado internamente ao cassete de transposição Tn10 que, posteriormente, é mobilizado para uma linhagem de *S. typhimurium lamB*, utilizando transdução via fago λ . A região cromossômica contendo o mini-elemento Tn10 é então mobilizada para o cromossomo da linhagem vacinal de *Salmonella* via transdução por fago P22. Este sistema envolve portanto, passos intermediários na construção da linhagem recombinante.

Herrero et al. (1990), baseados na utilização do transposon Tn5, descreveram um sistema para integração randômica de genes heterólogos em bactérias gram-negativas. Neste, plasmídios suicidas são utilizados na mobilização do cassete de transposição, evitando a necessidade de passos intermediários. Mesmo tendo sido descrito em 1990, nenhum trabalho havia sido feito até o momento, para analisar o uso potencial deste sistema na construção de linhagens vacinais de *Salmonella*. Desta forma, este trabalho descreve o uso, a caracterização e a posterior modificação deste sistema, para a construção de linhagens recombinantes vacinais de *Salmonella*.

Inicialmente, o plasmídio pUT/Cm:LT (Figura 1) foi utilizado para a integração do operon *eltAB*, no genoma de *S. typhimurium* LT2. Este experimento teve como objetivos: (1) determinar se o promotor de LT era ativo em *Salmonella*; (2) analisar a casualidade das inserções do operon *eltAB* no genoma; (3) determinar se inserções em diferentes seqüências do genoma estavam associadas com diferentes níveis de expressão da toxina LT; (4) determinar se a toxina LT, quando expressa em *Salmonella*, forma a holotoxina AB5 ativa; (5) determinar se a toxina LT era secretada para o espaço periplasmático.

Os resultados obtidos com a linhagem *S. typhimurium* LT2 sugerem que as inserções de *eltAB* ocorreram ao acaso no genoma. A presença de transconjugantes resistentes à Ampicilina, um fator indicativo de recombinação homóloga, foi baixa (5,5%;

Figura 7). Heterogeneidade na capacidade de expressar a toxina LT foi verificada entre os transconjugantes analisados e este é um outro fator indicativo da casualidade destas inserções (Figura 8). Este último resultado ainda sugere que a expressão do gene heterólogo é variável e dependente da seqüência onde o mini-elemento de transposição foi inserido. De fato, não existem terminações de transcrição no cassete de transposição, o que permite a expressão de genes contidos neste a partir de promotores presentes em seqüências adjacentes (De Lorenzo & Timmis, 1994). Pode-se especular que as diferenças observadas na produção de LT seriam devidas a diferenças na topologia das seqüências de DNA envolvidas com as inserções. Estas diferenças poderiam alterar a atividade do promotor de LT. Alterações topológicas do DNA tem sido implicadas na modulação da expressão gênica influenciando, principalmente, a afinidade de ligação entre inibidores e o sítio operador (Karem & Foster, 1993). O promotor de LT é, no entanto, constitutivo e o crescimento em condições de anaerobiose, um conhecido fator que influencia a topologia do DNA, não influenciam a expressão de LT em linhagens de *E. coli* do tipo ETEC (Marcelo Brocchi, observações não publicadas). Em conjunto, estas observações tornam pouco provável esta última hipótese.

A toxina LT em *S. typhimurium* LT2 foi secretada para o espaço periplasmático (Figura 8) e extratos protéicos de três transconjugantes produtores de quantidades diferentes de LT, foram analisados quanto à toxicidade em cultura de células Y1. Foi verificada atividade tóxica nestes extratos, independente da proveniência dos mesmos (Tabela 3). Estes resultados preliminares sugerem fortemente que a toxina LT é corretamente montada em sua estrutura ativa AB5.

Neste estudo, foi ainda descrito uma modificação do sistema de mini-transposon Tn5, para possibilitar o seu uso na inserção de seqüências heterólogas no genoma de linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium* ou *S. typhi*. Esta modificação baseou-se na substituição do gene que codifica para resistência à Estreptomicina (Sm), no plasmídeo pUT/Sm, pelo gene *asd* de *Salmonella*, que codifica a enzima Aspartato- β -semialdeído-desidrogenase. O plasmídeo assim construído foi chamado pUT/*asd* (Figura 2). A enzima Aspartato- β -semialdeído-desidrogenase faz parte da via biossintética da lisina e está envolvida na formação do ácido diaminopimélico (DAP), um importante componente da parede celular de bactérias gram-negativas. Linhagens Δasd lisam-se após poucos ciclos de replicação. Deleções no gene *asd* foram introduzidas em linhagens vacinais de *Salmonella*, visando o desenvolvimento de um sistema letal balanceado, estabilizador da expressão de genes heterólogos (Galán et al., 1990). A base deste sistema está na

clonagem de genes heterólogos em plasmídios *asd+*, e a introdução destes em linhagens Δasd de *Salmonella*. A lógica deste sistema está na incapacidade de linhagens auxotróficas para o DAP de sobreviverem por muito tempo no interior dos órgãos/tecidos do hospedeiro. Desta forma, a introdução destes plasmídios quiméricos *asd+* não só garante a reversão da auxotrofia ao DAP como também a rápida eliminação dos tecidos do hospedeiro, de células bacterianas livres de plasmídio e incapazes de produzirem o antígeno heterólogo. A estabilidade da expressão de antígenos heterólogos por linhagens vacinais de *Salmonella*, como discutido anteriormente, parece ser importante, já que em muitos casos a instabilidade parece ser a causa de baixa resposta imunológica contra o antígeno heterólogo. Desta forma, a modificação do sistema mini-transposon Tn5 descrita neste trabalho, não somente possibilitou o seu uso para a construção de linhagens recombinantes $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium*, como também, eliminou a utilização de marcas de resistência a antimicrobianos na construção e seleção de bactérias recombinantes. A resistência a qualquer tipo de antimicrobiano não é um atributo desejável para linhagens bacterianas vacinais. Adicionalmente, a presença de um gene essencial dentro do cassete de transposição, mesmo fazendo parte de integrações cromossômicas, pode garantir a eliminação de células bacterianas que venham a sofrer deleções envolvendo estas seqüências e que portanto, venham a perder a capacidade de produzir o antígeno.

O plasmídio pUT/*asd*:LT-K63 (Figura 4) foi utilizado para a inserção do operon mutante *lt-k63* nas linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium* X3987, X4072, X4217 e X4550. As linhagens recombinantes obtidas foram invariavelmente capazes de expressarem LT-K63 mas apresentaram heterogeneidade em relação à quantidade expressa (Figuras 10 e 11). O número de transconjugantes resistentes à Ampicilina, ao menos utilizando a metodologia descrita neste estudo, foi elevado (Figura 7). Estes resultados são contrários aos descritos por Herrero et al. (1990) e aos resultados obtidos previamente com a linhagem *S. typhimurium* LT2. No experimento descrito por Herrero et al. (1990), baixa porcentagem de transconjugantes foram resistentes à Ampicilina. Estes pesquisadores utilizaram, no entanto, *Pseudomonas putida* como bactéria receptora. Estes dados sugerem que o sistema de mini-transposon Tn5 funciona de modo diferente, quando diferentes espécies ou linhagens bacterianas são utilizadas. Resta determinar se mutações *cya* e *crp* podem, de alguma forma, influenciar a eficiência de transposição.

Conforme descrito na literatura, o transposon Tn5 não exibe especificidade em relação à seqüência alvo para a integração (Berg, 1989). No entanto, o isolamento de transconjugantes resistentes à Ampicilina indica a ocorrência de recombinação homóloga e a conseqüente inserção de seqüências do plasmídio pUT outras além do cassete de transposição. Estas integrações ocorrem em regiões preferenciais do genoma, que exibem homologia com seqüências do plasmídio pUT quimérico. Linhagens bacterianas vacinais devem apresentar características fenotípicas e genotípicas bem determinadas, estáveis e irreversíveis. Desta forma, a ocorrência de recombinação homóloga limita o uso deste sistema de mini-transposon Tn5, na construção de linhagens vacinais Δ *crp* de *S. typhimurium*.

As diferentes linhagens recombinantes, obtidas neste estudo, foram selecionadas para alta expressão de LT-K63 (Figura 9). Curiosamente, os maiores níveis de expressão verificados estiveram associados a integrações do cassete de transposição em uma seqüência do plasmídio de virulência de *Salmonella* (Figuras 17 e 18). Estas integrações são provenientes de recombinação homóloga e não transposição (item 6.4.4). A existência de integrantes desta categoria, sensíveis à Ampicilina, sugere a ocorrência de duplo “crossing over”. Embora Herrero et al. (1990) sugeriram que a sensibilidade à Ampicilina é um forte indicativo da ocorrência de transposição, os resultados obtidos neste presente trabalho sugerem cautela nesta interpretação e evocam a necessidade da caracterização molecular dos integrantes.

Similaridade entre uma seqüência de 136pb, presente na extremidade 5' do operon *lt-k63*, e um quadro de leitura aberto presente no plasmídio pSC101, próximo à *oriT*, foi encontrada. Não se sabe, no entanto, se estas seqüências estão envolvidas com o processo de recombinação. Diversas tentativas para clonar esta seqüência do plasmídio de virulência foram frustradas. Dados preliminares indicam que a inserção de *lt-k63* ocorreu próximo a uma das origens de replicação deste plasmídio. Esta conclusão é baseada na observação de que o fragmento Sall/XhoI LT⁺ de *S. typhimurium* LT2-2C também hibridou com uma sonda *oriR* específica. Estes resultados explicam as dificuldades encontradas para a clonagem deste fragmento (dados não mostrados). Novas estratégias estão sendo testadas para a caracterização e determinação desta seqüência.

As inserções do operon *lt-k63* na linhagem *S. typhimurium* X4072 envolvem, obrigatoriamente, seqüências cromossômicas, já que o plasmídio de virulência não está presente (Figura 19). Dentre os transconjugantes X4072, o recombinante X4072-27F foi

o que apresentou maior capacidade de expressão da toxina LT-K63 (Figuras 10 e 11). Os dados obtidos com PFGE sugerem que a inserção de *lt-k63* neste transconjugante ocorreu em uma seqüência que compreende a região entre 92 e 96 Centissomos (item 6.6.2). Esta região é muito próxima à origem de replicação *oriC* (84.9 Cs) do cromossomo bacteriano. O cromossomo de Enterobactérias dividem-se bidirecionalmente, a partir da origem de replicação *oriC*. Em conseqüência, quando a célula bacteriana está em divisão, genes localizados próximos à origem apresentam-se com maior número de cópias. Esta diferença em número de cópias foi apontada como responsável pelo aumento na expressão de genes localizados próximos à origem. Pavitt & Higgins (1993) por exemplo, demonstraram que em *S. typhimurium*, inserções de um gene "reporter" próximas a *oriC*, estão associadas com aumento de expressão em até 4 vezes, quando comparado com inserções próximas às terminações de replicação (*ter*) localizadas entre 28 e 30 minutos do mapa cromossômico. O gene "reporter" utilizado por estes autores foi o *operon luxAB* que codifica a enzima Luciferase de *Vibrio fischeri*. A expressão desta enzima pode ser quantificada em bactérias (Owen-Hughes et al., 1992). Desta forma, a maior expressão de LT-K63 exibida pela linhagem X4072-27F pode ser devida, em parte, ao efeito do número de cópias. Curiosamente, experimentos de hibridação com as sondas LT e PSC, onde DNA genômico de diferentes transconjugantes foram digeridos com as enzimas *AvrII*, *Sall* e *Sall/XhoI*, demonstraram que o fragmento de DNA de X4072-27F reconhecido por estas sondas apresenta tamanho, em pares de bases, idêntico aos fragmentos reconhecidos nos transconjugantes X3987-3D, 18A, 21A e *S. typhimurium* LT2-2C (Figuras 12, 19 e 26). Estes dados sugerem a existência de seqüência com similaridade entre o plasmídio de virulência e o cromossomo de *S. typhimurium*, na região de 92 a 96 Cs. De fato, esta região não está presente no cromossomo de *E. coli* K12 e contém seqüências que apresentam similaridade com genes plasmidiais cujo conteúdo GC está abaixo da média descrita para *Salmonella* (Groisman et al., 1992). Estas observações levaram Groisman et al. (1992) a proporem que esta região tenha sido adquirida em *Salmonella* por transmissão horizontal.

A análise do perfil eletroforético (eletroforese de campo pulsado) de DNA genômico das linhagens X3987, X4072 e X4217, após digestão com as enzimas *XbaI* e *AvrII* (Figuras 17, 18 e 19), confirmaram observações anteriores sobre a existência de poucos sítios de restrição para estas enzimas no genoma de *S. typhimurium* LT2 (Liu & Sanderson, 1992; Liu et al., 1993). DNA genômico desta última linhagem foi utilizada

como padrão nestas análises. Heterogeneidade com relação ao padrão de restrição para estas enzimas foi verificada entre as linhagem LT2, X3987 e X4072. Seqüências de DNA que incluem CTAG são raras em bactérias entéricas (McClelland et al., 1987) e os sítios de reconhecimento das enzimas XbaI e AvrII apresentam esta seqüência. Foi postulado que a seqüência CTAG é eliminada pelo produto do gene *vsr* ("very short repair") quando envolvida em pareamentos imperfeitos (Hennecke et al., 1991). Estas observações levaram Liu et al. (1993) a proporem que os sítios XbaI e AvrII remanescentes em *S. typhimurium* estariam presentes em regiões essenciais para a sobrevivência da bactéria ou em seqüências heterólogas, adquiridas de outros gêneros bacterianos por transferência horizontal. Os dados obtidos neste estudo, no entanto, são contrários a esta última hipótese, já que a linhagem X3987 é um isolado virulento de *S. typhimurium* LT2, obtido após várias passagens em camundongos BALB/c.

Três linhagens recombinantes, X3987-18A, X4217-10E e X4072-27F, foram utilizadas para a imunização de camundongos BALB/c. Títulos séricos de IgG anti-LT, embora tenham sido observados nos três grupos de camundongos imunizados, foram maiores em camundongos imunizados com a linhagem X3987-18A e, principalmente, na oitava semana após a segunda dose oral (Figura 22). Estas diferenças não são devido à instabilidade da linhagem recombinante pois, colônias das três linhagens, isoladas do baço e das placas de "Peyer", foram invariavelmente positivas para a capacidade de expressão da toxina LT-K63 (Tabela 7). Diferenças na capacidade de invadir e ou proliferar no organismo do hospedeiro podem explicar, em parte, estes resultados (Figura 20). Diferente da resposta anti-LT, maior uniformidade foi vista na resposta contra antígenos de *Salmonella* e, principalmente, em animais imunizados com as linhagens X3987-18A e X4217-10E (Figura 23). Desta maneira, as diferenças observadas em relação à resposta IgG anti-LT específica, entre os grupos de animais imunizados com X3987-18A e X4217-10E, podem ser devidas a indução de diferentes células do sistema retículo-endotelial ou na capacidade destas últimas em processarem o antígeno heterólogo.

Grande variação foi observada em relação aos títulos individuais IgG anti-LT, exibido por animais imunizados com a mesma dose da mesma linhagem vacinal (Tabela 6). Esta variação também foi verificada anteriormente por Scödel et al. (1994) na análise da resposta humoral em camundongos BALB/c imunizados com recombinantes das linhagens X4072, X4217 e X4550. Não existem dados suficientes para explicar as causas destas variações. Experimentos futuros estão sendo planejados para determinar

se tais resultados são devidos à indução de tolerância. Recentemente, Takahashi et al. (1995) demonstraram a indução de tolerância em camundongos BALB/c após a administração oral de pequenas mas contínuas doses de um peptídeo sintético (resíduos 26 a 45) de LTB. Não existem dados na literatura que comprovem a indução de tolerância contra antígenos carregados por *Salmonella* mas os resultados obtidos por Takahashi et al. (1995) e os obtidos por este trabalho evidenciam a necessidade de caracterizações futuras.

Cárdenas & Clements (1993) descreveram resultados que contrastam com os descritos neste estudo. Estes autores não foram capazes de induzir resposta imunológica humoral, após a imunização oral de camundongos BALB/c com linhagem recombinante de *Salmonella*, contendo o gene *eltB*, codificador da subunidade B de LT (LTB), integrado no cromossomo. Neste presente estudo, a utilização de linhagens recombinantes de *S. typhimurium*, contendo o operon *lt-k63* integrado no plasmídio de virulência, foi capaz de induzir resposta humoral contra esta proteína heteróloga. Gulig & Curtiss (1997) estimaram a presença de apenas 1 ou 2 cópias do plasmídio de virulência em *S. typhimurium*. Desta forma, o número de cópias do operon *lt-k63* parece não ser responsável pela diversidade dos resultados obtidos neste estudo e aqueles descritos por Cárdenas & Clements (1993). Existe a possibilidade que a inclusão da subunidade A nestas construções tenha contribuído para ativar a resposta imunológica. A holotoxina LT é reconhecidamente, um dos principais adjuvantes para o sistema imunológico estudado até o momento e o mutante LT-K63 conserva esta característica (Di Tomaso et al., 1996). Em contrapartida, a expressão de LT-K63 pode estar sendo dirigida por um promotor fortemente ativo "in vivo". Neste caso, a indução da resposta humoral pode ser devida à produção de níveis apropriados de LT-K63 para a indução de anticorpos.

O soro de camundongos imunizados com as três linhagens heterólogas de *S. typhimurium* entretanto, não neutralizaram o efeito tóxico de LT para células Y1 (item 6.10). Estes dados contrastam com resultados anteriores que descrevem a indução de anticorpos anti-LT neutralizantes quando linhagens recombinantes de *Salmonella* sp, produtoras de LTB, foram utilizadas (Clements et al. 1986; Maskell et al., 1987). Além disso, a imunização de camundongos por três vias diferentes (subcutânea, intraperitoneal e intravaginal) com o mutante LT-K63 solúvel, foi capaz de induzir a produção de anticorpos anti-LT neutralizantes (Pizza et al., 1994a; Di Tommaso et al., 1995). É possível que modificações no processamento de LT-K63 quando expressa por *S. typhimurium*, assim como os tipos de células do sistema retículo endotelial envolvidos,

expliquem estes resultados. Adicionalmente, a inclusão da subunidade A na construção das linhagens vacinais pode ter ocasionado o processamento e “apresentação” de epítomos da toxina que induzem a produção de anticorpos não neutralizantes. De fato, Pizza et al. (1994a) demonstraram que a utilização de adjuvante de Freund modifica o tipo de resposta humoral contra o mutante LT-K63. Na presença deste adjuvante a resposta humoral predominante é contra a subunidade B enquanto que na sua ausência ocorre considerável aumento do título de anticorpos dirigidos contra a subunidade A. Estes resultados associados ao efeito adjuvante do próprio mutante LT-K63 refletem a complexidade da resposta imunológica contra este antígeno. Experimentos estão sendo delineados para tentar responder quais os fatores envolvidos com a incapacidade dos anticorpos em neutralizar a atividade biológica de LT.

Os títulos e porcentagens de IgA específica, contra LT-K63 e contra antígenos de *Salmonella* foram extremamente baixos (Figuras 24 e 25). Doggett et al. (1993) reportaram a indução de altos títulos de IgA anti-LPS, após a imunização de camundongos BALB/c com as linhagens $\Delta cya \Delta crp$ de *S. typhimurium*. Diferenças no esquema de imunização podem ter influenciado estes resultados. Doggett et al. (1993) imunizaram os animais com duas doses espaçadas em 10 dias. Neste presente estudo, as doses foram espaçadas de 14 dias. Diferenças na metodologia para o ELISA podem também explicar a discrepância entre estes resultados. Na análise da resposta humoral IgA anti-LT-K63 foi verificado que a diluição ideal de anticorpos anti-IgA conjugados com biotina e estreptoavidina foi de 1:5000 e 1:10000, respectivamente. Para normalizar as análises, as mesmas condições foram utilizadas para a determinação do título de IgA anti-*Salmonella*. Entretanto, Doggett et al. (1993) utilizaram diluições menores para a determinação do título de IgA anti-LPS.

Karem et al. (1995) comparando a eficiência de mutantes *aroA aroD* e $\Delta cya \Delta crp$ de *S. typhimurium*, na ativação de resposta imunológica contra um antígeno heterólogo carregado por estas, descreveram resultados significativamente diferentes. Após uma única dose oral, administrada em camundongos BALB/c, o mutante *aroA aroD* induziu resposta humoral sistêmica (IgG) e a nível de mucosa (IgA), além de resposta celular contra o antígeno heterólogo. O mutante $\Delta cya \Delta crp$ também induziu a produção de anticorpos IgG, embora menos eficientemente, mas falhou na indução de IgA e de resposta celular. Embora as causas destas diferenças sejam difíceis de serem determinadas, estes dados sugerem que mutantes $\Delta cya \Delta crp$ são menos eficientes na indução de resposta imunológica contra antígenos heterólogos. Esta observação

associada aos níveis baixos de proteína heteróloga produzidos de genes cópia única, integrados no genoma bacteriano, podem explicar os baixos títulos de anticorpos IgA anti-LT descritos neste estudo. De fato, está bem determinado que a quantidade de antígeno heterólogo produzido por linhagens recombinantes de *Salmonella*, é um fator determinante na ativação do sistema imunológico.

8. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi descrito a modificação e caracterização de um sistema de mini-transposons para a inserção randômica do *operon lt-k63* no genoma de linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium*. Os resultados aqui descritos demonstraram que a inserção deste *operon* ocorreu de forma não randômica no genoma bacteriano. Estes resultados são explicados pela baixa eficiência de transposição e pela ocorrência de recombinação homóloga. Esta característica limita o uso deste sistema para a integração randômica de genes heterólogos em linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium*. Após a seleção de transconjugantes de *S. typhimurium* para alta expressão de LT-K63, uma seqüência alvo de integração foi detectada no plasmídio de virulência. Esta integração foi decorrente de um processo de recombinação homóloga e esteve associada à expressão de alta quantidade de LT-K63. As diferenças na expressão de LT-K63 pelos diferentes transconjugantes de *S. typhimurium* são provavelmente decorrentes da transcrição de promotores a montante do referido *operon*. Desta forma, a clonagem da seqüência do plasmídio de virulência envolvida com a integração de *lt-k63* está em andamento, o que possibilitará determinar a seqüência do promotor envolvido com a expressão da toxina.

Algumas linhagens recombinantes utilizadas para a imunização de camundongos BALB/c induziram a produção de altos títulos de anticorpos IgG séricos contra LT-K63 mas falharam na indução de IgA. Estes resultados demonstram que é possível a indução de IgG mesmo quando a expressão do antígeno heterólogo é derivada de 1 ou poucas cópias do gene ou *operon*. Entretanto, o soro de camundongos imunizados não neutralizou a toxicidade de LT. Este resultado contrasta com trabalhos anteriores (Clements et al. 1986; Maskell et al., 1987) e provavelmente não é devido a montagem incorreta da toxina LT em *S. typhimurium*. Diferenças no processamento da toxina LT-K63 quando expressa por *S. typhimurium*, possivelmente estão envolvidas na determinação deste resultado. O modelo de linhagem vacinal proposto neste estudo foi portanto ineficiente na indução de anticorpos neutralizantes contra a toxina LT. Novos experimentos estão sendo planejados para verificar a causa deste resultado.

9. RESUMO

Salmonella typhimurium causa em camundongos infecções que se assemelham à febre tifóide humana, causada por *Salmonella typhi*. Isto permite que linhagens de *S. typhimurium*, atenuadas com relação à virulência e capazes de expressar antígenos heterólogos, sejam utilizadas como modelo para o desenvolvimento de linhagens vacinais de *S. typhi*. No presente estudo foram realizadas a modificação e caracterização de um sistema de minitransposon Tn5 para a construção de linhagens vacinais $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium*, contendo inserções ao acaso do *operon It-k63*. Este *operon* codifica um mutante não tóxico da enterotoxina termo-lábil (LT) produzida por algumas linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC). Linhagens recombinantes de *S. typhimurium* foram isoladas após conjugação com *E. coli* SM10 λ pir transformada com plasmídios conjugativos suicidas, contendo o minitransposon. Foi detectada uma alta incidência de recombinação homóloga em vez de transposição, como o evento responsável pela integração do *operon It-k63* no genoma bacteriano. Após a seleção de linhagens recombinantes produtoras de elevada quantidade de LT-K63, um sítio preferencial de inserção foi localizado no plasmídio de virulência de *S. typhimurium*. A integração, neste caso, ocorreu por recombinação homóloga e esteve associada à elevada expressão de LT-K63. Esta alta expressão é provavelmente devida à transcrição de um promotor presente a montante da inserção. Camundongos BALB/c imunizados com linhagens recombinantes desenvolveram altos títulos de anticorpos IgG anti-LT-K63. Entretanto, estes anticorpos não neutralizaram a toxicidade de LT para células Y1 em cultura. As linhagens vacinais também não foram efetivas na indução de IgA secretória ao nível de mucosa intestinal. Estes resultados demonstraram que o sistema de minitransposon Tn5 não é eficiente na geração de integrações ao acaso de genes heterólogos no genoma de linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. typhimurium*. O uso de linhagens de *S. typhimurium* produtoras de LT-K63 não foi efetivo na indução de anticorpos neutralizantes contra a toxina LT no modelo da febre tifóide de camundongos.

10. ABSTRACT

Salmonella typhimurium strains cause in mice a disease that mimics the human typhoid fever caused by the human associated pathogen *Salmonella typhi*. Because of this, avirulent strains of *S. typhimurium* have been used as carriers of heterologous antigens to the Gut associated lymphoid tissues (GALT) of mice as a model for vaccine development purposes. The present study describes the modification and characterization of a Tn5 minitransposon based system to generate random insertions of an enterotoxin mutant *operon* (LT-K63) into the genome of avirulent $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ *S. typhimurium* strains. This *operon* codify for a nontoxic mutant of heat-labile (LT) toxin, produced by some *Escherichia coli* enterotoxigenic (ETEC) strains. Recombinant *Salmonella* strains were isolated after conjugation with *E. coli* SM10 λ pir containing suicide conjugative plasmids carrying the minitransposon cassette. It was detected a high frequency of homologous recombination rather than transposition as the causative event of insertion. After selection for recombinant strains expressing high LT-K63 production, a hot spot of integration in the 90kb virulence plasmid was detected. This integration was originated by homologous recombination and was associated with high production of LT-K63. This high production is probably due to readthrough from a strong upstream promoter. BALB/c mice immunized with *S. typhimurium* producing LT-K63 developed high titers of serum IgG antibodies against this mutant enterotoxin. However, the serum from immunized mice did not neutralize the LT toxicity to Y1 adrenal cells. The vaccine strains were not effective to induce mucosal secretory IgA. Altogether these results demonstrated that the mini-transposon system was not a suitable tool to generate random insertions by transposition into *S. typhimurium* genome. The use of *S. typhimurium* as carrier of LT-K63 was not effective to generate neutralizing antibodies against LT in the mouse typhoid model.

11. REFERÊNCIAS

- Abshire, K. Z. & F. C. Neidhart. 1993. Analysis of proteins synthesized by *S. typhimurium* during growth within a host macrophage. *J. Bacteriol.* **175**: 3734-3743.
- Aitken, R. & T. R. Hirst. 1993. Recombinant enterotoxins as vaccines against *Escherichia coli*-mediated diarrhoea. *Vaccine* **11**: 227-233.
- Albert, M. J., A. K. Siddique, M. S. Islam, A. S. G. Faruque, M. Ansaruzzaman, S. M. Faruque & R. B. Sack. 1993. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet* **341**: 704.
- Albert, M. J., K. Alam, M. Ansaruzzaman, F. Quadri & R. B. Sack. 1994. Lack of cross-protection against diarrhea due to *Vibrio cholerae* O139 (Bengal strain) after oral immunization with *Vibrio cholerae* O1 vaccine strain CVD103-HgR. *J. Infect. Dis.* **169**: 230-231
- Alpuche-Aranda, C. M., E. L. Racoosing, J. A. Swanson & S. I. Miller. 1993. *Salmonella* enter macrophages by macropinocytosis and survive within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* **179**: 601-608.
- Alpuche-Aranda, C. M., E. L. Racoosing, J. A. Swanson & S. I. Miller. 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* **179**: 601-608.
- Alpuche-Aranda, C. M., E. P. Berthiaume, B. Mock, J. A. Swanson & S. I. Miller. 1995. Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect. Immun.* **63**: 4456-4462.
- Bacon, G.A., T. W. Burrows & M. Yates. 1950. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the virulence of mutants. *Br. J. Exp. Pathol.* **31**: 714-724.

- Bacon, G.A., T. W. Burrows & M. Yates. 1951. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the loss of virulence of certain mutants. **Br. J. Exp. Pathol.** 32: 85-96.
- Bajaj, V., C. Hwang & C. A. Lee. 1995. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. **Mol. Microbiol.** 18: 715-727.
- Baudry, B., A. Fasano, J. M. Ketley & J. B. Kapper. 1992. Cloning of a gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** 60: 428-434.
- Bäumler, A. J. & F. Heffron. 1995. Identification and sequence analysis of the *lpf*ABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** 177: 2087-2097.
- Bäumler, A. J., R. M. Tsolis & F. Heffron. 1996a. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 279-283.
- Bäumler, A. J., R. M. Tsolis & F. Heffron. 1996b. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.** 64: 1862-1865.
- Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, F. A. Bowe, J. G. Kusters & F. Heffron. 1996c. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. **Infect. Immun.** 64: 61-68.
- Behlau, I. & S. I. Miller. 1993. A PhoP-repressed gene promotes *S. typhimurium* invasion of epithelial cells. **J. Bacteriol.** 175: 4475-4484.
- Berg, D. E. 1989. Transposon Tn5. In: Mobile DNA. (Berg, D. E. and Howe, M. M., eds). American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Betley, M. J., V. L. Miller & J. J. Mekalanos. 1986. Genetics of bacterial enterotoxins. **Annu. Rev. Microbiol.** 40: 577-605.

- Black, R. E. 1993. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. *Vaccine*. 11: 100-106.
- Cárdenas, L. & J. D. Clements. 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carrier of foreign antigens. *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 328-342.
- Cárdenas, L. & J. D. Clements. 1993a. Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine* 11: 126-135.
- Cárdenas, L. & J. D. Clements. 1993b. Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect. Immun.* 61: 4629-4636.
- Challacombe, S.J. & T. B. Tomasi Jr. 1980. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J. Exp. Med.* 152: 1459-1472.
- Chatfield, S. N., I. G. Charles, A. J. Makoff, M. D. Oxer, G. Dougan, D. Pickard, D. Slater & N. F. Fairweather. 1992. Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Bio/Technol.* 10: 888-892.
- Chopra, A. K., J. W. Peterson, P. Chary & R. Prasad. 1994. Expression and characterization of the cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin. *Microbiol. Pathol.* 16: 85-98.
- Church, G. M. & W. Gilbert. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1991-1995.
- Clegg, S. & G. F. Gerlach. 1987. Enterobacterial fimbriae. *J. Bacteriol.* 169: 934-938.
- Clements, J. D. & S. El-Morshidy. 1984. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera-*Escherichia coli*-related diarrhea. *Infect. Immun.* 46: 564-569.
- Clements, J. D., F. L. Lyon, K. L. Lowe, A. L. Farrand & S. El-Morshidy. 1986. Oral Immunization of mice with attenuated *Salmonella enteritidis* containing a

- recombinant plasmid which codes for production of the B subunit of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. **Infect. Immun.** **53**: 685-692.
- Clements, J. D.** 1990. Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* strains that produce heat-labile and heat-stable enterotoxins. **Infect. Immun.** **58**: 1159-1166.
- Clements, J. D., D. A. Sack, J. R. Harris, F. Van Loon, J. Chackraborty & F. Ahmed.** 1990. Field trial of oral cholera vaccine in Bangladesh: results from three-year follow-up. **Lancet.** **355**: 270-273.
- Curtiss, R. III. & S. M. Kelly.** 1987. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. **Infect. Immun.** **55**: 3035-3043.
- Curtiss, R. III, S. M. Kelly, S. A. Tinge, C. O. Tacket, M. M. Levine, J. Srinivasan & M. Koopman.** 1994. Recombinant *Salmonella* vectors in vaccine development. In: Brown, F. (ed). Recombinant vectors in vaccine development. Dev. Biol. Stand., Basel, Karger, **82**: 193-199.
- De Lorenzo, V., M. Herrero & K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative Eubacteria. **J. Bacteriol.** **172**: 6568-6572.
- De Lorenzo, V. & K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10- derived minitransposons. **Methods Enzymol.** **235**: 386-405.
- Dehoux, P. & P. Cossart.** 1995. Homologies between salmolyisin and some bacterial regulatory proteins. **Mol. Microbiol.** **15**: 591-592.
- Di Tommaso, A., G. Saletti, M. Pizza, R. Rappuoli, G. Dougan, S. Abrignani, G. Douce & M. T. De Magistris.** 1995. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a non-toxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. **Infect. Immun.** **64**: 974-979.

- DiRita, V. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 6: 451-458.
- DiRita, V. 1994. Multiple regulatory systems in *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Trend. Microbiol.* 2: 37-38.
- Doggett, T. A., E. K. Jagusztyn-Krynicka & R. Curtiss III. 1993. Immune responses to *Streptococcus sobrinus* surface protein antigen A by recombinant *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 61: 1859-1866.
- Donnenberg, M. S. & J. B. Kaper. 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *E. coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59: 4310-4317.
- Dorman, C. J. 1995. DNA topology and global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. *Microbiol.* 141: 1271-1280.
- Douce, G., C. Turcotte, I. Cropley, M. Roberts, M. Pizza, M. Domenighini, R. Rappuoli & G. Dougan. 1995. Mutants of *E. coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1644-1648.
- Dougan, G., S. Chatfield, D. Pickard, D.O. Collaghan & D. Maskell. 1988. Construction and characterization of *Salmonella* vaccine strains harboring mutations in two different *aro* genes. *J. Infect. Dis.* 158: 1329-1335.
- Eichelberg, K., C. C. Ginocchio & J. E. Galán. 1994. Molecular and functional characterization of the *S. typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: Homology of *invC* to the F₀F₁ ATPase family of proteins. *J. Bacteriol.* 176: 4501-4510.
- Elsinghorst, E. A., L. S. Baron & D. J. Kopecko. 1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: cloning and expression of *S. typhi* invasion determinants in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5173-5177.

- Elsinghorst, E. A. & D. J. Kopecko. 1992. Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60: 2409-2417.
- Elsinghorst, E. A. & J. A. Weitz. 1994. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect. Immun.* 63: 3463-3471.
- Ernst, R. K., D. M. Dombroski & J.M. Merrick. 1990. Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 58: 2014-2016.
- Fayolle, C., D. O'Callaghan, P. Martineau, A. Charbit, J. M. Clément, M. Hofnung & C. Leclerc. 1994. Genetic control of antibody responses induced against an antigen delivered by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 62: 4310-4319.
- Feinberg, A. P. & B. Vogelstein. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 266-267.
- Fiedler, S. & R. Wirth. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.* 170: 38-44.
- Field, M., L.H. Graf, W. J. Laiard & P. L. Smith. 1978. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects of guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2800-2084.
- Fields, P. I., E. A. Groisman & F. Heffron. 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbial proteins from phagocytic cells. *Science* 243: 1059-1062.
- Flynn, J. L., W. R. Weiss, K. A. Norris, H. S. Seifert, S. Kumar & M. So. 1990. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a *Salmonella* antigen-delivery system. *Mol. Microbiol.* 4: 2111-2118.
- Fontana, M. R., R. Manetti, V. Giannelli, C. Magagnoli, A. Marchini, R. Olivieri, M. Domenighini, R. Rappuoli & M. G. Pizza. 1995. Construction of a nontoxic

- derivatives of cholera toxin and characterization of the immunological response against the A subunit. *Infect. Immun.* **63**: 2356-2360.
- Foster, J. W. & M. P. Spector. 1995. How *Salmonella* survive against the odds. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 145-174.
- Francis, C. L., T. A. Ryan, B. D. Jones, S. J. Smith & S. Falkow. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* **364**: 639-642.
- Friedrich, M. J., N. E. Kinsey, J. Villa & J. Kadner. 1993. Nucleotide sequence of a 13.9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *S. typhimurium*: the presence of fimbrial biosynthetic genes. *Mol. Microbiol.* **8**: 543-558.
- Galán, J. E. & R. Curtiss III. 1990. Expression of *S. typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.* **58**: 1879-1885.
- Galán, J. E., K. Nakayama & R. Curtiss III. 1990. Cloning and characterization of the *asd* gene of *S. typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* **94**: 29-35.
- Galán, J. E., C. Ginocchio & P. Costeas. 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to a new family. *J. Bacteriol.* **174**: 4338-4349.
- Gálan, J. E. 1994. *Salmonella* entry into mammalian cells: different yet converging signal transduction pathways? *Trend. Cell Biol.* **4**: 196-199
- Galán, J. E. 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**: 263-271.
- Germanier, R. & E. Fürer. 1971. Immunity in experimental salmonellosis.II. Basis for the avirulence and protective capacity of *galE* mutants of *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* **4**: 663-673.

- Germanier, R. & E. Furer. 1975. Isolation and characterization of GalE mutant Ty21a of *S. typhimurium*: candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **131**: 553-558.
- Ginocchio, C. C., S. B. Olmsted, C. L. Wells & J. E. Galán. 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *S. typhimurium*. *Cell* **76**: 717-724.
- Goldberg, M. B. & P. J. Sansonetti. 1993. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect. Immun.* **61**: 4941-4946.
- Groisman, E. A., P. I. Fields & F. Heffron. 1990. Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. In: Molecular basis of bacterial pathogenesis. Ed. Barbara H. Iglewski and Virginia L. Clark, Academic Press, London, New York.
- Groisman, E. A., M. H. Saier Jr & H. Ochman. 1992. Horizontal transfer of a phosphatase gene as evidence for mosaic structure of the *Salmonella* genome. *EMBO J.* **11**: 1309-1316.
- Groisman, E. A. & H. Ochman. 1993. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *S. typhimurium* and *S. flexneri*. *EMBO J.* **12**: 3779-3787.
- Gross, R., B. Aricò & R. Rappuoli. 1989. Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol. Microbiol.* **3**: 1661-1667.
- Guiney, D. G., F. C. Fang, M. Krause & S. Libby. 1994. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**: 1-10.
- Gulig, P. A. & R. Curtiss III. 1987. Plasmid-associated virulence of *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* **55**: 2891-2901.
- Hafferman, E. J., S. Reed, J. Hackett, J. Fierer, C. Raudier & D. Guiney. 1992. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *S. typhimurium* virulence plasmid gene rck. *J. Clin. Invest.* **90**: 953-964.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning, vol. 1. Ed. Glover, D. M., IRL Press, Oxford, UK, pp. 109-135.

- Harrison, J. A., D. Pickard, C. F. Higgins, A. Khan, S. N. Chatfield, T. Ali, C. J. Dorman, C. E. Hormaeche & G. Dougan. 1994. Role of *hns* in the virulence phenotype of pathogenic *Salmonellae*. *Mol. Microbiol.* **13**: 133-140.
- Hermant, D., R. Ménard, N. Arricau, C. Parsot & M. Y. Popoff. 1995. Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **17**: 781-789.
- Helander, I. M. 1985. Isolation and electrophoretic analysis of bacterial lipopolysaccharides. In: Enterobacterial surface antigens: methods for molecular characterization, Korhonen, T. K., E. A. Dawes, and P. H. Mäkelä (ed), Elsevier Science Publishers.
- Hennecke, F., H. Kolmar, K. Brundl & H. J. Fritz. 1991. The *vsr* gene product of *E. coli* K12 is a strand and sequence specific DNA mismatch repair endonuclease. *Nature* **353**: 776-778.
- Herrero, M., V. De Lorenzo & K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- Herrington, D. A., R. H. Hall, G. A. Losonsky, J. J. Mekalanos, R. K. Taylor & M. M. Levine. 1988. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med.* **168**: 1487-1492.
- Hess, J., I. Gentshev, D. Miko, M. Welzel, C. Ladel, W. Goebel & S. H. E. Kaufmann. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 1458-1463.
- Hohmann, E. L., C. A. Oletta, W. P. Loomis & S. I. Miller. 1995. Macrophage-inducible expression of a model antigen in *S. typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* **92**: 2904-2908.

- Hoiseth, S. K. & B. D. Stocker. 1981. Aromatic-dependent *S. typhimurium* are nonvirulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. H. Sneath, T. Saley & T. W. Stanley. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. (Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. H., Saley, T. and Stanley, T. W., eds). Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Hone, D., S. Attridge, B. Forrest, R. Morona, D. Daniels, J. T. LaBrooy, R. C. A. Bartholomeuz, D. J. C. Shearman & J. Hackett. 1988a. A *galE* via (Vi antigen-negative) mutant of *S. typhi* Ty2 retains virulence in humans. *Infect. Immun.* 56: 1326-1333.
- Hone, D., S. Attridge, L. van den Bosh & J. Hackett. 1988b. A chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. *Microb. Pathogen.* 5: 407-418.
- Hone, D. M., A. M. Harris, S. Chatfield, G. Dougan & M. M. Levine. 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *S. typhi*. *Vaccine* 9: 810-816.
- Hueck, C. J., M. J. Hantman, V. Bajaj, C. Johnston, C. A. Lee & S. I. Miller. 1995. *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* Ipa proteins. *Mol. Microbiol.* 18: 479-490.
- Johnson, K., I. Charles, G. Dougan, D. Pickard, P. O'Gaora, T. Ali, I. Miller & C. Hormaeche. 1991. The role of a stress-response protein in *S. typhimurium* virulence. *Mol. Microbiol.* 5: 401-407.
- Jones, B. D. & S. Falkow. 1994. Identification and characterization of a *S. typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect. Immun.* 62: 3745-3752.
- Jones, B. D., N. Ghori & S. Falkow. 1994. *S. typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180: 15-23.

- Kaniga, K., D. Trollinger & J. E. Galán. 1995. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J. Bacteriol.* **177**: 7078-7085.
- Karem, K. & J. W. Foster. 1993. The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **10**: 75-86.
- Karem, K. L., S. Chatfield, N. Kuklin & B. T. Rouse. 1995. Differential induction of carrier antigen-specific immunity by *Salmonella typhimurium* live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of Balb/C mice. *Infect. Immun.* **63**: 4557-4563.
- Kauffmann, F. 1978. Das Fundament (Munksgaard, Copenhagen).
- Leclerk, C., R. Lo-Man, C. Fayolle, A. Charbit, J. M. Clément, P. Martineau, D. O'Callagan & M. Hofnung. 1994. Molecular and cellular parameters controlling the immunogenicity of foreign B- or T-cell epitopes expressed by recombinant vectors. In: Brown, F. (ed). Recombinant vectors in vaccine development. Dev. Biol. Stand., Basel, Karger, **82**: 193-199.
- Lee, C. A., B. D. Jones & S. Falkow. 1992. Identification of a *S. typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1847-1851.
- Le Minor, L. & M. Y. Poppoff. 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bact.* **37**: 465-468.
- Levine, M. M. 1987. *E. coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**: 377-389.

- Levine, M. M., J. B. Kaper, D. Herrington, J. M. Ketley, G. Losonsky, C. O. Tacket, B. Tall & S. Cryz. 1988. Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD103 and CVD103-HgR. *Lancet* **2**: 467-470.
- Levine, M. M. & J. B. Kapper. 1993. Live oral vaccines against cholera: an update. *Vaccine* **11**: 207-212.
- Libby, S. J., W. Goebel, A. Ludwig, N. Buchmeier, F. Bowe, F. C. Fang, D. G. Guiney, J. G. Songer & F. Hefron. 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 489-493.
- Lilleengen, K. 1948. Typing *Salmonella typhimurium* by means of bacteriophage. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **77**: 11-125.
- Liu, S. L. & K. E. Sanderson. 1992. A physical map of the *Salmonella typhimurium* LT2 genome made by using XbaI analysis. *J. Bacteriol.* **174**: 1662-1672.
- Liu, S. L., A. Hessel & K. E. Sanderson. 1993. The XbaI-BlnI-CeuI genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2 determined by double digestion, and labeling and pulse-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **175**: 4104-4120.
- Lyons, S & N. Nelson. 1984. An immunological method for detecting gene expression in yeast colonies. *Proc. Natl. Acad. USA.* **81**: 7426-7430.
- Manning, P. A. 1992. Molecular design of cholera vaccines. *Vaccine.* **10**: 1015-1021.
- Marinaro, M., H. F. Staats, T. Hiroi, M. Coste, R. J. Jackson, P. N. Boyaka, N. Okahashi, M. Tamamoto, K. Fujihashi, H. Kiyono, H. bluethmann & J. R. Maghee. 1995. The mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of t helper (Th2) cells ant IL-4. *J. Immunol.* **155**: 4621-4629.
- Maskell, D. J., K. J. Sweeney, D. O'Callaghan, C. E. Hormaeche, F. Y. Liew & G. Dougan. 1987. *Salmonella typhimurium aroA* mutants as carrier of the *Escherichia coli* heat-labile B subunit to the murine secretory and systemic immune systems. *Microb. Pathog.* **2**: 211-221.

- Maurelli, A. T. 1994. Virulence protein export systems in *Salmonella* and *Shigella*: a new family or lost relatives?. *Trends. Cell. Biol.* 4: 240-242.
- Mcclelland, M., R. A. Jones, Y. Patel & M. Nelson. 1987. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucl. Acids. Res.* 15: 5985-6005.
- McCormick, B. A., S. P. Colgan, C. D. Archer, S. I. Miller & J. L. Madara. 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signaling to subepithelial neutrophils. *J. Cell. Biol.* 123: 895-907.
- McCormick, B. A., S. I. Miller, D. Carnes & J. L. Madara. 1995. Transepithelial signaling to neutrophils by *Salmonella*: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect. Immun.* 63: 2302-2309.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miller, V. L. & J. J. Mekalanos. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membranes proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J. Bacteriol.* 170: 2575-2583.
- Miller, S. I., W. P. Loomis, C. Alpuche-Aranda, I. Behlau & E. Hohmann. 1993. The PhoP virulence regulon and live oral *Salmonella* vaccines. *Vaccines* 11: 122-125.
- Mills, D. M., V. Bajaj & C. A. Lee. 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *S. typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *E. coli* K12 chromosome. *Mol. Microbiol.* 15: 749-759.
- Moon, H. W. 1990. Colonization factors antigens of enterotoxigenic *E. coli* in animals. *Curr. Top. Microbial. Immunol.* 151: 147-165.
- Morona, R., J. K. Morona, A. Considine, J. A. Hackett, L. van den Bosh, L. Beyer & S. R. Attridge. 1994. Construction of K88-and K99-expressing clones of *S. typhimurium* G:30: immunogenicity following oral administration to pigs. *Vaccine* 12: 513-517

- Movva, R. N., P. Green, K. Nakamura & M. Inouye. 1981. Interaction of cAMP receptor protein with the *ompA* gene, a gene for a major outer membrane protein of *E. coli*. *FEBS Lett.* **128**: 186-190.
- Nakayama, K., S. K. Kelly & R. Curtiss III. 1988. Construction of an Asd⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Bio/Technol.* **6**: 693-697.
- Nashar, T. O., T. Amin, A. Marcello & T. R. Hirst. 1993. Current progress in the development of the B subunit of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as carriers for the oral delivery of heterologous antigens and epitopes. *Vaccine* **11**: 235-240.
- Ouellette, A. J., M. M. Hsieh, M. T. Nosek, D. F. Canno-Gauci, K. M. Huttner, R. N. Buick & M. E. Selsted. 1994. Mouse paneth cell defensins: Primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect. Immun.* **62**: 5040-5047.
- Owen-Hughes, T., G. D. Pavitt, D. S. Santos, J. Sidebotham, C. S. J. Hulton, J. C. D. Hinton & C. F. Higgins. 1992. Interaction of H-NS with curved DNA influences DNA topology and gene expression. *Cell* **71**: 255-265.
- Pace, J., M. J. Hayaman & J. E. Galán. 1993. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell* **72**: 505-514.
- Parra-Lopez, C., M. T. Baer & E. A. Groisman. 1993. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *S. typhimurium*. *EMBO J.* **12**: 4053-4062.
- Pascopella, L., B. Raupach, N. Ghori, D. Monack, S. Falkow & P. L. C. Small. 1995. Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. *Infect. Immun.* **63**: 4329-4335.
- Pavitt, G. D. & C. F. Higgins. 1993. Chromosomal domains of supercoiling in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **10**: 685-696.

- Pearson, G. D. N., A. Woods, S. L. Chiang & J. J. Mekalanos. 1993. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3750-3754.
- Pegues, D. A., M. J. Hantman, I. Behlau & S. I. Miller. 1995. PhoP/PhoQ transcription repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol. Microbiol.* **17**: 169-181.
- Pickard D., J. Li, M. Roberts, D. Maskell, D. Hone, M. M. Levine, G. Dougan & S. Chatfield. 1994. Characterization of defined *ompR* mutants of *S. typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect. Immun.* **62**: 3984-3993.
- Pizza, M., A. Covacci, M. Bugnoli, R. Manetti & R. Rappuoli. 1990. The S1 subunit is important for pertussis toxin secretion. *J. Biol. Chem.* **265**: 17759-17763.
- Pizza, M., M. R. Fontana, M. M. Giuliani, M. Domenighini, C. Magagnoli, V. Giannelli, D. Nucci, W. Hol, R. Manetti & R. Rappuoli. 1994a. A genetically detoxified derivative of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J. Exp. Med.* **180**: 2147-2153.
- Pizza, M., M. Domenighini, W. Hol, V. Giannelli, M. R. Fontana, M. M. Giuliani, C. Magagnoli, S. Peppoloni, R. Manetti & R. Rappuoli. 1994b. Probing the structure-activity relationship of *Escherichia coli* LT-A by site-directed mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **14**: 51-60.
- Poppoff, M. Y., J. Bockemühl & F. W. Hickman-brenner 1995. Supplement 1994 (no. 38) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **146**: 799-803.
- Prasad, R., A. K. Chopra, J. W. Peterson, R. Pericas & C. W. Houston. 1990. Biological and immunological characterization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* **9**: 315-329.
- Ramamurthy, T., S. Garg, R. Sharma, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, T. Shimada, T. Takeda, T. Karasawa, H. Kurazano, A. Pal & Y. Takeda. 1993. Emergence of a

novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India.

Lancet 341: 703-704.

Redman, T.R., C. C. Harmon & S. M. Michalek. 1994. Oral Immunization with recombinant *S. typhimurium* expressing surface protein antigen A of *Streptococcus sobrinus*: Persistence and induction of humoral response in rats. **Infect. Immun.** 62: 3162-3171.

Redman, T. R., C. C. Harmon, R. L. Lallone & S. M. Michalek. 1995. Oral Immunization with recombinant *S. typhimurium* expressing surface protein antigen A of *Streptococcus sobrinus*: dose response and induction of protective humoral response in rats. **Infect. Immun.** 63: 2004-2011.

Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis & J. J. Farmer III. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to others salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **J. Clin. Microbiol.** 27: 313-320.

Rosenshine, I., S. Ruschkowsky, V. Foubister & B. B. Finlay. 1994. *S. typhimurium* invasion of epithelial cells: role of induced host cell tyrosine protein phosphorylation. **Infect. Immun.** 62: 4969-4974.

Rossolini, G.M., P. Muscas, A. Chiesurin & G. Satta. 1993. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Salmonella typhi* gene cluster coding for type 1 fimbriae, p. 408-412. In: NATO ASI Series Volume: The Biology of *Salmonella* (Cabello, F. et al., eds.), Plenum Publishing Co., New York.

Rowland, K. L., L. E. Martin, C. R. Esther & J. K. Spitznagel. 1993. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 defined a new two component regulatory system with a possible role in virulence. **J. Bacteriol.** 175: 4154-4164.

Rowland, K. L., C. R. Esther & J. K. Spitznagel. 1994. Isolation and characterization of a gene, *pmrD*, that confers resistance to polymyxin when expressed in multiple copies. **J. Bacteriol.** 176: 3589-3597.

- Salyers, A. A. & D. D. Whitt. 1994.** *Salmonella* infection. In: Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach. (Salyers, A. A. and Whitt, D. D., eds). ASM Press, Washington, DC, pp. 229-243.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanderson, K. E., A. Hessel & K. E. Rudd. 1995.** Genetic map of *S. typhimurium*, Edition VIII. **Microbiol. Rev.** 59: 241-303.
- Savarino, S. J. 1993.** Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. Enteroadherent *Escherichia coli*: a heterogeneous group of *E. coli* implicated as diarrhoeal pathogens. **Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene** 87: 49-53.
- Schödel, F., S. M. Kelly, D. L. Peterson, D. R. Milich & R. Curtiss III. 1994.** Hybrid Hepatitis B virus core Pre-S proteins synthesized in avirulent *S. typhimurium* and *S. typhi* for oral vaccination. **Infect. Immun.** 62: 1669-1776.
- Sears, C. L. & J. B. Kapper. 1996.** Enteric bacterial toxins: Mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.** 60: 167-215.
- Smith, G. E. & M. D. Summers. 1980.** The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzyloxymethyl paper. **Anal. Biochem.** 109: 123-129.
- Spangler, B. D. 1992.** Structure and function of cholera toxin and related *E. coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.** 56: 622-647.
- Sperandio, V., J. A. Giron, W. D. Silveira & J. B. Kaper. 1995.** The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** 63: 4433-4438.
- Staats, H. F., R. J. Jackson, M. Marinaro, I. Takahasshi, H. Kiyono & J. R. Maghee. 1994.** Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. **Curr. Op. Immunol.** 6: 572-583.

- Stone, B. J., C. M. Garcia, J. L. Badger, T. Hasset, R. I. F. Smith & V. L. Miller. 1992. Identification of novel loci affecting entry of *S. enteritidis* into eukaryotic cells. *J. Bacteriol.* **174**: 3945-3952.
- Strugnell, R. A., D. Maskell, N. Fairweather, D. Pickard, A. Cockayne, C. Penn & G. Dougan. 1990. Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *S. typhimurium* vaccine strain. *Gene* **88**: 57-63.
- Sukupolvi, S., R. Vuorio, S. Y. Qi, D. O'Connor & M. Rhen. 1990. Characterization of the *traT* gene and mutants that increase outer membrane permeability from the *S. typhimurium* virulence plasmid. *Mol. Microbiol.* **4**: 49-57.
- Tacket, C. O., G. Losonsky, J. P. Nataro, S. J. Cryz, R. Edelman, A. Fasano, J. Michalski, J. B. Kaper & M. M. Levine. 1993. Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD110, a $\Delta ctxA \Delta zot \Delta ace$ derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* **168**: 1536-1540.
- Takahashi, I., I. Nakagawa, H. Kiyono, J. R. Maghee, J. D. Clements & S. Hamada. 1995. Mucosal T cells induce systemic anergy for oral tolerance. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* **206**: 414-420.
- Trucksis, M. J. E. Galen, J. Michalski, A. Fasano & J. B. Kaper. 1993. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 5267-5271.
- Tsai, C. M. & C. E. Frash. 1983. A sensitive stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115-119.
- Véscovi, E. G., F. C. Soncini & E. A. Groisman. 1994. The role of the PhoP/PhoQ regulon in *Salmonella* virulence. *Res. Microbiol.* **145**: 473-480.
- Véscovi, E. G., F. C. Soncini & E. A. Groisman. 1996. Mg^{2+} as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell.* **84**: 165-174.

- Waldor, M. K. & J. Mekalanos. 1994.** Emergence of a new cholera pandemic: molecular analysis of virulence determinants in *Vibrio cholerae* O139 and development of a live vaccine prototype. **J. Infect. Dis.** 170: 278-283.
- Walker, P. D. 1992.** Bacterial vaccines: old and new. veterinary and medical. **Vaccine** 10: 977-990.
- Walker, R. I.** New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. **Vaccine.** 12: 387-400.
- Wick, M. J., C. V. Harding, S. J. Normark & J. D. Pfeifer. 1994.** Parameters that influence the efficiency of processing antigenic epitopes expressed in *S. typhimurium*. **Infect. Immun.** 62: 4542-4548.
- Willians, S. G., S. R. Attridge & P. Manning. 1993.** The transcriptional activator HlyU of *Vibrio cholerae*: nucleotide sequence and role in virulence gene expression. **Mol. Microbiol.** 9: 751-760.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. De Cruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael & M. W. Grahan. 1989.** Quantitative evaluation of *E. coli* strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. **Nucl. Acid. Res.** 17: 3469-3478.
- Zierler, M. K. & J. E. Galán. 1995.** Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *S. typhimurium* invasion protein InvJ. **Infect. Immun.** 63: 4024-4028.