



**FERNANDA MARIA FRANZIN**

**“PAPEL DO SISTEMA AI-  
3/EPINEFRINA/NOREPINEFRINA NA REGULAÇÃO DA  
EXPRESSÃO GÊNICA DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA”**

Campinas

2013

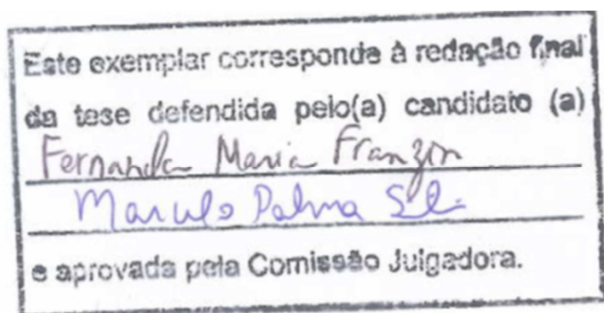




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDA MARIA FRANZIN

"PAPEL DO SISTEMA AI-3/EPINEFRINA/ NOREPINEFRINA  
NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
*ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGENICA ATÍPICA"



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, área de concentração: Microbiologia

ORIENTADOR: Dr. Marcelo Palma Sircili

Campinas

2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F859p Franzin, Fernanda Maria, 1981-  
Papel do sistema AI-3/epinefrina/norepinefrina na regulação da expressão gênica de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica / Fernanda Maria Franzin. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Palma Sircili.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Regulação da expressão gênica. 2. *Escherichia coli* enteropatogênica. 3. Quorum sensing. 4. Virulência (Microbiologia). I. Sircili, Marcelo Palma. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Role of AI-3/epinephrine/norepinephrine system in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* gene expression

**Palavras-chave em inglês:**

Gene expression regulation

Enteropathogenic *Escherichia coli*

Quorum sensing

Virulence (Microbiology)

**Área de concentração:** Microbiologia

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Marcelo Palma Sircili [Orientador]

Wanderley Dias da Silveira

Gerson Nakazato

Viviane Nakano

Marcelo Lancellotti

**Data de defesa:** 11-12-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 11 de dezembro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Marcelo Palma Sircili (orientador)

  
Assinatura

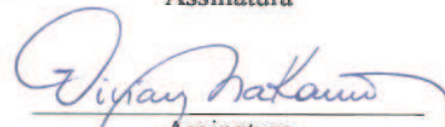
Prof. Dr. Wanderley Dias Da Silveira

  
Assinatura

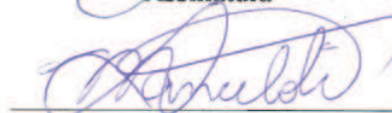
Prof. Dr. Gerson Nakazato

  
Assinatura

Dra. Viviane Nakano

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

  
Assinatura

Dra. Fernanda De Pace

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dra. Márcia Regina Franzin

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dra. Mônica Alves Vieira

\_\_\_\_\_  
Assinatura



## ABSTRACT

Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) is part of a group of pathogens capable of forming a characteristic lesion in epithelial cells called Attaching and Effacing (A/E). Genes required for A/E lesion formation are located on a pathogenicity island called Locus of Enterocyte Effacement (LEE). The regulation of LEE gene expression is a complex process and involves several factors and regulatory pathways, including the quorum sensing system AI-3/Epinephrine/Norepinephrine. The histidine kinase sensor QseC is responsible for detecting AI-3 produced by other bacteria and epinephrine/norepinephrine produced by the host, starting a regulatory cascade that induces the expression of virulence genes. In order to evaluate the influence of this system in the regulation of virulence factors of aEPEC, a *qseC* mutant has been generated, and transcriptional and phenotypical analyses were performed. Motility, ability to secrete proteins and induce A/E lesion, in the presence and/or absence of the epinephrine signal were analysed. qRT-PCR assays demonstrated reduced transcriptional levels of the LEE operons, and *flhD*, *fliC* and *nleA* genes in the mutant strain, suggesting that QseC regulates the expression of these virulence factors. Motility assays, secreted proteins and FAS have shown that motility, protein secretion and A/E lesion formation were decreased in the mutant, confirming the participation of QseC regulating these phenotypes in aEPEC. The same tests were performed in the presence of epinephrine, and demonstrated that this signal plays an important role in LEE gene regulation of aEPEC and this regulation does not occur exclusively via QseC, but involves other receptor for this hormone. Epinephrine regulates the expression of LEE genes, however, does not seem to be an important signal in the regulation of NleA and flagella/motility gene expression. Transcriptome analysis of the mutant strain has shown that, besides having a central role in the regulation of aEPEC virulence, QseC also acts as an important global regulator of gene expression in this strain, regulating, directly or indirectly, the expression of approximately 1505 genes, including genes related to metabolism, transport, chemotaxis, ion uptake, resistance to stress, biofilm formation, transcriptional regulation, and other. We proposed a simplified general model of virulence gene regulation of aEPEC through the AI-3/Epi/NE system and its sensor QseC. This is the first work describing the quorum sensing gene regulation modulating the virulence expression in atypical EPEC.

**KEY WORDS:** Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*, Quorum sensing, Virulence





## RESUMO

*Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) faz parte de um grupo de patógenos capazes de formar um tipo de lesão em células epiteliais denominada *Attaching and Effacing* (A/E). Os genes requeridos para a formação da lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). A regulação da expressão dos genes de LEE é um processo complexo e envolve inúmeros fatores e vias regulatórias, incluindo o sistema de *quorum sensing* AI-3/Epinefrina/Norepinefrina. O sensor histidina-quinase QseC é responsável por detectar AI-3 produzido por outras bactérias e epinefrina/norepinefrina produzidas pelo hospedeiro e iniciar uma cascata regulatória que induz a expressão de genes de virulência. Para avaliar o papel desse sistema na regulação de fatores de virulência de aEPEC, um mutante para o gene *qseC* foi gerado e analisado a nível transcricional e fenotípico quanto a sua motilidade, capacidade de secretar proteínas e induzir lesão A/E, na presença e/ou ausência do sinal epinefrina. Ensaio de qRT-PCR demonstraram níveis transcricionais diminuídos para LEE e para os genes *flhD*, *fliC* e *nleA* no mutante, sugerindo que QseC regula a expressão desses fatores de virulência. Ensaio de motilidade, proteínas secretadas e FAS evidenciaram que a motilidade, a secreção de proteínas e a formação da lesão A/E estavam diminuídas no mutante, comprovando a participação de QseC na regulação desses fenótipos em aEPEC. Os mesmos ensaios realizados na presença de epinefrina demonstraram que esse sinal tem papel importante na regulação dos genes de LEE de aEPEC e que essa regulação não ocorre exclusivamente via QseC, mas envolve outro receptor para esse hormônio. Epinefrina regula a expressão dos genes de LEE, porém, parece não ser um sinal importante na regulação da expressão de *NleA* e flagelo/motilidade. A análise do transcriptoma da linhagem mutante demonstrou que, além de ter uma importância central na regulação da virulência de aEPEC, QseC age também como um importante regulador global da expressão gênica nessa linhagem, regulando, direta ou indiretamente, a expressão de, aproximadamente, 1505 genes, entre eles genes relacionados ao metabolismo, transporte, quimiotaxia, captação de íons, resistência à stress, formação de biofilme, regulação transcricional, etc. Um modelo geral simplificado da regulação gênica da virulência de aEPEC através do sistema AI-3/Epi/NE e seu sensor QseC foi proposto. Esse trabalho descreve pela primeira vez a regulação do tipo *quorum sensing* na modulação da expressão da virulência em uma EPEC atípica.

**PALAVRAS CHAVE:** *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. *Quorum sensing*. Virulência



## SUMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>ESCHERICHIA COLI</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)</b>	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>A LESÃO ATTACHING AND EFFACING (A/E)</b>	<b>5</b>
	<b>A ILHA DE PATOGENICIDADE LEE E O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III</b>	
<b>1.3</b>	<b>(TTSS)</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1.</b>	<b>A REGULAÇÃO DA REGIÃO LEE</b>	<b>11</b>
<b>1.4.</b>	<b>QUORUM SENSING</b>	<b>15</b>
<b>1.4.1.</b>	<b>SISTEMAS DE QUORUM SENSING</b>	<b>17</b>
<b>1.4.1.1.</b>	<b>SISTEMA A-1/LUXIR</b>	<b>17</b>
<b>1.4.1.2.</b>	<b>SISTEMA DE PEPTÍDEOS AUTO-INDUTORES (AIP)</b>	<b>18</b>
<b>1.4.1.3.</b>	<b>SISTEMA AI-2/LUXS</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1.4.</b>	<b>SISTEMA AI-3/EPINEFRINA/NOREPINEFRINA</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1.</b>	<b>LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDEOS</b>	<b>30</b>
<b>3.2.</b>	<b>OBTENÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTE E COMPLEMENTADA</b>	<b>31</b>
	<b>DESENHO DOS INICIADORES PARA DELEÇÃO E VERIFICAÇÃO DA DELEÇÃO</b>	
<b>3.2.1.</b>	<b>DE QSEC</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>MUTAGÊNESE DE QSEC</b>	<b>32</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL</b>	<b>33</b>
<b>3.2.4.</b>	<b>CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE RECOMBINAÇÃO</b>	<b>34</b>
<b>3.2.5.</b>	<b>ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE</b>	<b>34</b>
<b>3.2.6.</b>	<b>PURIFICAÇÃO DO CASSETE QSEC::CAT EM GEL DE AGAROSE</b>	<b>35</b>
	<b>TRANSFORMAÇÃO DA LINHAGEM BA320 COM O PLASMÍDEO</b>	
<b>3.2.7.</b>	<b>ACESSÓRIO PKD46</b>	<b>35</b>
<b>3.2.8.</b>	<b>RECOMBINAÇÃO DO GENE QSEC PELO CASSETE DE RECOMBINAÇÃO</b>	<b>36</b>

	QSEC::CAT	
<b>3.2.9.</b>	CONFIRMAÇÃO DA RECOMBINAÇÃO POR PCR	37
<b>3.2.10.</b>	ELIMINAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA CAT	38
<b>3.2.11.</b>	SEQUENCIAMENTO DE DNA	38
<b>3.2.12.</b>	COMPLEMENTAÇÃO	39
<b>3.3.</b>	ANÁLISES TRANSCRICIONAIS	40
<b>3.3.1.</b>	EXTRAÇÃO DE RNA	40
<b>3.3.2.</b>	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR)	40
<b>3.3.3.</b>	DNA MICROARRAY	42
<b>3.4.</b>	ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	44
<b>3.4.1.</b>	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	44
<b>3.4.2.</b>	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS	44
<b>3.4.3.</b>	SDS-PAGE	45
<b>3.4.4.</b>	IMMUNOBLOTTING	46
<b>3.5.</b>	ANÁLISES FENOTÍPICAS	46
<b>3.5.1.</b>	TESTE DE FAS (FLUORESCENT ACTIN STAINING)	46
<b>3.5.2.</b>	TESTE DE MOTILIDADE	48
<b>3.6.</b>	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SINAL EPINEFRINA	48
<b>3.7.</b>	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
<b>4.</b>	RESULTADOS	49
<b>4.1.</b>	CONSTRUÇÃO DO MUTANTE $\Delta$ QSEC	50
<b>4.1.1.</b>	CARACTERIZAÇÃO DA MUTAÇÃO	51
<b>4.1.2.</b>	COMPLEMENTAÇÃO	53
<b>4.2.</b>	ANÁLISES DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR QSEC	54
<b>4.2.1.</b>	ANÁLISES TRANSCRICIONAIS POR QRT-PCR	54
	ANÁLISE DA EXPRESSÃO E SECREÇÃO DA PROTEÍNA EFETORA	
<b>4.2.2.</b>	TRANSLOCADA ESPA	57
<b>4.3.</b>	TESTES FENOTÍPICOS	58
<b>4.3.1.</b>	FORMAÇÃO DA LESÃO A/E IN VITRO	58
<b>4.3.2.</b>	MOTILIDADE	60

<b>4.4.</b>	<b>EFEITOS DO SINAL EPINEFRINA</b>	<b>61</b>
<b>4.4.1</b>	<b>TRANSCRIÇÃO DOS OPERONS DE LEE</b>	<b>61</b>
<b>4.4.2.</b>	<b>TRANSCRIÇÃO DO GENE NLEA</b>	<b>63</b>
<b>4.4.3.</b>	<b>EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ESPA</b>	<b>64</b>
<b>4.4.4.</b>	<b>FORMAÇÃO DA LESÃO A/E</b>	<b>65</b>
<b>4.4.5.</b>	<b>TRANSCRIÇÃO DE GENES FLAGELARES E MOTILIDADE</b>	<b>67</b>
	<b>ANÁLISE GLOBAL DA REGULAÇÃO POR QSEC ATRAVÉS DE DNA</b>	
<b>4.5.</b>	<b>MICROARRAY</b>	<b>68</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>119</b>



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à vida e tudo o que ela me dá em abundância: saúde, felicidade, prosperidade.

Agradeço aos dias difíceis e às duras lições vividas. Eles me ensinaram a crescer, a conhecer-me melhor e a conhecer melhor os outros.

Agradeço por todas as oportunidades que tive durante a realização desse trabalho. As descobertas, as vitórias que obtive, as viagens que realizei, paisagens que admirei, dias maravilhosos que vivi!

Agradeço à minha família, que sempre me apoiou e me ajudou, da maneira que pôde.

Agradeço as minhas melhores amigas: Fabia Daniello, Samantha Fonseca e Alessandra Veloso, que sempre estiveram do meu lado.

Agradeço a todos os professores que me ensinaram. Nesta etapa, principalmente ao meu orientador, Dr. Marcelo Palma Sircili, pela orientação, incentivo, confiança, amizade, respeito, ensinamentos e conhecimento compartilhado, imprescindíveis para essa tese e para minha formação.

Agradeço à Dra Vanessa Sperandio, pela inigualável oportunidade que me proporcionou, ao abrir as portas do seu laboratório na UT Southwestern Medical Center at Dallas. Pela sua receptividade, amizade, ensinamentos e contribuição científica na realização desse trabalho. Agradeço também à todas as pessoas da sua equipe: Alline Pacheco, Cristiano Moreira, Darya Terekhova, Christopher Parker, Benjamin Habdas, Jacqueline Njoroge, Melissa Kendall, Y Nguyen, Charlie Gruber, Meredith Curtiss e Regan Russel.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela participação e contribuições na melhoria da proforma desse trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Bacteriologia e ao Laboratório de Genética do Instituto Butantan, onde realizei parte desse trabalho. Aos colegas Vanessa Bueris, Renato Ruiz, Juliana Higa, Hebert Culler, Cláudia Trigo, Cristiane Souza, Thatiana Melo, Jacqueline Mazzuchelli.

Agradeço ao André, pela companhia, dedicação e paciência, tão requisitada em muitos momentos.

Agradeço as agências de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho.



# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* são bacilos gram-negativos, facultativos, não móveis ou móveis por flagelos peritríquios. É o principal habitante do intestino de humanos e outros animais, sendo parte importante da microbiota intestinal de hospedeiros saudáveis. É membro da família *Enterobacteriaceae*, gênero *Escherichia*, o qual foi nomeado em referência ao pediatra alemão Theodor Escherich, que isolou espécies do gênero pela primeira vez em 1885.

*E. coli* é um organismo bastante diversificado em seus aspectos bacteriológicos, ecológicos e patogênicos. Pode crescer em meio com glicose como único constituinte orgânico, na presença ou ausência de O<sub>2</sub>. Em anaerobiose pode crescer por fermentação, produzindo ácidos e gás como produtos finais, mas pode também crescer por respiração anaeróbia, pois é capaz de utilizar NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> ou fumarato como receptor final de elétrons (TORRES; ARENAS-HERNANDEZ; MARTINEZ-LAGUNA, 2010). Essa versatilidade é o que permite *E. coli* colonizar o ambiente intestinal, bem como ambientes extraintestinais no homem e em outros animais.

Linhagens comensais de *Escherichia coli* co-evoluem com seu hospedeiro em uma relação de benefício mútuo. Apesar da maioria das linhagens não serem consideradas patogênicas, elas podem tornar-se patógenos oportunistas e causar infecções em hospedeiros imunocomprometidos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TORRES; ARENAS-HERNANDEZ; MARTINEZ-LAGUNA, 2010). Sob condições específicas, elas podem superar as respostas protetoras do hospedeiro e causar patologias. Isso ocorre, por exemplo, quando a barreira gastrointestinal é rompida ou quando a aquisição de fatores de virulência, através de elementos genéticos móveis, tornam linhagens comensais de *E. coli* um patógeno altamente adaptado, capaz de causar um amplo espectro de doenças, que vão desde infecções intestinais, até infecções do trato urinário, septicemia e meningites (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

*Escherichia coli* causadoras de infecção intestinal são de particular importância em saúde pública e são denominadas *E. coli* diarreio gênicas (DEC). Esses patógenos são classificados atualmente em seis categorias ou patótipos, com base em seus mecanismos de patogenicidade comuns, síndromes clínicas, características epidemiológicas e padrão de adesão às células epiteliais em cultivadas. Esses patótipos são: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998).

### **1.1.1. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**

O termo *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) foi criado em 1955 por Neter para designar linhagens de *E. coli* epidemiologicamente associadas a casos de diarreia em crianças e distinguir essas linhagens de linhagens presentes na microbiota (TORRES; ARENAS-HERNANDEZ; MARTINEZ-LAGUNA, 2010).

*E. coli* enteropatogênica tem sido identificada como um dos principais patógenos associados à diarreia nos países em desenvolvimento, afetando especialmente crianças (NATARO; KAPER, 1998), sendo considerado um grave problema de saúde pública. Surto de infecção por EPEC eram frequentes em países desenvolvidos nas décadas de 1940 e 1950 (ROBINS-BROWNE, 1987) mas se tornaram cada vez mais raros em países como Estados Unidos e Reino Unido.

No início da década de 90, inúmeros estudos epidemiológicos em diferentes regiões geográficas detectaram amostras de *E. coli* que eram capazes de formar a lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada *Attaching and Effacing (A/E)*, porém, eram desprovidas do plasmídeo EAF e não produziam toxina de Shiga (Stx). O patótipo EPEC foi então subdividido em

duas categorias: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC), tendo por base a presença ou ausência do plasmídeo EAF (KAPER, 1996).

Em um evento internacional sobre EPEC, realizado em São Paulo no ano de 1995, as EPEC típicas foram definidas como *E. coli* diarreiogênicas que possuem o gene EPEC *attaching and effacing* (*eae*) e são, portanto, capazes de formar lesão A/E, não expressam a toxina de Shiga (Stx) e possuem o plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), que contém os genes que codificam a fímbria BFP (*Bundle-Forming Pilus*). As EPEC atípicas formam lesão A/E, mas não possuem o plasmídeo EAF (KAPER, 1996).

EPEC típica e atípica também são diferenciadas de acordo com o padrão de adesão em cultura de células epiteliais. Enquanto amostras de tEPEC apresentam somente o padrão de adesão à células epiteliais LA (*localized adhesion*), caracterizado pela formação de microcolônias bacterianas compactas sobre a superfície de células epiteliais após 3 horas de contato bactéria-célula (SCALETSKY *et al.*, 1984), amostras de aEPEC geralmente apresentam um padrão de aderência denominado adesão localizada-like (LLA), visualizado após ensaios de 6 horas e caracterizado pela presença de microcolônias menos compactas e menos densas que as microcolônias da adesão localizada das tEPEC (SCALETSKY *et al.*, 1999; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

As tEPEC são causas importantes de diarreia em países em desenvolvimento, mas raras nos países industrializados, onde as aEPEC constituem a principal causa de diarreia (OCHOA *et al.*, 2008). Enquanto a infecção por tEPEC ocorre principalmente em crianças menores de um ano (NATARO; KAPER, 1998), sendo a diarreia aguda seu principal sintoma clínico (FAGUNDES-NETO, 1996), aEPEC acomete indivíduos em diversas faixas etárias, havendo estudos que sugerem a sua associação com diarreia persistente (HERNANDES *et al.*, 2009). No Brasil, até a década de 90, uma elevada frequência de tEPEC era observada, no entanto, estudos recentes demonstraram um aumento na incidência da aEPEC como causa de diarreia (ARAÚJO *et al.*,

2007; BUERIS *et al.*, 2007; FRANZOLIN *et al.*, 2005; MORENO *et al.*, 2008; SCALETISKY *et al.*, 2009).

EPEC atípica aparentemente emergiu recentemente e já está entre os principais agentes de diarreia em muitos países, inclusive no Brasil (ARAÚJO *et al.*, 2007; BUERIS *et al.*, 2007; FRANZOLIN *et al.*, 2005; SCALETISKY *et al.*, 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Esse grupo é altamente heterogêneo e pouco se conhece ainda sobre a patogênese do mesmo, entretanto, sua significativa prevalência em surtos de diarreia em diferentes regiões geográficas confirma que aEPEC é um patógeno causador de diarreia (Hernandes *et al.*, 2009).

### **1.2. A lesão *Attaching and Effacing* (A/E)**

*E. coli* enteropatogênica pertence a um grupo de patógenos que possui a habilidade de formar uma lesão histopatológica denominada *Attaching and Effacing* (A/E) em células epiteliais intestinais, após sua adesão ao tecido. A lesão A/E é essencial para a patogenidade de EPEC e uma histopatologia similar é associada a outros patógenos de mucosa como a *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica de coelhos (REPEC), *Citrobacter rodentium* e *Escherichia albertii* (ou *Hafnia alveii*) (CROXEN; FINLAY, 2010).

A lesão A/E foi observada pela primeira vez por MOON *et al.* (1983) e se caracteriza pela aderência íntima da bactéria à membrana da célula epitelial, destruição das microvilosidades (*effacement*), acúmulo de altas concentrações de filamentos de actina e outras proteínas do citoesqueleto celular abaixo do sítio de adesão da bactéria, induzindo a formação de uma estrutura em forma de pedestal onde a bactéria se encontra aderida (KNUTTON *et al.*, 1989; MCDANIEL *et al.*, 1995; NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

EPEC coloniza o intestino delgado e as interações que ocorrem entre EPEC e o enterócito e resultam na estrutura lesão A/E podem ser divididas em 3 estágios: (i) aderência inicial à célula hospedeira, (ii) expressão e translocação de proteínas bacterianas através do sistema de

secreção do tipo III (TTSS) e (iii) aderência íntima e formação da estrutura em pedestal (CHEN; FRANKEL, 2005; GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005; NATARO; KAPER, 1998; VALLANCE; FINLAY, 2000).

A aderência inicial da bactéria ao epitélio intestinal envolve a participação da fímbria BFP (em tEPEC), que ajuda na interação bactéria- bactéria formando microcolônias na superfície do tecido infectado (NATARO; KAPER, 1998.) Além disso, há a participação de outras adesinas, além de fatores ambientais que regulam a expressão de genes de virulência de EPEC (KENNY *et al.*, 1997).

Proteínas do sistema de secreção do tipo III são expressas e proteínas efetoras são translocadas para o citoplasma da célula hospedeira através desse sistema (FRANKEL *et al.*, 1998, VALLANCE; FINLAY, 2000), o que induz uma variedade de vias de transdução de sinais na célula eucariótica.

A aderência íntima da bactéria à célula do hospedeiro é mediada pela adesina intimina e seu receptor Tir. A intimina é inserida na membrana externa da bactéria e interage com Tir translocado na membrana do enterócito. EPEC utiliza o TTSS para injetar Tir no citoplasma da célula hospedeira. Tir é então inserido na superfície da célula eucariótica e age como receptor para a intimina (KENNY *et al.*, 1997). A interação Intimina/Tir desencadeia uma cascata de eventos que culmina na formação da estrutura em pedestal na membrana do enterócito. Após a inserção na membrana da célula eucariótica, Tir de EPEC é fosforilada em seu resíduo de tirosina 474, permitindo a ligação à proteína adaptadora Nck. Nck recruta a proteína N-WASP (*neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein*), que por sua vez, ativa o complexo protéico Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) e induz o rearranjo de proteínas do citoesqueleto, levando à polimerização de filamentos de actina que vão formar o pedestal (NOUGAYRÈDE *et al.*, 2003). A polimerização de actina pode também ocorrer independentemente da ligação à Nck, apenas pela fosforilação dos resíduos de tirosina 454 e 474 (CAMPELLONE; LEONG, 2005).

EPEC e EHEC mostram diferenças interessantes no desencadeamento da polimerização da actina. Em EHEC O157:H7, o recrutamento de N-WASP é realizado por uma proteína efetora denominada EspFU, também conhecida como *Tir-cytoskeleton coupling protein* (Tccp/Tccp2) que faz o papel de Nck (CAMPELLONE; LEONG, 2003; LOMMEL *et al.*, 2004). Entretanto, o gene *tccP* foi detectado também em amostras de EPEC típica e atípica e de outros sorotipos de EHEC (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005), indicando a presença da via de ativação de actina independente de Nck em EPEC.



**Figura 3:** Lesão A/E induzida por EPEC e EHEC e a estrutura em pedestal resultante na célula epitelial. Fonte: KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004.

O fenótipo A/E pode ser detectado em células epiteliais cultivadas *in vitro* através de um teste denominado FAS (*Fluorescent Actin Staining*), que foi desenvolvido por KNUTTON *et al.* (1989). Nesse teste, as bactérias são incubadas com as células cultivadas por 3 a 6 horas e então fixadas, permeabilizadas e tratadas com faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína. Esse material se liga especificamente aos filamentos de actina polimerizada nas células epiteliais, evidenciando os locais de adesão bacteriana e dos pedestais quando examinados em microscópio de fluorescência. O fenótipo A/E pode também ser identificado por microscopia eletrônica em tecido intestinal humano cultivado *in vitro* ou células epiteliais cultivadas e incubadas com a bactéria (KAPER *et al.*, 1998).

### 1.3. A Ilha de Patogenicidade LEE e o Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS)

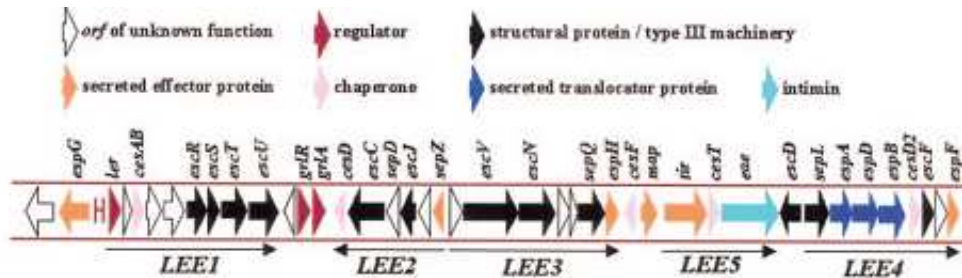
A maioria dos genes requeridos na formação da lesão A/E estão localizados em uma região de 35.6 Kb no cromossomo bacteriano denominada região LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*). LEE foi descrita primeiramente na linhagem de EPEC E2348/69 por MCDANIEL *et al.* (1995), mas também está presente nos outros patógenos indutores de lesão A/E.

LEE é uma ilha de patogenicidade, pois contém genes de virulência, está ausente em linhagens não-patogênicas, se encontra inserida em sítios específicos do genoma bacteriano e possui conteúdo de G+C de 38%, menor que o restante do genoma, indicando a sua aquisição por transferência horizontal de genes a partir de uma outra espécie (FRANKEL *et al.*, 1998).

LEE é altamente regulada e codifica o sistema de secreção do tipo III (TTSS), que transloca proteínas efetoras bacterianas no citoplasma da célula. Está organizada funcionalmente em cinco operons, denominados LEE-1, LEE-2, LEE-3, LEE-4, LEE-5 (MELLIES *et al.*, 1999). Os genes de LEE codificam os componentes estruturais do sistema de secreção do tipo III, reguladores, chaperonas e proteínas efetoras secretadas pelo TTSS. LEE-1, LEE-2 e LEE-3 abrigam os genes *esc* e *sep*, que codificam a maioria dos componentes do sistema de secreção tipo III (JARVIS *et al.*, 1995). Em LEE-1 encontra-se o gene *ler*, que codifica Ler (*LEE encoded-regulator*), uma proteína ligante de DNA que age como regulador transcricional principal da região LEE, modulando a expressão dos demais operons dessa região (ELLIOTT *et al.*, 2000). O operon LEE-5 contém os genes *eae* (*EPEC attaching and effacing*) e *tir* (*translocated intimin receptor*), que codificam a adesina intimina e o seu receptor Tir, envolvidos na aderência íntima da bactéria às células epiteliais e *cesT*, que codifica a chaperonina CesT das proteínas Tir e Map (*Mitochondrial-associated protein*) (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). LEE-4 abriga os genes das proteínas EspA, EspB e EspD, SepL, EspF, EscF, que são translocadas via sistema de secreção do tipo III e da chaperona CesD (DONNENBERG *et al.*, 1993; KNUTTON *et al.*, 1998, GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005).



LEE está ausente em *E. coli* K-12 e *E. coli* comensais (MCDANIEL *et.al.*, 1995). Porém, quando *E. coli* K-12 foi transformada com LEE de E2348/69, essa foi capaz de induzir lesão A/E, sugerindo que LEE não é apenas necessária, mas também é suficiente para conferir a capacidade de produzir o fenótipo A/E a essa amostra (MCDANIEL; KAPER, 1997).

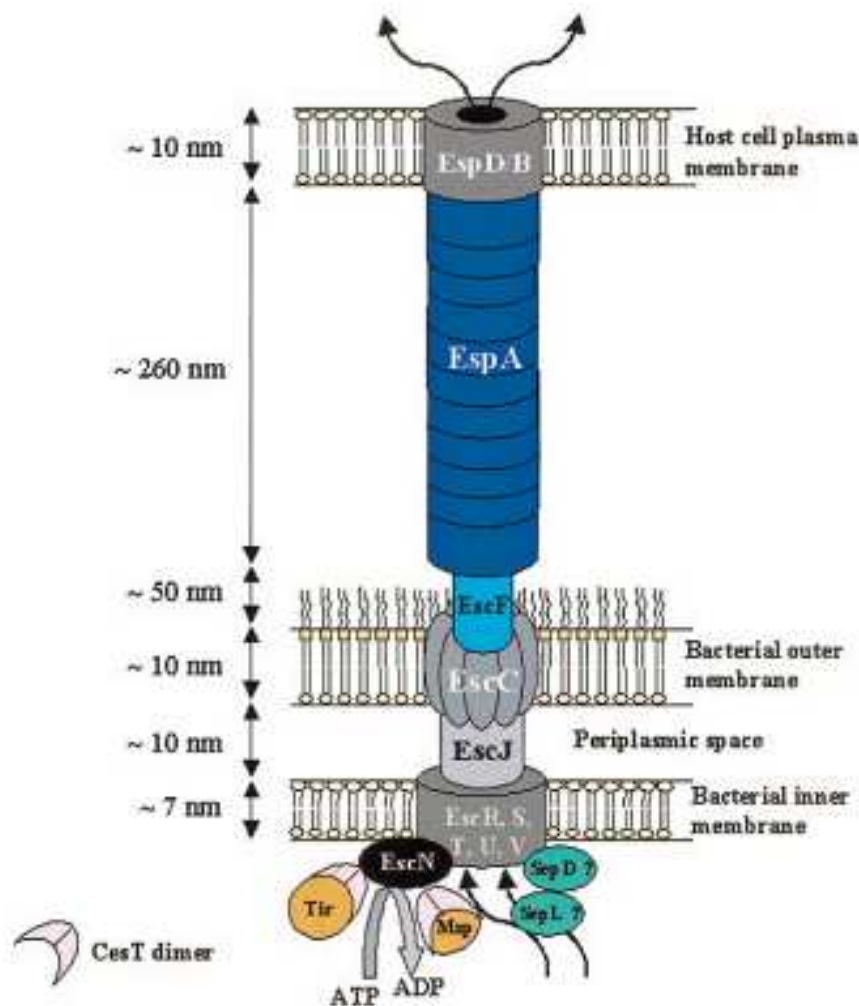


**Figura 4:** Representação esquemática da região LEE e seus operons. Fonte: GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005.

Diversos patógenos utilizam o sistema de secreção do tipo III (TTSS) para secretar proteínas através das membranas interna e externa da bactéria e transportá-las para a superfície ou diretamente para o citoplasma das células do hospedeiro (LEE, 1997; HUECK, 1998). Essas proteínas são capazes de modular processos celulares, facilitando a colonização e a patogênese. EPEC utiliza o TTSS para translocar as proteínas codificadas em LEE (EspS), incluindo EspA, EspB, EspD e Tir (NATARO; KAPER, 1998), essenciais para a formação da lesão A/E.

A translocação de proteínas para o citoplasma da célula hospedeira ocorre a partir da formação de uma estrutura protéica, semelhante a uma seringa, denominada *translocon*. Essa estrutura se estende da membrana interna da bactéria até o meio extracelular, formando um canal pelo qual as proteínas são translocadas (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). O *translocon* é constituído por várias proteínas. EscC e EscV são os componentes principais das estruturas em anel que se inserem nas membranas externa e interna, respectivamente (GAUTHIER; FINLAY, 2003). EscJ é uma lipoproteína que forma uma estrutura cilíndrica que

atravessa o periplasma, atuando como ponte entre os anéis das membranas interna e externa (CREPIN *et al.*, 2005). A estrutura em “agulha” da seringa é constituída pela proteína EscF recoberta por filamentos da proteína EspA, formando um canal filamentososo entre a bactéria e o interior da célula hospedeira, através do qual as proteínas são secretadas (GAUTHIER, 2002). A partir de EspA, o efector EspB é translocado para o citoplasma da célula hospedeira (KNUTTON *et al.*, 1998) e EspD é inserido na membrana da célula epitelial (KRESSE; GUZMAN, 1999), formando um poro de translocação (Figura 5).



**Figura 5:** Representação esquemática do TTSS de EPEC, cujos genes se encontram na ilha de patogenicidade LEE. Fonte: GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005.

O sistema de secreção do tipo III também transloca para a célula do hospedeiro outras proteínas efetoras que são codificadas em LEE e estão envolvidas nas alterações celulares que resultam na lesão A/E. A proteína Map age no controle da divisão celular e na regulação da dinâmica da actina, o que resulta na formação dos filopódios que cercam as microcolônias bacterianas (ALTO *et al.*, 2006). Age também na desestabilização do potencial de membrana da mitocôndria e provoca desestabilização da barreira intestinal e alterações nas junções oclusivas (DEAN; KENNY, 2004). EspF está envolvido na morte de mitocôndrias (NOUGAYRÈDE *et al.*, 2004), na inibição da fagocitose (QUITARD *et al.*, 2006) e perturbação das junções oclusivas e do tráfico de membranas (GUTTMAN *et al.*, 2006; ALTO *et al.*, 2007). EspG induz a fragmentação dos microtúbulos e a degradação da tubulina (TOMSON *et al.*, 2005). EspH é secretada para a membrana da célula hospedeira de onde modula a estrutura da actina, afetando a formação do pedestal (TU *et al.*, 2003).

Através do sistema de secreção do tipo III, EPEC secreta também alguns outros efetores que não são codificados na região LEE, mas que possuem papel importante na patogenicidade. Entre essas proteínas estão EspFu/Tccp e os *non-LEE effectors* NleA, NleB, NleE e NleH. EspFu/Tccp estimula a polimerização de actina e formação do pedestal (CAMPELLONE; ROBBINS; LEONG, 2004; GARMENDIA *et al.*, 2004). NleA é um importante fator de virulência requerido na infecção de *Citrobacter rodentium* em camundongos (GRUENHEID *et al.*, 2004), que age rompendo as junções oclusivas das células intestinais (THANABALASURIAR *et al.*, 2010) e inibindo a secreção de proteínas pela célula do hospedeiro (KIM *et al.*, 2007). NleB é um fator importante na colonização de *C. rodentium* em camundongos enquanto que NleE e NleH interferem com as vias de sinalização inflamatórias (WONG *et al.*, 2011).

### 1.3.1. A regulação da região LEE

Diversos estudos tem relatado que a regulação da expressão gênica da região LEE é um processo extremamente complexo e coordenado, envolvendo diversas proteínas e vias regulatórias.

O regulador central que controla a expressão dos genes de LEE é Ler, a proteína de 15 KDa codificada pelo primeiro gene do operon LEE-1, que pertence à família de proteínas associadas ao nucleóide, H-NS (MELLIES *et al.*, 2007; FRIEDBERG *et al.*, 1999; MELLIES *et al.*, 1999; ELLIOTT *et al.*, 2000; SPERANDIO *et al.*, 2000; BUSTAMANTE *et al.*, 2001). A expressão de Ler é fortemente regulada por outras proteínas reguladoras, bem como por fatores ambientais.

A ativação da transcrição de LEE por Ler ocorre após a diminuição da repressão dos promotores de LEE mediada pela proteína ligante de DNA, H-NS (BUSTAMANTE *et al.*, 2001), que age formando complexos estáveis de nucleoproteína com as regiões regulatórias dos genes reprimidos (BUSTAMANTE *et al.*, 2011). Por sua vez, a proteína IHF interrompe a repressão de LEE por H-NS por se ligar especificamente à região *upstream* do promotor de *ler* e ativar diretamente a expressão de *ler*, *orf3*, *orf5* e *orf2* (FRIEDBERG *et al.*, 1999).

MELLIES *et al.* (1999) demonstraram que o regulador Per (*plasmid-encoded regulator*), presente no plasmídeo EAF de EPEC típica, ativa os operons LEE1, LEE2 e LEE3 e, modestamente, aumenta a expressão de LEE4 em tEPEC. PerC, o terceiro gene do operon *perABC*, foi descrito como um regulador positivo da expressão de intimina e outras proteínas codificadas em LEE por ativar a expressão de *ler* (BUSTAMANTE *et al.*, 2001; GOMEZ-DUARTE; KAPER, 1995; KENNY *et al.*, 1997). PerC atua juntamente com IHF na desarticulação do silenciamento mediado por H-NS (BUSTAMANTE *et al.*, 2011).

Além de Ler, LEE codifica outros dois reguladores: GrIA (global regulator of LEE activator) e GrIR (global regulator of LEE repressor). GrIA atua regulando positivamente a expressão de

LEE por se ligar no promotor de LEE-1 que, por sua vez, aumenta a transcrição de *ler*. Já GrIR interage com GrIA e suprime a ligação específica de GrIA no promotor de LEE-1 (HUANG *et al.*, 2008; RUSSELL *et al.*, 2007).

A proteína regulatória Fis também está envolvida na regulação de LEE e atua regulando positivamente a expressão de *ler* e LEE-4. Porém, em altas concentrações, se liga ao promotor de *tir* e atenua sua expressão (GOLDBERG *et al.*, 2001).

As proteínas BipA e CsrA regulam positivamente a transcrição de *ler* (BHATT *et al.*, 2009; GRANT *et al.*, 2003) de EPEC. Já Hha se liga ao promotor de *ler* e atua como um repressor da transcrição desse gene em EHEC O157:H7 (SHARMA *et al.*, 2004).

Recentemente, FLOCKHART *et al.* (2012) identificaram um novo regulador de LEE, denominado RgdR, que é codificado no profago CP-933 de EHEC O157:H7 e ativa a transcrição do promotor LEE-1 na presença e ausência de Ler.

O fator de stress sigma, RpoS também foi descrito como envolvido na cascata regulatória que controla a expressão de LEE (IYODA; WATANABE, 2005; SPERANDIO *et al.*, 1999). RpoS age ativando a transcrição de *ler* através de uma via diferente da via usada por H-NS, ligando-se ao promotor de *ler*. RpoS atua de uma maneira dose-dependente dos níveis de DsrA (LAABERKI *et al.*, 2006). DsrA é um RNA não codificador (ncRNA) que modula a expressão de H-NS e RpoS. Concentrações elevadas de DsrA promovem a tradução de RpoS e levam à ativação de Ler.

ncRNAs foram reconhecidos recentemente como reguladores importantes envolvidos no controle da expressão de genes reguladores e efetores (GOTTESMAN, 2004). Hfq é uma chaperona indispensável para uma grande classe de pequenos ncRNAs (sRNAs) em diversas espécies bacterianas. Hfq estabiliza os sRNAs e promove a formação dos complexos sRNA/mRNA. Hfq foi descrito como regulador negativo da expressão dos 41 genes de LEE, agindo diretamente no mRNA de *ler*, uma vez que a tradução desse mRNA aumentou na ausência de Hfq em EHEC EDL 933 (SHAKHNOVICH *et al.*, 2009). HANSEN; KAPER (2009)

também demonstraram a participação de Hfq na regulação negativa da expressão de LEE, através da regulação de GrIA e GrIR a nível pos-transcricional em EHEC. Entretanto, KENDALL *et al.* (2011) demonstraram o fenótipo oposto para EHEC 86-24, com Hfq agindo como um regulador positivo da expressão de LEE.

O mecanismo de *quorum sensing* também está envolvido na regulação da expressão gênica da região LEE em EPEC e EHEC. SPERANDIO *et al.* (1999) demonstraram que, na presença de meio pré-condicionado, os operons de LEE-1 e LEE-2 apresentavam a transcrição aumentada, sugerindo que EHEC secreta o autoindutor 2 (AI-2), que age ativando esses operons e, portanto, regulando positivamente a expressão dos genes do TTSS. Posteriormente, *Quorum sensing E. coli regulator A* (QseA), um regulador transcricional do tipo Lys-R, foi relacionado com a ativação da transcrição de LEE-1 e dos demais operons em EHEC pela ligação direta com o promotor P1 de *ler*, atuando como parte da cascata regulatória que regula LEE através do sistema de *quorum sensing* AI-2/*luxS* (SPERANDIO *et al.*, 2002b, SHARP; SPERANDIO, 2007). QseA e LuxS também estão envolvidos na regulação de LEE em amostras de EPEC típica. Utilizando mutantes de tEPEC para esses genes, SIRCILI *et al.* (2004) demonstraram que ambos os mutantes apresentaram diminuição na secreção de tipo III, diminuição da capacidade de adesão à células epiteliais cultivadas, além de motilidade e produção de flagelo alteradas.

*Quorum sensing E. coli regulator D* (QseD), outro regulador do tipo Lys-R, foi identificado por HABDAS *et al.* (2010) e relacionado com a regulação negativa de LEE pelo sistema AI-2/LuxS em EHEC.

O sistema de *quorum sensing* AI-3/Epinefrina/Norepinefrina está envolvido na regulação da região LEE em EHEC O157:H7. Ele foi descoberto por SPERANDIO *et al.* (2003), que observaram que o autoindutor 3 (AI-3) é o verdadeiro sinal que ativa a transcrição de LEE, assim como os hormônios epinefrina e norepinefrina, que sinalizam cruzadamente com AI-3 na ativação de LEE. Esse sistema está descrito mais detalhadamente no item 1.4.1.4.

#### 1.4. *Quorum sensing*

As bactérias possuem mecanismos que as permitem detectar, processar e traduzir informações ambientais e mudar seu comportamento a fim de sobreviver. (PARKER; SPERANDIO, 2009). As respostas às alterações nas condições ambientais são sempre modificações programadas dos padrões de expressão gênica, que resultam em uma maior chance de sobrevivência.

Muitos microrganismos utilizam-se da comunicação célula-célula (ou *quorum sensing*) para acessar a sua densidade celular local (CHOUDHARY; SCHMIDT-DANNER, 2010). Essa comunicação baseia-se na produção, secreção e detecção de pequenas moléculas sinalizadoras liberadas no meio, cuja concentração está correlacionada com o número de células na população. Essas moléculas, semelhantes a hormônios, são denominadas autoindutores (AIs). AIs são produzidos em níveis basais e suas concentrações no meio aumentam conforme aumenta o número de células em uma população. Através desse mecanismo, os microrganismos detectam quando um número mínimo de células, ou *quorum*, é atingido e iniciam uma resposta coordenada (BASSLER; LOSICK, 2006).

Quando o sinal atinge uma concentração crítica, entende-se que o *quorum* está presente. As moléculas sinalizadoras se ligam e ativam receptores nas células bacterianas, o que permite os microrganismos iniciarem modificações coordenadas em seus perfis de expressão gênica. Como resposta, eles iniciam, em escala populacional, atividades complexas que não seriam benéficas em uma população pequena, como por exemplo: competência, esporulação, formação de biofilme, bioluminescência, produção de metabólitos secundários, entre outras (BASSLER; LOSICK, 2006), passando a se comportar como um organismo multicelular (ANTUNES *et al.*, 2009; BASSLER; LOSICK, 2006; FUQUA *et al.*, 1994; FUQUA *et al.*, 2001; FUQUA; GREENBERG, 2002).

A descoberta do mecanismo de *quorum sensing* é atribuída ao trabalho pioneiro de três microbiologistas marinhos – Nealson, Platt e Hastings. Enquanto trabalhavam com a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*, que coloniza os órgãos da lula *Euprymna scolopes*, Nealson e colaboradores observaram que o fenômeno de bioluminescência, que é o resultado da transcrição do operon da luciferase, apenas ocorria a uma densidade populacional limite de células bacterianas e que sobrenadantes de culturas induziam a bioluminescência em baixa densidade populacional (NEALSON; PLATT; HASTINGS, 1970). Eles sugeriram que autoindutores eram liberados e que a concentração desses autoindutores podia ser detectada pelas células bacterianas, transmitindo informações sobre a densidade populacional. Esse autoindutor foi posteriormente isolado, caracterizado e identificado como N-3-(oxohexanoil) homoserina lactona (EBERHARD *et al.*, 1981). A análise dos genes envolvidos no QS de *Vibrio fischeri* iniciou-se com o trabalho de ENGEBRECHT, NEALSON; SILVERMAN (1983), que propuseram um modelo para a regulação da expressão dos genes de bioluminescência.

*Quorum sensing* tem papel vital na regulação gênica de uma vasta gama de fenótipos bacterianos em muitas espécies. Sistemas de *quorum sensing* controlam formação de biofilme, resistência à antibióticos, transferência de DNA, autólise, tolerância à stress oxidativo, atividade metabólica, motilidade, competência, associações mutualísticas, produção de metabólitos secundários, interação com o hospedeiro, entre outros.

No caso de microrganismos patogênicos, *quorum sensing* controla a expressão de fatores de virulência (CÂMARA; WILLIAMS; HARDMAN, 2002; GREENBERG, 2003; KELLER; SURETTE, 2006; MILLER; BASSLER, 2001; PARSEK; GREENBERG, 2005). Por exemplo, o patógeno *Pseudomonas aeruginosa* possui dois sistemas de *quorum sensing* que participam da regulação da produção de elastase, protease LasA, endotoxina A, ramnolipídeos, sideróforos e lectinas citotóxicas (LATIFI; WINSON; FOGLINO; 1995; PEARSON *et al.*, 1995). Dessa forma, *P. aeruginosa* é capaz de coordenar a expressão de determinantes de virulência e evadir a resposta imune do hospedeiro, desenvolver biofilmes e resistência à antibióticos



(BJARNSHOLT *et al.*, 2005; HENTZER *et al.*, 2003; JENSEN *et al.*, 2007). *Staphylococcus aureus* utiliza *quorum sensing* para alternar seus padrões de expressão de genes de virulência, reduzindo a expressão de adesinas que promovem o *attachment* e a colonização quando a população se encontra em baixa densidade celular para aumentar a expressão de cápsula, toxinas como hemolisinas, toxina da síndrome do choque tóxico e serino-proteases requeridas para a invasão e disseminação quando em alta densidade celular (NOVICK; GEISINGER, 2008; ROUX *et al.*, 2009).

O patógeno intracelular *Brucella melitensis* utiliza *quorum sensing* para coordenar a expressão gênica do flagelo polar e sistema de secreção do tipo IV que são requeridos na patogênese e ciclo de vida intracelular: (DELRUE *et al.*, 2005). Já o fitopatógeno *Erwinia carotovora* utiliza *quorum sensing* para regular a expressão de genes que codificam pectinases, celulases e proteases empregadas na degradação da parede celular da célula vegetal (JONES *et al.*, 1993).

#### **1.4.1. Sistemas de *quorum sensing***

Uma variedade de moléculas sinalizadoras podem funcionar como autoindutores em bactérias gram-negativas e gram-positivas. Estes sinais moleculares e os seus receptores são agrupadas em quatro sistemas de *quorum sensing*.

##### **1.4.1.1. Sistema AI-1/LuxIR**

Esse sistema foi descrito em *Vibrio fischeri*, como o responsável pela bioluminescência nessa espécie. Duas proteínas, LuxI e LuxR, controlam a expressão do operon da luciferase (*luxICDABE*), requerido para a produção de bioluminescência. LuxI cataliza a síntese do autoindutor acil-homoserina lactona (AHL) 3-oxo-C6-HSL (EBERHARD *et al.*, 1981,

ENGBRECHT; SILVERMAN 1984) e LuxR é o receptor citoplasmático e ativador transcricional (ENGBRECHT, NEALSON; SILVERMAN, 1983). Após ser produzido, AHL se difunde para dentro e fora da célula e aumenta sua concentração no meio com o aumento na densidade populacional (KAPLAN; GREENBERG. 1985). Quando a sua concentração atinge o nível crítico, se liga ao receptor no citoplasma da célula bacteriana e esse complexo ativa a transcrição do operon da luciferase (STEVENS *et al.*, 1994).

Homólogos do sistema LuxI/LuxR foram identificados em mais de 70 espécies de bactérias gram-negativas (HENKE; BASSLER, 2004). LuxI e seus homólogos sintetizam AI-1 por transferir uma cadeia de ácido graxo de uma proteína carreadora de acil (ACP) para S-adenosilmetionina (SAM), liberando AHL e metiladenosina (SCHAEFER *et al.*, 1996). AHLs produzidos por homólogos de LuxI possuem diferentes motivos de ácidos graxos e cada sensor tipo LuxR é bastante específico em detectar uma molécula de AHL em particular, resultando em uma transdução de sinais espécie-específica.

Exemplos de sistemas homólogos a LuxI/LuxR são os sistemas LasR/LasI e RhIR/RhII de *Pseudomonas aeruginosa*. A AHL-sintase LasI produz o sinal N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL), que é reconhecido pelo regulador de resposta LasR. (WILLIAMS; CAMARA, 2009). RhII produz o sinal N-(butanoil)-homoserina lactona (C4-HSL), que ativa o receptor cognato RhIR. Juntos, esses dois sistemas regulam a expressão de 6 a 10% de todos os genes de *P. aeruginosa*, incluindo fatores de virulência como a lectina PA-I (WILLIAMS; CAMARA, 2009).

#### **1.4.1.2. Sistema de peptídeos auto-indutores (AIP)**

Espécies de bactérias gram-positivas utilizam predominantemente pequenos peptídeos na sinalização célula-célula (BASSLER, 2002). Sua secreção é mediada por uma maquinaria de transporte de proteínas. AIPs secretados pelas bactérias são reconhecidos por um sensor

histidina-quinase transmembrana, que ativa um sistema de dois componentes de transdução de sinal consistindo no sensor quinase e um regulador de resposta citoplasmático. O regulador de resposta fosforilado controla a transcrição, se ligando a promotores e iniciando a cascata transcricional que altera o perfil de expressão gênica (XAVIER; BASSLER, 2003).

Um exemplo desse tipo de sinalização é o sistema Agr de *Staphylococcus aureus* (PENG *et al.*, 1988). AIP é sintetizado pelo gene *agrD*. O propeptídeo AgrD é direcionado para a membrana por uma sequência sinal N-terminal. Uma vez na membrana, AgrB, uma endopeptidase de membrana, cliva o propeptídeo C-terminal e a porção N-terminal é removida pela peptidase SpsB e a porção C-terminal processada se liga a uma cisteína. Após ser secretado para o meio, o AIP é detectado pelo receptor AgrC. AgrC fosforila o regulador de resposta AgrA, que então ativa a transcrição de genes selecionados por se ligar diretamente em regiões promotoras (NOVICK *et al.*, 1995).

#### **1.4.1.3. Sistema AI-2/LuxS**

Esse sistema foi inicialmente descoberto na regulação da bioluminescência em *Vibrio harveyi* e é mediado pelo gene *luxS* e homólogos (BASSLER *et al.*, 1993; BASSLER *et al.*, 1994; MILLER; BASSLER, 2001; BASSLER, 2002).

AI-2 é sintetizado a partir de um produto do metabolismo de S-adenosilmetionina (SAM), onde a enzima LuxS converte S-ribosil-homocisteína em homocisteína e 4,5-dihidróxi-2,3-pentanodiona (DPD), um composto que reage com água formando compostos cíclicos e originando o AI-2 (CHEN *et al.*, 2002; SCHAUDER *et al.*, 2001).

As estruturas de dois AI-2 foram determinadas e as moléculas foram descritas como sendo um furanosil borato diéster utilizado por *Vibrio harveyi* para regular a bioluminescência e uma furanona [(2R,4SL)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofuran (R-THMF)] utilizado por *S. enterica* Typhimurium (CHEN *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2004). A detecção desse autoindutor

por *V. harveyi* é feita pela proteína LuxP, que se liga ao AI-2 no periplasma. O complexo AI-2/LuxP interage com o sensor quinase LuxQ, iniciando a cascata de fosfotransferência que resulta na desativação do regulador de resposta negativo, LuxO e produção da luminescência nessa espécie (XAVIER; BASSLER, 2003).

O sistema LuxS/AI-2 tem sido detectado em inúmeras espécies gram-positivas e gram-negativas e um papel para esse sistema na sinalização intra e interespecie vem sendo sugerido (BASSLER 1999; FEDERLE; BASSLER, 2003; HENKE; BASSLER, 2004; KAPER; SPERANDIO, 2005; SCHAUDER *et al.*, 2001; XAVIER; BASSLER, 2005).

Diversos fenótipos tem sido associados com a inativação de *luxS* em diferentes bactérias, porém ainda não está claro se eles são causados pela ausência da sinalização dependente de AI-2 ou por perturbações metabólicas associadas com a interrupção da via metabólica da metionina, da qual LuxS faz parte (VENDEVILLE *et al.*, 2005; WINZER *et al.*, 2002).

Estudos utilizando mutantes de EHEC para o gene *luxS* ou meio pré-condicionado relataram aumento na expressão de flagelos e da maquinaria de secreção do tipo III apenas sob condições em que o autoindutor estava presente (SPERANDIO *et al.*, 1999; 2001). Porém, a influência direta desse sinal fosforilado ou ligado a um regulador nunca foi relatada. De fato, a descoberta de um terceiro autoindutor, descrito a seguir, demonstra que a ativação dos genes de virulência nesse patógeno se deve à presença de um outro sinal que não o AI-2.

#### **1.4.1.4. Sistema AI-3/Epinefrina/Norepinefrina**

O sistema de *quorum sensing* AI-3/Epinefrina/Norepinefrina foi descoberto por SPERANDIO *et al.* (2003) durante a investigação da regulação da expressão de genes de virulência em EHEC. Nesse trabalho, os autores observaram que a comunicação célula-célula envolvia a detecção de um novo autoindutor, diferente de AI-2, que estava presente em meios pré-condicionados e que ativava a transcrição de genes do sistema de secreção do tipo III. Esse

autoindutor foi denominado AI-3 (SPERANDIO *et al.*, 2003). Inicialmente sua síntese foi associada ao gene *luxS*, pois  $\Delta luxS$  eram deficientes em produzir AI-3. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que a ausência da síntese de AI-3 em  $\Delta luxS$  era causada por uma mudança no metabolismo celular, que passava a usar oxalacetato no lugar de SAM, como precursor de metionina e que a adição de L-aspartato no meio de crescimento atenuava a demanda por oxalacetato restaurando a produção de AI-3, mas sem efeito na produção de AI-2. (WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006).

Até o momento, a estrutura e a síntese do AI-3 permanecem desconhecidas, porém acredita-se que ele seja um composto aromático aminado, semelhante às catecolaminas.

AI-3 é produzido por bactérias comensais como *E. coli* não patogênica e *Enterobacter cloacae*, bem como por bactérias patogênicas como *Shigella*, *Salmonella* e *Klebsiella*. Entretanto, esse sinal não foi ainda detectado em espécies gram-positivas (PARKER; SPERANDIO, 2009; WALTERS; SIRCILI; SPERANDIO, 2006).

SPERANDIO *et al.*, 2003 observaram também que o hormônio epinefrina poderia substituir o sinal AI-3 na regulação da expressão de genes de virulência em EHEC e que AI-3, Epi e NE são sinais agonistas, podendo ter seus efeitos bloqueados por antagonistas adrenérgicos (CLARKE *et al.*, 2006; SPERANDIO *et al.*, 2003; WALTERS; SPERANDIO, 2006).

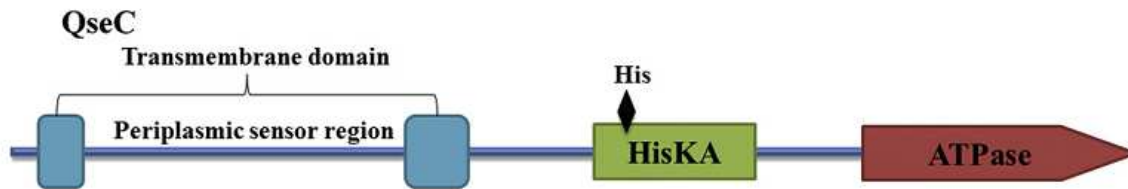
Ao atingir o trato gastrointestinal, EHEC é capaz de detectar: 1) o sinal bacteriano AI-3, produzido e liberado no meio por bactérias da microbiota intestinal; 2) norepinefrina (NE), que é sintetizada nos neurônios adrenérgicos do sistema nervoso entérico (FURNESS, 2000) e 3) epinefrina (Epi), sintetizada no sistema nervoso central e medula adrenal e transportada ao intestino pela corrente sanguínea (PURVES *et al.*, 2001). Ao detectar os sinais, EHEC inicia a expressão dos fatores de virulência requeridos para a colonização. A detecção desses sinais demonstrou-se importante para a expressão *in vivo* da virulência em modelos de infecção em coelhos e bovinos (CLARKE *et al.*, 2006; VLISIDOU *et al.*, 2004).

Nas células de mamíferos, epinefrina e norepinefrina são reconhecidas pelos receptores ligados à membrana complexados com proteínas heterotriméricas ligantes de guanina (proteínas G), os GPCRs, com os quais esses hormônios se ligam e iniciam uma cascata regulatória (GILMAN, 1987; HUGHES *et al.*, 2008; NJOROGE; SPERANDIO, 2012). Porém, as bactérias não possuem receptores homólogos aos receptores adrenérgicos de mamíferos. Nesses organismos, os hormônios são detectados através de sensores histidina-quinase (HK) (CLARKE *et al.*, 2006; READING *et al.*, 2009). Os sensores HK são as proteínas sinalizadoras predominantes em bactérias e atuam em conjunto com reguladores de resposta (RR) em um sistema de dois componentes. Após detectarem o sinal ambiental, os HK sofrem autofosforilação em um resíduo conservado de histidina e então transferem fosfato para um resíduo de aspartato no domínio receptor do RR cognato. RR são fatores transcricionais ativados por fosforilação que iniciam uma cascata regulatória que culmina na transcrição de genes específicos (STOCK *et al.*, 2000).

O sensor histidina-quinase *Quorum sensing E. coli regulator C* (QseC) foi descrito por SPERANDIO *et al.* (2002). Esse sensor está envolvido na regulação por *quorum sensing* da expressão de genes flagelares em EHEC e *E. coli* K-12 e foi identificado como o sensor que detecta AI-3, epinefrina e norepinefrina em EHEC (CLARKE *et al.*, 2006), sendo considerado um análogo funcional bacteriano dos receptores adrenérgicos GPCRs.

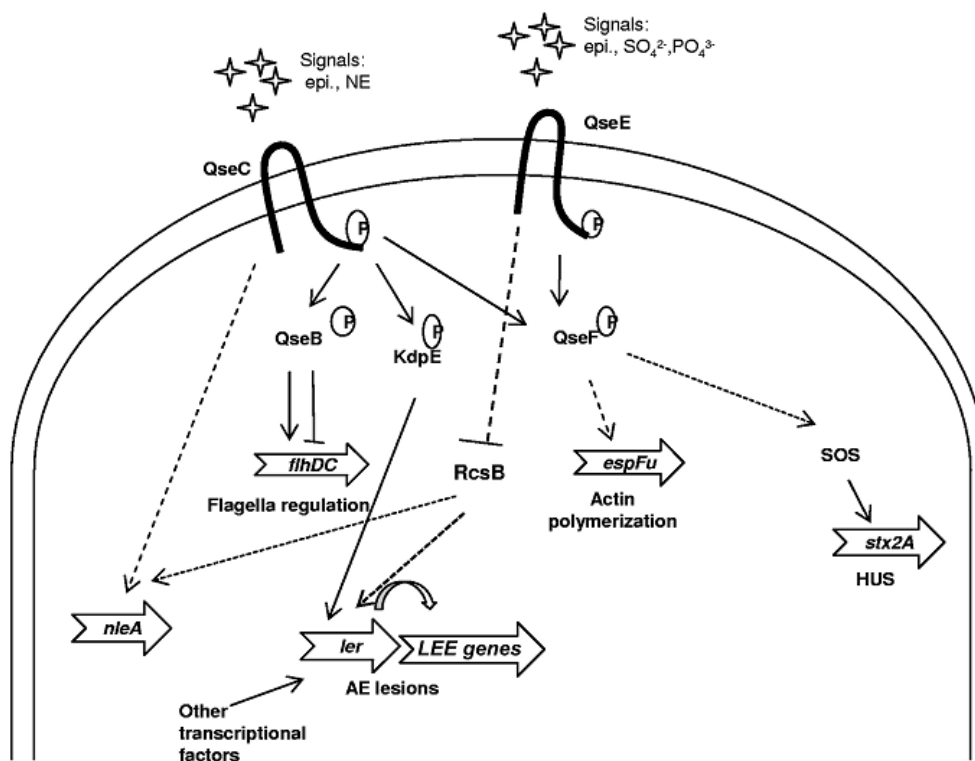
QseC é parte do sistema regulatório de dois componentes QseBC. Esse sistema, que possui homologia com o sistema PmrAB de *Salmonella enterica* Typhimurium, é codificado no operon *qseBC* (SPERANDIO *et al.*, 2002). QseC é uma proteína de 50 KDa altamente conservada entre diferentes espécies bacterianas (CLARKE *et al.*, 2006) e que está localizada na membrana das bactérias. É formada de dois domínios transmembrana (TM) e um domínio conservado histidina-quinase. Possui um domínio sensor extracitoplasmático, responsável por detectar o estímulo ambiental e transmitir o sinal através da membrana (MASLENNIKOV *et al.*,

2010). Além disso, QseC possui um domínio EAL e um domínio ATPase, o que permite a sua atividade de fosfatase (CLARKE; SPERANDIO, 2005, WANG *et al.*, 2011).



**Figura 6:** Esquema representando os domínios do sensor histidina-quinase QseC. Fonte: WANG *et al.* (2011).

Ao detectar os sinais AI-3, epinefrina e norepinefrina, QseC autofosforila seu próprio resíduo conservado de histidina e transfere o grupo fosfato ligado para três reguladores de resposta distintos: a) QseB (*Quorum sensing E. coli regulator B*), que regula os genes do operon flagelar através de sua ligação direta com a região promotora do gene do principal regulador do operon flagelar, FlhD (CLARKE; SPERANDIO, 2005, CLARKE *et al.*, 2006; SPERANDIO *et al.*, 2002), e também autorregula a transcrição de seu próprio operon, ligando-se diretamente à seu próprio promotor (CLARKE; SPERANDIO, 2005b); b) KdpE, que, em EHEC, regula a transcrição dos genes da ilha de patogenicidade LEE, através da sua ligação na região promotora do gene que codifica Ler, o regulador principal de LEE (HUGHES *et al.*, 2009, NJOROGÉ; SPERANDIO, 2012) e c) QseF (*Quorum sensing E. coli regulator F*), que regula a expressão da toxina de Shiga (Stx) e do efetor EspFu de EHEC (READING *et al.*, 2007). QseF é o RR cognato do sensor QseE, outro sensor capaz de detectar os sinais epinefrina e norepinefrina, além de sulfato (SO<sub>4</sub>) e fosfato (PO<sub>4</sub>) e regular a expressão de EspFU e Stx (READING *et al.*, 2007).



**Figura 7:** Esquema do sistema de *Quorum sensing* AI-3/Epi/NE em EHEC. Fonte: NJOROGÉ; SPERANDIO (2012).

Homólogos de QseC estão presentes em pelo menos 25 importantes patógenos humanos e vegetais (RASKO *et al.*, 2008) e muitos trabalhos tem evidenciado a importância de QseC e do sistema AI-3/Epi/NE na patogenicidade bacteriana *in vitro* e *in vivo*. BEARSON; BEARSON, (2008) demonstraram que *Salmonella enterica* Typhimurium  $\Delta qseC$  apresentou motilidade reduzida e diminuição da colonização do trato gastrointestinal de suínos. MOREIRA *et al.* (2010) relataram a diminuição da motilidade, da capacidade de invasão de células epiteliais e sobrevivência em macrófagos, além da atenuação da infecção sistêmica *in vivo* em camundongos por *Salmonella enterica* Typhimurium  $\Delta qseC$ . *Francisella tularensis*  $\Delta qseC$  apresentou a sobrevivência em macrófagos comprometida e virulência atenuada (MOKRIEVICH *et al.*, 2010). WANG *et al.* (2011) relataram que *Edwardsiella tarda*  $\Delta qseC$  foi capaz de prejudicar a expressão intracelular de elementos do sistema de secreção do tipo III (TTSS) e



diminuir assim a capacidade de sobrevivência intracelular e as habilidades competitivas desse patógeno *in vivo*. CLARKE *et al.* (2006) demonstraram a atenuação da virulência de EHEC O157:H7  $\Delta qseC$  no modelo animal de coelho.

Segundo KOSTAKIOTI; PINKNER; HULTGREN, (2009), a deleção de *qseC* em *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) resultou em uma significativa atenuação da virulência e da formação de comunidades intracelulares em células de bexiga durante a infecção *in vivo*.

Em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a inativação de *qseC* levou a uma redução do crescimento do biofilme oral e atenuação da virulência *in vivo* (NOVAK *et al.*, 2010). UNAL *et al.* (2012) relataram a participação de QseC no controle da formação de biofilme em *Haemophilus influenzae* sob condições de fluxo e estática após observarem que a deleção de *qseC* levou a uma significativa diminuição da biomassa do biofilme.

Devido ao papel central do sistema de *quorum sensing* AI-3/Epi/NE e do sensor quinase QseC na ativação da expressão gênica de fatores de virulência em diversos patógenos importantes, um estudo para melhor entender o papel desse sistema na regulação da ilha de patogenicidade LEE e outros fatores de virulência de EPEC atípica poderia contribuir para uma maior compreensão das interações entre esses microrganismos e a microbiota intestinal, bem como entre esse patógeno e seu hospedeiro. Esse trabalho é o primeiro estudo sobre a regulação gênica dos fatores de virulência em uma amostra de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica pelo mecanismo de *quorum sensing*.



## OBJETIVOS

---

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo central investigar o papel do sistema de *quorum sensing* AI-3/epinefrina/norepinefrina na regulação de fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC).

### **Os objetivos específicos foram:**

1. Construção de um mutante de aEPEC para o gene do sensor histidina quinase *QseC*
2. Avaliação do papel de *QseC* na regulação gênica dos principais fatores de virulência de aEPEC.
3. Avaliação do papel de *QseC* na regulação gênica global em aEPEC.
4. Avaliação do efeito do sinal epinefrina na regulação gênica global e de fatores de virulência em aEPEC na presença e ausência de *QseC*.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens bacterianas e plasmídeos

As amostras bacterianas e os plasmídeos utilizados nesse estudo estão descritos na Tabela I. A amostra de EPEC atípica BA320 foi escolhida como alvo do estudo por ser uma linhagem previamente bem estudada. Essa amostra pertence ao sorotipo O55:H7 e foi isolada de paciente com quadro clínico de diarreia. Pertence à coleção de culturas do Prof. Dr. Luiz Rachid Trabulsi, abrigada no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

**TABELA I:** Linhagens e plasmídeos utilizados nesse estudo.

<b>Linhagem/ Plasmídeo</b>	<b>Genótipo/ Descrição</b>	<b>Referência/ Fonte</b>
<b><u>Linhagem</u></b>		
<b>BA 320</b>	<i>eae</i> <sup>+</sup> , <i>EAF</i> <sup>-</sup> , adesão ALL, sorotipo O55:H7	BUERIS <i>et. al</i> , 2007
<b>FF01</b>	BA320 $\Delta$ <i>qseC</i>	Este estudo
<b>FF02</b>	FF01 complementada com o plasmídeo pVS155	Este estudo
<b><u>Plasmídeo</u></b>		
<b>pVS155</b>	Vetor de clonagem pBADMycHisA contendo o gene <i>qseC</i>	SPERANDIO <i>et al</i> , 2002
<b>pKD3</b>	Molde para a amplificação do cassete de recombinação (sistema $\lambda$ - Red)	DATSENKO; WANNER, 2000
<b>pKD46</b>	Plasmídeo auxiliar contendo os genes das enzimas de recombinação (sistema $\lambda$ - Red)	DATSENKO; WANNER, 2000
<b>pCP20</b>	Plasmídeo auxiliar contendo o gene da FLP (sistema $\lambda$ - Red)	DATSENKO; WANNER, 2000

Todas as amostras foram mantidas a – 80° C em meio LB (10% de Triptona, 10% de NaCl e 5% de Extrato de levedura) com glicerol 2,5 M.

### 3.2. Obtenção das linhagens mutante e complementada

#### 3.2.1. Desenho dos iniciadores para deleção e verificação da deleção de *qseC*

Para a deleção do gene *qseC* foram confeccionados iniciadores que foram utilizados na construção do cassete de recombinação e na detecção da presença do gene de resistência inserido no lugar de *qseC*, além de um par de iniciadores homólogos à região flanqueadora do gene *qseC* para a confirmação da recombinação/deleção na posição correta. Todos os iniciadores utilizados nessa metodologia estão descritos na Tabela II e foram confeccionados utilizando-se o programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

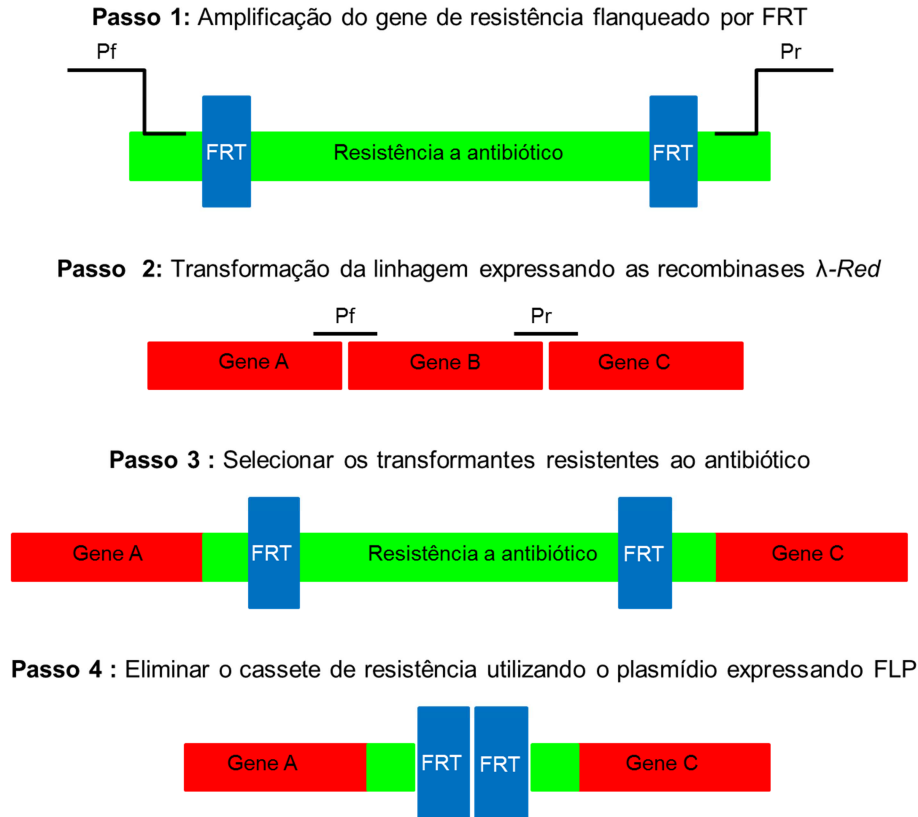
**TABELA II:** Iniciadores utilizados na deleção e confirmação da deleção do gene *qseC*.

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Referência
<b><i>qseC-f</i></b>	GGCTACACATTAGGTGAGAAATGAAATTTACCCAAC GTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Este estudo
<b><i>qseC-r</i></b>	ATGTGCAAAGTCTTTTGCGAATTTAGCAAAAATCTTA CCCATATGAATATCCTCCTTAGTTC	Este estudo
<b><i>catDT - f</i></b>	GAACTTCGGAATAGGAACTTCA	Este estudo
<b><i>catDT - r</i></b>	TGTGACGGAAGATCACTTCG	Este estudo
<b><i>qseCDT-f</i></b>	GCAAACCTCGGCAGTGATTTT	Este estudo
<b><i>qseCDT-r</i></b>	ACAGAGCGGTACGGTCAAAT	Este estudo

### 3.2.2. Mutagênese de *qseC*

A metodologia utilizada para realizar a deleção do gene *qseC* foi a recombinação homóloga mediada pelas enzimas de recombinação do bacteriófago  $\lambda$ -*Red*. Essa estratégia foi descrita por DATSENKO; WANNER (2000) e, basicamente, consiste em substituir uma sequência cromossomal (no caso o gene *qseC*) por um gene de resistência à antibiótico, que é gerado por PCR utilizando iniciadores com 40 pb de homologia com a região flanqueadora da região a ser deletada. A recombinação é feita pelas enzimas do sistema *Red*. Após a seleção em meio com antibiótico, o gene de resistência pode ser eliminado pelo uso do plasmídeo auxiliar que expressa uma FLP recombinase. Essa enzima age nos sítios FRT que flanqueiam o gene de resistência.





**Figura 6:** Estratégia de deleção gênica baseada nas enzimas de recombinação do bacteriófago  $\lambda$ -Red. Adaptado de DATSENKO; WANNER, 2000.

### 3.2.2.1. Obtenção de DNA plasmidial

Para empregar o sistema  $\lambda$ -Red na deleção do gene *qseC*, primeiramente foi necessário obter os plasmídeos do sistema: pKD3, pKD46 e pCP20. Esses plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina através do *kit PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega, CA, EUA) para preparações em pequena escala, segundo as recomendações do fabricante.

### 3.2.2.2. Construção do cassete de recombinação

Para construir o cassete de recombinação (o produto de PCR composto pelo gene de resistência flanqueado por sítios FRT e a sequência complementar à sequência que flanqueia o gene *qseC* no cromossomo bacteriano) que foi re combinado no lugar de *qseC*, foi realizada uma PCR utilizando como DNA molde o plasmídeo acessório pKD3. Esse plasmídeo possui o gene *cat* (*chloramphenicol acetyl transferase*), que confere a resistência ao antibiótico cloranfenicol aos recombinantes. Os iniciadores utilizados foram *qseC-f* e *qseC-r* (Tabela I), que possuem 60 pares de bases, sendo os 40 primeiros complementares à sequência gênica flanqueadora de *qseC* e os outros 20 pares de bases complementares à sequência do gene *cat* no plasmídeo pKD3. A PCR ocorreu nas seguintes condições: em volume final de 50 µL contendo 10 pmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA molde, 1 mM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, EUA), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e tampão apropriado provido com a enzima. O DNA plasmidial foi desnaturado a 94°C por 2 minutos e a amplificação realizada em 35 ciclos com os seguintes passos: (1) desnaturação a 94°C por 2 minutos; (2) anelamento a 51°C por 2 minuto; (3) extensão a 72°C por 2 minutos. Procedeu-se uma extensão final por 10 minutos. As reações foram feitas no termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, EUA).

### 3.2.2.3. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos gerados na PCR foram denominados *qseC::cat* e foram submetidos à eletroforese em gel de agarose UltraPure (Invitrogen, CA, EUA ) a 1% preparado com tampão TBE 1X (45 mM Tris-borato e 1mM EDTA) em sistema horizontal (Horizon 58 Gel Electrophoresis Apparatus, Life Technologies, CA, EUA). Os produtos foram ressuspensos em

tampão de amostra para DNA 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25%, glicerol 30%) e como marcador do peso molecular foi utilizado o *100 pb DNA ladder* ou *1 Kb DNA ladder* (Invitrogen, CA, EUA). A corrida foi conduzida a 80V, em tampão TBE 1X. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5µg/mL e o DNA visualizado em transiluminador de U.V. UVP (UVP, CA, EUA), sendo os resultados registrados com o auxílio do sistema de imagem AlphaImager (AlphaInnotech, CA, EUA).

#### **3.2.2.4. Purificação do cassete *qseC::cat* em gel de agarose**

Os fragmentos de DNA correspondentes ao cassete de recombinação *qseC::cat* foram analisados em gel de agarose (item 3.2.2.3) e então purificados do gel utilizando-se o *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

#### **3.2.2.5. Transformação da linhagem BA320 com o plasmídeo acessório pKD46**

Para que a recombinação homóloga ocorresse seria necessária a presença das enzimas responsáveis por esse evento. Dessa forma, o plasmídeo pKD46 foi inserido na linhagem BA320, escolhida para a deleção de *qseC*. Esse plasmídeo, parte do sistema  $\lambda$ -Red, possui 3 genes:  $\gamma$ ,  $\beta$  e *exo*, que codificam, respectivamente, as enzimas Gam, Bet e Exo. Gam inibe a exonuclease V do sistema RecBCD do hospedeiro para que Bet e Exo tenham acesso ao DNA e promovam a recombinação de fragmentos lineares no DNA alvo (DATSENKO; WANNER, 2000). pKD46 possui a sequência que confere resistência à ampicilina e origem de replicação termossensível. Para transformar BA320 com pKD46 foram preparadas células eletrocompetentes dessa linhagem de acordo com a metodologia descrita em SAMBROOK; RUSSEL (2001). BA320 foi inoculada em 3 mL de meio LB e incubada a 37<sup>o</sup> C por 16 horas. 1

mL dessa cultura foi então inoculado em 100 mL de meio LB. A cultura foi incubada a 37° C, 250 rpm, até atingir a  $DO_{600\text{ nm}}$  0,6 e então incubada em banho de gelo por 10 minutos. O volume total da cultura foi centrifugado a 4.000 g por 15 minutos a 4° C e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi lavado com 20 mL de água ultrapura esterilizada e gelada e centrifugado novamente. O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez e em seguida o sedimento foi ressuspendido em 1mL de água ultrapura esterilizada e gelada. As células foram distribuídas em alíquotas de 50µL e uma proporção de 10:1 de células e plasmídeo pKD46 foram misturadas e imediatamente submetidas a eletroporação. Para isso, o eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad, CA, EUA) foi ajustado para 1,5 KV, 25 µF e 200 ohms e utilizou-se cubetas de eletroporação de 0,1 cm (Bio-Rad, CA, EUA). Imediatamente após o pulso, as células foram recuperadas em 1mL de meio SOC (0,5% de Extrato de Levedura, 2% de Triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de  $MgSO_4$  e 20 mM de glicose) e incubadas a 30° C por 1 hora. Nesse passo, é necessária a incubação em temperaturas menores que 37° C para evitar a perda do pKD46 devido à sua origem de replicação termossensível. Após esse período, 100 µL das culturas foi plaqueado em meio LB ágar com 100 µg/ mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubado a 30° C por 16 horas. Três colônias recombinantes foram selecionadas e denominadas 320pKD46. Essas colônias foram crescidas e estocadas, conforme descrito anteriormente.

#### **3.2.2.6. Recombinação do gene *qseC* pelo cassete de recombinação *qseC::cat*.**

Os transformantes de BA320 carregando o plasmídeo pKD46 foram utilizados para a transformação com o cassete de recombinação *qseC::cat*. Para isso, células 320pKD46 foram crescidas em 3 mL de meio LB, a 37° C por 16 horas. 1 mL dessa cultura foi inoculado em 100 mL de meio LB com 100 µg/ mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e 1 mM de L-arabinose (Sigma-Aldrich, MO, EUA), usado como indutor da expressão dos genes do sistema  $\lambda$ -Red. A

nova cultura foi incubada a 30° C, 250 rpm, até atingir a DO<sub>600 nm</sub> 0,6 e as células foram preparadas, conforme descrito no item anterior. As células foram distribuídas em alíquotas de 50 µL e 5 µL produto de PCR purificado (*qseC::cat*) foi adicionado. As células foram submetidas a eletroporação, conforme descrito no item anterior. As amostras eletroporadas foram recolhidas em meio SOC, incubadas a 30° C por 2 horas e posteriormente plaqueadas em meio LB ágar com 25 µg/ mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, MO, EUA). As placas foram incubadas por 16 horas a 37° C. Cerca de 10 colônias foram selecionadas e testadas quanto a sensibilidade á ampicilina para testar a perda do plasmídeo pKD46, que possui origem de replicação termosensível e é facilmente eliminado a 37° C. Três colônias sensíveis à ampicilina foram selecionadas para a continuidade dos experimentos e foram denominadas  $\Delta qseC::cat$ .

### 3.2.2.7 Confirmação da recombinação por PCR

Foram realizadas duas reações de PCR para confirmar se os mutantes  $\Delta qseC::cat$  apresentavam a estrutura correta. Em uma delas utilizou-se os iniciadores com homologia ao gene de resistência *cat*, denominados *cat*DT-f e *cat*DT-r para detectar a presença desse gene no cromossomo bacteriano. As reações foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 10 pmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA molde, 1 mM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA,EUA) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> em tampão apropriado. O DNA foi desnaturado a 94° C por 5 minutos e a amplificação realizada em 35 ciclos com os seguintes passos: (1) desnaturação a 94° C por 2 minutos; (2) anelamento a 55° C por 1 minuto; (3) extensão a 72° C por 1 minuto. Procedeu-se uma extensão final por 10 minutos. A segunda reação utilizou iniciadores homólogos a região flanqueadora do gene *qseC* no cromossomo bacteriano, denominados *qseCDT*-f e *qseCDT*-r, para verificar simultaneamente a perda de *qseC* e a aquisição do novo fragmento, *cat*. A PCR ocorreu sob as mesma condições descritas

acima e foi repetida com os mutantes após a eliminação do gene de resistência. Os produtos das duas PCRs foram analisados em gel de agarose 1%, conforme descrito no item 3.2.2.3.

#### **3.2.2.8. Eliminação do gene de resistência *cat*.**

O último passo da mutagênese consistiu em eliminar o gene de resistência na linhagem mutante  $\Delta qseC::cat$ . Para isso, o plasmídeo acessório pCP20 foi empregado. pCP20 é um plasmídeo que contém os genes de resistência a ampicilina e cloranfenicol, com replicação termosensível e indução térmica da expressão da enzima FLP, que reconhece e cliva os sítios FRT. Células eletrocompetentes do mutante  $\Delta qseC::cat$  foram preparadas e eletroporadas com o plasmídeo pCP20, conforme descrito anteriormente. Os transformantes foram selecionados em LB ágar com 100 µg/ mL de ampicilina por 16 horas a 30°C. Algumas colônias foram selecionadas, crescidas na ausência de ampicilina por 16 horas a 42°C e testadas para a perda de todas as resistências a antibióticos. Dessa maneira, as colônias que perderam o gene de resistência e o plasmídeo acessório pCP20 foram escolhidas e estocadas, sendo denominadas  $\Delta qseC$ .

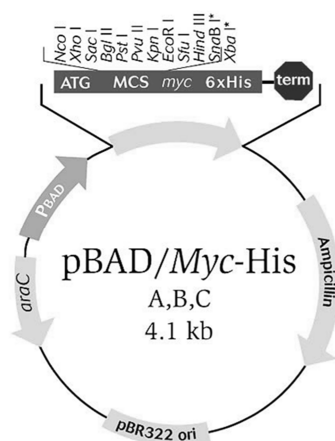
#### **3.2.3. Sequenciamento de DNA**

A mutagênese de *qseC* também foi confirmada através do sequenciamento de DNA das linhagens selvagem,  $\Delta qseC::cat$  e  $\Delta qseC$ . Para isso, foram utilizados os iniciadores *qseCDT-f* e *qseCDT-r* para amplificar a região flanqueadora de *qseC* nessas linhagens. A reação foi a mesma descrita no item 3.2.2.7 e os produtos de PCR foram purificados, conforme descrito no item 3.2.2.4. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o *kit BigDye Terminator v.3.1* (Applied Biosystems, CA, EUA) e a plataforma *ABi 3500*, capilar de 50 cm, POP7 (Applied Biosystems, CA, EUA). Os produtos de sequenciamento foram purificados com o *kit BigDye*

*Xterminator* (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. As sequências foram analisadas no software *Sequence Scanner v.1.0* (Applied Biosystems, CA, EUA) e alinhadas através do programa ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)).

### 3.2.4. Complementação

Para construir a linhagem complementada, foram utilizados a linhagem mutante  $\Delta qseC$  e o plasmídeo pVS155. Esse plasmídeo, gentilmente cedido pela Dra. Vanessa Sperandio, foi construído pela amplificação do gene *qseC* da linhagem K-12 MG1655, que foi clonado no sítio *EcoRI-KpnI* do vetor comercial de expressão pBADMyHisA (Invitrogen, CA, EUA) (Figura 7) e está descrito em SPERANDIO *et al*, (2002). As células eletrocompetentes da linhagem  $\Delta qseC$  foram preparadas conforme descrito no item 3.2.2.5 e eletrotransformadas com o plasmídeo pVS155. Os transformantes foram selecionados em LB agar contendo 100 $\mu$ g/ mL de ampicilina e três colônias foram escolhidas, estocadas e nomeadas *qseC+*. Todos os testes nos quais o mutante complementado foi utilizado tiveram a adição de 0.2% de L-arabinose para ativação do promotor indutível  $P_{ara}$  presente no plasmídeo.



**Figura 7:** Mapa ilustrando o plasmídeo pBADMyHisA. Fonte: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).

### 3.3. Análises transcricionais

#### 3.3.1. Extração de RNA

Para a realização das análises transcricionais, o RNA total das amostras selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$  foi extraído. Para isso, as amostras foram cultivadas inicialmente em 3 mL de LB a 37° C sob agitação por 16 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas 1:100 em 50 mL de meio DMEM ou LB, na presença ou ausência de 50  $\mu$ M de epinefrina, em triplicatas, e incubadas a 37° C e 150 rpm. O crescimento foi monitorado por leitura da absorbância a 600 nm no espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (GE Healthcare, EUA) até atingir a  $D.O_{600\text{ nm}}$  0,5 ou 1,0. As culturas foram então centrifugadas a 4.000 g e 4° C por 15 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em Trizol (Ambion, Life Technologies, EUA) e o RNA total foi extraído com o kit *RiboPure Bacterial RNA Isolation* (Ambion, Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi feita em NanoDrop (ThermoScientific, EUA), por leitura da absorbância em comprimento de onda 260 nm e 280 nm.

#### 3.3.2. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Análises transcricionais foram feitas com a utilização do sistema SYBR Green (Applied Biosystems, EUA), numa reação de passo único utilizando a plataforma ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA). Para cada 20  $\mu$ L de reação foi utilizado 10  $\mu$ L de 2x *SYBR Green Master Mix*, 0,1  $\mu$ L de *MultiScribe Reverse Transcriptase* (Life Technologies, EUA), 0,1  $\mu$ L de *RNase Inhibitor* (Life Technologies, EUA), 8,4  $\mu$ L de água *nuclease-free*. (Ambion, Life Technologies, EUA), RNA na concentração final de 5 ng/  $\mu$ L e 50 nM do mix de primers (*forward* + *reverse*) As condições para gerar e amplificar o cDNA foram: 1 ciclo a 48° C por 30 minutos, 1 ciclo a 95° C por 10 minutos e 40 ciclos a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. O gene *rpoA*



(subunidade A da RNA polimerase) foi utilizado como controle endógeno. Os níveis de transcrição foram analisados em software SDS v.2.0.1 (Applied Biosystems, EUA). Os dados foram normalizados com os níveis de transcrição de *rpoA* e analisados utilizando um comparativo crítico *threshold* (*CT*) conforme descrito no *Applied Biosystems Bulletin number 2*. Os níveis transcricionais dos genes estudados foram quantificados pelo método de quantificação relativa e expressos como diferenças comparadas com os níveis da amostra selvagem. Barras de erros representam os desvios padrões dos valores de *Ct* nas três replicatas analisadas (WALTERS; SPERANDIO, 2006). Os iniciadores utilizados nos ensaios de qRT-PCR estão descritos na Tabela III:

**Tabela III:** Sequência dos iniciadores utilizados nos ensaios de qRT-PCR.

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Referência</b>
<b>escC_RT_F1</b>	GCGTAAACTGGTCCGGTACGT	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>escC_RT_R1</b>	TGCGGGTAGAGCTTTAAAGGCAAT	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>escV_RT_F1</b>	TCGCCCCGTCCATTGA	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>escV_RT_R1</b>	CGCTCCCGAGTGCAAAA	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>espA_RT_F1</b>	TCAGAATCGCAGCCTGAAAA	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>espA RTR</b>	GAAGGATGAGGTGGTTAAGCT	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>eae_RT_F1</b>	GCTGGCCCTTGGTTTGATCA	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>eae_RT_R1</b>	GCGGAGATGACTTCAGCACTT	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>ler_RT_F1</b>	CGACCAGGTCTGCCCTTCT	WALTERS; SPERANDIO, 2006

<b>ler_RT_R1</b>	GCGCGGAACTCATCGAAA	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>fliCRTF</b>	TCCATCGACAAATTCCGTTCT	HABDAS <i>et al.</i> , 2010
<b>fliCRTR</b>	TGGTGA CTGCGGAATCCA	HABDAS <i>et al.</i> , 2010
<b>fIHDrTF</b>	TTTCGTCTCGGCATAAATGAAG	HUGHES <i>et al.</i> , 2009
<b>fIHDrTR</b>	TCATT CAGCAAGCGTGTTGAG-	HUGHES <i>et al.</i> , 2009
<b>rpoA RTF</b>	GCGCTCATCTTCTTCCGAAT	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>rpoA RTR</b>	CGCGGTCGTGGTTATGTG	WALTERS; SPERANDIO, 2006
<b>nleArt549F</b>	AGCCACTACTTCGACGGTAACC	HUGHES <i>et al.</i> , 2009
<b>nleArt624R</b>	ACGAACCACTTGAGCTGTTAATCC	HUGHES <i>et al.</i> , 2009

### 3.3.3. DNA *Microarray*

O ensaio de DNA *Microarray* foi realizado no intuito de comparar de forma global o transcriptoma das linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ . Para isso, foi utilizado o RNA extraído dessas amostras crescidas em meio DMEM até D.O.  $_{600\text{ nm}}$  0,5 na presença ou ausência de 50  $\mu\text{M}$  de epinefrina (item 3.3.1) e o *chip GeneChip E. coli Genome 2.0 array* (Affymetrix, EUA), que contém aproximadamente 10.000 sondas direcionadas para genes presentes em quatro linhagens de *E. coli*: MG1655 (K-12), CFT073 (linhagem uropatogênica), EDL933 (O157:H7) e Sakai (O157:H7). As reações foram feitas de acordo com as instruções descritas no manual *Affymetrix Gene Expression Technical Manual* (<http://www.affymetrix.com>). O cDNA de cada amostra foi sintetizado a partir do RNA total, na reação contendo 10  $\mu\text{L}$  de RNA total (0,33  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{L}$  (75  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) de *random primers* (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 2  $\mu\text{L}$  de poly-A RNA control (Affymetrix, EUA) e 8  $\mu\text{L}$  de água livre de DNase e RNase (Ambion, Life Technologies, EUA). A reação foi submetida a um ciclo de 10 minutos a 70° C e 10 minutos a 25° C em termociclador PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, EUA). A essa reação adicionou-se 12  $\mu\text{L}$  de *First Strand Buffer* (Affymetrix, EUA), 100 mM de DTT

(Invitrogen, CA, EUA), 10 mM de dNTP (Invitrogen, CA, EUA), 20 U/ $\mu$ L de *SUPERase* (Affymetrix, EUA), 200 U/ $\mu$ L de *SuperScript II* (Affymetrix, EUA) e volume final de 60  $\mu$ L. Essa reação foi então submetida ao ciclo de 25 $^{\circ}$  C por 10 minutos, 37 $^{\circ}$  C por 60 minutos, 42 $^{\circ}$  C por 60 minutos, 70 $^{\circ}$  C por 10 minutos e resfriada até 4 $^{\circ}$  C. Para a remoção do RNA foi adicionado à reação 20  $\mu$ L de NaOH 1 N e esta foi incubada a 65 $^{\circ}$  C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 20  $\mu$ L de HCl 1N para neutralizar a reação. A reação foi então purificada com o kit *MinElute PCR Purification Columns* (Qiagen, EUA) e quantificada com NanoDrop (Thermo Scientific, EUA). O cDNA produzido foi fragmentado utilizando-se a seguinte reação: 2  $\mu$ L de tampão DNase I 10x (Invitrogen, CA, EUA), 3 a 7  $\mu$ g de cDNA, 0,6 U/ $\mu$ g de DNase I (Invitrogen, CA, EUA) e água livre de nuclease q.s.p. 20  $\mu$ L (Ambion, Life Technologies, EUA), incubada a 37 $^{\circ}$  C por 8 minutos e 98 $^{\circ}$  C por 10 minutos em termociclador PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, EUA). A fragmentação foi analisada em gel de poliacrilamida com gradiente de concentração entre 4% e 20% (BioRad, CA, EUA) corado com *SYBR Gold 1X* (Invitrogen, CA, EUA) onde 200 ng do cDNA apresentou mobilidade eletroforética na faixa de 50 pb a 200 pb. Para a marcação 3' terminal do cDNA fragmentado foi preparada a seguinte reação: 10  $\mu$ L de *Reaction Buffer 5x* (Affymetrix, EUA), 7,5 mM de *GeneChip DNA Labeling Reagent* (Affymetrix, EUA) 2  $\mu$ g de cDNA fragmentado e água *nuclease-free* q.s.p. 50  $\mu$ L. A reação foi incubada a 37 $^{\circ}$  C por 60 minutos e interrompida com 2  $\mu$ L de EDTA 0.5 M. A eficiência da marcação foi verificada por ensaio de *Gel Shift*, para o qual o 200 ng do cDNA fragmentado e marcado foi adicionado a 5  $\mu$ L de uma solução de 2 mg/ mL de *NeutrAvidin* (Sigma Aldrich, MO, EUA) em PBS 1X e essa reação foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. A reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose de gradiente de concentração entre 4% e 20% durante aproximadamente 1 hora a voltagem constante de 150 V em cuba vertical (BioRad, CA, EUA), com tampão TAE 1X. O gel foi corado com *SYBR Gold* (Invitrogen, CA, EUA) e observado em luz UV, com filtro apropriado. As amostras marcadas foram enviadas ao *Core Affymetrix UT Southwestern*

Medical Center at Dallas para reação de hibridização com o *chip E. coli Genome 2.0 array* (Affymetrix, EUA). A análise dos dados foi feita conforme descrito anteriormente por KENDALL; RASKO; SPERANDIO (2007). Os dados foram analisados utilizando o *software* GCOS v1.4, de acordo com as instruções do fabricante. A normalização dos dados foi feita utilizando-se o *software Robust Multiarray Analysis* (BOLSTAD *et al.*, 2003; IRIZARRY *et al.*, 2003) disponível na página *RMAExpress* (<http://www.rmaexpress.bmbolstad.com>). Os dados foram analisados comparando-se as diferenças de transcrição gênica na ausência de QseC e/ou na presença de epinefrina.

### **3.4. Análises de Expressão Gênica**

#### **3.4.1. Extração de proteínas totais**

As proteínas totais das amostras selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$  foram obtidas de culturas crescidas aerobicamente em 50 mL de meio DMEM a 37° C, sob agitação até D.O.<sub>600 nm</sub> 0,5 ou 1.0. As culturas foram centrifugadas a 4.000 g por 15 minutos a 4° C e o precipitado foi ressuspenso em tampão de lise (8M uréia, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM Tris) pH6.3 (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e incubado a temperatura ambiente por 16 horas. As amostras foram então centrifugadas em rotação máxima por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento transferido para um novo tubo.

#### **3.4.2. Extração de proteínas secretadas**

As proteínas secretadas das amostras selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$  foram obtidas por centrifugação e filtração, segundo metodologia descrita por JARVIS *et al.* (1995), a partir de

culturas crescidas aerobicamente em 50 mL de meio DMEM a 37<sup>o</sup> C, sob agitação até D.O.<sub>600 nm</sub> 0,5 ou 1.0. As culturas foram centrifugadas a 4.000 g por 15 minutos a 4<sup>o</sup> C. O sobrenadante das culturas foi filtrado utilizando-se filtros de 0,22 µm (Millipore, EUA) e adicionou-se a ele 10 mg/ mL de PMSF (Sigma–Aldrich, MO, EUA), 20 mg/ mL de aprotinina (Sigma–Aldrich, MO, EUA), 1 mL de EDTA 0,5 M e 10 µg de BSA. O sobrenadante foi concentrado até o volume final de aproximadamente 300 µL por centrifugação a 4.000 g utilizando filtros Centricon 3.000 MWCO (Millipore, EUA).

### 3.4.3. SDS-PAGE

As proteínas extraídas foram submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 15% em condições denaturantes, segundo descrito por LAEMMLI (1970), em sistema *Mini Protean 3 Cell – Vertical Gel Electrophoresis System* (Bio-Rad Laboratories, Hercules – CA, EUA). As amostras de proteínas totais e secretadas foram solubilizadas em tampão de Laemmli 2x (4% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8), aquecidas a 100<sup>o</sup> C por 5 minutos e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi conduzida a 100 V em tampão Tris-Glicina (1% Tris, 3% SDS, 14% glicina). Após a corrida, os géis foram incubados em solução fixadora (40% metanol, 70% ácido acético, 53% água) por 2 horas e em seguida corados com Coomassie blue R250 (Bio-Rad, Richmond – CA, EUA), conforme descrito em SAMBROOK; RUSSEL (2001), para a visualização do controle de proteínas secretadas (BSA), ou submetidos à eletrotransferência para membrana de nitrocelulose para os experimentos de *Immunoblotting*. Para inferir a massa molecular das bandas protéicas foi utilizado o marcador de peso molecular para proteínas *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad, CA, EUA).

#### **3.4.4. Immunoblotting**

Para as análises de expressão por *Immunoblotting* as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond™ C extra membrane, GE Healthcare). As transferências ocorreram a 90 V por 90 minutos a 4º C em cuba *Mini Protean 3 Cell – Vertical Gel Electrophoresis System* (Bio-Rad, CA, EUA) contendo tampão de transferência. As interações inespecíficas foram bloqueadas incubando-se as membranas com PBS contendo 0,5% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e 3% de leite desnatado por 16 horas. O antissoro policlonal de coelho anti- EspA e o anticorpo monoclonal de camundongo anti-RpoA (Neoclone) foram diluídos 1:5000 em PBS contendo Tween 20 a 0,5% e incubados com as membranas eletrotransferidas por 1 hora. As membranas foram lavadas 3 vezes com PBS Tween 20 a 0,5% e incubadas com os anticorpos secundários conjugados anti-IgG de camundongo (para RpoA) e anti-IgG de coelho (para EspA) diluídos 1:25000 em PBS contendo Tween 20 a 0,5% por 1 hora. As membranas foram novamente lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,5% e as reações foram reveladas por quimioluminescência utilizando-se o *kit Amershan ECL Plus* (GE Healthcare, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

### **3.5. Análises Fenotípicas**

#### **3.5.1. Teste de FAS (*Fluorescent Actin Staining*)**

Células HeLa foram cultivadas em garrafas de 50ml com 12ml de meio DMEM (Gibco, Life Technologies, CA, EUA) alta glicose com antibiótico (penicilina 1000 U/ml; estreptomicina 1 mg/ml – Sigma Aldrich, MO, EUA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, CA, EUA) e mantidas por 2 a 3 dias a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A cada dois dias as

células foram lavadas três vezes com PBS 1x (Tampão Fosfato Salina - NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, e pH de 7,4) a 37°C e o meio DME M substituído por um novo. Assim que as células atingiram uma confluência de 75%, foram adicionados 2 ml de tripsina (GIBCO – Life Technologies, CA, EUA) e deixados por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram homogeneizadas e 1 mL de células foi inoculado em placas de cultura celular de 12 orifícios contendo lamínulas de vidro. As placas foram incubadas por 16 horas sob as mesmas condições anteriores. As amostras selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$  foram inoculadas em 3 ml de meio LB e incubadas a 37°C por 16 horas e foram usadas para infectar as células por 6 horas. O teste de FAS foi realizado conforme descrito por KNUTTON *et al.* (1989). Após incubação as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1x, fixadas por 20 minutos com 2% de formaldeído em PBS e permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS por 6 minutos. O acúmulo de actina foi corado com faloidina marcada com isotiocianato fluorescente (FITC) a 37°C por 20 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes com tampão SSC 2x (0,3 M NaCl, 0,03 M citrato de sódio) e tratadas com 100 µg/mL de RNaseA livre de DNase diluída em SSC 2x por 10 minutos. Bactérias e núcleos das células HeLa foram corados com 500 nM de iodeto de propídio em SSC 2x por 5 minutos. As lâminulas foram lavadas com SSC 2x para retirada do excesso de corante, secas em temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia com reagente *Antifade* (Invitrogen, CA, EUA). Para os estudos com epinefrina, 50 µM dessa molécula foram adicionados a cada orifício da placa e a placa foi incubada sob proteção da luz. As lâminas foram analisadas através de microscopia de fluorescência em microscópio Zeiss Axiovert 200 HAL 100 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) em objetiva de 100X. Fotos foram tiradas com a câmera digital AxioCam acoplada ao microscópio. Imagens foram adquiridas utilizando o *software AxioVision 4.1 software* (Carl Zeiss). Para a quantificação, no mínimo 100 células infectadas foram contadas.

### **3.5.2. Teste de Motilidade**

Para verificar se QseC participa da regulação da motilidade em aEPEC, foi realizado o ensaio de motilidade conforme descrito em HUGHES *et al.* (2009). Placas com meio triptona (triptona a 1%, NaCl a 0,25% e 0,3% de ágar) foram preparadas e inoculadas com 2 µL de inóculo crescido por 16 horas a 37° C sob agitação. As placas inoculadas com as linhagens selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$  foram incubadas a 37° C. Foram feitas medidas do diâmetro dos halos, bem como fotos do tamanho dos halos após 6 e 8 horas de incubação. Para os ensaios utilizando a linhagem complementada, adicionou-se 0,2% de arabinose e para os ensaios feitos na presença de epinefrina adicionou-se 50 µM dessa molécula.

### **3.6. Avaliação do efeito do sinal epinefrina**

Para todos os experimentos realizados na presença de epinefrina, a concentração final utilizada foi de 50 µM. As culturas incubadas na presença dessa molécula foram crescidas até a D.O.<sub>600 nm</sub> 0.5. Todos os testes realizados na presença desse sinal foram feitos sob proteção da luz.

### **3.7. Análises Estatísticas**

Os dados foram mostrados como médias e desvios padrões das repetições. Em todos os testes, os grupos bacterianos foram comparados e a significância estatística foi determinada utilizando-se o teste *t*- Student para amostras independentes. Um valor de  $P \leq 0.01$  foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o *GraphPad Prism 6*.



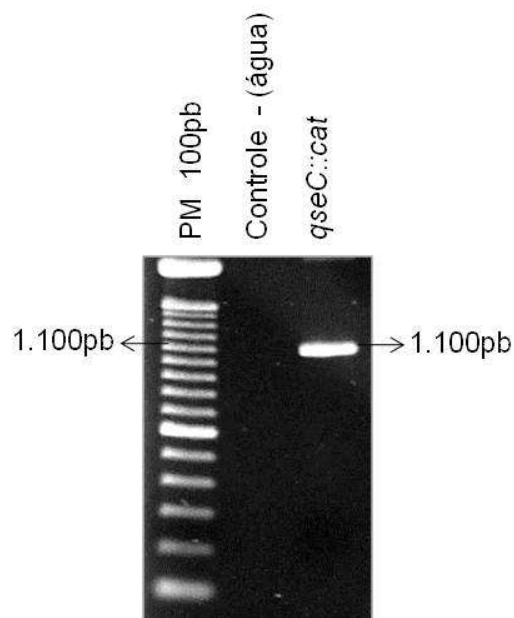
## RESULTADOS

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Construção do mutante $\Delta qseC$

Para a construção da linhagem de EPEC mutante para o gene *qseC*, utilizou-se a metodologia de recombinação homóloga mediada pelas enzimas do sistema de recombinação do bacteriófago  $\lambda$ -*Red*. Inicialmente foi realizada a extração dos plasmídeos que fazem parte do sistema. O plasmídeo pKD3 foi utilizado como molde para amplificar uma região de aproximadamente 1.100 pb correspondente ao gene *cat* flanqueado pelas regiões FRT, numa PCR com os iniciadores *qseC*-f e *qseC*-r, que resultou no cassete de recombinação denominado *qseC::cat*, representado na Figura 8.

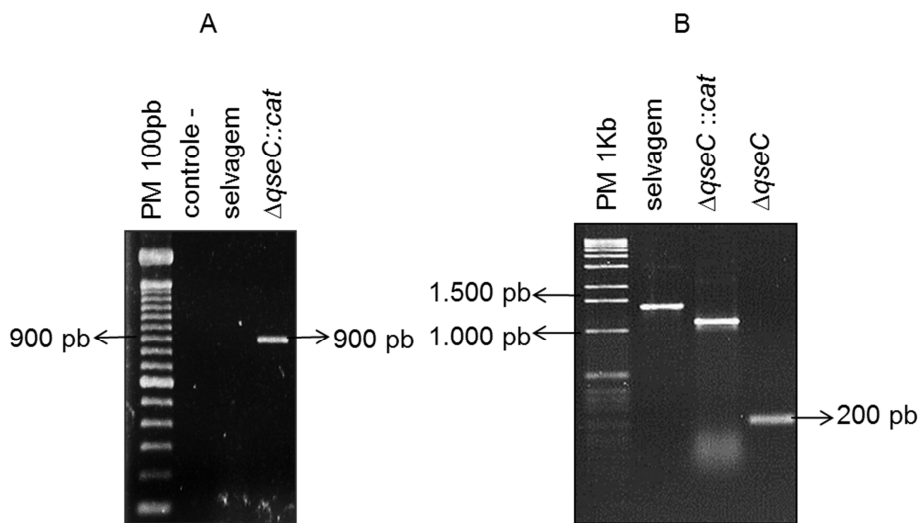


**Figura 8:** Gel de agarose a 1% demonstrando o cassete de recombinação gerado por PCR com os iniciadores *qseC*-f e *qseC*-r.

A amostra selvagem BA320 foi transformada com o plasmídeo pKD46, que contém as enzimas de recombinação de  $\lambda$ -*Red*. 320pKD46 foi submetida a eletroporação com o cassete de recombinação. A expressão induzida dos genes  $\gamma$ ,  $\beta$  e *exo* inibiu a degradação da fita linear de DNA e permitiu a recombinação do cassete a partir do reconhecimento das sequências FRT. Esta recombinação obedece à homologia de DNA conferida pelas sequências flanqueadoras de tal forma que a recombinação irá envolver somente sequências homólogas. As recombinantes foram então selecionados utilizando a marca de resistência ao cloranfenicol carregada pelo módulo de recombinação. O gene de resistência foi posteriormente removido pela transformação do mutante com o plasmídeo pCP20, que contém o gene da FLP, que reconhece as sequências FRT e cliva o cassete de recombinação. A retirada do cassete constitui um passo importante na construção de mutantes, pois evita a polarização da mutação (efeito da mutação em genes *downstream* ao gene recombinado).

#### **4.1.1. Caracterização da mutação**

A ocorrência da mutação foi verificada por duas PCRs diferentes. A primeira PCR utilizou iniciadores desenhados internamente ao gene *cat* e confirmou a presença deste na linhagem recombinante e sua ausência na linhagem selvagem, como pode ser observado na Figura 9A. A segunda PCR utilizou iniciadores externos ao gene *qseC* de EPEC, no intuito de verificar a localização correta da inserção do gene *cat* e sua posterior remoção. Como pode ser observado na Figura 9B, essa PCR gerou na selvagem, um fragmento de 1.300 pb correspondente a *qseC*; no mutante, um fragmento de 1.100 pb correspondente ao gene *cat* e na mutante com os genes *qseC* e *cat* removidos um fragmento de aproximadamente 200 pb, demonstrando a ausência de ambos os genes. A diferença de tamanho dos produtos de amplificação evidenciou a ocorrência da mutagênese no sítio correto.



**Figura 9:** Confirmação da mutagênese de *qseC* em aEPEC por PCR utilizando primers internos (A) e externos (B) à região mutada. **A:** gel de agarose a 1% demonstrando a amplificação por PCR do gene *cat* presente na linhagem recombinante portando o cassete de resistência ( $\Delta qseC::cat$ ) utilizando-se os iniciadores *catDT-f* e *catDT-r*. A linhagem selvagem não apresenta amplificação para esse gene. **B:** gel de agarose a 1% demonstrando, por diferença de tamanho do produto amplificado, a troca de *qseC* pelo cassete de recombinação e posterior remoção do mesmo, originando assim a linhagem mutante  $\Delta qseC$ .

As etapas de recombinação e posterior remoção do gene *cat* no *locus* de *qseC* foram também confirmadas através de sequenciamento de DNA. As sequências obtidas a partir da amplificação desse *locus* com os iniciadores *qseCDT-f* e *qseCDT-r* nas linhagens selvagem, recombinante  $\Delta qseC::cat$  e mutante  $\Delta qseC$  evidenciaram a presença do gene *qseC* intacto na linhagem selvagem, sua troca pelo gene *cat* na recombinante e a ausência de ambos os genes na mutante, conforme pode ser observado na Figura 10. Para melhor visualização estão destacadas em cores as regiões de anelamento dos iniciadores *qseCDT-f* e *qseCDT-r* (rosa) e a sequência FRT deixada após a remoção do gene *cat* (azul).

### Selvagem - gene *qseC*

GAAATGAAATTTACCCAACGTCTTAGTCTGCGTGTGAGGCTGACGCTAATCTTTTTAATTCTG  
GCCTCGGTGACCTGGCTGCTTTCCAGCTTTGTGCGCTGAAACAAACAACGGATAACGTCG  
ATGAATTGTTTCGACACCCAAGTATGCTGTTTGCCAAGCGGTTAAGTACGCTCGATCTCAAC  
GAAATCAACGCGCGGATCGCATGGCACAGACGCCAAATAAATTAACACGGTCATGTTG  
ATGACGATGCGCTGACCTTTGCCATCTTTACCCACGACGGCAGAATGGTCTTAACGATGGC  
GATAACGAGAAGATATTCCCTATAGCTATCAACGGGAAGGTTTTGCTGACGGCAACTGGT  
GGGCGATAAAGATCAATGGCGTTTTGTCTGGATGACCTCACCTGATGGCAAATATCGCATCG  
TTGTTGGTCAGGAATGGGAATACCGTGAAGACATGGCGCTGGCGATTGTTGCCGGGCAATT  
GATCCCCTGGTTGGTCGCACTGCCGGTTATGTTAATCATCATGATGGTACTACTGGGTCGTG  
AACTCGCGCCGCTGAACAACTGGCGCTGGCACTACGATGCGTGACCCTGACTCGGAAAA  
ACCACTAAACGCGACTGGCGTACCCAGCGAAGTGCAGCAACTGGTTGAGTCGCTAAATCAA  
CTGTTCCGCCGACACATGCGATGATGGTTGCGTGAACGACGCTTTACCTCCGACGCAGCTC  
ACGAACTTCGTAGCCCGTTAACGGCGCTGAAAGT **GCAAAC**

### Recombinante - gene *cat*

TTCT\*AGA **GAATAGGAACCTCGGAATAGGAACCTTC**ATTTAAATGGCGCGCCTT\*ACGCCCCGC  
CCT\*GCCACTCATCGCAGTAT\*TGTTGTATTCAATTAAGCA\*TCT\*GCCGACATGGAAGCCATCA  
CAAACGGCAT\*GATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCT\*GCGTATAAT  
ATTTGCCATGGTAAAACGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAA  
CTGGTAAAACCTACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTAGG  
GAAATAGGCCAGGTTTTACCCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCC  
GGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACG  
GTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGTAAT  
TCCGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAAACCTTGTGCTT  
ATTTTTCTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACA  
TTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGT  
GGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACCTCA  
AAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTAAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGA  
TCAACGTCCTATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAG  
GATTTATTTATTCTGCGAAGTATCTTCCGTACAGGTAGGCGCGCC **GAAGTTCTTACTTT**  
**CTAGAGAATAGGAACCTTC**GGAATAGCA **CTAAGGAGGATATTCATATG**G

### Mutante $\Delta qseC$

GGTATTGGCTACACATTAGGTGAGAA **GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC** **GAAGTTCTTACTTT**  
**CTAGAGAATAGGAACCTTCGGAATAG** **GAACTAAGGAGGATATTCATATG**GGGTAAGATTTTTG  
CTAAATTCGCAAAGACTTTGCACATTTTGCTAATTTAC

**Figura 10:** *Locus* do gene *qseC* sequenciado utilizando os iniciadores *qseCDT-f* e *qseCDT-r*. Na linhagem selvagem está representada a sequência obtida, correspondente ao gene *qseC*; na linhagem recombinante, a sequência obtida correspondente ao gene *cat* e na linhagem mutante, a ausência da sequência de ambos os genes. Em rosa, está representada a região de anelamento dos iniciadores e em azul as sequências FRT do cassete de recombinação.

#### 4.1.2. Complementação

O mutante complementado *qseC+* foi construído no intuito de garantir que as alterações observadas no mutante  $\Delta qseC$  nos testes subsequentes se devam à ausência de QseC. Para

a obtenção do complementado a amostra  $\Delta qseC$  foi transformada com o plasmídeo pVS155 (SPERANDIO *et al.*, 2002) e selecionada em meio LB agar com ampicilina. A presença do plasmídeo pVS155 foi confirmada através de extração plasmidial por lise alcalina e digestão enzimática com as enzimas de restrição *EcoRI* e *KpnI*, que resultou em dois fragmentos, um de aproximadamente 4.1 Kb correspondente ao plasmídeo e outro de aproximadamente 1.2 Kb correspondente ao gene *qseC* (dados não mostrados).

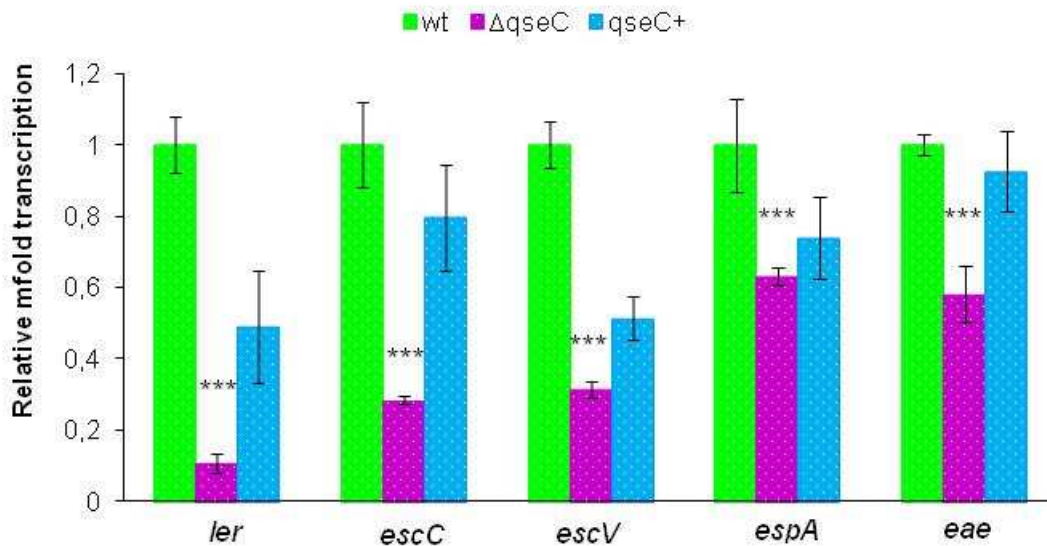
## **4.2. Análises da regulação da expressão gênica por QseC**

A segunda etapa deste estudo constituiu em análises transcricionais e fenotípicas para avaliar o papel de QseC na regulação da expressão gênica em aEPEC. Essas análises foram feitas comparando-se os resultados obtidos com a linhagem  $\Delta qseC$  com os resultados obtidos com a linhagem selvagem.

### **4.2.1. Análises transcricionais por qRT-PCR**

Inicialmente, foram escolhidos genes de virulência representando os cinco operons da ilha de patogenicidade LEE (*ler*, *escC*, *escV*, *espA* e *eae*), um gene de virulência não- codificado em LEE (*nleA*) e genes do operon flagelar (*flhD* e *fliC*) para a quantificação da transcrição através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Os efeitos da ausência de QseC em LEE foram investigados comparando-se os níveis transcricionais dos operons em  $\Delta qseC$  com os níveis selvagem. A linhagem *qseC+* foi avaliada através da observação da complementação do fenótipo selvagem. Para esse experimento, as amostras foram incubadas em meio DMEM, a 37° C sob agitação, até atingir a D.O.<sub>600 nm</sub> 1.0 e os RNAs totais de cada amostra foram extraídos e avaliados. Na Figura 11 estão representados os níveis transcricionais dos operons

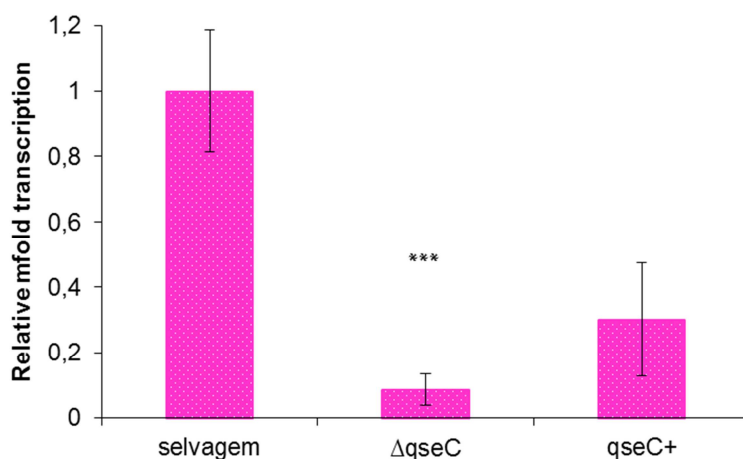
de LEE nas amostras selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$ . O operon LEE-1 foi avaliado através da quantificação da transcrição do gene *ler*. Observou-se que a transcrição de *ler* diminuiu cerca de 10 vezes em  $\Delta qseC$  comparado com a transcrição na selvagem. LEE-2 foi avaliado pela quantificação da transcrição do gene *escC*. Observou-se que houve uma diminuição de aproximadamente 3 vezes na linhagem  $\Delta qseC$  em comparação com a linhagem selvagem. O mesmo resultado foi observado para o operon LEE-3, através da quantificação da transcrição do gene *escV* (diminuição de aproximadamente 3 vezes). LEE-4 foi avaliado através da quantificação da transcrição do gene *espA*. Assim como nos outros operons, observou-se uma redução da transcrição nesse operon, porém, ela foi menor que 2 vezes. O mesmo resultado foi observado na avaliação do operon LEE-5, através da quantificação do gene *eae* (redução menor que 2 vezes). A quantificação da transcrição desses genes na linhagem  $qseC+$  demonstrou que, para todos eles, os níveis selvagens foram complementados.



**Figura 11:** Análise da transcrição dos operons da região LEE por qRT-PCR nas linhagens selvagem,  $qseC$  e  $qseC+$ . Os níveis transcripcionais dos genes foram quantificados como diferenças normalizadas com os níveis transcripcionais selvagens. Os níveis transcripcionais de *rpoA* foram utilizados como controle interno para normalizar os valores de  $C_t$ . Os dados

representam ao menos 3 replicatas de crescimento independentes. Significância estatística calculada pelo teste *t* Student (\*\*\*)  $P < 0.0001$ ).

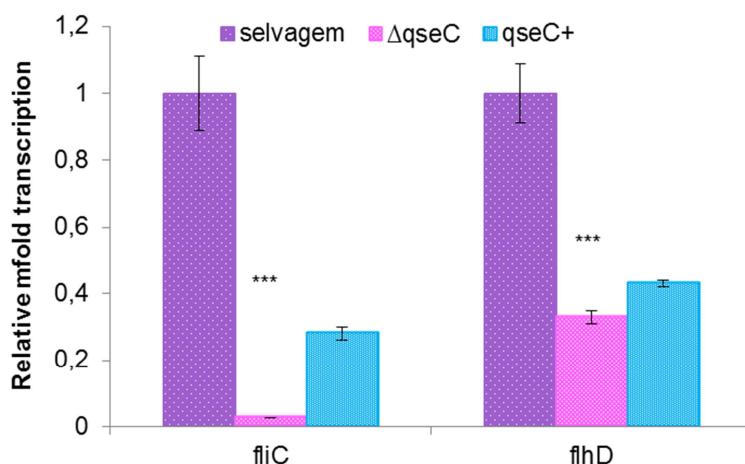
Fatores de virulência não codificados em LEE também participam da virulência de aEPEC, por isso a transcrição do gene *nleA* foi analisada. NleA é um efetor secretado pelo TTSS que interfere nas junções oclusivas das células intestinais por interromper o tráfico de proteína celular (GRUENHEID *et al.*, 2004). A expressão dessa molécula é ativada por QseC em EHEC 86-24 (HUGHES *et al.*, 2009). Na Figura 12 estão representados os níveis de transcrição de *nleA* nas amostras selvagem,  $\Delta qseC$  e *qseC+*. Observou-se que a transcrição de *nleA* diminuiu aproximadamente 12 vezes em relação ao selvagem.



**Figura 12:** Análise da transcrição do gene de virulência não codificado em LEE, *nleA* por qRT-PCR nas linhagens selvagem,  $\Delta qseC$  e *qseC+*. Os níveis transcricionais dos genes foram quantificados como diferenças normalizadas com os níveis transcricionais selvagens. Os níveis transcricionais de *rpoA* foram utilizados como controle interno para normalizar os valores de  $C_t$ . Os dados representam ao menos 3 replicatas de crescimento independentes. Significância estatística calculada pelo teste *t* Student (\*\*\*)  $P < 0.0001$ ).



Na Figura 13 estão representados os níveis transcripcionais dos genes flagelares *fliC*, que codifica a proteína flagelina, e *flhD*, que codifica o regulador principal do operon flagelar. Para a análise da transcrição desses genes, as amostras foram crescidas em meio LB a 37° C, sob agitação, até atingir a D.O.<sub>600 nm</sub> 1.0, devido a melhor expressão dos genes flagelares nesse meio de cultivo. Observou-se uma diminuição de cerca de 50 vezes na transcrição do gene *fliC* em  $\Delta qseC$  quando comparado com a transcrição na linhagem selvagem. Em relação ao gene *flhD*, observou-se um decréscimo na transcrição de aproximadamente 3 vezes em  $\Delta qseC$  quando comparado com a transcrição na amostra selvagem.

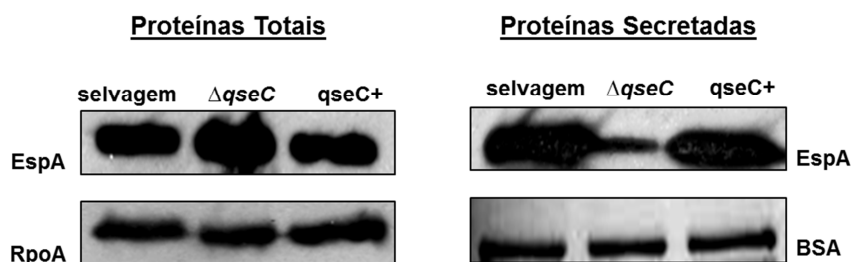


**Figura 13:** Análise da transcrição de genes flagelares por qRT-PCR nas linhagens selvagem,  $\Delta qseC$  e *qseC+*. Os níveis transcripcionais dos genes foram quantificados como diferenças normalizadas com os níveis transcripcionais selvagens. Os níveis transcripcionais de *rpoA* foram utilizados como controle interno para normalizar os valores de  $C_t$ . Os dados representam ao menos 3 replicatas de crescimento independentes. *t*-Student (\*\*\*)  $P < 0.0001$ ).

#### 4.2.2. Análise da expressão e secreção da proteína efetora translocada EspA

As proteínas totais e secretadas foram isoladas nas linhagens selvagem,  $\Delta qseC$  e *qseC+* e a expressão e secreção do filamento EspA foram analisadas por *immunoblotting*. A expressão constitutiva da subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase (RpoA) foi utilizada como controle para a

expressão de EspA. BSA foi utilizada como controle da quantidade de proteínas secretadas analisada. A Figura 14 representa os resultados obtidos para a expressão (proteínas totais) e secreção (proteínas secretadas) de EspA. Comparando-se o nível de expressão de EspA em  $\Delta qseC$  com a amostra selvagem, observou-se que este se manteve inalterado. Porém, ao comparar a capacidade de secretar essa proteína,  $\Delta qseC$  demonstrou ter sua capacidade de secreção prejudicada em relação á selvagem. Em ambos os casos, o fenótipo selvagem foi complementado em  $qseC+$ .



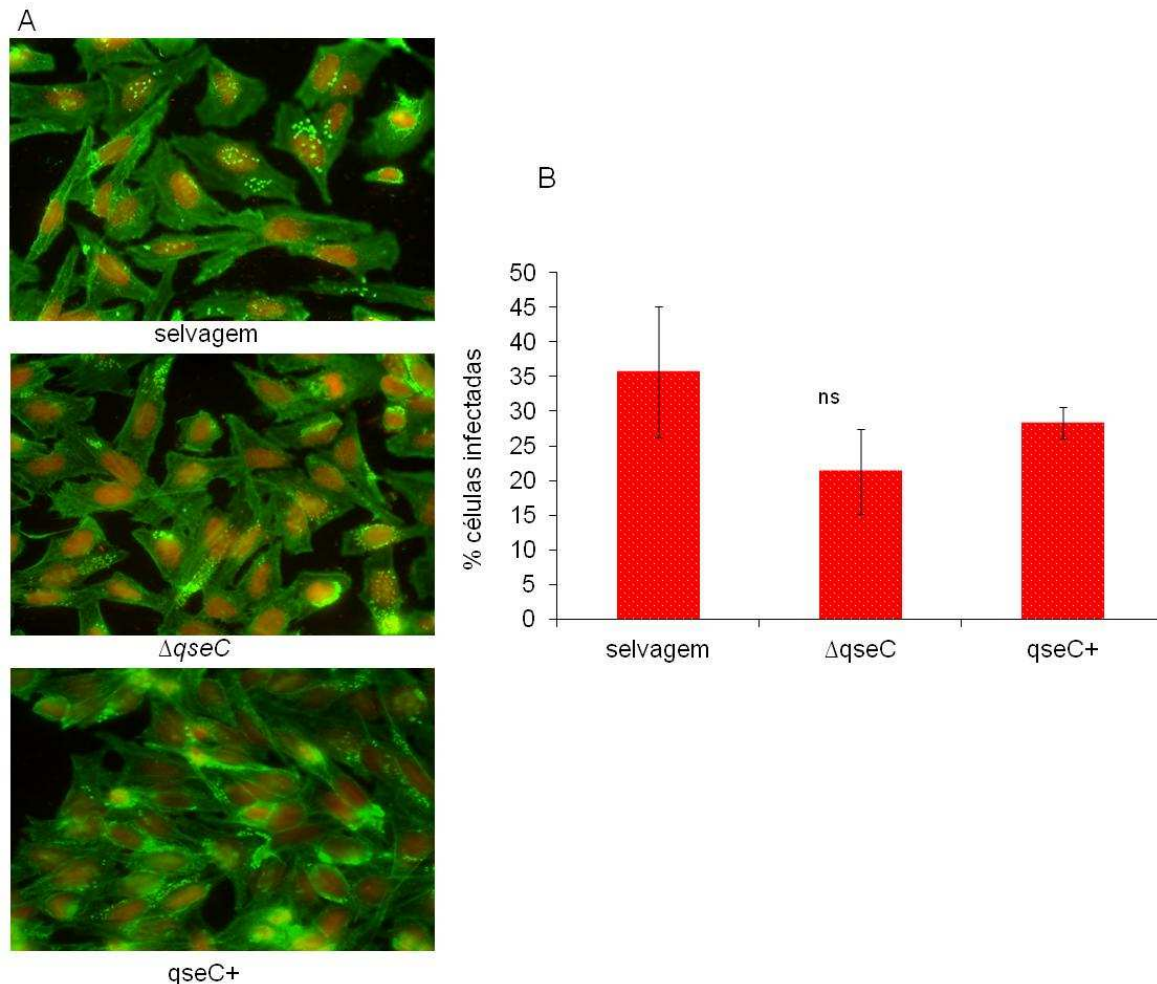
**Figura 14:** Análise por *immunoblotting* da expressão (proteínas totais) e secreção (proteínas secretadas) da proteína efetora EspA nas linhagens selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$ .

### 4.3. Testes Fenotípicos

#### 4.3.1. Formação da lesão A/E *in vitro*

A partir da observação de que a ausência de QseC reflete mudanças na transcrição de genes de LEE, o teste de FAS (*Fluorescent Actin Staining*) foi realizado para verificar o potencial de formação da lesão A/E em  $\Delta qseC$ . Esse teste detecta o acúmulo de actina polimerizada no sítio de adesão da bactéria à célula eucariótica, que é evidenciado pela ligação da faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína à essa proteína. As amostras selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$  foram analisadas por FAS em ensaio de interação de 6 horas com células HeLa e os resultados estão representados na Figura 15. Observou-se que  $\Delta qseC$  foi capaz de formar

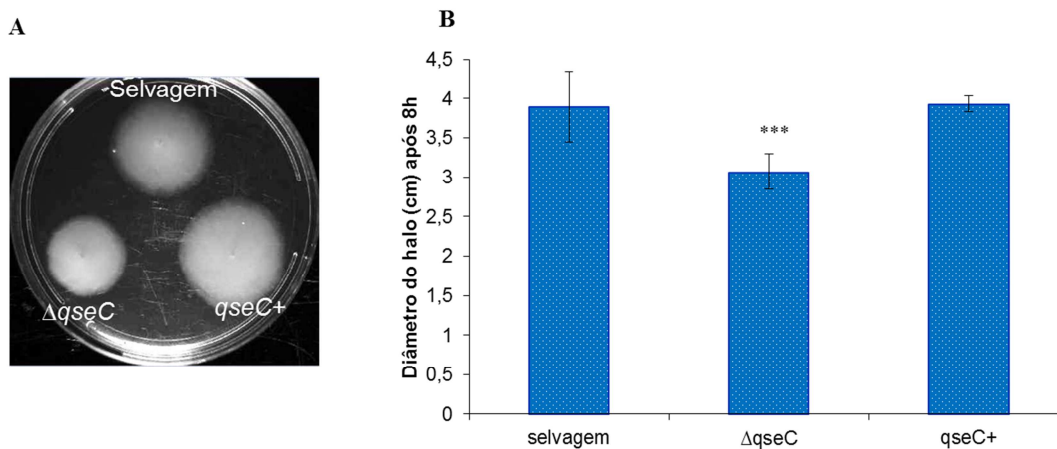
lesão A/E (Figura 15 A), porém a uma taxa menor que a selvagem. 36% das células HeLa que foram incubadas com a linhagem selvagem apresentaram formação de pedestal, enquanto que, 21% das células incubadas com  $\Delta qseC$  apresentaram pedestal (Figura 15 B). Essa diferença porém, não foi estatisticamente significativa. O fenótipo selvagem foi complementado na  $qseC+$ , com formação da lesão em 28% das células.



**Figura 15:** Teste de FAS para a detecção de actina polimerizada na formação do pedestal (lesão A/E) pelas amostras selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$  **A:** Microscopia de fluorescência. Células HeLa foram coradas em verde com FITC-faloidina, enquanto que, o núcleo das células HeLa e as bactérias foram coradas em vermelho com iodeto de propídio. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. **B:** Representação gráfica da porcentagem de células HeLa infectadas. Para cada lâmina, 100 células foram avaliadas. Teste *t*-Student baseado na comparação com a linhagem selvagem (ns = não significativo).

### 4.3.2. Motilidade

A partir da observação de que a ausência de QseC reflete mudanças na transcrição de genes flagelares, o teste em placa de ágar 0.3% foi realizado para verificar a motilidade de  $\Delta qseC$  em comparação com a amostra selvagem. Nesse teste, as linhagens selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$  foram inoculadas na placa e incubadas a 37° C. Os halos foram medidos e fotografados após 6 e 8 horas de incubação. A Figura 16 representa os resultados obtidos onde demonstrou-se que a motilidade foi menor em  $\Delta qseC$  em comparação com a selvagem. O fenótipo selvagem foi complementado em  $qseC+$  (Figura 16 A e 16 B).

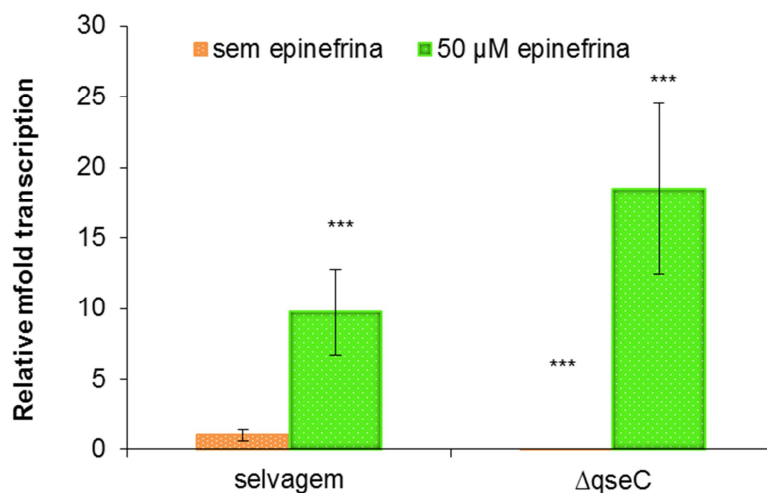


**Figura 16:** Teste de motilidade com as linhagens selvagem,  $\Delta qseC$  e  $qseC+$ . **A:** Imagem da placa de agar motilidade demonstrando o tamanho do halo em cada amostra após 8 horas de incubação. **B:** Gráfico representando as medidas do diâmetro do halo em cm após 8 horas de incubação. Significância estatística foi determinada pelo teste *t* Student baseando-se na comparação com a linhagem selvagem (\*\*\*)  $P < 0.0001$ ).

#### 4.4. Efeitos do sinal epinefrina

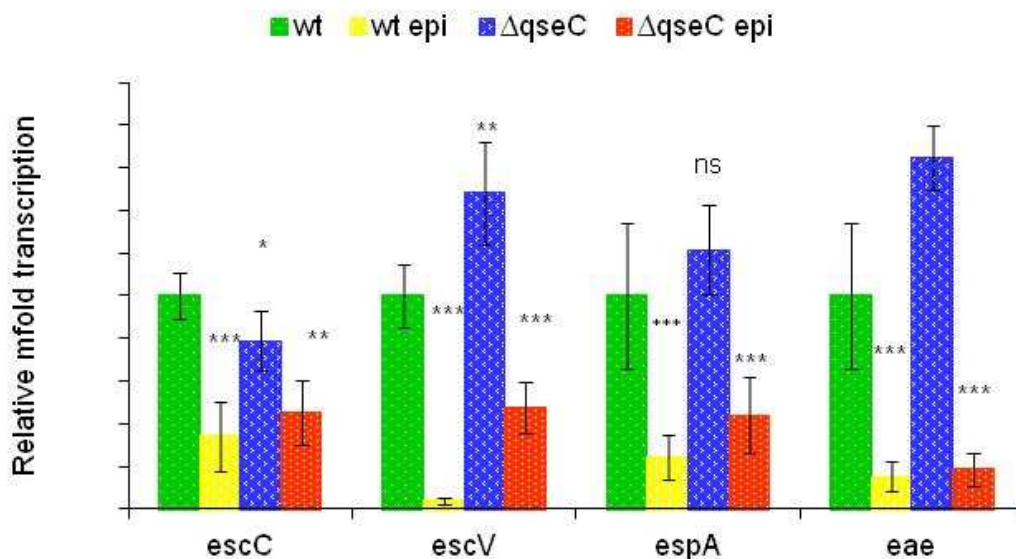
##### 4.4.1. Transcrição dos operons de LEE

QseC foi descrito como o sensor quinase responsável por detectar os hormônios epinefrina e norepinefrina em EHEC. Os efeitos da epinefrina na regulação da expressão gênica da região LEE de aEPEC foram investigados comparando-se os níveis transcricionais dos cinco operons nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$  crescidas na presença de epinefrina, com as mesmas linhagens crescidas na ausência de epinefrina. Para isso, as amostras foram crescidas em meio DMEM acrescido ou não de epinefrina, a 37° C sob agitação, até atingir a D.O.<sub>600 nm</sub> 0.5 e os RNAs totais de cada amostra foram extraídos e avaliados por qRT-PCR. Na Figura 17 estão representados os efeitos da epinefrina nos níveis transcricionais do gene *ler* (LEE-1) nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ . Para esse gene, a presença de epinefrina regulou positivamente a transcrição, aumentando-a cerca de 10 vezes na amostra selvagem e cerca de 18 vezes em  $\Delta qseC$ .



**Figura 17:** Efeito da epinefrina na regulação de LEE-1. A transcrição do gene *ler* foi avaliada por qRT-PCR nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$  crescidas até a D.O.<sub>600nm</sub> 0,5. Os níveis transcricionais dos genes foram quantificados como diferenças normalizadas com os níveis transcricionais selvagens. Os níveis transcricionais de *rpoA* foram utilizados como controle interno para normalizar os valores de  $C_t$ . Os dados representam ao menos 3 replicatas de crescimento independentes. Significância estatística calculada pelo teste *t*- Student (\*\*\*)  $P < 0.0001$ , \*\*  $P < 0,001$ , \*  $P < 0,01$ , ns = não significante).

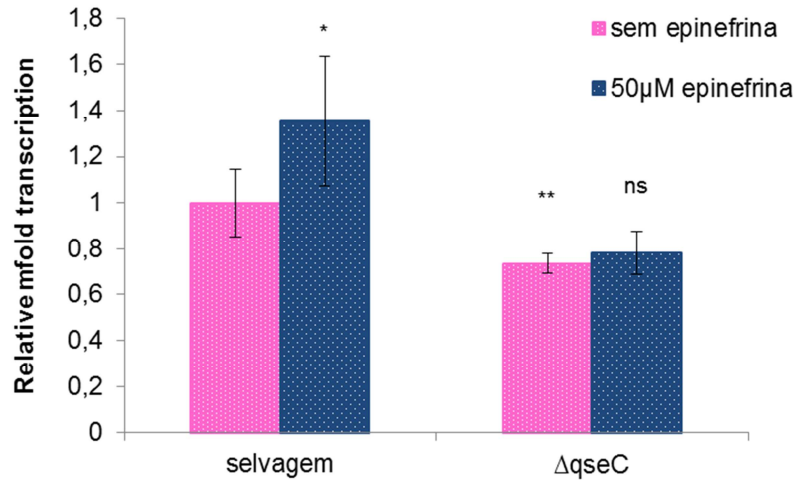
Na Figura 18 estão representados os efeitos da epinefrina nos níveis transcricionais dos genes *escC* (LEE-2), *escV* (LEE-3), *espA* (LEE-4) e *eae* (LEE-5) nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ . Os resultados obtidos demonstraram que, ao contrário do que ocorreu em LEE-1, a transcrição de LEE-2, LEE-3, LEE-4 e LEE-5 foi regulada negativamente na presença de epinefrina tanto na linhagem selvagem como em  $\Delta qseC$ . Na linhagem selvagem, o gene mais afetado foi *escV*, que apresentou níveis de transcrição 33 vezes menor que a selvagem na ausência de epinefrina, seguido de *eae* (6 vezes menor), *espA* (5 vezes menor) e *escC* (3 vezes menor). Na linhagem  $\Delta qseC$ , o gene mais afetado foi *eae*, que apresentou níveis transcricionais 9 vezes menor que a  $\Delta qseC$  crescida na ausência de epinefrina, seguido de *espA* e *escV*, que apresentaram níveis transcricionais 3 vezes menor. A presença de epinefrina não afetou significativamente a transcrição de *escC* em  $\Delta qseC$ .



**Figura 18:** Efeito da epinefrina na regulação de LEE-2, LEE-3, LEE-4 e LEE-5 por QseC. A transcrição dos genes *escC*, *escV*, *espA* e *eae* foi avaliada por qRT-PCR na presença e ausência de epinefrina nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ . Os níveis transcripcionais dos genes foram quantificados como diferenças normalizadas com os níveis transcripcionais selvagens. Os níveis de *rpoA* foram utilizados como controle interno para normalizar os valores de  $C_t$ . Os dados representam ao menos 3 replicatas de crescimento independentes. Significância estatística calculada pelo teste *t*-Student (\*\*\*)  $P < 0.0001$ , \*\*  $P < 0,001$ , \*  $P < 0,01$ , ns = não-significante).

#### 4.4.2. Transcrição do gene *nleA*

O efeito da epinefrina na regulação da expressão gênica do gene *nleA* também foi investigado. Comparou-se os níveis transcripcionais das linhagens selvagem e  $\Delta qseC$  crescidas na presença de epinefrina com as mesmas linhagens crescidas na ausência de epinefrina. Os resultados estão representados na Figura 19 e demonstraram que não houve alteração significativa nos níveis transcripcionais de *nleA* na presença de epinefrina.

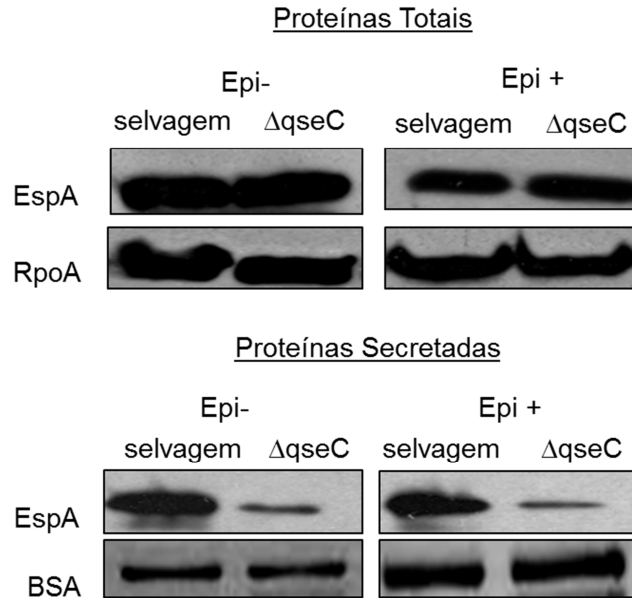


**Figura 19:** Efeito da epinefrina na regulação de *nleA* por QseC. A transcrição do gene *nleA* foi avaliada por qRT-PCR na presença e ausência de epinefrina nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ . Os níveis transcricionais dos genes foram quantificados como diferenças normalizadas com os níveis transcricionais selvagens. Os níveis transcricionais de *rpoA* foram utilizados como controle interno para normalizar os valores de  $C_t$ . Os dados representam ao menos 3 replicatas de crescimento independentes. Significância estatística calculada pelo teste *t*-Student (\*\*  $P < 0,001$ , \*  $P < 0,01$ ).

#### 4.4.3. Expressão da proteína EspA

A expressão e secreção do filamento EspA foram também avaliados na presença do sinal epinefrina. As proteínas totais e secretadas foram extraídas de culturas crescidas em meio DMEM, acrescido ou não de epinefrina, a 37° C sob agitação até a D.O.<sub>600 nm</sub> 0.5 e analisadas por *immunoblotting*. Os resultados obtidos estão representados na Figura 20. Observou-se que a presença de epinefrina não afetou expressão de EspA, que continuou a ser expressa a níveis semelhantes na selvagem e em  $\Delta qseC$ , bem como a secreção dessa proteína, que também se manteve em níveis menores em  $\Delta qseC$  em relação à selvagem.

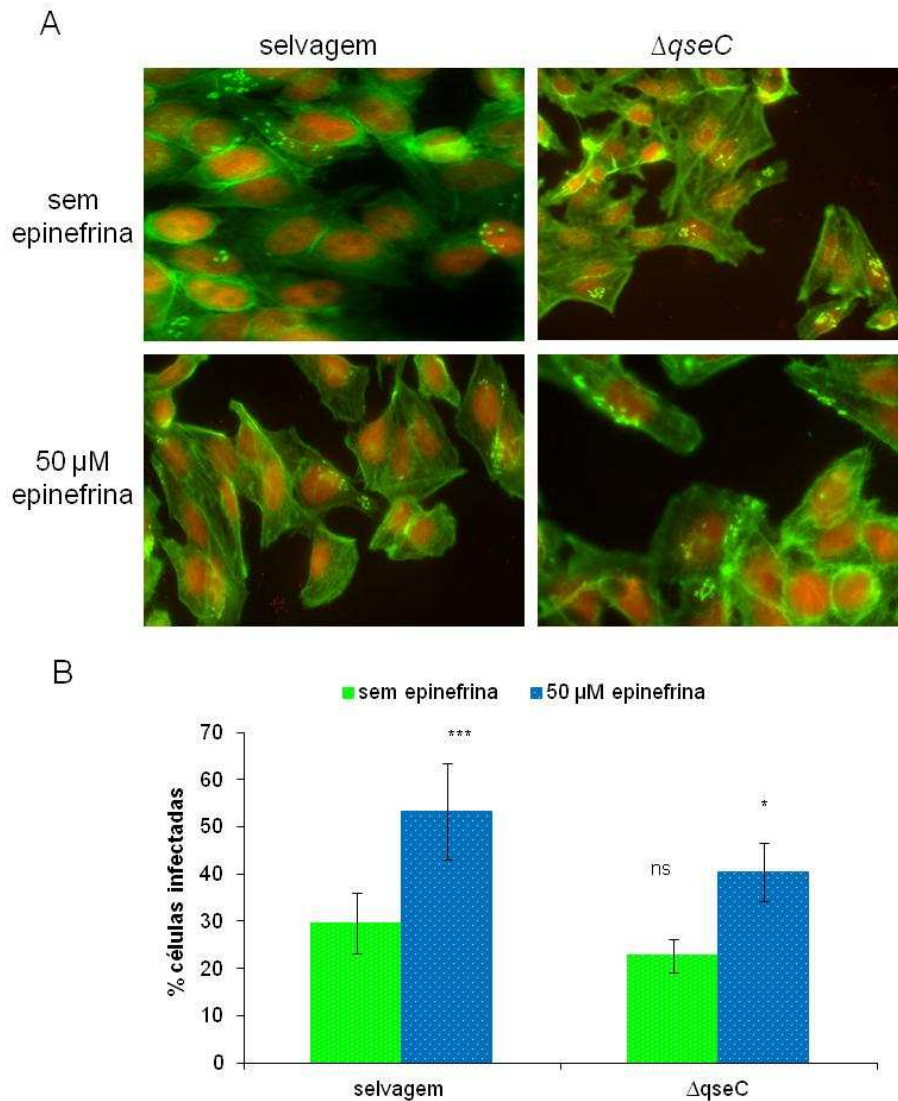




**Figura 20:** Análise por *Immunoblotting* da expressão e secreção da proteína efetora EspA nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ , na presença do sinal epinefrina.

#### 4.4.4. Formação da lesão A/E

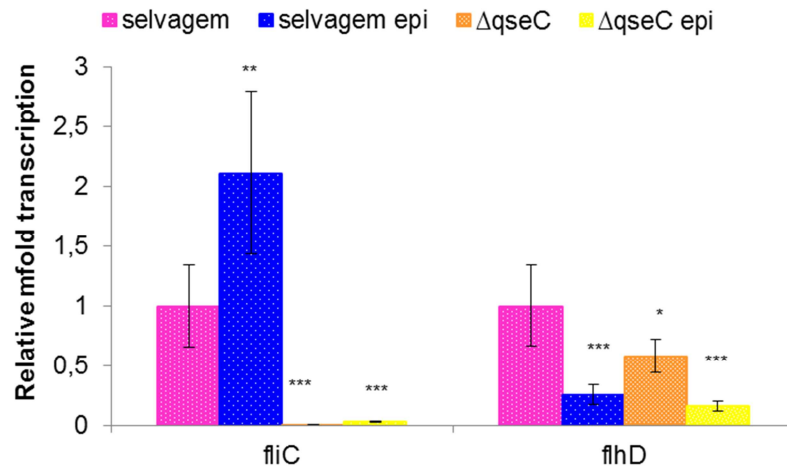
O teste de FAS foi realizado na presença de epinefrina para avaliar o potencial de formação da lesão A/E nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$  nessa condição. As amostras selvagem e  $\Delta qseC$  foram submetidas ao ensaio de interação de 6 horas com células HeLa na presença e ausência do sinal. Os resultados estão representados na Figura 21 A e 21 B. Observou-se que, quando a interação da linhagem selvagem com as células ocorreu na presença de epinefrina, houve a formação da lesão A/E em 53% das células, enquanto que, na ausência do sinal, a formação da lesão ocorreu em 29% das células. Um aumento de cerca de 1,8 vezes no número de células que formaram lesão. Quando a linhagem  $\Delta qseC$  interagiu com as células na presença de epinefrina, houve a formação da lesão A/E em 40% das células, enquanto que, na ausência de epinefrina, a lesão se formou em 22% das células, novamente um aumento de 1,8 vezes.



**Figura 21:** Teste de FAS para a detecção de actina polimerizada na formação do pedestal (lesão A/E) pelas amostras selvagem e  $\Delta qseC$  na presença do sinal epinefrina. **A:** Microscopia de fluorescência. Células HeLa foram coradas em verde com FITC-faloidina, enquanto que, o núcleo das células HeLa e as bactérias foram coradas em vermelho com iodeto de propídio. **B:** Representação gráfica da porcentagem de células HeLa infectadas. Para cada lâmina, 100 células foram avaliadas. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Significância estatística avaliada pelo teste *t*-Student baseado na comparação com as linhagens testadas na ausência do sinal (\*\*\*)  $P < 0.0001$ , \*  $P < 0,01$ , ns = não significativo).

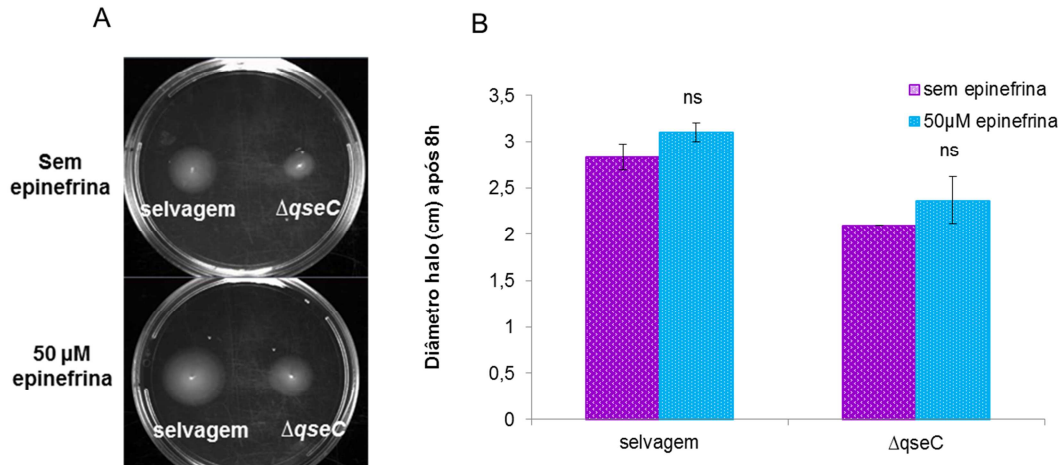
#### 4.4.5. Transcrição de genes flagelares e a motilidade

Avaliou-se o efeito da epinefrina também na transcrição de genes do operon flagelar e na motilidade. Os resultados estão representados na Figura 22. Observou-se que, na presença desse sinal, o gene *flhD* apresentou sua transcrição regulada negativamente cerca de 5 vezes na selvagem e 6 vezes em  $\Delta qseC$ . Já o gene *fliC*, apresentou a transcrição regulada positivamente, aumentando 2 vezes na selvagem e 3 vezes em  $\Delta qseC$ .



**Figura 22:** Efeito do sinal epinefrina na transcrição dos genes flagelares *fliC* e *flhD* avaliada por qRT-PCR nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ . Os níveis transcripcionais dos genes foram quantificados como diferenças normalizadas com os níveis transcripcionais selvagens. Os níveis transcripcionais de *rpoA* foram utilizados como controle interno para normalizar os valores de  $C_t$ . Os dados representam ao menos, 3 replicatas de crescimento independentes. Significância estatística calculada pelo teste *t*-Student (\*\*\*)  $P < 0,0001$ , \*\*  $P < 0,001$ . \*  $P < 0,01$ ).

Quando a motilidade foi verificada através do teste em placa de ágar a 0.3%, observou-se que na presença do sinal não houve alteração da motilidade em ambas as linhagens analisadas (Figura 23).



**Figura 23:** Efeito do sinal epinefrina na motilidade. **A:** Imagem da placa de ágar motilidade demonstrando o tamanho do halo em cada amostra após 8 horas de incubação, na presença e ausência de epinefrina. **B:** representação gráfica do diâmetro dos halos de motilidade medidos após 8 horas de incubação. Dados representam 3 replicatas de crescimento independentes. Significância estatística calculada pelo teste *t*-Student (\*  $P < 0,01$ , ns = não significativo).

#### 4.5. Análise global da regulação por QseC através de *DNA Microarray*

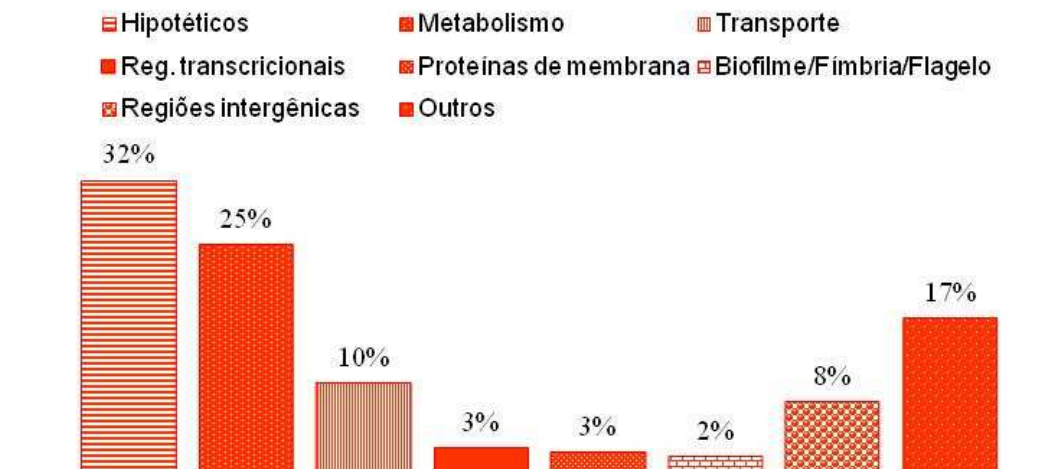
Após a análise específica da transcrição de alguns genes por qRT-PCR, foi realizada uma análise global do papel de QseC na regulação gênica em aEPEC através da técnica de *DNA Microarray*, no intuito de identificar quais outros genes estavam sob a regulação por esse sensor. Para isso, as amostras foram crescidas em meio DMEM acrescido ou não de epinefrina, a 37° C sob agitação, até atingir a D.O.<sub>600 nm</sub> 0.5. Os RNAs totais de cada amostra foram extraídos, transformados em cDNAs e marcado com uma fluorescência. Estes foram hibridizados com *Affymetrix E. coli 2.0 microarray chip* para comparar o transcriptoma das linhagens selvagem e  $\Delta qseC$  e o efeito da presença do sinal epinefrina na transcrição global em ambas. *Affymetrix E. coli 2.0 microarray chip* contém aproximadamente 10.000 sondas, que correspondem a todos os genes das linhagens de EHEC EDL933 e Sakai; da K-12 MG1655; UPEC CFT073 e 700 sondas para regiões intergênicas. Os resultados obtidos na comparação

entre o transcriptoma de  $\Delta qseC$  e selvagem estão descritos na Tabela IV e revelaram 1505 genes com transcrição alterada, dos quais, 355 apresentaram aumento e, 1150 apresentaram redução da transcrição. A maioria desses genes (55%) são derivados de MG1655, que contém um genoma conservado entre linhagens de *E. coli*.

**Tabela IV:** Papel de QseC na regulação gênica global em aEPEC O55:H7. Comparação entre o transcriptoma de  $\Delta qseC$  e selvagem.

		<b>Aumentados</b>	<b>Diminuídos</b>	<b>Sem alterações</b>	<b>Total</b>
selvagem x $\Delta qseC$	MG 1655- específicos	181	659	3230	4070
	Patógeno- específicos	174	491	5278	5943
	<b>Total</b>	<b>355</b>	<b>1150</b>	<b>8508</b>	<b>10013</b>

Dentre os genes que apresentaram alterações da transcrição encontram-se genes relacionados com funções como: motilidade, metabolismo e transporte de açúcares, metabolismo de lípideos, metabolismo de nitrogênio, transporte e captação de íons, síntese de aminoácidos, divisão celular, resistência a stress, quimiotaxia, bombas de efluxo multidrogas, formação de biofilmes, reparo de DNA, ativadores e repressores transcricionais, genes de virulência, entre outros, além de regiões intergênicas, que podem conter sequências para RNAs não codificadores (dados não mostrados). A porcentagem dos genes com alterações transcricionais de acordo com algumas funções, está demonstrada na Figura 24.



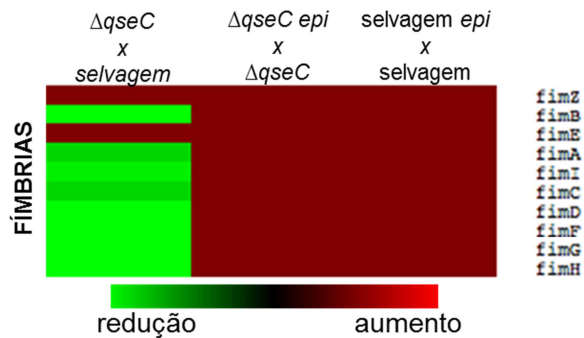
**Figura 24:** Classificação dos 1505 genes afetados pela ausência de QseC em aEPEC, baseada na análise de DNA *Microarray*. Cada gene está representado uma única vez, classificado na categoria mais relevante. A porcentagem indica o número total de genes afetados em cada categoria, relativo ao número total de genes afetados no *array*.

Os resultados obtidos da comparação dos efeitos da epinefrina nos transcriptomas das amostras selvagem e  $\Delta qseC$  estão demonstrados na Tabela V. Observou-se um total de 1057 genes com transcrição alterada na linhagem selvagem. Desses genes, 818 apresentaram redução na transcrição e 239 apresentaram aumento, sendo a maioria deles (54%) derivados das linhagens patogênicas. Para  $\Delta qseC$ , 1308 genes apresentaram alterações, sendo 947 com a transcrição aumentada e 361 com a transcrição reduzida. A maioria deles, (53%) derivados de M1655.

**Tabela V:** Efeito do sinal epinefrina na regulação gênica global de aEPEC O55:H7 Comparação entre os transcriptomas selvagem e  $\Delta qseC$  na presença e ausência do sinal.

		<b>Aumentados</b>	<b>Diminuídos</b>	<b>Sem alteração</b>	<b>Total</b>
selvagem x selvagem epi	MG 1655- específicos	162	316	3592	4070
	Patógeno- específicos	77	502	5364	5943
	Total	239	818	8956	10013
$\Delta qseC$ x $\Delta qseC$ epi	MG 1655- específicos	550	150	3370	4070
	Patógeno- específicos	397	210	5336	5943
	Total	947	361	8706	10013

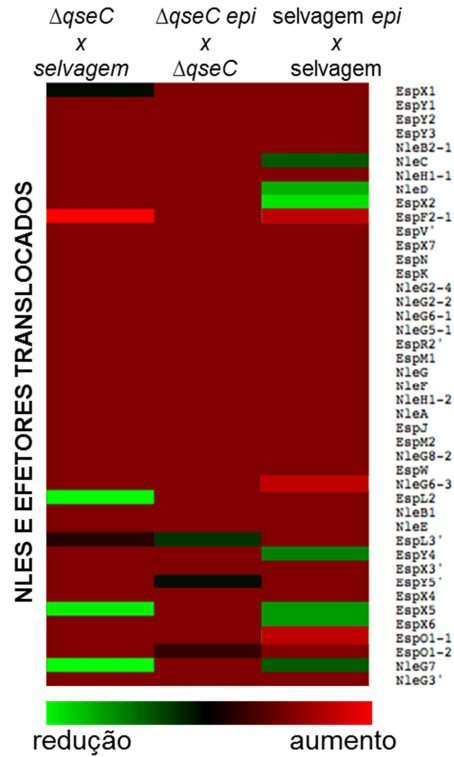
A partir dos resultados obtidos através de *DNA Microarray*, alguns grupos específicos de genes foram escolhidos para a construção de *heat-maps*. Os *heat-maps* são representações gráficas onde valores individuais de transcrição em uma matriz são representados por cores. Valores altos, que representam uma transcrição aumentada, são representados em vermelho. Valores baixos, que representam uma transcrição reduzida, são representados em verde. Valores não modificados são representados em preto. Para todos os *heat-maps* construídos comparou-se  $\Delta qseC$  com amostra selvagem,  $\Delta qseC$  na presença e ausência de epinefrina, e amostra selvagem na presença e ausência de epinefrina. A Figura 25 demonstra o *heat-map* para os genes *fim*, que codificam componentes das fímbrias do tipo I. Observou-se que em  $\Delta qseC$ , os genes *fim* apresentaram a transcrição reduzida, com exceção apenas de *fimZ* e *fimE*, que apresentaram transcrição discretamente aumentada. Na presença do sinal epinefrina, para ambas as linhagens, todos os genes *fim* apresentaram a transcrição discretamente aumentada.



**Figura 25:** Representação gráfica por *heat map* da transcrição dos genes fimbriais do tipo I (*fim*) nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ , na presença ou ausência de epinefrina. Em verde, transcrição reduzida, em vermelho, transcrição aumenta e em preto, transcrição não modificada.

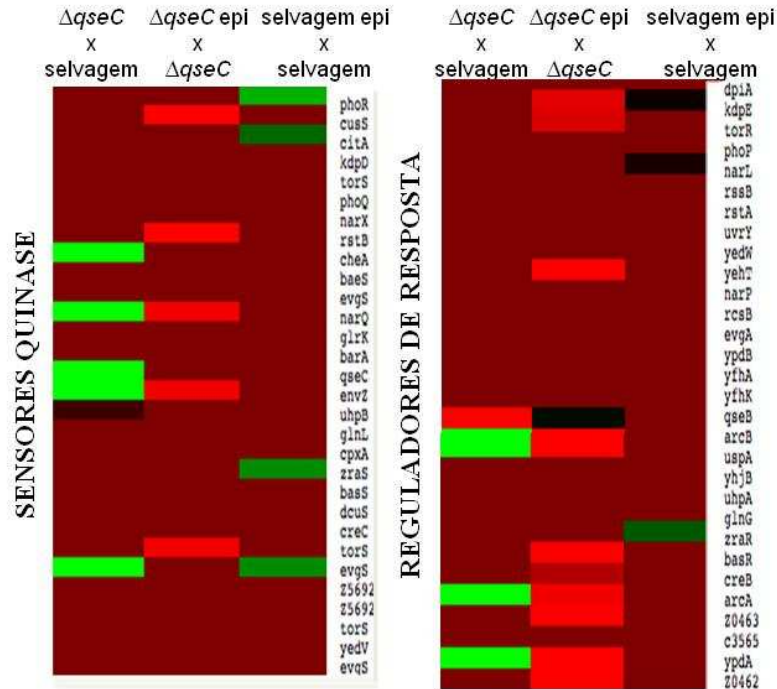
A Figura 26 representa o *heat-map* de genes de fatores translocados não-codificados em LEE (Nles). Observou-se que em  $\Delta qseC$ , o gene do fator EspF2-1 foi o que apresentou transcrição mais aumentada, enquanto os genes de EspL2, EspX4 e NleG7 apresentaram transcrição reduzida. Os demais genes apresentaram nenhuma ou discreta modificação na transcrição. Na presença de epinefrina, os mesmos genes apresentaram nenhuma ou discreta modificação. Na amostra selvagem, o sinal epinefrina induziu uma redução na transcrição principalmente dos genes de NleD, EspX2, EspY4, EspX5 e EspX6.





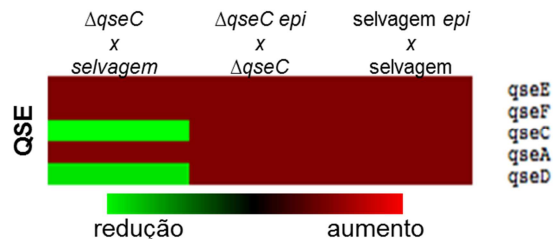
**Figura 26:** Representação gráfica por *heat map* da transcrição dos genes de fatores translocados não-codificados em LEE (Nles) nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ , na presença ou ausência de epinefrina. Em verde, transcrição reduzida, em vermelho, transcrição aumenta e em preto, transcrição não modificada.

Outros dois grupos de genes avaliados por *heat-map* foram os sensores quinase e os reguladores de resposta pertencentes a sistemas de dois componentes e estão representados na Figura 27. Observou-se que em  $\Delta qseC$ , os genes de sensores quinase *cheA*, *narQ*, *envZ* e *evgS* apresentaram transcrição reduzida, assim como os genes de reguladores de resposta *arcA*, *uspA* e *ypdA*. Quando o sinal epinefrina estava presente, os genes *narQ* e *envZ* apresentaram a transcrição aumentada, bem como os genes *cusS*, *rstB* e *torS*. Os genes de reguladores de resposta *qseB*, *arcA* e *ypdA* apresentaram aumento da transcrição, assim como os genes *dpiA*, *kdpE*, *yedW*, *arcB*, *zraR*, *z0463* e *z0462*. A linhagem selvagem não apresentou alterações nesses dois grupos de genes quando sob sinalização da epinefrina.



**Figura 27:** Representação gráfica por *heat map* da transcrição dos genes de sensores quinase e reguladores de resposta nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ , na presença ou ausência de epinefrina. Em verde, transcrição reduzida, em vermelho, transcrição aumenta e em preto, transcrição não modificada.

A análise dos genes relacionados com *quorum sensing* de *E. coli* por *heat-map* demonstrou que, em  $\Delta qseC$ , o gene *qseD* apresentou transcrição reduzida e os genes *qseA*, *qseE* e *qseF* não apresentaram alteração. Na presença de epinefrina nenhum gene analisado apresentou mudanças na transcrição.



**Figura 28:** Representação gráfica por *heat map* da transcrição dos genes de *quorum sensing* de *E. coli* (*qse*) nas linhagens selvagem e  $\Delta qseC$ , na presença ou ausência de epinefrina. Em verde, transcrição reduzida, em vermelho, transcrição aumenta e em preto, transcrição não modificada.

## DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

Bactérias constantemente reconhecem e se ajustam a situações ambientais através do reconhecimento de sinais químicos e alteração da sua expressão gênica para se adaptar e obter sucesso em colonizar o ambiente em que se encontram. Os mecanismos para detecção e resposta a esses sinais são amplamente difundidos entre espécies bacterianas e conduzem a regulação de fenótipos apropriados a uma determinada situação, como por exemplo: bioluminescência, formação de biofilme, mudanças na motilidade e produção e secreção de fatores de virulência.

Diante do vasto repertório de sinais ambientais, populações bacterianas empregam *quorum sensing* para sincronizar suas respostas de forma eficiente. Sistemas de *quorum sensing* funcionam através da produção e detecção de moléculas sinalizadoras difusíveis, os autoindutores. Quando uma concentração crítica desses autoindutores é alcançada, uma mudança coletiva no comportamento da população ocorre através da ativação de um sensor e/ou proteína regulatória (FUQUA *et al.*, 1994; WILLIAMS, 2007).

O sistema AI-3 (SPERANDIO *et al.*, 2003) é um exemplo de como as bactérias detectam os sinais ambientais e, em resposta, modulam sua expressão gênica. Esse sistema permite aos patógenos detectar moléculas sinalizadoras de outras bactérias (AI-3) e do hospedeiro (hormônios neuroendócrinos de stress epinefrina e norepinefrina), sinalizando para a bactéria que ela se encontra em seu local de colonização e deve, nesse momento, iniciar a expressão dos fatores de virulência que irão participar do estabelecimento da infecção (CLARKE; SPERANDIO, 2006; HUGHES *et al.*, 2009, MOREIRA *et al.*, 2010; SPERANDIO *et al.*, 2003). Os hormônios do hospedeiro epinefrina e norepinefrina foram descritos como sinais que substituem o autoindutor AI-3, participando de uma comunicação cruzada entre patógeno e hospedeiro (SPERANDIO *et al.*, 2003) que irá regular a expressão gênica de fatores de virulência. Epi/ NE apresentam efeitos sistêmicos e um papel importante no balanço energético,

comportamento, termoregulação e resposta a stress (LEVI-MONTALCINI; ANGELETTI, 1966). Dessa forma, a capacidade de detectar estes sinais pode permitir aos patógenos modular precisamente a expressão de genes de virulência em resposta ao estado fisiológico do hospedeiro (MOREIRA *et al.*, 2010) .

Durante a patogênese, as bactérias se deparam com diversos microambientes diferentes no hospedeiro (BEIER; GROSS, 2006) e várias bactérias, incluindo EPEC, se adaptam utilizando sensores quinase. QseC é o sensor quinase que detecta o sinal bacteriano AI-3 e os hormônios hospedeiro Epi/NE (CLARKE *et al.*, 2006).

No intuito de melhor compreender a rede regulatória que modula a expressão dos fatores de virulência envolvidos na colonização e estabelecimento da infecção por EPEC atípica, neste trabalho, foi investigado o papel do sistema de *quorum sensing* AI-3/Epinefrina/Norepinefrina *in-vitro*. Esse estudo fundamentou-se nos trabalhos do grupo de pesquisa da Dra. Vanessa Sperandio, que relatou como esse sistema de sinalização atua na regulação gênica da virulência de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7. Sabendo que EHEC O157 e EPEC O55:H7 são patótipos evolutivamente muito próximos, com EHEC O157 tendo possivelmente se originado a partir de uma precursora de EPEC O55:H7 (FENG *et al.*, 1998; WHITTAM *et al.*, 1993; ZHOU *et al.*, 2010), neste trabalho verificou-se se esse sistema de regulação atua de maneira semelhante em ambos os patótipos.

Para caracterizar o papel de AI-3/Epi/NE na regulação da virulência de aEPEC construiu-se um mutante nulo para o gene do sensor quinase QseC na linhagem de EPEC atípica BA320. O mutante  $\Delta qseC$  foi construído por recombinação homóloga utilizando a metodologia descrita em DATSENKO; WANNER (2000) na qual o gene *qseC* foi substituído pelo gene *cat*, que, posteriormente foi removido.  $\Delta qseC$  foi analisado por PCR e sequenciamento, confirmando que a mutação havia ocorrido. O gene *qseC* deletado foi complementado em *trans* para confirmar as alterações fenotípicas obtidas para o mutante nos testes subsequentes.

SPERANDIO *et al.* (2002), CLARKE; SPERANDIO (2005), HUGHES *et al.* (2009) e NJOROGE; SPERANDIO (2012) descreveram previamente que QseC participa da regulação da motilidade e da formação da lesão A/E na linhagem de EHEC 86-24.

Para verificar os efeitos de QseC na regulação dos genes da região LEE de aEPEC, a transcrição de cinco genes representando os cinco operons dessa ilha de patogenicidade foi analisada em  $\Delta qseC$  e comparada com a transcrição na linhagem selvagem. LEE abriga os genes que expressam os componentes do sistema de secreção do tipo III, um importante aparato responsável por secretar proteínas cruciais para virulência e sobrevivência bacteriana dentro do hospedeiro (MCDANIEL *et al.*, 1995).

Nessa análise, observou-se que a transcrição do gene *ler*, o regulador principal de LEE localizado em LEE-1, apresentou níveis bastante reduzidos em  $\Delta qseC$  em comparação com a transcrição na linhagem selvagem (Figura 11). Assim como em LEE-1, os demais operons também demonstraram níveis reduzidos na ausência de QseC, com reduções significativas para os operons LEE-2 e LEE-3 (*escC* e *escV*). Os operons LEE-4 e LEE-5 (genes *espA* e *eae*) apresentaram níveis transcricionais levemente reduzidos, porém, esses valores não são considerados significativos do ponto de vista de mudanças nos padrões de expressão. Para todos os genes analisados, houve a complementação do fenótipo selvagem, demonstrando que os efeitos observados se devem à ausência de QseC.

Esse primeiro resultado evidencia que os operons LEE-1, LEE-2 e LEE-3 de aEPEC são ativados por QseC ou seja, são regulados positivamente por esse sensor após esse detectar os sinais ambientais. Entretanto, LEE-4 e LEE-5 não estão sob a regulação direta por QseC em aEPEC, ao contrário do que ocorre em EHEC, onde QseC regula positivamente esses dois operons (NJOROGE; SPERANDIO, 2012). Esses achados demonstram uma regulação diferencial de alguns genes alvo em LEE para esses patótipos.

Os resultados transcricionais foram comprovados pelos achados de expressão e secreção da proteína EspA (LEE-4). EspA faz parte do aparelho de secreção, sendo o

componente que forma o canal pelo qual as proteínas são secretadas da célula bacteriana para a célula hospedeira. Através de *immunoblotting* (Figura 14) foi possível observar que a produção dessa proteína não foi afetada na ausência de QseC, visto que os níveis de expressão são semelhantes nas linhagens selvagem, mutante e complementada. Porém, quando analisou-se os níveis de secreção dessa proteína, observou-se que no mutante  $\Delta qseC$ , a secreção ocorreu em níveis menores em comparação com as linhagens selvagem e complementada. Essa redução da capacidade de secretar EspA na ausência de QseC pode ser explicada pela diminuição nos níveis transcricionais dos genes *escC* e *escV* (Figura 11). As proteínas EscC e EscV são os componentes principais das estruturas em anel que se inserem nas membranas externa e interna da bactéria para formar o sistema de secreção do tipo III (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). A diminuição da transcrição desses genes em  $\Delta qseC$  resulta em uma deficiência na habilidade de montar o aparato de secreção, resultando em uma secreção deficiente de proteínas efetoras e translocadas nessa linhagem.

Além de ativar a expressão dos genes do TTSS codificados em LEE, QseC também parece estar envolvido na regulação dos genes que codificam efetores translocados pelo TTSS e que estão fora da região LEE. É o caso de NleA, o primeiro efector secretado pelo TTSS descoberto fora da região LEE, é regulado positivamente por QseC uma vez que mutantes  $\Delta qseC$  apresentaram níveis transcricionais reduzidos (HUGHES *et al.*, 2009; NJOROGE; SPERANDIO, 2012). Em aEPEC, o gene *nleA* foi analisado a nível transcricional por qRT-PCR. Os resultados demonstraram que  $\Delta qseC$  apresentou a transcrição de *nleA* diminuída em relação à selvagem (Figura 12), demonstrando que, assim como descrito em EHEC, em aEPEC NleA faz parte dos efetores regulados positivamente pelo sensor QseC.

Sustentando os dados de qRT-PCR para os genes de LEE, a regulação do TTSS por QseC pôde ser comprovada fenotipicamente. A capacidade de induzir o acúmulo de filamentos de actina polimerizada no sítio de adesão pôde ser detectada nas linhagens selvagem,  $\Delta qseC$  e *qseC+* através do teste de FAS, como um indicativo da formação da lesão A/E *in vitro*

(KNUTTON *et al.*, 1989). As amostras foram analisadas em ensaio de interação de 6 horas com células HeLa (Figura 15), no qual observou-se a ocorrência da formação de pedestais por  $\Delta qseC$ , porém com uma taxa menor que a observada para a linhagem selvagem. 35% das células HeLa que foram incubadas com a linhagem selvagem foram infectadas, enquanto que 21% das células incubadas com  $\Delta qseC$  foram infectadas. Essa diminuição na taxa de infecção na ausência de QseC corrobora com os achados de qRT-PCR e análise de EspA secretado, onde  $\Delta qseC$  apresenta transcrição reduzida para alguns genes essenciais à formação do aparato de secreção. Entretanto, esse decréscimo na capacidade de formar lesão A/E não foi estatisticamente significativo, demonstrando que, mesmo níveis menores de expressão e secreção das proteínas efetoras e translocadas ainda são suficientes para permitir a formação da lesão A/E por aEPEC. Em EHEC, a deleção de QseC diminui significativamente a formação de lesão A/E em células HeLa (NOJOROGE; SPERANDIO, 2012).

Flagelo é outro importante fator de virulência em EPEC, requerido para a motilidade e colonização do hospedeiro. A expressão e síntese de flagelo e a motilidade requerem a expressão de mais de 50 genes divididos em, pelo menos 17 operons, constituindo um regulon flagelar grande e coordenado (SPERANDIO *et al.*, 2002). A expressão dos genes flagelares é regulada em resposta a diversos sinais ambientais, entre os quais se encontra a densidade celular bacteriana (SPERANDIO *et al.*, 2001b). Dentro do regulon, os operons são regulados temporalmente e divididos hierarquicamente em classe. (KUTSUKAKE; OHYA; IINO, 1990). Os genes de classe I codificam o regulador principal, FlhDC, que ativa a transcrição dos genes de classe II, incluindo genes que codificam as estruturas de gancho e os reguladores transcricionais FlgM e FliA. FliA, por sua vez, regula a transcrição dos genes de classe III, que incluem *fliC*, que codifica a flagelina e o operon *mot* (CHILCOTT; HUGHES, 2000). Em EHEC e *E. coli* K-12, mutantes  $\Delta qseC$  expressam menos flagelo e são menos móveis que as linhagens selvagem, com os genes *flhD*, *fliA*, *fliC* e *motA* apresentando transcrição reduzida (SPERANDIO *et al.*, 2002).



A análise da transcrição de genes flagelares em aEPEC  $\Delta qseC$  demonstrou que o gene flagelar de classe I, *flhD*, apresentou transcrição reduzida em relação à selvagem. Já o gene de classe III, *fliC*, apresentou transcrição extremamente reduzida em relação à selvagem, como pode ser visto na Figura 13. Esses resultados evidenciam que a regulação do operon flagelar de aEPEC também ocorre por densidade celular bacteriana, através do sistema AI-3/Epi/NE. Assim como em EHEC (CLARKE; SPERANDIO 2005), o sensor QseC tem papel fundamental nessa regulação, provavelmente reconhecendo o sinal ambiental e ativando o regulador transcricional QseB, que vai agir diretamente no promotor de *flhDC*, regulando positivamente sua transcrição. Fenotipicamente, esses resultados foram comprovados pela análise da capacidade móvel de aEPEC  $\Delta qseC$  em placa de ágar 0.3% (Figura 16). Foi possível observar que a motilidade em  $\Delta qseC$  foi muito menor em comparação com as linhagens selvagem e complementada. Dessa forma, foi possível afirmar que, assim como ocorre em outras bactérias como EHEC (HUGHES *et al.*, 2009, NJOROGE; SPERANDIO 2012), *Edwardsiella tarda* (WANG *et al.*, 2011), *Salmonella enterica* Tiphymurium (MOREIRA *et al.*, 2009) e UPEC (KOSTAKIOTI; PINKNER; HULTGREN, 2009), em aEPEC a motilidade é modulada por AI-3/Epi/NE via o sensor QseC. QseC inicia a cascata que irá ativar o regulon flagelar, levando à motilidade, o que, no trato gastrointestinal, provavelmente permite a aEPEC se aproximar do epitélio intestinal, onde iniciará a formação da lesão A/E e será exposta aos hormônios Epi/NE presentes nesse sítio (CLARKE *et al.*, 2006; SPERANDIO *et al.*, 2003).

SPERANDIO *et al.* (2003) observaram que os sinais eucarióticos eram capazes de ativar a expressão de genes do TTSS de EHEC quando bactéria e célula estavam em contato, ou quando a bactéria era incubada com meio que havia sido incubado com células eucarióticas. Eles reportaram que os hormônios epinefrina e norepinefrina, em concentrações fisiológicas, ativavam a expressão de TTSS e LEE-1, indicando que ambos os hormônios estavam envolvidos na sinalização celular bactéria-hospedeiro, regulando genes de virulência.

Os efeitos da sinalização bactéria-hospedeiro através do hormônio epinefrina foram estudados na linhagem aEPEC BA320. Primeiramente, a transcrição dos genes *ler*, *escC*, *escV*, *espA* e *eae* foi analisada nas amostras selvagem e  $\Delta qseC$  incubadas na presença de 50  $\mu$ M de epinefrina por qRT-PCR. Observou-se que, na presença do sinal, a linhagem selvagem apresentou o gene *ler* 10 vezes mais transcrito comparado com a mesma linhagem na ausência do sinal. Surpreendentemente, na linhagem  $\Delta qseC$ , esse mesmo gene apresentou-se 18 vezes mais transcrito em comparação com a ausência do sinal (Figura 17). Sendo QseC o receptor responsável por reconhecer Epi/NE e transduzir esse sinal para ativar a transcrição da região LEE em EHEC, era esperado não haver o reconhecimento e transdução desse sinal na ausência do sensor. Entretanto, o mutante  $\Delta qseC$  de aEPEC ainda foi capaz de detectar a epinefrina do meio e elevar consideravelmente os níveis transcricionais de *ler*. Esse resultado sugere que, em aEPEC, ao contrário do que foi observado para EHEC (NJOROGÉ; SPERANDIO, 2012), a regulação positiva da expressão do gene *ler* em resposta à sinalização Epi/NE, não é completamente dependente do sensor QseC, havendo um outro receptor, que reconhece os sinais ambientais e participa da regulação desse operon.

Como *ler* é um regulador positivo da expressão de LEE, era esperado que níveis transcricionais elevados desse gene refletissem um aumento da transcrição dos demais operons. Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que os níveis transcricionais de LEE-2, LEE-3, LEE-4 e LEE-5 eram menores na presença de epinefrina em ambas as amostras, selvagem e  $\Delta qseC$  (Figura 18). Na linhagem selvagem, o gene *escV* (LEE-3) foi o mais afetado, seguido de *eae* (LEE-5), *espA* (LEE-4) e *escC* (LEE-2). Em  $\Delta qseC$ , *eae* foi o gene mais afetado, seguido de *escV*, e *espA*. Esses resultados são intrigantes e sugerem que a sinalização Epi/NE pode estar agindo como repressora da transcrição desses operons de LEE, atuando de maneira diferenciada (ativadora ou repressora), dependendo do gene alvo analisado. Além disso, a observação de que o sinal continua a ser interpretado mesmo na ausência do receptor QseC suporta o fato do envolvimento de um outro receptor para Epi/NE nessa complexa rede

regulatória. Entretanto, ao contrário de QseC, esse receptor parece ter um papel repressor na transcrição dos operons LEE-2 a LEE-5. De fato, a existência de um segundo receptor para o sinal epinefrina em EHEC foi relatado por READING *et al.* (2007). Esse receptor, denominado QseE faz parte do sistema de dois componentes QseEF, que foi descrito como um regulador indireto da formação do pedestal, atuando na modulação da expressão do fator EspFu. De acordo com NJOROGE; SPERANDIO (2012), em EHEC, QseE reconhece epinefrina, sulfato e fosfato e regula negativamente a expressão de LEE e formação da lesão A/E. Nesse patógeno, a deleção de ambos, QseC e QseE, resulta na incapacidade de EHEC de detectar epinefrina, sugerindo que esses dois sensores quinases são os únicos responsáveis pelo reconhecimento desse sinal nesse patótipo bacteriano (NJOROGE; SPERANDIO, 2012). Os resultados obtidos para aEPEC sugerem que, assim como em EHEC, QseE pode estar atuando como um regulador negativo para alguns genes da região LEE em resposta a epinefrina, entretanto, um estudo detalhado do papel desse sensor na regulação gênica de aEPEC se faz necessário para poder confirmar que os resultados observados nesse trabalho estão relacionados com a atuação de QseE e não de um outro receptor, ainda não descrito e relacionado com o sistema AI-3/Epi/NE de sinalização.

A expressão e secreção do filamento EspA foram também avaliados na presença de epinefrina. Notou-se que, em concordância com os resultados de qRT-PCR, a expressão de EspA apresentou uma discreta diminuição em ambas linhagens, selvagem e  $\Delta qseC$  quando o sinal estava presente. Porém, a secreção dessa proteína continuou deficiente na ausência de QseC, mesmo na presença de epinefrina.

A capacidade de formar lesão A/E na presença de epinefrina foi avaliada nas linhagens aEPEC selvagem e  $\Delta qseC$  através de FAS, em ensaio de interação de 6 horas com células HeLa (Figura 21). Observou-se que, quando a linhagem selvagem interagiu com as células na presença de epinefrina, houve um aumento de aproximadamente duas vezes na capacidade de formação da lesão A/E. O mesmo resultado já havia sido observado em EHEC (NJOROGE;

SPERANDIO, 2012; SPERANDIO *et al.*, 2003). Porém, quando a linhagem  $\Delta qseC$  interagiu com as células na presença de epinefrina, o mesmo aumento de aproximadamente duas vezes na taxa de formação de lesão A/E foi observado. Esse resultado contrasta com os resultados obtidos para EHEC, onde a suplementação do teste com epinefrina não afetou a taxa de infecção na ausência de QseC (NOJOROGE; SPERANDIO, 2012) e reafirma a hipótese da participação de outro sensor que pode detectar epinefrina e atuar na modulação da expressão dos genes essenciais para a formação da lesão A/E em aEPEC.

Apesar da diminuição na transcrição de genes importantes do aparato de secreção do tipo III na presença de epinefrina, esse sinal ainda foi capaz de modular positivamente a formação do fenótipo A/E por aEPEC. Uma possível explicação para isso é que outros fatores podem estar contribuindo para a formação da lesão A/E por aEPEC e que a expressão desses fatores está sendo positivamente regulada pelo sinal epinefrina. Além disso, esses resultados refletem a presença de uma complexa rede regulatória que participa do reconhecimento de epinefrina e controla a expressão de LEE em aEPEC, com a participação integrada de QseC e outras vias adicionais, que podem estar agindo em nível transcricional e/ou pós-transcricional para regular a expressão da virulência desse patógeno.

Ao avaliar a regulação da transcrição do efector NleA por QseC (Figura 19), notamos uma forte regulação por esse sensor ativado após o reconhecimento do sinal bacteriano AI-3 no meio. Quando o efeito da epinefrina na transcrição de *nleA* foi avaliado, pudemos observar que não houve alteração nos níveis transcricionais de *nleA* na presença desse sinal em nenhuma das linhagens, selvagem ou mutante. Esse dado sugere que a regulação da expressão gênica de *nleA* em aEPEC ocorre preferencialmente via QseC e que a epinefrina não tem papel importante na regulação do efector NleA em aEPEC. Em EHEC, a expressão de NleA parece ser regulada de maneira diferente. NOJOROGE; SPERANDIO (2012) reportaram que, na presença de epinefrina, selvagem e  $\Delta qseC$  apresentavam a transcrição do gene *nleA* aumentada e, que a regulação desse gene ocorre através de uma ação conjunta entre QseC e QseE, sendo que,

após o reconhecimento do sinal epinefrina, esse processo ocorre preferencialmente via QseE nesse patótipo.

Os efeitos da epinefrina foram avaliados também na transcrição de genes flagelares e na motilidade de aEPEC (Figura 22). Quando o sinal estava presente, o gene *flhD* apresentou a transcrição reduzida na selvagem e em  $\Delta qseC$ . Já o gene da flagelina, *fliC* apresentou transcrição aumentada em ambas as linhagens. Essas diferenças nos níveis transcricionais de *flhD* e *fliC* de aEPEC não refletiram em alterações na motilidade em nenhuma das linhagens, quando essa foi analisada na presença de epinefrina e comparada com a ausência do sinal (Figura 23).

Os dados obtidos evidenciam a complexa regulação do operon flagelar, que pode ocorrer diferencialmente entre os patótipos de *E. coli*. Dessa maneira, podemos supor que a motilidade em aEPEC é regulada positivamente por QseC, mas o hormônio epinefrina parece não ser um sinal importante para induzir o fenótipo de motilidade. Ao contrário, ele parece sinalizar para um aumento do fenótipo de *attachment* nesse patógeno, o que é coerente com a modulação temporal da expressão dos genes de virulência durante a infecção por aEPEC.

Além de participar da regulação da virulência em diferentes patógenos, QseC atua como um regulador geral da expressão gênica (HUGHES *et al.*, 2009; KOSTAKIOTI; PINKNER; HULTGREN, 2009, NJOROGÉ; SPERANDIO 2012). Para se ter uma visão global da transcrição de todos os genes de aEPEC que poderiam estar sendo regulados por QseC e pelos sinais AI-3/Epi/NE foi utilizada a técnica de *DNA Microarray*. Essa abordagem permitiu comparar todo o transcriptoma da linhagem  $\Delta qseC$  com a linhagem selvagem. A comparação revelou alterações nos níveis transcricionais de 1505, dos quais, 355 apresentaram aumento e 1150 apresentaram redução. 55% dos genes alterados derivam da amostra MG1655, que contém um genoma conservado entre linhagens de *E. coli*. Utilizando o mesmo procedimento, HUGHES *et al.* (2009) identificaram em EHEC  $\Delta qseC$  668 genes com transcrição aumentada e 479 genes com transcrição reduzida.

Uma classificação dos genes que apresentaram transcrição alterada de acordo com a função permitiu observar que a maioria dos genes com perfil alterado (32%) são genes considerados hipotéticos. Em uma análise semelhante, HADJIFRANGISKOU *et al.* (2011) encontraram 37,7% de genes hipotéticos regulados por QseC em UPEC. 25% dos genes afetados em aEPEC foram classificados em genes de metabolismo. Entre eles, genes que participam do metabolismo de carboidratos, lipídeos, nitrogênio, nucleotídeos e aminoácidos apresentaram transcrição deficiente. Na mesma análise para UPEC, HADJIFRANGISKOU *et al.* (2011) encontraram 23,3% dos genes afetados pela ausência de QseC classificados em genes de metabolismo, principalmente genes relacionados com síntese e catabolismo de carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos.

Apesar de não serem considerados determinantes de virulência, fatores metabólicos exercem um papel vital durante o estabelecimento da infecção. Por isso, muitos trabalhos tem conectado metabolismo com a virulência bacteriana (DALEBROUX *et al.*, 2010; KOSTAKIOTI *et al.*, 2011; NJOROGÉ *et al.*, 2012; WOLFE, 2010), argumentando que a regulação do estado metabólico é um requerimento geral durante a infecção, sugerindo que genes de metabolismo e virulência apresentam regulação coordenada, independentemente do local da infecção ou estratégia patogênica. No caso de aEPEC, QseC parece ser um fator que participa dessa regulação e as mudanças metabólicas mediadas por esse sensor podem ter papel importante na patogênese dessa bactéria.

A classificação dos genes afetados em  $\Delta qseC$  ressaltou ainda a importância de QseC na regulação de ativadores e repressores transcricionais, que representaram 3% desses genes. Interessante é o fato de que todos os reguladores analisados tiveram a transcrição reduzida. O único regulador que demonstrou transcrição aumentada foi o repressor GrlR, que é codificado na região LEE e reprime a ativação de *ler* pelo regulador positivo GrlA. Esse resultado indica que uma das vias pelo qual QseC pode estar agindo na ativação da região LEE é através da

repressão da regulação negativa do ativador GrlA por GrlR, levando a uma ativação da expressão de *ler*.

QseC ainda está relacionado com a regulação da expressão de genes importantes relacionados a transporte (10% dos genes afetados), constituintes de membrana (3%), além de regiões intergênicas (8%), genes relacionados à motilidade, quimiotaxia, biofilme, captação de íons, resistência a stress, virulência, entre outros. Esses resultados suportam ainda mais o fato de que QseC tem um papel importante na regulação global de genes em aEPEC.

A participação da epinefrina na regulação gênica em aEPEC também foi analisada globalmente através de DNA *Microarray*. 1057 genes apresentaram a transcrição alterada em aEPEC selvagem na presença do hormônio. A transcrição foi reduzida em 77% desses genes e aumentada em 23% deles. Interessantemente, a maioria das alterações (54%) foi observada em sondas para genes patógenos-específicos. Na ausência de QseC, 1308 genes foram afetados pela presença de epinefrina, 72% com transcrição aumentada e 28% reduzida, sendo que a maioria deles, (53%) são derivados de *E. coli* K-12. Esses resultados suportam a hipótese do envolvimento de outro receptor para Epi/NE em aEPEC, visto que o sinal ainda atua na regulação diferencial global de genes, mesmo quando QseC está ausente. De fato, no caso da ausência de QseC, esse receptor parece ter um papel bastante importante na regulação gênica global, visto o grande número de genes afetados nessa condição. Como citado anteriormente, o papel do sensor QseE em aEPEC deve ser investigado, para que a sua participação nessa regulação em conjunto com QseC seja melhor compreendida.

Em EHEC, os resultados do DNA *Microarray* revelaram um número maior de genes com níveis transcricionais alterados na linhagem selvagem tratada com epinefrina em comparação com  $\Delta qseC$  tratada com esse hormônio (NJOROGÉ; SPERANDIO, 2012), diferindo do observado para aEPEC. Porém, para ambos os patótipos, epinefrina possivelmente possui duplo papel (sinal ativador ou repressor), dependendo do gene alvo.

Através da construção de *heat-maps*, comparou-se a transcrição de alguns grupos de genes na ausência de QseC e/ou presença de epinefrina em aEPEC.

A fímbria tipo I, produzida por muitas linhagens de *E.coli*, é um apêndice que promove a aderência bacteriana à células eucarióticas. Em UPEC, a fímbria tipo I é um importante fator de virulência (JOHNSON, 1991) envolvido na invasão celular de células epiteliais de bexiga humana (MARTINEZ *et al.*, 2000). Em *E. coli* K-12 e EAEC, as fimbrias tipo I são responsáveis pela adesão inicial à superfícies abiótica e células epiteliais no estabelecimento do biofilme (MOREIRA *et al.*, 2003; PRATT; KOLTER, 1998). Constitui-se de um filamento protéico, codificado pelo operon *fim*, o qual é composto pelos genes *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG*, *fimH*, *fimI* (MOL; OUDEGA, 1996), responsáveis pela sua expressão e montagem.

KOSTAKIOTI; PINKNER; HULTGREN, (2009) reportaram que QseC regula a expressão da fímbria do tipo I em UPEC através de QseB e que a ausência desse sensor implica em atenuação da virulência desse patógeno *in vivo*. O *heat-map* para os genes *fim* de aEPEC (Figura 25) evidenciou transcrição reduzida em  $\Delta qseC$ , com excessão apenas de *fimZ* e *fimE*, que apresentaram transcrição discretamente aumentada. Esses dados sugerem que QseC está envolvido na regulação do operon da fímbria tipo I também em aEPEC. Na presença do sinal epinefrina, todos os genes *fim* apresentaram a transcrição discretamente aumentada em ambas as linhagens.

Além de NleA, outros efetores translocados não-codificados em LEE (Nles) participam do processo de patogênese de aEPEC, principalmente por interferirem com vias de sinalização na célula eucariótica. A transcrição de alguns desses fatores de aEPEC foi analisada em um *heat-map* (Figura 26). Foi possível observar que, em  $\Delta qseC$ , o fator EspF2-1 apresentou níveis transcricionais elevados, enquanto os genes de EspL2, EspX4 e NleG7 apresentaram níveis transcricionais reduzidos. Epinefrina não foi reconhecida como sinal para a transcrição desses efetores em  $\Delta qseC$ . Na linhagem selvagem, a epinefrina induziu uma redução na transcrição principalmente dos genes de NleD, fator que inibe a apoptose (BARUCH *et al.*, 2011) EspX2,



EspY4, EspX5 e EspX6. As proteínas EspX e EspY não possuem função conhecida. No caso dos Nles, os resultados observados sugerem um papel duplo para a sinalização AI-3/Epi/NE via QseC, que pode agir como ativador ou repressor, dependendo do gene alvo.

Sistemas de dois componentes são dispositivos de transdução de sinais que permitem as bactérias iniciar uma resposta adaptativa a um estímulo ambiental através de mudanças na expressão de genes (BEIER; GROSS, 2006). A análise global por *microarray* indicou que alguns sistemas de dois componentes parecem ser regulados por QseC e AI-3/Epi/NE em aEPEC. A comparação por *heat-map* (Figura 27) revelou que, na ausência de QseC, os sensores quinase CheA, NarQ, EnvZ e EvgS apresentaram transcrição reduzida. CheA é o sensor quinase do sistema de dois componentes CheA-CheY e está envolvido no reconhecimento e transdução de sinal na quimiotaxia (DEF FRANCO; KOSHLAND, 1981, PARKINSON, 1978). NarQ, juntamente com o regulador NarP, atua no controle da expressão gênica durante a respiração anaeróbia em resposta a nitrito e nitrato (STEWART; RABIN, 1995, DARWIN, STEWART, 1996). EnvZ atua com o regulador OmpR no complexo mecanismo de regulação osmótica (MJZUNO; MIZUSHIMA, 1990). Já EvgS, junto com o regulador EvgA compõe o principal sistema que confere resistência à ácido às bactérias na fase exponencial (MASUDA; CHURCH, 2002; MASUDA; CHURCH, 2003). Na presença de epinefrina, os genes *narQ* e *envZ* apresentaram níveis transcricionais aumentados.

Esses resultados sugerem a participação indireta de QseC em uma rede regulatória que controla a expressão gênica nos processos citados acima. De fato, sabe-se que QseC regula e interfere com outras vias e sistemas de sinalização, formando um sistema integrado, com níveis adicionais de regulação que controlam o gasto energético da expressão gênica para promover a sobrevivência e um processo infeccioso de sucesso.

Um sensor quinase pode ativar múltiplos reguladores de resposta. Ao analisar o papel de QseC na regulação de fatores transcricionais (Figura 27) por *heat map*, observou-se que, em  $\Delta qseC$ , os genes de reguladores *uspA*, *arcA* e *ypdA* apresentavam transcrição reduzida. ArcA é

o regulador de resposta no sistema de dois componentes ArcB-ArcA. Esse sistema tem um importante papel na regulação do metabolismo energético a nível transcricional em bactérias (IUCHI; LIN, 1993). YpdB-YpdA é um sistema recém-descrito e parece estar envolvido na eliminação de nutrientes antes da entrada na fase estacionária (FRIED; BEHR; JUNG, 2013). Na presença de epinefrina, esses mesmos genes apresentaram aumento da transcrição, assim como os genes *dpiA*, *kdpE*, *yedW*, *zraR*, *z0463* e *z0462*, o que sugere que, não apenas QseC é capaz de regular a expressão desses reguladores em resposta a epinefrina.

É interessante notar que os resultados observados para o regulador QseB corroboram com os achados de KOSTAKIOTI; PINKNER; HULTGREN, (2009) que relataram que, na ausência de QseC, a fosforilação de QseB ainda ocorre, o que culmina na transcrição aumentada de QseB. Isso ocorre porque, na ausência de QseC, QseB não tem sua atividade reprimida, regulando positivamente a sua própria expressão e mediando de maneira direta ou indireta, a repressão de genes alvo.

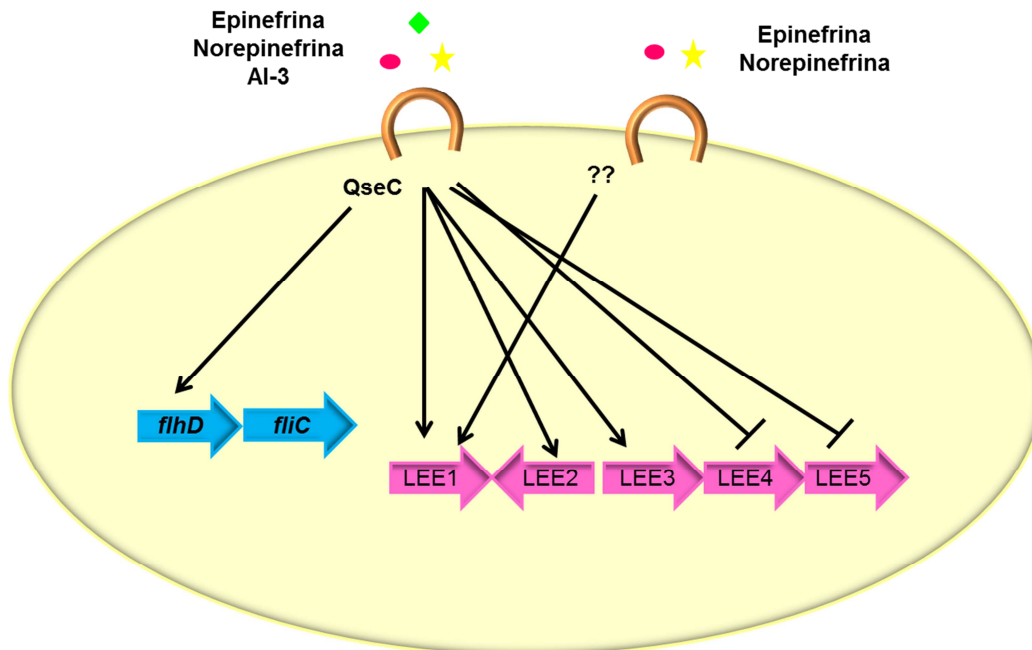
Outro fato interessante que se pode observar é que, na presença de epinefrina, o regulador KdpE apresenta sua transcrição aumentada, mesmo na ausência de QseC. KdpE é um regulador transcricional que, assim como QseB e QseF é ativado por QseC (HUGHES *et al.*, 2009) e está envolvido na regulação da região LEE de EHEC, por ser ligar ao promotor de *ler*. O fato de esse regulador apresentar a transcrição aumentada na presença de epinefrina pode sugerir que KdpE tem papel na regulação da região LEE de aEPEC em resposta a esse sinal, mesmo na ausência de QseC, sendo dessa forma, ativado também por outro sensor quinase que está envolvido no reconhecimento de epinefrina e age em conjunto com QseC para então regular os genes de LEE.

Os resultados encontrados ao analisar genes de sistemas de dois componentes, indicam que QseC está envolvido na regulação de alguns desses sistemas em aEPEC, e que, outro receptor que detecta epinefrina pode atuar em conjunto na regulação desses sistemas, fazendo

parte de uma complexa rede que culmina em uma cascata regulatória que pode ocorrer de maneira hierárquica, iniciando-se com a fosforilação de QseC.

Os genes relacionados com *quorum sensing* em *E. coli* (Qse) também foram analisados por *heat-map*. Nessa análise, observou-se que o gene *qseD* foi o único que apresentou transcrição reduzida em  $\Delta qseC$ . QseD é um regulador transcricional do tipo Lys encontrado em enterobactérias. Em EHEC, QseD foi relacionado com a regulação negativa da transcrição de LEE e alteração da formação da lesão A/E (HABDAS *et al.*, 2010). Em aEPEC, esse fator transcricional parece estar envolvido na rede de integração de sinais regulados por QseC e que culminam na regulação da expressão gênica de LEE.

A análise em conjunto dos resultados obtidos nesse trabalho levou à proposta de um modelo simplificado da regulação da virulência de aEPEC por QseC AI-3/Epi/NE. Provavelmente, após alcançar o intestino delgado, aEPEC primeiramente detecta AI-3 produzido pela microbiota gastrointestinal no lúmen. QseC inicia então uma cascata de sinalização que irá ativar o regulon flagelar induzindo a motilidade, que permite aEPEC se aproximar do epitélio intestinal. Nesse local, aEPEC provavelmente detecta epinefrina e norepinefrina presentes no intestino hospedeiro através de QseC, que inicia a cascata regulatória que age nos genes da região LEE e leva a formação da lesão A/E nas células intestinais. Muito provavelmente, a formação de lesão A/E e o início de diarreia causada por aEPEC podem aumentar a exposição dessa bactéria a Epi/NE, devido ao estado fisiológico do hospedeiro, o que poderia aumentar ainda mais a expressão dos genes de virulência desse patógeno entérico.



**Figura 29:** Modelo geral simplificado da regulação da virulência pelo sistema de *quorum sensing* Al-3/Epinefrina/Norepinefrina em EPEC atípica O55:H7.

Em conjunto, os resultados deste trabalho sugerem que a regulação gênica da virulência em patógenos entéricos como EPEC atípica é um processo extremamente complexo e envolve a integração de múltiplos sinais e níveis hierárquicos de vias de transdução que convergem com proteínas regulatórias intracelulares para alterar os padrões de expressão gênica. Além disso, as inúmeras diferenças observadas na regulação de EHEC e aEPEC, principalmente no que diz respeito aos efeitos da sinalização por epinefrina, sugerem que, apesar da proximidade genética entre essas linhagens, a importância relativa dessa via regulatória pode variar entre os diferentes patótipos. Talvez essas diferenças estejam ligadas ao fato de que essas bactérias colonizam sítios intestinais diferentes (EHEC coloniza o cólon e aEPEC, o intestino delgado) onde os níveis de sinalização podem variar e afetar cada patógeno de maneira distinta.

Neste trabalho descreveu-se, pela primeira vez, a regulação gênica do tipo *quorum sensing* em uma amostra de EPEC atípica e o papel central de QseC Al-3/Epi/NE em promover

a virulência desse patógeno. Novos questionamentos foram apresentados e necessitam ser investigados para que o papel desse sistema na integração de redes regulatórias de virulência seja esclarecido, o que seria de extrema importância para se obter o conhecimento essencial para a compreensão da patogênese de aEPEC e desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas e profiláticas no combate á infecções por esse patógeno.



## CONCLUSÃO

---

## CONCLUSÃO

1. O sistema de *quorum sensing* AI-3/Epinefrina/Norepinefrina, através do sensor quinase QseC, participa da regulação da expressão de genes da ilha de patogenicidade LEE de EPEC atípica. Essa regulação reflete na capacidade de formação da lesão A/E por aEPEC.
2. Em aEPEC, o hormônio epinefrina tem papel importante na regulação de genes de LEE e essa regulação parece não ocorrer exclusivamente através de QseC, mas também por outro receptor capaz de detectar esse sinal.
3. O sistema de *quorum sensing* AI-3/Epinefrina/Norepinefrina, através do sensor quinase QseC, está envolvido na regulação da expressão gênica flagelar e na motilidade de aEPEC. Entretanto, a sinalização por epinefrina parece não ser importante para a expressão da motilidade.
4. Além do papel central na regulação da virulência de aEPEC, QseC atua também como um importante regulador global da expressão gênica em aEPEC, regulando, de maneira direta ou indireta, a expressão de genes envolvidos em diversos processos fisiológicos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTO NM, SHAO F, LAZAR CS, BROST RL, CHUA G, MATTOO S, MCMAHON SA, GHOSH P, HUGHES TR, BOONE C, DIXON JE. 2006. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. **Cell**.124: 133–145.
2. ALTO NM, WEFLIN AW, RARDIN MJ, YARAR D, LAZAR CS, TONIKIAN R, KOLLER A, TAYLOR SS, BOONE C, SIDHU SS, SCHMID SL, HECHT GA, DIXON JE. 2007. The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways. **J. Cell Biol.** 178:1265–1278.
3. ANTUNES LCM, FERREIRA LQ, FERREIRA EO, MIRANDA KR, AVELAR KES, DOMINGUES RMCP, DESOUZA FERREIRA MC: 2005. Bacteroides species produce *Vibrio harveyi* autoinducer 2-related molecules. **Anaerobe.** 11:295-301.
4. ARAUJO JM, TABARELLI GF, ARANDA KR, FABBRICOTTI SH, FAGUNDES-NETO U. 2007. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* (EPEC) are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.** 45:3396-3399.
5. BARUCH K, GUR-ARIE L, NADLER C, KOBY S, YERUSHALMI G, BEN-NERIAH Y, YOGEV O, SHAULIAN E, GUTTMAN C, ZARIVACH R, ROSENSHINE I. 2011. Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF- $\kappa$ B. **EMBO J.** 30:221-31.
6. BASSLER BL. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Curr. Opin. Microbiol.** 2: 582-587.
7. BASSLER BL. 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. **Cell.** 109:421-4.
8. BASSLER BL, LOSICK R. 2006. Bacterially speaking. **Cell.** 125:237-46.

9. BASSLER, B. L., WRIGHT, M. & SILVERMAN, M. R. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. **Mol. Microbiol.** 13, 273-286 (1994).
10. BASSLER, B. L., WRIGHT, M., SHOWALTER, R. E. & SILVERMAN, M. R. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. **Mol. Microbiol.** 9, 773-786.
11. BEARSON BL, BEARSON SM. 2008. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microb. Pathog.** 44:271-8.
12. BEIER D, GROSS R. 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. **Curr. Opin. Microbiol.** 9:143–152.
13. BHATT S, EDWARDS AN, NGUYEN HT, MERLIN D, ROMEO T, KALMAN D. 2009. The RNA binding protein CsrA is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 77:3552-3568.
14. BJARNSHOLT T, JENSEN PO, BURMOLLE M, HENTZER M, HAAGENSEN JA, HOUGEN HP, CALUM H, MADSEN KG, MOSER C, MOLIN S, HOIBY N, GIVSKOV M. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. **Microbiol.**151:373-383.
15. BOLSTAD BM, IRIZARRY RA, ASTRAND M, SPEED TP. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. **Bioinformatics.** 19:185–193.
16. BUERIS V, SIRCILI MP, TADDEI CR, DOS SANTOS MF, FRANZOLIN MR, MARTINEZ MB, FERREIRA SR, BARRETO ML, TRABULSI LR. 2007. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. I. Oswaldo Cruz.**, 102: 839-844.

17. BUSTAMANTE VHF, SANTANA J, CALVA E, PUENTE JL. 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. **Mol. Microbiol.** 39:664–678.
18. BUSTAMANTE VH, VILLALBA MI, GARCÍA-ANGULO VA, VÁZQUEZ A, MARTÍNEZ LC, JIMÉNEZ R, PUENTE JL. 2011. PerC and GrIA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 82: 398–415.
19. CÁMARA M, WILLIAMS P, HARDMAN A: Controlling infection by tuning in and turning down volume of bacterial small-talk. **Lancet Infect. Dis.** 2002, 2:667-676.
20. CAMPELLONE KG, LEONG JM. 2005. Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. **Mol. Microbiol.** 56:416-32.
21. CAMPELLONE KG, ROBBINS D, LEONG JM. 2004. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck independent actin assembly. **Dev. Cell** 7:217–228.
22. CHEN HD, FRANKEL G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiol. Rev.** 29:83-98.
23. CHEN XS, SCHAUDER N, POTIER A, VAN DORSSEALAER I, PELCZER F, BASSLER BL, HUGHSON FM. 2002. Structural identification of a bacterial quorum – sensing signal containing boron. **Nature.** 415: 545-549.
24. CHILCOTT GS, HUGHES KT. 2010. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64:694-708.
25. CHOUDHARY S, SCHMIDT-DANNERT C. 2010. Applications of quorum sensing in biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 86:1267-79.
26. CLARKE MB, HUGHES DT, ZHU C, BOEDEKER EC, SPERANDIO V. 2006. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 103:10420–10425.

27. CLARKE MB, SPERANDIO V. 2005. Transcriptional autoregulation by quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QqseBC) in Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). **Mol. Microbiol.** 58:441–455.
28. CLARKE MB, SPERANDIO V. 2005. Transcriptional regulation of *flhdc* by QseBC and Sigma (*flia*) in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 57:1734–1749.
29. CREPIN VF, PRASANNAN S, SHAW RK, WILSON RK, CREASEY E, ABE CM, KNUTTON S, FRANKEL G, MATTHEWS S. 2005. Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. **Mol. Microbiol.** 55:1658-70.
30. CROXEN MA, FINLAY BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.** 8:26-38.
31. DALEBROUX ZD, SVENSSON SL, GAYNOR EC, SWANSON MS. 2010. ppGpp conjures bacterial virulence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 74:171-99.
32. DARWIN AJ, STEWART V. 1996. The Nar modulon systems: nitrate and nitrite regulation of anaerobic gene expression, p. 343-359. In E. C. C. Lin and A. S. Lynch (ed.), Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. R. G. Landes Biomedical Publishers, Austin, Tex.
33. DATSENKO KA, WANNER BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* k-12 using PCR products. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97:6640–6645.
34. DEAN P, KENNY B. 2004. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. **Mol. Microbiol.** 54:665-75.
35. DEFRANCO AL, KOSHLAND DE. 1981. Molecular cloning of chemotaxis genes and overproduction of gene products in the bacterial sensing system. **J. Bacteriol.** 147:390-400.

36. DELRUE RM, DESCHAMPS C, LÉONARD S, NIJSKENS C, DANESE I, SCHAUS JM, BONNOT S, FEROOZ J, TIBOR A, DE BOLLE X, LETESSON JJ. 2005. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. **Cell Microbiol.** 7:1151-61.
37. DONNENBERG MS, YU J, KAPER JB. 1993. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of Enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **J. Bacteriol.** 175: 4670-4680.
38. EBERHARD A, BURLINGAME AL, EBERHARD C, KENYON GL, NEALSON KH, OPPENHEIMER NJ. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry.** 20:2444-9
39. ELLIOTT SJ, SPERANDIO V, GIRÓN JA, SHIN S, MELLIES JL, WAINWRIGHT L, HUTCHESON SW, MCDANIEL TK, KAPER JB. 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 68:6115-6126.
40. ENGBRECHT J, NEALSON K, SILVERMAN M. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. **Cell.** 32:773-81.
41. ENGBRECHT J, SILVERMAN M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 81:4154-8.
42. FAGUNDES-NETO U, SCHMITZ LG, SCALETSKY I. 1996. Acute diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli*: epidemiological and clinical features in Brasilia, Brazil. **Int. J. Infect. Dis.**, 1: 65-69.
43. FEDERLE MJ, BASSLER BL. 2003. Interspecies communication in bacteria. **J. Clin. Invest.** 112:1291-9.
44. FENG P, LAMPEL KA, KARCH H, WHITTAM TS. 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Infect. Dis.** 177:1750–1753.

45. FLOCKHART AF, TREE JJ, XU X, KARPIYEVICH M, MCATEER SP, ROSENBLUM R, SHAW DJ, LOW CJ, BEST A, GANNON V, LAING C, MURPHY KC, LEONG JM, SCHNEIDERS T, LA RAGIONE R, GALLY DL. 2012. Identification of a novel prophage regulator in *Escherichia coli* controlling the expression of type III secretion. **Mol. Microbiol.** 83:208-23.
46. FRANKEL G, PHILLIPS AD, ROSENSHINE I, DOUGAN G, KAPER JB, KNUTTON S. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.** 30:911–921.
47. FRANZOLIN MR, ALVES RC, KELLER R, GOMES TAT, BEUTIN L, BARRETO ML, MILROY C, STRINA A, RIBEIRO H, TRABULSI LR. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. I. Oswaldo Cruz**, 100: 359- 363.
48. FRIED L, BEHR S, JUNG K. 2013. Identification of a Target Gene and Activating Stimulus for the YpdA/YpdB Histidine Kinase/Response Regulator System in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 195:807-15.
49. FRIEDBERG D, UMANSKI T, FANG Y, ROSENSHINE I. 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 34:941–952.
50. FUQUA C, GREENBERG EP. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 3:685-695.
51. FUQUA C, PARSEK MR, GREENBERG EP. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acylhomoserine lactone quorum sensing. **Annu. Rev. Genetics.** 35:439–468.
52. FUQUA WC, WINANS SC, GREENBERG EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **J. Bacteriol.** 176:269–275.

53. FURNESS JB. Types of neurons in the enteric nervous system. 2000. **J. Auton. Nerv. Syst.** 81:87–96.
54. GARMENDIA J, FRANKEL G, CREPIN VF. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.** 73:2573-85.
55. GARMENDIA J, PHILLIPS AD, CARLIER MF, CHONG Y, SCHÜLLER S, MARCHES O, DAHAN S, OSWALD E, SHAW RK, KNUTTON S, FRANKEL G. 2004. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actincytoskeleton. **Cell Microbiol.** 6:1167–1183.
56. GAUTHIER A, FINLAY BB. 2003. Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 185:6747-55.
57. GILMAN AG. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Annu. Rev. Biochem.** 56:615– 649.
58. GOLDBERG MD, JOHNSON M, HINTON JC, WILLIAMS PH. 2001. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 41:549-59.
59. GOMES TAT, RASSI V, MACDONALD KL, RAMOS SR, TRABULSI LR, VIEIRA MA. 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.** 164: 331-337.
60. GÓMEZ-DUARTE OG, KAPER JB. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 63: 1767-1776.
61. GOTTESMAN S. 2004. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. **Annu. Rev. Microbiol.** 58:303-28.



62. GRANT AJ, FARRIS M, ALEFOUNDER P, WILLIAMS PH, WOODWARD MJ, O'CONNOR CD. 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Mol. Microbiol.** 48:507–521.
63. GREENBERG EP. 2003. Bacterial communication and group behavior. **J. Clin. Invest.** 112:1288-1290.
64. GRUENHEID S, SEKIROV I, THOMAS NA, DENG W, O'DONNELL P, GOODE D, LI Y, FREY EA, BROWN NF, METALNIKOV P, PAWSON T, ASHMAN K, FINLAY BB. 2004. Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.** 51: 1233–1249.
65. GUTTMAN JA, LI Y, WICKHAM ME, DENG W, VOGL AW, FINLAY BB. 2006. Attaching and effacing pathogen induced tight junction disruption *in vivo*. **Cell Microbiol.** 8: 634–645.
66. HABDAS BJ, SMART J, KAPER JB, SPERANDIO V. 2010. The LysR-type transcriptional regulator QseD alters type three secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and motility in K-12 *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 192:3699-712.
67. HADJIFRANGISKOU M, KOSTAKIOTI M, CHEN SL, HENDERSON JP, GREENE SE, HULTGREN SJ. 2011. A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 80:1516-29.
68. HANSEN AM, KAPER JB. 2009. Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 73:446-65.
69. HENKE JM, BASSLER BL. 2004. Bacterial social engagements. **Trends Cell Biol.** 14:648-56.
70. HENTZER M, WU H, ANDERSEN JB, RIEDEL K, RASMUSSEN TB, BAGGE N, KUMAR N, SCHEMBRI MA, SONG Z, KRISTOFFERSEN P, MANEFIELD M, COSTERTON JW, MOLIN S, EBERL L, STEINBERG P, KJELLEBERG S, HOIBY N, GIVSKOV M. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **EMBO J.** 22:3803-3815.
71. HERNANDES RT, ELIAS WP, VIEIRA MA, GOMES TA. 2009. An overview of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 2009. 297:137-149.

72. HUANG LH, SYU WJ. 2008. GrlA of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 activates LEE1 by binding to the promoter region. **J. Microbiol. Immunol. Infect.** 41:9-16.
73. HUECK CJ. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62:379-4.
74. HUGHES DT, CLARKE MB, YAMAMOTO K, RASKO DA, SPERANDIO V. 2009. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). **Plos Pathog.** 5:e1000553.
75. HUGHES DT, SPERANDIO V. 2008. Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and host. **Nat. Rev. Microbiol.** 6:111–120.
76. IRIZARRY RA, HOBBS B, COLLIN F, BEAZER-BARCLAY YD, ANTONELLIS KJ, SCHERF U, SPEED TP. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics.** 4:249-264.
77. IUCHI S, LIN EC. 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. **Mol. Microbiol.** 9:9-15.
78. IYODA S, WATANABE H. 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 187:4086-94.
79. JARVIS KG, GIRÓN JA, JERSE AE, MCDANIEL TK, DONNENBERG MS, KAPER JB. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92:7996–8000.
80. JENSEN PO, BJARNSHOLT T, PHIPPS R, RASMUSSEN TB, CALUM H, CHRISTOFFERSEN L, MOSER C, WILLIAMS P, PRESSLER T, GIVSKOV M, HOIBY N. 2007.

Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol.** 153:1329-1338.

81. JOHNSON JR. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.** 4:80-128.

82. JONES S, YU B, BAINTON NJ, BIRDSALL M, BYCROFT BW, CHHABRA SR, COX AJ, GOLBY P, REEVES PJ, STEPHENS S, *et al.* 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. **EMBO J.** 12:2477-82.

83. KAPER JB. 1996. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.** 27:130-133.

84. KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** 2:123–140.

85. KAPLAN HB, GREENBERG EP. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. **J. Bacteriol.** 163:1210-4.

86. KAPER JB, SPERANDIO V. 2005. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. **Infect. Immun.** 73:3197-209.

87. KELLER L, SURETTE MG. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nat. Rev. Microbiol.** 4:249-258.

88. KENDALL MM, GRUBER CC, RASKO DA, HUGHES DT, SPERANDIO V. 2011. Hfq virulence regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24. **J. Bacteriol.** 93:6843-51.

89. KENDALL MM, RASKO DA, SPERANDIO V. 2007. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 75:4875–4884.

90. KENNY B, ABE A, STEIN M, FINLAY BB. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. **Infect. Immun.** 65:2606–2612.
91. KENNY B, LAI LC, FINLAY BB, DONNENBERG, MS. 1997. EspA, a protein secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. **Mol. Microbiol.** 20: 313-323.
92. KIM J, THANABALASURIAR A, CHAWORTH-MUSTERS T, FROMME JC, FREY EA, LARIO PI, METALNIKOV P, RIZG K, THOMAS NA, LEE SF, HARTLAND EL, HARDWIDGE PR, PAWSON T, STRYNADKA NC, FINLAY BB, SCHEKMAN R, GRUENHEID S. 2007. The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. **Cell Host Microbe.** 2:160 –171.
93. KNUTTON S, BALDWIN T, WILLIAMS PH, MCNEISH AS. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 57:1290 –1298.
94. KNUTTON S, ROSENSHINE I, PALLEN MJ, NISAN I, NEVES BC, BAIN C, WOLFF C, DOUGAN G, FRANKEL G. 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.** 17: 2166–2176.
95. KOSTAKIOTI M, HADJIFRANGISKOU M, PINKNER JS, HULTGREN SJ. 2009. QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 73:1020-31.
96. KRESSE AU, ROHDE M, GUZMAN CA. 1999. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. **Infect. Immun.** 67:4834–4842.
97. KUTSUKAKE K, OHYA Y, IINO T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** 172:741-7.

98. LAABERKI MH, JANABI N, OSWALD E, REPOILA F. 2006. Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. **Int. J. Med. Microbiol.** 296: 197–210.
99. LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 15;227:680-5.
100. LATIFI A, WINSON MK, FOGLINO M, BYCROFT BW, STEWART GS, LAZDUNSKI A, WILLIAMS P. 1995. Multiple homologs of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Mol. Microbiol.** 17: 333 – 343.
101. LEE CA. 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? **Trends Microbiol.** 5:148-56.
102. LEVI-MONTALCINI R, ANGELETTI PU.1966. Second symposium on catecholamines. Modification of sympathetic function. **Pharmacol. Rev.**18:619–628.
103. LOMMEL S, BENESCH S, ROHDE M, WEHLAND J, ROTTNER K. 2004. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. **Cell Microbiol.** 6:243-54.
104. MARTINEZ JJ, MULVEY MA, SCHILLING JD, PINKNER JS, HULTGREN SJ. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J.** 19:2803-12.
105. MASLENNIKOV I, KLAMMT C, HWANG E, KEFALA G, OKAMURA M, ESQUIVIES L, MÖRS K, GLAUBITZ C, KWIATKOWSKI W, JEON YH, CHOE S. 2010. Membrane domain structures of three classes of histidine kinase receptors by cell-free expression and rapid NMR analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 107:10902-7.
106. MASUDA N, CHURCH GM. 2002. *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. **J. Bacteriol.**184:6225-6234.

107. MASUDA N, CHURCH GM. 2003. *Regulatory network of acid resistance genes in Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 48:699-712.
108. MCDANIEL TK, JARVIS KG, DONNENBERG MS, KAPER JB. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92:1664–1668.
109. MCDANIEL TK, KAPER JB. 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Mol. Microbiol.** 23:399-407.
110. MELLIES JL, BARRON AM, CARMONA AM. 2007. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. **Infect. Immun.** 75:4199-210.
111. MELLIES JL, ELLIOTT SJ, SPERANDIO V, DONNENBERG MS, KAPER JB. 1999. The Per regulon of Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (*ler*). **Mol. Microbiol.** 33:296-306.
112. MILLER MB, BASSLER BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** 55:165-199.
113. MILLER ST, XAVIER KB, CAMPAGNA SR, TAGA ME, SEMMELHACK MF, BASSLER BL, HUGHSON FM. 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. **Mol. Cell.** 15:677-87.
114. MJZUNO T, MIZUSHIMA S. 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. **Mol. Microbiol.** 4: 1077-1082.
115. MOKRIEVICH AN, KONDAKOVA AN, VALADE E, PLATONOV ME, VAKHRAMEEVA GM, SHAIKHUTDINOVA RZ, MIRONOVA RI, BLAHA D, BAKHTEEVA IV, TITAREVA GM, KRAVCHENKO TB, KOMBAROVA TI, VIDAL D, PAVLOV VM, LINDNER B, DYATLOV IA, KNIREL YA. 2010. Biological properties and structure of the lipopolysaccharide of a vaccine

strain of *Francisella tularensis* generated by inactivation of a quorum sensing system gene *qseC*. **Biochemistry (Mosc)**. 75:443-51.

116. MOL O, OUDEGA B. 1996. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Rev.**19:25-52.

117. MOON HW, WHIPP SC, ARGENZIO RA, LEVINE MM, GIANNELLA RA. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human Enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.** 41: 1340–1351.

118. MOREIRA CG, CARNEIRO SM, NATARO JP, TRABULSI LR, ELIAS WP. 2003. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 226: 79-85.

119. MOREIRA CG, WEINSHENKER D, SPERANDIO V. 2010. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence *in vitro* and *in vivo*. **Infect. Immun.** 78:914-26.

120. MORENO AC, FILHO AF, GOMES TAT, RAMOS ST, MONTEMOR, LP, TAVARES VC, FILHO LD, IRINO K, MARTINEZ MB. 2008. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Micr. Infec. Dis.** 36: 1319-1351.

121. NATARO JP, KAPER JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11: 142-201.

122. NEALSON KH, PLATT T, HASTINGS JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **J. Bacteriol.** 104: 313-322.

123. NJOROGE J, SPERANDIO V. 2012. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE. **Infect. Immun.** 80:688-703.

124. NJOROGE JW, NGUYEN Y, CURTIS MM, MOREIRA CG, SPERANDIO V. 2012. Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **MBio.** 16:3-5.

125. NOUGAYRÈDE J, DONNENBERG MS. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. **Cell Microbiol.** 6:1097–1111.
126. NOUGAYREDE JP, FERNANDES PJ, DONNENBERG MM. 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell. Microbiol.** 5:359-372.
127. NOVAK EA, SHAO H, DAEP CA, DEMUTH DR. 2010. Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.** 78:2919-26.
128. NOVICK RP, PROJAN S, KORNBLUM J, ROSS H, KREISWIRTH B, MOGHAZEH S. 1995. The *agr* P-2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Gen. Genet.** 248:446-458.
129. NOVICK RP, GEISINGER E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. **Annu. Rev. Genet.** 42:541-64.
130. OCHOA TJ, BARLETTA C, CONTRERAS C, MERCADO E. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 102:852-856.
131. OCHOA TJ, CONTRERAS CA. 2011. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 24:478-83.
132. PARKER CT, SPERANDIO V. 2009. Cell-to-cell signaling during pathogenesis. **Cell. Microb.** 11: 363-369.
133. PARKINSON JS. 1978. Complementation analysis and deletion mapping of *Escherichia coli* mutants defective in chemotaxis. **J.Bacteriol.** 135:45-5.
134. PARSEK MR, GREENBERG EP: 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends Microbiol.** 13:27-33.



135. PEARSON JP, PASSADOR L, IGLEWSKI BH, GREENBERG EP. 1995. A 2ndN-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92, 1490 – 1494.
136. PENG H-L, NOVICK RP, KREISWIRTH B, KORNBLUM J, SCHLIEVERT P. 1988. Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** 179:4365-4372.
137. PRATT LA, KOLTER R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol. Microbiol.**, 30:285-93.
138. PURVES D, AUGUSTINE GJ, FITZPATRICK D. 2001. *Neuroscience*. Sunderland, MA: **Sinauer Associates**.
139. QUITARD S, DEAN P, MARESCA M, KENNY B. 2006. The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. **Cell Microbiol.** 8: 972–981.
140. RASKO DA, MOREIRA CG, LI DE R, READING NC, RITCHIE JM, WALDOR MK, WILLIAMS N, TAUSSIG R, WEI S, ROTH M, HUGHES DT, HUNTLEY JF, FINA MW, FALCK MW, SPERANDIO V. 2008. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science.** 321:1078 –1080.
141. READING NC, RASKO DA, TORRES AG, SPERANDIO V. 2009. The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 106: 5889–5894.
142. READING NC, TORRES AG, KENDALL MM, HUGHES DT, YAMAMOTO K, SPERANDIO V. 2007. A novel two-component signaling system that activates transcription of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. **J. Bacteriol.** 189:2468-2476.
143. ROBINS-BROWNE RM. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Rev. Infect. Dis.** 9: 28–53.

144. ROUX A, PAYNE SM, GILMORE MS. 2009. Microbial telesensing: probing the environment for friends, foes, and food. **Cell Host Microbe**. 6:115-24.
145. RUSSELL RM, SHARP FC, RASKO DA, SPERANDIO V. 2005. QseA and GrIR/GrIA regulation of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 243:189-96.
146. SAMBROOK J, RUSSELL DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
147. SCALETSKY ICA, ARANDA KR, SOUZA TB, SILVA NP, MORAIS MB. 2009. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** 47: 3756-3759.
148. SCALETSKY ICA, PEDROSO MZ, OLIVA CAG, CARVALHO RLB, MORAIS MB, FAGUNDES-NETO U. 1999. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.** 67: 3410-3415.
149. SCALETSKY ICA, SILVA MLM, TRABULSI LR. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.** 45:534-536.
150. SCHAEFER AL, VAL DL, HANZELKA BL, CRONAN JE JR, GREENBERG EP. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 93:9505-9.
151. SCHAUDER, S., SHOKAT, K., SURETTE, M. G; BASSLER, B. L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum sensing signal molecule. **Mol. Microbiol.** 41, 463-476 (2001).
152. SHAKHNOVICH EA, DAVIS BM, WALDOR MK. 2009. Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. **Mol. Microbiol.** 74: 347–363.
153. SHARMA VK, ZUERNER RL. 2004. Role of hha and ler in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Bacteriol.** 186:7290-301.

154. SHARP FC, SPERANDIO V. 2007. QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 75:2432-40.
155. SIRCILI MP, WALTERS M, TRABULSI LR, SPERANDIO V. 2004. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infect. Immun.** 72:2329–2337.
156. SPERANDIO V, LI CC, KAPER JB. 2002b. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in Enterohemorrhagic *E. coli*. **Infect. Immun.** 70:3085-3093.
157. SPERANDIO V, MELLIES JL, DELAHAY RM, FRANKEL G, CRAWFORD JA, NGUYEN W, KAPER JB. 2000. Activation of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by *ler*. **Mol. Microbiol.** 38:781-793.
158. SPERANDIO V, MELLIES JL, NGUYEN W, SHIN S, KAPER JB. 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 96:15196-201.
159. SPERANDIO V, TORRES AG, GIRÓN JA, KAPER JB. 2001. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Bacteriol.** 183:5187-97.
160. SPERANDIO V, TORRES AG, JARVIS B, NATARO JP, KAPER JB. 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 100:8951– 8956.
161. SPERANDIO V, TORRES AG, KAPER JB. 2002. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Mol. Microbiol.** 43:809-821.
162. STEWART V, RABIN RS. 1995. Dual sensors and dual response regulators interact to control nitrate- and nitrite-responsive gene expression in *Escherichia coli*, p. 233-252. *In* J. A.

Hoch and T. J. Silhavy (ed.), Two-component signal transduction. **ASM Press**, Washington, D.C.

163. STOCK AM, ROBINSON VL, GOUDREAU PN. 2000. Two-component signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.** 69: 183–215.

164. THANABALASURIAR A, KOUTSOURIS A, WEFLER A, MIMEE M, HECHT G, GRUENHEID S. 2010. The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.** 12:31-41.

165. TOLEDO MR, ALVARIZA MDO C, MURAHOVSKI J, RAMOS SR, TRABULSI LR. 1983. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infect. Immun.** 39:586-9.

166. TOMSON FL, VISWANATHAN VK, KANACK KJ, KANTETI RP, STRAUB KV, MENET M, KAPER JB, HECHT G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. **Mol. Microbiol.** 56:447-64.

167. TORRES AG, ARENAS-HERNANDEZ M, MARTINEZ-LAGUNA Y. 2010. Overview of *Escherichia coli*, p. 1-7. In A.G. Torres (ed) *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*, **Bentham Science Publishers**.

168. TRABULSI RL, KELLER R, GOMES TAT. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.** 8: 508-513.

169. TRABULSI LR, MANISSADJAN A, PENNA HA, LIBERATORE R, DUAILIBE L., de CAMARGO, PEIXOTO ES. 1961. Infantile diarrhea caused by enteropathogenic colibacilli. Preliminary studies on the occurrence of certain groups and serological types in São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 3: 267-70.

170. TU X, NISAN I, YONA C, HANSKI E, ROSENSHINE I. 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 47:595-606.

171. UNAL CM, SINGH B, FLEURY C, SINGH K, CHÁVEZ DE PAZ L, SVENSÅTER G, RIESBECK K. 2012. QseC controls biofilm formation of non-typeable *Haemophilus influenzae* in addition to an AI-2-dependent mechanism. **Int. J. Med. Microbiol.** 302:261-9.
172. VALLANCE BA, FINLAY BB. 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 97:8799-806.
173. VENDEVILLE A, WINZER K, HEURLIER K, TANG CM, HARDIE KR. 2005. Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria **Nat. Rev. Microbiol.** 3:383-96.
174. VLISIDOU I, LYTE M, VAN DIEMEN PM, HAWES P, MONAGHAN P, WALLIS TS, STEVENS MP. 2004. The neuroendocrine stress hormone norepinephrine augments *Escherichia coli* O157:H7-induced enteritis and adherence in a bovine ligated ileal loop model of infection. **Infect. Immun.** 72:5446–5451.
175. WALTERS M, SIRCILI MP, SPERANDIO V. 2006. AI-3 synthesis is not dependent on *luxS* in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 188:5668-81.
176. WALTERS M, SPERANDIO V. 2006. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 74:5445–5455.
177. WANG X, WANG Q, YANG M, XIAO J, LIU Q, WU H, ZHANG Y. 2011. QseBC controls flagellar motility, fimbrial hemagglutination and intracellular virulence in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. **Fish Shellfish Immunol.** 30:944-53.
178. WHITTAM TS, WOLFE ML, WACHSMUTH IK, ORSKOV F, ORSKOV I, WILSON RA. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. **Infect. Immun.** 61: 1619–1629.
179. WILLIAMS P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. **Microbiol.** 53:3923-38.

180. WILLIAMS P, CÁMARA M. 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Curr .Opin. Microbiol.** 12:182-91.
181. WINZER K, HARDIE KR, BURGESS N, DOHERTY N, KIRKE D, HOLDEN MT, LINFORTH R, CORNELL KA, TAYLOR AJ, HILL PJ, WILLIAMS P. 2002. LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. **Microbiol.** 148:909-22.
182. WOLFE AJ. 2010. Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. **Curr. Opin. Microbiol.** 13:204-9.
183. WONG AR, PEARSON JS, BRIGHT MD, MUNERA D, ROBINSON KS, LEE SF, FRANKEL G, HARTLAND EL. 2011. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Mol. Microbiol.** 80:1420-38.
184. XAVIER KB, BASSLER BL. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. **Curr. Opin. Microbiol.** 6:191-7.
185. XAVIER KB, BASSLER BL. 2005. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. **Nature.** 437:750-3.
186. ZHOU Z, LI X, LIU B, BEUTIN L, XU J, REN Y, FENG L, LAN R, REEVES PR, WANG L. 2010. Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from Its O55:H7 Precursor. **PLoS ONE.** 5(1): e8700. doi:10.1371/ journal.pone.0008700.



## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Papel do sistema AI-3/Epinefrina/Norepinefrina na regulação da expressão genica de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica"

( ) nao se enquadra no§ 3º do Artigo 1º da Informa9ao CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

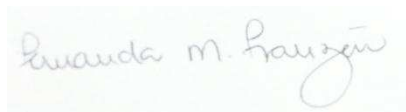
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( x ) CIBio- Comissão Interna de Biossegurança , projeto No 1.341/2008, Instituição: Instituto Butantan.

( ) CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição:

( ) CEP- Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. — — — — — . Instituição:

*\* Caso a Comissão seja extema ao 18/UN/CAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, devera ser anexado tambem um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: (Fernanda Maria Franzin)



Orientador: (Marcelo Palma Sircili)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido ( ) Indeferido



Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI  
Presidente da ConusInterna de Biossegur1n a Instituto de  
Biologia UNICAWP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura



## **COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA**

### **EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 1.341/2008**

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 112ª Reunião Ordinária, ocorrida em 17 de abril de 2008, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo nº: 01200.004893/1997-93 Requerente: Instituto Butantan CNPJ: 61.821.344/0001-56 Endereço Av. Vital Brasil, 1500 São Paulo, SP CEP 05503-900. Telefone: (11) 3726-7222. Fax: (11)3726-1505. Assunto: Solicitação de parecer para pesquisa em regime de contenção com organismo geneticamente modificado da classe II de risco biológico. Extrato Prévio: 1260/2008 Publicado no D.O.U No. 37, 25 de fevereiro de 2008.

Decisão: DEFERIDO

Resumo: A CTNBio, após apreciação do processo de solicitação de parecer técnico para projeto de pesquisa envolvendo organismos geneticamente modificados, conclui pelo deferimento nos termos deste parecer técnico. O Dr. Paulo Lee Ho, presidente da Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Butantan, solicita à CTNBio parecer técnico referente à execução de projeto de pesquisa em regime de contenção nas instalações do Laboratório Bacteriologia, credenciado no Certificado de Qualidade em Biossegurança da instituição (CQB 39/98). O projeto envolve atividades com a bactéria *Escherichia coli* geneticamente modificada para expressar o promotor do gene LEE1 da *Escherichia coli* enteropatogênica, este organismo geneticamente modificado foi classificado como sendo da classe de risco II. O projeto a ser executado denomina-se: "Quorum sensing em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC): Típica e atípica", sob a responsabilidade do Dr. Marcelo Palma Sircili. O responsável pela unidade operativa declara que as instalações contam com salas e equipamentos úteis em nível de biossegurança adequado às atividades propostas. O processo descreve as condições de biossegurança das áreas a serem cadastradas, as medidas de biossegurança propostas para o laboratório e a qualificação da equipe de pesquisadores envolvida no projeto, bem como a declaração formal do responsável assegurando que as condições descritas no processo são apropriadas à realização dos projetos propostos. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal. A CTNBio esclarece que este extrato não exige a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento. A íntegra deste Parecer Técnico consta do processo arquivado na CTNBio. Informações complementares ou solicitações de maiores informações sobre o processo acima listado deverão ser encaminhadas por escrito à Secretaria Executiva da CTNBio.

WALTER COLLI

## DECLARAÇÃO DE VÍNCULO DO TRABALHO AO PARECER TÉCNICO CTNBio

Declaro para os devidos fins que o trabalho de Doutorado, intitulado “Papel do sistema AI-3/epinefrina/norepinefrina na regulação da expressão gênica de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica” foi realizado de acordo com os requisitos da CTNBio para pesquisa em regime de contenção com organismo geneticamente modificado da classe II de risco biológico. Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, para o qual a CTNBio emitiu o parecer técnico Nº 1.341/2008 no qual conclui que, no âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, esse laboratório atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.