

Identificação dos genes da *Escherichia coli* patogênica aviária envolvidos na invasão de fibroblastos aviários por mutagenese marcada com assinatura (STM - *Signature Tagged Mutagenesis*)

João Pedro Stepan Wagner, Fabiana Horn (orientadora) (UFRGS)

INTRODUÇÃO

A cepa MT78 é uma ExPEC capaz de invadir células não-fagocitárias e pode possuir genes de virulência ainda não descritos. À procura de genes que possam responder por sua capacidade invasiva, foi criada por STM (signature-tagged mutagenesis) uma biblioteca de 1710 mutantes aleatórios, que foram triados a procura de atenuação da capacidade de invasão e adesão a fibroblastos aviários CEC-32. Entre os mutantes atenuados, um dos mutantes perdeu o gene para a enzima periplasmática trealase, e o outro perdeu o gene para a enzima fosfo- β -glicosidase B (*bglB*).

A capacidade de adesão do mutante MT78 Δ *bgl* foi reduzida a 45%, e a de invasão, a 32%, quando comparadas à cepa selvagem (Fig.1). A cepa selvagem e o mutante foram testados *in vivo* em modelo murino de infecção urinária; 48 h após a inserção da bactéria via uretra, o mutante colonizou a bexiga 10 x menos do que a cepa selvagem. Para confirmar que a atenuação na virulência se deve à ausência do operon *bgl*, é necessária a criação do mutante complementado.

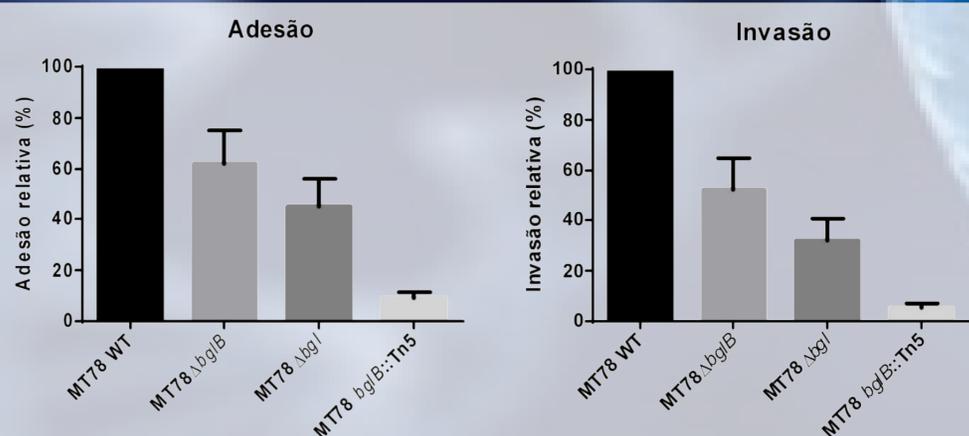


Figura 1. Adesão e invasão dos mutantes MT78 Δ *bglB*, MT78 Δ *bgl* e MT78 *bglB*::Tn5 a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32. Média \pm erro padrão de pelo menos três replicatas biológicas.

OBJETIVOS

Complementar o mutante MT78 Δ *bgl* e caracterizá-lo através de testes de invasão e adesão a células eucarióticas e quanto à expressão e produção de fatores de virulência.

COMPLEMENTAÇÃO

O operon *bgl* foi amplificado a partir do ADN da cepa selvagem WT MT78; porém, por ser um fragmento muito extenso (8,3 kb), foi primeiramente amplificado em 4 fragmentos de aproximadamente 2 kb com extremidades complementares que então foram fusionados em um único fragmento de 8,3 kb, que possui sítios de restrição para *SacI* e *XhoI* nas suas extremidades.

O operon *bgl*, assim como o plasmídeo PgpTn7-cm, foram digeridos pelas enzimas de restrição *SacI* e *XhoI* e então ligados com a ligase T4. O plasmídeo PgpTn7*bgl*-cm contendo o operon *bgl* será inserido por choque térmico em uma DH5 α pir quimiocompetente.

As colônias recombinantes serão selecionadas, o plasmídeo PgpTn7*bgl*-cm será extraído e a cepa MGN-617 será transformada com ele; esta cepa será então conjugada com a cepa mutante MT78 Δ *bgl* contendo o plasmídeo pSTNSK, que codifica uma transposase, o que resultará na inserção do *bgl* no cromossomo do mutante (Fig.2). O mutante complementado será então selecionado em um meio com ausência de DAP (Ácido Diaminopimélico) e a 42°C, o que impedirá respectivamente o crescimento da cepa MGN-617 e a replicação do plasmídeo pSTNSK, e na presença dos antibióticos canamicina, ao qual o mutante é resistente, e cloranfenicol, cujo gene de resistência está presente no fragmento inserido com o *bgl*. O mutante complementado será então submetido a ensaios de adesão e invasão e testes de aglutinação em levedura, para confirmar a recuperação do fenótipo da WT MT78.

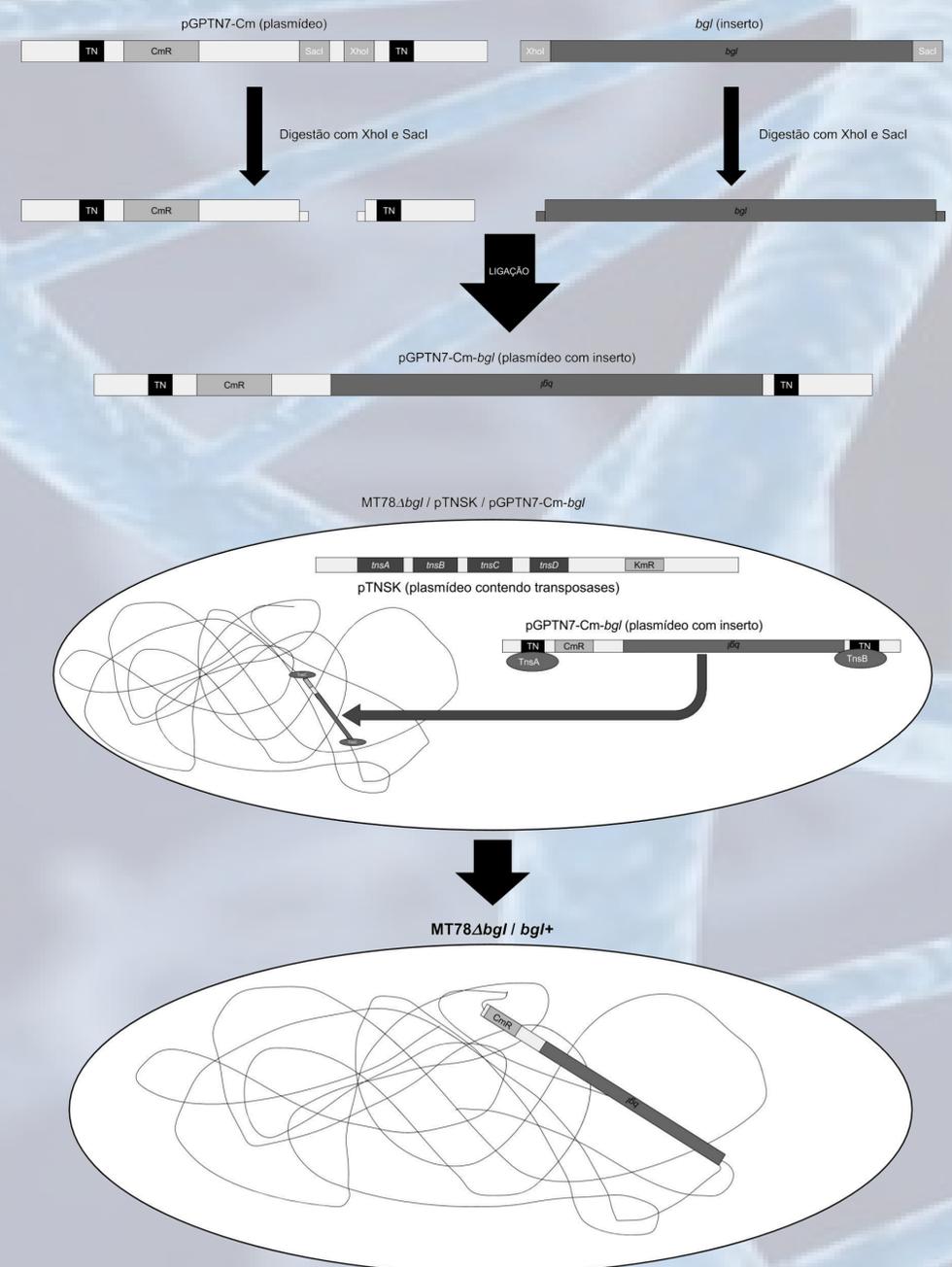


Figura 2. Esquema simplificado da complementação do mutante MT78 Δ *bgl*