

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

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

INTRODUÇÃO

A cepa MT78 é uma *Escherichia coli* extraintestinal de origem aviária capaz de invadir células não-fagocitárias e pode possuir genes que influenciam em sua virulência que ainda não foram descritos. À procura de genes que podem influenciar na virulência dessa cepa foi criada uma biblioteca de mutantes aleatórios dela, que foram triados a procura de atenuação da capacidade de invasão e adesão a células não-fagocitárias. Entre os mutantes atenuados, um perdeu o gene para a enzima fosfo- β -glicosidase B (*bglB*).

Um mutante nulo para o operon *bgl* (MT78 Δ *bgl*) apresentou, em ensaios de adesão e de invasão a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32, apenas 45% da capacidade de adesão e 32% da capacidade de invasão da cepa selvagem.

Entretanto ainda é necessária a complementação do mutante nulo para confirmação da influência do operon *bgl* na virulência e o estudo de seus possíveis mecanismos.

OBJETIVOS

Completar 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, além de elucidar os mecanismos pelos quais o operon *bgl* pode afetar a virulência da cepa.

COMPLEMENTAÇÃO PARCIAL

O mutante MT78 Δ *bgl* será complementado, por meio da técnica de Datsenko (PNAS; vol 97. 6640), apenas com o gene *bglG* do operon *bgl*, pois se observou que esse gene influenciou a regulação de outros genes, podendo portanto ser a chave para explicar a redução da virulência do mutante MT78 Δ *bgl*. O mutante também será complementado com os genes *bglG* e *bglF*, pois a enzima codificada pelo gene *bglF* interage com a proteína BglG ativando-a ou desativando-a através de desfosforilação e fosforilação mediada pela presença de β -glicosídeos (Fig. 1).

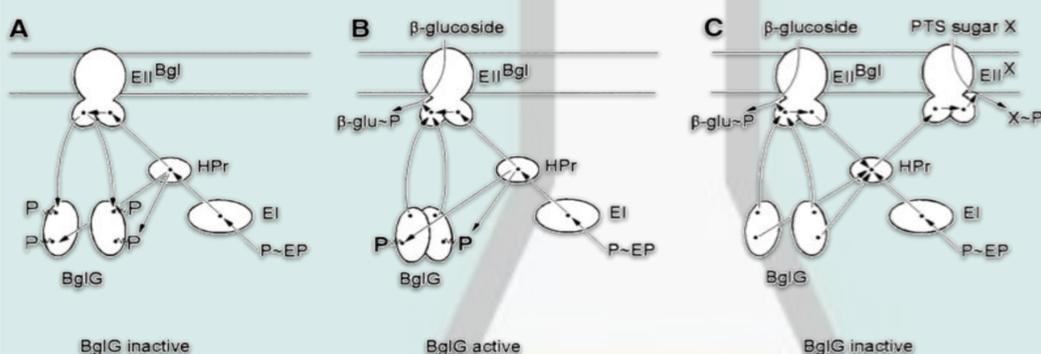


Figura 1. Esquema da fosforilação da BglG pela BglF (EII Bgl), adaptado (Gorke 1999; 10.1093/emboj/18.12.3370)

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 em meio seletivo que também impedirá crescimento da cepa MGN-617 e a replicação do plasmídeo pSTNSK. 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 MT78.

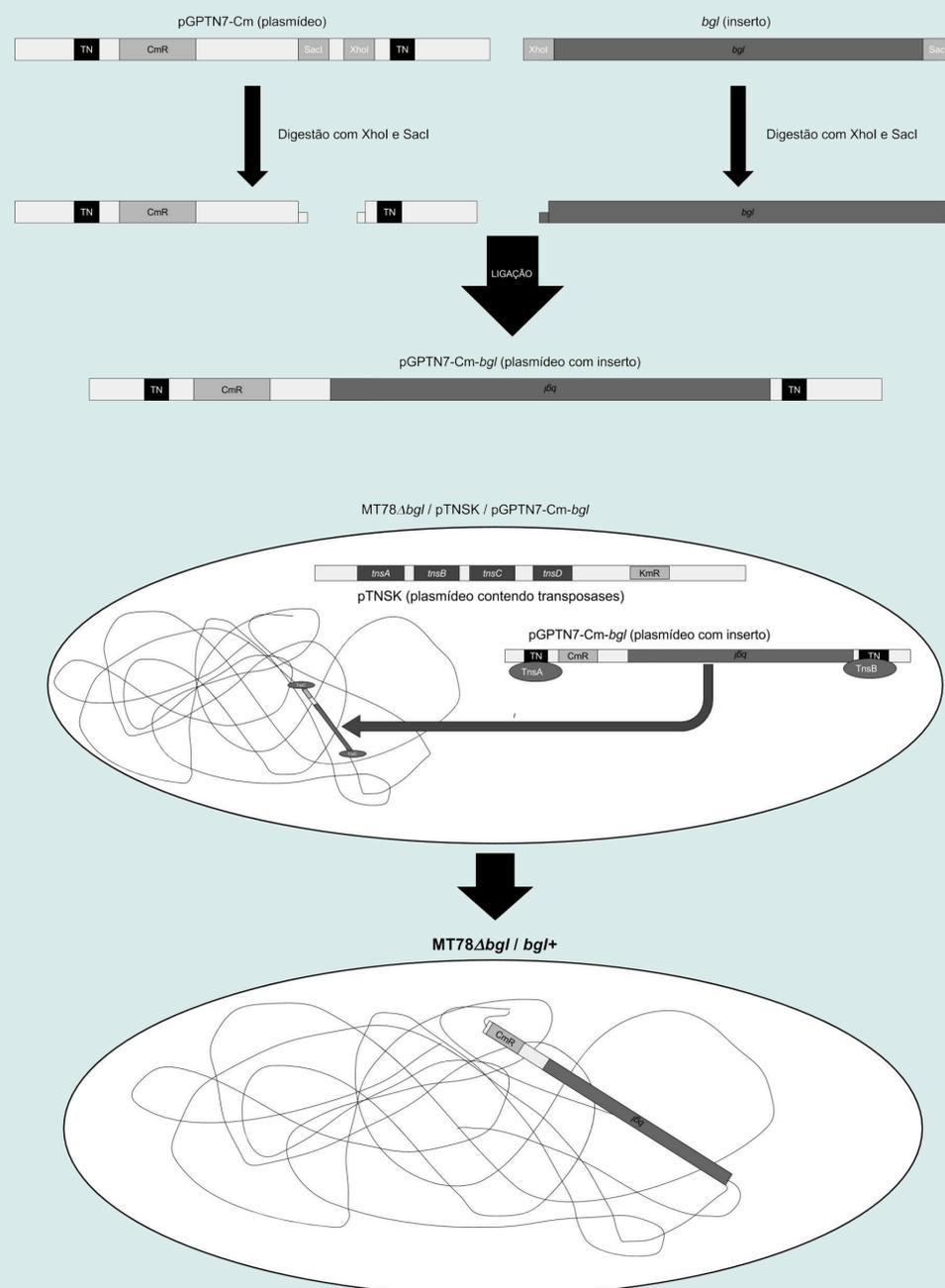


Figura 2. Esquema simplificado da complementação do mutante MT78 Δ *bgl*