



Evento	Salão UFRGS 2018: SIC - XXX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2018
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Identificação dos genes da Escherichia coli patogênica aviária envolvidos na invasão de fibroblastos aviários por mutagênese marcada com assinatura (STM - Signature Tagged Mutagenesis)
Autor	JOÃO PEDRO STEPAN WAGNER
Orientador	FABIANA HORN

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)

A cepa MT78 é uma *Escherichia coli* patogênica extraintestinal de origem aviária capaz de invadir células não-fagocitárias, e pode possuir genes que influenciam em sua virulência ainda não descritos. À procura de genes que possam influenciar a virulência dessa cepa, foi criada por meio da técnica de STM (*signature-tagged mutagenesis*) uma biblioteca de 1710 mutantes aleatórios da MT78, que foram triados para adesão e invasão de fibroblastos aviários. Um dos mutantes atenuados apresentou inserção do transposon no gene que codifica a enzima fosfo- β -glicosidase B (*bglB*). Para caracterizar a função do operon *bgl* na capacidade invasiva da MT78, foi gerado o mutante MT78 Δ *bgl* por meio da técnica de “lambda red” de mutação apolar. Esse mutante apresentou uma adesão de 45% comparada à cepa selvagem, enquanto a capacidade de invasão teve uma redução ainda mais acentuada, 32% da capacidade da cepa selvagem. Quando testado em modelo murino de infecção urinária, o mutante MT78 Δ *bgl* apresentou uma redução de 10x na colonização da bexiga murina em comparação à cepa selvagem.

Meu trabalho consiste em complementar e caracterizar o mutante MT78 Δ *bgl*, com o objetivo de elucidar o mecanismo pelo qual um operon de metabolismo de β -glicosídeos influencia na capacidade de invasão e adesão dessa cepa. Para a complementação do operon *bgl*, o mesmo foi amplificado em 4 fragmentos complementares - pois dada a sua grande extensão (8,3 kb) houve dificuldade em amplificá-lo em uma única reação - os fragmentos foram então fusionados em um único grande fragmento e clonado no plasmídeo PgpTn7-cm. A cepa MGN-617 será transformada com o plasmídeo PgpTn7*bgl*-cm, e então conjugada com a cepa mutante MT78 Δ *bgl* contendo o plasmídeo pSTNSK que codifica uma transposase. A MGN-617 doará o plasmídeo PgpTn7*bgl*-cm e a transposase codificada no plasmídeo pSTNSK irá inserir o operon *bgl* no cromossomo do mutante.

Além da complementação com o operon completo (MT78 Δ *bgl/bgl*⁺), o mutante MT78 Δ *bgl* será complementado apenas com o gene *bglG* do operon *bgl* (MT78 Δ *bgl/bglG*⁺), uma vez que há evidências que esse gene influencia a regulação de outros genes, podendo ser este o mecanismo da redução da virulência do mutante MT78 Δ *bgl*. Para isso o gene *bglG* será amplificado com um cassete de resistência a cloranfenicol e extremidades complementares à região de onde o operon *bgl* foi retirado no mutante MT78 Δ *bgl*, e então inserido no genoma do mutante. O mutante MT78 Δ *bgl* também será complementado com os genes *bglG*, *bglF* e *bglB* (MT78 Δ *bgl/bglGFB*⁺), 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. Neste complementado, o gene *bglB* será inserido junto com os genes *bglG* e *bglF*, pois *bglF* e *bglB* compartilham o mesmo terminador. Uma vez criados todos complementados, será possível avaliar a influência dos genes do operon *bgl* na capacidade invasiva da cepa MT78 em ensaios em células *in vitro*.