

Daniel Pavanelo, Letícia Matter e Fabiana Horn

Departamento de Biofísica – Instituto de Biociências – UFRGS
(daniel.pavanelo@ufrgs.br)

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) é o microrganismo responsável pela colibacilose em frangos, doença difundida mundialmente que causa grandes prejuízos na avicultura. A cepa APEC MT78 apresenta grande capacidade de adesão e invasão em fibroblastos, causa infecção sistêmica quando inoculada pela traquéia em frangos de 5 semanas de idade - observado em experimento *in vivo* - e ativa o mecanismo de morte celular por apoptose em macrófagos aviários.

Uma das técnicas utilizadas para melhor entender e descobrir novos fatores de virulência de microrganismos é a mutagênese marcada com assinatura (STM, de signature-tagged mutagenesis), que consiste na indução de mutação não-direcionada através da inserção de plasmídeos contendo transposons (cada transposon contém uma sequência única, a *tag*, flanqueada por sequências iguais e conhecidas que permitem a amplificação da *tag*) que podem inserir-se aleatoriamente no genoma da bactéria. Estudos utilizando essa técnica foram responsáveis por descobertas de genes de virulência importantes em *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* e também em APEC.

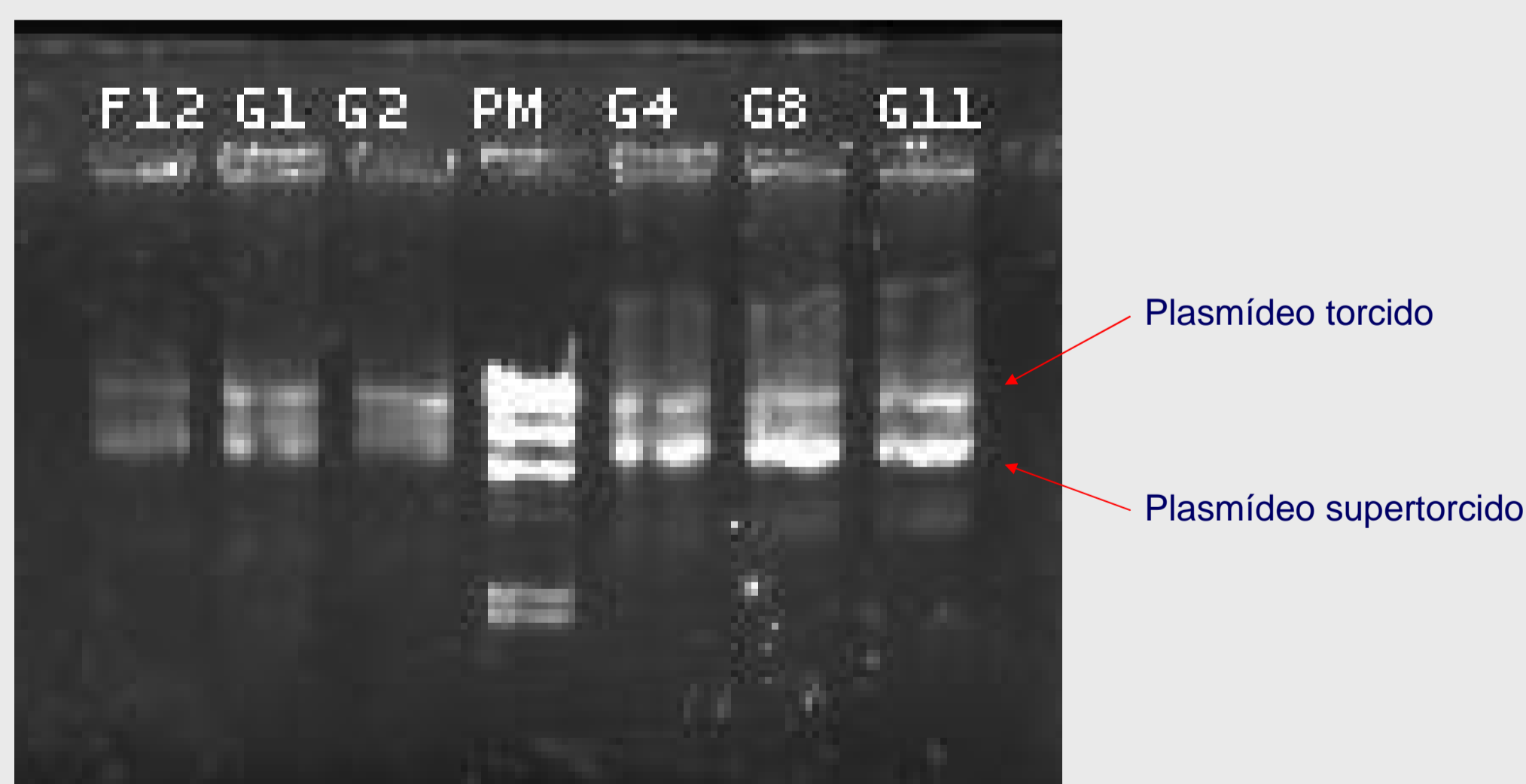
Esse trabalho propõe o início da execução da técnica de STM para a cepa APEC MT78, através da construção de mutantes aleatórios marcados com assinatura e da seleção daqueles que apresentem atenuação de sua capacidade de invasão em células aviárias não-fagocitárias da linhagem CEC-32 *in vitro*. A infecção dessas células acontecerá em *pools* de mutantes, e após infecção elas serão lisadas e os mutantes serão recuperados e identificados através de *dot blot*. Aqueles que não forem recuperados após a infecção devem possuir virulência atenuada, e serão estudados posteriormente. A técnica de STM aplicada nesse projeto permite seleção de mutantes para futuros ensaios *in vivo*, possibilitando a descoberta e/ou a confirmação de genes essenciais para a invasão de células aviárias pela cepa MT78 e sendo de grande utilidade para o melhor entendimento dos mecanismos de virulência utilizados por esse microrganismo.

OBJETIVOS

- Confecção de uma biblioteca de mutantes marcados com assinatura da cepa APEC MT78;
- Seleção de mutantes incapazes de invadir células aviárias não-fagocitárias *in vitro* para futuros experimentos *in vivo*;
- Determinação do ensaio de competitividade *in vitro* dos mutantes incapazes de invadir células aviárias não-fagocitárias.

MÉTODOS E RESULTADOS

- Eletroporação: inserção de 90 plasmídeos contendo transposons diferentes na cepa *E. coli* S17- λ pir.
- Extração do plasmídeo das *E. coli* S17- λ pir transformadas para assegurar o sucesso da eletroporação, através da técnica de miniprep, e eletroforese para confirmar a extração (figura abaixo).



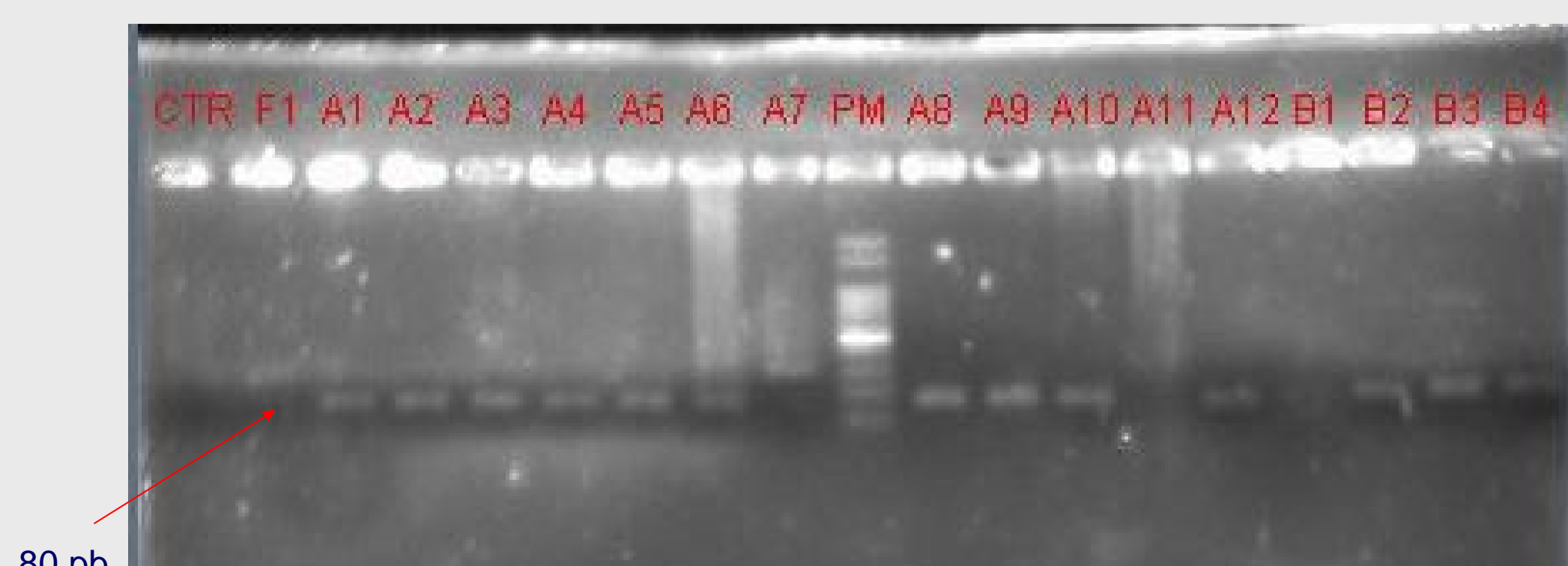
Gel com os plasmídeos extraídos.

- Conjugação: passagem dos 90 plasmídeos das *E. coli* S17- λ pir transformadas para a cepa MT78;
- Seleção de 10 colônias de MT78 conjugada para cada plasmídeo diferente, totalizando 10 *pools* de 90 mutantes cada.
- Amplificação da *tag*, através de PCR, de cada transposon, para a construção da membrana para o *dot blot* (figura ao lado). Cada uma das 90 *tags* amplificadas foi pingada em uma membrana de nylon, na disposição de uma placa de 96 poços, e a membrana foi submetida a 80° C por 2 horas para a fixação do DNA.

- Ensaio de invasão dos mutantes em fibroblastos aviários de linhagem (CEC-32): foram inoculadas em torno de 108 bactérias para cada poço com 105 células; após 1 hora as células foram lavadas e, após 4 horas, foram lisadas. O lisado foi plaqueado em meio seletivo, e foram obtidas cerca de 105 colônias por placa. Esse experimento foi feito em triplicata para cada *pool* de 90 mutantes, no total de 10 *pools*.

PRÓXIMAS ETAPAS

- Extração do DNA dos mutantes selecionados;
- *Dot blot* com o DNA dos mutantes selecionados, o que permitirá saber quais deles invadiram os fibroblastos; Aqueles mutantes cujo DNA não hibridizar no *dot blot* não invadiram os fibroblastos; sua virulência pode ter sido atenuada devido à inserção do transposon em algum gene fundamental à capacidade de invasão da bactéria;
- Fazer um ensaio de competitividade *in vitro* com a cepa selvagem e esses mutantes de virulência atenuada.



Gel com as *tags* amplificadas.