



**Universidade:
presente!**

UFRGS
PROPEAQ

XXXI SIC

CONHECIMENTO FORMACAO INOVACAO
Salão UFRGS 2019

21. 25. OUTUBRO • CAMPUS DO VALE

Evento	Salão UFRGS 2019: SIC - XXXI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2019
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	A função do operon do metabolismo de β -glicosídeos na aptidão e virulência da cepa de Escherichia coli extraintestinal MT78
Autor	JOÃO PEDRO STEPAN WAGNER
Orientador	FABIANA HORN

A função do operon do metabolismo de β -glicosídeos na aptidão e virulência da cepa de *Escherichia coli* extraintestinal MT78.

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

A cepa MT78 é uma *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) de origem aviária capaz de invadir células não-fagocitárias, cujo genótipo de virulência é indistinguível de outras ExPEC não invasivas. À procura de genes que possam contribuir para sua capacidade invasiva, usamos mutagênese marcada por assinatura (STM) para criar uma biblioteca de 1710 mutantes aleatórios da MT78, que foram triados para adesão e invasão de fibroblastos aviários. Um dos mutantes atenuados, MT78***bglB::Tn5***, apresentou inserção do transposon no gene que codifica a enzima fosfo- β -glicosidase B (*bglB*); este mutante foi incapaz de produzir fímbria do tipo I – uma das principais adesinas em ExPEC – e portanto de aderir e invadir fibroblastos. Para caracterizar a função do operon *bgl*, foi gerado o mutante MT78 **Δ *bgl***, que apresentou atenuação (1) da adesão e invasão a fibroblastos e (2) da colonização da bexiga murina *in vivo*. Porém, ensaios de aglutinação em levedura revelaram que a expressão da fímbria do tipo I neste mutante foi igual à cepa selvagem. Para desvendar se a divergência entre os fenótipos dos mutantes MT78***bglB::Tn5*** e MT78 **Δ *bgl*** seria devida a uma segunda inserção do Tn5 em outra região do genoma além do *bglB*, inseri o Tn5 no gene *bglB* pela técnica λ red de mutação apolar. Assim como o MT78***bglB::Tn5***, este novo mutante foi incapaz de produzir fímbria do tipo I, o que elimina a possibilidade de ter havido uma segunda inserção do Tn5 no genoma. Meu trabalho consiste em complementar e caracterizar o mutante MT78 **Δ *bgl***, para elucidar o mecanismo pelo qual um operon de metabolismo de β -glicosídeos influencia na capacidade de adesão e invasão da MT78 e desvendar a divergência entre os fenótipos dos mutantes MT78***bglB::Tn5*** e MT78 **Δ *bgl***. A complementação do mutante MT78 **Δ *bgl*** requer a amplificação de todo o operon (8,3 kb) e sua clonagem no plasmídeo PgpTn7-cm. Tive inúmeras dificuldades em amplificar o operon dada a sua grande extensão, mas recentemente obtive sucesso. Uma vez inserido no PgpTn7-cm, este será introduzido por conjugação na cepa mutante MT78 **Δ *bgl*** contendo o plasmídeo pSTNSK que codifica uma transposase, que por sua vez inserirá 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***⁺), pois 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*.