

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DESCRIÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UM NOVO
SUBTIPO DE TCCP (*TIR-CYTOSKELETON COUPLING PROTEIN*)
NA FORMAÇÃO DA LESÃO *ATTACHING AND EFFACING*,
INDEPENDENTEMENTE DE NCK, EM UM ISOLADO DE
Escherichia albertii

IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES

ORIENTADOR: RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

COORIENTADORA: TÂNIA APARECIDA TARDELLI GOMES DO AMARAL

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia de micro-organismos e imunidade.

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

BOTUCATU – SP
2023

F363d

Fernandes, Iranildo do Amarante

Descrição e avaliação funcional de um novo subtipo de Tccp
(Tir-cytoskeleton coupling protein) na formação da lesão attaching and
effacing, independentemente de Nck, em um isolado de *Escherichia albertii* /
Iranildo do Amarante Fernandes. -- Botucatu, 2023
50 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto
de Biociências, Botucatu

Orientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

Coorientadora: Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral

1. *E. albertii*. 2. lesão AE. 3. virulência. 4. TccP4. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de novembro do ano de 2023, às 08:00 horas, no(a) Espaço IB Eventos, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES, intitulada **Descrição e Avaliação funcional de um novo subtipo de TccP (Tir-cytoskeleton coupling protein) na formação da lesão attaching and effacing, independente de Nck, em um isolado de Escherichia albertii**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Prof. Dr. WALDIR PEREIRA ELIAS JUNIOR (Participação Presencial) do(a) Laboratório de Bacteriologia / Instituto Butantan, Pós-doutorando CLÁUDIA ANDRADE FREIRE (Participação Presencial) do(a) Laboratório de Bacteriologia / Instituto Butantan - Escola Superior do Instituto Butantan. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES



O presente estudo foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo FAPESP: 2021/10398-8 e 2022/06053-8 e desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada (área de concentração: Biologia de micro-organismos e imunidade), no Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).



“Eu não quero acreditar, eu quero saber”

Carl Sagan

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Raimundo** (*In Memoriam*) e **Francisca**, e avó **Deusa** (*In Memoriam*), minhas sinceras desculpas, esse caminho que escolhi me faz ser um pouco ausente. Aos mesmos meus sinceros agradecimentos, onde mesmo distantes e com as dificuldades financeiras, não pouparam esforços para que eu chegasse até aqui. A vocês dedico esse trabalho, e todos os outros que surgirem daqui pra frente. Muito Obrigado!!!

Ao meu Orientador Rodrigo Tavanelli Hernandez, que sempre caminhou comigo nessa curta jornada que chamamos de Mestrado. Sem sua fé em mim, nos momentos mais difíceis, esse trabalho não estaria concluído. Meu exemplo de pesquisador, de pessoa e de profissional. Muito Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, um agradecimento mais que especial a minha Coorientadora Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral.

Aos meus familiares, irmãos (Maria, Antônio, Ioneide, Ionete, Daniel e Verônica), Tios (Socorro e Zé Almir).

Aos meus amigos que foram essenciais até aqui, em especial à Aline Parisoto Missio, Ana Caroline Silva Gomes, Italo Rafael de Freitas, Stefani Thais Alves Dantas e Talita Gabriela de Souza.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Patogenicidade Bacteriana (Henrique Orsi, Bruna Luiz, Gustavo Boldrin, Guilherme Solveira, Luisa Pereira, Guilherme Frizzarin e Beatrice Di Virgilio), e em especial a Daiany Ribeiro Paz de Lira, fundamental nessa jornada.

A todos os docentes e funcionários do Setor de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

A todos os parceiros nacionais e internacionais, Waldir Pereira Elias Junior (Instituto Butantan), Fernando Henrique Martins (*University of Texas Southwestern Medical Center*), Nina Jones (*University of Guelph*), Ooka Tadasuke (*Kagoshima University*) e Tetsuya Hayashi (*Kyushu University*).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro no desenvolvimento desse estudo.

RESUMO

A espécie *Escherichia albertii* compreende o mais novo membro do gênero *Escherichia* e é responsável por casos esporádicos, bem como surtos de diarreia em diversos países do mundo, incluindo o Brasil. Uma das principais características de virulência observada em isolados classificados como pertencentes à espécie *E. albertii* é a formação da lesão *attaching and effacing* (AE), que é caracterizada pela aderência íntima da bactéria às células epiteliais, destruição das microvilosidades e formação de uma estrutura semelhante a um pedestal rico em F-actina e outros elementos do citoesqueleto eucariótico. Estudos anteriores, realizados com o protótipo brasileiro de *E. albertii* 1551-2, mostraram que esse patógeno possui a capacidade de recrutar F-actina para a formação da lesão AE utilizando tanto a via Nck-dependente, que requer a fosforilação do resíduo de Tirosina Y474 na proteína receptora Tir, quanto a via Nck-independente, que utiliza a proteína adaptadora TccP (*Tir-cytoskeleton coupling protein*). Estudos anteriores identificaram um novo subtipo de TccP no isolado de *E. albertii* 1551-2 (denominado TccP3), cujo papel na formação da lesão AE se mostrou minoritário. Análises posteriores do genoma do isolado de *E. albertii* 1551-2 revelaram que, além de TccP3, esse isolado alberga um gene com potencial para codificar um novo TccP. Frente ao exposto, nossos objetivos foram avaliar a relação desse novo TccP com os subtipos de TccP já descritos até o momento, bem como a participação dessa nova proteína na formação da lesão AE pela via independente de Nck. Uma árvore de máxima verossimilhança foi construída comparando as sequências de aminoácidos dos diferentes subtipos de TccP e a sequência do novo TccP encontrado no isolado 1551-2. Posteriormente, foram realizadas a mutagênese e complementação *in trans* do gene responsável por codificar essa nova proteína a partir do mutante 1551-2 Δ tccP3. Sequenciamento *Sanger* e *Immunoblotting* foram realizados para confirmação da mutagênese e complementação, respectivamente. Em desfecho, foram realizados testes quantitativos de FAS (*Fluorescent actin staining*) em células MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) desprovidas de Nck e infectadas com as bactérias empregadas neste estudo. A nova proteína TccP identificada nesse estudo, está localizada em um clado diferente na árvore de máxima verossimilhança e apresentou identidade inferior a 80% se comparada com outros subtipos de TccP. Tais resultados indicam, portanto, se tratar de um novo subtipo de TccP, denominado neste estudo de TccP4. A deleção do gene tccP4 foi confirmada por sequenciamento bem como pela produção da proteína recombinante TccP4-Myc no isolado complementado por *Immunoblotting* com o soro anti-Myc. Os testes quantitativos mostraram que 64,7% das bactérias selvagens aderidas eram capazes de recrutar F-actina para a formação do pedestal característico da lesão AE, enquanto, apenas 5,0% dos isolados de *E. albertii* mutados em tccP4 (1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4) mostraram esse fenótipo, sendo essa diferença considerada significativa pelo teste de ANOVA ($P < 0.0001$). A complementação *in trans* restaurou a capacidade do isolado 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4 (pTccP4) em recrutar F-actina em porcentagens semelhantes às observadas com o isolado selvagem (64,7% vs. 52,6%; $P = 0.3846$). Tais evidências vêm a corroborar o papel da proteína adaptadora TccP4 no recrutamento de F-actina, pela via Nck-independente, para a formação da lesão AE durante o estabelecimento do processo infeccioso por *E. albertii*.

Palavras chaves: *E. albertii*, lesão AE, virulência e TccP4.

ABSTRACT

The *Escherichia albertii* species comprises the newest member of the genus *Escherichia* and is responsible for sporadic cases, as well as outbreaks of diarrhea, in several countries worldwide. One of the main virulence features observed in this pathogen is the formation of the attaching and effacing (AE) lesion, characterized by intimate adherence of the bacteria to the epithelial cells, effacement of the microvilli, and formation of a pedestal-like structure that is rich in F-actin and other eukaryotic cytoskeleton elements. Previous studies carried out with the Brazilian prototype strain of *E. albertii* 1551-2 showed this pathogen has the capacity to recruit F-actin for the AE lesion formation using both the Nck-dependent pathway, which requires the phosphorylation of the Tyrosine residue 474 in the Tir receptor protein, as well as the Nck-independent pathway, which uses the TccP (Tir-cytoskeleton coupling protein) adaptor protein. In a recently published study a novel TccP, named TccP3, was identified in the 1551-2 genome. However, TccP3 was not considered essential for F-actin polymerization during AE lesion formation in infected cells. Despite TccP3, genomic analyses have identified a gene-encoding an additional TccP adaptor protein in the *E. albertii* 1551-2 isolate. Thus, our main objectives were to evaluate the association of this novel adaptor protein with the other TccP proteins described so far, as well as to evaluate the participation of this novel TccP in the AE lesion formation in a Nck-independent pathway. A maximum likelihood tree was constructed comparing the amino acid sequences of the different TccP and the sequence of the novel TccP uncovered in the 1551-2 isolate. Subsequently, mutagenesis and *in trans* complementation of the gene responsible for encoding this novel adaptor protein were performed in the 1551-2 Δ tccP3 mutant background. Sanger sequencing and Immunoblotting, with anti-Myc serum, were performed to confirm mutagenesis and complementation, respectively. Further, quantitative FAS (Fluorescent actin staining) assays were performed in MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) cells lacking Nck (-/-), infected with the distinct bacteria to be evaluated. The novel TccP protein identified in this study occupied an exclusive clade in the maximum likelihood tree and showed less than 80% identity compared to other TccP proteins. These results indicate that it is a novel TccP, which was termed TccP4 in the present study. The *tccP4* gene deletion in the 1551-2 Δ tccP3 mutant background was confirmed by sequencing, and the production of the TccP4-Myc recombinant protein in the complemented isolate was demonstrated by Immunoblotting. Quantitative FAS assays showed that 1551-2 and 1551-2 Δ tccP3 were very efficient in the AE lesion formation, since 72.7% and 74.57% of adherent bacteria co-localized with polymerized F-actin in the MEF infected cells, respectively. On the other hand, only 2.4% of the *E. albertii* 1551-2 lacking *tccP4* (1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4) preserved this ability, with this difference being considered very significant ($P < 0.0001$). Complementation restored the ability of the 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4 (pTccP4) to recruit F-actin as efficiently as the wild-type (72.7% vs. 71.74%; $P = 0.9944$). In conclusion, our data led to the identification of a novel TccP, named TccP4. Moreover, we showed that TccP4 is crucial for F-actin recruitment, in the Nck-independent pathway, during AE lesion formation in host cells infected by this pathogen.

Keywords: *E. albertii*, AE lesion, virulence and TccP4

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
JUSTIFICATIVA	19
OBJETIVO	21
MATERIAIS E MÉTODOS	21
Isolado de <i>E. albertii</i> 1551-2	22
Sequenciamento do genoma completo	22
Relações filogenéticas entre os distintos subtipos de TccP	22
<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	22
Construção de mutantes não polares nos genes <i>tccP4</i>	23
Complementação <i>in trans</i> no gene <i>tccP4</i>	25
Sequenciamento do gene <i>tccP4</i> do isolado selvagem e mutante no gene <i>tccP4</i>	25
<i>Immunoblotting</i>	25
Curva de crescimento	26
Imunofluorescência	26
Teste de <i>Fluorescence Actin Staining</i> e Quantificação dos pedestais de F-actina	27
RESULTADOS	28
TccP4: um novo efector do SST3 crucial na formação da lesão <i>attaching and effacing</i> em <i>Escherichia albertii</i>	28
Construção de mutantes no gene <i>tccP4</i> e complementação <i>in trans</i>	33
A proteína recombinante TccP4-Myc colocaliza com o acúmulo de F-actina promovido por <i>E. albertii</i> 1551-2	38
TccP4 é crucial para o recrutamento de F-actina por <i>E. albertii</i> 1551-2	39
Quantificação dos pedestais de F-actina em células MEF desprovidas de Nck	43
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura genética da região LEE da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica E2348/69	13
Figura 2. Representação esquemática do SST3	14
Figura 3. Vias de recrutamento de F-actina	15
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão da alça de íleo de coelho infectada com <i>E. albertii</i> 1551-2	18
Figura 5. Representação esquemática das vias de indução do recrutamento de F-actina pelas vias dependente (1) e independente (2) da proteína eucariótica Nck	21
Figura 6. Identificação de uma nova proteína TccP, nomeada TccP4, em isolado de <i>E. albertii</i>	29
Figura 7. Comparação da sequência de aminoácidos de TccP4 de <i>E. albertii</i> 1551-2 com outras sequências de TccP conhecidas	32
Figura 8. Confirmação das principais características genotípicas do isolado selvagem de <i>E. albertii</i> 1551-2 e seus derivados	34
Figura 9. Confirmação da troca alélica entre o gene <i>tccP4</i> e <i>ble</i>	35
Figura 10. Comparação entre o sequenciamento do isolado 1551-2 selvagem (A) e duplo mutante 1551-2 Δ <i>tccP3</i> / Δ <i>tccP4</i> (B) na região do gene <i>tccP4</i>	36
Figura 11. <i>Immunoblotting</i> com anticorpos α -Myc	37
Figura 12. Curva de crescimento dos isolados utilizados neste estudo.	38
Figura 13. Ensaio de imunofluorescência demonstrando a produção da proteína recombinante TccP4-Myc pelo isolado 1551-2 Δ <i>tccP3</i> / Δ <i>tccP4</i> (pTccP4) e a colocalização das bactérias aderidas às células HeLa com a polimerização de F-actina	39
Figura 14. Controles bacterianos utilizados no teste de FAS	40
Figura 15. Detecção da polimerização de F-actina pelo isolado selvagem de <i>E. albertii</i> 1551-2 e seus derivados em células HeLa infectadas.	41
Figura 16. Detecção da polimerização de F-actina pelo isolado selvagem de <i>E. albertii</i> 1551-2 e seus derivados em células MEF Nck (-/-) infectadas.	42
Figura 17. A proteína TccP4 é crucial para a formação da lesão AE em células infectadas por <i>E. albertii</i> 1551-2	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores de caracterização genotípica de <i>E. albertii</i> 1551-2	23
Tabela 2. Iniciadores utilizados para construção ou complementação dos mutantes no gene <i>tccP4</i>	24
Tabela 3. Plasmídeos e isolados utilizados nos experimentos de mutagênese e complementação	24
Tabela 4. Similaridade das sequências de aminoácidos entre as proteínas TccP, TccP2, TccP3 e TccP4 de cepas de EHEC, EPEC e <i>E. albertii</i> 1551-2	31
Tabela 5. Características genotípicas e perfil de resistência dos isolados de <i>E.</i> <i>albertii</i> utilizados neste estudo	33

INTRODUÇÃO

O primeiro isolado de *Escherichia albertii* (isolado 19982), do qual se tem conhecimento na literatura, foi obtido de uma criança de nove meses de idade com diarreia em Bangladesh. Tendo por base suas características bioquímicas, esse isolado foi, à época, classificado como *Hafnia alvei* (Albert et al., 1991). Posteriormente, no mesmo país, outros seis isolados com as mesmas características foram obtidos de crianças com diarreia, mostrando, assim, a circulação desse patógeno em Bangladesh (Albert et al., 1992). Albert e colaboradores mostraram que esses isolados de *Hafnia alvei* eram capazes, assim como os isolados de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), de induzir nas células epiteliais infectadas a formação da lesão *attaching and effacing* (AE) (Albert et al., 1992). Com base em características bioquímicas e genéticas, esses isolados de *Hafnia alvei* produtores da lesão AE foram reclassificados em uma nova espécie denominada *Escherichia albertii* (Huys et al., 2003).

Os principais sintomas associados às infecções do trato gastrointestinal por *E. albertii* compreendem: desidratação leve, diarreia aquosa, distensão abdominal, febre e vômito, sendo o período de incubação estimado entre 12 e 24 horas. Além de sua associação com casos esporádicos de diarreia (Ooka et al., 2012), surtos causados por *E. albertii* também já foram relatados, principalmente em estudos conduzidos no Japão (Asoshima et al., 2014; Konno et al., 2012; Ooka et al., 2012; Ooka et al., 2015). *E. albertii* já foi isolada de vários produtos alimentícios, incluindo carne processada e frango (Asoshima et al., 2014; Maeda et al., 2015; Wang et al., 2016), bem como sua ocorrência já foi relatada em sistemas de tratamento e distribuição de água potável (Maheux et al., 2014).

Além das doenças do trato gastrointestinal, um estudo descreveu a capacidade de *E. albertii* de causar bacteremia, indicando a possibilidade desse patógeno em acessar o hospedeiro humano através de portas de entradas alternativas, visto que a paciente em questão não havia tido contato prévio com humanos e aves infectadas, e também não apresentou histórico de diarreia (Inglis et al., 2015). Embora a prevalência de *E. albertii* no Brasil ainda seja um assunto que requer mais pesquisas, um estudo conduzido pelo Instituto Adolfo Lutz investigou um total de 5.047 pacientes com diarreia, entre os anos de 2011 e 2016, mostrando que *E. albertii* foi identificada em apenas 0,2% dos pacientes incluídos nesse estudo (Ori et al., 2019), a importância desses dados é evidenciada pela dificuldade de diferenciação de *E. coli* e *E. albertii*.

A lesão AE, que compreende uma das principais ferramentas de virulência identificada em isolados de *E. albertii* até o momento, é caracterizada pela aderência íntima da bactéria às

células epiteliais, destruição das microvilosidades e formação de uma estrutura semelhante a um pedestal rico em F-actina e outros elementos do citoesqueleto eucariótico (Moon et al., 1983). A grande maioria dos genes responsáveis por codificar proteínas que participam da formação da lesão AE estão localizados em uma ilha de patogenicidade (PAI), denominada *locus of enterocyte effacement*, região LEE, formada por um conjunto de 41 genes organizados em cinco operons policistrônicos (LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5), dois operons bicistrônicos (*espG-rorG1* e *grlA-grlR*) e quatro genes individuais (*etgA*, *cesF*, *map*, *escD*) (Gaytán et al., 2016; McDaniel et al., 1995) (Figura 1). A clonagem da região LEE em um *background* de *E. coli* K12, demonstrou a capacidade de causar a lesão AE semelhante ao isolado selvagem de EPEC (McDaniel et al., 1997). Surpreendentemente, o mesmo experimento foi realizado, porém clonando a região LEE de EHEC no mesmo *background* de K-12 e não houve restauração na capacidade de recrutar F-actina (ELLIOT; YU; KAPER, 1999), sugerindo assim, que EPEC e EHEC promoviam a lesão AE por mecanismos diferentes.

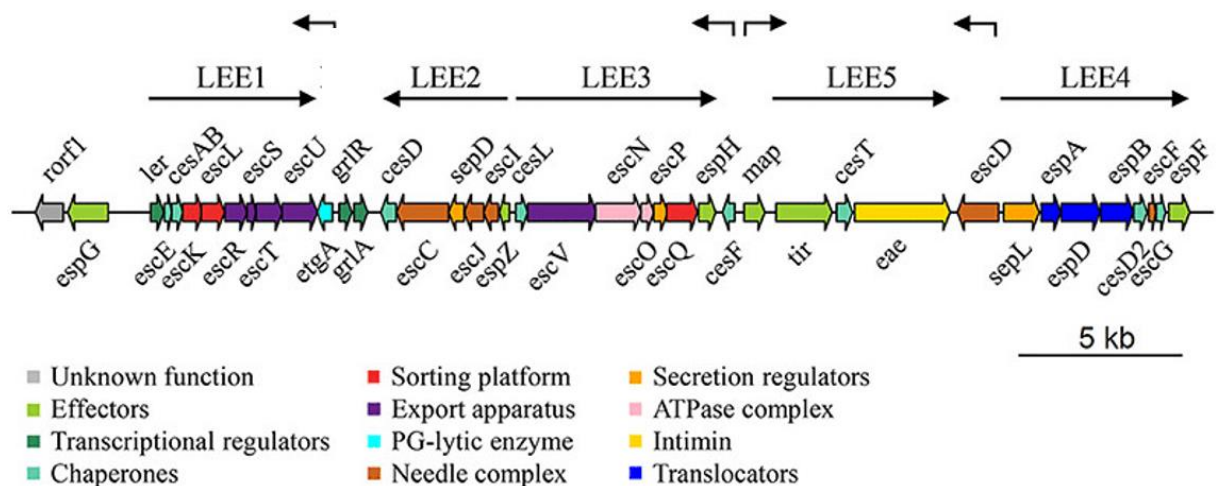


Figura 1. Estrutura Genética da Região LEE da *Escherichia coli* enteropatogênica típica E2348/69. Fonte: Gaytán et al., 2016 PMID: 27818950.

Os genes localizados nos operons LEE1, LEE2 e LEE3 codificam o aparato do sistema de secreção do tipo 3 (SST3) (Figura 2) responsável pela translocação de proteínas efetoras do citoplasma da célula bacteriana para o citoplasma da célula hospedeira eucariótica. O translocon do SST3 é formado por proteínas codificadas por genes localizados no operon LEE4, destacando-se as proteínas EscF (que forma a agulha do SST3), EspA (proteína que recobre a proteína EscF) e as proteínas EspB e EspD que são sinergicamente responsáveis pela formação do poro de translocação nas células epiteliais hospedeiras. A região LEE5 alberga o gene *eae*

(*E. coli attaching and effacing*) que codifica a adesina autotransportadora inversa intimina (Jerse et al., 1990), bem como o gene *tir* (*translocated intimin receptor*), que codifica o receptor da intimina, translocado para as células hospedeiras através do SST3 (Kenny et al., 1997).

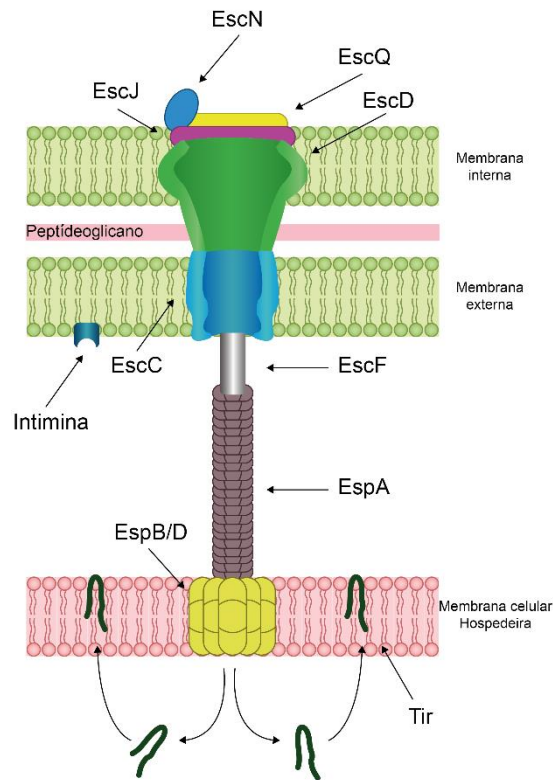


Figura 2. Representação esquemática do SST3. Fonte: Própria (Não publicado).

A compreensão das etapas envolvidas no recrutamento de F-actina e formação do pedestal característico da lesão AE durante as infecções causadas por EPEC e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) despertou o interesse de pesquisadores por vários anos, sendo que até o presente momento, duas vias de indução da lesão AE foram caracterizadas. Na primeira via, descrita tendo por base o isolado protótipo de EPEC E2348/69, a interação Tir-Intimina provoca a fosforilação do resíduo de tirosina 474 (Y₄₇₄) do domínio C- terminal de Tir; esse resíduo apresenta sítio de ligação para as proteínas adaptadoras Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase*) presentes nas células do hospedeiro. Subsequentemente a essa interação, ocorre o recrutamento e ativação da proteína N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*), iniciando a polimerização da actina através da ativação do complexo proteico Arp2/3 (*Actin related protein 2/3*), o que promove a formação do pedestal (Devinney et al., 2001; Kenny, 1999).

microcolônias bacterianas frouxas, que podem ser observadas apenas em ensaios de aderência realizados com períodos de incubação bactéria-célula mais prolongados (6 horas) (Albert et al., 1992; Hernandez et al., 2006; Lima et al., 2019).

No entanto, um estudo realizado no Brasil com o isolado de *E. albertii* denominado 1551-2, que foi obtido de uma criança de 23 meses de idade com um quadro clínico de diarreia aguda (Vieira et al., 2001), mostrou que esse isolado produzia microcolônias bacterianas bastante compactas na superfície das células epiteliais infectadas, em ensaios realizados com períodos estendidos de incubação (6 horas), sendo esse padrão denominado de AL₆ (Hernandes et al., 2006) para diferenciar do padrão AL produzido por isolados de tEPEC em ensaios realizados com 3 horas de incubação. Um estudo posterior que caracterizou um total de cinco isolados de *E. albertii*, provenientes de crianças brasileiras com diarreia, mostrou que três isolados produziam o padrão AL, enquanto os outros dois isolados produziam o padrão AL₆ (Lima et al., 2019).

O isolado brasileiro de *E. albertii* 1551-2 foi extensivamente estudado no intuito de promover a compreensão de quais adesinas estariam envolvidas na formação do padrão AL₆ em células HeLa (Hernandes et al., 2006; Hernandez et al., 2008; Hernandez et al., 2013; Romão et al., 2014; Yamamoto et al., 2017). Tendo por base que o isolado de *E. albertii* 1551-2 alberga a região LEE e, portanto, o gene *eae* que codifica a adesina intimina (Hernandes et al., 2006; Vieira et al., 2001), esse gene se tornou o primeiro candidato a ser mutagenizado. A mutagênese no gene *eae* do isolado 1551-2 fez com que essa bactéria deixasse de produzir o padrão AL₆, passando assim a aderir às células HeLa no padrão de aderência difusa, reforçando assim o papel da adesina intimina na formação do padrão de aderência AL₆ (Hernandes et al., 2008). Ensaios quantitativos de aderência revelaram uma diminuição de aproximadamente 33% no número de bactérias associadas às células HeLa quando comparados o isolado 1551-2 mutado no gene *eae* com o isolado selvagem (Hernandes et al., 2013).

Posteriormente, foi demonstrado que o padrão de aderência difusa, produzido pelo isolado 1551-2 mutado no gene *eae*, era dependente do translocon do SST3, uma vez que o mutante do isolado 1551-2 no gene *escN* (que codifica a ATPase do SST3) ou o duplo mutante nos genes *eae/espA*, não eram mais aderentes às células HeLa (Hernandes et al., 2013). Embora muitos estudos ainda sejam necessários para compreender a regulação dos fatores de virulência envolvidos na aderência de *E. albertii* às células epiteliais, foi demonstrado que a aderência do isolado 1551-2 às células HeLa é significativamente maior quando os experimentos são realizados na presença de 5% de CO₂, comparando-se a experimentos realizados em uma atmosfera normal (0,03%). No mesmo estudo, observou-se também que a presença de altas

concentrações de glicose altera o padrão AL₆ para um padrão híbrido, onde concomitantemente às microcolônias compactas características do padrão AL₆, foram observadas bactérias aderidas à superfície abiótica (vidro) em um padrão que se assemelha ao padrão de aderência agregativa (AA), sendo esse padrão híbrido referido como AL₆/AA-like (Romão et al., 2014).

Além dos estudos realizados com células HeLa (Hernandes et al., 2008; Hernandez et al., 2013), foi também evidenciado que o isolado de *E. albertii* 1551-2 foi capaz de aderir às células intestinais polarizadas e diferenciadas Caco-2 (Pacheco et al., 2014; Yamamoto et al., 2017) e T84 (Yamamoto et al., 2009). Interessantemente, estudos realizados com fragmentos de íleo obtidos de ratos, *in vitro organ culture* (IVOC), mostraram que a aderência às células desse tecido era completamente dependente de um SST3, uma vez que a mutação no gene *escN* foi capaz de reduzir significativamente a capacidade do isolado 1551-2 em aderir a esse fragmento de tecido (Yamamoto et al., 2017), diferentemente do observado com os mutantes nos genes *eae*, *tir* e *fimA* (que codifica a pilina da fimbria do tipo I de *E. coli*).

Embora todos os estudos focados em entender o processo de aderência de isolados de *E. albertii*, especialmente os realizados com o isolado brasileiro 1551-2, tenham funcionalmente demonstrado o papel da adesina intimina e do translocon do SST3 (Hernandes et al., 2013; Yamamoto et al., 2017), é importante destacar que dos 243 isolados de *E. albertii* sequenciados até o momento, aproximadamente 91% albergam o gene *paa* (*porcine attaching and effacing associated*) (Gomes et al., 2020), que codifica uma adesina originalmente identificada e caracterizada em um isolado de EPEC de suíno (Batisson et al., 2003). Também já foi observada a presença do gene *efa1/lifA* (*EHEC factor for adherence/lymphocyte inhibitory factor*) (Lima et al., 2019), que codificada uma adesina identificada em um isolado de EHEC do sorotipo O111:HNM (Nicholls et al., 2000).

Além de aderir às células epiteliais, isolados de *E. albertii* são também capazes de aderir a superfícies abióticas, em especial, ao poliestireno (Lima et al., 2019). Estudos com o isolado 1551-2 mostraram que esse fenótipo é mediado pela produção da fimbria do tipo I (FT1), uma vez que a mutagênese no gene *fimA*, que codifica a pilina da FT1, impactou drasticamente a formação de biofilme (Hernandes et al., 2013).

Como mencionado anteriormente, a capacidade de *E. albertii* em produzir a lesão AE foi evidenciada desde os primeiros estudos de patogenicidade bacteriana realizados com esse patógeno (Albert et al., 1991; Albert et al., 1992). Nos estudos publicados até o momento, esse fenótipo tem sido observado nos seguintes modelos experimentais: células cultivadas *in vitro* (Hernandes et al., 2013; Lima et al., 2019; Pacheco et al., 2014; Yamamoto et al., 2009), alça ligada de coelho (Albert et al., 1991; Albert et al., 1992; Gomes et al., 2020) ou IVOC de

fragmentos do íleo de ratos (Yamamoto et al., 2017). A formação da lesão AE, nos modelos experimentais citados, tem sido evidenciada diretamente através de microscopia eletrônica de transmissão ou varredura, buscando-se pelas características histopatológicas da lesão AE; ou indiretamente através do teste de FAS (*fluorescent actin-staining*) que permite evidenciar o acúmulo de F-actina junto ao sítio de aderência bactéria-célula (Knutton et al., 1989). A capacidade do isolado brasileiro de *E. albertii* 1551-2 em produzir a lesão AE nas células epiteliais infectadas já foi evidenciada *in vitro* utilizando várias linhagens celulares, HeLa, Caco-2 e T84 (Hernandes et al., 2006; Hernandez et al., 2013; Pacheco et al., 2014; Yamamoto et al., 2009) e IVOC de fragmentos do íleo de ratos (Yamamoto et al., 2017); bem como *in vivo*, em modelo de alça ligada de coelho (Gomes et al., 2020) (Figura 4).



Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão da alça de íleo de coelho infectada com *E. albertii* 1551-2. A destruição das microvilosidades e a formação da estrutura semelhante a um pedestal são evidenciadas pelo asterisco, indicando a capacidade do isolado 1551-2 em induzir a lesão AE *in vivo*. **Fonte:** Gomes et al., 2020 PMID: 32588811.

Inesperadamente, ensaios de interação do isolado de *E. albertii* 1551-2 com células HeLa mostraram que esse isolado era capaz de invadir essa linhagem celular (Hernandes et al., 2008), com uma eficiência três vezes maior que o isolado de EPEC JPN15, isolado protótipo de tEPEC E2348/69 espontaneamente curada do pEAF (*EPEC adherence factor plasmid*) e, portanto, incapaz de produzir a fímbria BFP. O isolado de *E. albertii* 1551-2 alberga o subtipo

de intimina omicron, e ensaios de mutagênese mostraram que a interação intimina-Tir compreende um processo indispensável para a internalização desse patógeno (Hernandes et al., 2008). Uma vez internalizado, o isolado 1551-2 permanece dentro de vacúolos endocíticos circundados por F-actina polimerizada (Hernandes et al., 2008; Pacheco et al., 2014), e é capaz de persistir e se multiplicar no ambiente intracelular, em experimentos de invasão realizados com células Caco-2, por até 24 horas (Lima et al., 2019; Pacheco et al., 2014).

Semelhante ao observado em células HeLa, a invasão de células Caco-2 também depende de um SST3 funcional e da interação intimina-Tir (Yamamoto et al., 2017). Outro aspecto importante a ser mencionado é que o tratamento de células T84 com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), que promove a ruptura das junções oclusivas das células epiteliais, aumenta significativamente o número de bactérias internalizadas, demonstrando, assim, que a porção basolateral das células infectadas deva constituir o principal sítio de invasão para esse patógeno (Yamamoto et al., 2009).

Até o momento, somente a produção de duas toxinas foi observada em isolados de *E. albertii*, sendo essas as toxinas CDT (*Cytolethal distending toxin*) e Stx (*Shiga toxin*) (Hyma et al., 2005; Hinenoya et al., 2019; Gomes et al., 2020). A toxina CDT é produzida por várias bactérias Gram-negativas e induz a distensão do núcleo das células epiteliais infectadas por prolongar as fases G1 e G2 da mitose, podendo até levar a célula hospedeira à morte (Jinadasa et al., 2011; Grasso; Frisan, 2015; Taieb et al., 2016; Fedor et al., 2013). O mecanismo de ação da toxina Stx está ligado a inibição da síntese proteica nas células eucarióticas infectadas (Shiga, 1898; O'Brien; LaVeck, 1983). A grande maioria dos isolados de *E. albertii* produtores Stx alberga o gene do subtipo *stx2f* (Hinenoya et al., 2017; Murakami et al., 2014; Ooka et al., 2012; 59, Ori et al., 2019), muito embora um isolado albergando o subtipo *stx2a* já tenha sido reportado (Brandal et al., 2015).

JUSTIFICATIVA

Em uma revisão recentemente publicada pelos nossos grupos de pesquisa (Laboratório Experimental de Patogenicidade de Enterobactérias - Tânia A. T. Gomes do Amaral, UNIFESP/EPM/São Paulo/SP e Laboratório de Patogenicidade Bacteriana - Rodrigo T. Hernandez, UNESP/IBB/Botucatu/SP), ficou evidenciado o crescente aumento do interesse pela compreensão dos mecanismos de patogenicidade utilizados por isolados de *E. albertii* para colonizar, se estabelecer e causar danos ao hospedeiro humano (Gomes et al., 2020). Até o presente momento, a formação da lesão AE compreende a principal estratégia de virulência empregada por esse patógeno (Hernandes et al., 2013; Yamamoto et al., 2017; Romão et al.,

2020; Gomes et al., 2020). Estudos realizados com os protótipos de tEPEC (E2348/69) e EHEC (EDL933 ou Sakai) mostraram que a formação da lesão AE pode ocorrer por duas vias distintas, sendo uma dependente e outra independente de Nck (Lai et al., 2013), respectivamente.

Um estudo recente dos nossos grupos de pesquisa mostrou que o isolado de *E. albertii* 1551-2 possui concomitantemente a via Nck-dependente (Hernandes et al., 2008), e uma via de indução da lesão AE independente de Nck (Romão et al., 2020) (Figura 1). Embora nesse estudo uma nova variante de TccP, denominada TccP3, tenha sido descrita, o isolado *E. albertii* 1551-2 mutado no gene *tccP3* não perdeu sua capacidade de recrutar F-actina (Romão et al., 2020) em experimentos realizados com fibroblastos embrionários de camundongos desprovidos de Nck (Jones et al., 2006). Análises posteriores do genoma do isolado de *E. albertii* 1551-2 (número de acesso: CP025317.1), recentemente publicado (Romão et al., 2018), mostraram que, além do gene *tccP3*, esse patógeno alberga um gene responsável por codificar um novo subtipo de TccP (AUS64398.1), denominado nesse projeto de *tccP4*, ainda não caracterizado (T. A. T. Gomes, R. T. Hernandez; T. Ooka & T. Hayashi, dados não publicados). Sendo assim, a avaliação da participação de TccP4 na indução da lesão AE por uma via independente de Nck (Figura 5) se torna um alvo de extrema relevância para os nossos grupos de pesquisa, bem como para laboratórios nacionais e internacionais que tentam melhor compreender os mecanismos de patogenicidade de *E. albertii*.

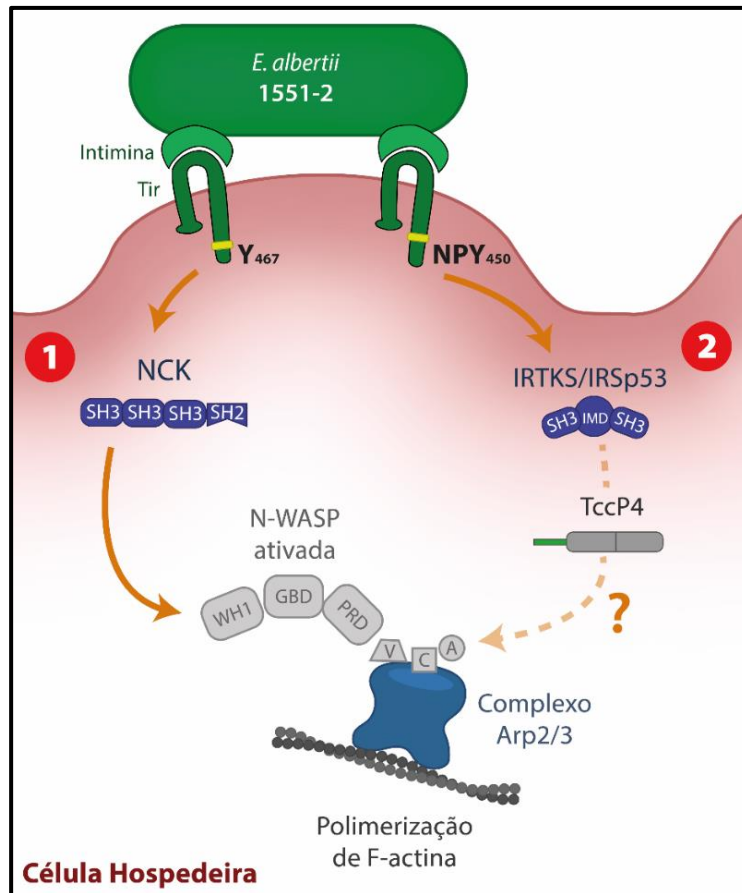


Figura 5. Representação esquemática da indução do recrutamento de F-actina pelas vias dependente (1) e independente (2) da proteína eucariótica Nck. O ponto de interrogação na figura ilustra a pergunta central do presente projeto de pesquisa que é estabelecer o papel da proteína bacteriana TccP4 no recrutamento de F-actina independentemente de Nck. **Fonte:** Própria.

OBJETIVO

Frente ao exposto, nossos objetivos foram avaliar a relação desse novo TccP, nomeado de TccP4, com os subtipos de TccP já descritos até o momento, bem como, a participação dessa nova proteína na formação da lesão AE pela via independente de Nck.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolado de *E. albertii* 1551-2

O isolado de *E. albertii* 1551-2, foi obtido de uma criança de 23 meses de idade com quadro de diarreia aguda, durante um estudo epidemiológico da Universidade Federal de São Paulo - Brasil, no ano de 1989 (Vieira et al., 2001; Hernandez et al., 2006). O isolado foi rotineiramente cultivado em *Lysogeny Broth* (LB) a 37°C e estocado em LB suplementado com 30% de glicerol a -80°C.

Sequenciamento do genoma completo.

O isolado bacteriano de *E. albertii* 1551-2 teve seu genoma completo sequenciado (Romao et al., 2018), onde se encontra depositado no banco de dados do GenBank (número de acesso: CP025317.1).

Relações filogenéticas entre os distintos tipos de TccP

Foram selecionadas 37 sequências de aminoácidos dos diferentes tipos de TccP já descritos na literatura, sendo 8 TccP, 26 TccP2 e 3 TccP3. Em seguida, a árvore filogenética de máxima verossimilhança foi construída utilizando o software MEGA 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021), pelo método *Bootstrap* com 100 replicações (Jones; Taylor; Thornton, 1992).

Representantes de cada tipo de TccP foram selecionados e, utilizando a ferramenta BLAST do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), foi realizado um *blastp*, comparando a identidade entre os subtipos de TccP e a proteína investigada.

Polymerase chain reaction (PCR)

A técnica de *polymerase chain reaction* (PCR) foi empregada para a confirmação de genes que caracterizam o isolado de *E. albertii* 1551-2. Os primers (tccP3 e tccP4-Flank) foram desenhados utilizando-se a ferramenta PCR Primer Design Tool (<https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/>). A tabela 1 descreve os iniciadores *forward* e *reverse* referentes a cada gene utilizado na caracterização genotípica do isolado de *E. albertii*. Para cada reação foi utilizado 7,5 µl de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 5,5 µl de H₂O livre de nucleases (incluso no GoTaq Green Master Mix) 0,34 µM de cada iniciador e 1 µl do DNA molde. Após a reação, 8 µl foi colocado nos poços de um gel de agarose preparado com TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X e corado por SYBR Safe (Invitrogen). Foi realizada eletroforese nas seguintes condições: tensão = 100V; corrente = 400mA e tempo de corrida = 30 minutos. O resultado foi capturado para análise através de um transiluminador ultravioleta UVCI-1200 e *SmartView Pro Imager System* 1200 (Major Science).

Tabela 1. Iniciadores de caracterização genotípica de *E. albertii* 1551-2.

Iniciadores	Sequências (5' → 3')	Temperatura de Anelamento	Referência
<i>eae omicron-F</i>	AGCGTTAGCAATGCCGCAGTTGAT	60°C	Blanco et al., 2006
<i>eae omicron-R</i>	CAACGGTAATTGTTGTTTCC		
EA0g7-F	ACCACGACATAAAGCCACCG	50°C	Ooka et al., 2019
EA0g7-R	GGAGCAGGGGGTATACATTTCAG		
<i>tccP4-Flank-F</i>	AAAAAAACCTCCACCGCC	55°C	Presente estudo
<i>tccp4-Flank-R</i>	AAGCCAGGTAAACATATCAGG		
<i>tccP3-F</i>	GCAAAAAGTGTCTACTAACCCC	50°C	Presente estudo
<i>tccP3-R</i>	TGAGATGCTTCATTTGATACCG		

Construção de mutantes não polares no gene *tccP4*

A mutagênese no gene *tccP4* foi realizada empregando-se o sistema *Lambda Red*, descrito por Datsenko & Wanner (2000), baseando-se na recombinação homóloga dos genes de interesse com um gene de resistência ao antimicrobiano zeocina. O plasmídeo pKOBEG foi introduzido no isolado mutante 1551-2Δ*tccP3*, adquirido do trabalho de Romão et al., 2020 (Tabela 2), e a expressão dos genes que codificam proteínas envolvidas no evento de recombinação homóloga foi induzida pela adição de 0,1% de L-arabinose (Sigma, EUA).

Nesse procedimento, o isolado 1551-2Δ*tccP3* foi inoculado em caldo LB e incubado a 37°C, *overnight*. O crescimento bacteriano foi diluído 1:100 e novamente incubado a 37°C com agitação (200 *xg*) até atingir DO_{600nm} entre 0,5 e 0,8. Em seguida, as bactérias foram incubadas em banho de gelo por 30 min e, após esse período, levadas à centrifugação (15min, 5000 *xg* e 4°C) duas vezes e lavadas com água ultrapura gelada. Uma última centrifugação foi realizada (10min, 5000 *xg* e 4°C) e o conteúdo precipitado foi ressuspensão em 60 µL de glicerol estéril gelado na concentração de 10%. A próxima etapa foi acrescentar 50 ng do pKOBEG em 60 µL da suspensão de células competentes, para um microtubo de 1,5 mL estéril e gelado. O conteúdo do microtubo foi transferido para uma cubeta de eletroporação 0,2 cm de espaço entre os eletrodos (Bio Rad, EUA); dessa maneira, foi realizada a eletroporação de fato (2,5 kV, 200 Ω e 25 µF). Posteriormente, uma solução de LB suplementada com glicose 2 M e magnésio 2 M foi adicionada à cubeta de eletroporação e a mesma incubada a 37°C com agitação (250 rpm) por uma hora. Após esse período, os transformantes foram selecionados em placa de LB contendo apramicina (100 µg/mL), sendo que as colônias resultantes foram utilizadas no próximo passo da mutagênese.

Os iniciadores tccP4-zeo-F/tccP4-zeo-R (Tabela 2), foram construídos com cerca de 50 pares de bases homólogas ao gene de interesse, na região 5' e cerca de 20 pares de bases homólogas ao gene de resistência, na região 3', e utilizados para amplificação do gene de resistência à zeocina, nas seguintes condições: 95°C/5 min, 35 ciclos: (95°/30 s, 50°C/30 s, 72°C/1 min), e extensão final de 72°C/7 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, as bandas recortadas do gel, e o DNA extraído com o Kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemanha) uma segunda reação de PCR foi realizada e, purificado com o Kit *QIAquick Gel Purification Kit* (QIAGEN, Alemanha), em seguida, inserido no mutante de *E. albertii* 1551-2Δ*tccP3* contendo o plasmídeo pKOBEG, por eletroporação (2,5 kV, 200 Ω e 25 μF). Os transformantes foram selecionados em ágar LB contendo zeocina (60 μg/mL), e submetidos à PCR com os *primers* tccP4-F/tccP4-R para verificação do evento de deleção do(s) gene(s) de interesse (Tabela 1).

Tabela 2. Plasmídeos e isolados utilizados nos experimentos de mutagênese e complementação.

Construções	Características	Referência
pKOBEG	Plasmídeo contendo o operon <i>lambda red</i> e o gene de resistência à apramicina	Chaveroche et al., 2000
pKC471	Vetor com epítipo Myc fusionado	Campellone; Robbins; Leong, 2004
1551-2Δ <i>tccP3</i>	Isolado deletado no gene <i>tccP3</i>	Romao et al., 2020
MC4160 <i>malT</i> Δ224	Isolado contendo o cassete de resistência à zeocina	Chaveroche et al., 2000

Tabela 3. Iniciadores utilizados para construção ou complementação dos mutantes no gene *tccP4*.

Iniciadores	Sequências (5' → 3')	Anelamento	Referência
tccP4-zeo-F	ATGATTAAGGGCATTATTTCTTTTTTTCTGGTATTC	55°C	Presente estudo
tccP4-zeo-R	CTCGCGGCATAACGTCATCGCTTGCATTAGAAAGG		
tccP4-F	TTACAGCTTCATATCTGGATGAAGTGCACCATTTAA	67°C	Presente estudo
tccP4-R	CACCGGCGGTGGCGGAATGATGCAGAGATGTAAG		
tccP4-XbaI-F	ACCACGACATAAAGCCACCG	55°C	Presente estudo
tccP4-XbaI-R	GGAGCAGGGGGTATACATTCAG		
tccp4-BamHI-R	CTCTCTTCTAGAAATGAATATCGCAACATACCAA	55°C	Presente estudo
ampli-zeo-F	CGCGCGGATCCCAGCTTCATATCTGGATGAAGT		
ampli-zeo-R	GTCATCGCTTGCATTAGAAAGG	55°C	Pichon et al., 2009
	GAATGATGCAGAGATGTAAG		

Complementação *in trans* no gene *tccP4*

Para a complementação do mutante no gene *tccP4*, um segmento de DNA, que se inicia 100 pb antes do primeiro códon (ATG) até o último códon antes do códon de terminação, foi amplificado com os primers *tccP4*-XbaI-F e *tccP4*-BamHI-R clonados nos sítios XbaI e BamHI do vetor pKC471 (Campellone; Robbins; Leong, 2004) (Tabela 3). Esse plasmídeo recombinante albergando o gene *tccP4* foi chamado de pTccP4. Sendo assim, a expressão do gene *tccP4* é controlada por seu promotor nativo, e a proteína recombinante produzida pelo isolado complementado foi fusionada ao epítopo Myc, permitindo assim a sua detecção com um soro monoclonal anti-Myc (1:200; clone 9E40 sc-40, Santa Cruz *Biotechnology*, EUA).

Sequenciamento do gene *tccP4* do isolado selvagem e mutante no gene *tccP4*

Para a confirmação da mutagênese, dessa vez utilizando uma metodologia mais precisa, foi realizado o sequenciamento Sanger do isolado selvagem (1551-2), bem como do isolado mutado no gene *tccP4* (1551-2 Δ *tccP3*/ Δ *tccP4*). O sequenciamento foi realizado em parceria com o Instituto de Biotecnologia (IBTEC), unidade complementar da UNESP – Botucatu/SP.

As amostras enviadas para sequenciamento tiveram seu DNA extraído pelo método de fervura e, em seguida, realizada a PCR com os iniciadores *tccP4*-Flank-R/*tccP4*-Flank-F, descritos na Tabela 1. A próxima etapa foi purificar essa reação de PCR com o Kit *QIAquick Gel Purification Kit* (QIAGEN, EUA) e determinar a concentração de DNA no Nanodrop 2000c (ThermoFisher Scientific, EUA).

Em seguida, foram adicionados, em microtubos de 0,2 mL, 10 μ L do produto purificado e 5 μ L do iniciador *forward*, totalizando 15 μ L. O mesmo processo foi realizado com o iniciador *reverse*. Desse modo, foi obtido um total de quatro microtubos de 0,2 mL com 15 μ L cada, dois para cada amostra enviada para sequenciamento. Seguindo-se o protocolo sugerido pelo serviço de sequenciamento do IBTEC, foram enviados produtos de PCR com 500-1000 pb em uma concentração de 10-20 ng/ μ L.

Immunoblotting

Os isolados bacterianos 1551-2, 1551-2 Δ *tccP3*, 1551-2 Δ *tccP3*/ Δ *tccP4* e 1551-2 Δ *tccP3*/ Δ *tccP4* (pTccP4), foram cultivados em 3 mL de caldo LB por 18 horas a 37° C. Após este período, foram transferidos 100 μ L destas culturas em 10 mL de DMEM e esse volume foi incubado a 37 °C sob agitação constante por aproximadamente 6 h. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 15000 *xg* por 15 minutos e os sedimentos ressuspensos em 150 μ L de

tampão de amostra (60 mM de Tris-HCL 1M pH 6,8, 25% de glicerol, 2% de SDS a 10%, 14,4 mM de 2-mercaptoetanol, 0,1% de azul de bromofenol e água destilada q. s. p. 10 mL) armazenados a 4°C. Posteriormente, as suspensões foram fervidas por 10 minutos, segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970).

As proteínas foram separadas através de SDS-PAGE (transferência em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) a 12% e, posteriormente, transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese. As membranas foram bloqueadas *overnight* a 4°C com leite desnatado a 10% em PBS, contendo Tween 0,05% (PBS-T). No dia seguinte, foram feitas três lavagens com PBS-T, por 5 minutos, seguida de incubação com o anticorpo primário anti-Myc (Sigma-Aldrich, MO, EUA) na proporção 1:5000, em leite desnatado a 10% em PBS-T, por uma hora. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS-T e a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-mouse (1:4000) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em leite desnatado a 10% em PBS-T por uma hora. Após este período, foram realizadas três lavagens com PBS-T e o resultado foi revelado com o auxílio do kit SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e visualizado no transiluminador Amersham Imager 600 (GE Healthcare, MA, EUA).

Curva de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas com o intuito de verificar a viabilidade dos mutantes gerados. Para isso, todos os isolados, tanto mutante quanto o selvagem, foram previamente semeadas em caldo LB a 37 °C, durante 18-24 horas. Posteriormente, as culturas bacterianas foram transferidas individualmente para tubos contendo 30 mL de LB, em uma diluição de 1:50, a mesma utilizada nos testes quantitativos de FAS, e incubadas durante 30 minutos a 37°C. Após esse período, foram realizadas leituras de DO de cada cultura a 600 nm. Esse procedimento foi repetido a cada 30 minutos, durante 6 horas, em triplicata experimental.

Imunofluorescência

As células HeLa foram cultivadas *in vitro* em placas de 24 poços por 48 h, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e, então foram infectadas com os isolados (1551-2 e 1551-2Δ*tccP3*/Δ*tccP4* (pTccP4) por 6 h, em mesma atmosfera, e fixadas com formaldeído a 3%. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 1% em PBS, por cinco minutos. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS e o bloqueio foi realizado com BSA 2% em PBS, por uma hora.

Para a detecção da proteína recombinante TccP4-Myc, foi utilizado o anticorpo primário monoclonal anti-Myc (1:100) (clone 9E40 sc-40, Santa Cruz, Biotechnology, EUA), produzidos em camundongos, sendo incubado por uma hora. Após duas lavagens com PBS, as células foram novamente incubadas por uma hora com o anticorpo secundário Alexa Fluor 568 anti-IGg de camundongo (1:1000), produzido em cabra (Molecular Probes), com FITC-phalloidin (1:125) (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e DAPI (1:500) (Life Technologies, Carlsbad, EUA) em PBS. As lamínulas foram visualizadas com o microscópio de fluorescência Olympus BX60.

Teste de *Fluorescence Actin Staining* e Quantificação dos pedestais de F-actina

Os testes quantitativos de *Fluorescence Actin Staining* (FAS) foram utilizados para avaliar a participação da proteína TccP4 no recrutamento de F-actina, por uma via independente de Nck, sendo realizados em fibroblastos embrionários de camundongos desprovidos da proteína Nck (MEF Nck $-/-$), gentilmente cedidos pela Dr. Nina Jones, *Department of Molecular and Cellular Biology, University of Guelph*, Canadá (Jones et al., 2006). O teste de FAS também foi realizado em células HeLa, como forma de controle, visto que essa linhagem celular possibilita a polimerização de actina por ambas as vias de recrutamento (Nck dependente e independente). Foram testados o isolado de *E. albertii* 1551-2, bem como os isolados mutados e complementados.

Nesse procedimento, primeiro, se fez necessário o teste de adesão, que foi realizado seguindo o protocolo descrito por Cravioto et al (1979), com modificações. A linhagem celular MEF Nck ($-/-$), cultivadas *in vitro*, foi mantida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em meio DMEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma, MO, EUA) e 1% de PenStrep (10.000 U penicilina + 10 mg estreptomicina/mL) (Sigma, MO, EUA). Após a formação da monocamada celular na superfície da garrafa de cultivo, as células foram desprendidas utilizando-se uma solução de tripsina 0,2% (Nova Biotecnologia, SP, BRASIL), seguido de uma agitação manual. Após o desprendimento celular, a tripsina foi inativada com adição de DMEM suplementado com 10% de SFB e a determinação de contagem do número de células foi realizada utilizando-se uma Câmara de Neubauer, a fim de obter uma concentração celular de 4×10^4 células/mL.

As células foram distribuídas em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro, com um volume de 1 mL por orifício. Posteriormente, as células foram incubadas por 48 horas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂, até atingirem um estágio de semi-confluência (70 a 80%). Em seguida, para realizar o teste de interação, os isolados bacterianos foram inoculados, a partir do

crescimento em LB por 18h a 37°C, na diluição de 1:50, em placas de 24 poços contendo as linhagens celulares utilizadas neste estudo, em meio DMEM acrescido de 2% de SFB e 2% de D-manose.

Após o período de infecção (3 horas), as placas foram lavadas com PBS estéril e reincubadas por mais 3 horas (período de multiplicação). Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com PBS estéril e fixadas com formaldeído a 3%, para em sequência ser realizado o teste de FAS.

As preparações foram permeabilizadas com Triton X-100 a 1% (*Sigma*, Saint Louis, Missouri, EUA) e incubadas no escuro por 20 min, com faloidina marcada com fluoresceína (*Life Technologies*, Carlsbad, EUA), na diluição de 1:125, marcando filamentos de actina, e DAPI (*Life Technologies*, Carlsbad, EUA) na diluição 1:500, marcando ácidos nucleicos tanto da célula hospedeira quanto da bactéria. As lamínulas foram lavadas em PBS, montadas em glicerol (diluído 1:9 em PBS) e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX60) em aumento de 1000x.

Em seguida, foram selecionadas de maneira aleatória 50 células eucarióticas com a presença de bactérias aderidas e, dessa forma foram contadas a quantidade de pedestais formados (FAS) e a quantidade de bactérias aderidas (DAPI); posteriormente, a relação entre esses dois dados foi estabelecida, possibilitando a quantificação desse ensaio.

Os resultados dos ensaios quantitativos de FAS foram apresentados primeiramente tendo por base a presença de células infectadas com acúmulo evidente de F-actina. O protótipo de tEPEC E2348/69 foi utilizado como controle negativo, enquanto o isolado de EHEC EDL933 foi utilizado como controle positivo. Todos os isolados foram testados em pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

Para as análises estatísticas foram utilizados Kruskal-Wallis para dados não paramétricos e ANOVA *one way* em caso de dados paramétricos, sendo que a diferença estatística foi apontada quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

TccP4: um novo efetor do SST3 crucial na formação da lesão *attaching and effacing* em *Escherichia albertii*

Analizando a árvore filogenética construída a partir do método de máxima verossimilhança, contendo 38 sequências de aminoácidos dos diferentes subtipos de TccP, encontrados em *E. coli* e *E. albertii* e, já descritos em banco de dados do NCBI, nota-se que as

proteínas se agruparam em quatro ramos distintos da árvore filogenética (Figura 6). Essa análise revelou que a proteína TccP4 representa um novo subtipo de TccP, visto que ela está contida em um clado totalmente isolado das demais proteínas.

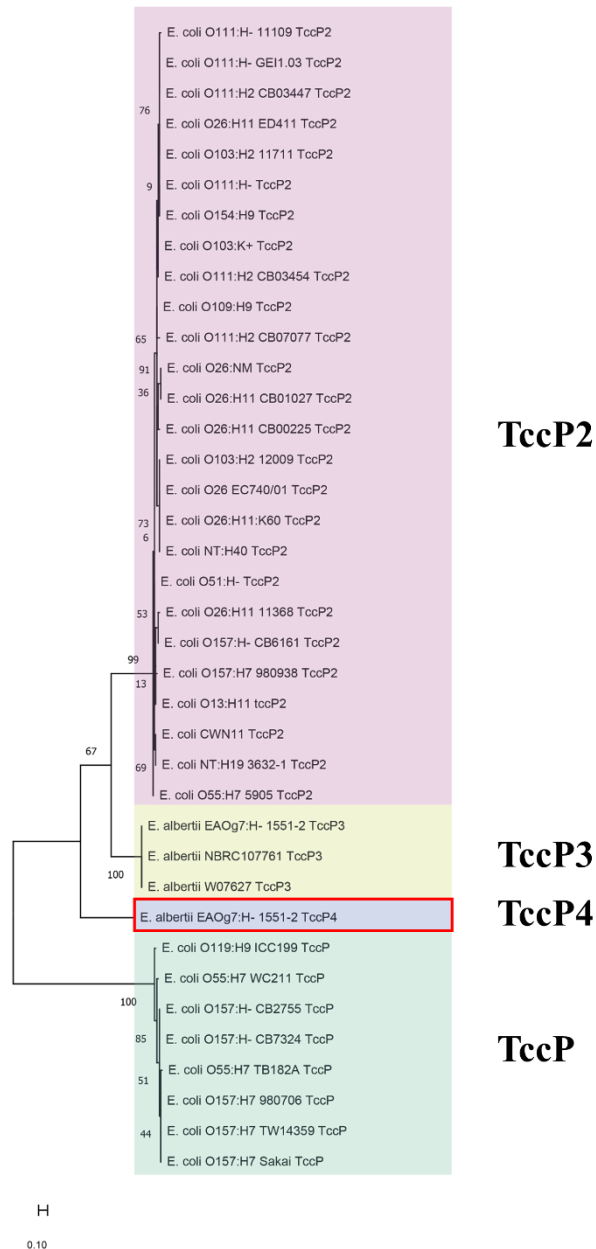


Figura 6. Identificação de uma nova proteína TccP, nomeada TccP4, em isolado de *E. albertii*. Observa-se que a proteína de interesse (AUS64398.1), corresponde a um novo subtipo de TccP, denominado neste estudo de TccP4. Cada subtipo de TccP está representado por uma cor distinta, sendo que a proteína TccP4, identificada neste estudo, está destacada em vermelho.

A similaridade entre as sequências de aminoácidos dos diferentes subtipos de TccP mostrou que a proteína identificada apresenta menos 80% de identidade com as sequências de aminoácidos dos tipos de TccP (TccP, TccP2 e TccP3) já descritas (Tabela 4), indicando se tratar de uma proteína diferente; sendo denominada nesse estudo, TccP4.

Na figura 7, é possível observar o alinhamento das sequências de aminoácidos dos subtipos de TccP. A proteína TccP4 apresenta regiões parcialmente conservadas, quando comparadas com outros subtipos de TccP anteriormente descritos como funcionais (TccP e TccP2), e apresenta três regiões repetidas ricas em prolina (PRR). Os aminoácidos marcados em preto representam regiões conservadas entre as sequências alinhadas; em cinza, indica regiões parcialmente conservadas e, em branco regiões não conservadas.

Tabela 4. Similaridade das sequências de aminoácidos entre as proteínas TccP, TccP2, TccP3 e TccP4 de cepas de EHEC, EPEC e *E. albertii* 1551-2

Subtipos de TccP	Isolados ^a	Protein ID	Nº de aminoácidos	Nº de PRR ^d	Subtipos de TccP ^{b,c}					
					TccP		TccP 2		TccP 3	TccP 4
					Sakai	ICC199	B171	11368	1551-2	1551-2
TccP	Sakai	NP_310742.1	337	6						
	ICC99	ABB16333.1	290	5						
TccP 2	B171	BBL40755.1	297	5						
	11368	WP_061317672.1	250	4						
TccP 3	1551-2	AUS68249.1	156	1						
TccP 4	1551-2	AUS64398.1	227	3	60%	41%	51%	53%	47%	

^a**Isolados:** 1551-2 (*E. albertii* EAOg7:H⁻), Sakai (EHEC O157:H7), ICC199 (EPEC O119:H6), B171 (EPEC O111:H⁻), e 11368 (EHEC O26:H11).

^bA porcentagem equivale à similaridade entre a sequência de aminoácidos alinhados.

^cSimilaridade de alinhamento alta ($\geq 80\%$), indicado em vermelho, representa o mesmo subtipo de TccP.

^dRegiões repetidas ricas em prolina.

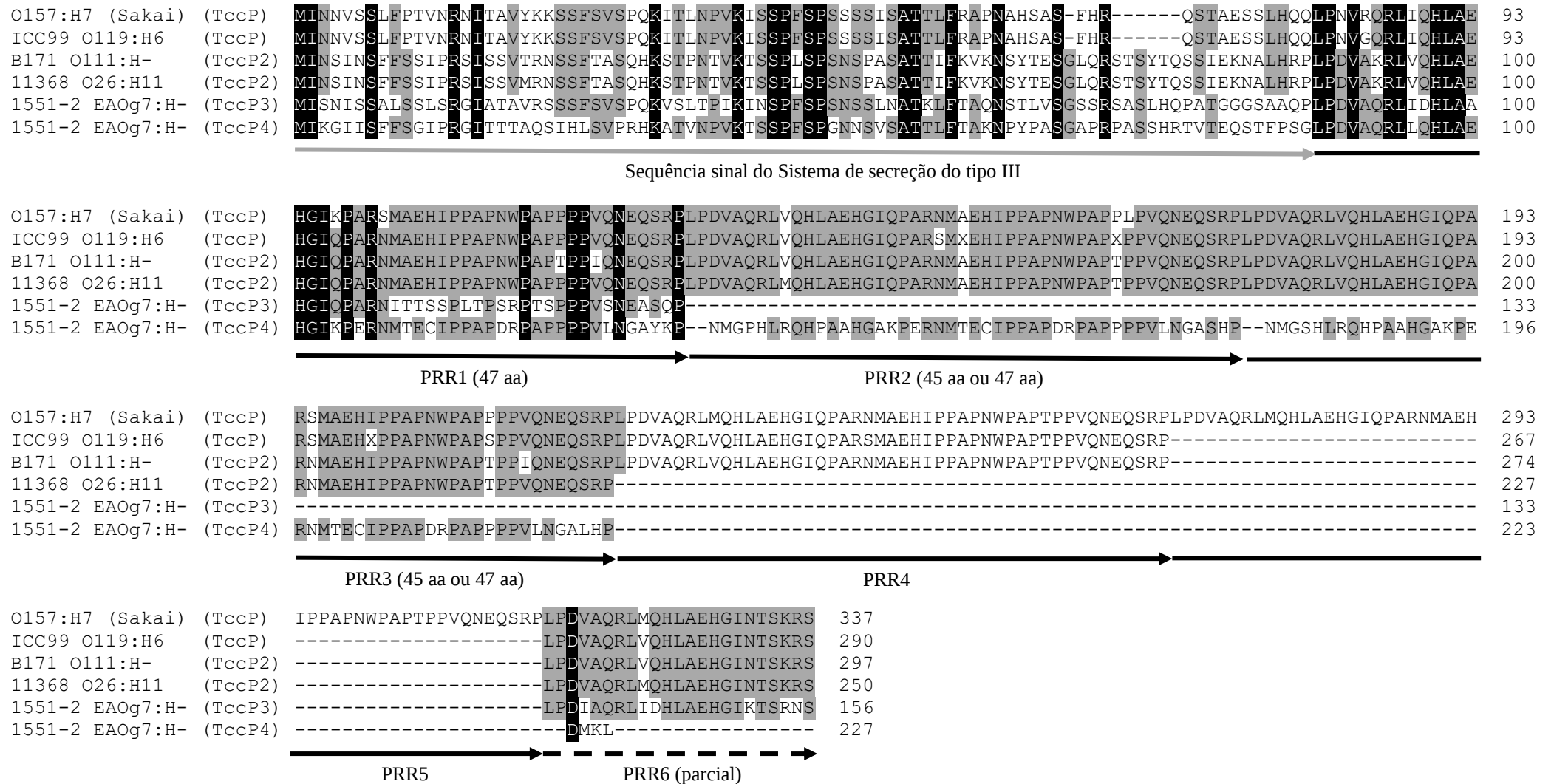


Figura 7. Comparação da sequência de aminoácidos de TccP4 de *E. albertii* 1551-2 com outras sequências de TccP conhecidas. Os aminoácidos marcados em preto e cinza indicam regiões conservadas e parcialmente conservadas, respectivamente, entre os subtipos de TccP. A sequência sinal do sistema de secreção do tipo III está indicado pela seta cinza. As regiões repetidas ricas em prolina (PRR) e a repetição parcial estão indicados pelas setas preta e seccionada, respectivamente.

Construção de mutantes e complementação *in trans* no gene *tccP4*

Com o intuito de verificar se a proteína TccP4 tem papel crítico no recrutamento de F-actina pela via Nck-independente, uma técnica de mutagênese empregando-se o sistema *Lambda Red* foi realizada. O isolado 1551-2 Δ *tccP3* foi utilizado para a deleção do gene *tccP4*, resultando em um duplo mutante (1551-2 Δ *tccP3*/ Δ *tccP4*). A complementação *in trans* no gene *tccP4* foi realizada utilizando o vetor pTccP4.

O isolado mutante 1551-2 Δ *tccP3*/ Δ *tccP4* e seu complementado 1551-2 Δ *tccP3*/ Δ *tccP4*(pTccP4), que foram obtidos nesse estudo, tiveram suas características genotípicas confirmadas por PCR, onde foi possível observar a perda do gene *tccP4* e sua presença, no caso da complementada. Desta forma, também foi confirmada a manutenção de características genotípicas antes presentes no isolado selvagem 1551-2, de modo a assegurar a identidade dos isolados derivados da selvagem 1551-2 (Figura 8 e Tabela 5).

Tabela 5. Características genotípicas e perfil de resistência dos isolados de *E. albertii* utilizados neste estudo

Isolados	Genes					Antimicrobianos ^b				
	<i>tccP3</i>	<i>tccP4</i>	<i>ble</i>	<i>eae</i>	omicrom	<i>wzxO7</i> ^a	Nal	Clo	Zeo	Kan
							20 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL	50 µg/mL
1551-2	+	+	-		+	+	R	S	S	S
1551-2 Δ <i>tccP3</i>	-	+	-		+	+	R	R	S	S
1551-2 Δ <i>tccP3</i> / Δ <i>tccP4</i>	-	-	+		+	+	R	R	R	S
1551-2 Δ <i>tccP3</i> / Δ <i>tccP4</i> (pTccP4)	-	+	+		+	+	R	R	R	R

^a: antígeno O.

^b: Ácido Nalidíxico (Nal), Cloranfenicol (Clo), Zeocina (Zeo), Canamicina (Kan).

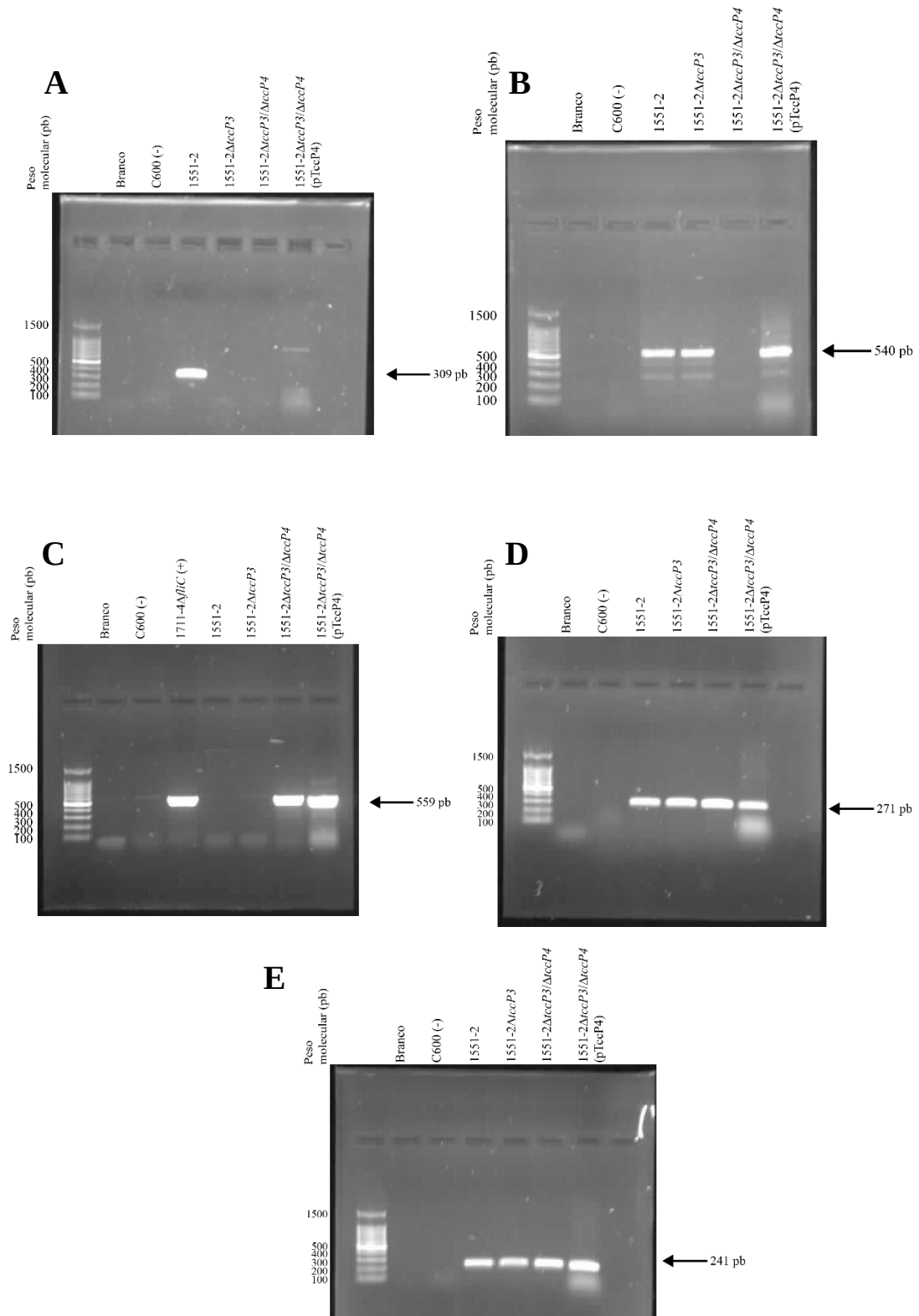


Figura 8. Confirmação das principais características genotípicas do isolado selvagem de *E. albertii* 1551-2 e seus derivados. A figura 8 corresponde aos resultados da reação de amplificação dos genes: *tccP3* (A), *tccP4* (B), *ble* (C), *eae* subtipo omicron (D) e *wzxO7* (E). Peso Molecular: 100pb ladder M1061 (Sinapse inc., Flórida, EUA).

Com o objetivo de confirmar a correta inserção do gene *ble* (que confere resistência a zeocina), substituindo o gene *tccP4*, novas reações de PCR foram realizadas combinando os iniciadores *tccP4*-flank-F/*ampli-zeo*-R e *ampli-zeo*-F/*tccP4*-flank-R, conforme ilustrado na figura 9A

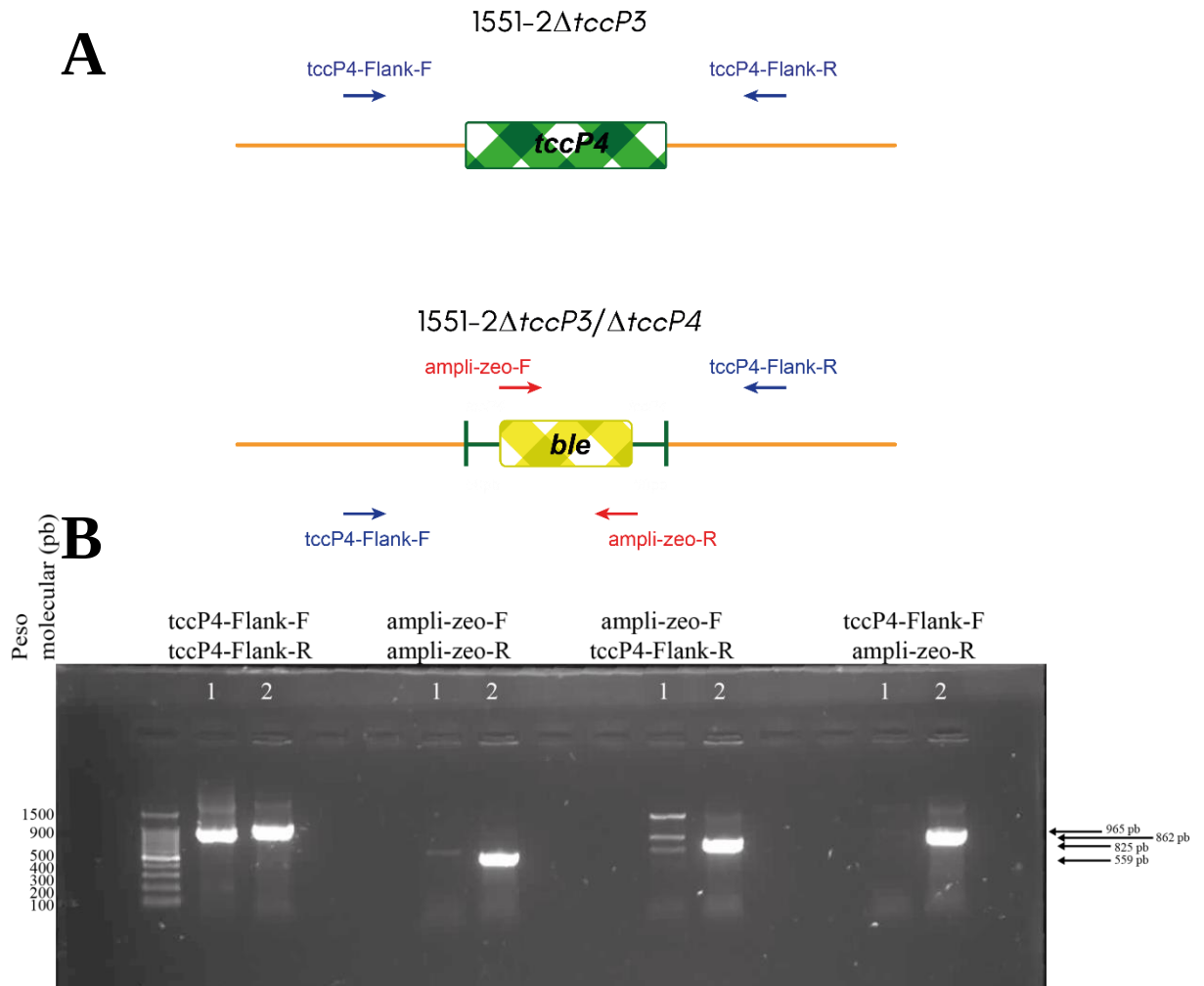
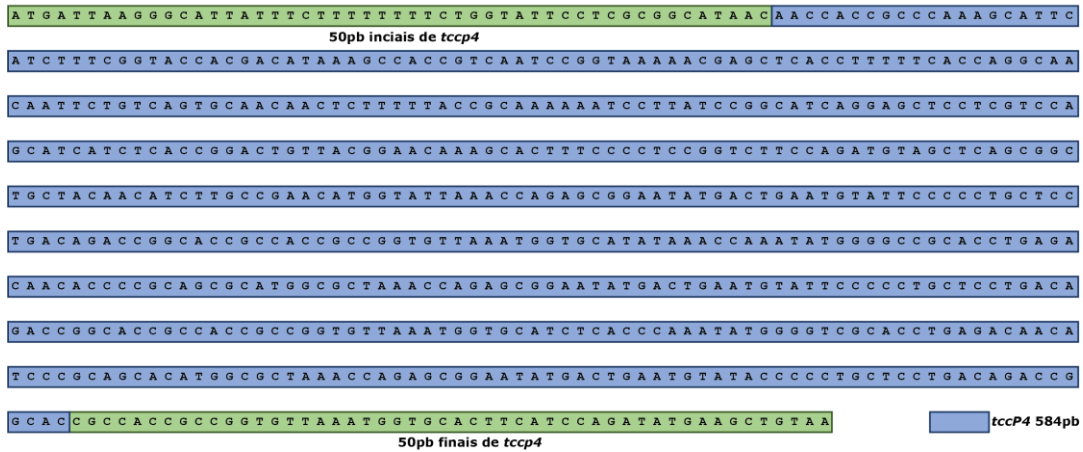


Figura 9. Confirmação da troca alélica entre o gene *tccP4* e *ble*. Representação esquemática das diferentes reações de PCR utilizadas para confirmar a deleção do gene *tccP4* e a correta inserção do gene *ble* no genoma do isolado de *E. albertii* 1551-2Δ*tccP3* (A). A figura B corresponde aos resultados das reações de PCR, sendo 1) 1551-2Δ*tccP3* e 2) 1551-2Δ*tccP3*/Δ*tccP4*. Peso Molecular: 100pb ladder M1061 (Sinapse inc, Flórida, EUA).

Como podemos observar na figura 9B, o duplo mutante amplificou nas quatro reações de PCR realizadas, confirmando dessa maneira que a troca alélica entre o gene *ble* e o gene *tccP4* ocorreu na região correta. Um sequenciamento *Sanger* com o fragmento de DNA obtido com *primer* desenhados em regiões que circundam o gene *tccP4* (*tccP4*-flank-F e *tccP4*-flank-R) foi realizado, utilizando a amostra selvagem e o duplo mutante 1551-2Δ*tccP3*/Δ*tccP4*. Este

método foi outra maneira de provar com alto grau de confiabilidade que o gene *tccP4* foi deletado no duplo mutante (Figura 10).

A) 1551-2



B) 1551-2 $\Delta tccP3/\Delta tccP4$

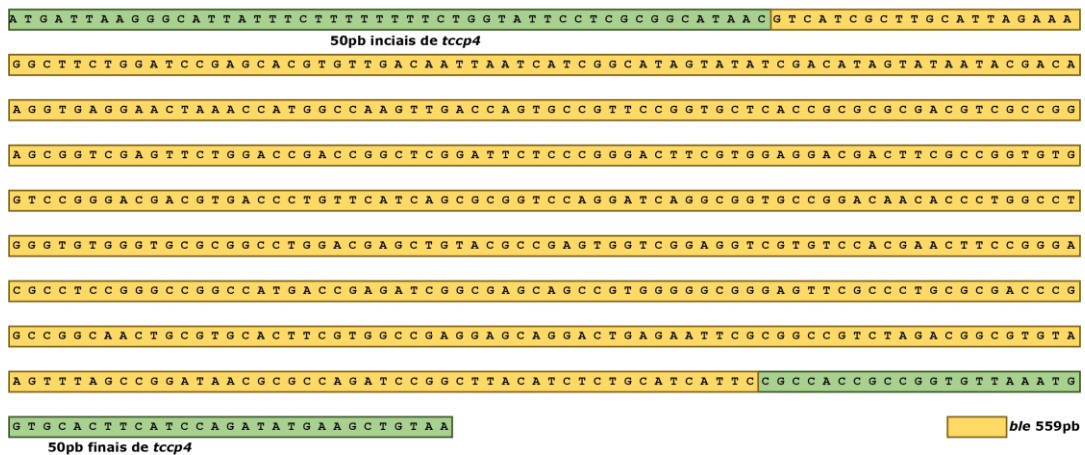


Figura 10. Comparação entre o sequenciamento do isolado 1551-2 selvagem (A) e duplo mutante 1551-2 $\Delta tccP3/\Delta tccP4$ (B) na região do gene *tccP4*. O sequenciamento desses dois isolados possibilitou evidenciar a troca alélica entre o gene *ble* (amarelo) e o gene *tccP4* (azul) no isolado mutante 1551-2 $\Delta tccP3/\Delta tccP4$. Os nucleotídeos em verde correspondem ao fragmento de DNA conservado na mutagênese.

As regiões demarcadas em verde indicam os 50 pb iniciais e finais que foram preservados na realização da mutagênese. A amostra selvagem (1551-2) apresenta 584 pb no intervalo dessas regiões; em contrapartida, a duplo mutante apresenta 559 pb, que corresponde ao tamanho do gene *ble* (resistência a zeocina) (Sampaio et al., 2009). Dessa maneira, demonstramos que houve a troca alélica mencionada anteriormente.

A confirmação da produção da proteína recombinante TccP4 fusionada ao epítipo Myc no isolado complementado 1551-2 $\Delta tccP3/\Delta tccP4$ (pTccP4) foi realizada por

immunoblotting empregando-se o soro monoclonal anti-Myc (Figura 11). Utilizando a ferramenta ExPASy (https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool), foi possível estabelecer a massa molecular da proteína TccP4 em 24 kDa; já o epítipo de Myc corresponde a 10 kDa. Sendo assim, a proteína recombinante TccP4-Myc deveria ter massa atômica de 34 kDa.

A produção de uma proteína com massa condizente com o esperado para a proteína recombinante TccP4-Myc foi detectada no ensaio de *immunoblotting*, empregando-se o soro monoclonal anti-Myc, somente no isolado 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4(pTccP4), confirmando a complementação.

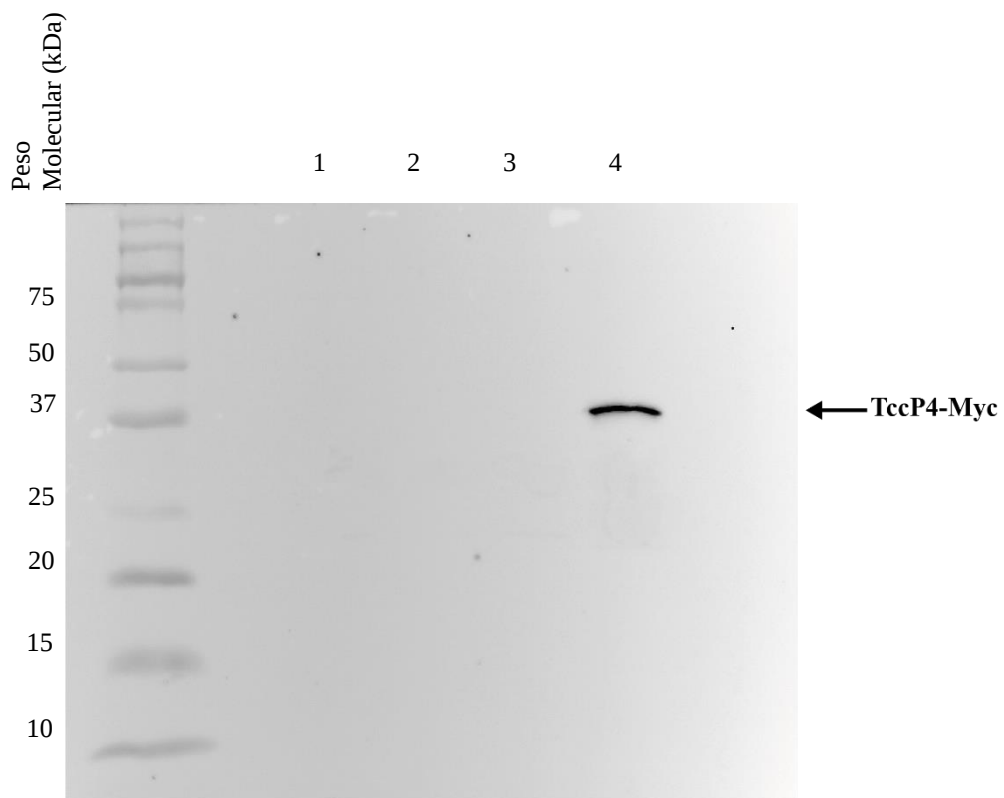


Figura 11. Immunoblotting com anticorpos α -Myc. A produção da proteína recombinante TccP4-Myc (34 kDa) está indicada pela seta. Os isolados utilizados foram: 1551-2 (1), 1551-2 Δ tccP3 (2) e 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4 (3) e 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4(pTccP4) (4). Nota-se a produção da proteína recombinante TccP4-Myc somente no isolado 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4(pTccP4). Massa molecular: Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards.

Para confirmar que os eventos de mutagênese e complementação não afetaram a capacidade de replicação dos isolados derivados do isolado de *E. albertii* 1551-2, uma curva de crescimento foi realizada (figura 12). Os resultados da curva de crescimento mostraram que todos os isolados utilizados neste estudo apresentaram capacidade de se multiplicar semelhante ao isolado selvagem 1551-2 ($P < 0.05$).

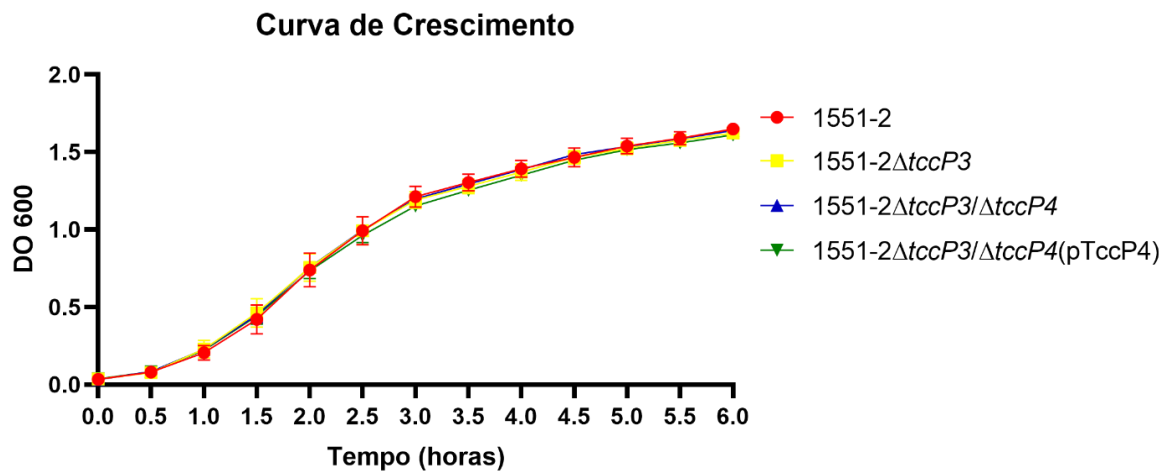


Figura 12. Curva de crescimento dos isolados utilizados neste estudo. Nota-se que não há diferença estatística de crescimento em nenhum dos isolados mutantes quando comparados ao isolado selvagem 1551-2, $P > 0,05$.

A proteína recombinante TccP4-Myc colocaliza com o acúmulo de F-actina promovido por *E. albertii* 1551-2

O ensaio de imunofluorescência demonstrou que a proteína recombinante TccP4-Myc (Figura 13E) colocalizava com a presença de pedestais de F-actina (figura 13D) e a aderência bacteriana (Figura 13F), no isolado 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4 (pTccP4). O isolado selvagem 1551-2 desprovido de pTccP4 não apresentou a produção da proteína recombinante (Figura 13B), por esse motivo foi utilizado como controle negativo.

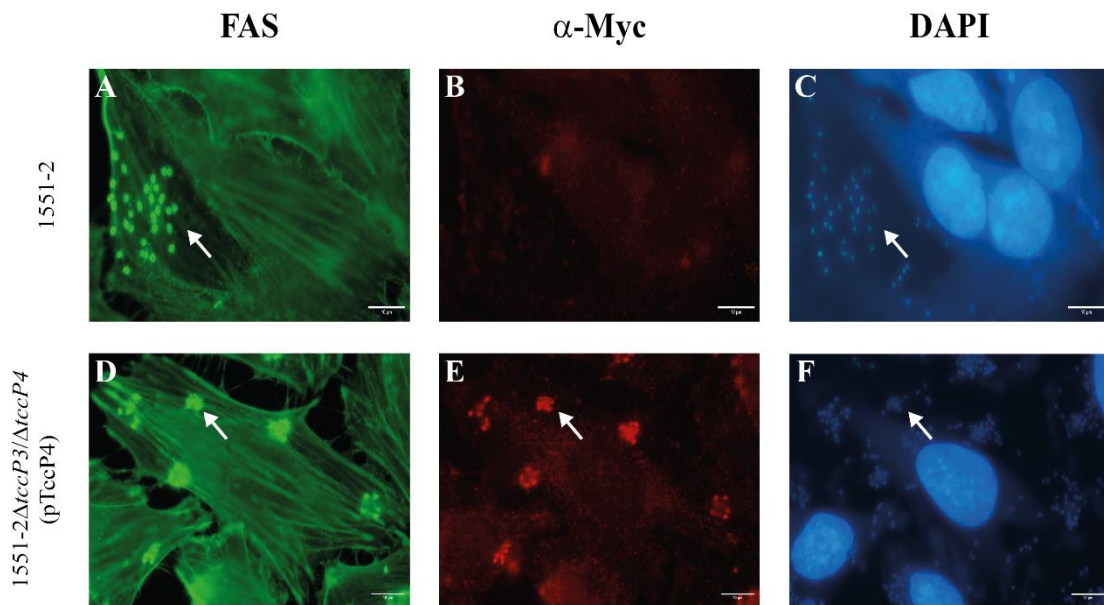


Figura 13. Ensaio de imunofluorescência demonstrando a produção da proteína recombinante TccP4-Myc pelo isolado 1551-2ΔtccP3/ΔtccP4(pTccP4) e a colocalização das bactérias aderidas às células HeLa com a polimerização de F-actina. Nota-se a produção da proteína recombinante TccP4-Myc pelo isolado 1551-2ΔtccP3/ΔtccP4(pTccP4) (13E), mas não pelo selvagem 1551-2 (13B). Barra de aumento: 10μm.

TccP4 é crucial para o recrutamento de F-actina por *E. albertii* 1551-2

O teste de FAS foi realizado com a linhagem celular HeLa, como controle dos isolados bacterianos utilizados neste estudo, visto que essas células possibilitam a formação de pedestais por ambas as vias de recrutamento de actina (Nck dependente e independente). Como esperado, os protótipos tEPEC E2348/69 e EHEC EDL933 apresentaram resultados conforme descritos na literatura (figura 14). É possível observar que todos os isolados demonstraram capacidade de causar a lesão AE no sítio de aderência bacteriano, uma vez que há acúmulo de F-actina no mesmo local de presença bacteriana (Figura 15).

Na linhagem celular MEF Nck (-/-), os protótipos de tEPEC E2348/69 e a EHEC EDL933 foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Assim como em HeLa, esses isolados apresentaram resultados já descritos na literatura (figura 11). Em relação aos demais isolados utilizados neste estudo, foi observado que a mutação no gene *tccP4* resultou em uma perda substancial na capacidade de recrutar filamentos de actina no sítio de aderência bacteriana. A complementação em *trans* (1551-2ΔtccP3/ΔtccP4(pTccP4)), como visto na figura 16, restaurou a capacidade desse patógeno em causar a lesão AE. Desta forma, todos os dados sugerem que a proteína adaptadora TccP4, tem papel crítico na formação da lesão AE nas células infectadas.

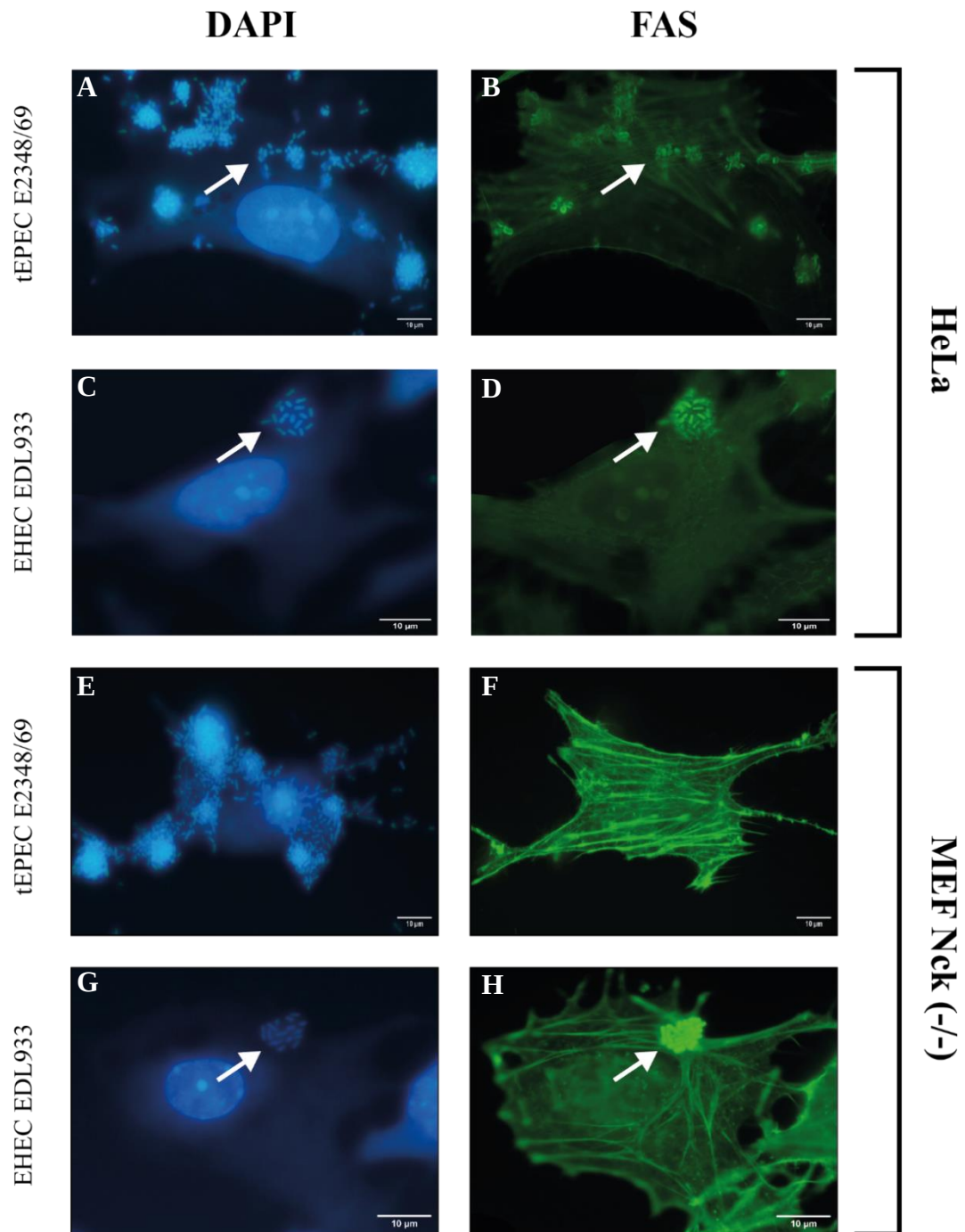


Figura 14. Controles bacterianos utilizados no teste de FAS. Microscopia de fluorescência representando os controles utilizados, tEPEC E2348/69 e EHEC EDL933, em ensaios realizados em células HeLa e MEF Nck (-/-). Setas indicam o acúmulo de F-actina (FAS) e a presença de bactéria aderidas (DAPI). Observa-se que o isolado de tEPEC E2348/69 apresentou inabilidade no acúmulo de F-actina pela via Nck independente (F) nas células MEF Nck (-/-) desprovidas da proteína eucariótica Nck. Barra de aumento: 10 μm.

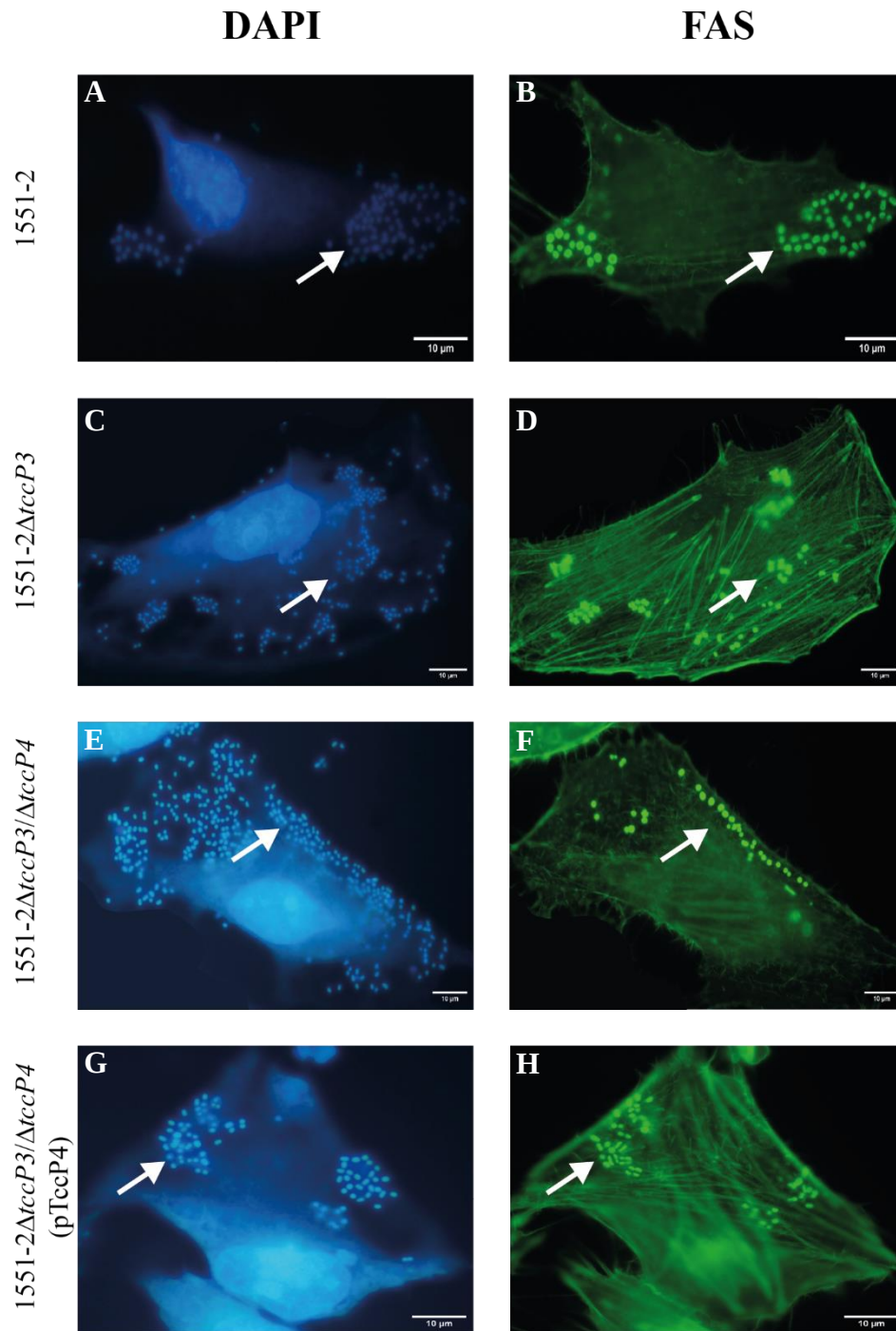


Figura 15. Detecção da polimerização de F-actina pelo isolado selvagem de *E. albertii* 1551-2 e seus derivados em células HeLa infectadas. A dupla marcação com DAPI e Faloidina possibilitou a visualização das células bacterianas e eucarióticas (A, C, E e G) e dos filamentos de actina (B, D, F, H) após ensaios de infecção com os isolados de interesse. Todos os isolados testados levaram ao acúmulo de F-actina em células HeLa nos locais de aderência bacteriana, conforme indicado pelas setas nos painéis B, D, F e H. Barra de aumento: 10 μ m.

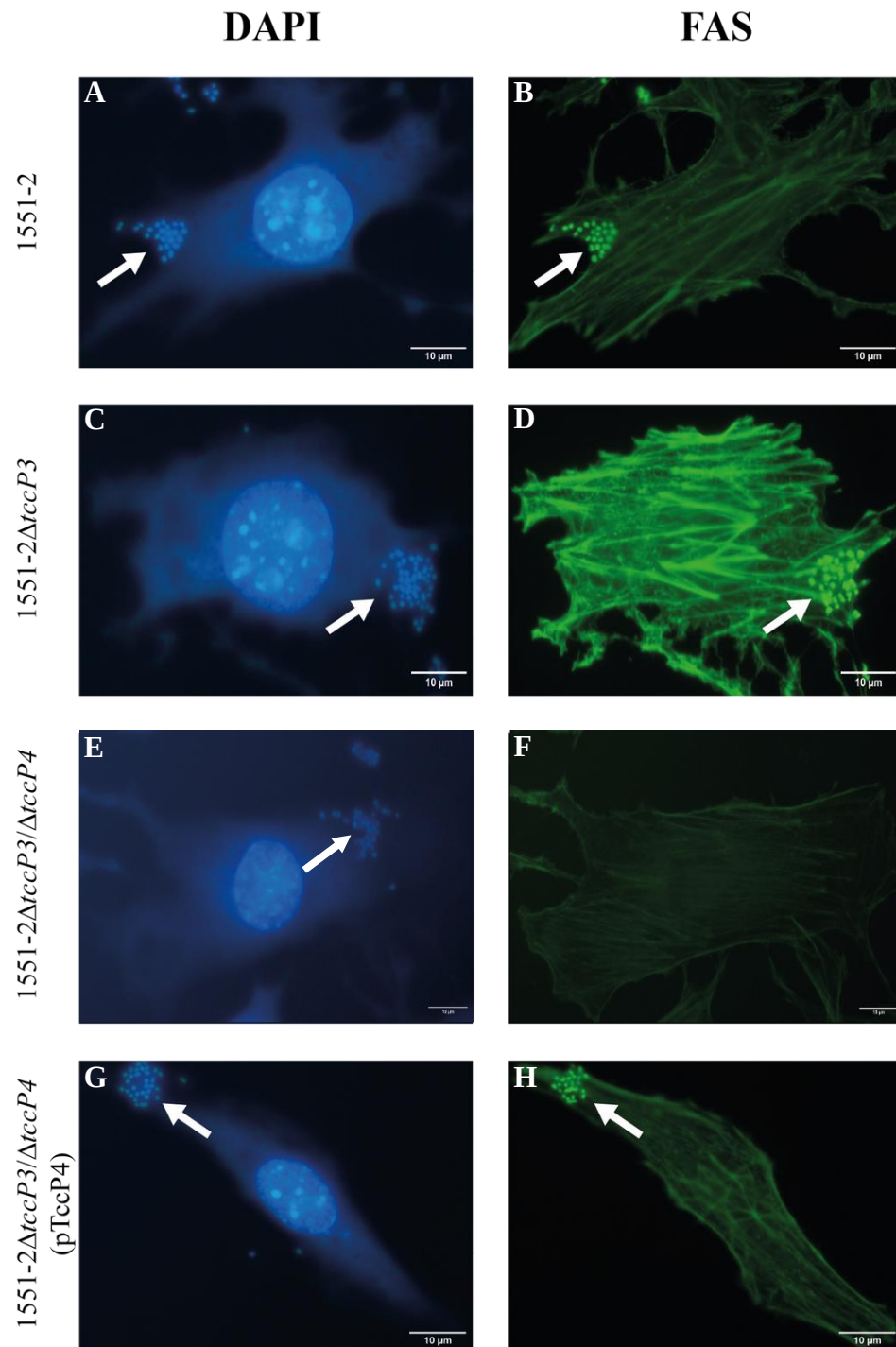


Figura 16. Detecção da polimerização de F-actina pelo isolado selvagem de *E. albertii* 1551-2 e seus derivados em células MEF Nck (-/-) infectadas. A dupla marcação com DAPI (A, C, E e G) e Faloidina (B, D, F e H) revelou que a ausência da proteína adaptadora TccP4 no isolado 1551-2 Δ tccP3/ Δ tccP4 (F) resultou na perda da capacidade desse isolado em recrutar F-actina em células desprovidas da proteína eucariótica Nck. As setas indicam a presença de bactéria aderida (A, C, E e G), e a correlação dessa aderência com o acúmulo de F-actina (B, D e H) promovido por esse patógeno. Barra de aumento: 10 μ m.

Quantificação dos pedestais de F-actina em células MEF desprovidas de Nck

Para verificar se os eventos de mutagênese e complementação não alteraram a capacidade dos isolados em aderir às células hospedeiras, foram quantificadas a presença de bactérias aderidas (Figura 17B), não havendo diferença estatística entre os isolados utilizado neste estudo. A ausência do gene *tccP4* resultou em uma redução significativa (14,22 vs 1,09; $P < 0,0001$) na quantidade de pedestais de F-actina formados pelo isolado mutagenizado (Figura 17A).

Um gráfico relacionando a quantidade de pedestais de actina e a aderência bacteriana foi construído, mostrando que o isolado selvagem 1551-2 e o mutante 1551-2 Δ *tccP3* foram eficientes na formação da lesão AE, com 72,7% e 74,57% de bactérias aderidas colocalizadas com a polimerização de F-actina em células MEF Nck (-/-) infectadas (Figura 17C). Por outro lado, apenas 2,4% dos isolados de *E. albertii* desprovidos do gene *tccP4* preservaram essa habilidade. A complementação *in trans* restaurou esse fenótipo, com eficiência semelhante ao isolado selvagem (72,7% vs. 71,74%; $P = 0,9944$).

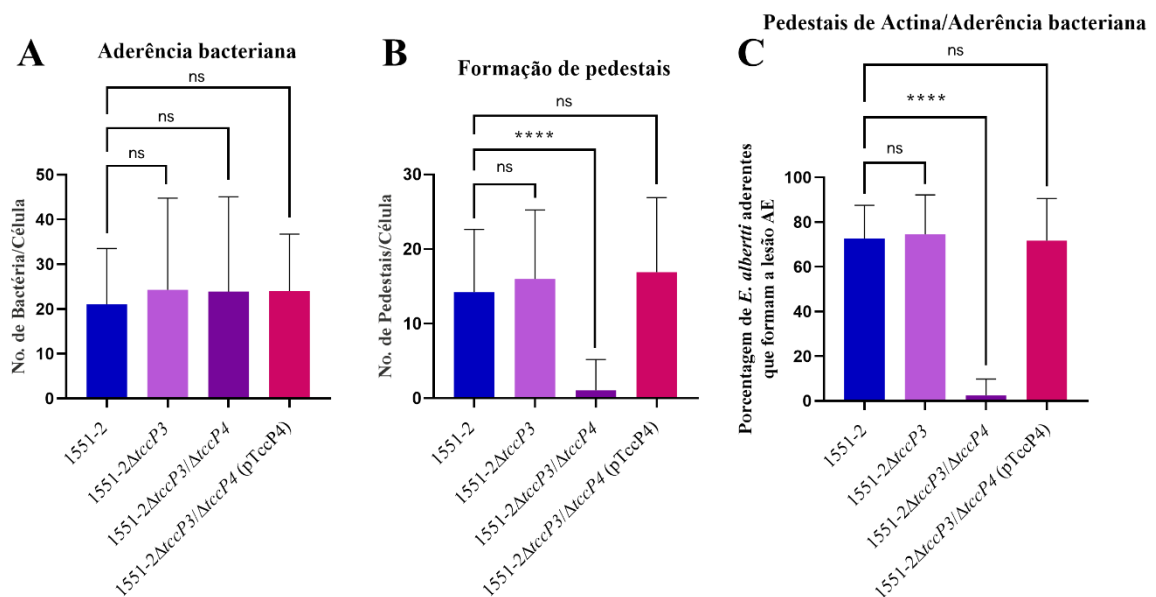


Figura 17. A proteína TccP4 é crucial para a formação da lesão AE em células infectadas por *E. albertii* 1551-2. As figuras A, B e C representam o número total de bactérias aderidas (A), a quantificação do número de pedestais de F-actina (B), bem como a relação entre formação de pedestais e número de bactérias aderidas (C) dos quatros isolados utilizados neste estudo. O ensaio quantitativo de FAS demonstrou não haver diferença estatística na aderência bacteriana em células MEF Nck(-/-) entre os isolados avaliados. Por outro lado, o isolado mutante 1551-2 Δ *tccP3*/1551-2 Δ *tccP4* apresentou uma redução de 96.7% na capacidade de causar a lesão AE nas células infectadas. ns = non-significant, **** p < 0,0001.

DISCUSSÃO

O recente reconhecimento de *E. albertii* como um patógeno intestinal vem trazendo à luz várias discussões de como essa bactéria é capaz de colonizar e causar danos às células hospedeiras, culminando com o estabelecimento da doença diarreica. Assim como os isolados de EPEC, *E. albertii* é capaz de se aderir intimamente às células epiteliais do hospedeiro, e induzir mudanças na composição estrutural do citoesqueleto eucariótico, ocasionando uma lesão AE (MOON et al., 1983). Um estudo, conduzido por Donnenberg e colaboradores, demonstrou que a proteína codificada pelo gene *eae* era essencial para a patogenicidade dessa bactéria (Donnenberg et al., 1993). Analogamente, isolados de *E. albertii* também albergam esse gene (Hernandes et al., 2006; Vieira et al., 2001), sugerindo que esses dois patógenos possam compartilhar ferramentas de virulência no estabelecimento da doença diarreica.

Estudos anteriores demonstraram que o protótipo brasileiro de *E. albertii* 1551-2, alvo deste estudo, albergava um resíduo de tirosina equivalente a Y₄₇₄, presente na proteína Tir, secretada por tEPEC (Hernandes et al., 2008). Além do mais, ensaios realizados em células HeLa demonstraram a colocalização do acúmulo de F-actina com a proteína Tir fosforilada, sugerindo que esse isolado recrutava F-actina pela via Nck dependente.

O sequenciamento completo desse protótipo (Romão et al., 2018) revelou um novo tipo de TccP, nomeado de TccP3 (Romão et al., 2020). Nesse mesmo estudo, foi demonstrada a capacidade da 1551-2 de recrutar F-actina pela via independente de Nck. Para isso, foram realizados ensaios de interação bacteriana com células MEF Nck (-/-). No entanto, como também mostrado nesse estudo, o isolado mutagenizado no gene *tccP3* não perdeu a capacidade de recrutar F-actina, sugerindo que a proteína TccP3 não desempenhasse um papel para o estabelecimento desse fenótipo.

Dessa maneira, com análises genômicas do protótipo brasileiro de *E. albertii* 1551-2, identificamos um gene que codifica uma nova variante de TccP/EspF_U, denominada no presente estudo de TccP4. É importante ressaltar que a sequência de aminoácidos da proteína TccP4 tem uma similaridade inferior a 80% com os outros tipos de TccP identificados até o presente momento (TccP, TccP2 e TccP3), sugerindo que essa proteína deveria ser classificada como um novo membro da família TccP/EspF_U.

Os ensaios de interação bacteriana com células MEF Nck (-/-) nos permitiu observar o papel da proteína TccP4 no recrutamento de F-actina independentemente da proteína Nck. O protótipo de tEPEC E2348/69, utilizado como controle negativo nos testes com células MEF Nck (-/-), foi incapaz de recrutar F-actina da célula eucariótica, uma vez que esse é um evento dependente do recrutamento de Nck, que se dá após a fosforilação do resíduo de tirosina na

posição 474 (Y₄₇₄) do receptor translocado Tir, levando à ativação de N-WASP e do complexo Arp 2/3 (Devinney et al., 2001; Kenny, 1999). Como mencionado anteriormente, a proteína eucariótica Nck é ausente na linhagem celular MEF Nck (-/-), o que explica a inabilidade do isolado tEPEC E2348/69 em recrutar F-actina nesse cenário. Em contrapartida, o isolado de EHEC EDL933 recrutou F-actina nos sítios de interação com as células MEF Nck (-/-). Isso pode ser explicado pelo fato desse isolado utilizar da via independente de Nck, uma vez que a proteína Tir secretada por esse patógeno não apresenta o resíduo Y₄₇₄. Sendo assim, o motivo NPY₄₅₈, localizado na porção C-terminal de Tir, é crucial no recrutamento de F-actina pela via Nck-independente, juntamente com a proteína adaptadora TccP/EspF_U que é secretada por esse isolado pelo sistema de secreção do tipo 3.

A análise da sequência de aminoácidos de TccP4 possibilitou observar a presença de três regiões repetidas ricas em prolina (PRR). Essa é uma observação importante uma vez que Garmendia e colaboradores sugeriram que a presença, de pelo menos, uma região N-terminal e duas PRR são necessárias para desencadear a polimerização de F-actina em células epiteliais infectadas. (Garmendia et al., 2006). O papel desempenhado pelas PRR, deve-se à presença do motivo PxxP, que apresenta alta afinidade com o domínio SH3 de IRTKS/IRSp53 (*insulin receptor tyrosine kinase substrate*). A proteína eucariótica IRTKS/IRSp53 serve como um elo de ligação entre a proteína adaptadora TccP/EspF_U e o receptor Tir, no processo de recrutamento de F-actina que ocorre nas células eucarióticas infectadas por patógenos que são capazes de induzir a lesão AE pela via Nck-independente (Aitio et al., 2010).

As sequências de aminoácidos dos domínios SH3 formam uma espécie de bolsões de ligação de peptídeo, e a seletividade dessa interação é determinada pelo “bolso de especificidade”, onde o reconhecimento específico do domínio SH3 de IRTKS depende da presença e posicionamento correto de dois motivos PxxP consecutivamente (Aitio et al., 2010). Sendo assim, interação entre os motivos PxxP com o domínio SH3 de IRTKS estabelece uma ponte entre TccP e o Tir bacteriano, possibilitando o desencadeamento em cascata do processo de recrutamento de F-actina. O segmento rico em prolina da proteína TccP/EspF_U da EHEC O157:H7 abriga dois motivos PxxP, que estão sublinhados na sequência a seguir: ²⁷IPPAPNWPAPPPP³⁹ (Aitio et al., 2010). Em TccP4, esses dois motivos PxxP são conservados (²⁷IPPAPDRPAPPPP³⁹), sugerindo que a presença de aminoácidos com alta afinidade ao domínio SH3 indica o potencial de TccP4 em se ligar à proteína eucariótica IRTKS, no recrutamento de F-actina, para formação de pedestal.

A inserção da proteína TccP na célula eucariótica hospedeira, pelo sistema de secreção do tipo 3 bacteriano, possibilita ativar proteínas pertencentes à família WASP (*Wiskott-Aldrich*

syndrome protein) que são partes essenciais da cascata de polimerização de F-actina durante a formação da lesão AE. Em um trabalho publicado por Cheng e colaboradores (2008), foi demonstrado que uma sequência de 27 aminoácidos da região N-terminal dos PRRs apresenta alta afinidade pelo domínio central GBD (*GTPase binding domain*) de N-WASP. Essa interação leva à ativação de proteínas pertencentes à família WASP e, posteriormente, a ativação do complexo Arp 2/3, culminado na formação dos pedestais de F-actina. É importante ressaltar que, na proteína TccP4 do protótipo brasileiro de *E. albertii* 1551-2, o primeiro PRR contém essa sequência de 27 aminoácidos que, teoricamente, apresenta alta afinidade pelo domínio central GBD de N-WASP, enquanto os outros dois PRRs não apresentam os dois primeiros aminoácidos dessa sequência N-terminal. Apesar dessa diferença, a proteína TccP4 mostrou-se colocalizando com o acúmulo de F-actina e ser essencial para a formação do pedestal.

Sendo assim, observamos que a proteína identificada neste estudo apresenta resíduos de aminoácido parcialmente conservados, quando comparada com outros TccPs, gerando evidências das possíveis interações de TccP4 com proteínas eucarióticas no recrutamento de F-actina na formação de pedestal.

CONCLUSÃO

Nossos dados levaram a identificação de uma nova proteína, aqui nomeada como TccP4. Além disso, foi demonstrado que TccP4 é crucial para o recrutamento de F-actina, pela via Nck-independente, durante a formação da lesão AE em células hospedeiras infectadas por *E. albertii*, podendo contribuir na patogênese desse microrganismo.

REFERÊNCIAS

- AITIO, O. et al. Recognition of tandem PxxP motifs as a unique Src homology 3-binding mode triggers pathogen-driven actin assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 50, p. 21743–21748, 14 dez. 2010.
- ALBERT, M. J. et al. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 4, p. 1507–1513, 1991.
- ALBERT, M. J. et al. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 310–314, 1992.
- ASOSHIMA, N. et al. Identification of *Escherichia albertii* as a causative agent of a food-borne outbreak occurred in 2003. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 67, n. 2, p. 139–140, 2014.
- BATISSON, I. et al. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4516–4525, 2003.
- BRANDAL, L. T. et al. Shiga Toxin 2a in *Escherichia albertii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1454–1455, 2015.
- CAMPELLONE, K. G.; ROBBINS, D.; LEONG, J. M. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Developmental Cell**, v. 7, n. 2, p. 217–228, 2004.
- CHENG, H. C. et al. Structural mechanism of WASP activation by the enterohaemorrhagic *E. coli* effector EspFU. **Nature**, v. 454, n. 7207, p. 1009–1013, 21 ago. 2008.
- CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640–6645, 2000.
- DEVINNEY, R. et al. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1445–1458, 2001.
- DONNENBERG, M. S. et al. Role of the *eaeA* Gene in Experimental Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. **J Clin. Invest**, 1993.
- ELLIOTT, S. J.; YU, J.; KAPER, J. B. The Cloned Locus of Enterocyte Effacement from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Unable To Confer the Attaching and Effacing Phenotype upon *E. coli* K-12. **Infection and Immunity**, p. 4260–4263, 1999.
- FEDOR, Y. et al. From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: A new mode of action of the *Escherichia coli* Cytotoxic Distending Toxin. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2013.
- GARMENDIA, J. et al. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1167–1183, 2004.
- GARMENDIA, J. et al. Characterization of TccP-mediated N-WASP activation during enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1444–1455, set. 2006.
- GAYTÁN, M. O. et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 129, p. 1–25, 2016.
- GOMES, T. A. T. et al. *Escherichia albertii* Pathogenesis. **EcoSal Plus**, v. 9, n. 1, 2020.
- GRASSO, F.; FRISAN, T. Bacterial genotoxins: Merging the DNA damage response into infection biology. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1762–1782, 2015.

- GRASSO, F.; FRISAN, T. Bacterial genotoxins: Merging the DNA damage response into infection biology. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1762–1782, 2015.
- HERNANDES, R. T. et al. Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3793–3802, 2013.
- HERNANDES, R. T. et al. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4214–4217, 2006.
- HERNANDES, R. T. et al. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 415–425, 2008.
- HINENOYA, A. et al. Isolation and characterization of an *Escherichia albertii* strain producing three different toxins from a child with diarrhea. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 70, n. 3, p. 252–257, 2017.
- HUYS, G. et al. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 807–810, 2003.
- INGLIS, T. J. J. et al. First bacteraemic human infection with *Escherichia albertii*. **New Microbes and New Infections**, v. 8, p. 171–173, 2015.
- JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 20, p. 7839–7843, 1990.
- JINADASA, R. N. et al. Cytolethal distending toxin: A conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. **Microbiology**, v. 157, n. 7, p. 1521–1875, 2011.
- JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences** 8: 275-282.
- JONES, N. et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 818–823, 2006.
- KENNY, B. et al. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511–520, 1997.
- KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1229–1241, 1999.
- KNUTTON, S. et al. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1290–1298, 1989.
- KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209–222, jul. 2013.
- KONNO, T. et al. Isolation and identification of *Escherichia albertii* from a patient in an outbreak of gastroenteritis. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 65, n. 3, p. 203–207, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LANATA, C. F. et al. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72788, 4 set. 2013.
- LAI, Y. et al. Intimate host attachment: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 1796–1808, 2013.

- LIMA, M. P. et al. Phenotypic characterization and virulence-related properties of *Escherichia albertii* strains isolated from children with diarrhea in Brazil. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 2, 2019.
- MAEDA, E. et al. Detection of *Escherichia albertii* from chicken meat and Giblets. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 7, p. 871–873, 2015.
- MAHEUX, A. F. et al. Characterization of *Escherichia fergusonii* and *Escherichia albertii* isolated from water. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 597–609, 2014.
- MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 92, n. 5, p. 1664–1668, 1995.
- MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 399–407, 1997.
- MARTINS, F. H. et al. Interactions between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and Gut Commensals at the Interface of Human Colonoids. **mBio**, v. 13, n. 3, 1 jun. 2022.
- MARTINS, F. H. et al. Phylogenetic distribution of tir-cytoskeleton coupling protein (tccP and tccP2) genes in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 11, p. 1–7, 2017.
- MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340–1351, 1983.
- MURAKAMI, K. et al. Shiga toxin 2f-producing *Escherichia albertii* from a symptomatic human. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 67, n. 3, p. 204–208, 2014.
- NICHOLLS, L.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 275–288, 2000.
- O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 2, p. 675–683, 1983.
- OOKA, T. et al. Clinical significance of *Escherichia albertii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 488–492, 2012.
- OOKA, T. et al. Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 12, p. 3170–3179, 2015.
- ORI, E. L. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: Pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. **Epidemiology and Infection**, v. 147, 2019.
- PACHECO, V. C. R. et al. Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 2, p. 167–175, 2014.
- PICHON, C. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* AL511 requires flagellum to enter renal collecting duct cells. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 616–628, 2009.
- ROMÃO, F. T. et al. Genomic Properties and Temporal Analysis of the Interaction of an Invasive *Escherichia albertii* With Epithelial Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–14, 2020.
- ROMÃO, F. T. et al. Influence of environmental factors in the adherence of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain to epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.
- ROMÃO, F. T. et al. Complete genome sequence of *Escherichia albertii* strain 1551-2, a potential extracellular and intracellular pathogen. **Genome Announcements**, v. 6, n. 9, p. 1–2, 2018.

- STEPHEN, F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Res.** 25:3389-3402, 1997
- SAMPAIO, S. C. F. et al. The flagella of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes in vitro. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4406–4413, out. 2009.
- SHIGA, K. 1898. Ueber den Dysenterie-bacillus (*Bacillus dysenteriae*). **Zentralbl Bakteriol Orig** 24:913–918
- TAIEB, F. et al. The Enterobacterial Genotoxins: Cytolethal Distending Toxin and Colibactin. **EcoSal Plus**, v. 7, n. 1, 2016.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution** <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- VIEIRA, M. A. M. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry eae and lack the EPEC adherence factor and shiga toxin DNA probe sequences. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 5, p. 762–772, 2001.
- WANG, H. et al. Prevalence of eae-positive, lactose non-fermenting *Escherichia albertii* from retail raw meat in China. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 1, p. 45–52, 2016.
- WHO, World Health Organization. Diarrhoeal disease. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. Acessado em 8 fev. 2022.
- YAMAMOTO, D. et al. *Escherichia albertii*, a novel human enteropathogen, colonizes rat enterocytes and translocates to extra-intestinal sites. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2017.
- YAMAMOTO, D. et al. Invasiveness as a putative additional virulence mechanism of some atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains with different uncommon intimin types. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–10, 2009.