

JÚLIA MITICO NARA

ADESINAS FIMBRIAIS EM *Escherichia coli*

ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA:

PREVALÊNCIA E PROTEÔMICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

JÚLIA MITICO NARA

**ADESINAS FIMBRIAIS EM *Escherichia coli*
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA:
PREVALÊNCIA E PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof. Dra. Roxane Maria
Fontes Piazza

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel
Carvalho Pimenta

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Nara, Júlia Mítico.

Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: prevalência e proteômica / Júlia Mítico Nara. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profª Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Proteômica bacteriana

Versão do título para o inglês: Fimbrial adhesins in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*: prevalence and proteomics.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. Genes 3. Proteínas 4. Reação em cadeia por polimerase (PCR) 5. Espectrometria de massas (MS) prevalência e proteômica I. Piazza, Profª Dra. Roxane Maria Fontes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB020/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Júlia Mitico Nara.

Título da Tese: Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: prevalência e proteômica.

Orientador(a): Profª Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

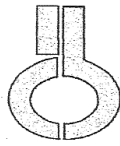
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° 047 nas fls. 45 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Roxane Maria Fontes Piazza** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Análise proteômica de adesinas fimbriais de Escherichia coli enteropatogênica atípica**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Júlia Mítico Nara**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária -Suplente
CEEA - ICB/USP

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, pela oportunidade de retornar ao Laboratório de Bacteriologia e desenvolver este trabalho, que muito contribuiu com um passo a mais no meu desenvolvimento profissional. Muito obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador Dr. Daniel Carvalho Pimenta, o *expert* em espectrometria de massas, que soube explicar e orientar a cada passo deste estudo, no qual sem a sua inestimável colaboração não se realizaria. Meu muito obrigado!

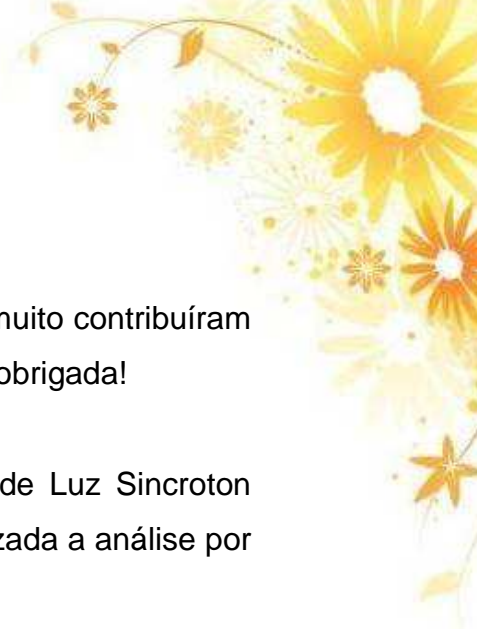
À Dra. Patrícia Abreu de Aniz, agradeço pelas sugestões e disponibilidade por me ensinar a trabalhar com proteoma, base fundamental para a realização deste estudo.

À Dra. Solange Massa do Laboratório de Imunogenética, agradeço por sua disponibilidade e boa vontade ao me explicar como utilizar o *software ImageMaster™ 2D Platinum 6.0*, importantíssimo para análise dos géis 2D.

À Dra. Cecília Abe do Laboratório de Biologia Celular, agradeço pela sua inestimável colaboração na obtenção das imagens por microscopia. Obrigada!

Aos Drs. Waldir Pereira Elias Jr. e Sérgio Paulo Dejato da Rocha, agradeço as sugestões que muito contribuíram na padronização dos ensaios de PCR.

À Dra. Claudia Trigo Pedroso de Moraes e a Natalia Cristina de Freitas pela grande contribuição técnica, na produção dos diferentes ensaios de bancada, realizada ao longo deste estudo. Muito obrigada!



À Dra. Denise Horton, agradeço pelas sugestões que muito contribuíram na elaboração escrita desta tese e de outros trabalhos. Muito obrigada!

À Dra. Adriana Paes Leme do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), responsável pelo Laboratório de Massa onde foi realizada a análise por ESI-Q-Tof das proteínas identificadas neste estudo.

Às Dras. Tânia Gomes do Amaral e Beatriz Guth do departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que gentilmente forneceram várias das cepas de *E. coli*, utilizadas como controles nos ensaios de PCR.

Aos amigos de bancada: Cris Souza, Dani, Letícia, Márcio, Sarita, Fran, Tati, Keyde, Carol Menezes, Hebert e Cris Culler, Marina, Silvio, Gabi, Chris Ozaki e Cíntia pelo convívio diário compartilhando idéias, sugestões e brincadeiras.

Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan: Demétria, Edson, Eliane, Juliana, Juscelino, Maria, Regina, Sebastiana e Thaís que gentilmente e com disposição, muito contribuem no cotidiano para facilitar o trabalho de pesquisadores e estudantes, através do apoio de serviço técnico realizado por vocês. Obrigada!

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de SP) pelo apoio financeiro, que foi de fundamental importância, durante o desenvolvimento deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês.



Resumo

NARA, J. M. **Adesinas fimbriais em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica: prevalência e proteômica.** 2012. 148 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Escherichia coli enteropatogênica atípica (EPECa) emergiu mundialmente como uma significativa causa de diarreia pediátrica. Em células epiteliais *in vitro*, devido à ausência da fímbria *Bundle-Forming Pilus* (BFP), esse patotipo não apresenta o padrão de adesão localizado em 3 h observado nas EPEC típicas. Por outro lado, os isolados de EPECa podem não aderir ou apresentar os padrões de aderência localizado-*like*, agregativo, difuso ou indeterminado. Como esses fenótipos de aderência são também observados em outros patotipos de *E. coli*, o objetivo deste estudo foi pesquisar nas EPECa a presença de genes de adesinas encontrados em outras *E. coli* patogênicas e analisar comparativamente por proteoma os extratos protéicos dos isolados de EPECa BA320 (localizado-*like*), Ec292/84 (agregativo), 9100-83 (difuso) e BA4013 (não aderente). Por microscopia eletrônica de transmissão observou-se a presença de diferentes estruturas filamentosas ancoradas a superfície nos quatro isolados de EPECa. Também verificou-se a presença dos genes *fimA*, *fimH*, *papA*, *ecpA*, *IdaH*, *pilS*, *daaC*, *sfpA*, *lpfA*₀₁₁₃ e os variantes polimórficos (*lpfA1* e *lpfA2*) por PCR. Enquanto, por proteômica, utilizando gel 2D e LC-MS/MS, foram identificadas nos extratos protéicos das EPECa, extraídos com *Omnimixer* e precipitados com sulfato de amônio, diversas proteínas envolvidas em diferentes processos funcionais das bactérias, incluindo proteínas indiretamente envolvidas no mecanismo de adesão bacteriana. Entre as estruturas encontradas estão: uma proteína envolvida no processo de regulação transcricional (*Histone-like Nucleoid Structuring*, H-NS), uma proteína de membrana (*Outer membrane protein*, OmpX), as proteínas metabólicas *Universal stress protein* (Usp), a glicoproteína *L-Fucose mutarotase* (FucU) e a proteína transportadora *galactose-binding transport* (MglB) associadas ao processo de funcionamento das adesinas fimbriais de *E. coli*. Nos extratos protéicos também foram identificadas algumas proteínas hipotéticas, dentre as quais se destaca uma possível proteína filamentososa encontrada nas EPECa com os fenótipos de adesão localizado-*like*, agregativo e difuso. Os resultados obtidos nos permitem concluir que os genes que codificam a fímbria tipo 1 e a fímbria ECP são altamente prevalentes nos isolados de EPECa e que as proteínas identificadas no proteoma dos quatro isolados de EPECa, que estão relacionadas as diferentes funções bacterianas, podem funcionar como complexos protéicos, direta ou indiretamente, envolvidos no processo de adesão.

Palavras-chaves: EPECa. Genes. Fímbrias. Proteoma. PCR. Gel de eletroforese 2D. LC-MS/MS.

Abstract

NARA, J. M. **Fimbrial adhesins in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*: prevalence and proteomics**. 2012. 148 p. PhD thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) have emerged as a significant cause of pediatric diarrhea worldwide. Due to the absence of BFP fimbriae (bundle-forming pili), aEPEC are unable to develop the 3 h-localized adherence pattern observed in typical EPEC. Since some aEPEC show the adherence phenotype observed for other pathotypes of *E. coli*, the aim of this study was to investigate, in aEPEC, the presence of adhesin genes found in other pathogenic *E. coli* and to analyze, by comparative proteomic analyses, the protein extracts isolated from aEPEC BA320 (localized-like), Ec292/84 (aggregative) and 9100-83 (diffuse) and BA4013 (non-adherent). Initially, transmission electron microscopy demonstrated the presence of different filamentous structures anchored to the surface in the four EPEC isolates. PCR analyses of aEPEC revealed the presence of the genes *fimA*, *fimH*, *papA*, *ecpA*, *ldaH*, *pilS*, *daaC*, *sfpA*, *lpfA*₀₁₁₃ and polymorphic variants (*lpfA1* and *lpfA2*), which are also present in other pathotypes of *E. coli*. On the other hand, proteomic analyses of aEPEC extracts obtained with an Omnimixer and precipitated with ammonium sulfate, using 2D gel electrophoresis and LC-MS/MS, identified several proteins involved in different functional processes of bacteria, including proteins involved in the mechanism of bacterial adhesion, namely: a histone-like nucleoid structuring protein (H-NS), an outer membrane protein (OmpX), universal stress proteins (Usp), L-fucose mutarotase (FucU) and galactose-binding transport protein (MglB) associated with the action of adhesins of *E. coli* fimbriae. The protein extract also revealed “hypothetical” proteins, particularly a putative filamentous protein found in aEPEC with the phenotypes of localized-like, diffuse and aggregative adherence. Therefore, we conclude that the genes encoding type 1 fimbriae and ECP fimbriae are highly prevalent in aEPEC isolates, and that the proteins identified in the proteome of four aEPEC strains, which are related to different bacterial functions, can operate as protein complexes, directly or indirectly involved in adhesion processes.

Keywords: aEPEC. Genes. Fimbriae. Proteome. PCR. 2D gel electrophoresis. LC MS/MS.

LISTA DE ABREVIATURAS

ESI-Q-Tof: *Electrospray - Quadrupole - Time of flight*

ORF (*open reading frame*): região de leitura aberta

Fim: Fímbria tipo 1

ECP / *ecp* (*E. coli common pilus*): pilus comum de *E. coli*

Esp / *esp* (*EPEC secreted proteins*): proteínas secretadas de EPEC

H-NS: *Histone-like Nucleoid Structuring protein*

Usp (*Universal stress protein*): proteína universal de stress

Omp (*Outer membrane protein*): proteína de membrana externa

MglB: *galactose-binding transport protein*

FucU: *L-fucose mutarotase*

ALL: **A**desão **L**ocalizada-**L**ike

AA: **A**desão **A**gregativa

AD: **A**desão **D**ifusa

NA: **N**ão **A**derente

LEE: *Locus of Enterocyte Effacement*

TTSS (*Type III Secretion System*): sistema de secreção do tipo III

eae : *EPEC attaching and effacing*

EAF (*EPEC adherence factor*): fator de aderência de EPEC

BFP / *bfp*: *bundle-forming pilus*

LPF / *lpf* (*Long Polar Fimbriae*): fímbria polar longo

Lng: **L**ongus

sfp (*sorbitol-fermenting pilus*): pili fermentadora de sorbitol

CFs (*Colonization Factors*): fatores de colonização

CS (*Coli Surface antigen*): antígenos da superfície de *coli*

AAFs (*Aggregative Adherence Fimbriae*): fímbrias de adesão agregativa

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

