



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**A participação dos genes *mreB* e *spl* no
processo autolítico de *Listeria
monocytogenes***

Ana Bárbara Malta da Costa Lapa

Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas

Faro, Portugal

2010



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**A participação dos genes *mreB* e *spl* no
processo autolítico de *Listeria
monocytogenes***

Ana Bárbara Malta da Costa Lapa

Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas

Dissertação orientada pela Professora Doutora M. Leonor Faleiro

Faro, Portugal

2010

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Ciências Biomédicas
Área de Biologia Molecular pela Universidade do Algarve

MSc Thesis in Biomedical Science
Area of Molecular Biology by the Universidade do Algarve

As opiniões expressas nesta publicação são da exclusiva responsabilidade do seu Autor

The contents of this dissertation are of the exclusive responsibility of the Author

(Ana Bárbara Malta da Costa Lapa)

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à Professora Doutora Maria Leonor Faleiro pela oportunidade de me integrar no seu projecto e pela transmissão de conhecimentos durante esta fase. Pela sua disponibilidade, interesse, paciência e incentivo que demonstrou desde o início.

À Elsa Pinto, por me ter ensinado a executar as técnicas desenvolvidas no trabalho, mas principalmente pela amizade, o sorriso e o carinho, que sempre demonstrou em todos os momentos.

A todos os meus restantes colegas do laboratório (Liseta, Jessie, Ricardo, Denise, Joana e Nicola) pelo apoio e amizade, que tornaram esta experiência única.

Ao Zé e à Anahi pela disponibilidade e paciência, na utilização do microscópio de fluorescência e na realização da cultura de células, respectivamente.

A todas as pessoas do mestrado de Ciências Biomédicas que tive oportunidade de conhecer e que me proporcionaram novas amizades.

Aos meus pais por todo o apoio e carinho que sempre deram, e que fizeram de mim o que sou hoje. Adoro-vos do fundo do coração. Obrigado por serem meus pais!

Ao Pedro por ter sido o meu “alicerce” durante esta fase. Por toda a dedicação, carinho e paciência que foram essenciais para conseguir ultrapassar esta etapa. Estarás sempre no meu coração!

A todos os meus amigos pelo apoio e amizade que demonstraram nos momentos mais difíceis.

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto PTDC/AGR-ALI/69751/2006.

RESUMO

A bactéria *Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma doença fundamentalmente associada ao consumo de alimentos contaminados com esta bactéria. Os grupos de risco incluem idosos, doentes imunocomprometidos, grávidas, fetos e crianças. A frequência desta doença é baixa, mas a taxa de mortalidade é relativamente elevada, cerca de 30%. Esta bactéria tem uma capacidade extraordinária para sobreviver em ambientes bastante adversos; elevados teores de sais minerais, em particular sal, baixos valores de pH, temperaturas baixas, entre outros. Como a maioria das bactérias possui enzimas que degradam o peptidoglicano (genéricamente denominadas de muramidases) que podem comprometer a sobrevivência da célula bacteriana se a sua actividade deixar de ser regulada. Durante estudos recentes sobre a autólise em *L. monocytogenes* foi verificado que uma enzima, a MreB, que tem sido relacionada com a aquisição da forma bacilar aparecia em quantidades significativas no secretoma de uma estirpe não autolítica (EGD). De modo a clarificar o seu papel no comportamento autolítico foi realizada a mutagénese do gene *mreB*. Para além da enzima MreB foi ainda detectada uma produção significativamente elevada de uma autolisina, a Spl no secretoma da estirpe autolítica (C897). Com o objectivo de verificar a sua participação no comportamento autolítico foi igualmente realizada a mutagénese do gene *spl*. A mutagénese foi realizada por recombinação homóloga para os dois genes em estudo.

O mutante do gene *mreB* da estirpe EGD ficou com o crescimento afectado em meio definido e perdeu a forma bacilar. Através de coloração com um derivado fluorescente da vancomicina verificou-se que a síntese de peptidoglicano se concentra no local do septo de divisão e sob a acção da penicilina o mutante exibiu maior resistência à lise, provavelmente devido à acumulação de proteínas “penicillin binding proteins”, PBP's que puderam realizar a transpeptidação. Não foi possível obter um mutante no gene *mreB* com a estirpe C897. Este obstáculo foi colmatado através da utilização de uma fusão de transcrição com uma proteína fluorescente verde e o gene *mreB* com um promotor induzido por IPTG, o pMUTINGFP⁺. Os resultados demonstraram que a proteína MreB não contribui para o comportamento autolítico.

A mutagénese do gene *spl*, em ambas as estirpes, resultou numa maior resistência à lise, pelo que a sua actividade contribui para o comportamento autolítico.

Os ensaios de invasão realizados com células NIH 3T3 demonstraram que a estirpe autolítica é significativamente mais invasiva, mas não se encontraram diferenças significativas entre os mutantes.

Palavras - Chave: *L. monocytogenes*, Autolisina, MreB, Divisão celular, Mutagénese.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is the etiologic agent of listeriosis a disease fundamentally associated to the consumption of contaminated food with this bacterium. The risk group includes elderly, immunocompromised patients, pregnant women, foetus and children. The frequency of this disease is low, but the mortality rate is relatively high, about 30%. This bacterium has an extraordinary ability to survive in very adverse environments; high content in mineral salts, in particular salt, low pH values, low temperatures, among others. As the majority of bacteria possess enzymes that degraded the peptidoglycan (generally denominated muramidases) that can compromise the survival of the bacterial cell if their activity remain not regulated. During recent studies about autolysis in *L. monocytogenes* an enzyme, MreB which is related with the acquisition of bacillary form was detected, in significant amounts in the secretome of a non autolytic strain (EGD). In order to clarify its role on the autolytic behaviour the mutagenesis of the gene *mreB* was done. Besides the MreB enzyme the autolysin Spl was detected in significant amounts in the secretome of the autolytic strain (C897). The mutagenesis of gene *spl* was done in order to verify its participation on the autolytic behaviour. The mutagenesis of both genes under study was done by homologous recombination.

The *mreB* mutant of EGD strain showed a deficient growth in a defined medium and lost its bacillary form. Through a staining technique with a fluorescent derivative of vancomycin was verified that the peptidoglycan synthesis is concentrated at septum and under the action of penicillin the mutant showed a higher resistance to lysis, probably due to an accumulation of penicillin binding proteins (PBPs) that could perform the transpeptidation. It was not possible to make a *mreB* mutant in the strain C897. This obstacle was defeated through the use of a transcription fusion with a green fluorescent protein and the *mreB* gene with a IPTG promotor, the pMUTINGFP⁺. The results demonstrated that the MreB protein did not contribute to the autolytic behaviour.

The *spl* mutagenesis in both strains resulted in an increase in the resistance to lysis, for what its activity contributes to the autolytic behaviour.

The invasion assays performed with NIH 3T3 cells showed that the autolytic strain is significantly more invasive, but no significant differences were found among the mutants.

Key words: *L. monocytogenes*, autolysin, MreB, cellular division, mutagenesis

LISTA DE ABREVIATURAS

A₂₆₀ – Absorvência a 260 nm;

A₂₈₀ – Absorvência a 280 nm;

A_{600nm} – Absorvência a 600 nm;

Abs – Absorvência;

AMP – Ampicilina;

BHI – Infusão de coração e cérebro;

CMI – Concentração mínima inibitória;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DNA – Ácido desoxirribonucleico;

DNAc – Ácido desoxirribonucleico complementar;

DNase- Desoxirribonuclease;

dNTP's – Desoxirribonucleótidos Trifosfato;

DO – Densidade óptica;

EDTA – Ácido Etilenodiaminatetracético;

ERY – Eritromicina;

GES - Guanidina, EDTA e Sarcosil;

IPTG – isopropil - β - tiogalactopiranosido;

Kb – Kilobases;

kDa – KiloDalton;

LB – Meio Luria Bertani Broth;

nm – nanómetro;

pb – Pares de bases;

TFS – Tampão fosfato salino;

PCR – Reacção de polimerização em cadeia;

RNA- Ácido ribonucleico;

RNase – Hidrolase de Ácido Ribonucleico;

rpm - Rotações por minuto;

SDS – Dodecilsulfato de sódio;

TAE – Tris - Ácido acético – EDTA;

TM – Meio Trivett and Meyer;

Tm – Temperatura de desnaturação;

UFC – Unidade formadora de colónias;

UV – Ultravioleta;

X-Gal – 5 bromo- 4 cloro-3 indolil- beta-D- galacto-piranoside.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1 - Introdução	1
1.1 - Algumas características de <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2 - Taxonomia	2
1.3 - Características culturais e bioquímicas	2
1.3 - Contaminação de alimentos por <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.4 - Transmissão de <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.5 - Mecanismos de infecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	5
1.5.1 - Ciclo de infecção intracelular	6
1.5.2 - Factores de virulência.....	7
1.6 - Propriedades e estrutura da parede celular bacteriana	8
1.6.1 - Hidrolases da parede celular de <i>L. monocytogenes</i>	9
1.6.1.1 - Proteína associada à invasão, P60	10
1.6.1.2 - A Autolisina P45.....	11
1.7 - Determinação e manutenção da forma da parede celular	11
1.7.1 - A formação do septo.....	12
1.7.2 - O processo de Elongação.....	12
1.7.2.1 - Proteínas MreC e MreD.....	13
1.7.2.2 - A Proteína MreB e seus homólogos	14
1.8 - Objectivos	17
2 - Material e Métodos	18
2.1 - Fluxogramas	18
2.1.1 - Mutagéneses.....	18
2.1.2 - Fusão do proteína MreB com GFP	19
2.2 - Material	20

2.2.1 - Equipamentos.....	20
2.2.2 - Soluções Tampão.....	21
2.2.3 - Plasmídeos.....	21
2.2.4 - Material biológico.....	22
2.3 - Métodos.....	24
2.3.1 - Coloração de Gram.....	24
2.3.2 - Extracção de DNA.....	24
2.3.3 - Quantificação de DNA.....	25
2.3.4 - Técnica da reacção da polimerase em cadeia (PCR).....	25
2.3.5 - Electroforese de ácidos nucleicos em geis de agarose.....	28
2.3.6 - Extracção e purificação de produtos de PCR.....	29
2.3.7 - Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	29
2.3.8 - Reacção de ligação do fragmento ao vector de clonagem.....	31
2.3.9 - Preparação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	33
2.3.10 - Transformação de <i>Escherichia coli</i>	34
2.3.11 - Identificação dos clones recombinantes.....	35
2.3.12 - Extracção e purificação de DNA plasmídico (“Miniprep”).....	35
2.3.13 - Preparação de células electrocompetentes de <i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.3.14 - Electroporação de <i>Listeria monocytogenes</i>	37
2.3.15 - Indução da autólise pelo Triton-X.....	40
2.3.16 - Indução da lise com Penicilina G.....	40
2.3.17 - Visualização da nascente do peptidoglicano com o derivado fluorescente da vancomicina.....	41
2.3.18 - Determinação da concentração mínima inibitória.....	41
2.3.19 - Coloração com Van-FL.....	42
2.3.20 - Visualização ao microscópio de fluorescência.....	42
2.3.21 - Avaliação da capacidade de invasão celular.....	42
2.3.22 - Avaliação da expressão do gene <i>mreB</i> por PCR em tempo real.....	43
3 - Resultados.....	46

3.1 - Clonagem no vector pGEM-TEasy dos fragmentos dos genes <i>spl</i> e <i>mreB</i>	46
3.2 - Integração dos fragmentos do gene <i>mreB</i> e <i>spl</i> no vector pAUL-A	48
3.3 - Transformação das estirpes de <i>L. monocytogenes</i> EGD e C897	50
3.4 - Análise da expressão do gene <i>mreB</i>	52
3.5 - Caracterização dos mutantes <i>L. monocytogenes</i> EGD <i>mreB</i> , EGD <i>spl</i> e C897 <i>spl</i>	52
3.5.1 - Crescimento em meio definido.....	53
3.5.2 - Indução da lise pela penicilina	54
3.5.3 - Indução da lise pelo Triton-X	55
3.5.4 - Análise morfológica dos mutantes	56
3.5.4.1 -Visualização das células com Van-FL	57
3.6 - Fusão do plasmideo pMUTINGFP <i>mreB</i>	58
3.6.1 - Observação das fusões <i>EGD</i> ::pMUTINGFP <i>mreB</i> e C897::pMUTINGFP <i>mreB</i>	60
3.6.2 - Indução da lise pela penicilina	62
3.7 - Avaliação da capacidade de invasão celular	63
4- Discussão.....	65
5- Conclusões.....	69
6- Perspectivas Futuras	70
7- Bibliografia.....	71
8- Anexos	82

1 - Introdução

1.1 - Algumas características de *Listeria monocytogenes*

A primeira referência a infecções causadas por bactérias do género *Listeria* data de 1891, quando a presença de bacilos Gram-positivos foi descrita em biópsias de tecidos de pacientes (Wehr, 1987). Em 1926, Murray e seus colaboradores, procederam ao isolamento de um microrganismo em forma de bacilo, designando-o por *Bacterium monocytogenes* por causar mononucleose em coelhos. Posteriormente, Pirie isolou a bactéria de um gerbil selvagem no Norte de África e designou-a de *Listerella hepatolytica*. Mas em 1940, Pirie chegou à conclusão que *Bacterium monocytogenes* e *Listerella hepatolytica* eram o mesmo microrganismo, que passou a designar-se por *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) (Farber e Peterkin, 1991).

As infecções por *L. monocytogenes* só passaram a ser consideradas uma fonte de preocupação e problemas para a saúde pública, indústria alimentar e agências reguladoras, quando em 1985 foi identificada como o agente causador de um surto de origem alimentar de grande repercussão causado por um queijo de pasta mole tipo mexicano (Farber e Peterkin, 2000). Desde então, inúmeros casos e surtos de listeriose, designação para a infecção causada por *L. monocytogenes*, têm sido descritos em alimentos contaminados no mundo inteiro.

Apesar de *L. monocytogenes* ser uma bactéria ubíqua e como tal, ser frequente uma possível exposição, a listeriose humana é uma doença rara (de Valk *et al.*, 2003). A incidência na Europa é de 0,3 a 7,5 casos por um milhão de habitantes por ano com uma taxa de mortalidade entre 20 a 30%. Certos grupos dentro da população são particularmente susceptíveis à infecção, nomeadamente doentes imunocomprometidos (doentes sujeitos a transplantes ou doentes oncológicos), indivíduos com VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana), grávidas, recém-nascidos e idosos (Swaminathan e Gerner- Smidt, 2007).

A listeriose não é uma doença de declaração obrigatória em Portugal, e por este motivo os dados referentes a esta doença são escassos, além disso o facto do quadro clínico da listeriose não ser característico dificulta o seu diagnóstico (Mena *et al.*, 2002). De acordo com Almeida *et al.* (2006), os dados relativos a 2003, indicam que a incidência da listeriose em Portugal foi na ordem dos 1,4 casos por milhão de habitantes.

Num estudo feito pelo INVS (Institut de Veille Sanitaire) em 2003, todos os países participantes excepto Portugal tinham pelo menos um sistema de vigilância para a

listeriose. Além do mais, numa outra publicação, os Serviços de Saúde Pública Portugueses aconselham para a prevenção das doenças infecciosas durante a gravidez, não sendo mencionada a bactéria *L. monocytogenes* (<http://www.dgs.pt/>). Este panorama tende a mudar e já são reportados alguns casos de listeriose (<http://www.alert-online.com/pt/news/health-portal/cantinas-publicas-contaminadas-com-listeria-monocytogenes>).

1.2 - Taxonomia

Têm sido utilizados diversos marcadores quimiotaxonómicos na verificação da posição filogenética do género *Listeria*. Esta pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo de G/C no DNA (< 55%), o que reforça a sua distinção do género *Corynebacterium spp.*, assim como a sua relação com bactérias lácticas (Rocourt, 1999). Análises filogenéticas e métodos de biologia molecular permitiram uma melhor observação da diversidade dentro do género *Listeria*, sendo analisados os valores de homologia de DNA, sequência do 16S RNA, propriedades quimiotaxonómicas e análise do enzima multilocus (Rocourt *et al.*, 1987). Desta forma *L. monocytogenes* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Listeriaceae* e ao género *Listeria* (Koneman *et al.*, 2006).

Desde 1961, *L. monocytogenes* era a única espécie reconhecida do género *Listeria*. Actualmente, existem oito espécies identificadas no género, sendo duas patogénicas, nomeadamente *L. ivanovii* (Boerlin *et al.*, 1992) e *L. monocytogenes* e as outras seis não patogénicas, *L. innocua* (Glaser *et al.*, 2001), *L. seeligeri* (Steinweg *et al.*, 2010), *L. welshimeri* (Hain *et al.*, 2006), *L. grayi* (Sharpe *et al.*, 1973), *L. marthii* (Graves *et al.*, 2010) e *L. recourtae* (Leclercq *et al.*, 2010).

1.3 - Características culturais e bioquímicas

A bactéria *L. monocytogenes* reage positivamente à coloração de Gram, exhibe a forma de bacilo, com dimensões de 0,4 µm – 0,5 µm de diâmetro e 0,5 µm – 2 µm de comprimento, não forma esporos e é considerada uma bactéria anaeróbia facultativa (Farber e Peterkin, 1991).

A bactéria adapta-se a vários ambientes conseguindo sobreviver em condições extremas (Fenlon, 1999). Também tolera grandes variações de temperatura (4 a 45°C), com um crescimento óptimo entre os 30 e os 37°C. Possui mobilidade giratória

que é conferida por 2 a 5 flagelos que se desenvolvem entre as temperaturas de 20 e 25 °C, e permitem que a bactéria se movimente para um ambiente preferencial quando está sob *stress* nutricional ou ambiental (Seeliger e Jones, 1986). A formação destes flagelos é inibida a 37 °C (Farber e Peterkin, 1991).

No meio de cultura agar de sangue, *L. monocytogenes*, apresenta uma β -hemólise incompleta, o que permite distinguir esta espécie das outras pertencentes ao mesmo género (Farber e Peterkin, 1991). Apresenta uma rápida multiplicação na maioria dos meios bacteriológicos tradicionais, crescendo bem em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), caldo soja tripticase e caldo tripticase (Jay, 1996). Requer biotina, riboflavina, tiamina e aminoácidos como cisteína, glutamina, isoleucina e valina. Em agar nutritivo, as colónias características de *Listeria* adquirem uma coloração azul cinza, apresentado um diâmetro de 0,2 a 0,8 mm após 24 horas de incubação (Donnelly, 2000).

São conhecidos 13 serótipos em *L. monocytogenes*, baseados nos antigénios celulares O e flagelar H. Os serótipos podem variar na expressão de certas proteínas e conseqüentemente mostrarem distintos fenótipos como a hemólise, a virulência e o crescimento (Goldfine e Shen, 2007).

A aplicação de vários procedimentos de subtipagem resultou na classificação de estirpes de *L. monocytogenes* em três linhagens. A linhagem I compreende os serótipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, e é considerada a mais virulenta. A linhagem II (1/2a, 1/2c, 3a e 3c) e linhagem III (4c e 4a) são consideradas menos significativas, estando raramente associadas a casos de listeriose (Wiedman *et al*, 1997; Zhang *et al*, 2003; Liu, 2006).

1.3 - Contaminação de alimentos por *Listeria monocytogenes*

A bactéria *L. monocytogenes* faz parte da microbiota do tracto gastrointestinal de alguns animais, tais como bovinos, ovinos, suínos e galináceos. No entanto, esta bactéria já foi igualmente isolada a partir de outro tipo de animais, entre os quais, crustáceos, ostras e alguns peixes (Vasquez-Boland *et al*, 2001). Esta bactéria também pode ser encontrada no solo, na vegetação e em águas residuais, de rios e de estuários, provavelmente devido a contaminações fecais (Rocourt *et al.*, 2000).

A presença de *L. monocytogenes* em diversos tipos de alimentos pode ser explicada pela ubiquidade desta bactéria. Por este motivo a contaminação de matérias-primas e de alimentos não processados é frequente, sendo os alimentos não sujeitos a

tratamentos térmicos, mais susceptíveis de permitir a sua presença. Assim esta bactéria tem sido detectada em vários alimentos, sendo os mais comuns: saladas, queijos processados a partir de leite não pasteurizado, carne e produtos cárneos, salmão, molhos, patês, entre outros (Vasquez-Boland *et al*, 2001).

1.4 - Transmissão de *Listeria monocytogenes*

A infecção provocada por *L. monocytogenes* depende principalmente do estado imunitário do hospedeiro, da virulência da estirpe, da quantidade de inóculo e da composição do alimento, como por exemplo o teor em sal, água disponível e acidez (McLauchlin *et al*, 2004). De acordo com Vázquez-Boland *et al.* (2001), os alimentos implicados nalguns surtos apresentam concentrações superiores a 10^3 células de *L. monocytogenes* por grama de alimento. Os mesmos autores referem ainda que o consumo de alimentos com concentrações de *L. monocytogenes* inferiores a 10^2 células por grama, representa um baixo risco para o consumidor, no entanto, podem ser suficientes para causar infecção em grupos de risco.

A infecção em humanos, pode ocorrer por várias vias entre elas aérea, cutânea, transplacentária, infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS), por contacto directo ou via digestiva, mas alguns estudos de vigilância e investigação de surtos recentes, demonstraram que o tracto gastrointestinal é a via mais frequente de infecção por *L. monocytogenes* (McLauchlin *et al.*, 2004). Deste modo, o tracto gastrointestinal constitui o primeiro local onde esta bactéria se irá fixar, e como consequência, os sintomas associados à infecção são, numa fase inicial, semelhantes aos manifestados pelas restantes patologias infecciosas do tracto gastrointestinal (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Nos idosos, doentes imunocomprometidos e recém-nascidos, a listeriose manifesta-se principalmente sob a forma de infecção do sistema nervoso central, como por exemplo a meningite e uma infecção sanguínea generalizada. Nas grávidas os sintomas confundem-se muitas vezes com um síndrome gripal, ocorrendo a propagação da infecção da mãe ao feto, através da placenta, podendo provocar aborto (normalmente no final do segundo trimestre), ou o nascimento de bebés com patologias graves (Keto-Timonen, 2008). Deste modo, o despiste da listeriose pode ser camuflada pelo tipo de sintomas, permitindo a progressão da infecção dando origem a quadros clínicos de maior gravidade, como é o caso da meningite. Este período infeccioso poderá ter uma duração de 20 a 30 dias (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

1.5 - Mecanismos de infecção de *Listeria monocytogenes*

A bactéria *L. monocytogenes* possui a capacidade de infectar diversos tipos de células no hospedeiro. Por um lado podem infectar células da linha fagocitária, como as células dendríticas (Kolb-Maurer *et al.*, 2000) e macrófagos (Mackness *et al.*, 1962). Por outro lado também possuem a capacidade de infectar células não fagocitárias, como as células epiteliais, endoteliais e hepatócitos (Gaillard *et al.*, 1987; Gaillard *et al.*, 1986; Berche *et al.*, 1986), mediando a entrada celular.

O processo de infecção por *L. monocytogenes*, devido à ingestão de alimentos contaminados, inicia-se com a colonização do tracto gastrointestinal, seguida da deslocação da bactéria para o fígado e multiplicação neste órgão. Segue-se a infecção de outros tecidos, tais como a colonização da placenta e do feto ou a invasão do cérebro, o que pode conduzir, no primeiro caso, ao aborto ou septicemia neonatal ou, no segundo caso, ao desenvolvimento de meningite ou septicemia (Lecuit, 2007). A infecção causada por esta bactéria pode levar horas, semanas ou meses a manifestar-se. Apresenta-se a seguir o esquema do processo infeccioso de *L. monocytogenes* (Lecuit, 2007).

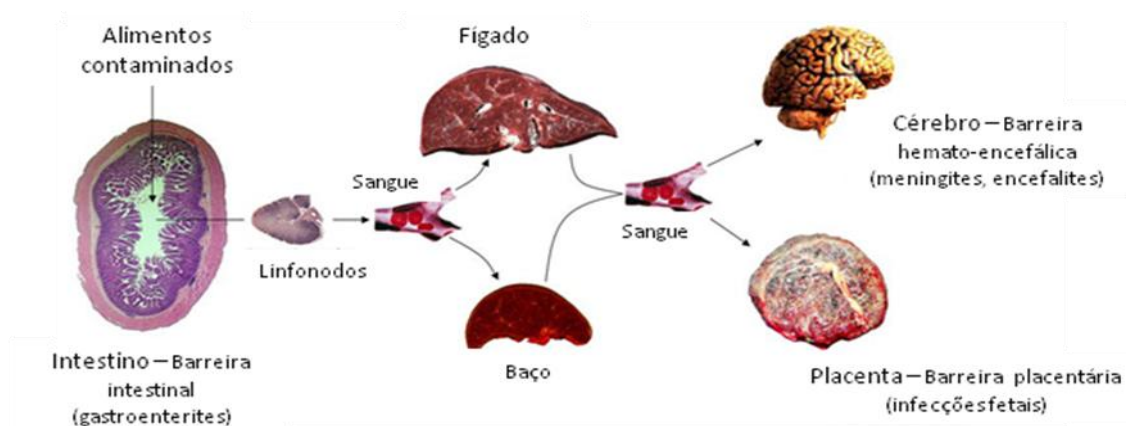


Figura 1 - Percurso de infecção por *Listeria monocytogenes* (Fonte: Lecuit, 2007)

1.5.1 - Ciclo de infecção intracelular

No interior do hospedeiro, *L. monocytogenes* tem a capacidade de induzir a sua própria internalização em células que normalmente não têm funções fagocitárias, conseguindo transferir-se de célula em célula como se descreve em seguida, sem contactar com o ambiente extracelular (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

A invasão de células não fagocíticas implica um mecanismo do tipo “Fecho de correr”, no qual a bactéria entra gradualmente nas estruturas da superfície da célula hospedeira até que é finalmente abarcada. Os receptores da célula hospedeira usados por *Listeria spp* incluem a proteína transmembranar E-caderina (Mengaud *et al*, 1996), o receptor Met do factor de crescimento hepático (HGF) (Shen *et al*, 2000) e componentes da matriz extracelular como os proteoglicanos sulfato de heparano (do inglês HSPG) e a fibronectina. (Gilot *et al*, 1999).

Para aderir e invadir as células do hospedeiro, esta bactéria utiliza várias proteínas conhecidas como invasivas ou internalinas (A e B), que interagem com receptores celulares de membrana que permitem a internalização da bactéria na célula hospedeira. No ambiente intracelular a bactéria segrega a proteína listeriolisina O, responsável pela sua capacidade de invasão e virulência, uma vez que é capaz de provocar a lise do vacúolo fagocítico e transitar para o citoplasma. Este passo da destruição da membrana é essencial para a sobrevivência e proliferação da bactéria (Goebel *et al*, 1997). Ao ser libertada para o citoplasma a bactéria pode multiplicar-se através da proteína actina A, e utiliza os filamentos de actina para se deslocar até à membrana plasmática, formando um tipo de “cauda de cometa”. Quando alcança a membrana induz a sua internalização na célula adjacente, e o ciclo volta-se a repetir na nova célula hospedeira, até chegar ao fígado. Através deste ciclo a *L. monocytogenes* consegue deslocar-se de célula em célula, mantendo-se indetectável pelo sistema imunológico (Bania *et al.*, 2009; Olivares, 2009; Gandhi e Chikindas, 2007).

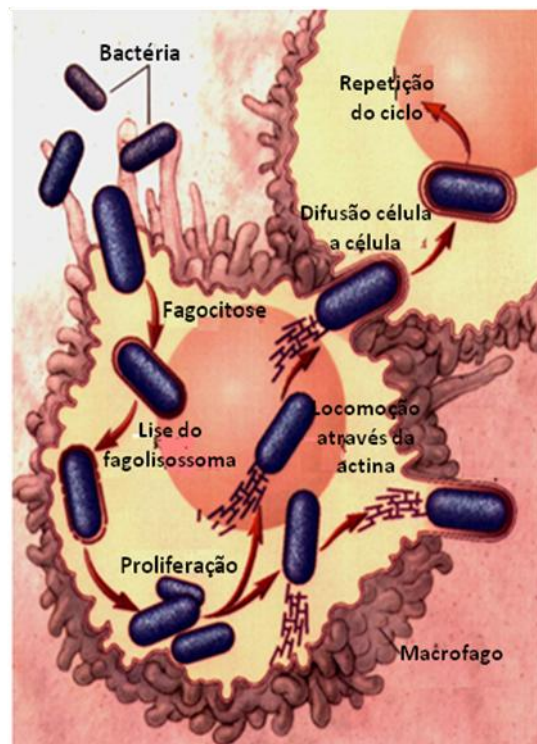


Figura 2: Ciclo de infecção intracelular de *L. monocytogenes*. Fonte: Olivares (2009)

1.5.2 - Factores de virulência

São vários os factores de virulência associados ao género *Listeria*, entre eles destacam-se a hemolisina Hly, as fosfolipases, a actina A, as internalinas, a proteína associada à invasão (P60), entre outros, que são conhecidos como factores secundários (Gaillard *et al.*, 1991; Vasquez-Boland *et al.*, 2001).

Para a incorporação de *Listeria* na célula hospedeira, existe um número de genes envolvidos na virulência que capacitam a bactéria para a entrada, replicação, e difusão na célula hospedeira. Muitos desses genes estão localizados na mesma região cromossómica formando um conjunto de genes de virulência de 9 kb (Figura 3) que está confinado às espécies patogénicas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (Domann *et al.*, 2002) e é denominado de ilha de patogenicidade de *L. monocytogenes* -1 (LIPI-1) (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

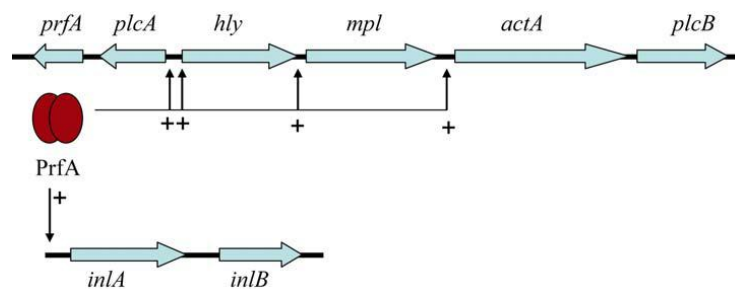


Figura 3: Organização dos genes de virulência e regulação por PrfA. Os sinais mais (+) indicam a regulação positiva da transcrição por PrfA (Fonte: Doman *et al.*, 2002)

Este agrupamento compreende seis genes que estão actualmente bem caracterizados e que são eles, *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*. Os produtos destes genes de virulência consistem na listeriolisina (*hly*), a fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (*plcA*), a fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (*plcB*), a metaloproteína (*mpl*), a proteína envolvida na polimerização da actina (*actA*) e o factor PdfA de regulação positiva (*prfA*) (Kuhn e Goebel, 1999).

Os genes de internalina *inlA*, *inlB* e *inlC* que codificam a produção de internalina, *InlB* e *InlC* respectivamente, o gene *iap* que codifica a proteína Iap ou P60 e outros genes que se julga possuírem um desempenho na virulência da bactéria encontram-se localizados fora do agrupamento PrfA. Porém a maioria destes últimos encontram-se

ligados ao conjunto de genes de virulência, assim como são regulados pelo activador transcripcional PrfA (Kuhn e Goebel, 1999). A expressão do gene *iap* é independente do operão PrfA e é apenas controlada ao nível pós-transcrição (Pilgrim *et al.*, 2003).

1.6 - Propriedades e estrutura da parede celular bacteriana

A parede celular das bactérias Gram-positivas possui várias funções, entre as quais a protecção mecânica e osmótica. Também serve como local de alojamento de proteínas que interagem com o ambiente permitindo a reacção da célula a certos sinais ambientais. Também é responsável, em parte pela permeabilidade das proteínas, pela presença das hidrolases do peptidoglicano, adesinas e pela hidrofobicidade da superfície celular (Neuhaus e Baddiley, 2003).

O citoesqueleto da parede celular bacteriana é constituído por peptidoglicano ou mureína ligada a várias moléculas como, os ácidos teicóicos, ácidos lipoteicóicos, polifosfatos e carbonos (Scheffers e Pinho, 2005).

A parede das bactérias Gram-positivas tem pelo menos 10 a 20 camadas de glicano, enquanto que a parede celular das Gram-negativas é composta por apenas uma a duas camadas (Labischinski *et al.*, 1991).

A camada de peptidoglicano é uma estrutura dinâmica que se encontra em constante remodelação, devido à sua expansão durante o crescimento celular e clivagem durante a divisão celular e lise. O peptidoglicano é um polímero composto por açúcares e aminoácidos. A componente dos açúcares consiste em resíduos alternados de dissacárideos β -(1,4), ligados a N-acetil-D-glucosaminas (NAG) e a ácidos N-acetilmurâmicos (NAM), ligados covalentemente por ligações peptídicas. A cadeia de péptidos é ligada a uma cadeia de péptidos de outra cadeia do glicano vizinho formando uma estrutura de polímero. Em *L. monocytogenes* a ligação é directamente entre o ácido meso-diaminopimelico (*m*-Dpm) na posição 3 de um péptido e o resíduo D-alanina (D-Ala) na posição 4 de outro péptido, uma configuração incomum nas bactérias Gram-positivas e que mais se assemelha à parede celular das bactérias Gram-negativas (Dhar *et al.*, 2000; Fiedler, 1988; Kamisango *et al.*, 1982).

No geral, a formação do peptidoglicano pode ser dividida em três etapas: a primeira etapa da biossíntese da parede celular ocorre no citoplasma e leva à formação de precursores nucleotídicos ligados a um açúcar, a UDP-*N*-acetilmuramil-pentapeptídeo (UDP-NAM-pentapeptídeo) e a UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-NAG). A segunda etapa ocorre na membrana citoplasmática e leva à síntese de precursores lípidicos

intermediários. O fosfo-NAM-pentapeptídeo, metade do UDP-NAM-pentapeptídeo é transferido para o receptor membranar bactoprenol, originando o lípido I (NAM-pentapeptídeo-pirofosforilundecaprenol). O NAG do UDP-NAG é depois adicionado ao lípido I, originando o lípido II (NAG- β -1,4,-NAM-pentapeptídeo-pirofosforilundecaprenol) (Scheffers e Pinho, 2005).

O bactoprenol lipofílico possui um papel essencial na biossíntese da parede celular, possibilitando à célula o transporte de precursores hidrofílicos a partir do meio citoplasmático aquoso, através da membrana hidrofóbica para os sítios externos da incorporação do peptidoglicano. A terceira e última etapa, ocorre na parte exterior da membrana citoplasmática, envolvendo a polimerização de unidades péptídicas dissacáridicas e a incorporação no peptidoglicano em crescimento, sob a acção de transpeptidases ou ainda proteínas de ligação à penicilina (do inglês Penicilin-binding proteins, PBPs) (Scheffers e Pinho, 2005; Carballido-López e Formstone, 2007).

A formação do peptidoglicano é um processo que envolve várias enzimas da família das PBP's, como as transglicolases, transpeptidases e D-alanil-D-alanina carboxipeptidases. Estas enzimas sintetizam as ligações do peptidoglicano a partir dos intermediários lipídicos e medeiam a remoção da D-alanina do precursor do peptidoglicano (Scheffers e Pinho, 2005; Mohammadi *et al.*, 2007).

Em *L. monocytogenes*, cinco proteínas foram caracterizadas como PBPs, contudo estudos mais recentes reconheceram mais seis proteínas com homologias para as PBPs (Bierne e Cossart 2007; Guinane *et al.*, 2006). Foram identificadas proteínas como as PBP1, 2, 3 e 4 que catalizam reacções de polimerização no peptidoglicano e a PBP5 onde foi determinada a actividade enzimática (Korsak *et al.*, 2005; Guinane *et al.*, 2006). Nos estudos realizados por Guinane e colaboradores (2006), também foi sugerido que a PBP3 possui um papel central na resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Listeria spp.*

1.6.1 - Hidrolases da parede celular de *L. monocytogenes*

A separação das pontes moleculares do peptidoglicano é necessária para permitir a inserção de novo material na parede celular para a divisão celular e para a manutenção da estrutura da célula. As hidrolases do peptidoglicano são enzimas que possuem actividade hidrolítica em relação a certos componentes da parede celular. Elas estão presentes na maioria das bactérias e possuem um papel crucial na divisão da parede celular e lise na clivagem do peptidoglicano (Bierne e Cossart, 2007,

Vollmer *et al.*, 2008). Também estão envolvidas na biossíntese da nova parede celular e em vários processos celulares como a secreção proteica, a formação de biofilme, a competência genética e formação do flagelo (Holtje, 1998). Certas hidrolases, designadas por autolisinas são capazes de degradar a parede celular, levando à lise da célula bacteriana (Smith *et al.*, 2000). Estas enzimas formam orifícios na camada de peptidoglicano, permitindo a incorporação de novo material na parede celular. Geralmente, elas contêm dois domínios diferentes activos, um para a ligação à parede celular e outro para a actividade de clivagem (Joris *et al.*, 1992).

Em *L. monocytogenes*, muitas enzimas hidrolíticas, como a P60, Ami e Auto, estão implicadas na modulação da virulência (Milahanic *et al.*, 2001). Enzimas hidrolíticas podem ser categorizadas de acordo com a sua especificidade na separação do peptidoglicano, sendo classificadas de N-acetilmuramidases, N-acetilglucosaminidases, N-acetilmuramyl-L-alanina amidases, endopeptidases e transglicosilases (Höltje, 1995).

1.6.1.1 - Proteína associada à invasão, P60

A proteína P60 codificada pelo gene *iap*, foi a primeira autolisina descrita como estando envolvida no processo de invasão de *L. monocytogenes* (Kuhn e Goebel, 1989). É classificada como uma endo-N-acetilmuramidase, com funções ao nível da divisão celular, aderência e invasão de *L. monocytogenes* a células mamíferas hospedeiras (Kuhn e Goebel, 1989; Wuenscher *et al.*, 1993).

Em 2003, Pilgrim e colaboradores, sugeriram a mudança da designação de *iap* (proteína associada à invasão) para *cwhA* (hidrolase da parede celular A) e consequentemente a alteração de P60 para CwhA.

A mutação do gene *iap* resultou numa morfologia anormal, caracterizada pela presença de células filamentosas com um septo formado (Wuenscher *et al.*, 1993). Foi estabelecida uma ligação entre a proteína P60 e a patogenicidade de *L. monocytogenes* (Kuhn e Goebel, 1989). Os mutantes de *L. monocytogenes* com o gene *iap* interrompido mostraram, que níveis baixos de P60 tornam menos eficiente a entrada em certas células eucariotas, sugerindo um papel para a P60 no processo de invasão. Verificou-se que, ao expor os mutantes de *L. monocytogenes* não invasivos à acção da proteína P60, estes readquirem a capacidade invasiva. Deste modo, esta proteína foi associada à virulência, estabelecendo-se uma relação entre os

componentes da superfície celular da bactéria *L. monocytogenes* e o seu potencial patogénico (Kuhn e Goebel, 1989).

Os quatro membros da família P60 são: Spl (P45), Lmo0394, Lmo1104 e a própria P60. Além da P60, a P45 (Spl) é a única proteína desta família de *L. monocytogenes* conhecida por apresentar actividade lítica no peptidoglicano (Schuber *et al.*, 2000).

Além das propriedades descritas, a proteína P60 desempenha um papel importante na resposta imune contra *L. monocytogenes*. Anticorpos específicos para a P60 actuam como opsoninas e podem desempenhar um papel na prevenção de infecções sistémicas em doentes imunocomprometidos (Kolb-Maurer *et al.*, 2001).

1.6.1.2 - A Autolisina P45

A autolisina P45 é uma proteína que apresenta várias semelhanças com a P60 (Kuhn e Goebel 1989). Desde que a actividade de hidrolase do peptidoglicano foi descrita para a P60, Schubert e seus colaboradores (2000), assumiram que a P45 pode ter uma função semelhante. A forte semelhança entre ambas está localizada num fragmento de aproximadamente 120 aminoácidos na zona C-terminal das proteínas. Em contraste com a P60, a P45 hidrolisa preferencialmente células de *L. monocytogenes*, uma vez que não foi detectada actividade bacteriolítica com células de *Micrococcus luteus* (*M. luteus*). Consequentemente o gene que codifica a P45, foi designado de *spl* (secreted protein with lytic activity) (Schubert *et al.*, 2000).

1.7 - Determinação e manutenção da forma da parede celular

Nas bactérias existem uma grande variedade de formas e, historicamente, a morfologia celular tem sido um importante critério taxonómico. As formas mais comumente encontradas são a cocóide e a bacilar (Daniel e Errigton, 2003). Análises filogenéticas indicam que bactérias com forma cocóide, advêm de precursores com forma de bacilo, que durante o seu período de evolução foram perdendo genes intervenientes na extensão celular (Siefert e Fox, 1998).

No grupo do domínio Bacteria, a camada de peptidoglicano da parede celular é o maior determinante para a forma celular. Após a formação do peptidoglicano, a estrutura resultante compreende uma única grande molécula que cobre toda a superfície da célula (Daniel e Errigton, 2003; Figge *et al.*, 2004).

Durante muitos anos, a visão predominante era que as bactérias não continham elementos do citoesqueleto sendo apenas moldadas por um “exoesqueleto” - a parede celular. No entanto, foram recentemente descobertos nas bactérias, homólogos dos elementos do citoesqueleto eucariotas, que desempenham funções na segregação do DNA, na polaridade celular, esporulação e na formação de estruturas do citoesqueleto que direccionam a forma da parede celular, modulando a localização e actividade da síntese de peptidoglicano (Cabeen e Jacobs-Wagner, 2005).

O processo de expansão do peptidoglicano é complexo porque requer a inserção de novo material dentro da estrutura já existente, sem comprometimento da integridade da parede. Para o efeito a parede tem de ser uma estrutura dinâmica, continuamente sintetizada e remodelada para permitir a formação de um septo, seguido de separação durante a divisão e a inserção de novo material durante o crescimento (Carballido-López *et al.*, 2006).

1.7.1 - A formação do septo

A divisão celular é estritamente regulada para assegurar uma produção eficiente e precisa dos cromossomas, e manter o tamanho e forma da célula. A proteína FtsZ desempenha um papel central na regulação da divisão celular. Encontra-se altamente conservada e está presente na maioria das bactérias, representando a estrutura homóloga para a tubulina eucariótica (van den Ent *et al.*, 2001). Ela forma um anel (anel - Z) no centro da célula bacteriana e desencadeia a junção dos mecanismos de divisão (divissoma), entre os quais as proteínas como, a FtsI e a FtsW. Além do mais, o anel Z também provoca a actuação de enzimas que são menos especializadas, mas que são necessárias para a expansão lateral do PG, como a PBP1B, uma transglicosilase (Kawai e Ogasawara, 2006; Pichoff e Lutkenhaus, 2007). A proteína FtsZ ao actuar no local de divisão é implicada no processo de determinação da forma celular. Consequentemente o tamanho da célula é determinado pela divisão celular (Addinall e Lutkenhaus, 1996).

1.7.2 - O processo de Elongação

Durante a fase de elongação, as células crescem ao longo de um eixo longitudinal com um pequeno aumento na largura. Uma vez que o comprimento celular crítico seja atingido, a síntese da parede celular muda de direcção, voltando-se para dentro e

formando um septo de divisão celular. A regulação destas duas fases é coordenada com outros eventos relacionados com o ciclo celular, como a replicação do DNA e a partição cromossómica (Figge *et al.*, 2004).

Estudos realizados em *B. subtilis* e *Caulobacter crescentus* demonstraram que a forma de bacilo requer genes *mre* (região de mureína 'e' - *mreB*, *mreC* e *mreD*) assim como *rodA* e *pbp2*. Apesar de RodA e PBP2 serem requeridos para a síntese do PG lateral (análogos para a função dos ortólogos FtsW e FtsI, respectivamente, na síntese do septo PG), o mecanismo pelo qual os genes *mre* determinam a forma bacilar, tem sido alvo de investigação. Os referidos genes organizam os mecanismos para a síntese de PG, essencial para a elongação (Pichoff e Lutkenhaus, 2007).

Os genes *mre* foram inicialmente identificados em mutantes de *E. coli* que foram afectados na sua sensibilidade para a andinocilina, um antibiótico que inibe a PBP2 (Wachi *et al.*, 1987; 1989).

Os dois tipos de mutação que afectam a classificação da forma de bacilo em *B. subtilis*, designam-se de mutantes *fts* (filamentosos) e mutantes *rod* (redondos), onde são mapeados genes que codificam proteínas associadas à síntese da parede celular, envolvidas na formação do septo e no processo de elongação, respectivamente (Carballido-López e Formstone, 2007).

Alguns investigadores têm estudado a região do operão *mreBCD* e foram referidas dificuldades na complementação da mutação no *mreB* o que sugere efeitos polares na transcrição do *mreC* e *mreD* (Leaver e Errigton, 2005).

1.7.2.1 - Proteínas MreC e MreD

Estudos realizados na bactéria *B. subtilis*, revelaram que as proteínas MreC e MreD são codificadas por genes conservados que parecem estar envolvidos no controlo da forma celular, exercendo a sua função na mesma via morfogénica que o MreB. Encontram-se invariavelmente no operão imediatamente depois do gene *mreB*. É previsto o MreC ter um único espaço transmembranar com o domínio maior C-terminal fora da membrana citoplasmática. A proteína MreD é predominantemente hidrofóbica com quatro ou seis espaços transmembranares e ambos os terminais C e N dentro da célula (Leaver e Errigton, 2005).

Van den Ent e colaboradores (2006), em conjunto com outros estudos, ao analisarem a estrutura do MreC, verificaram que a cauda citoplasmática do MreC é bastante variável e muito curta em alguns organismos (apenas seis resíduos aminoácidos em

B. subtilis), parecendo pouco provável que possa exercer uma grande interação com MreB. Possivelmente a terceira proteína codificada pelo operão *mre*, MreD, exerce uma função como intermediário, estabelecendo uma ligação entre o MreB citoplasmático e o MreC.

Recentes descobertas indicam que eles também desempenham uma função no crescimento hélico da parede cilíndrica e que exercem interações com PBPs de alto peso molecular específicas para a elongação, como a PBP2a e a PbpH, sugerindo que o MreC/D liga o MreB ao citosqueleto, na zona citosólica da membrana, para os enzimas modificarem a parede celular no local extracelular da membrana (Carballido-López e Formstone, 2007; van den Ent *et al.*, 2006).

Uma deficiência em MreC e MreD resulta na formação de células esféricas que eventualmente lisam, provavelmente por causa da sua deficiência na síntese de peptidoglicano na zona cilíndrica da célula (Lee e Stewart, 2003; Leaver e Errigton, 2005).

1.7.2.2 - A Proteína MreB e seus homólogos

O gene *mreB* codifica uma proteína de 37 kDa que mostrou possuir semelhanças significativas com os membros da superfamília Hsp70. (Bork *et al.*, 1992). Com estas semelhanças, a proteína MreB tem demonstrado cruzar-se numa estrutura que é estreitamente similar à actina eucariota. Mostrou formar espirais que atravessam o eixo longitudinal das células de *B. subtilis*, uma descoberta que sugere que a bactéria contém no citoesqueleto uma proteína do tipo actina, que é comparável com a dos eucariotas, que dita a sua forma celular. (Figge *et al.*, 2004).

A verificação das sequências dos genomas bacterianos revelou que o *mreB* está ausente dos genomas dos organismos coccídeos, no entanto este encontra-se representado em bactérias com formas mais complexas, desempenhando um papel essencial na elongação cilíndrica, distribuindo vários componentes do metabolismo do peptidoglicano ao longo do comprimento da célula (Figura 4) (Jones *et al.*, 2001; Carballido-López e Formstone, 2007).

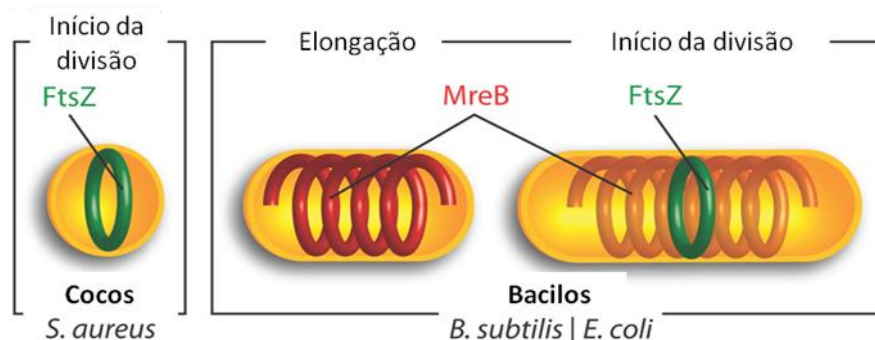


Figura 4: O citoesqueleto bacteriano. O único elemento presente nas bactérias em forma de coco (esquerda) é a proteína FtsZ (verde) que define o anel da divisão celular e o plano de divisão. A maioria das bactérias em forma de bacilo (direita) também contém um ou mais homólogos MreB (vermelho), que exibem um padrão de localização tipo hélice e são essenciais para o controle do comprimento celular. Na zona da divisão celular, o anel FtsZ forma e define o plano de divisão. (Fonte: Cabeen e Jacobs-Wagner, 2007).

A proteína MreB tem sido visualizada em diversas bactérias, entre as quais os bacilos *B. subtilis* e *E. coli* (Carballido-López *et al.*, 2006) e a bactéria dismórfica *Caulobacter crescentus* (Figue *et al.*, 2004; Gitai *et al.*, 2004).

Em *B. subtilis* e *E. coli* foi demonstrado que uma deficiência ou a inativação induzida por antibióticos da proteína MreB, leva a um gradual alargamento da célula durante a fase de alongação, mas que depois estimula um arredondamento celular durante o crescimento, por longos períodos de tempo (Jones *et al.*, 2001; Figue *et al.*, 2004; Gitai *et al.*, 2005).

Algumas espécies possuem vários homólogos MreB. Em *B. subtilis* existem três: MreB, Mbl e MreBH, mas a maioria só tem um, o MreB. Em *Listeria* também existe um homólogo, o Mbl (lmo2525) (Glaser *et al.*, 2001)

Estudos realizados por Carballido-López e colaboradores (2006), nas três isoformas da actina na bactéria *B. subtilis*, mostraram que a ausência da expressão das mesmas resulta em defeitos específicos na parede celular. O Mbl afecta o controlo linear do eixo, direccionando a inserção do PG ao longo da parede lateral, no entanto o seu papel específico mantém-se duvidoso. O MreB é um importante determinante no alargamento da célula, e também se considera que actua directamente na montagem dos componentes da parede celular. Finalmente o MreBH desempenha um papel distinto na morfogénese celular, provavelmente no controlo da actividade autolítica ao longo da parede celular lateral, direccionando a localização da hidrolase LytE. No que respeita à organização, o Mbl forma uma estrutura do tipo dupla hélice que corre o

1.8 - Objectivos

O presente trabalho, teve como principal objectivo esclarecer a participação dos genes *mreB* e *spl*, no processo autolítico de *L. monocytogenes*. A análise proteómica, realizada anteriormente entre uma estirpe autolítica, a C897 e outra não autolítica, a EGD, revelou diferenças de expressão nos genes referidos acima. Verificou-se que a proteína MreB da estirpe C897 encontrava-se no secretoma em menor quantidade que no secretoma da estirpe EGD, colocando-se a hipótese que a proteína MreB poderá ficar retida na parede celular da C897 e não ser excretada, provavelmente devido à actividade de autolisinas como a P60 ou P45.

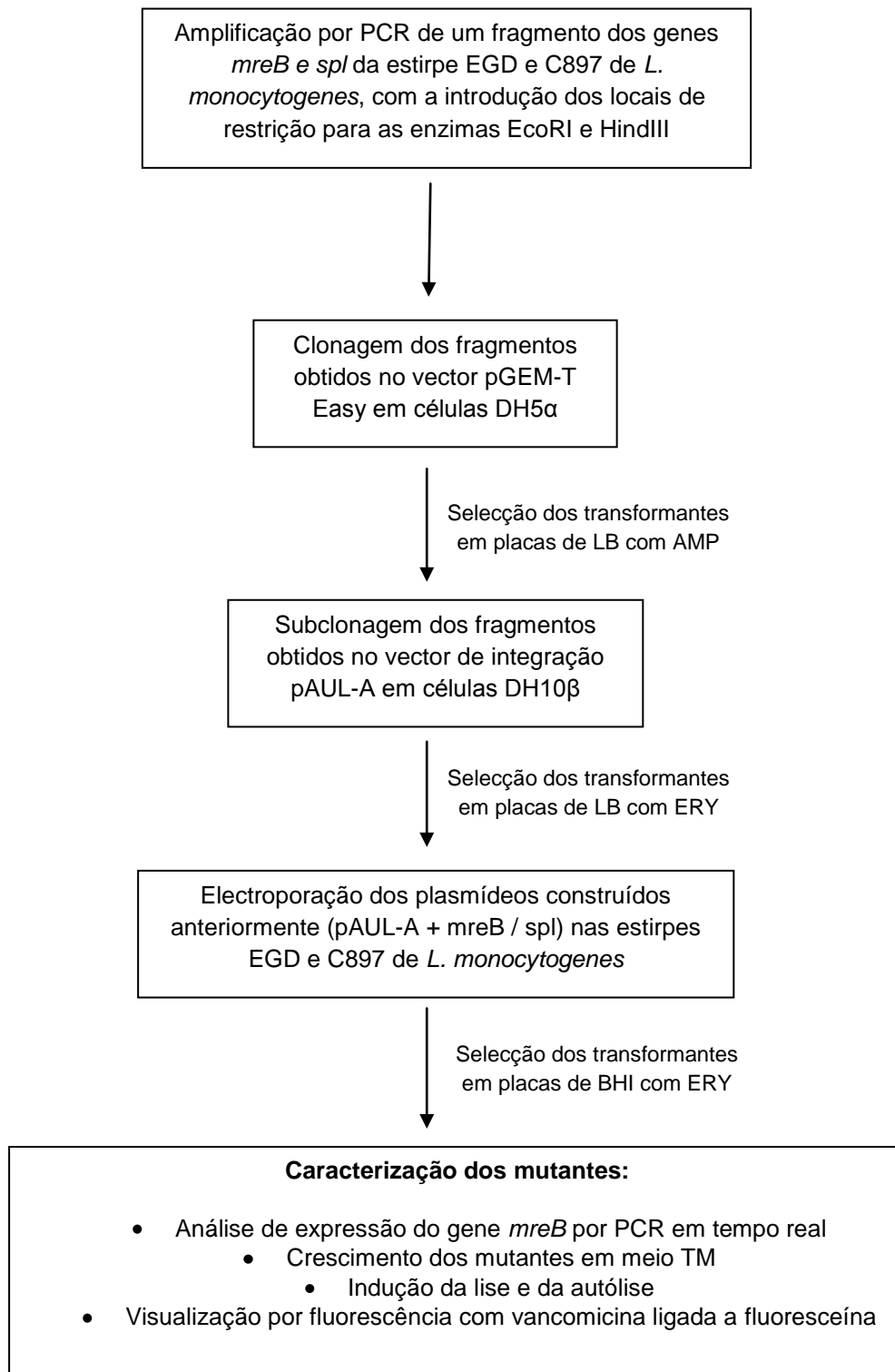
Para esclarecer o papel das proteínas MreB e P45 recorreu-se à técnica de mutagénesis, para se interromper a expressão dos genes *mreB* e *spl*, por inserção de um vector por recombinação homóloga. A visualização do local de síntese da nascente do peptidoglicano foi inicialmente verificada. A expressão do gene *mreB* também foi estudada através de fusão com uma proteína fluorescente.

Os mutantes obtidos foram avaliados quanto à capacidade lítica e susceptibilidade à autólise, assim como a sua capacidade de aderência e invasão a células de fibroblastos.

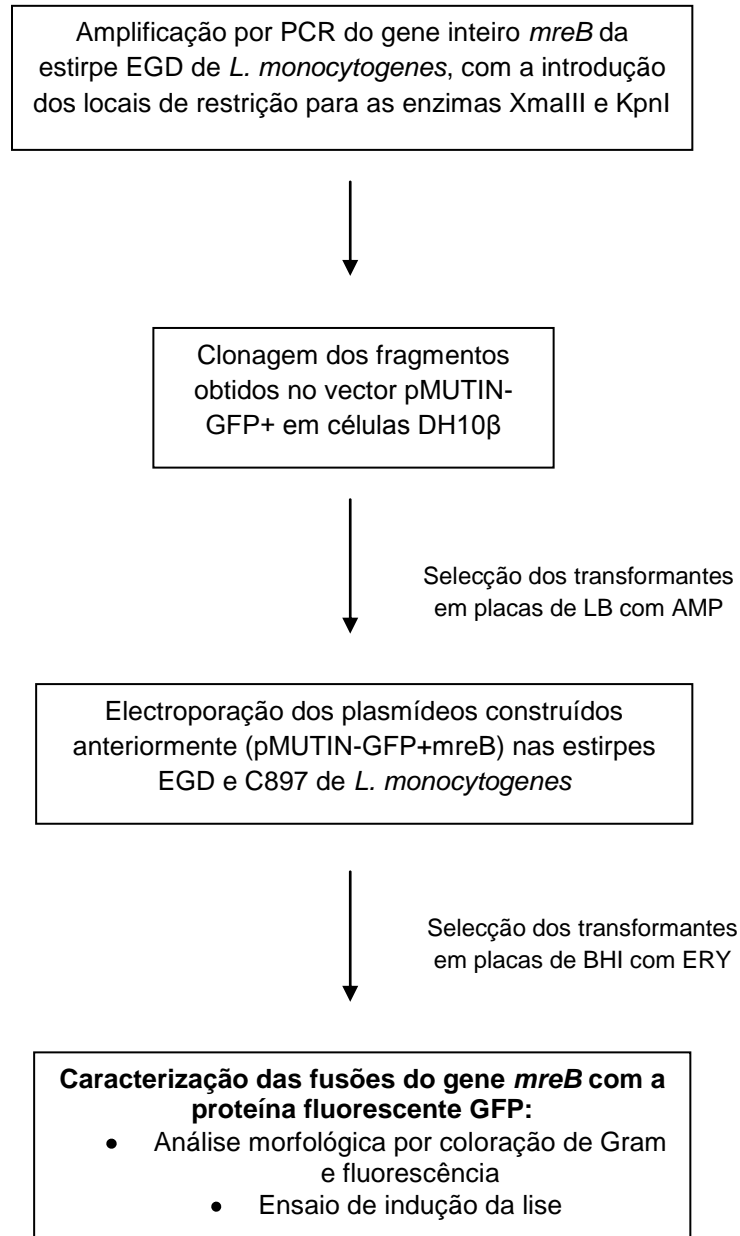
2 - Material e Métodos

2.1 - Fluxogramas

2.1.1 - Mutagénese



2.1.2 - Fusão da proteína MreB com a proteína fluorescente GFP



2.2 - Material

2.2.1 - Equipamentos

- Câmara de Fluxo Laminar Bio 48 (Faster);
- Incubadora (Binder);
- Incubador de CO₂ COM-18AIC (Sanyo);
- Autoclave Uniclave 88 – 40x60 (AJC);
- Centrifuga refrigerada Mikro 22R (Hettich);
- Captador de imagem EDAS-290 (Kodak);
- Balança analítica XS 410 (Fisher-Scientific);
- Balança analítica AE 200 (Mettler);
- Banho seco múltiplos (Selecta);
- Banho SW (Julabo);
- Medidor de pH GLP21 (Crison);
- Câmara de PCR Mini-V PCR (Telstar);
- Termociclador T-personal (Biometra);
- Termociclador T-Gradient (Biometra);
- Termociclador T1 (Biometra);
- Vortex PCV 2400 (Grant-Bio);
- Tina de Electroforese GNA 100 (Pharmacia Biotech);
- Fonte de electroforese electrophoresis Power supply-EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech);
- Espectrofotômetro UV-visível 1700, Pharmaspec;
- Aparelho de leitura de absorvência – Labsystems BioscreenC, Thermo;
- Aparelho icycleriq multicolor real time PCR detection system (BioRad, Hercule, EUA);
- Microscópio Carl Zeiss, Axioimager Z2.

- Leitor de microplacas - TECAN
- Câmara de fluxo laminar BH-EN2003 (Faster).

2.2.2 - Soluções Tampão

- Tampão TAE (50x): 2mM Tris, 5,71% (v/v) ácido acético glacial, 50 mM EDTA;
- Tampão GES: 5 M Tiocianato de guanidina, 100 mM EDTA, 1% (p/v) sarcosil;
- Tampão Lise: 10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 0,001% (v/v) Triton-X;
- Tampão fosfato salino (PBS) 10x: 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 0,137 M NaCl;
- Tampão Cloreto de cálcio: 5 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 100 mM CaCl₂ e 15% glicerol;
- Tampão Glucose, Tris, EDTA (GTE): 50mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8;
- Tampão de amostra: 0,25% (p/v) azul bromofenol, 25% (p/v) -Ficol tipo 400, 10 µg/ml RNaseA.

2.2.3 - Plasmídeos

Tabela I – Descrição dos plasmídeos utilizados

Identificação	Descrição	Origem/Referência
pGEM-T Easy	Vector para a bactéria <i>E.coli</i> com 3015 pb	Promega
pGEM-T EasymreB	Vector com o fragmento do gene <i>mreB</i>	Este estudo
pGEM-T Easyspl	Vector com o fragmento do gene <i>spl</i>	Este estudo
pAUL-A	Vector com 9200 pb, para integração num local específico do genoma de <i>L. monocytogenes</i>	Chakraborty, et al, (1992)
pAUL-AmreB	Vector com o fragmento do gene <i>mreB</i> clonado para transformação de <i>L.</i>	Este estudo

	<i>monocytogenes</i>	
pAUL-Aspl	Vector com o fragmento do gene <i>spl</i> clonado para transformação de <i>L. monocytogenes</i>	Este estudo
pAUL-AmreB897	Vector com o fragmento do gene <i>mreB</i> clonado para transformação de <i>L. monocytogenes</i> C897	Este estudo
pAUL-Aspl897	Vector com o fragmento do gene <i>spl</i> clonado para transformação de <i>L. monocytogenes</i> C897	Este estudo
pMUTIN-GFP+	Vector de integração, com 6192 pb, desenhado para fundir proteínas com uma variante altamente fluorescente da GFP	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center / Kaltwasser <i>et al.</i> (2002)
pMUTIN-GFP+mreB	Vector com o gene <i>mreB</i> completo para fusão em <i>L. monocytogenes</i>	Este estudo

2.2.4 - Material biológico

Tabela II – Estirpes de bactérias utilizadas neste trabalho

Estirpe	Descrição / Genótipo	Origem / Referência
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), λ-</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10 β	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ-</i>	Invitrogen

<i>L. monocytogenes</i> EGD	Estirpe do serótipo 1/2a	Clínica / Trudeau Institute
<i>L. monocytogenes</i> C897	Estirpe do serótipo 1/2a	Queijo / INETI-DTIA, Faleiro <i>et al.</i> 2003
EGDmreB	Eri ^r , <i>L. monocytogenes</i> EGD contem o pAUL-A integrado no <i>locus</i> correspondente ao gene <i>mreB</i> , integrado no cromossoma de <i>L. monocytogenes</i> EGD	Este estudo
EGDspl	Eri ^r , <i>L. monocytogenes</i> EGD contem o pAUL-Aspl integrado no <i>locus</i> correspondente ao gene <i>spl</i> , integrado no cromossoma de <i>L. monocytogenes</i> C897	Este estudo
C897spl	Eri ^r , <i>L. monocytogenes</i> C897 contem o pAUL-Aspl integrado no <i>locus</i> correspondente ao gene <i>spl</i> , integrado no cromossoma de <i>L. monocytogenes</i> C897	Este estudo
EGD::pMUTINGFPmreB	Eri ^r , <i>L. monocytogenes</i> EGD contem o pMUTIN-GFPmreB integrado no <i>locus</i> correspondente ao gene <i>mreB</i> , integrado no cromossoma de <i>L. monocytogenes</i> EGD	Este estudo
C897::pMUTINGFPmreB	Eri ^r , <i>L. monocytogenes</i> C897 contem o pMUTIN-GFPmreB integrado no <i>locus</i> correspondente ao gene <i>mreB</i> , integrado no cromossoma de <i>L. monocytogenes</i> C897	Este estudo

2.3 - Métodos

2.3.1 - Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica de coloração diferencial, desenvolvida por Christian Gram em 1884, que permite diferenciar as bactérias em dois grupos distintos: bactérias Gram positivas e Gram negativas. As diferenças químicas e estruturais entre os vários tipos de bactérias, fazem-nas reagir de forma diferente aos corantes utilizados.

Este tipo de coloração foi utilizado para confirmar a pureza das culturas de *L. monocytogenes*. Para isso foi preparado um esfregaço da cultura e deixou-se secar ao ar e depois procedeu-se à fixação pelo calor. Após o arrefecimento o esfregaço foi coberto com cristal violeta (Merck, Darmstadt, Germany) e ficou a actuar durante 2 minutos. De seguida, lavou-se com água destilada para a remoção do corante e aplicou-se o lugol (Merck, Darmstadt, Germany), deixando-se actuar por 30 segundos. O lugol foi eliminado por escorrimento e em seguida o esfregaço foi tratado com álcool a 96%, durante alguns segundos. O álcool foi eliminado por lavagem com água destilada e colocou-se uma solução de contraste, a safranina (Merck, Darmstadt, Germany), actuando durante 2 minutos. Removeu-se o excesso de corante com água destilada e deixou-se secar ao ar para se posteriormente observar ao microscópio óptico com uma ampliação de 1000x.

2.3.2 - Extracção de DNA

A extracção do DNA das estirpes de *L. monocytogenes* EGD e C897 foi realizada a partir de culturas crescidas em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), durante cerca de 16 h a 37°C. O procedimento foi realizado como descrito por Pitcher *et al.*, (1989). Resumidamente procedeu-se inicialmente à recolha das células bacterianas, pela centrifugação a 6280 xg durante 10 min a 4°C. Os *pellets* celulares obtidos foram depois ressuspendidos em 100µl de tampão de lise e 25µl de lisozima (10 mg/ml, Sigma, New York, USA) e a incubação decorreu durante 45 min a 30°C. De seguida, adicionou-se à mistura 500 µl de tampão Glucose, Tris, EDTA (GTE), agitou-se no vortex e colocou-se 5 min no gelo. Após este tempo, adicionou-se 250 µl de acetato de amónia 10M, procedeu-se à homogenização e manteve-se em gelo por 10 min. Posteriormente adicionou-se 500 µl de uma solução de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) e misturou-se vigorosamente por inversão. Depois centrifugou-se a 18890 xg, durante 10 min a 4°C. Esta última solução vai remover proteínas

contaminantes existentes na mistura, desnaturando-as, mas não afecta os ácidos nucleicos. A centrifugação da emulsão, formada por esta solução, produz uma fase orgânica em baixo separada da de cima, fase aquosa (contém o DNA que se pretende extrair) por uma interface de proteína desnaturada. A solução aquosa é então retirada para um *ependorf* à qual é adicionado metade do volume de isopropanol frio (Sigma, New York, USA) que irá precipitar o DNA. Posteriormente, centrifugou-se a solução a 18890 xg durante 5 min a 4°C de forma a recolher o DNA. Em seguida o *pellet* foi lavado com etanol a 70% frio e centrifugou-se novamente a 188890 xg durante 2 min a 4°C. Repetiu-se este último passo mais duas vezes. Por último, secou-se o *pellet* ao ar e ressuspendeu-se o DNA extraído em 50 µl de água miliQ que foi dividido em aliquotas. Após a extracção do DNA, procedeu-se à sua quantificação e determinação da pureza por espectrofotometria e verificou-se a sua integridade por electroforese em gel de agarose.

2.3.3 - Quantificação de DNA

Para quantificar o DNA fez-se uma diluição das amostras de 1:100 em água miliQ, e procedeu-se à leitura num espectrofotómetro, obtendo-se assim as concentrações do DNA extraído. Esta leitura permite verificar a contaminação por proteínas, ao determinar o valor da razão A_{260}/A_{280} , sendo que os valores recomendados são entre 1,8 e 2 para a razão A_{260}/A_{280} e 2 para a razão A_{260}/A_{230} .

2.3.4 - Técnica da reacção da polimerase em cadeia (PCR)

A Técnica de PCR foi desenvolvida em 1983, por Kary Mullis e é utilizada para amplificar quantidades pequenas ou mesmo a sequência completa de um gene de DNA específico do microrganismo alvo. A amplificação implica a utilização de oligonucleótidos específicos (iniciadores, "*primers*") que delimitam a região a amplificar, de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's), uma solução tampão com magnésio (necessário para a actividade enzimática) e de uma enzima termoestável, a *Taq* DNA polimerase. Com essa enzima a sequência-alvo do DNA pode ser amplificada até um milhão de vezes após sucessivos ciclos, sendo que estes consistem em três passos. No primeiro passo o DNA é desnaturado, produzindo duas cadeias simples de DNA. No segundo passo ocorre o emparelhamento, onde os oligonucleótidos iniciadores (os *primers*) ligam-se a sequências complementares do

DNA alvo. O terceiro passo consiste na extensão das novas cadeias formadas, com a actuação da enzima ao adicionar às novas cadeias os desoxinucleotidos trifosfatos presentes na solução. A enzima catalisa a polimerização de nucleótidos no DNA em dupla hélice na direcção 5' → 3' na presença de magnésio. Cada um destes passos ocorre a temperaturas bem definidas, a desnaturação ocorre a 94°C, a extensão depende das características dos *primers* utilizados, e a temperatura de emparelhamento vai depender do comprimento do fragmento de DNA a amplificar.

Para a realização deste trabalho, utilizou-se a técnica de PCR, para modificar as extremidades de um fragmento da sequência de DNA dos genes *mreB* e *spl*, com a introdução de locais de restrição (*EcoRI* e *HindIII*) nos *primers*, para clonagem no vector pGEM-T Easy e posteriormente no vector pAUL-A para integração no cromossoma de *L. monocytogenes*. Também se recorreu a esta técnica para amplificar o gene inteiro *mreB* com a introdução dos locais de restrição para as enzimas *KpnI* e *XmaIII*, para subsequente clonagem no vector de fusão pMUTIN-GFP+.

Os *primers* utilizados ao longo do trabalho são indicados na tabela III. Todos os *primers* foram adquiridos à empresa Metabion international AG (Alemanha).

Tabela III: Descrição dos *primers* utilizados nas reacções de PCR

<i>Primers</i>	Sequência	Tm (°C)	Origem
mreEcoRI	5'-CCGAATTCTGCGGCTATTGGTG-3'	64°C	Este estudo
splEcoRI	5'-GTTAACGAATTCGTTGATTCTGATAA-3'	60°C	Este estudo
mreHind	5'-ATAAGCTTACAATTCTGGTGGCG-3'	61°C	Este estudo
splHind	5'-TGGTCAAGCTTCTCCAAGGCTA-3'	62°C	Este estudo
mreBR897	5'-GTAGAATTCACAAAAGCTGGTA-3'	57°C	Este estudo
splR897	5'-TTAAAAGAATTCGCTCGTGCGATGC-3'	64°C	Este estudo
Bact1	5'-CCAACAGAAGCTGCAAAACC-3'	60°C	Jordan <i>et al.</i> , 2008
Lis1A	5'-GCTACAGCTGGGATTGCGGT-3'	60°C	Bubert <i>et al.</i> , (1997)
Lis1B	5'-TTATACGCGACCGAAGCCAA-3'	60°C	Bubert <i>et al.</i> ,

			(1997)
UR	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	50°C	Jordan <i>et al.</i> , 2008
FXma	5'-CCTCGGCCGTTAGTTCATTTTTTTTACGTT-3'	68°C	Este estudo
RKpn	5'-GTCCATGGAATGTTTGGATTTGGTAATAA-3'	65°C	Este estudo

Para a estirpe EGD, o tamanho dos fragmentos utilizados nesta técnica foi de 429 pb e 501 pb, para os genes *mreB* e *spl*, respectivamente. Para a estirpe C897, o tamanho dos fragmentos foram de 577 pb para o gene *mreB* e 608 pb para o gene *spl*, uma vez que se tentou aumentar o tamanho do fragmento para que ocorra homologia com o cromossoma desta estirpe. As figuras seguintes representam os esquemas de amplificação dos fragmentos.

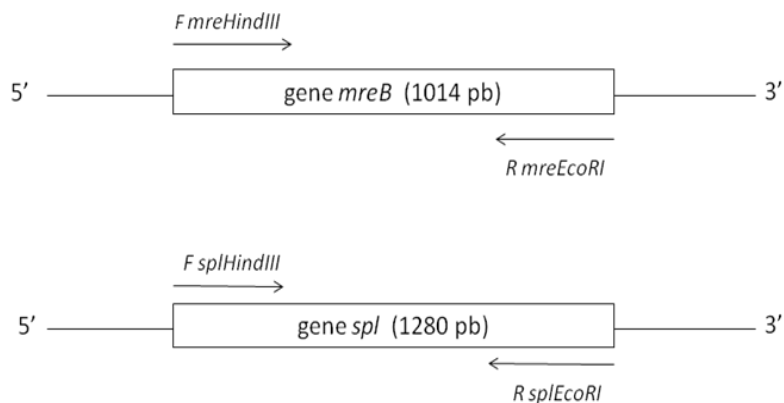


Figura 6: Esquema de amplificação dos fragmentos dos genes *mreB* e *spl* a partir do DNA genómico da estirpe EGD de *L. monocytogenes*, para clonagem no vector pAUL-A.

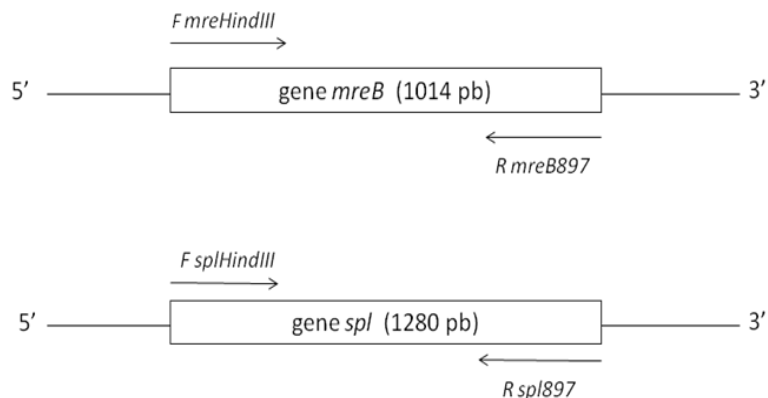


Figura 7: Esquema de amplificação dos fragmentos maiores dos genes *mreB* e *spl* a partir do DNA genómico da estirpe EGD, para clonagem no vector pAUL-A.

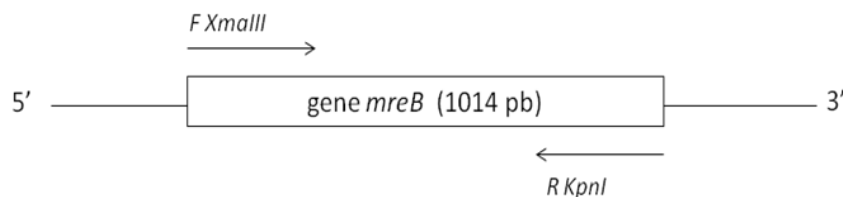


Figura 8: Esquema de amplificação dos fragmentos dos genes *mreB* e a partir do DNA genómico da estirpe EGD de *L. monocytogenes*, para clonagem com o vector pMUTIN-GFP+.

As misturas reaccionais utilizadas nas amplificações são indicadas no anexo I.

2.3.5 - Electroforese de ácidos nucleicos em geis de agarose

A separação electroforética de fragmentos de DNA é o método mais utilizado para a visualização e para a o cálculo do tamanho de fragmentos de ácidos nucleicos. A electroforese de DNA é feita normalmente em gel de agarose, que forma uma matriz porosa que deixa passar mais facilmente as moléculas mais pequenas, que assim vão migrar mais que as moléculas maiores.

As moléculas de DNA com o mesmo número de par de bases, migram juntamente e formam bandas, que podem ser visualizadas com o auxílio de uma luz ultravioleta. Para isso, é necessário incluir no gel, brometo de etídio ou outro corante como o *SYBRGreen Safe DNA gel Stain*, que se intercala na cadeia de DNA e após a exposição a raios UV, emite fluorescência.

As amostras de DNA são colocadas nos poços do gel e com a aplicação de um campo eléctrico, vão migrar para o pólo positivo (ânodo), uma vez que os ácidos nucleicos possuem uma carga negativa em pH neutro.

Para a realização do trabalho, prepararam-se geis com 1% (p/v) de agarose em 50 ml de tampão TAE 1x, que é um bom condutor. A mistura foi liquefeita no microondas e em seguida foi adicionado 2,5 µl de *SYBR Safe DNA gel Stain* (Invitrogen), a partir de uma solução stock 1000x concentrado em DMSO. Colocou-se a mistura no molde e uma vez polimerizada, colocou-se numa tina imersa de tampão TAE 1x. Adicionaram-

se aos poços o marcador padrão de tamanho de DNA (1Kb plus, Invitrogen) e as amostras, já com o tampão de amostra (loading buffer). Este tampão aumenta a densidade da amostra, devido ao glicerol e confere cor permitindo a monitorização da corrida electroforética. Aplicou-se uma voltagem de 100 V entre os dois pólos e correu-se o gel durante 30 a 40 min. Terminada a corrida, visualizaram-se as bandas num transiluminador de UV.

2.3.6 - Extração e purificação de produtos de PCR

As bandas obtidas após uma corrida electroforética, podem ser observadas e seleccionadas sob luz UV, para posterior tratamento. Para o efeito, com o auxílio de um bisturi, cortaram-se as bandas de interesse, extraíndo-as da matriz de agarose. A purificação das bandas no gel, foi feita com o kit "Gel Extraction spin kit" (Genomed), de acordo com as instruções do fornecedor. Resumidamente, o gel extraído é solubilizado e transferido para uma banda de sílica incorporada numa coluna fornecida pelo kit. O DNA presente no gel fica retido na membrana e posteriormente é eluído em 30 µl de água MiliQ estéril.

2.3.7 - Digestão de DNA com enzimas de restrição

As enzimas de restrição reconhecem e actuam sobre sequências específicas de DNA, catalisando a destruição de uma ligação fosfodiéster entre dois nucleótidos consecutivos ligados a determinadas bases. Os fragmentos de DNA obtidos por PCR e os vectores de clonagem necessitam de ser tratados com enzimas de restrição, para que as suas extremidades sejam compatíveis, possibilitando o emparelhamento entre bases complementares por ligações de hidrogénio.

Neste trabalho as enzimas utilizadas foram a *EcoRI* (10 U/µl, Promega) e *Hind III* (10 U/µl, Promega), para a clonagem com o vector pAUL-A; e FastDigest *Eag I* (*Xma III*) (10 U/µl, Fermentas) e FastDigest *Kpn I* (10 U/µl, Fermentas) para a clonagem com o vector pMUTIN-GFP+. A tabela IV mostra a sequência de reconhecimento e o local de quebra do DNA, de cada uma das enzimas.

Tabela IV: Enzimas de restrição utilizadas e respectivas sequências de reconhecimento e corte (^- indica o local do corte)

Enzima	Sequência
<i>EcoRI</i>	5'-G [^] AATTC-3'
<i>Hind III</i>	5'-A [^] AGCTT-3'
<i>Xma III</i>	5'-C [^] GGCCG-3'
<i>Kpn I</i>	5'-GGTAC [^] C-3'

A reacção de digestão foi preparada num *ependorf* com os seguintes componentes:

Tabela V: Componentes utilizados na reacção de digestão para clonagem no vector pGEM-T Easy e posterior clonagem no vector pAUL-A

Componentes da reacção	Volume (20µl)
DNA (fragmento do gene) / vector	12 µl
<i>EcoRI</i>	0,5 µl
<i>Hind III</i>	0,5 µl
Buffer E (Promega)	2 µl
Água estéril livre de nucleases	5 µl

As reacções foram a incubar a 37°C, durante 2 horas, e por fim, inactivaram-se a enzimas incubando a 60°C, durante 20 minutos.

Para a clonagem no vector pMUTIN-GFP+, utilizaram-se os seguintes componentes:

Tabela VI: Componentes da reacção de digestão para clonagem no vector pMUTIN-GFP+

Componentes da reacção	Volume vector / fragmento do gene (20µl)
DNA (fragmento do gene) / vector	10 µl / 1,5 µl
<i>Kpn I</i>	1 µl
<i>Xma III</i>	1 µl
<i>Fast Digest Buffer</i> (Fermentas)	2 µl
Água estéril	7 µl / 14,5 µl

Primeiro adicionou-se a enzima *Xma III* com uma incubação a 37°C, durante 15 minutos, depois adicionou-se a enzima *Kpn I* deixando-se actuar 5 minutos, a 37°C, e por fim, procedeu-se à inactivação enzimática, incubando a 80°C durante 5 minutos.

Após a digestão dos vectores de clonagem, o produto resultante foi tratado com fosfatase alcalina de camarão (SAP) (Roche), para remover os grupos fosfato do terminal 5' das cadeias de DNA, evitando que estes se liguem entre si, recircularizando o vector. O tratamento foi feito adicionando 1µl de SAP e incubando a 37°C, durante 15 minutos. Por fim, inactivou-se a SAP a 65°C, durante 15 minutos.

Os produtos resultantes da digestão foram separados por electroforese e purificados os produtos de interesse.

2.3.8 - Reacção de ligação do fragmento ao vector de clonagem

Para se proceder à ligação de um fragmento do gene com um vector de clonagem, o tratamento com enzimas de restrição é necessário, para que as extremidades resultantes sejam coesivas, e assim ocorra o emparelhamento de bases, resultando na ligação dos fragmentos.

Para que ocorra a ligação há que promover a ligação covalente (uma ligação fosfodiéster) entre os dois nucleótidos das extremidades das duas moléculas a ligar. Para tal, utiliza-se uma enzima denominada de DNA ligase, que catalisa a ligação entre o grupo fosfato ligado à região terminal 5' e o grupo hidroxilo ligado à região terminal 3' das moléculas de desoxiribose presentes nos nucleótidos que constituem o DNA.

Neste procedimento utilizou-se a T4 DNA ligase (Promega), isolada de *E. coli*, que é um polipéptido com peso molecular de 68000 daltons, para se proceder à ligação de um fragmento do gene *spl* e *mreB*, ao vector pGEM-T easy (Promega), e posteriormente ao vector pAUL-A; bem como a ligação do produto de PCR do gene inteiro do *mreB*, ao vector pMUTIN-GFP+. As condições das reacções encontram-se a seguir descritas.

Tabela VII: Componentes e quantidades da reacção de ligação ao vector pGEMT-Easy

Componentes da reacção	Volume (10 µl)
DNA	7 µl
pGEM-T Easy (50ng/µl)	1 µl
Tampão da ligase (10x)	1 µl
T4 DNA ligase (3U/µl)	1 µl
Água estéril	—

Tabela VIII: Componentes e quantidades da reacção de ligação ao vector pAUL-A

Componentes da reacção	Volume (20 µl)
DNA	10 µl
pAUL-A	6,5 µl
Tampão da enzima ligase (10x)	2 µl
T4 DNA ligase (3U/µl)	1,5 µl
Água estéril	—

Tabela IX: Componentes e quantidades da reacção de ligação ao vector pMUTIN-GFP+

Componentes da reacção	Volume (20 ul)
DNA	9 µl
pMUTIN-GFP+	6 µl
Tampão da enzima ligase	2 µl
T4 DNA ligase (3U/µl)	1,5 µl

Água estéril	1,5 µl
--------------	--------

A reacção de ligação foi sujeita a uma incubação a 4°C durante a noite.

2.3.9 - Preparação de células competentes de *Escherichia coli*

Uma bactéria competente é uma bactéria que está apta a receber DNA exógeno. A competência pode ocorrer naturalmente, o que é raro, ou pode ser produzida através de diferentes técnicas. Estas técnicas envolvem o tratamento com cloreto de cálcio e mudanças bruscas de temperatura. Os iões metálicos e as mudanças bruscas de temperatura alteram a permeabilidade da parede celular fazendo com que estas células permitam a entrada de DNA exógeno através da membrana celular. O procedimento do cloreto de cálcio que é o normalmente utilizado, produz uma eficiência de transformação de 10^5 a 10^7 transformantes por micrograma de DNA.

Para este procedimento utilizam-se bactérias em crescimento até à fase exponencial, uma vez que é sugerido que as moléculas do DNA, passam através de canais situados nas chamadas zonas de adesão, que são locais onde a membrana interna e externa da célula bacteriana se unem formando poros. Estes poros só estão presentes durante o crescimento bacteriano (fase de crescimento exponencial) (Mazodier e Davies, 1991).

Para a preparação de células competentes, utilizaram-se culturas de *E. coli* DH5α e *E. coli* DH10β, isolada em meio *Luria Bertani Broth* (LB) agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Transferiu-se uma colónia para 10 ml de meio LB estéril e colocou-se a crescer a 37°C numa incubadora orbital com agitação (180rpm), durante 12-16 horas. Após o crescimento, transferiu-se 1 ml do pré-inoculo para 100 ml de meio LB. A cultura foi crescida até atingir um valor máximo de $DO_{600} = 0,5$. Entretanto prepararam-se tubos *eppendorf* estéreis e colocados a -80°C antes da sua utilização, para que as bactérias competentes fragilizadas não perdessem o estado de competência.

Distribuíram-se 50 ml da cultura em tubos *falcon* de 50 ml e centrifugaram-se a 2790 xg durante 5 min a 4°C. Decantou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 1/10 do volume da cultura (5 ml) de tampão de cloreto de cálcio frio (15% de glicerol, 5mM de Tris-HCl a pH 7.5, 5mM de $MgCl_2$ e 100 mM de $CaCl_2$). Colocou-se no gelo durante 5 minutos e centrifugou-se 5 minutos a 2790 xg a 4°C. Decantou-se o

sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1/25 do volume original de cultura (cerca de 2ml) de tampão de CaCl₂ frio. Esta suspensão foi mantida em gelo por 20 min. Por fim, distribuíram-se 100 µl da suspensão bacteriana por cada tubo *ependorf* previamente gelado e voltou a colocar-se à temperatura -80°C. A suspensão foi mantida pelo menos por 24 horas a -80°C, antes de ser utilizada.

Para a preparação das células competentes, utilizaram-se culturas de *E. coli* DH5α e *E. coli* DH10β, crescidas em meio LB agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Para isso transferiu-se uma ansada da cultura para 10 ml de meio LB estéril e colocou-se a crescer a 37°C numa incubadora orbital com agitação (180 rpm), durante 12-16 horas. Após o crescimento, transferiu-se 1 ml do pré-inóculo para 100 ml de meio LB. A cultura foi crescida até atingir um valor máximo de DO₆₀₀ = 0,5. Entretanto prepararam-se tubos *ependorf* estéreis e colocados a -20°C antes da sua utilização, para assegurar a manutenção do estado de competência.

Distribuíram-se 50 ml da cultura em tubos *Falcon* de 50 ml e centrifugaram-se a 2790 xg durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e ressuspenderam-se as células em 1/10 do volume da cultura (5 ml) de tampão de cloreto de cálcio frio (15% de glicerol, 5mM de Tris-HCl a pH 7.5, 5mM de MgCl₂ e 100 mM de CaCl₂). De seguida foram mantidas em gelo durante 5 minutos e posteriormente foram sujeitas a centrifugação por 5 minutos a 2790 xg a 4°C. Decantou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1/25 do volume original de cultura (cerca de 2ml) de tampão de CaCl₂ frio. Esta suspensão foi mantida em gelo por 20 min. Por fim, distribuíram-se 100 µl da suspensão bacteriana por cada tubo *ependorf* previamente gelado e voltou a colocar-se à temperatura -80°C. A suspensão foi mantida pelo menos por 24 horas a -80°C, antes de ser utilizada.

2.3.10 - Transformação de *Escherichia coli*

O processo de transformação envolve a introdução de DNA exógeno nas células bacterianas, passando então o DNA exógeno a fazer parte do material genético da bactéria, podendo ser herdado pelas novas células todas as vezes que a bactéria se multiplicar.

Para se concretizar este processo, adicionaram-se 4 µl da reacção de ligação a 100 µl de bactérias competentes. Permaneceram em gelo durante 30 minutos. De seguida, a mistura foi submetida a um choque térmico (90 s a 42°C) de modo a permeabilizar a membrana das células e permitir a entrada do plasmídeo. Adicionaram-se 400µl de

meio SOC frio (4°C) e incubou-se durante 1 hora a 37°C com agitação (180 rpm). Por fim, procedeu-se à sementeira da suspensão bacteriana em meio LB agar suplementado com o antibiótico indicado (100 ug/ml de AMP, para o vector pGEM-T Easy e pMUTIN-GFP+, ou 300 ug/ml de ERY para o vector pAUL-A), de modo a seleccionar as células com o plasmídeo inserido. Na transformação com o vector pGEM-T Easy foi também adicionado ao meio 60 µl de X-Gal (20mg/ml, Fermentas). Após a incubação por um período de 16-18h a 37°C, foram seleccionadas algumas colónias para verificação da transformação.

2.3.11 - Identificação dos clones recombinantes

Os clones recombinantes foram seleccionados pela resistência à AMP e pela degradação do composto X-Gal, que é um substrato cromogénico para a enzima β-galactosidase. O vector pGEM-T Easy contém um segmento do gene Lac-Z que codifica para os aminoácidos iniciais (146) da β-galactosidase de *E. coli*, e que vai actuar por α-complementação com o gene de células hospedeiras que codificam para o segmento carboxi-terminal da proteína e assim activar a síntese da β-galactosidase activa. Desta forma, quando os fragmentos de DNA estão inseridos no vector, a região que codifica o péptido α da β-galactosidase fica bloqueada, não existindo a degradação do X-Gal. As colónias constituídas por células transformadas apresentam o pigmento branco. Quando a enzima está activa o composto X-Gal é degradado originando colónias com pigmento azul.

A transformação foi ainda confirmada através de PCR com primers específicos para o fragmento em questão.

2.3.12 - Extracção e purificação de DNA plasmídico (“Miniprep”)

Quando são obtidas colónias de bactérias transformadas com o fragmento pretendido, é necessário extrair e purificar o vector com o fragmento de DNA inserido. Para isso, procedeu-se a uma minipreparação que se realiza em três fases: i) crescimento dos clones seleccionados em meio líquido, ii) recolha em lise das bactérias e, iii) purificação do DNA plasmídico por precipitação.

Primeiramente, inoculou-se individualmente as colónias bacterianas em 5 ml de caldo LB, contendo o antibiótico apropriado para o vector. A cultura foi mantida cerca de 16 h a 37°C com agitação (180 rpm). Após o crescimento, centrifugaram-se 2 ml das

culturas a 16000 xg durante 5 min a 4°C. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 200 µl de tampão GTE frio e 10 µl de RNase A (10mg/ml, Promega). Homogenizou-se no vórtex e deixou-se à temperatura ambiente por 10 min. De seguida foram adicionados 400 µl de uma solução de 0,2M NaOH / 1% (p/v) SDS preparada de fresco, misturou-se por inversão e colocou-se no gelo por 5 min. Posteriormente adicionaram-se 300 µl de uma solução de acetato de sódio 3M, pH 5,2, misturou-se por inversão e colocou-se no gelo durante 30 min. Esta solução neutraliza o NaOH adicionado anteriormente enquanto precipita o DNA genómico e o SDS num precipitado branco insolúvel (Maniatis *et al.*, 1989). Decorrido este tempo, centrifugaram-se os *ependorfs* a 16000 xg durante 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, transferiu-se o sobrenadante para novos tubos estéreis contendo 1 ml de etanol a 96% frio para precipitação do DNA. Homogenizou-se no vórtex e centrifugou-se novamente a 16000 xg durante 15 min a 4°C. O *pellet* obtido foi lavado com etanol a 75% e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. Finalmente, procedeu-se à secagem do *pellet* obtido (DNA) ao ar de forma a eliminar o álcool residual. A solubilização do DNA foi feita em 50 µl de água MilliQ estéril.

2.3.13 - Preparação de células electrocompetentes de *Listeria monocytogenes*

Para se realizar a electroporação das estirpes *L. monocytogenes* EGD e C897, prepararam-se previamente células para o tratamento.

Primeiro inoculou-se uma colónia da estirpe seleccionada em 50 ml de meio BHI/20% sucrose (BHI/S) e foi a incubar durante a noite a 30°C em banho-maria com agitação (120 rpm). Uma vez crescida a cultura, inoculou-se 12,5 ml desta suspensão em 237,5 ml de meio BHI/S e incubou-se nas mesmas condições até a cultura atingir uma $DO_{600}=0,2$. De seguida, adicionou-se 10 µg/ml de Penicilina G (Sigma, New York, USA) à cultura e deixou-se crescer por mais 2 horas. Ao fim das duas horas centrifugou-se a suspensão a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C, e lavou-se o *pellet* duas vezes com o mesmo volume de uma solução Hepes (Sigma, New York, USA) 1mM Hepes pH 7,0 e 0,5M sucrose e centrifugou-se a 4500 rpm por 10 minutos. No final, ressuspendeu-se o *pellet* em 1,5 mL da mesma solução e prepararam-se aliquotas de 100µl. As aliquotas foram acondicionadas a -80°C.

2.3.14 - Electroporação de *Listeria monocytogenes*

A Electroporação baseia-se na electropermeabilização reversível, das células bacterianas, devido a um impulso eléctrico de elevada intensidade e curta duração. Com os plasmídeos obtidos anteriormente transformaram-se as estirpes EGD e C897, previamente preparadas para a electroporação. A quantidade de plasmídeo indicada foi adicionada a 20 µl da suspensão bacteriana.

Tabela X: Componentes utilizados na electroporação e respectivas quantidades

DNA plasmídico	Quantidade (DNA)	Estirpe
pAUL-A+mreB	0,78 µg	EGD
pAUL-A+ spl	0,98 µg	EGD
pMUTIN-GFP+ mreB	0,812 µg	EGD
pAUL-A+mreB	1,95 µg	C897
pAUL-A+ spl	2,45 µg	C897
pMUTIN-GFP+ mreB	2,02 µg	C897

Após a adição a mistura deixou-se a incubar no gelo por 1 minuto, procedendo-se de seguida à electroporação.

As condições para a electroporação das estirpes EGD e C897 foram as seguintes: resistência, 10kVcm⁻¹, 200Ω e 2,5µF com uma constante de tempo de 3,9ms.

Colocaram-se depois as cuvettes em gelo por 1 min e adicionou-se 1 ml de BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), incubando-se durante 3 h sem agitação a 30°C. Para a estirpe C897 a incubação decorreu durante 4 horas. Após esse período de tempo, plaqueou-se o conteúdo da electroporação em placas BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) na presença de eritromicina (ERY) (5 µg/ml para o vector pAUL-A e 1µg/ml com 1mM IPTG para o vector pMUTIN-GFP+) e a incubação decorreu a 30°C. As colónias obtidas da electroporação com o vector pAUL-A, foram transferidas para novas placas de BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) com ERY (5 µg/ml) e incubadas a 42°C.

O processo de recombinação homóloga entre o vector pAUL-A e os fragmentos dos genes em estudo encontra-se esquematizado na Figura 9.

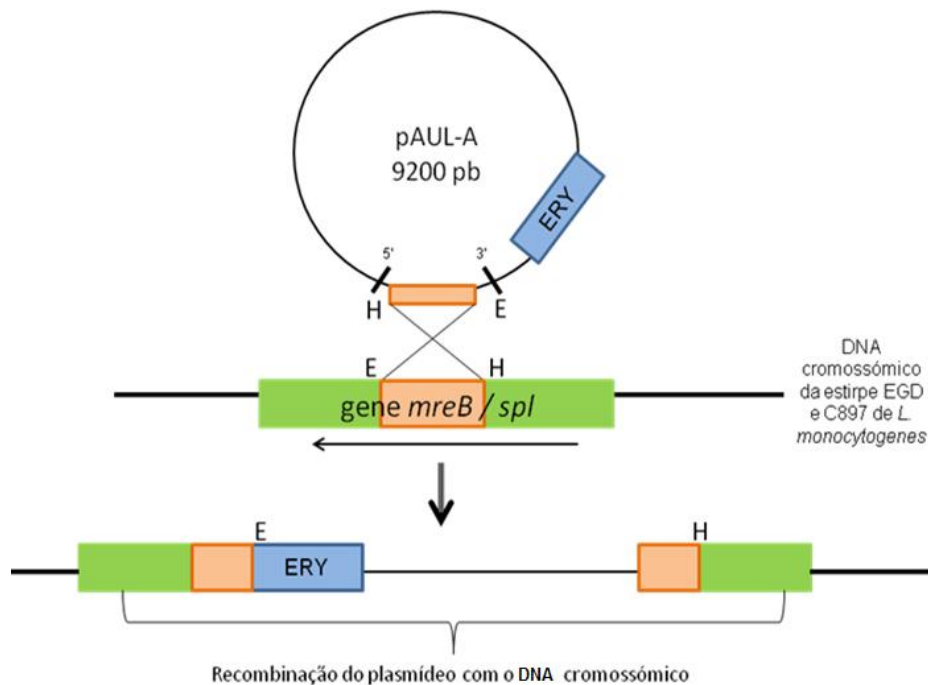


Figura 9- Esquema da recombinação do plasmídeo (pAUL-A + mreB/spl) com os genes *mreB* e *spl* presentes no DNA cromossômico das estirpes EGD e C897 de *L. monocytogenes*. O plasmídeo transporta um fragmento do gene, que foi introduzido após a criação de extremidades compatíveis com as enzimas EcoRI (E) e HindIII (H). Por recombinação homóloga o fragmento do gene liga-se à porção interna do gene presente no cromossoma, permitindo a integração do plasmídeo no cromossoma da estirpe. O vector pAUL-A contém um marcador de resistência à eritromicina (ERY). A seta (←) indica a direção da transcrição do gene *mreB/spl* truncado.

Os recombinantes obtidos com o vector pAUL-A foram posteriormente verificados por PCR com *primers* do fragmento e do vector (UR). Os clones transformados foram igualmente verificados pela amplificação do gene *iap* para assegurar que não ocorreram efeitos polares no gene de umas das mais importantes autolisinas.

O esquema de fusão do pMUTIN-GFP⁺mreB no locus do *mreB* está representado na Figura 10. O vector pMUTIN-GFP⁺ possui um marcador de selecção à eritromicina, cuja concentração de selecção teve que ser optimizada tendo por base a referência de

0,3 µg/ml para *B. subtilis* (Kaltwasser *et al.* 2002). A concentração a ser utilizada em *L. monocytogenes* é de 1µg/ml.

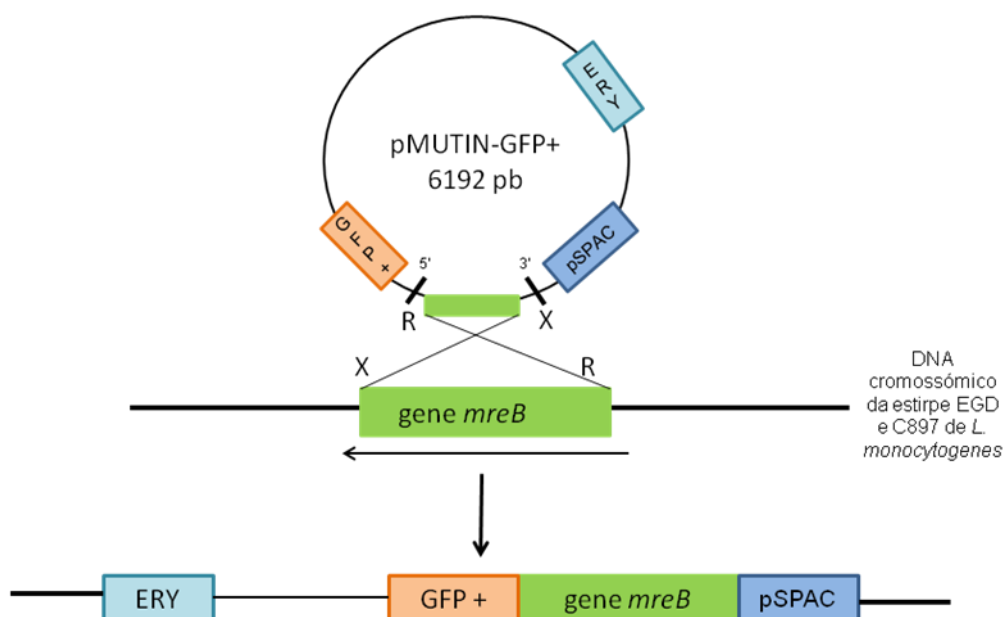


Figura 10 - Representação da fusão do pMUTINGFP+mreB no DNA cromossômico das estirpes *L. monocytogenes* EGD e C897. O pMUTINGFP+mreB transporta uma cópia do gene *mreB* inteiro, que foi introduzido após a criação de extremidades compatíveis com as enzimas KpnI (R) e XmaIII (X). Por recombinação homóloga é possível a integração/fusão do plasmídeo no gene alvo no cromossoma bacteriano. A transcrição do gene *mreB* é controlada pelo promotor *Pspac* dependente de IPTG e a sua expressão visualizada pela expressão de GFP. O vector pMUTIN-GFP+ contém um marcador de resistência à eritromicina (ERY).

Para avaliar a funcionalidade da fusão do vector pMUTIN-GFP+mreB nos clones isolados realizou-se o procedimento descrito por Kaltwasser *et al.* (2002). Em primeiro lugar as colónias suspeitas foram crescidas em 50 ml de BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado com 1 µg/ml ERY e com 1 mM IPTG até meio da fase exponencial. Nesta fase retirou-se 1 ml da cultura para 3 eppendorfs e centrifugou-se a 3500 rpm durante 10 min. Num dos eppendorfs ressuspendeu-se o pellet em TFS e centrifugou-se de novo nas condições anteriores e ressuspendeu-se novamente em TFS e mantiveram-se os tubos no gelo e protegidos da luz. A suspensão de um dos tubos foi dividida por poços de uma microplaca *Greiner 96 Flat bottom* com 200 µl cada e em triplicado. A partir do segundo eppendorf mediu-se a absorvência a 578nm e a absorvência foi ajustada a 0,1 V do seu valor. E em seguida foi medida a fluorescência a 25°C com um filtro de excitação de 488 nm e um filtro de emissão a 510 nm. O clone com emissão de fluorescência foi o seleccionado para a continuação

do estudo. O volume da suspensão correspondente ao terceiro eppendorf foi utilizado para observação ao microscópio por fluorescência.

2.3.15 - Indução da autólise pelo Triton-X

A susceptibilidade à lise foi testada pela indução da lise pela acção do detergente não iónico Triton-X. O procedimento foi realizado como descrito por De Jonge *et al.* (1991). Foram preparados pré-inóculos e de cada um foram utilizados cerca de 600 µl para a inoculação de 50 ml de meio BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), para se obter um valor de DO inicial de $DO_{620} = 0,02 - 0,05$. A cultura foi mantida a 37°C com agitação (120 rpm) até se atingir um valor de $DO_{620}=0,3$ o que corresponde ao meio da fase exponencial. De seguida a cultura foi colocada em gelo, para arrefecimento rápido. Após arrefecimento transferiram-se 25 ml de cada cultura para tubos *Falcon* de 50 ml e centrifugaram-se a 5000 rpm, durante 5 minutos a 4°C. O *pellet* obtido foi lavado com o mesmo volume de água MilliQ estéril e gelada e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições anteriores e realizou-se novamente uma segunda lavagem. Efectuou-se uma última centrifugação e ressuspendeu-se o *pellet* numa solução de Glicina 50 mM/Triton-X 0,01% até uma $DO_{620} = 1,0$. O ensaio decorreu a 37°C, sendo feitas medições durante 4 horas, com intervalos de 30 minutos. A lise foi verificada por decréscimo da absorvência. Foram utilizadas três réplicas de cada estirpe e respectivos mutantes.

2.3.16 - Indução da lise com Penicilina G

A penicilina G é um antibiótico inibidor beta-lactâmico, com ligação às proteínas de transpeptidação ou proteínas de ligação à penicilina (PBP's), que desempenham um papel essencial na incorporação do peptidoglicano na parede celular. Durante os primeiros minutos de contacto com o antibiótico a inactivação (acilação) das PBP's pode ocorrer de forma desigual e algumas podem permanecer não aciladas. Estas são capazes de catalisar uma parede celular estruturalmente incorrecta com propensão para a lise. Com o objectivo de avaliar o efeito da acção da penicilina nas estirpes e respectivos mutantes procedeu-se ao ensaio como descrito por Qin *et al.* (1998).

Foram preparados pré-inóculos das estirpes selvagens e respectivos mutantes e 1% foi transferido para 100ml de BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). A incubação ocorreu a 37°C até as culturas atingirem uma $DO_{620}= 0,25$. De seguida adicionaram-se

100U/ml de Penicilina G à suspensão e, mantendo as mesmas condições de incubação (37°C, 120 rpm), mediu-se o declínio da DO (lise) ao longo de 6 horas, em intervalos de uma hora e as 24 horas. Determinou-se o número de células viáveis, pelo método das gotas, conhecido por *Miles e Misra* (1938), no tempo inicial do ensaio (T=0) após a adição de penicilina e às 24 horas, conforme a seguir se descreve. O ensaio incluiu três réplicas.

2.3.17 - Visualização da nascente do peptidoglicano com o derivado fluorescente da vancomicina

Com o objectivo de se visualizar o padrão espacial da inserção de novo material na síntese do peptidoglicano, utilizou-se um derivado fluorescente da vancomicina (BODIPY® FL vancomycin, Invitrogen (Van-FL)) como sonda para se ligar ao terminal D-alanina-D-alanina do precursor do peptidoglicano, possibilitando assim uma visualização da nascente da parede celular por microscopia de fluorescência. O procedimento efectuado baseou-se no descrito por Daniel e Errington, (2003). O procedimento requer a utilização do antibiótico na concentração mínima inibitória (CMI), bem como do seu derivado fluorescente uma vez que será preciso adicionar os dois componentes pelo que se procedeu à sua determinação.

2.3.18 - Determinação da concentração mínima inibitória

Na determinação da CMI da vancomicina e respectivo derivado fluorescente foi preparado um pré-inoculo de 10ml em meio Trivett-Meyer (TM) que cresceu durante a noite. Transferiu-se 500 µl do pré-inoculo para um eppendorf e centrifugou-se durante 5 minutos a 3500 rpm. Lavou-se o *pellet* em novo meio TM com a respectiva concentração de antibiótico. Da suspensão obtida inocularam-se 20 µl numa microplaca com 96 poços (Greiner 96 Flat bottom Transparent), em 180 µl de meio TM com antibiótico.

Na determinação do valor CMI do Van-FL efectuou-se o procedimento descrito acima, tendo em conta os resultados obtidos com a vancomicina.

2.3.19 - Coloração com Van-FL

O procedimento para a coloração das células com Van-FL consistiu primeiramente na preparação de um pré-inoculo de 20ml de meio TM ou BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) das estirpes e respectivos mutantes em estudo, a 30°C durante a noite. Posteriormente inocularam-se 30 ml de meio a partir do pré-inoculo e a cultura cresceu durante 9 horas. Retiraram-se 2 ml da suspensão para um eppendorf e centrifugou-se a 4000 rpm durante 5 minutos. Lavou-se o pellet três vezes com tampão fosfato salino (TFS) e por fim ressuspendeu-se em 1,6% formaldeído (diluído em TFS). A suspensão foi mantida no gelo durante 1 hora. De seguida voltou-se a centrifugar nas condições anteriores e lavou-se novamente 3 vezes com TFS. Transferiram-se 40 µl para um novo eppendorf e adicionaram-se 20 µl de VAN com uma concentração de 12 µg/ml e 20 µl de Van-FL com igual concentração. Envolveu-se o *eppendorf* em papel de alumínio, de modo a permanecer ao abrigo da luz, para não ocorrer a degradação da fluoresceína e permaneceu durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as células foram centrifugadas e realizaram-se mais duas lavagens com TFS.

2.3.20 - Visualização ao microscópio de fluorescência

Para a observação ao microscópio de fluorescência e respectiva captação de imagem utilizaram-se lâminas revestidas com polilisina. As imagens foram obtidas através do microscópio Carl Zeiss, Axioimager Z2.

Para melhor visualização as células foram tratadas com um antibiótico inibidor da divisão celular, a cefalexina (Sigma, New York, USA). Para as estirpes selvagens EGD e C897 foi utilizada uma concentração de 15 µg/ml e para os mutantes obtidos 10 µg/ml. As células cresceram durante 9 horas em meio BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) e foram posteriormente fixas em 1,6 % formaldeído (diluído em TFS). O procedimento de visualização foi como descrito acima.

2.3.21 - Avaliação da capacidade de invasão celular

Na determinação da capacidade invasiva das estirpes e respectivos mutantes, foram utilizadas as linhas celulares NIH3T3. A linhagem utilizada foi cedida pelo Instituto Gulbenkian para a Ciência (IGC), Lisboa.

As células NIH3T3 são fibroblastos derivados do embrião de ratinho, com um tempo médio de duplicação de 20 horas. O crescimento das linhas celulares foi realizado em meio RPMI (Gibco, Invitrogen) com 10% soro bovino fetal e 2 mM Glutamina. A incubação decorreu a 37°C na presença de 5% CO₂.

Durante a fase de recuperação das células o meio foi mudado de dois em dois dias até a cultura atingir a confluência. Uma vez confluenta a cultura foi tripsinada utilizando uma solução de 0,25% tripsina-EDTA (Sigma, New York, USA, Madrid, Espanha) e transferida para frascos de 250 ml até atingir total confluência.

As estirpes de *L. monocytogenes* e respectivos mutantes foram cultivados em meio BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (suplementado com antibiótico sempre que necessário) durante a noite a 30°C sem agitação. Monocamadas confluentes de células NIH3T3 foram inoculadas numa razão de 10 células bacterianas por cada célula NIH3T3, cerca de $1,0 \times 10^6$ *L. monocytogenes* e a incubação decorreu a 37 °C e 5%CO₂ durante 45 minutos. De forma a eliminar as células bacterianas extracelulares, lavaram-se três vezes as monocamadas com TFS, pH 7,3, após as quais se adicionou meio suplementado com 150 µg/µl de gentamicina. E deixou-se actuar por mais 45 minutos findo os quais as células NIH3T3 foram novamente lavadas três vezes com TFS e procedeu-se à lise celular através de pipetagem vigorosa com água destilada fria. Na determinação da viabilidade bacteriana foi utilizado o método das gotas descrito por Miles and Misra, (1938). A capacidade de invasão é determinada como a percentagem das células bacterianas intracelulares.

2.3.22 - Avaliação da expressão do gene *mreB* por PCR em tempo real

Para confirmar que a expressão do gene *mreB* em *L. monocytogenes* EGDmreB era nula ou pouco significativa foi seleccionado o método de expressão por PCR em tempo real. Esta técnica é altamente sensível e permite a quantificação de transcriptos raros bem como de pequenas mudanças na expressão dos genes (Pfaffl, 2001). O método de quantificação baseia-se na expressão relativa do gene alvo *versus* o gene de referência, nomeadamente *housekeeping genes*.

As reacções são caracterizadas pelo ciclo de PCR em que a amplificação alvo é detectada, o ponto que detecta o ciclo no qual a reacção atinge o limiar da fase exponencial é designado por *Cycle Threshold* (C_T), ou seja, o valor de tempo em que a intensidade de fluorescência é superior à fluorescência base. Este ponto permite a

quantificação exacta e reprodutível com base na fluorescência obtida. Consequentemente, quanto mais elevada a quantidade de DNA na amostra inicial, mais rapidamente surge um aumento do sinal de fluorescência, originando um Ct mais baixo.

O composto fluorescente mais utilizado é o SYBR®Green, que se liga à cadeia dupla do DNA. Quando o corante SYBR Green liga-se ao DNA, a intensidade das emissões fluorescentes aumentam. Quanto mais DNA for amplificado, maior o nível de emissão de fluorescência. Como tal, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado.

Para realizar o ensaio efectuou-se a extracção do RNA da estirpe *L. monocytogenes* EGD e do mutante EGDmreB, em triplicado. As culturas foram preparadas em 50 ml de BHI até atingir um valor de $DO_{600} = 0,4$. De seguida, as culturas foram centrifugadas a 2790 xg durante 5 minutos e procedeu-se à extracção do RNA com o kit *SV RNA Isolation* (Promega), seguindo as instruções do fornecedor. As amostras foram tratadas com 4U de *TURBO™ DNase* (Ambion), para se eliminar algum DNA residual. A pureza e a concentração do RNA obtido foram determinadas medindo a absorvência por espectrofotometria e qualidade do RNA isolado foi ainda avaliada por electroforese em gel de agarose. Posteriormente procedeu-se à síntese de cDNA, de cada réplica, com o kit *iScript™ cDNA synthesis* (Bio Rad). Na tabela XI é indicada a composição da reacção:

Tabela XI: Componentes da reacção para a síntese de DNAC

Componentes da reacção	Volume (20 µl)
<i>iScript reaction mix</i> (5x)	4 µl
<i>iScript reverse transcriptase</i>	1 µl
ARN extraído	1ug
Água livre de nucleases	14 µl

A mistura reaccional foi a incubar durante 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. As amostras foram posteriormente armazenadas a -20°C.

A amplificação do gene *mreB* ocorreu no termociclador iQcycle multicolor real time PCR detection system (BioRad, Hercule, EUA). O housekeeping gene utilizado foi o *rps* (lmo1796). Os *primers* utilizados foram os seguintes:

Tabela XII: *Primers* utilizados na reacção de PCR em Tempo Real

	Primers	Sequência	Tm	Origem
Gene <i>mreB</i>	mreBF	5'-CATTACGCGTGGTTTACTTG-3'	56°C	Este estudo
	mreBR	5'-AGATGGCGTTATTGCTGATT-3'	54°C	Este estudo
Gene <i>rps</i>	rps2R	5'-GTTTAAAACGTATTGGTTCTA-3'	57°C	Este estudo
	rps2F	5'-TTATAAGTACCAATAGTTTCG-3'	57°C	Este estudo

A composição da mistura reaccional para o PCR em Tempo Real é indicada na Tabela XIII.

Tabela XIII: Componentes e respectivas quantidades para a reacção PCR em Tempo Real

Componentes	Volume (50 µl)
<i>iQ SYBR Green supermix</i> (1x) (Bio-Rad)	25 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
DNAc	2 µl
Àgua miliQ	21 µl

Para controlo da reacção foi adicionado um controlo de negativo sem cDNA e um controlo com RNA.

As condições utilizadas na reacção encontram-se no anexo I.

3 - Resultados

Com o objectivo de esclarecer a possível participação dos genes *mreB* e *spl* no processo autolítico de *L. monocytogenes* C897, procedeu-se à interrupção dos referidos genes, nas estirpes EGD e C897. Para isto foi utilizada a técnica de recombinação homóloga, com o vector de integração pAUL-A. O estudo foi iniciado com a clonagem dos referidos genes no vector pGEM-Teasy e posterior clonagem com o vector pAUL-A, para posterior transformação das estirpes de *L. monocytogenes*.

3.1 - Clonagem no vector pGEM-TEasy dos fragmentos dos genes *spl* e *mreB*

Para se obterem os fragmentos dos genes *spl* e *mreB* necessários para a clonagem, procedeu-se primeiramente à amplificação por PCR de dois fragmentos, de cada um dos genes, tendo como molde o DNA genómico da estirpe EGD e C897. Os *primers* utilizados foram modificados nas extremidades, para se introduzirem os locais de restrição das enzimas *EcoRI* e *HindIII*, necessários à posterior ligação com o vector pAUL-A. Para a amplificação do fragmento do gene *mreB* e *spl* na estirpe EGD, utilizaram-se os *primers* *mreEcoRI/mreHind* e *splEcoRI/splHind*, respectivamente, e para a estirpe C897 para os mesmos genes foram os *primers* *mreHind/mreBR897* e *splHind/spIR897*, respectivamente. A utilização de um fragmento superior nos genes *mreB* e *spl* na estirpe C897, prende-se com o facto de não se terem obtido mutantes com a construção aplicada na estirpe EGD.

A amplificação dos fragmentos está representada na Figura 11 e 12.

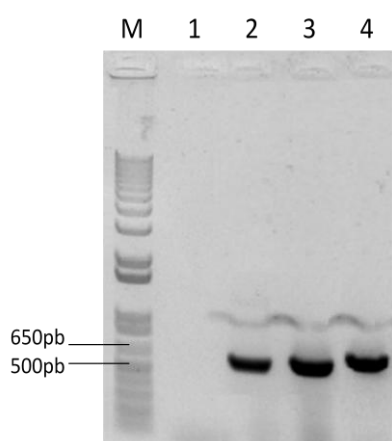


Figura 11: Amplificação do gene *mreB* e *spl* na estirpe C897. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1- control negativo da reacção (sem adição de DNA), 2 e 3 – fragmento amplificado do gene *mreB* (577 pb) com os *primers* *mreHind/mreBR897*, 4- fragmento amplificado do gene *spl* (608 pb) com os *primers* *splHind/spIR897*.

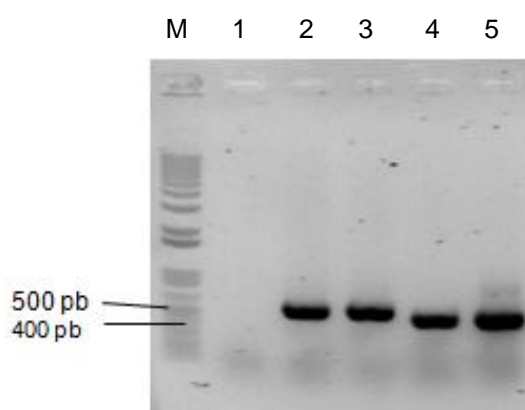


Figura 12: Amplificação do gene *mreB* e *spl* na estirpe EGD. M-marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1 - control negativo da reacção (sem adição de DNA), 2 e 3 – fragmento amplificado do gene *spl* (501 pb) com os *primers* *splEcoRI/splHind*, 4 e 5 - fragmento amplificado do gene *mreB* (429pb) com os *primers* *mreEcoRI/mreHind*.

Os fragmentos amplificados foram verificados por electroforese em gel de agarose, purificados e clonados no vector pGEM-T Easy. Posteriormente procedeu-se à transformação da estirpe DH10 β de *E. coli*, com os plasmídeos obtidos. Os clones recombinantes foram confirmados por PCR *colony* com os *primers* utilizados anteriormente. A confirmação da transformação de *E. coli* está representada nas Figuras 13 a 16.

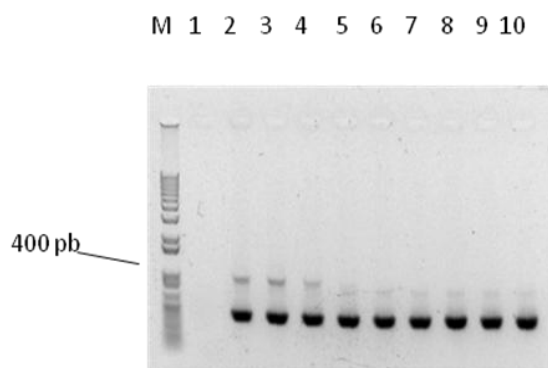


Figura 13 - Amplificação do fragmento do gene *mreB*, da estirpe EGD, clonado no vector pGEM-T Easy. M- Marcador 1 Kb plus (Invitrogen) 1- controlo negativo da reacção (sem adição de DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe EGD) 3 a 10 – DNA plasmídico de 8 colónias seleccionadas.

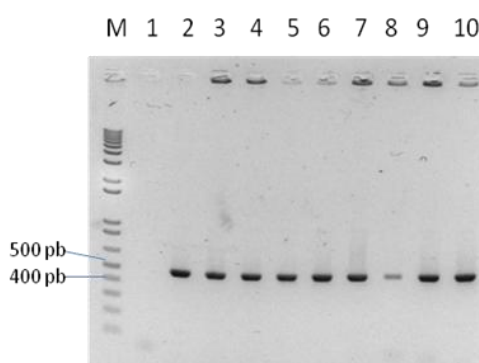


Figura 14 - Amplificação do fragmento do gene *spl*, da estirpe EGD, clonado no vector pGEM-T Easy. M- Marcador 1 Kb plus (Invitrogen) 1- controlo negativo da reacção (sem adição de DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe EGD) 3 a 10 – DNA plasmídico de 8 colónias seleccionadas.

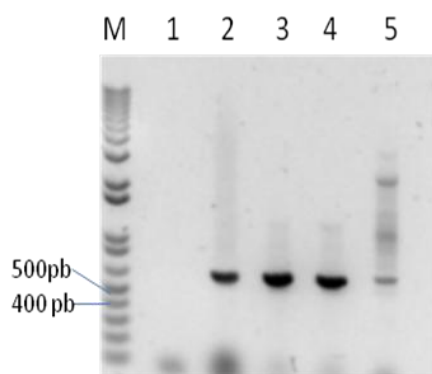


Figura 15 - Amplificação do fragmento do gene *mreB*, da estirpe C897 clonado no vector pGEM-T Easy. M- Marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1- controlo negativo da reacção (sem adição de DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe C897), 3 a 5 – DNA plasmídico de 3 colónias seleccionadas.

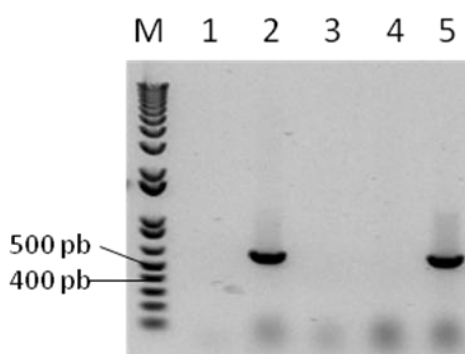


Figura 16 - Amplificação do fragmento do gene *spl*, da estirpe C897, clonado no vector pGEM-T Easy. M- Marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1- controlo negativo da reacção (sem adição de DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe C897), 3 a 5 – DNA plasmídico da colónia seleccionada.

3.2 - Integração dos fragmentos do gene *mreB* e *spl* no vector pAUL-A

O vector pAUL-A tem a capacidade de se replicar, quer em *E. coli* quer em *Listeria spp*, tendo uma origem de replicação sensível à temperatura e um marcador de resistência à eritromicina (Chakraborty *et al.*, 1992).

Os plasmídeos pGEMT-EasymreB e pGEMT-Easyspl obtidos anteriormente foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, para o isolamento dos fragmentos dos genes *mreB* e *spl* (Figura 17 e 18) para posterior inserção no vector pAUL-A. Os fragmentos foram purificados e em seguida através de uma reacção de ligação foram transferidos para o vector pAUL-A. O plasmídeo resultante foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH10 β . Os transformantes foram verificados por PCR, que se encontra representada nas Figuras 19 – 22.

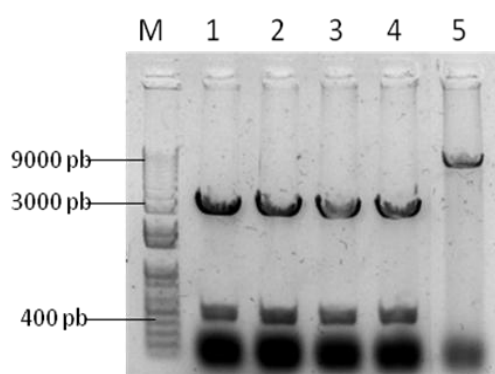


Figura 17- Digestão do vector pGEM-T Easy com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* para libertação do fragmento do gene *spl* (estirpe EGD) (501 pb) (linhas 1 e 2), fragmento do gene *mreB* (estirpe EGD) (429 pb) (linhas 3 e 4), e do vector pAUL-A (9200 pb) com mesmas enzimas (linha 5). M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen).

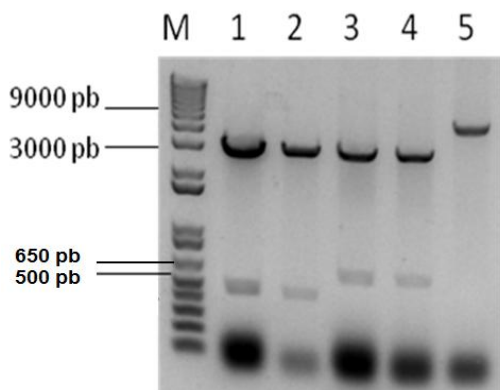


Figura 18- Digestão do vector pGEM-T Easy com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* para libertação do fragmento do gene *mreB* (estirpe C897) (577 pb) (linhas 1 e 2), fragmento do gene *spl* (estirpe C897) (608 pb) (linhas 3 e 4), e do vector pAUL-A (9200 pb) com mesmas enzimas (linha 5). M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen).

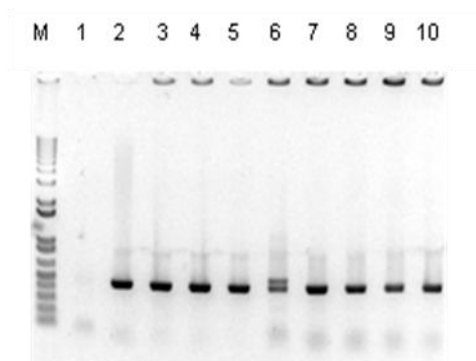


Figura 19 - Verificação da transformação de *E.coli* com o plasmídeo pAUL-A e o fragmento do gene *mreB* inserido por PCR, da estirpe EGD. O par de *primers* utilizado foi o *mreHindIII* / *mreEcoRI*. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1- controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe EGD, 3-10- colónias seleccionadas para confirmação.

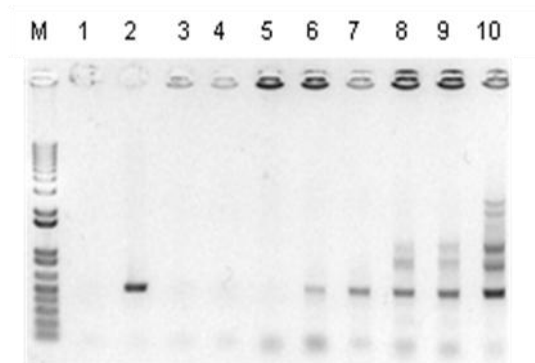


Figura 20 - Verificação da transformação de *E.coli* com o plasmídeo pAUL-A e o fragmento do gene *spl* inserido por PCR, da estirpe EGD. O par de *primers* utilizado foi o *splHindIII* / *splEcoRI*. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1- controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe EGD, 3-10- colónias seleccionadas para confirmação.

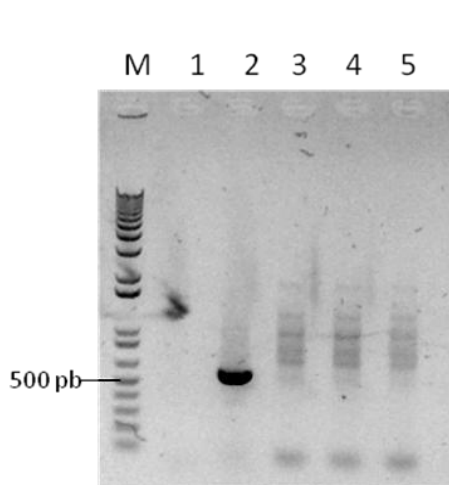


Figura 21 - Verificação da transformação de *E.coli* com o plasmídeo pAUL-A e o fragmento do gene *mreB* inserido por PCR, da estirpe C897. O par de *primers* utilizado foi o *mreHindIII* / *mreBR897*. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1- controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe EGD, 3 a 5- colónias seleccionadas para confirmação.

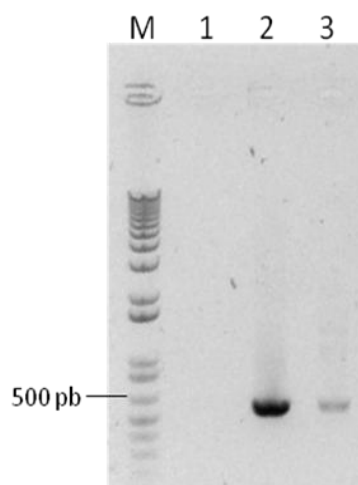


Figura 22 - Verificação da transformação de *E.coli* com o plasmídeo pAUL-A e o fragmento do gene *spl* inserido por PCR, da estirpe C897. O par de *primers* utilizado foi o *splHindIII* / *splR897*. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1- controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe EGD, 3- colónia seleccionada para confirmação.

3.3 - Transformação das estirpes de *L. monocytogenes* EGD e C897

O processo de transformação de *L. monocytogenes* EGD e C897 foi iniciado com o isolamento do DNA plasmídico, que corresponde ao pAUL-A com os fragmentos dos genes em estudo inseridos pelo processo de recombinação homóloga.

Os transformantes obtidos foram verificados por PCR com *primers* do vector (UR) e do fragmento. Os resultados são apresentados nas Figuras 23 - 25.

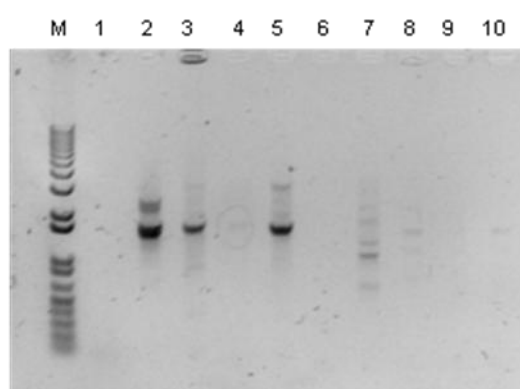


Figura 23 - Confirmação da transformação da estirpe EGD com o plasmídeo pAUL-AmreB. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1 e 6- controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- controlo positivo (fragmento *mreB* amplificado a partir do DNA da miniprep com os *primers* *mreHindIII* / UR, 3 a 5 - colónias seleccionadas para confirmação com os *primers* *mreHindIII* / UR, 7- controlo positivo (fragmento *mreB* amplificado a partir do DNA da miniprep com os *primers* *mreEcoRI* / UR, 8 a 10 - colónias seleccionadas para confirmação com os *primers* *mreEcoRI* / UR. As linhas 5 e 10 representam o mutante utilizado neste trabalho.

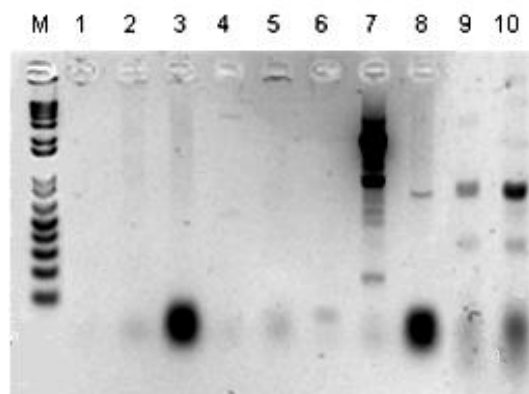


Figura 24 - Confirmação da transformação da estirpe EGD com o plasmídeo pAUL-A spl. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1 e 6- controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- amplificação do fragmento *spl* a partir da *miniprep* do vector pAUL-A com *spl* com os *primers* *splEcoRI* / UR, 3- amplificação do fragmento *spl* a partir do DNA da EGD com os *primers* *splEcoRI* / UR, 4 e 5 - colónias seleccionadas para confirmação com os *primers* *splEcoRI* / UR, 7- amplificação do fragmento *spl* a partir do DNA da EGD com os *primers* *splHindIII* / UR, 8- amplificação do fragmento *spl* a partir da *miniprep* do vector pAUL-A com *spl* com os *primers* *splHindIII* / UR 9 a 10 - colónias seleccionadas para confirmação com os *primers* *splHindIII* / UR. As linhas 4 e 9 representam o mutante utilizado neste trabalho.

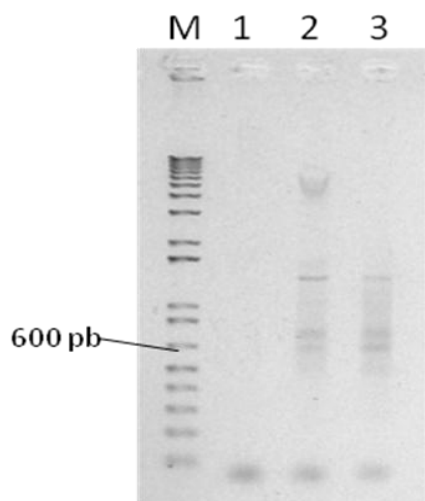


Figura 25 - Confirmação da transformação da estirpe C897 com o plasmídeo pAUL-Aspl. M-marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1- Controlo da reacção (sem DNA) 2- amplificação do fragmento *spl* a partir da *miniprep* do vector pAUL-spl com os *primers* splHindIII / UR, 3- colónia seleccionada para confirmação com os *primers* splHindIII / UR.

Como resultado desta transformação em *L. monocytogenes* obtiveram-se mutantes da estirpe EGD para ambos os genes (EGDmreB e EGDspl) e um mutante da estirpe C897 para o gene *spl* (C897spl). Não se conseguiu obter mutantes para o gene *mreB* da estirpe C897 apesar de várias tentativas que incluíram modificações no tamanho do fragmento a utilizar na recombinação homóloga, diferentes proporções entre vector:fragmento e diferentes quantidades de DNA plasmídico na transformação.

De modo a confirmar os mutantes obtidos como pertencentes a *L. monocytogenes* a amplificação do gene *iap* (invasion associated protein) que é um factor de virulência e as zonas homólogas e heterólogas deste gene permitem a identificação do género e da espécie de *Listeria* (Bubert *et al.* 1992) pelo que a sua presença foi avaliada por PCR. A amplificação é apresentada na Figura 26 e 27.

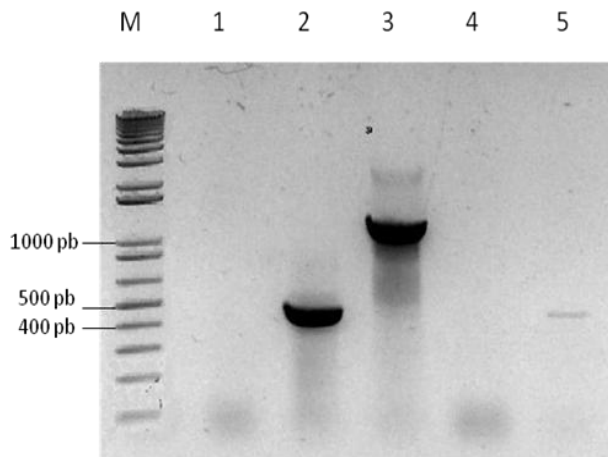


Figura 26- Confirmação da presença do gene *iap* no mutante EGDmreB. M-marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1 e 4 - controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- amplificação de um fragmento do gene *iap*, na estirpe EGD com os *primers* Bact1 / Lis1B (520 pb), 3- amplificação do gene *iap* inteiro na EGD com os *primers* Lis1A / Lis1B (1400 pb), 5 - confirmação da amplificação do gene *iap* no mutante EGDmreB.

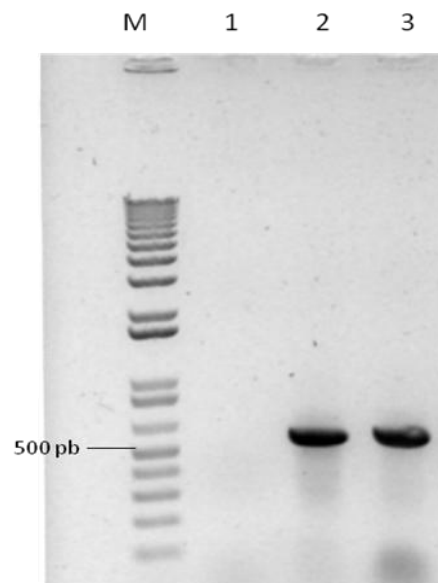


Figura 27- Confirmação da presença do gene *iap* no mutante C897spl. M-marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1 - controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- amplificação de um fragmento do gene *iap*, na estirpe EGD com os *primers* Bact1 / Lis1B (520 pb), 3- confirmação da amplificação do gene *iap* no mutante C897spl.

3.4 - Análise da expressão do gene *mreB*

A confirmação da eliminação da expressão do gene *mreB* no mutante *L. monocytogenes* EGDmreB foi confirmada por PCR em tempo real. A expressão relativa do gene *mreB* no mutante EGDmreB relativamente à estirpe selvagem foi nula. Deste modo pode concluir-se que a expressão do gene *mreB* foi anulada.

3.5 - Caracterização dos mutantes *L. monocytogenes* EGDmreB, EGDspl e C897spl

3.5.1 - Crescimento em meio definido

Para a caracterização dos mutantes iniciou-se o processo com o crescimento em meio definido TM (Trivett e Meyer, 1973). O crescimento do mutante *L.monocytogenes* EGDmreB está representado na Figura 28.

Verifica-se que a interrupção do gene *mreB* afecta o crescimento do mutante, em comparação com a estirpe selvagem, EGD. A estirpe EGD atinge o valor de A_{600nm} máximo de $0,321 \pm 0,013$ ao fim de 14 horas, enquanto que o mutante EGDmreB, não tem uma fase exponencial definida e mostra valores de absorvência sempre inferiores aos da estirpe selvagem. É de notar também que o valor de A_{600nm} do mutante ao longo do tempo vai se aproximando ao valor da estirpe EGD. Ao fim de 36 horas o valor de A_{600nm} para a estirpe EGD era de $0,312 \pm 0,013$ enquanto que o mutante apresentava uma A_{600nm} de $0,243 \pm 0,004$. Este dados reflectem o papel importante do gene *mreB*, na divisão da parede celular bacteriana, mostrando que na sua ausência o crescimento fica afectado.

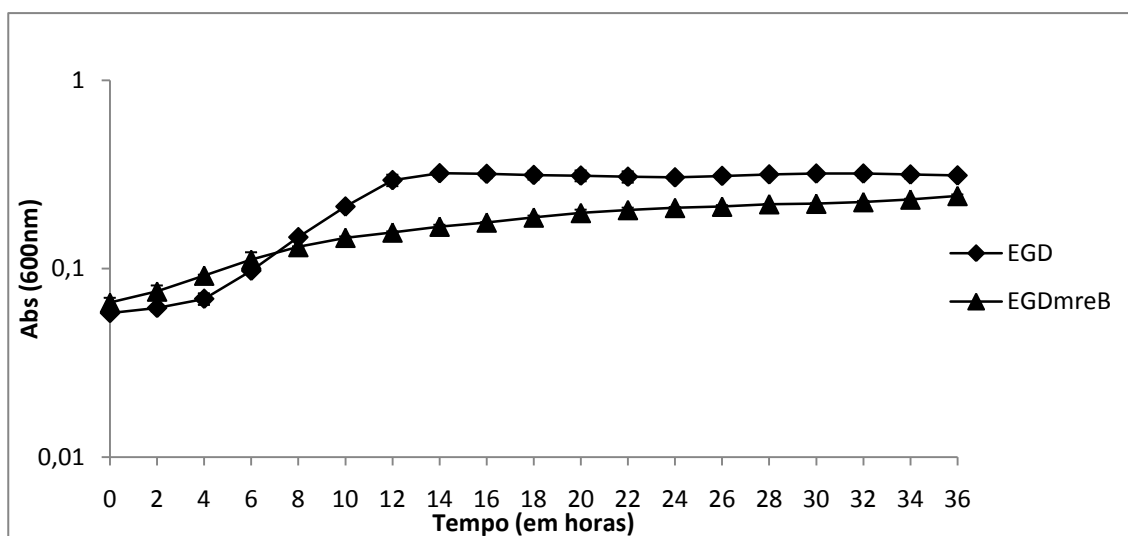


Figura 28- Curva de crescimento da estirpe selvagem *L. monocytogenes* EGD e do mutante EGDmreB em meio de cultura Trivet-Meyer à temperatura de 30°C. Ao meio de cultura para o mutante adicionou-se 5 µg/ml de ERY. Os dados representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam o desvio padrão.

Em estudos realizados com mutantes *mreB* de *B. subtilis* foi observado uma forte dependência do crescimento em relação à concentração de magnésio (Carballido-López *et al*, 2006; Leaver e Errington, 2005). Tendo em atenção este facto, o mutante EGDmreB foi crescido na presença de diferentes concentrações de magnésio (2g/L a 6 g/L) e igualmente na presença de diferentes concentrações de glucose (4,1g/L a

201g/L) para verificação de uma possível dependência da fonte de carbono. O crescimento do mutante EGDmreB não foi afectado pela adição de magnésio ou glucose pelo que se pode concluir que a mutação do gene *mreB* em *L. monocytogenes* tem consequências para a célula de modo distinto do registado para *B. subtilis*.

3.5.2 - Indução da lise pela penicilina

Os antibióticos β -lactâmicos promovem a acilação, formando complexos covalentes inactivos com enzimas da parede celular bacteriana, que catalisam regiões terminais na biossíntese da parede celular, as transpeptidases denominadas penicillin binding proteins (PBP's). A formação de alguns complexos inactivos leva à redução da taxa de síntese de peptidoglicano provocando a formação de uma parede celular imperfeita.

De forma a testar possíveis alterações provocadas pela interrupção dos genes *mreB* e *spl* na actividade das PBPs a indução da lise pela penicilina foi avaliada. Os resultados são apresentados na Figura 29 e 30.

O efeito da adição da penicilina às culturas em fase exponencial foi mais evidente na estirpe autolítica, *L. monocytogenes* C897. A mutação do gene *spl* na estirpe C897 inibiu o processo de lise pela penicilina, este mutante atingiu valores de A_{600nm} iguais à estirpe não autolítica EGD, $0,124 \pm 0,009$ e $0,123 \pm 0,018$, respectivamente (Figura 29). A indução da lise na estirpe selvagem EGD foi muito subtil em comparação com a estirpe autolítica C897 (Figura 29 e 30). Ao fim de 24 horas a EGD apresentava um valor de $A_{600nm} = 0,123 \pm 0,018$, enquanto que a C897 entrou nitidamente em lise obtendo um valor de A_{600nm} final de $0,009 \pm 0,01$. No que respeita aos mutantes da estirpe EGD, EGDmreB e EGDspl, estes evidenciam uma forte inibição da lise em comparação com a estirpe selvagem EGD, obtendo valores de A_{600nm} de $0,650 \pm 0,053$ e $1,171 \pm 0,087$, respectivamente (Figura 29 e 30).

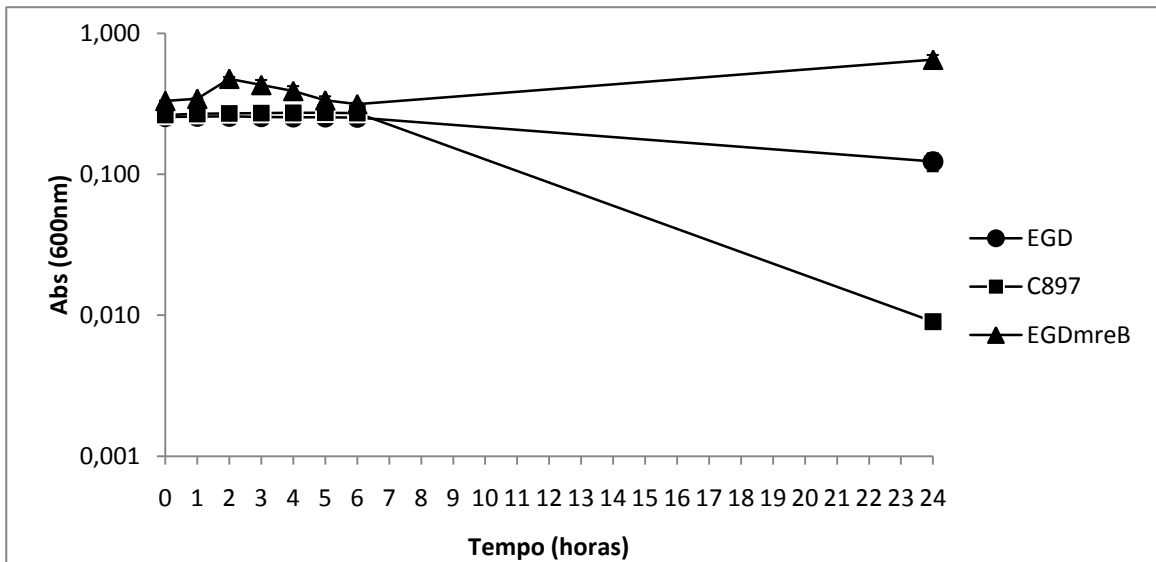


Figura 29: Efeito da penicilina G no crescimento das estirpes EGD, C897 e mutante EGDmreB em meio BHI com 100U/ml de Penicilina G. O crescimento decorreu a 37°C. Os dados representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam o desvio padrão.

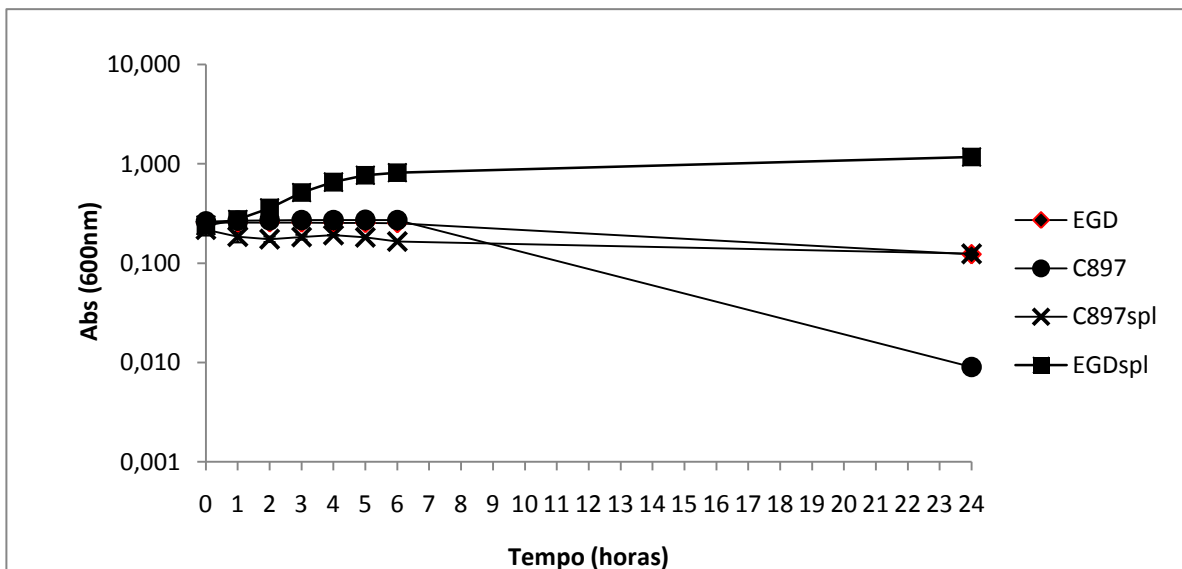


Figura 30: Efeito da penicilina G no crescimento das estirpes EGD, C897 e mutantes C897spl e EGDspl, em meio BHI com 100U/ml de Penicilina G. O crescimento decorreu a 37°C. Os dados representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam o desvio padrão.

3.5.3 - Indução da lise pelo Triton-X

A susceptibilidade à lise pelas estirpes *L. monocytogenes* EGD e C897 e respectivos mutantes foi igualmente avaliada através da indução da lise pelo Triton-X. O Triton-X (p-t-octilfenol) é um agente tensoactivo, não iónico cuja acção se centra na

solubilização de lípidos e de proteínas das membranas biológicas (Rocha, 2000). Os resultados são apresentados na Figura 31.

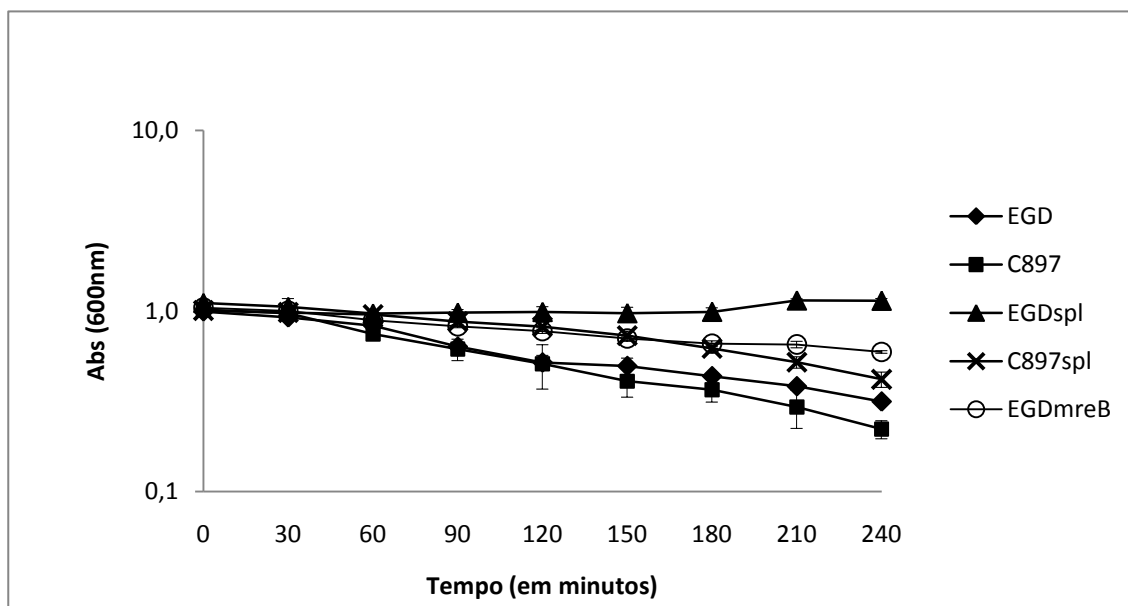


Figura 31 - Efeito do Triton-X no crescimento das estirpes EGD, C897 e respectivos mutantes. O crescimento decorreu a 37°C. Os dados representam a média de 3 réplicas. As barras de erro representam o desvio padrão.

A indução da lise pelo Triton-X evidenciou uma maior susceptibilidade à lise pela estirpe autolítica C897 ($A_{600nm} = 0,221 \pm 0,025$), em comparação com a estirpe não autolítica EGD ($A_{600nm} = 0,315 \pm 0,007$), no entanto as diferenças na susceptibilidade à lise são menos marcantes em comparação com a acção da penicilina. Novamente a interrupção do gene *spI* na estirpe C897 (C897spl) confere um comportamento lítico muito próximo ao da estirpe não autolítica, EGD, ao apresentar um valor de $A_{600nm} = 0,418 \pm 0,01$. Os mutantes da estirpe EGD, EGDmreB e EGDspl apresentam uma maior resistência à lise, com A_{600nm} de $0,593 \pm 0,041$ e $1,140 \pm 0,033$, respectivamente.

3.5.4 - Análise morfológica dos mutantes

Para se analisar a morfologia dos mutantes e ver de que forma é que a interrupção dos genes alteraram o seu fenótipo, procedeu-se à coloração de Gram durante o seu crescimento, assim como às das estirpes selvagem EGD e C897.

Em relação aos mutantes dos genes *mreB* (Figura 34B) e *spl* (Figura 32A) da estirpe EGD, verificou-se que eles perderam a forma bacilar, apresentando uma morfologia cocóide em comparação com a estirpe selvagem, EGD. Esta observação mostra que o gene *mreB* está envolvido na extensão da parede bacteriana como verificado em *B. subtilis* (Carballido-López *et al*, 2006; Leaver e Errington, 2005) e o *spl* no processo de divisão celular.

No que respeita ao mutante do gene *spl* da estirpe C897 (Figura 32B), este apresentou as mesmas alterações fenóticas que o mutante EGD*spl* (Figura 32A).



Figura 32: Observação ao microscópio óptico das colorações de Gram das células do mutante EGD*spl* (A) e C897*spl* (B).

3.5.4.1 -Visualização das células com Van-FL

De modo a esclarecer possíveis alterações na disposição do peptidoglicano nascente entre as estirpes autolítica e não autolítica as células das duas estirpes foram visualizadas com um derivado fluorescente de vancomicina, bem como o mutante EGD*mreB*. A utilização da vancomicina advém do facto de ela reconhecer as cadeias de glicano em crescimento assim como os seus locais de iniciação, ao possuir afinidade para os terminais D-Ala-D-Ala, encontrados ao longo da cadeia e no lípido II. A adição de Van-FL bloqueia as reacções de transglicosilação e transpeptidação, sem inibir completamente a adição de novos monómeros às cadeias de glicano em crescimento. Os novos locais de ligação podem ser criados pela adição de vancomicina não ligada, permitindo que a Van-FL se acumule nesses locais (Tiyant *et al*. 2006).

As imagens são apresentadas na Figura 33 e 34.

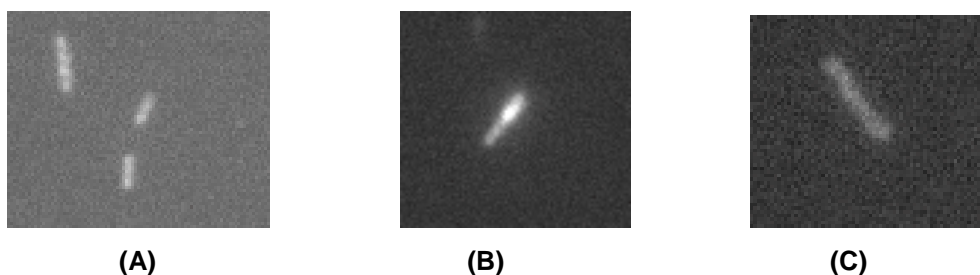


Figura 33- Observação da disposição do peptidoglicano nascente em *L. monocytogenes* EGD (A e B) e C897 (C) através de Van-FL. A disposição ocorre em espiral (A) e (C) e também com forte evidência junto à zona de divisão da célula (B).

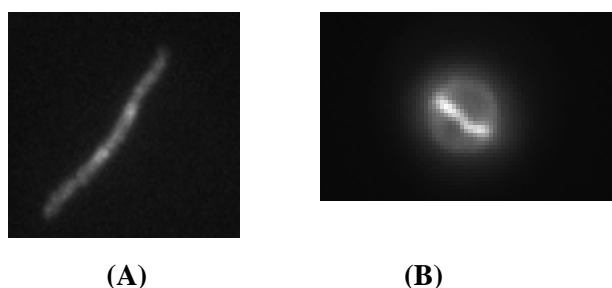


Figura 34 - Observação da disposição da nascente do peptidoglicano em *L. monocytogenes* EGD (A) e EGDmreB (B) com crescimento na presença do inibidor de divisão, o antibiótico cefalexina (10µg/ml). A perda da forma de bacilo é evidente no mutante EGDmreB e a fluorescência concentra-se no centro de divisão celular.

3.6 - Fusão do plasmideo pMUTINGFPmreB

Uma estratégia que pode contribuir para o esclarecimento da ação do gene *mreB*, bem como *mreC* e *MreD*, uma vez que constituem um operão com *mreB* é a utilização de uma fusão de transcrição com uma proteína fluorescente verde e o gene *mreB* com um promotor induzido por IPTG, o pMUTINGFPmreB. Esta estratégia foi aplicada nas duas estirpes EGD e C897 utilizando o plasmideo pMUTIN-GFP⁺ (Kaltwasser *et al.* 2002).

A amplificação do gene *mreB* completo (1013 pb) foi realizada com os primers FXma e RKpn, utilizando como molde o DNA da estirpe *L. monocytogenes* EGD. O resultado é apresentado na Figura 35.

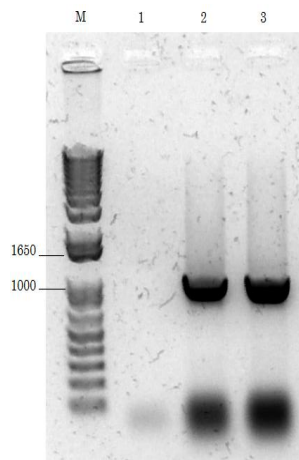


Figura 35: Amplificação do gene *mreB* M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1 - controlo negativo da reacção (sem adição de DNA), 2 e 3 – fragmento amplificado do gene *mreB* (1013 pb) com os primers FXmaIII / RKpnI.

Após a amplificação procedeu-se à digestão do fragmento amplificado, bem como o vector pMUTIN-GFP+ com as enzimas XmaIII e KpnI e posteriormente foi realizada a purificação do fragmento para em seguida ser utilizado na reacção de ligação. Pode ser observada a forma linear, covalentemente ligada e super enrolada do plasmídeo e apenas a forma linear quando o fragmento foi inserido (Figura 36). O plasmídeo obtido foi utilizado para transformar a estirpe de *E. coli* DH10 β , na presença de 100 μ g/ml de AMP. A confirmação da transformação das células de *E. coli* DH10 β foi realizada por PCR. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 37.

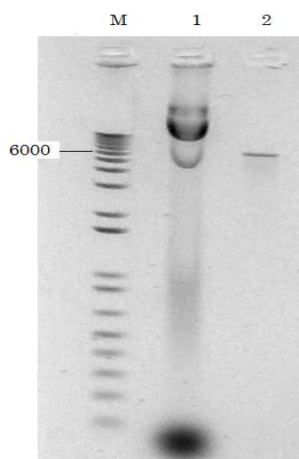


Figura 36: Confirmação da ligação do fragmento do gene *mreB* com o vector pMUTIN-GFP+, após a reacção de ligação. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1 – miniprep do vector pMUTIN-GFP+, 2 – confirmação da ligação do vector com o *mreB*.

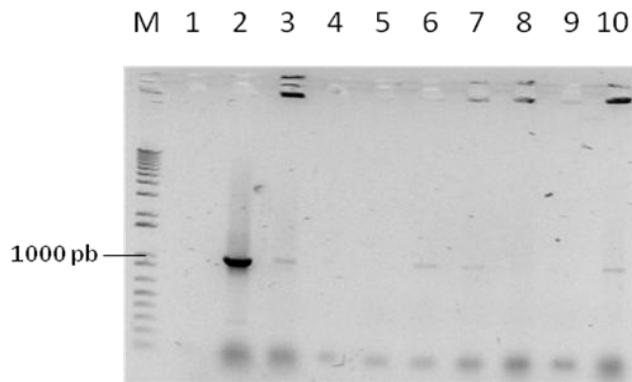


Figura 37- *PCR colony* para confirmação da ligação do vector pMUTIN-GFP+ com o fragmento do gene *mreB*, após a transformação em *E.coli* DH10 β , com os *primers* FXmaIII / RKpnl. M- marcador 1 Kb plus (Invitrogen), 1 - controlo negativo da reacção (sem DNA), 2- controlo positivo da reacção (com DNA da estirpe EGD, 3 a 10- colónias seleccionadas para confirmação.

De seguida efectuou-se o isolamento do DNA plasmidico das colónias transformadas e procedeu-se à transformação das estirpes EGD e C897.

3.6.1 - Observação das fusões *EGD::pMUTINGFPmreB* e *C897::pMUTINGFPmreB*

Com o objectivo de se verificar as alterações induzidas na parede celular das duas estirpes de *L. monocytogenes* EGD e C897 pela expressão do gene *mreB* as estirpes transformantes, *EGD::pMUTINGFPmreB* e *C897::pMUTINGFPmreB* foram observadas por microscopia por fluorescência após crescimento na presença de IPTG e por coloração de Gram com observação ao microscópio óptico sem a presença de IPTG. As imagens são apresentadas nas Figuras 37 e 38. É de salientar que o transformante *C897::pMUTINGFPmreB* na ausência de IPTG tem o crescimento afectado e só seja recuperado tardiamente. Estes dados vêm apoiar o insucesso na obtenção de mutantes no gene *mreB* nesta estirpe. É possível que a isoforma de MreB, a Mbl esteja ligada à recuperação tardia do transformante.

É possível observar que a disposição de MreB (e igualmente MreC e MreD, uma vez que constituem um operão) é semelhante nas duas estirpes com disposição em espiral, (Figura 38A e E) e nos pólos (Figura 38C, D e F). Na estirpe EGD é possível verificar a participação de MreB no local de divisão (Figura 38B), mas não foi possível observar este fenómeno na estirpe C897.

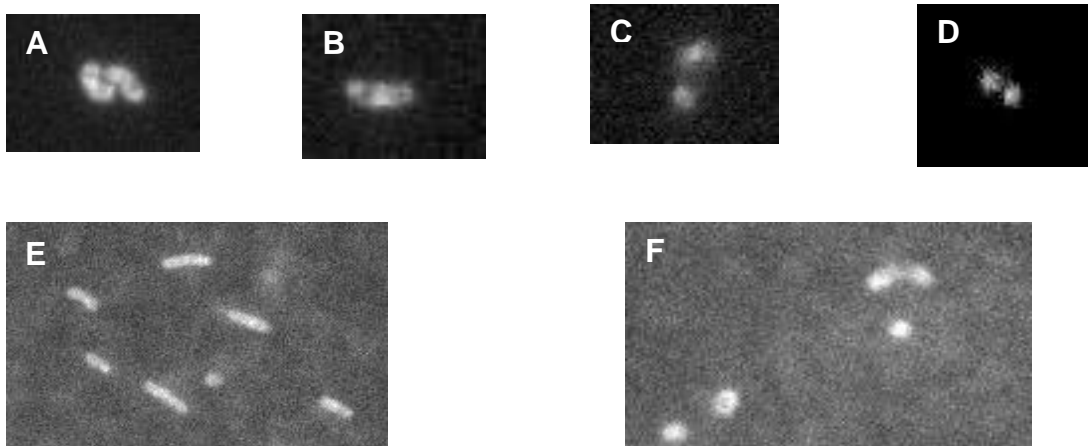


Figura 38- Observação ao microscópio por fluorescência das células de *EGD::pMUTINGFPmreB*, A, B, C, D e *C897::pMUTINGFPmreB* E e F.

Os dados obtidos pela observação das células de *EGD::pMUTINGFPmreB* e *C897::pMUTINGFPmreB* vêm confirmar o papel de MreB na determinação da forma de bacilo. As culturas *EGD::pMUTINGFPmreB* e *C897::pMUTINGFPmreB* obtidas sem adição de IPTG (a expressão de *mreB* é inibida) foram observadas por coloração de Gram. As imagens são apresentadas na Figura 39. É possível observar que na ausência de expressão do gene *mreB* as células adquirem a forma circular.

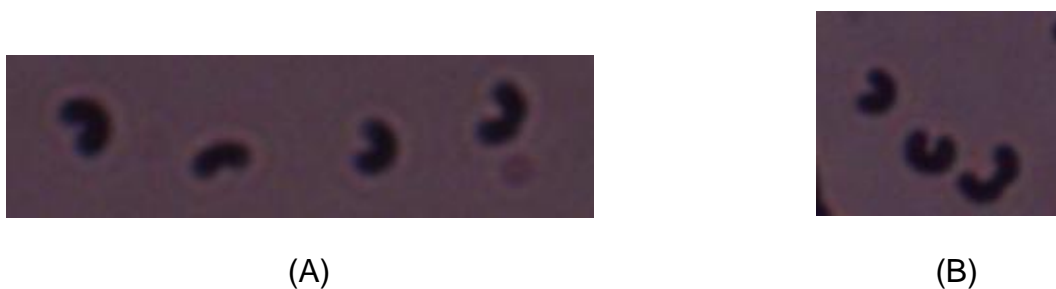


Figura 39- Observação ao microscópio óptico das colorações de Gram das células de *EGD::pMUTINGFPmreB*, (A) e *C897::pMUTINGFPmreB* (B).

3.6.2 - Indução da lise pela penicilina

Dado que não nos foi possível obter um mutante de *mreB* da estirpe C897 a estratégia da fusão com uma proteína fluorescente contribuiria para o esclarecimento dos efeitos da expressão deste gene em ambas as estirpes. A susceptibilidade à indução de lise pela penicilina foi testada nos transformantes *EGD::pMUTINGFPmreB* e *C897::pMUTINGFPmreB* com e sem adição de IPTG (de modo a induzir ou inibir a expressão do gene *mreB* e os genes *mreC* e *mreD* que constituem o operão). Os resultados são apresentados na Figura 39.

Em relação à indução de lise pela penicilina com e sem adição de IPTG no transformante *EGD::pMUTINGFPmreB* não produziu qualquer diferença na susceptibilidade à lise, o que coloca a questão sobre a maior resistência à lise pela penicilina do mutante *EGDmreB* estar ligada a algum efeito polar da mutação. A susceptibilidade à lise não foi significativamente diferente ($P > 0,05$) no transformante *C897::pMUTINGFPmreB* com a adição de IPTG comparativamente à não adição de IPTG, ou seja a não expressão do operão *MreB* não afectou a susceptibilidade à lise (Figura 40).

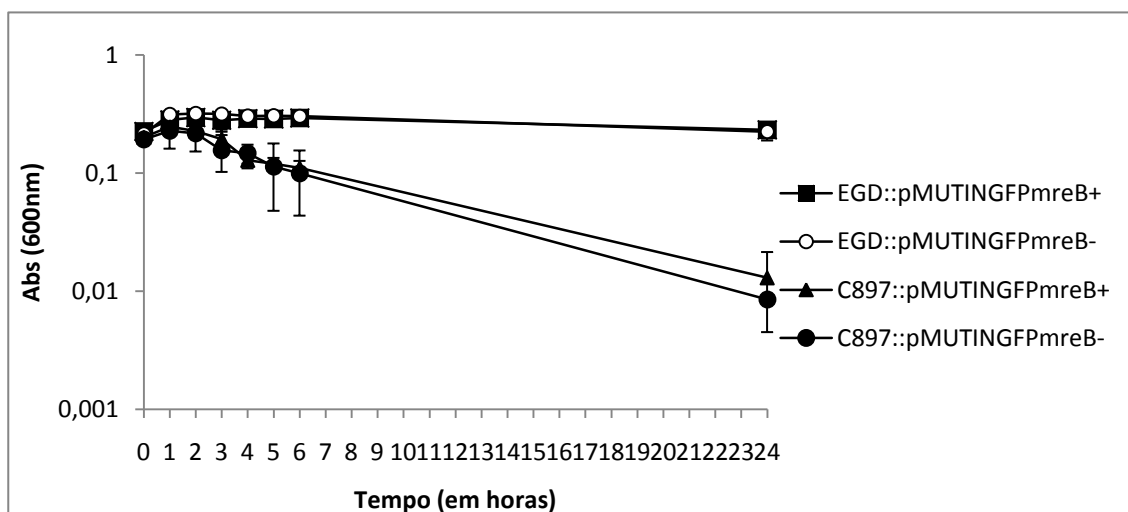


Figura 40: Efeito da penicilina G no crescimento das estirpes com a fusão *EGD::pMUTINGFPmreB* e *C897::pMUTINGFPmreB* em meio BHI com 100U/ml de Penicilina G. O sinal de (+) indica a adição de IPTG à cultura e o sinal de (-) indica sem adição de IPTG. O crescimento decorreu a 37°C. Os dados representam a média de 3 réplicas e as barras de erro representam o desvio padrão.

3.7 - Avaliação da capacidade de invasão celular

Com o objectivo de se esclarecer se os genes *mreB* e *spl* poderão estar associados à capacidade invasiva das estirpes em estudo, utilizaram-se células NIH3T3, para determinar a capacidade de invasão celular. Recorreu-se à técnica de *Miles* e *Misra* para determinar o número de bactérias que conseguiram invadir as células NIH3T3. Os valores obtidos são apresentados na tabela XIV.

Tabela XIV: Percentagem de invasão das estirpes selvagens EGD e C897, e respectivos mutantes e transformantes, nas células NIH3T3. Os dados representam a média de 3 réplicas e o desvio padrão (dp).

Estirpe	% de invasão
EGD	46,7 ± 1,2
C897	49,5 ± 0,8
EGD <i>mreB</i>	44,9 ± 0,7
EGD::pMUTINGFP <i>mreB</i> +	46,7 ± 2,3
EGD::pMUTINGFP <i>mreB</i> -	48,7 ± 0,9
C897::pMUTINGFP <i>mreB</i> +	50 ± 0,4
C897::pMUTINGFP <i>mreB</i> -	51,4 ± 1,1

Através da análise da Tabela XIV, verifica-se que as estirpes EGD*mreB*, EGD::pMUTINGFP*mreB*- e C897::pMUTINGFP*mreB*-, que não têm a expressão do *mreB*, não perderam o potencial invasivo, em comparação com as estirpes selvagens e com os transformantes cuja expressão do gene *mreB* se encontra dependente do IPTG (C897::pMUTINGFP*mreB*+ e EGD::pMUTINGFP*mreB*+). Desta forma foi possível confirmar que a interrupção do gene *mreB* não afectou a viabilidade e capacidade de invasão da bactéria.

No entanto, é notória uma maior percentagem de invasão da estirpe C897 (49,5% - 51,4%), em relação à EGD (46,7% - 48,7%). Este fenómeno poderá dever-se ao facto da C897 possuir maiores quantidades da proteína P60 (invasion associated protein) e P45 (proteína da mesma família da P60) (Pinto *et al*, submetido para publicação), permitindo assim uma maior aderência celular.

4- Discussão

A biossíntese de PG tem sido alvo de diversos estudos devido à sua importância na sobrevivência da célula e ao seu papel na manutenção da parede celular. Bactérias em forma de bacilo, como *Bacillus subtilis*, mantêm a sua morfologia direccionando a síntese “de novo” PG ao longo da parede celular durante a fase de alongação (Daniel e Errington, 2003). Para se determinar o papel dos genes que estarão envolvidos na formação e manutenção da forma da parede celular, técnicas de mutagenese têm sido consideradas um método simples e conveniente para a obtenção de respostas (Schäferkordt e Chakraborty, 1995). Muitos plasmídeos originários de *B. subtilis* ou de *E. coli*, têm sido utilizados em *Listeria* (Freitag, 2000), estando muitas vezes associados à resistência de antibióticos (Charpentier e Courvalin, 1999). O vector pAUL-A tem sido amplamente utilizado em estudos genéticos de *L. monocytogenes*, na construção de mutantes por recombinação homóloga, ao ligar-se a uma única porção interna do gene alvo. Este tipo de mutação é útil para o estudo de genes transcritos monocistrônicos ou para clonar regiões que flaqueiam genes de interesse (Schäferkordt e Chakraborty, 1995). No entanto, quando a recombinação envolve um gene de um operão, como é o caso do gene *mreB* do presente trabalho, a inserção pode afectar os genes a jusante, pela disrupção do transcripto de RNA policistrónico (Chakraborty, 1995).

Desta forma, recorreu-se à técnica de mutagenese para fazer-se a interrupção dos genes *mreB* e *spl*, nas duas estirpes de *L. monocytogenes* EGD e C897, de modo a interromper a expressão dos mesmos. Verificaram-se algumas dificuldades na consecução da técnica, nomeadamente na optimização do tamanho dos fragmentos dos genes a utilizar e no processo de transformação da estirpe C897 no gene *mreB*. Contudo, conseguiu-se obter mutantes do gene *mreB*, para a estirpe EGD (EGD*mreB*) e mutantes do gene *spl*, para ambas as estirpes (EGD*spl* e C897*spl*).

A interrupção do gene *mreB* na EGD afectou a taxa de crescimento das células, mas não provocou a lise, como foi descrito em *E. coli* (Kruse *et al*, 2005). O mutante EGD*mreB* evidenciou um crescimento muito lento em relação à estirpe selvagem, revelando que a ausência da proteína MreB interferiu na taxa de utilização dos nutrientes, muito provavelmente na incorporação dos componentes de síntese do peptidoglicano (PG). Nos estudos feitos em *B. subtilis* e *Caulobacter crescentus* a interrupção da proteína MreB mostrou ser letal (Daniel e Errington, 2003; Figge *et al*, 2004) evidenciando a essencialidade destes genes para estas bactérias. No entanto a viabilidade do mutante de *Bacillus subtilis* pôde ser recuperada pela adição de estabilizadores osmóticos como o magnésio e sucrose (Formstone e Errington, 2005).

Os mutantes obtidos foram expostos a condições de autólise induzidas pela penicilina e pelo Triton-X, tendo sido evidenciado em todos os mutantes, uma forte inibição da lise em relação às estirpes selvagens. A comparação da susceptibilidade entre as duas estirpes selvagens, C897 e EGD confirma-se a maior susceptibilidade à lise pela estirpe C897. A interrupção do gene *spl* provocou no mutante EGDspl uma maior resistência à lise, em comparação com o mutante C897spl. Este resultado pode estar ligado à maior susceptibilidade à lise pela estirpe C897 que nas condições em estudo exprime outra autolisina, para além da Spl, a autolisina lap (Pinto *et al.* submetido para publicação).

A resistência do mutante EGDmreB, em relação à estirpe selvagem, poderá indicar que a proteína MreB estará envolvida na orientação da localização de PBP's que interagem com inibidores da autólise, nomeadamente proteases. Foi descrito em *C. crescentus* que a localização da PBP2 nas estruturas em forma de espiral é dependente de MreB (Figge *et al.*, 2004). A maior resistência à lise pela acção da penicilina indica que ligação desta à(s) PBPs foi inferior, ou seja é possível que ocorra uma acumulação de PBPs no mutante e assim estejam disponíveis para realizar a transpeptidação assegurando a integridade da célula. A acumulação de PBPs em mutantes MreB foi já descrita em *E. coli* (Wachi e Matsushashi, 1989).

Para se visualizar o padrão espacial da síntese de PG de *L. monocytogenes*, utilizou-se o método descrito por Daniel e Errington (2003), onde se utilizou vancomicina ligada a fluorescência (Van-FL), para examinar a topologia da síntese da parede celular. Através da aplicação desta técnica nas estirpes de *L. monocytogenes* EGD e C897 um padrão de fluorescência em bandas tipo espiral e também uma intensa banda na formação do novo septo foi registada Estes resultados suportam a ideia de que o PG é sintetizado de acordo com um padrão em hélice ao longo da parede, durante a alongação celular, e quando a célula atinge o seu comprimento crítico, a síntese de novo PG volta-se para dentro, formando os novos locais de divisão. Este tipo de padrão de inserção de PG vai de encontro ao que foi descrito noutras bactérias em forma de bacilo (Daniel e Errington, 2003). Nas células EGDmreB, a ausência da expressão do gene *mreB*, desencadeou a formação de células esféricas, onde se observou uma banda transversal de Van-FL, correspondendo provavelmente ao septo de divisão. Ao contrário da estirpe selvagem não se observaram quaisquer outras bandas sugestivas de um padrão em hélice, evidenciando apenas uma fluorescência muito ténue na parede celular. Estes resultados sugerem que a síntese da parede celular apenas ocorre nos locais de divisão e que a incorporação em hélice para a extensão da parede foi anulada ou muito afectada no mutante. A banda transversal

que representa o septo, significa que este contém material proveniente da parede celular e que a perda da proteína MreB, não preveniu a síntese de novo PG no local da divisão. Desta forma a síntese do anel de divisão celular pode ser responsável pelo crescimento contínuo das células mutantes. Leaver e Errington (2005) observaram o mesmo tipo de células em mutações induzidas nos genes *mreC* e *mreD*, que também estão envolvidos na coordenação da síntese de PG e sugeriram que o crescimento das células mutantes pode ser dependente da proteína de divisão celular FtsZ. Tal como em *B. subtilis* ou *E. coli*, a proteína MreB é necessária para a presença das estruturas em hélice na síntese da parede celular de *L. monocytogenes*, levando a célula à elongação.

Alterações na morfologia da célula observadas no mutante EGDmreB, são semelhantes às encontradas noutras bactérias, reforçando a ideia de Kruse e colaboradores (2005), de que a proteína MreB exerce funções conservadas em diversos organismos.

A análise de expressão do gene *mreB* no mutante *L. monocytogenes* EGDmreB, por PCR em tempo real confirmou a sua interrupção.

A confirmação da presença do gene *iap* nos mutantes EGDmreB e C897spl, também permitiu concluir que os mutantes pertencem a *L. monocytogenes*.

Os resultados obtidos com Van-FL demonstraram que MreB é requerida para a organização espacial da síntese da parede celular, na zona cilíndrica da célula. Para clarificar a natureza essencial de MreB na estirpe C897, pois a técnica de recombinação homóloga apontou para o facto do gene *mreB* poder ser essencial para a viabilidade da bactéria e para confirmar os efeitos da não expressão do operão MreB na mudança morfológica, quer em C897 quer na estirpe EGD procedeu-se a uma fusão de transcrição com uma proteína fluorescente verde (GFP) e o gene *mreB*, com um promotor induzido por IPTG. Em primeiro lugar é necessário referir que a não expressão do operão MreB não foi letal para a estirpe C897 o que é aponta para a elaboração de novas estratégias para a obtenção de um mutante C897mreB.

A presença do IPTG permitiu observar a disposição de MreB na parede celular, nas duas estirpes em estudo, embora com menos detalhe na C897. Esta observação pode dever-se ao facto da fusão em C897 ser mais fraca e necessitar de um promotor mais forte. Na fusão C897::pMUTINGFPmreB é possível a observação de filamentos em hélice, quer uma acumulação nos pólos. A acumulação ao nível dos pólos das células poderá ocorrer logo após a divisão celular. No entanto foi notória uma menor expressão de MreB em relação à estirpe EGD, uma vez que a sua localização ficou

pouco definida. Estes dados foram verificados pela expressão do gene *mreB* por PCR em tempo real (Pinto *et al.* submetido para publicação). Na fusão EGD::pMUTINGFPmreB foi possível observar com clareza que a disposição de MreB é do tipo hélice, resultados estes semelhantes aos obtidos em *C. crescentus* (Gitai *et al.*, 2004), *B. subtilis* (Daniel e Errington, 2003) e *E. coli* (Kruse *et al.*, 2005). A sua presença também se distingue nos pólos e nos local da divisão, indicando que MreB poderá interagir com proteínas de divisão, para formar o septo. É importante relembrar que a disposição observada desta proteína consiste na expressão dos genes que constituem o operão, os genes *mreC* e *mreD*. Para se observar qual o efeito nas células da não expressão do gene *mreB*, estas foram expostas a um meio sem IPTG. Na ausência de IPTG, a C897::pMUTINGFPmreB⁻ tem o crescimento afectado e só é recuperado tardiamente. Estes dados vêm apoiar o insucesso na obtenção de mutantes no gene *mreB* nesta estirpe. A sua recuperação tardia poderá dever-se à existência de um homólogo MreB em *L. monocytogenes*, a isoforma Mbl. Foi descrito em *B. subtilis* que a inserção em hélice parece ser dependente da proteína Mbl (Daniel e Errington, 2003). Jones e colaboradores (2001) indicaram que as proteínas MreB e Mbl de *B. subtilis* formam estruturas em hélice e filamentosas que possuem um papel do tipo citoesqueleto na determinação da forma bacteriana. Eles propuseram um modelo em que a proteína MreB tem como função controlar o tamanho da célula, mas no entanto a proteína Mbl possui um papel mais importante na manutenção da linearidade do eixo longitudinal na célula.

As culturas de EGD::pMUTINGFPmreB⁻ e C897::pMUTINGFPmreB⁻ obtidas sem adição de IPTG (a expressão de *mreB* é inibida) foram observadas por coloração de Gram. A ausência de expressão do gene *mreB*, desencadeou a formação de células arredondadas em foice, ou seja, a sua interrupção comprometeu a integridade do peptidoglicano ao longo do comprimento da célula.

As estirpes EGD::pMUTINGFPmreB e C897::pMUTINGFPmreB, também foram expostas a condições de lise induzidas pela penicilina e, observaram-se diferentes respostas entre a EGD e a C897. Na EGD::pMUTINGFPmreB não se observou diferenças na susceptibilidade à lise quando a expressão do operão MreB foi permitida ou inibida. Apesar de ocorrerem alterações ao nível morfológico sem a expressão do gene *mreB*, a exposição à penicilina não desencadeou a lise da estirpe. É pois possível que tal como se verificou com o mutante EGDmreB também na fusão ocorra uma acumulação de PBPs, mas aparentemente inferior ao que ocorreu no mutante, uma vez que este adquiriu uma resistência à lise provocada pela penicilina.

Em relação à C897::pMUTINGFPmreB a não expressão do gene *mreB*, não alterou o comportamento lítico da estirpe pelo que se pode colocar a hipótese de que a associação da MreB da estirpe C897 com a(s) PBPs é inferior ou inexistente em relação ao que se observa em EGD, pelo que não ocorre a sua acumulação quando MreB não é expresso.

A caracterização do crescimento e fenótipo dos mutantes foi seguida de estudos de interacção entre a bactéria e células hospedeiras. Vários ensaios com células epiteliais, fibroblastos e macrófagos têm sido realizados para investigar a virulência das estirpes mutantes (Gaillard *et al.*, 1987; Gaillard *et al.*, 1986; Berche *et al.*, 1986). Realizou-se o estudo da capacidade invasiva das estirpes selvagens EGD e C897 e dos respectivos mutantes, em células fibroblastos NIH3T3. Constatou-se que a interrupção da expressão do gene *mreB*, não influenciou a capacidade de adesão e invasão das bactérias às células, mantendo o seu potencial invasivo. A estirpe C897 mostrou maior capacidade invasiva em relação à EGD, provavelmente devido à existência de maiores quantidades da autolisina P60 no secretoma da C897 (Pinto *et al.*, submetido para publicação). Foi já demonstrado por Kuhn e colaboradores (1989) que a proteína p60 está directamente envolvida na invasão de células mamíferas, NIH3T6, por *L. monocytogenes*, ao verificarem que mutantes no gene *iap* não apresentavam capacidade de invasão celular. Apesar dos elevados níveis de P60, potenciarem a invasão nas células pela C897, também tornam a bactéria mais sensível à autólise, quando exposta a fenómenos de *stress* induzidos pelas células hospedeiras. Verificou-se anteriormente que a estirpe C897 é menos virulenta, o que pode estar ligado ao seu carácter autolítico (Faleiro, 2000). Pode-se, então colocar a hipótese de que apesar das estirpes autolíticas poderem exprimir autolisinas que permitem uma maior aderência às células hospedeiras, o mesmo fenómeno torna-as mais susceptíveis às variações no meio intracelular com a consequente perda de viabilidade, ou seja, as estirpes mais autolíticas são menos virulentas.

5- Conclusões

Os dados obtidos neste trabalho, permitiram a verificação do papel da proteína MreB na manutenção do processo de alongação da bactéria *L. monocytogenes*. Constatou-se que existe uma estreita interacção entre a forma da célula e a síntese da parede celular, em que a síntese da parte cilíndrica da célula parece ser orientada por MreB. Pode-se sugerir que o complexo proteico MreB (com os restantes componentes, mreC e mreD) direcciona a maquinaria da síntese de peptidoglicano no eixo longitudinal. O mutante EGDmreB adquiriu a forma cocoide e o transformantes EGD::pMUTINGFPMreB e C897::pMUTINGFPMreB em condições de ausência de indução confirmou a aquisição da forma esférica dos transformantes podendo-se concluir a essencialidade do operão MreB na manutenção da forma bacilar.

A mutação do gene *mreB* na estirpe EGD provocou uma maior resistência à lise provocada pela acção da penicilina, mas o mesmo não se verificou quando foi utilizado o transformante EGD::pMUTINGFPMreB, o que poderá estar ligado a algum efeito polar no mutante EGDmreB.

Não foi possível a obtenção de um mutante *mreB* na estirpe C897 apesar das diferentes estratégias aplicadas. No entanto com a utilização do transformante C897::pMUTINGFPMreB foi possível verificar que a sua susceptibilidade à lise provocada pela acção da penicilina não foi alterada quando comparada com a estirpe selvagem. Este resultado pode estar ligado a uma menor associação de MreB com a(s) PBPs comparativamente à estirpe EGD, pelo que não ocorre a sua acumulação quando MreB não é expresso.

A mutação do gene *spl*, uma autolisina da família da P60 provocou em ambas as estirpes, C897 e EGD uma alteração morfológica, ou seja, os mutantes EGDspl e C897spl adquiriram uma forma esférica o que indica um papel da Spl semelhante ao da MreB, é mesmo possível que exista uma interacção entre a MreB e a Spl.

O comportamento autolítico da estirpe C897 poderá estar ligado à acção da autolisina Spl, pois outro aspecto da mutação do gene *spl* que foi verificado nos dois mutantes, EGDspl e C897spl foi uma maior resistência à lise provocada pela acção da penicilina e pelo Triton-X, o que indica a interacção destes agentes líticos com esta autolisina, ou os seus reguladores.

6- Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos com o mutante da estirpe EGD e das fusões realizadas nas duas estirpes mostram a importância da proteína MreB e do restante complexo proteico, no processo de elongação celular. Torna-se, pois fundamental verificar a ação da isoforma Mbl, bem como das proteínas MreC e MreD, através de mutações dos respectivos genes, bem como utilizando as fusões de transcrição com proteínas fluorescentes, como a descrita neste estudo.

Será ainda interessante utilizar técnicas de interação proteína-proteína para verificar as possíveis interações entre a proteína MreB e as proteínas MreC e MreD, bem como as PBPs e autolisinas.

Outros ensaios para completar os efeitos da mutação no gene *spl* são necessários, nomeadamente na mobilidade, aderência a superfícies abióticas, resistência a antibacterianos, dada a maior resistência à ação da penicilina será particularmente interessante testar os antibióticos com ação na parede celular, como os β -lactâmicos.

A utilização de células Caco-2 ou macrófagos fornecerá resultados mais esclarecedores sobre a capacidade invasiva dos mutantes obtidos.

7- Bibliografia

- Addinall, S. G. and Lutkenhaus, J. (1996). FtsZ-spirals and –arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **22**: 231–237.
- Almeida, G.N., Gibbs, P.A., Hogg, T.A., Teixeira, P.C. (2006). Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. *BMC Infectious Diseases*, **6**: 1-4.
- Bacillus* Genetic Stock Center. (2002). Integration Vectors for Gram-Positive Organisms. Catalog of Strains, 7^a Ed.
- Bania, J., Żarczyńska, A., Molenda, J., Dąbrowska, A., Kosek-Paszkowska, K., Więckowska-Szakiel, M., and Różalska, B. (2009). Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates by actA gene sequencing, PCR-Fingerprinting, and Cell-Invasion Assay. *Folia Microbiology.* **54**: 17–24.
- Bierne, H. e Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes* Surface Proteins: from Genome Predictions to Function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **71**(2): 377–397.
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jacquet, C., and Piffaretti, J.C. (1992). *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:69-73.
- Bork, P., Sander, C. and Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and Hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:7290–7294.
- Bubert A., Kohler S., Goebel W. (1992) The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genus- and species- specific identification of *Listeria* spp. By polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2625-2632.
- Bubert, A., Riebe, J., Schnitzler, N., Schonberg, A., Goebel, W., and Schubert, P. (1997). Isolation of Catalase-Negative *Listeria monocytogenes* Strains from Listeriosis Patients and Their Rapid Identification by Anti-p60 Antibodies and/or PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* **35**(1): 179-183.
- Cabeen, M. T. and Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews.* **3**:601-610.
- Carballido-López, et. al (2006): Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Development Cell*, **11**: 399-409

- Carballido-López, R. e Formstone, A. (2007). Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, **10**: 611-616.
- Chakraborty, T., Leimeister-Wachter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T., and Notermans, S. (1992). Coordinate Regulation of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes* Requires the Product of the *prfA* Gene. *Journal of Bacteriology*. **174**(2):568-574.
- Charpentier, E., and Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria spp.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2103-2108.
- Daniel, R. A. e Errington, J. (2003). Control of Cell Morphogenesis in Bacteria: Tow Distinct Ways to Make a Rod-Shaped Cell. *Cell*. **113**: 767-776.
- De Jonge, B. L. M., Lencastre, H., and Tomasz, A. (1991). Suppression of Autolysis and Cell Wall Turnover in Heterogeneous TnS51 Mutants of a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain *Journal of Bacteriology*. **173**(3):1105-1111.
- De Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Desenclos, J.C., Martin, P. and the *Listeria* Working Group (2003). Feasibility study for a collaborative 67 surveillance of *Listeria* infections in Europe. Report to the European Commission, DG SANCO, Paris.
- DGS – Direção Geral da Saúde (s.d.). *Saúde reprodutiva: doenças infecciosas e gravidez*. Consultado a 30 de Setembro de 2010 através da fonte <http://www.dgs.pt/>.
- Dhar, G., Faull, K. F., and Schneewind, O. (2000). Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* **39**:3725– 3733.
- Domann, E., Deckert, M., Schluter, D., and Chakraborty, T. (2002). *Listeria monocytogenes*: a model system to study invasion and spread of bacteria in the central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol*. **265**:213-26.
- Donnelly, C. W. (1990). Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. P 225-260. In E. T. Ryser and E: H. Marth (ed), *Listeria, Listeriosis and food safety*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.
- Faleiro, M.L. 2000. Tese de doutoramento “Stress response and autolytic behaviour of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese cheeses”. Univ. Algarve, Faro.
- Farber, J.M.; Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*. **55**: 476–511.

- Farber, J.M.; Peterkin, P.I. (2000). *Listeria monocytogenes*. p. 1178-1216. In Lund, B.; Baird-Parker, T.; Gould, G. (ed.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*. (Vol. 2). An Aspen Publication.
- Fenlon, D.R. (1999). *Listeria monocytogenes* in the natural environment. pp. 21-37. In: *Listeria, listeriosis, and food safety*, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Fiedler, F. (1988). Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. *Infection*. **16**, (Suppl. 2):S92–S97.
- Figge, R. M., Divakaruni, A. V., Gober, J. W. (2004). MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, **51**(5): 1321-1332
- Freitag, N. E. (2000). Genetic tools for use the *Listeria monocytogenes*. (pp 488-498). In V. A. Fischetti, R. P. Noviek, J. J. Fennetti, D. A. Portney, and J. I. Rood (ed). *Gram Positive Pathogens*, 1st ed. ASM Press, Washington, DC. Goldfine, H. and Shen, H. (2007). *Listeria monocytogenes: pathogenesis and host response*. USA, Springer.
- Gaillard, J. L., Berche, P., and Sansonetti, P. (1986). Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **52**:50-5.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., and Sansonetti, P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun.* **55**:2822-9.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*. **65**:1127-41.
- Gandhi, M.; Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. **113**: 1–15.
- Gilot, P., André, P. and Content, J. (1999). *Listeria monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin. *Infection and Immunity*. **67**: 6698-6701.
- Gitai, Z., Dye, N., and Shapiro, L. (2004). An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *PNAS*. **101**(23): 8643–8648.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durand, L.,

Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Karst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.-C., Rimmel, B., Rose, M., Rusniok, C., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*. **294**:849-852.

Goebel, W., and Kreft, J. (1997). Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends of Microbiology*. **5**: 86-88.

Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Millilo, S. R., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. and Sauders, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60**:1280.

Guinane, C. M., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2006). Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrob Agents Chemother*. **50**:2824- 8.

Hain, T., Steinweg, C., Kuenne, C. T., Billion, A., Ghai, R., Chatterjee, S. S., Domann, E., Karst, U., Goesmann, A., Bekel, T., Bartels, D., Kaiser, O., Meyer, F., Puhler, A., Weisshaar, B., Wehland, J., Liang, C., Dandekar, T., Lampidis, R., Kreft, J., Goebel, W., and Chakraborty, T. (2006). Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol*. **188**:7405-7415.

Höltje, J. V. (1995). From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. **164**: 243-54.

Höltje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **62**:181–203.

<http://www.alert-online.com/pt/news/health-portal/cantinas-publicas-contaminadas-com-listeria-monocytogenes>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/986954>

Jay, J. M., 1996. Prevalence of *Listeria* spp. on meat and poultry products. *Food Control*. **4**(5), 109-214.

- Jones, L. J., Carballido-Lopez, R. and Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*. **104**:913–922.
- Jordan, S. J., Perni, S., Glenn, S., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R. P., Chambel, L., Barata, B., Zilhao, I., Aldsworth, T. G., Adriaio, A., Faleiro, M. L., Shama, G., and Andrew, P. W. (2008). *Listeria monocytogenes* Biofilm-Associated Protein (BapL) may contribute to surface attachment of *L. monocytogenes* but is absent from many field isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**(17):5451–5456.
- Joris, B., Englebort, S., Chu, C. P., Kariyama, R., Daneo-Moore, L., Shockman, G. D., and Ghuysen, J. M. (1992). Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase -2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. *FEMS Microbiol Lett*. **70**:257-64.
- Kaltwasser, M., T. Wiegert, and W. Schumann. 2002. Construction and Application of Epitope- and Green Fluorescent Protein-Tagging Integration Vectors for *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol*. **68**:2624-2628.
- Kamisango, K., Saiki, I., Tanio, Y., Okumura, H., Araki, Y., Sekikawa, I., Azuma, I., and Yamamura, Y. (1982). Structures and biological activities of peptidoglycans of *Listeria monocytogenes* and *Propionibacterium acnes*. *J. Biochem*. **92**:23–33.
- Kawai, Y. and Ogasawara, N. (2006). *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology*. **152**:1129-1141.
- Keto-Timonen, R. (2008). Amplified fragment length polymorphism analysis in strain typing and identification of *Listeria* and *Clostridium* species. Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, Helsinki.
- Kolb-Maurer, A., Gentschev, I., Fries, H. W., Fiedler, F., Brocker, E. B., Kampgen, E., and Goebel, W. (2000). *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect Immun*. **68**:3680-8.
- Kolb-Maurer, A., Pilgrim, S., Kampgen, E., McLellan, A. D., Brocker, E. B., Goebel, W., and Gentschev, I. (2001). Antibodies against listerial protein 60 act as an opsonin for phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human dendritic cells. *Infect. Immun*. **69**:3100–3109.
- Koneman, E., Winn, Jr. W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. (6^a Ed.) (Chapter 14) (p. 766), Lippincott Williams e Wilkins.

- Korsak, D., Vollmer, W., and Markiewicz, Z. (2005). *Listeria monocytogenes* EGD lacking penicillin-binding protein 5 (PBP5) produces a thicker cell wall. *FEMS Microbiol. Lett.* **251**:281–288.
- Kruse, T., Bork-Jensen, J., and Gerdes, K. (2005). The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Molecular Microbiology.* **55**(1): 78–89.
- Kuhn, M., and Goebel, W. (1989). Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* **57**:55–61.
- Kuhn, M and Goebel, W. (1999). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes.*, p. 97-130. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria, listeriosis, and food safety*, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Labischinski, H., Goodell, E. W., Goodell, A., and Hochberg, M. L. (1991). Direct proof of a “more-than-single-layered” peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7: a neutron small-angle scattering study. *J. Bacteriol.* **173**:751–756.
- Leaver, M. e Errington, J. (2005). Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **57**(5): 1196-1209.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., and Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **60**, 2210-2214.
- Lecuit, M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*, **9**: 1216-1225.
- Lee, J. C., and Stewart, G. C. (2003). Essential Nature of the *mreC* Determinant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology.* **185**(15): 4490–4498
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology.* **55**: 645-659.
- Mackaness, G. B. (1962). Cellular resistance to infection. *J Exp Med.* **116**:381-406.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., (1989). *Molecular Cloning – A Laboratory manual.* 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Mazodier, P. and Davies, J. (1991). Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 147-171.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W. J, and Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and Listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International journal of food microbiology.* **92**: 15-33.
- Mena, C.; Almeida, G.; Carneiro, L.; Teixeira, P.; Hogg, T.; Gibbs, P.A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, **21**: 213–216.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R. M. and Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell.* **84**: 923-932.
- Milohanic, E., Jonquieres, R., Cossart, P., Berche, P., and Gaillard, J. L. (2001). The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol.* **39**:1212-24.
- Mohammadi, T., Karczmarek, A., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Mengin-Lecreux, D., and den Blaauwen, T. (2007). The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **65**:1106–1121.
- Neuhaus, F. C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**:686-723.
- Olivares, R. (2009). *Listeria monocytogenes*: bacteria antigua, desafío permanente. *Medwave*, Ano IX (6).
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleid Acids Research.* **29**(9):2002-2007.
- Pichoff, S. e Lutkenhaus, J. (2007). Overview of cell shape: cytoskeletons shape bacterial cells. *Current Opinion in Microbiology.* **10**: 601-605.
- Pilgrim, S., Kolb-Maurer, A., Gentschev, I., Goebel, W., and Kuhn, M. (2003). Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infect. Immun.* **71**: 3473–3484.

- Pinto, E., Marques, N, and Andrew P. W. *Listeria monocytogenes* under autolysis, a proteomic approach. Submetido para publicação.
- Promega (s.d). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Technical Manual.
- Qin, X., Singh, K. V., Xu, Y., Weinstock, G. M., and Murray, B. E. (1998). Effect of Disruption of a Gene Encoding an Autolysin of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. **42**(11): 2883–2888.
- Rocha J. M. S. Aplicações de Agentes Tensioactivos em Biotecnologia. *Bol. Biotecnol.* 2000, **5**: 5-11.
- Rocourt, J., Wehmeyer, U., and Stackebrandt, E. (1987). Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus *Jonesia gen. nov.* as *Jonesia denitrificans comb. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:266-270.
- Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification, p. 1–20. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria, listeriosis, and food safety*, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Rocourt, J., Jacquet, C. and Reilly, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*. **62**: 197-209.
- Schäferkordt, S., and Chakraborty, T. (1995). Vector plasmid for insertional mutagenesis and directional cloning in *Listeria spp.* *Biotechniques*. **19**: 720-722; 724-725.
- Scheffers, D., and Pinho, M. G. (2005). Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **69**(4):585-607.
- Schubert, K., Bichlmaier, A. M., Mager, E., Wolff, K., Ruhland, G., and Fiedler, F. (2000). P45, an extracellular 45 kDa protein of *Listeria monocytogenes* with similarity to protein p60 and exhibiting peptidoglycan lytic activity. *Arch. Microbiol.* **173**:21–28.
- Seeliger, H. P.R., Jones, D., (1986). Genus *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. Mair P.M.A., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Vol 2), Williams and Wilkins, Baltimore pp 1235-1245.
- Sharpe, M.E., Latham, M.J., Garvie, E.I., Zirngibl, J., and Kandler, O. (1973). Two new species of *Lactobacillus* isolated from the bovine rumen, *Lactobacillus ruminus sp. nov.* and *Lactobacillus vitulinus sp. nov.* *J. Gen. Microbiol.* **77**:37-49.

- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. and Ireton, K. (2000). InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*. **103**: 501-510.
- Siefert, J. L., and Fox, G. E. (1998). Phylogenetic mapping of bacterial morphology. *Microbiology*. **144**: 2803-2808.
- Smith, T. J., Blackman, S. A., and Foster, S. J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*. **146**:249– 262.
- Soufo, H. J. D. and Graumann, P. L. (2003). Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr. Biol*. **13**: 1916–1920.
- Steinweg, C., Kuenne, C. T., Billion, A., Mraheil, M. A., Domann, E., Ghai, R., Barbuddhe, S. B., Karst, U., Goesmann, A., Puhler, A., Weisshaar, B., Wehland, J., Lampidis, R., Kreft, J., Goebel, W., Chakraborty, T., and Hain, T. (2010). Complete genome sequence of *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic member of the genus *Listeria*. *J. Bacteriol*. **192**:1473-1474.
- Swaminathan B., Smidt P. G. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*. **9**: 1236-1243.
- Tiyanont, K., Doan, T., Lazarus, M. B., Fang, X., Rudner, D. Z., and Walker, S. (2006). Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *PNAS*. **103**(29):11033–11038.
- Trivett, T. L. and Meyer, E. A (1971). Citrate Cycle and Related Metabolism of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*. **107**(3): 770-779.
- Van den Ent, F., Leaver, M., Bendezu, F., Errington, J., de Boer, B., Löwe, J. (2006). Dimeric structure of cell shape protein MreC and its functional implications. *Molecular Microbiology*. **62**(6): 1631-1642.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, G., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*. **14**: 309-318.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan murein hydrolases. *FEMS. Microbiol Rev*. **32**:259-86.
- Wachi, M., Doi, M., Tamaki, S., Park, W., Nakajima-Iijima, S., and Matsushashi, M. (1987) Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 4935–4940.

- Wachi, M., and Matsushashi, M. (1989) Negative control of cell division by mreB, a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **171**: 3123–3127.
- Wachi, M., Doi, M., Okada, Y., and Matsushashi, M. (1989) New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **171**: 6511–6516.
- Wehr, H. M. (1987). *Listeria monocytogenes*- a current dilemma. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**: 769-772.
- Wiedman M., Bruce J. L., Keating C., Johnson A. E., McDonough P. L., Batt C. A. (1997). Ribotypes and Virulence Gene Polymorphisms Suggest Three Distinct *Listeria monocytogenes* Lineages with Differences in Pathogenic Potential. *Infection and Immunity.* **65**:2707-16.
- Wuenscher, M. D., Kohler, S., Bubert, A., Gerike, U., and Goebel, W. (1993). The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* **175**:3491– 3501.
- Zhang, C., Zhang, M., Ju, J., Nietfeldt, J., Wise, J., Terry, P.M., Olson, M., Kachman, S. D. Wiedmann, M., Samadpour, M., Benson, A.K. (2003) Genome Diversification in Phylogenetic Lineages I and II of *Listeria monocytogenes*: Identification of Segments Unique to Lineage II Populations. *Journal of Bacteriology.* **185**: 5573–5584.

8- Anexos

Anexo I - Mapas de restrição dos vetores e marcador utilizado

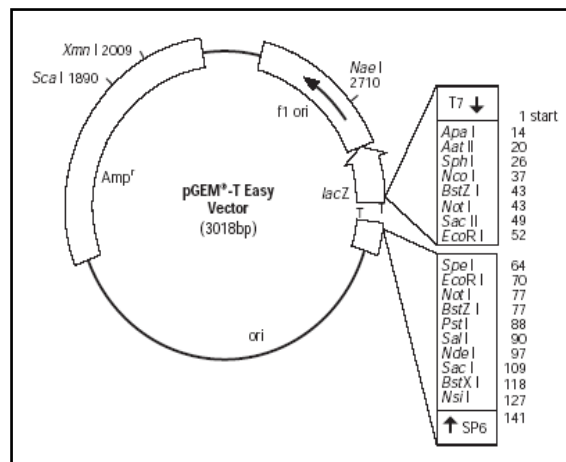


Figura 40- Mapa do vetor pGEMT-Easy (Promega)

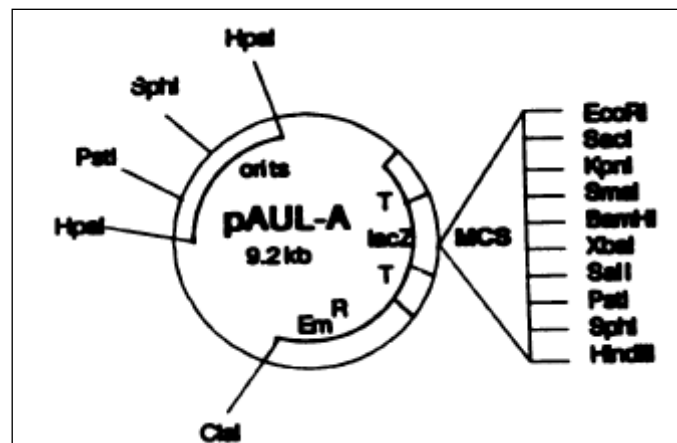


Figura 41: Mapa do vetor pAUL-A (Chakraborty *et al*, 1992)

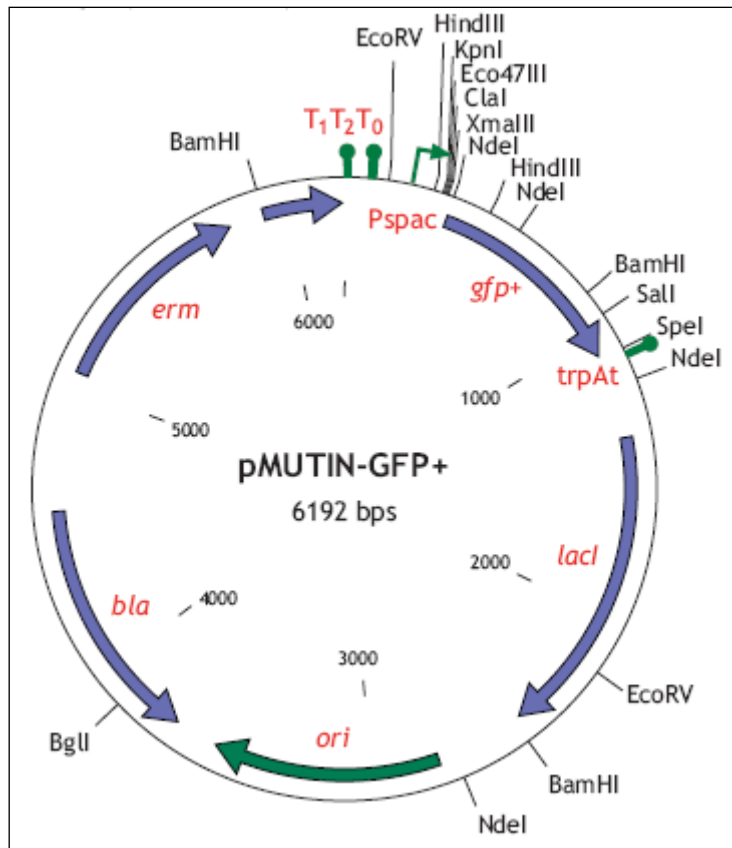


Figura 42: Mapa do vector pMUTIN-GFP+ (*Bacillus* Genetic Stock Center, 2002)

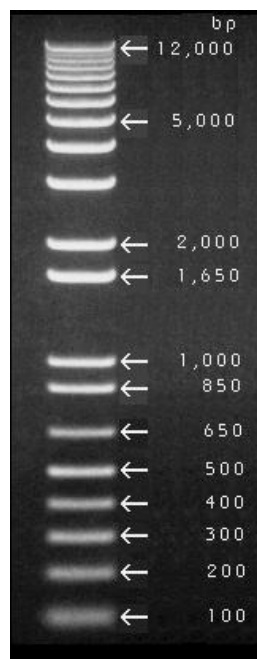


Figura 43 – Marcador utilizado neste trabalho: 1 Kb *plus* DNA Ladder (Invitrogen)

Anexo II – Condições e composição das misturas das reacções de PCR

Tabela XV – Mistura reaccional para a realização das reacções de PCR para a amplificação dos fragmentos dos genes *mreB* e *spl* com os pares de primers *mreEcoRI/mreHind* e *splEcoRI/splHind*, para a estirpe EGD e *mreHind/mreBR897* e *splHind/splR897*, respectivamente, para a estirpe C897.

Componentes da reacção	Volume
Tampão (10x)	5 µl
Mgcl ₂ (25 mM)	5 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
<i>Primer FW</i> (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Primer RV</i> (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Taq DNA polimerase</i> (Promega)	0,25 µl
H ₂ O estéril	35,95 µl
DNA	0,8 µl

A mistura reaccional utilizada na realização das reacções de PCR para amplificar os fragmentos dos genes *mreB* e *spl* com os *primers* anteriores foram as mesmas usadas para verificar os transformantes com os *primers* do vector (UR) e do fragmento e também para amplificar o gene *iap*.

Tabela XVI – Condições utilizadas na realização das reacções de PCR para amplificação dos fragmentos dos genes *mreB* e *spl* com os pares de primers *mreEcoRI/mreHind* e *splEcoRI/splHind*, respectivamente, para a estirpe EGD e *mreHind/mreBR897* e *splHind/splR897*, respectivamente, para a estirpe C897.

Temperatura	Tempo	N.º de ciclos
94°C	2 min	1
94°C	1 min	34
58°C	1 min	34
72°C	40 seg	34

Tabela XVII - Condições utilizadas na realização das reacções de PCR para amplificar os fragmentos dos genes nos transformantes com os *primers* do vector (UR) e do fragmento.

Temperatura	Tempo	N.º de ciclos
94°C	2 min	1
94°C	1 min	34
60°C	1 min	34
72°C	1,5 min	34

Tabela XVIII - Condições utilizadas na realização das reacções de PCR para a amplificação do fragmento do gene *iap*.

Temperatura	Tempo	N.º de ciclos
94°C	3 min	1
94°C	1 min	30
60°C	1 min	30
72°C	1 min	30

Na amplificação do gene *mreB* inteiro com os *primers* RKpnl/ FXmaIII, para a execução da fusão com vector pMUTIN-GFP+ utilizou-se a mistura reaccional bem como as condições expressas nas tabelas XIX e XX.

Tabela XIX – Mistura reaccional para a realização das reacções de PCR' para a amplificação do gene *mreB* inteiro com o par de *primers* RkpnI/FXmaIII.

Componentes da reacção	Volume
<i>Master mix</i> (Qiagen)	10 µl
<i>Primer FW</i> (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Primer RV</i> (10 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O estéril	6 µl
DNA	2 µl

Tabela XX – Condições utilizadas na realização das reacções de PCR para amplificar o gene *mreB* inteiro.

Temperatura	Tempo	N.º de ciclos
95°C	5 min	1
94°C	2 min	1
94°C	1 min	35
62°C	1 min	35
72°C	1,5 min	35
72°C	5 min	1

Para a verificação da expressão do gene *mreB* por PCR em tempo real utilizaram-se as condições descritas na tabela VII abaixo.

Tabela XXI- Condições utilizadas para verificação da expressão do gene *mreB* no mutante EGD*mreB*, através da técnica PCR em tempo real.

Temperatura	tempo	N.º de ciclos	Ciclo
94°C	3 min.	1	1
94°C	45 s	45	2
59°C	30 s	45	
72°C	15 s	45	
65°C	10 s	125	3

Anexo III- Meios de cultura

- Meio LB:

Dissolveram-se 4,65 g de meio LB (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) em 300 ml de água destilada (cf = 15,5 g/l) e autoclavou-se a 121°C, durante 20 min. Para preparar o mesmo meio em placa (sólido), procedeu-se de igual forma, tendo-se adicionado também 4,5 g de agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy, Roseto degli Abruzzi, Italy) (cf = 15 g/l).

Para preparar placas de LB com AMP (Sigma, New York, USA) (cf = 100 µg/ml) ou ERY (cf = 300 µg/ml), deixou-se arrefecer o meio até ~45°C e, adicionou-se por fim os antibióticos ao meio.

- Meio BHI:

Dissolveram-se 11,1 g de meio LB (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) em 300 ml de água destilada (cf = 37 g/l) e autoclavou-se a 121°C, durante 20 min. Para preparar o mesmo meio em placa (sólido), procedeu-se de igual forma, tendo-se adicionado também 4,5 g de agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) (cf = 15 g/l).

- Meio SOC

a) – Meio SOB (100 ml):

Dissolveram-se em 100 ml de água destilada 2 g de bacto-triptona (Difco, USA), 0,5 g de extracto de levedura (Difco, USA), 0,0584 g de cloreto de sódio (Sigma, New York, USA) e 0,0186 g de cloreto de potássio (Merck, Darmstadt, Germany).

Ajustou-se o pH a 7 com hidróxido de sódio diluído e autoclavou-se durante 15 min. a 121°C.

b) – Solução de sais de magnésio 2 M (100 ml)

Em 100 ml de água destilada dissolveram-se 20,33 g de cloreto de magnésio (Sigma, New York, USA) e 24,65 g de sulfato de magnésio heptahidratado (Merck, Darmstadt, Germany). Autoclavou-se durante 15 min. a 121°C.

c) – Solução de glucose 2 M (100 ml)

Dissolveram-se 36,04 g de glucose (Fisher Scientific) em 100 ml de água destilada e filtrou-se com um filtro de 0,2 µm.

d) – Meio SOC (100 ml)

Juntaram-se 1 ml da solução de sais de magnésio a 2 M (cf = 20 mM), 1 ml da solução de glucose a 2M (cf = 20 mM) e 98 ml de meio SOB. Homogeneizou-se bem e congelaram-se alíquotas de 1ml.

- Meio Trivett and Meyer (Trivett e Meyer, 1971) (1L):

a) Solução de sais minerais:

- Solução A (440 ml):

Dissolveram-se 8,5 g de K_2HPO_4 , 1,69 g de $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ e 0,5 g de NH_4Cl em 440 ml de água destilada.

- Solução B (200 ml):

Dissolveram-se 0,24 g de $NaOH$ e 0,48 g de ácido nitricotriacético em 200 ml de água destilada.

- Solução C (200 ml):

Dissolveram-se 0,048 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ em 200 ml de água destilada.

- Solução D (100 ml):

Dissolveram-se 0,41 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em 100 ml de água destilada.

De modo a evitar a precipitação, juntou-se a solução C à solução B, a mistura resultante adicionou-se à solução A e por fim a solução D. Esterilizou-se a solução final por autoclavagem a 115°C durante 15 minutos.

b) Solução de Aminoácidos (100 ml):

Dissolveram-se 200 mg de L-cisteína-HCl, 200 mg de L-leucina, 400 mg de DL-Isoleucina, 400 mg de DL-Valina, 400 mg de DL-metionina, 400 mg de L-Arginina-HCl e 400 mg de L-Histina-HCl a 100 ml de água destilada pré-aquecida a 50°C. Esterilizou-se a solução por filtração com um filtro de 0,2 µm.

À solução de aminoácidos adicionaram-se 4 g de Glucose (0,2 % (p/v)).

c) Solução de Vitaminas (100 ml):

Dissolveram-se 10 mg de Riboflavina e 10 mg de Tiamina em 99 ml de água destilada previamente aquecida. Fez-se uma segunda solução com 10 mg de Biotina e 1 mg de ácido DL-tioactivo em 10 ml de água destilada (adicionou-se NaOH 1M, quando necessário, para dissolver). Adicionou-se 1 ml da segunda solução à primeira e esterilizou-se por filtração. Protegeu-se o frasco da luz e armazenou-se no frigorífico a 4°C.

Após a preparação de todas as soluções do meio TM, adicionaram-se 50 ml da solução de aminoácidos (a solução preparada tem 2x a concentração necessária) e 10 ml da solução de vitaminas à solução de sais minerais.

Anexo IV - Contexto genómico do gene *mreB*

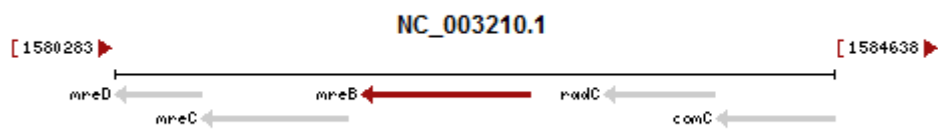


Figura 44: Contexto genómico do gene *mreB* e genes vizinhos na estirpe EGD de *L. monocytogenes* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/986954>)

Anexo V – Sequências dos genes em estudo

- Gene *mreB* (lmo1548) – Contém 1014 pb:

ttagttcattttttacgttatacatatccatattttctaaagctttccctgtccaattgcaacacaatcaagtgggtcatctgcaat
aataacaggcattttgtttcttcagaaataactgtatctaaattacgtaaaagcgctccccacctgtgagtacaataccttt
atccataatatcagctgacaattctgggtggcgattttcaagtggtccttttacagcatcaataatagctgctactgtatcagca
agtgcttcgctaatttctctggagtaattcaatagtttaggaagtccgggtactaaatcgcgctcctcgaatgctaaatggag
ataagtccaaaaccttttgactagctgagccaatttcattttaattgcttcggcagtagcatccaattaatagattatatttt
tacgaatgtaattaatgataactcatctaaatcatcaccggcagtcctcacagagcgactagttacaataccacctagag
aaataacagcaacttctgtagttcctccaccaataatctacaaccatactacctgtaggctcgccaactggaagtccagcac
caatagccgcagcaaacgggttctcaattgtaaatgcgctttagcacctgcttgacgagtcgcatcaataacagcgctttt
tctacacctgtaattccagaaggtacacatatcattacgcggtggttactgcatcaaacctttaccagctttttgtatgtagta
ttcatcattgctgctgtgtatcataatcagcaataacgccatctttcattggacgaattgcaacaatatttctggtgttctacca
atcatatttttagcatcgctaccaactgcaactatttctgtgtgctttttcattgccacaacggaaggtcacgaaggacaat
acctttccctcatatagacaagtgtgtcgtgtccctaaatcaattccaatatctttattaccaaatacctcaaacat

- Gene *spl* (lmo2505) – Contém 1280 pb:

catataaaaaagcacctttgtttaaaacgacaaaagggtgcttttaactttcaataataattagaagtagctacgcggccat
atcctacaagatatttagcccagtagccgctagtgatgtgtcatattaacgccattgtttgagcattgatcattgaccgcc
accacataaattcctacgtgagcaattccgctgccatagttaaagaataactaagtcacctggtttgtctggctagcgctga
tttagatgctgctgcatattgtccaccagatgttcttgaagagaaacaccgctgcacggaatgcataagaagtaaatac
cagaacagtcaaatgcgcttggtccagttgctccaaggctataagggtttcctagttgtgcttagctgcagaaatcattgct
gagtatccgccactagatgggtgtgctgcgcttggtgctgaattgtgtcatttgacgcaacattttgtgtattagattttgctt
gggtgtagaggtatccgaactacttgattctgtccaacggttgaagatgttgcttcacgtaatgctgtcgcacgtgctgtagctt
cttagctgctttatcacgttcactacaagaccagctttgcattttcagcactgcttgatcagaagctagttgagcaacgatt
gcttcttttcagctttttgtgcttcgattttttgtgtgcttcatattcatgaattgctgttctgctgatcttctgtttttctaacagcag
ttgttttttttaagctttttcatcattttgtgatcttctaaaatagatttatcagaatcaactaattggttaactgcagaaacac
gtccaactaagtcagaaagattttctgcatctaagataactcaagataagcattagaattagaagttttgcatcgcacga
gcaggttcttttaaacagtttcgcttcttfaatacgttcattgatacttttaatatcttcattaagtttttagttcttgcctgtttatc
aaattctcctgtagagatttagctttttctgagctttctcaaggctgctactaaaccagaaagatctgattgtaaactgtttttt
agactgtatgctgtaattttttatcttggtttgaatgtctgtattcacgtccgcgaaaacattagtcgtaaaagctggcgctcaa
actgataactgctgcgagtgagatcgcaataaacgtattcttttcaaaaagtttacctcct

