



Análise do gene *ssa_0094* na liberação de DNA extracelular em *Streptococcus sanguinis*.

Orientadora: Renata O. Mattos-Graner

Lívia Araujo Alves

Geovanny Cuya Salvatierra

Aluna: Isabela Camargo

Resumo

Introdução:

Streptococcus sanguinis é uma espécie bacteriana ubíqua e abundante da cavidade bucal, cujo nicho primário são as superfícies dentárias. Cepas desta espécie são colonizadoras pioneiras dos dentes e encontra-se em maior proporção em biofilmes dentários associados à saúde, quando comparados a biofilmes cariogênicos (Ge *et al.*, 2008; Giacaman *et al.*, 2015). Os mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes por *S. sanguinis* são pouco compreendidos, mas é conhecido que *S. sanguinis* é capaz de produzir H₂O₂ sob condições de aerobiose, o qual não somente inibe o crescimento de espécies competidoras, mas também induz a liberação de DNA extracelular (DNAe), principal componente da matriz extracelular de biofilmes formados por esta espécie (Kreth *et al.*, 2009; 9, Moraes *et al.*, 2014). Há evidências de que *S. sanguinis* produz DNAe sem sofrer autólise e durante a divisão celular (Moraes *et al.*, 2014), através de hidrolases de peptideoglicano, como a codificada pelo gene *ssa_0094*. A hipótese deste trabalho é que a inativação de *ssa_0094* pode comprometer a produção de DNAe. **Financiado pela FAPESP (Proc. 2018/02054-4; 2017/23183-4).**



Objetivo: O objetivo deste estudo foi investigar o papel do gene *ssa_0094* na liberação de DNAe em *S. sanguinis*.

Materiais e Métodos: Para isto, o gene *ssa_0094* foi inativado na cepa *S. sanguinis* SK36, através de recombinação homóloga com alelo mutado, no qual *ssa_0094* foi substituído por gene de resistência à eritromicina. O nível de DNAe liberado no sobrenadante de cultura crescidas na fase exponencial e estacionária foi comparado entre o mutante isogênico (designado SK0094) e a cepa parental SK36 pela quantificação do DNAe através de PCR quantitativo com primers para o gene *16SrRNA*.

A cepa mutante SK0094 foi construída através da deleção apolar do gene *ssa_0094* em SK36, utilizando-se um alelo mutado construído através de estratégia de PCR e ligação (*PCR ligation mutagenesis*) (Moraes *et al.*, 2014). Para a construção da cepa mutante isogênica de *ssa_0094* foram desenhados primers (Tabela 1) para as regiões flanqueando *ssa_0094* designados primers P1, P2, P3 e P4. O gene de resistência à eritromicina foi amplificado do plasmídeo pVA838 através dos pares de primers E1 e E2 (Tabela 1). O tamanho esperado dos amplicons e a especificidade das reações foram monitoradas em géis de agarose, como ilustrado na Figura 1A. Em seguida, produtos das reações de PCR foram purificados e posteriormente submetido à digestão, a integridade dos produtos digeridos foi monitorada em géis de agarose (Figura 1B), foram purificados e ligados em reações catalisadas pela DNA ligase T4. Estas reações de ligação geraram fragmentos contendo as sequências amontante e adjacente da região codificadora de *ssa_0094* ligadas ao gene *erm^r*, os quais foram amplificados com os pares de primers P1/E2 e E1/P4; os produtos destas reações foram monitoradas em géis de agarose (Figura 1C). Estes fragmentos foram utilizados como template em reações de PCR realizadas com os primers, para gerar alelos mutados de 1.761 pb, nos quais o gene *ssa_0094* foi substituído pelo gene *erm^r*. Para gerar o alelo mutado, a reação foi composta por: 79 µl de H₂O ultra pura, 9 µl de Tampão PCR 10X, 2,3 µl de solução de dNTPs a 10 mM, 2,0 µl de solução de cada primer a 10 µM, 1,8 µl de Taq DNA Polimerase HF e 1 µl de DNA molde (0,5 µl de P1/E2 purificado e 0,5 µl de E1/P4 purificado). As condições de ciclagem incluíram extensão inicial 95°C (5 min), seguida de 30 ciclos a 95°C (45 seg.), 58°C (30 seg.), 68°C (120 seg.), 68°C (10 min.). Os amplicons de tamanho esperado (1.761 pb) foram então purificados de gel de agarose a 0,8%, e usados para transformação da cepa selvagem SK36. Os transformantes foram recuperados em culturas



em BHI agar contendo 10 µg/ml de eritromicina. A substituição do *locus* de *ssa_0094* pelo alelo mutado foi confirmada através de PCR de colônia com os pares de *primers* P1/P4.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na estratégia de inativação do gene *SSA_0094* através de mutagênese por PCR e ligação.

| <i>Primers</i> | Sequencia 5'-3' (Forward//Reverse) ^a | Tamanho (pb)/ T ^o m |
|----------------------------------|--|-----------------------------------|
| ermE1- <i>ascI</i> | TTGGCGCGCCTGGCGGAAACGTAAAAGAAG | 1000pb/ 59°C |
| ermE2- <i>xhoI</i> | TTCTCGAGGGCTCCTTGGAAGCTGTCAGT | |
| <i>SSA_0094</i> P1 | AAAATAGACGAAGAAGAAGCGACAG | 22pb/ 59.13°C |
| <i>SSA_0094</i> -P2- <i>ascI</i> | TTGGCGCGCCACAAAGGCAATGCTGACAAA | 30pb/ 59.32°C |
| <i>SSA_0094</i> -P3- <i>xhoI</i> | TTCTCGAGAACTGAAAACCATTACGACCAC | 30pb/ 58.03°C |
| <i>SSA_0094</i> -P4 | ATCAAACCTTGCTGTCGTAGGC | 21pb/ 59.40°C |

^aAs sequencias sublinhadas correspondem aos sítios de restrição inseridos em cada *primer*. T^om; temperatura de anelamento do *primer*.

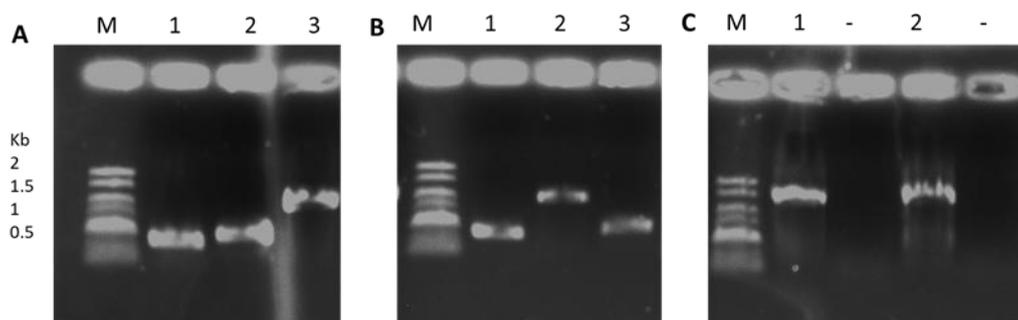


Figura 1: Gel de Agarose (1,5%) contendo 10 µl de produtos de PCR utilizados para construção do mutante SK0094. A) Produtos de PCR purificados. Canaletas 1 e 2: produtos obtidos das regiões que flanqueiam *ssa_0094* com P1/P2 (361 pb) e P3/P4 (421 pb) respectivamente, a partir de DNA genômico da cepa selvagem. Canaleta 3: produtos obtidos com primers E1/E2 (Erm) a partir do plasmídeo pVA838 (979 pb). B) Produtos de PCR digeridos com enzimas *AscI* e/ou *XhoI*. Canaleta 1: produto P1/P2 (361 pb) digerido com *AscI*; canaleta 2: produto E1/E2 (979 pb) digerido com *AscI* e *XhoI*; canaleta 3: produto P3/P4 (421 pb) digerido com *XhoI*. C) Produtos das reações PCR obtidos com P1/E2 (1340 pb) (canaleta 1) e E1/P4 (1400 pb) (canaleta 2), nas quais utilizaram-se os produtos de ligação dos fragmentos a montante e a jusante de *SS_0094* com o gene de resistência à eritromicina.

Para a análise da quantificação de DNAe, culturas em BHI das cepas estudadas com as absorbâncias ajustadas (A_{550nm} 0,3) foram diluídas em garrafas de 50 ml em meio BHI contendo 25 µl de eritromicina para o mutante SK0094 e 100 µl de espectinomicina para a



cepa complementada SK0094+. As amostras foram incubadas (aerobiose, 37°C). Os sobrenadantes de volumes de 1 ml das culturas das cepas estudadas ao final da fase log de crescimento (A_{550nm} 0,7) foram coletados por centrifugação (16.000 x g, 4°C, 10 min). Os sobrenadantes foram filtrados através de membranas para remoção de células remanescentes. Ensaio de PCRq foram então realizados utilizando-se sistema StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies) com volumes de 1 µl de sobrenadante filtrado acrescido de 3,4 µl de água ultrapura, 5 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, USA) e 0,3 µl de solução de primers (10 µM) específicos para o gene *16SrRNA* (5'-CGTAAACGATGAGTGCTAGGTG-3' e 5'-TAGAGCGGTCAGAGGATGT-3'). As condições térmicas das reações de amplificação incluíram aquecimento a 95 °C (10 min), seguido de 40 ciclos de 95°C (por 15 s), 58°C (por 15 s) e 72°C (por 30 s).

Resultados: Foi observado aumentos significativos na produção de DNAe no mutante SK0094 ($p < 0.05$) nas fases exponencial (A_{550nm} 0,3) e estacionária (A_{550nm} 0,7) comparado à SK36 (Figura 2A). Na fase exponencial, as concentrações de DNAe nas cepas SK36 e SK0094 foram de 328,37 e 519,23 ng/µl, respectivamente. Já na fase estacionária, a produção de DNAe foi 509,51 e 1002,91 ng/µl nas cepas SK36 e SK0094, respectivamente. Na fase estacionária (Figura 2B), onde ocorre a maior liberação e produção de DNAe, a cepa complementada SK0094+ restaurou os níveis de produção de DNAe em relação à cepa selvagem SK36 ($p > 0.05$). O mutante SK0094 apresentou (1,58 e 1,96 vezes, respectivamente) mais liberação de DNAe nas fases exponencial e estacionária de crescimento, quando comparado à cepa SK36.

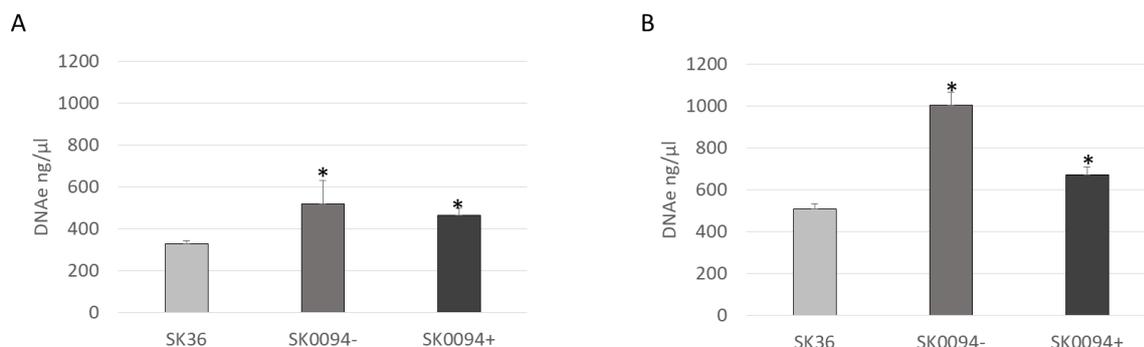


Figura 2: Quantificação de DNA extracelular (DNAe) das cepas de *S. sanguinis* SK36, mutante SK0094 e da cepa mutante complementada SK0094+ em aerobiose. Análises de RT-qPCR foram realizadas em cepas crescidas em BHI nas absorvâncias de A_{550nm} 0,3 (A) e A_{550nm} 0,7 (B). As colunas indicam médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras indicam o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas em comparação com a cepa selvagem SK36 (Kruskal Wallis, * $p < 0,05$).



Conclusão: O gene *ssa_0094* está envolvido na liberação de DNA extracelular em *S. sanguinis*. A inativação do gene *ssa_0094* promoveu aumento significativo na liberação de DNAe em *S. sanguinis*, principalmente no início da fase estacionária de crescimento, o que pode influenciar na maior presença de DNAe nos biofilmes de *S. sanguinis*.

Referências Bibliográficas:

1. **Ge, X., T. Kitten, Z. Chen, S. P. Lee, C. L. Munro, and P. Xu.** 2008. Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. *Infect.Immun.* **76**:2551-2559. doi:IAI.00338-08 [pii];10.1128/IAI.00338-08 [doi].
2. **Giacaman, R. A., S. Torres, Y. Gomez, C. Munoz-Sandoval, and J. Kreth.** 2015. Correlation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization and ex vivo hydrogen peroxide production in carious lesion-free and high caries adults. *Arch.Oral Biol.* **60**:154-159. doi:S0003-9969(14)00248-9 [pii];10.1016/j.archoralbio.2014.09.007 [doi].
3. **Kreth, J., H. Vu, Y. Zhang, and M. C. Herzberg.** 2009. Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *J.Bacteriol.* **191**:6281-6291. doi:JB.00906-09 [pii];10.1128/JB.00906-09 [doi].
4. **Moraes, J. J., R. N. Stipp, E. N. Harth-Chu, T. M. Camargo, J. F. Hofling, and R. O. Mattos-Graner.** 2014. Two-component system VicRK regulates functions associated with establishment of *Streptococcus sanguinis* in biofilms. *Infect.Immun.* **82**:4941-4951. doi:IAI.01850-14 [pii];10.1128/IAI.01850-14 [doi].