

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**MAYARA DE MATTOS LACERDA DE CARVALHO**

**Caracterização do Papel da Proteína PLD<sup>kp</sup> na Virulência de *Klebsiella pneumoniae***

**RIO DE JANEIRO**

2018

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**MAYARA DE MATTOS LACERDA DE CARVALHO**

Caracterização do Papel da Proteína PLD<sup>kp</sup> na Virulência de *Klebsiella pneumoniae*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Leticia Miranda Lery Santos

**RIO DE JANEIRO**

2018

Carvalho, Mayara de Mattos Lacerda de.

Caracterização do Papel da Proteína PLDkp na Virulência de *Klebsiella pneumoniae* / Mayara de Mattos Lacerda de Carvalho. - Rio de Janeiro, 2018.  
82 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Leticia Miranda Lery Santos.

Bibliografia: f. 76-82

1. Fosfolipase D. 2. Virulência. 3. Cápsula polissacarídica. 4. Sobrevivência. 5. Escape. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**MAYARA DE MATTOS LACERDA DE CARVALHO**

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA PLD<sup>kp</sup> NA VIRULÊNCIA DE  
*Klebsiella pneumoniae***

**ORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Miranda Lery Santos

**Aprovada em: 30/01/2018**

**EXAMINADORES:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef (IOC-Fiocruz) - Presidente**

**Prof. Dr. Luis Caetano Martha Antunes (ENSP-Fiocruz)- Membro**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Maron Gutierrez (IOC-Fiocruz)- Membro**

**Prof. Dr. Milton Ozório Moraes (IOC-Fiocruz) - Suplente**

**Prof. Dr. Paulo Marcarello Bisch (IBCCF-UFRJ)- Suplente**

**Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristiana Santos de Macedo (CDTS-Fiocruz) - Revisora**

Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2018

*Dedico essa dissertação à população brasileira, que me permitiu estar aqui e a quem desejo que meu trabalho beneficie.*

## AGRADECIMENTOS

Para estar na primeira linha, não me vem à mente outra pessoa que não você - mãe. Em cada passo que dou, ainda que de todo não compreenda, estende a mão e me sustenta firme com seu amor. Obrigada por eu nunca ter precisado ir ao dicionário para saber o que significava a palavra Mãe. Nem mesmo sei o que está lá, e tenho medo de ler e não concordar, pois penso que as definições são frias demais para abarcar o quanto Mãe pode significar. Hoje, o que eu sou, também é você.

Minha vinda para o Rio só foi possível graças a uma tia que ganhei emprestada. Ela nem mesmo me conhecia, mas me acolheu em sua casa e dividiu comigo a sua vida. Ela compreendeu meu esforço e me incentivou a ir mais longe. Foram mais de dois anos juntas e não há como fazer caber em palavras o quanto sou grata. Obrigada Tia Cida.

Hoje gostaria de agradecer a dois grandes amigos que fiz - Lucas e Jefferson! Obrigada por dividirem comigo não só o apartamento, mas também as risadas, os “rolês”, as problemáticas, os livros e principalmente, a luta pelos direitos dos pós-graduandos e por um mundo mais justo.

Agradeço imensamente aos componentes e amigos do LAMICEL, que desde o meu primeiro dia no laboratório me trouxeram a sensação de pertencimento. Obrigada pela ajuda mútua, pelo respeito e carinho que temos, pelos papos no escritório, pelas discussões científicas durante o clube, por manterem os congeladores organizados (Vai que cola, né?!), por toda comilança, por todo companheirismo e por tornarem meus dias mais ensolarados! Sou muito grata por poder passar meus dias ao lado de pessoas positivas, amigas, altruístas.

E por falar em “todos os dias”, queria dizer - obrigada pelo café e pelos puxões de orelha Andréia! Levaremos mais pó..rs

Queria agradecer em especial a Talyta, Victor, Thabatta, Fabrício e Arthur. Pessoas que ganharam um espaço único na minha vida. Obrigada Talyta, pelas músicas da Andra Day, pelo seu jeito divertido e moleca, por quebrar paradigmas e mostrar que mulher é muito boa na bateria, sim senhor! Portnoy que se cuide! E a você Victor, eu quero dizer o quanto sua amizade, suas críticas de conjuntura, e até seus resmungos sobre esse computador velho me fazem rir e ter um dia melhor. Thabatta, Fabrício e Arthur, obrigada por estarem presentes

sempre que precisei. Obrigada por dividirem comigo desde o trivial, até conflitos internos. A amizade de vocês eu pretendo levar para toda a vida!

Agradeço também ao grupo 5 Milhões, formado durante uma disciplina. De forma despretensiosa, nos tornamos grandes. Grandes em apoio, em amizade, em união. Daquilo que seria uma derrota (apenas 5 milhões de células) surgiu a força para as nossas vitórias! Com vocês me emociono, aprendo e ganho esperança. Obrigada!

Agradeço de forma especial, àquela pessoa que me guiou durante todo esse tempo. Leticia, obrigada! Você conhece meus pontos fracos e minha capacidade, e com isso tem me ajudado a chegar cada vez mais longe.

Agradeço a Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Vidal Pessolani, por estar sempre presente e contribuir tanto para as discussões dos clubes de revista e rumos de nossas pesquisas. Agradeço também por ser um exemplo de cuidado e amor aos animais.

Gostaria de agradecer também ao Gustavo Rocha e aos membros do FISBIO-UFRJ por todos os ensinamentos em MFA.

Agradeço também as agências de fomento como a Fundação de Amparo a Pesquisado do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bem como o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio para a realização de pesquisas e aperfeiçoamento.

De forma geral, quero dizer um OBRIGADA a todos que de alguma forma contribuíram para que eu estivesse aqui e para a realização desse trabalho.

*“Quem não se movimenta, não sente as correntes que o prendem”.*

Rosa Luxemburgo

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1 O gênero <i>Klebsiella</i> .....	20
1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	21
1.2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> como patógeno.....	21
1.2.2 Resistência antimicrobiana .....	22
1.2.3 Fatores de virulência.....	24
1.2.3.1 Biofilmes .....	25
1.2.3.2 Lipopolissacarídeos .....	25
1.2.3.3 Sideróforos .....	27
1.2.3.4 Vesículas de membrana externa .....	27
1.2.3.5 Cápsula polissacarídica .....	28
1.2.3.6 Sistemas de secreção .....	32
1.2.3.6.1 Sistema de Secreção do Tipo VI.....	32
1.2.3.7 As fosfolipases.....	34
1.2.3.7.1 Fosfolipases D na virulência bacteriana.....	35
1.2.3.7.2 Fosfolipase D hipotética de Kp52.145.....	38
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos:.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	43

3.1	Cepas Utilizadas.....	43
3.1.1	Cultivo de Células RAW 264.7.....	43
3.1.2	Cultivo bacteriano.....	43
3.2	Avaliação da citotoxicidade em células RAW 264.7 por ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo).....	45
3.3	Adesão e internalização bacteriana por citometria de fluxo.....	45
3.4	Sobrevivência e escape bacteriano.....	47
3.5	Avaliação do envolvimento da proteína PLD <sup>kp</sup> nas estruturas de superfície por microscopia de força atômica.....	48
3.5.1	Método de fixação por paraformaldeído 8% .....	48
3.5.2	Método de Diluição Seriada.....	49
3.5.3	Ponto crítico .....	49
3.6	Avaliação do envolvimento da proteína PLD nas estruturas de superfície por microscopia eletrônica de transmissão.....	50
3.7	Extração de proteínas totais.....	50
3.8	Extração de proteínas de membrana externa.....	51
3.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	51
3.10	Análise estatística.....	51
4	RESULTADOS .....	52
4.1	Avaliação de efeito citotóxico da proteína PLD <sup>kp</sup> em células RAW 264.7.....	52
4.2	Envolvimento da proteína PLD <sup>kp</sup> na interação bactéria-macrófago.....	53
4.2.1	Adesão de cepas Kp52.145 em macrófagos murinos.....	54
4.2.2	Internalização de cepas Kp52.145 em macrófagos murinos .....	57
4.3	Envolvimento da proteína Pld <sup>kp</sup> no arranjo estrutural de moléculas da superfície de <i>K. pneumoniae</i> .....	61
4.4	Perfil de extrato proteico total .....	66
4.5	Perfil de proteínas de membrana externa.....	67

5	DISCUSSÃO .....	69
6	CONCLUSÕES .....	75
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt ou PKB	Proteína quinase B ( <i>Protein kinase B</i> )
CPS	Cápsula polissacarídica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMB	Eosina azul de metileno ( <i>Eosin Methylene Blue</i> )
GT	Glicosiltransferase
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídio
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MFA	Microscopia de força atômica
MIP-2	Proteína Inflamatória de Macrófagos-2 ( <i>Macrophage Inflammatory Protein -2</i> )
MOI	Multiplicidade de infecção ( <i>Multiplicity Of Infection</i> )
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo
NOD	Domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização ( <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like</i> )
O.D.	Densidade ótica ( <i>Optical Density</i> )
OMP	Proteína de membrana externa ( <i>Outer Membrane Protein</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMV	Vesícula de membrana externa ( <i>Outer Membrane Vesicle</i> )

PA	Ácido fosfatídico ( <i>Phosphatidic Acid</i> )
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
PBS	Tampão fosfato de sódio ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PC	Fosfatidilcolina
PG	Fosfaditilglicerol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase ( <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
PLA	Abscesso hepático piogênico ( <i>Pyogenic Liver Abscess</i> )
PLA	Fosfolipase A ( <i>Phospholipase A</i> )
PLB	Fosfolipase B ( <i>Phospholipase B</i> )
PLC	Fosfolipase C ( <i>Phospholipase C</i> )
PLD	Fosfolipase D ( <i>Phospholipase D</i> )
PldA	Fosfolipase D A ( <i>Phospholipase D A</i> )
PldB	Fosfolipase D B ( <i>Phospholipase D B</i> )
PTA	Ácido fosfotúngstico ( <i>Phosphotungstic Acid</i> )
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SFB	Soro fetal bovino
T1SS	Sistema de secreção do tipo I ( <i>Type I Secretion System</i> )
T2SS	Sistema de secreção do tipo II ( <i>Type II Secretion System</i> )
T4SS	Sistema de secreção do tipo IV ( <i>Type III Secretion System</i> )
T6SS	Sistema de secreção do tipo VI ( <i>Type VI Secretion System</i> )
Tle	Lipase efetora do tipo VI ( <i>Type VI lipase effector</i> )
Tli	Proteína de imunidade de lipase do tipo VI ( <i>Type VI lipase immunity</i> )
TLR	Receptor do tipo Toll ( <i>Toll-like Receptor</i> )
UFC	Unidade formadora de colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.1:</b>	Fosfolipases D na virulência bacteriana.....	<b>36</b>
--------------------	--	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Distribuição global de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de KPC...	22
<b>Figura 1.2</b>	Representação da estrutura de lipopolissacarídeo (LPS)	25
<b>Figura 1.3</b>	Modelo de síntese da cápsula através do mecanismo dependente de Wzy.....	29
<b>Figura 1.4</b>	A cápsula de <i>K. pneumoniae</i> e sua relação com o sistema imunológico.....	30
<b>Figura 1.5</b>	Sistema de Secreção de Tipo VI	32
<b>Figura 1.6</b>	Sítios de clivagem das fosfolipases	33
<b>Figura 1.7</b>	Região do T6SS codificadora de possíveis PLDs no genoma de Kp52.145.	37
<b>Figura 1.8</b>	Esquema representativo de domínios e sítios ativos da proteína PLD <sup>kp</sup> de Kp52.145	38
<b>Figura 1.9</b>	Envolvimento da PLD <sup>kp</sup> na virulência de <i>K. pneumoniae</i>	39
<b>Figura 4.1</b>	Viabilidade de células RAW 264.7 por ensaio de redução do MTT	52
<b>Figura 4.2</b>	Representação temporal do monitoramento da interação patógeno-hospedeiro	53
<b>Figura 4.3</b>	Representação esquemática da estratégia de quantificação da taxa de adesão e internalização bacteriana a células RAW 264.7 por citometria de fluxo	54
<b>Figura 4.4</b>	Adesão de cepas de <i>K. pneumoniae</i> a macrófagos RAW 264.7 após 1 hora de interação	55
<b>Figura 4.5</b>	Internalização de <i>K. pneumoniae</i> por macrófagos em período de 1 hora.....	57
<b>Figura 4.6</b>	Percentual de sobrevivência de cepas de <i>K. pneumoniae</i> internalizadas por macrófagos 2.5 horas após a infecção.....	58

<b>Figura 4.7</b>	Sobrevivência de cepas de <i>K. pneumoniae</i> internalizadas por macrófagos, 24 horas após a infecção.....	<b>59</b>
<b>Figura 4.8</b>	Escape de <i>K. pneumoniae</i> da fagocitose por macrófagos, 24 horas após a infecção.....	<b>60</b>
<b>Figura 4.9</b>	Imagens de topografia 3D de cepas de <i>K. pneumoniae</i> visualizadas por Microscopia de Força Atômica .....	<b>63</b>
<b>Figura 4.10</b>	Microscopia de estruturas de superfície de cepas de <i>K. pneumoniae</i> visualizadas por contrastação negativa em microscopia eletrônica de transmissão .....	<b>64</b>
<b>Figura 4.11</b>	Perfil de extrato proteico total .....	<b>66</b>
<b>Figura 4.12</b>	Perfis de expressão de proteínas de membrana externa .....	<b>67</b>

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA PLD<sup>kp</sup> NA VIRULÊNCIA DE *Klebsiella pneumoniae*

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Mayara de Mattos Lacerda de Carvalho**

*Klebsiella pneumoniae* é uma enterobactéria responsável por uma grande diversidade de infecções, tanto em ambientes nosocomiais quanto na comunidade. Essas infecções representam hoje um grande desafio à saúde pública, visto que cepas resistentes a múltiplos antibióticos estão circulando por todo o mundo, inclusive no Brasil. A compreensão dos mecanismos associados à virulência é de grande interesse para o entendimento da causa e agravamento da doença, assim como das possibilidades de futura interferência nesse processo, por exemplo para o desenvolvimento de alternativas aos antibióticos como os inibidores de virulência. Recentemente foi descrito que um mutante no gene *pld*, que codifica uma proteína da família fosfolipase D, é avirulento em modelo de pneumonia em camundongos. PLDs de diversas bactérias patogênicas Gram-negativas têm sido descritas como envolvidas em interações bactéria-bactéria e bactéria-hospedeiro, atuando na toxicidade, invasão e/ou escape celular. Contudo, o papel da PLD<sup>kp</sup> na virulência ainda não é conhecido. Assim, neste trabalho estudamos o papel da PLD<sup>kp</sup> na interação com macrófagos murinos. Foi observado que a PLD<sup>kp</sup> não possui atividade citotóxica neste tipo celular, e não afeta as taxas de adesão ou internalização bacteriana. Contudo, os resultados indicam que a PLD<sup>kp</sup> influencia a sobrevivência e escape bacteriano da fagocitose pelos macrófagos. Para explicar de que forma a PLD<sup>kp</sup> afeta a sobrevivência bacteriana em macrófagos, foram analisadas diferenças estruturais entre bactérias selvagem e mutante, tais como: expressão de proteínas totais, perfil de proteínas de membrana externa e cápsula polissacarídica. Por microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de transmissão, foi mostrado que a cepa *pld* apresenta uma estrutura capsular mais frouxa e menos ramificada do que a cepa selvagem. Considerando que a cápsula polissacarídica é determinante para a virulência de *K. pneumoniae*, acreditamos que o papel da PLD<sup>kp</sup> na virulência é mediado pela cápsula. Também foram observadas diferenças no perfil de expressão de proteínas de membrana externa. Dentre as bandas diferencialmente expressas entre selvagem e mutante *pld*, possivelmente está a porina OmpK36. O mutante *pld* apresenta maiores níveis dessa proteína. A presença de OmpK36 têm sido associada a uma menor resistência à antibióticos e maior susceptibilidade a morte por opsonização. Além disso, a falta de OmpK36 também é responsável pela diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Desse modo, acreditamos que a proteína PLD é capaz de alterar a composição de proteínas de membrana externa e a presença elevada de OmpK36 no mutante *pld* pode fazer com que essa bactéria seja mais reconhecida por mecanismos do sistema imune inato e eliminada mais facilmente. Como perspectivas, pretendemos futuramente elucidar de que forma a atividade bioquímica da PLD<sup>kp</sup> poderia afetar a composição de proteínas de membrana externa e a interação entre os polissacarídeos capsulares e a membrana plasmática bacteriana.

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF PLD<sup>kp</sup> PROTEIN IN THE VIRULENCE OF *Klebsiella pneumoniae*

### ABSTRACT

Mayara de Mattos Lacerda de Carvalho

*Klebsiella pneumoniae* is an enterobacterium responsible for a wide variety of nosocomial and community-acquired infections. These infections represent a significant public health challenge, as multiple antibiotic-resistant strains are circulating throughout the world, including in Brazil. Therefore, there is an urgent need for research and development of therapeutical alternatives. The comprehension of virulence-associated mechanisms is of great interest for the understanding of the origin and for raising possibilities of future interference in such process. Recently it has been described that a *pld* gene mutant, which encodes a phospholipase D family protein, is avirulent in a mouse pneumonia model. Bacterial PLDs, specially from Gram-negatives, have been implicated in bacteria-bacteria and host-bacteria interactions, involved in toxicity, invasion and/or cellular escape. However, the role of PLD<sup>kp</sup> in virulence is not yet disclosed. Thus, in this work, the role of PLD<sup>kp</sup> in the interaction of *K. pneumoniae* with murine macrophages was studied. It has been observed that PLD<sup>kp</sup> does not have cytotoxic activity in this cell type, nor affects bacterial adhesion or internalization rates. However, it seems that PLD<sup>kp</sup> affects bacterial survival and escape from phagocytosis. To explain how this process occurs, structural differences between wild-type and mutant bacteria were analyzed, such as the expression of total and outer membrane proteins and polysaccharide capsule. By atomic force microscopy and transmission electron microscopy, it was observed that the *pld*- strain presents a looser and less branched capsular structure than the wild-type strain. Considering the fundamental role of the polysaccharide capsule in *K. pneumoniae* pathogenesis, we believe that the role of PLD<sup>kp</sup> in virulence is mediated by the capsule. Differences in outer membrane proteins expression profile were also observed. Among the differentially expressed proteins between wild-type and *pld* mutant strains, possibly there is the OmpK36 porin. The *pld* mutant present higher levels of this protein. The presence of OmpK36 has been associated with a lower resistance to antibiotics and a greater susceptibility to death by opsonization. In addition, the lack of OmpK36 is also responsible for a decrease in the production of pro-inflammatory cytokines. Thus, we believe that PLD<sup>kp</sup> protein is capable of altering the composition of outer membrane proteins. The elevated amount of OmpK36 in the *pld* mutant may let this bacterium more vulnerable to innate immune system and consequently be more easily eliminated. As perspectives, we intend to elucidate how the biochemical activity of PLD<sup>kp</sup> could affect the composition of outer membrane proteins and the interaction between capsular polysaccharides and bacterial membrane.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O gênero *Klebsiella*

*Klebsiella* spp são procariotos pertencentes ao filo Proteobacteria, da classe das Gammaproteobacterias e ordem Enterobacteriales (1). Sua família é a Enterobacteriaceae, um grupo bastante amplo e heterogêneo de bacilos Gram-negativos, composto por gêneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, sendo a família Enterobacteriaceae a mais frequentemente cultivada em laboratórios (2). *Klebsiella* foi nomeada no ano de 1885 por Trevisan em homenagem a Edwin Krebs, um microbiologista alemão. A primeira espécie de *Klebsiella* descrita foi um bacilo encapsulado de um paciente com rinoscleroma, de acordo com Von Frisch em 1882, sendo chamado de *Klebsiella rinoscleroma* por Trevisan no ano de 1887 (1,3).

Inicialmente, a classificação das espécies de *Klebsiella* foi baseada em seu local de isolamento, ou em características patogênicas, e só posteriormente de acordo com suas atividades bioquímicas. Finalmente, devido aos avanços da biologia molecular, foi permitida a identificação de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia das espécies pertencentes a este gênero. Desse modo, o gênero *Klebsiella* é formado atualmente por oito espécies: *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella mobilis*, *Klebsiella variicola* e *Klebsiella pneumoniae* (1). Esta última contém três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*; *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rinoscleromatis* (4).

O gênero *Klebsiella* é ubíquo e compreende espécies que podem ser encontradas em uma gama ampla de ambientes, como em águas doce e salgada, esgotos, solos e plantas atuando como fixador de nitrogênio, por exemplo. Além disso, *Klebsiella* está associada a superfícies mucosas e ao trato gastrointestinal de mamíferos, tais como cavalos, porcos e o homem. Embora não seja seu ambiente natural, *Klebsiella pneumoniae*, a espécie clínica mais importante do gênero, tem adotado o ambiente hospitalar como um nicho promissor para seu estabelecimento, devido à presença de indivíduos imunocomprometidos, sendo amplamente encontrada em infecções nosocomiais (4).

## 1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Bactérias patogênicas são classificadas em dois tipos: as primárias, que possuem capacidade de infectar indivíduos saudáveis; e as oportunistas, que podem colonizar o indivíduo, ou que estão disseminadas pelo ambiente, mas podem causar infecções quando existe algum nível de comprometimento do sistema imunológico ou mesmo um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, por exemplo (5,6).

*K. pneumoniae* é conhecida por ser um patógeno oportunista que se apresenta em forma de bacilo não móvel, sendo anaeróbico facultativo (7) e medindo de 0.3 por 1.5 µm a 0.4 por 2 µm. Podem estar isolados, em pares, ou em cadeias curtas. Em Ágar EMB (ágar eosina azul de metileno), produz colônias rosadas com centro enegrecido, com consistência mucoide e brilhante devido à grande produção de cápsula (8).

### 1.2.1 *Klebsiella pneumoniae* como patógeno

*K. pneumoniae* é capaz de causar uma grande variedade de doenças em mamíferos. No homem, *K. pneumoniae* é responsável por infecções de trato respiratório, como pneumonia, rinite atrofica e rinoscleroma. *K. pneumoniae* também pode levar a infecções do trato urinário, onde é encontrada como o segundo agente mais comum, ficando atrás apenas de outra bem conhecida enterobactéria, a *Escherichia coli* (4). Meningite, endoftalmite, fascite necrotizante, abscessos de fígado, abscessos prostáticos e hepáticos também são causados por essa bactéria. Tem sido mostrado que *K. pneumoniae* é um dos principais causadores de PLA (abscessos hepáticos piogênicos) em países asiáticos, e que cepas isoladas de PLA são aptas a atravessar o epitélio transcelularmente, o que pode levar o patógeno a atingir outros compartimentos anatômicos (9). *K. pneumoniae* também está relacionada à septicemia, principalmente em neonatos. Em um estudo realizado no Irã, foi visto que 16% dos casos de bacteremia em recém nascidos de 0 a 30 dias era causado por *K. pneumoniae* e que a taxa de mortalidade era de 66.6% (10). Essa espécie é responsável por cerca de 80% das infecções clínicas causadas pelo gênero *Klebsiella*, considerado o mais importante dentro do grupo das Enterobacteriaceas (11). O *Institute of Surgical Research Burn Center* indica que *K.*

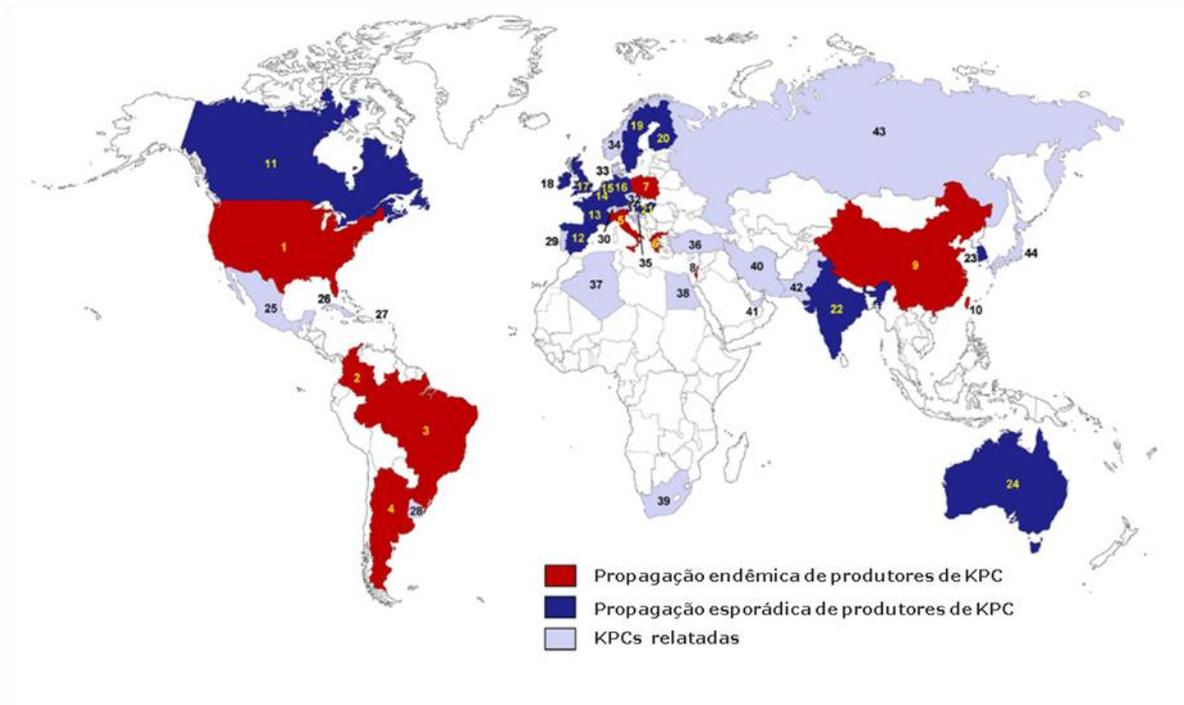
*pneumoniae* é uma das espécies mais comumente recuperadas de pacientes recém admitidos, ressaltando a possibilidade de transmissão no interior de ambientes nosocomiais (12).

### 1.2.2 Resistência antimicrobiana

As infecções por bactérias resistentes a múltiplas drogas são responsáveis por centenas de milhares de mortes por ano em todo o mundo. Estudos mostram que esse número pode chegar a mais de 10 milhões de mortes no ano de 2050. A Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou a resistência antimicrobiana como um dos maiores desafios atuais à saúde humana (13). Em fevereiro de 2017, a OMS emitiu uma nota elencando quais são os patógenos com prioridade para o desenvolvimento de novos antibióticos, a fim de servir como um guia para grupos de pesquisa e desenvolvimento. A lista destaca em particular, como prioridade para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, bactérias Gram-negativas resistentes a uma ampla gama de antibióticos, tendo como grupo principal as enterobacteriaceas, como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, e *Proteus* (14).

*K. pneumoniae* é produtora de uma das principais enzimas de resistência produzidas por enterobactérias, as carbapenemases. As carbapenemases podem ser classificadas de acordo com a sua dependência de cátions divalentes para a ativação enzimática em metalo-carbapenemases (classe B - dependente de zinco) e não-metalo-carbapenemases (A, C e D - classes independentes de zinco) (15). As carbapenemases são enzimas capazes de hidrolisar praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos incluindo os carbapenêmicos, uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções multiresistentes (16). A *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) é uma enzima  $\beta$ -lactamase independente de zinco, classificada como classe A, e que está entre as enzimas com maior importância clínica atualmente. Até o momento, 22 variantes das KPCs foram descritas, sendo a KPC2 e KPC3 as mais comumente identificadas e as mais bem caracterizadas (15,17).

Descrita inicialmente nos Estados Unidos em um hospital da Carolina do Norte em 1996, a KPC é uma enzima  $\beta$ -lactamase que tem sido identificada em diversos países ao redor do mundo (Figura 1), inclusive na América Latina, onde no ano de 2006, as primeiras cepas produtoras de KPC foram identificadas na Colômbia, Argentina e Brasil. Dados do programa de vigilância SENTRY mostram que entre 2008 e 2010, Argentina e Brasil registraram um aumento na incidência de cepas produtoras de KPC (16).



**Figura 1.1: Distribuição global de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC.** Em vermelho estão indicados os países onde foi relatada a propagação endêmica de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC. Já em azul escuro estão retratados os países com propagação esporádica. Os países em azul claro reportaram isolamento de cepas de *K. pneumoniae* produtoras da enzima KPC. Áreas em branco não possuem notificação. Em ordem numérica: (1) Estados Unidos; (2) Colômbia; (3) Brasil; (4) Argentina; (5) Itália; (6) Grécia; (7) Polônia; (8) Israel; (9) China; (10) Taiwan; (11) Canadá; (12) Espanha; (13) França; (14) Bélgica; (15) Netherlands; (16) Alemanha; (17) Reino Unido; (18) Irlanda; (19) Suécia; (20) Finlândia; (21) Hungria; (22) Índia; (23) Coreia do Sul; (24) Austrália; (25) México; (26) Cuba; (27) Porto Rico; (28) Uruguai; (29) Portugal; (30) Suíça; (31) Áustria; (32) República Tcheca; (33) Dinamarca; (34) Noruega; (35) Croácia; (36) Turquia; (37) Argélia; (38) Egito; (39) África do Sul; (40) Irã; (41) Emirados Árabes; (42) Paquistão; (43) Rússia; (44) Japão. Adaptado de: (15).

Segundo Pereira e colaboradores, houve uma grande dispersão dos genes KPC em *K. pneumoniae* a partir do ano de 2010 no Brasil. Esse dado é evidenciado pela identificação de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos em diversos hospitais de diferentes estados brasileiros (18). Na cidade do Rio de Janeiro, cepas KPC estão presentes até mesmo no meio ambiente, como por exemplo em praias e rios. Enterobactérias portando o gene *bla<sub>KPC</sub>* foram identificadas na Praia do Flamengo, Baía de Guanabara e no Rio Carioca, que deságua na mesma região (19).

Bactérias produtoras de carbapenemases, como *K. pneumoniae*, permanecem susceptíveis a pouquíssimos antibióticos, tais como colistina e tigeciclina (derivada da minociclina), da classe das polimixinas e glicilciclinas, respectivamente; e um ou mais aminoglicosídeos, como por exemplo a gentamicina. Porém, algumas cepas são resistentes até mesmo a essas drogas (16,20). O alto custo para produção de novos antibióticos, associado ao baixo rendimento comparado a outras drogas, e a alta taxa de surgimento de novos genes de resistência, desestimula as indústrias farmacêuticas a investirem em novos antimicrobianos. Uma forma de contornar a pressão seletiva exercida pelos antibióticos seria não mais utilizar apenas drogas bactericidas ou bacteriostáticas, mas sim impedir a capacidade do microrganismo de causar infecção. Atualmente, os bloqueadores de virulência têm sido discutidos como uma proposta complementar ao desenvolvimento de novos antibióticos (21). Ao bloquear os mecanismos de virulência, o fármaco pode ser bem mais específico à bactéria alvo, diminuindo as chances de resistência e de danos à microbiota do hospedeiro, que possui papel chave para a prevenção de infecções através da modulação de microambientes, competição e repressão da virulência de bactérias patogênicas (22,23). Desse modo, os bloqueadores de virulência parecem ser uma boa aposta para o futuro.

### **1.2.3 Fatores de virulência**

Para entender a diferença entre microorganismos patogênicos e não patogênicos, diversos estudos foram realizados ao longo dos últimos dois séculos. Estes estudos visaram entender quais seriam as características que permitiam um determinado microrganismo ser capaz de se estabelecer no hospedeiro e levar ao adoecimento do mesmo. Os trabalhos mostraram que agentes patogênicos são capazes de expressar fatores determinantes para o sucesso da infecção, já que quando não presentes, a sua virulência é atenuada. Esses componentes que permitem a susceptibilidade e/ou o dano ao hospedeiro causado pelo patógeno são conhecidos como fatores de virulência (24). Mais especificamente, esses fatores de virulência podem influenciar a capacidade da bactéria de aderir, invadir e colonizar tecidos do hospedeiro, evadir respostas do sistema imune, captar nutrientes do meio e/ou competir com outros microrganismos que coabitem o nicho.

Geralmente, fatores de virulência não possuem uma função *tudo-ou-nada*, e podem atuar de forma cooperada, ou mesmo sendo requeridos em momentos diferentes do processo

infeccioso. Além disso, o dano ao hospedeiro pode ser resultante não diretamente do efeito de um componente microbiano, mas sim de uma resposta exacerbada do sistema imunológico (24). Fímbrias, adesinas, lipopolissacarídeos, bombas de efluxo, vesículas de membrana externa, ureases, sideróforos, cápsula, formação de biofilme, sistemas de secreção e toxinas são alguns dos diversos fatores de virulência que *K. pneumoniae* possui (25). Logo abaixo, alguns dos mais importantes fatores de virulência dessa espécie são melhor detalhados.

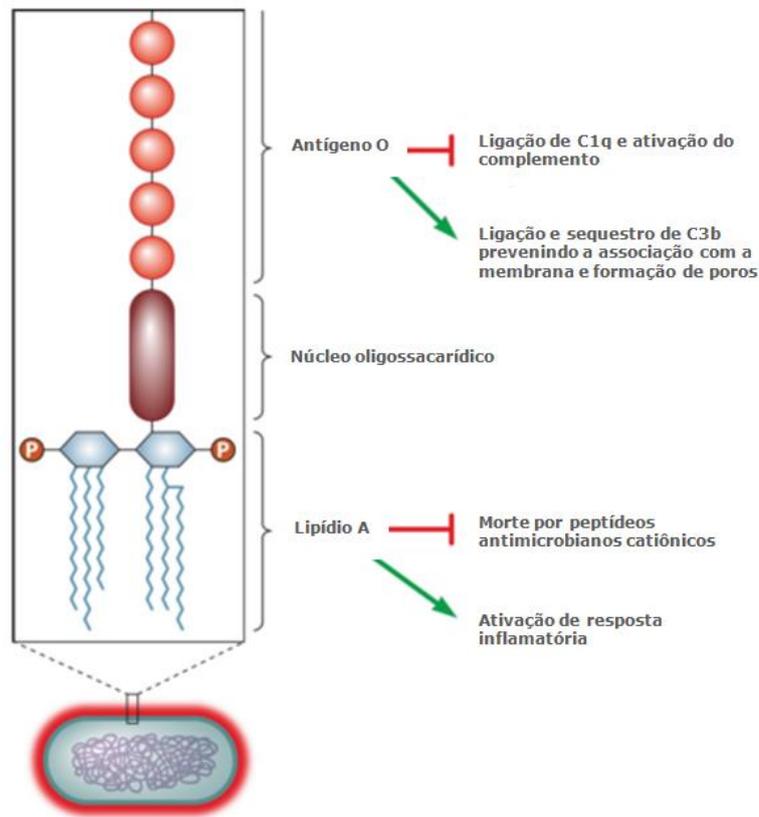
### **1.2.3.1 Biofilmes**

Bactérias podem viver individualmente, de forma livre para se moverem em suspensão, recebendo a denominação de células planctônicas, ou podem ser encontradas em comunidades organizadas aderidas a uma superfície, como em biofilmes (26). Biofilmes são compostos por uma matriz exopolissacarídica liberada por células bacterianas quando estão aderidas em comunidade e podem ser formados por uma ou mais espécies diferentes. Em biofilmes dentários, podem ser encontradas até 500 espécies diferentes. A formação de biofilmes é um processo dividido em estágios, como a adesão inicial, criação de uma microcolônia, formação de um biofilme maduro, e a liberação de células para o meio. Tem sido mostrado que os biofilmes possuem uma grande importância na área médica. Cerca de 65% das infecções nosocomiais estão associadas a formação de biofilmes, visto que permitem a adesão bacteriana a superfícies bióticas e abióticas, incluindo dispositivos médicos como cateteres (27). A formação de biofilme tem sido colocada como um dos importantes estágios para a colonização do trato gastrointestinal por *K. pneumoniae* (28). Biofilmes permitem o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, sendo um mecanismo promotor da persistência. Dentro de um biofilme, células bacterianas se tornam de 10 a 1000 vezes mais resistentes a antimicrobianos, o que decorre não somente de um ambiente controlado, ao qual o acesso ao antimicrobiano é dificultado, mas também de um crescimento mais lento das células em camada profunda (27,28).

### **1.2.3.2 Lipopolissacarídeos**

Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas bacterianas que compõem o folheto externo da membrana celular de bactérias Gram-negativas. O LPS é basicamente composto por um antígeno “O” em sua parte mais externa, um centro de oligossacarídeos, e um núcleo interno formado pelo lipídio “A”, que faz a sua ancoragem à membrana (Figura 2). Foram

identificados até agora, doze diferentes tipos de antígeno “O” de LPS em isolados de *K. pneumoniae*, sendo “O1” o mais comum deles (29).



**Figura 1.2: Representação da estrutura de lipopolissacarídeo (LPS).** A figura representa, em aumento, a estrutura de LPS composta pelo lipídio “A” ancorado na membrana, seguido por seu núcleo oligossacarídico carregando o antígeno “O”. Setas verdes indicam funções ativadas, enquanto linhas vermelhas indicam funções inibidas pelo LPS de *K. pneumoniae*. Adaptado de: (25).

*K. pneumoniae* é conhecida por levar à ativação da via complemento, e o LPS é um dos principais protetores contra a ação do complemento. Cepas que contêm um antígeno “O” longo são mais resistentes à eliminação pelo sistema complemento (25). Porém, essa resistência só ocorre se a cepa em questão possuir uma cápsula de polissacarídeos. Tem sido mostrado que algumas cepas de *K. pneumoniae* usam a cápsula para recobrir o LPS, impedindo assim seu reconhecimento por receptores do tipo *Toll* (30). Apesar de sua defesa contra o sistema imunológico, o LPS também dispara fortemente a produção de citocinas pró-inflamatórias, através da ligação do lipídio “A” a receptores TLR4 (*Toll-like receptor 4*), que vão agir no recrutamento de células como neutrófilos e macrófagos. Porém, algumas bactérias

como *Yersinia* tem o lipídio “A” do seu LPS modificado de modo a não ativar o sistema imune do hospedeiro (25).

### 1.2.3.3 Sideróforos

A aquisição de ferro é essencial para o crescimento da maioria das espécies bacterianas. Em ambientes anaeróbicos, o  $\text{Fe}^{2+}$  é captado por células bacterianas através de porinas ou transportadores ABC. Porém, no hospedeiro, o ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) encontra-se associado a proteínas como transferrinas, lactoferrinas e ferritinas. Obter ferro é um dos grandes desafios para bactérias, protozoários e fungos durante a infecção em mamíferos, porque todo o ferro livre é capturado por essas proteínas ligadoras de ferro. Para que tivessem sucesso durante a infecção, as bactérias tiveram que desenvolver sistemas de captação de ferro, e fez-se necessário que esses sistemas possuíssem mais afinidade do que as proteínas transportadoras do hospedeiro (24,31).

*K. pneumoniae* adquire ferro através da secreção de sideróforos, que são moléculas secretadas pelo patógeno e que possuem maior afinidade por ferro do que as proteínas do hospedeiro. *Klebsiella spp* pode expressar uma grande variedade de sistemas de aquisição de ferro, como as enterobactinas, aerobactinas, yersiniabactina e salmochelinas, bem como heminas e transportadores transferrina (11).

A expressão de sideróforos é regulada em níveis transcricionais de acordo com a quantidade de ferro disponível no ambiente onde o microrganismo se encontra. O papel dos sideróforos na virulência já é bem estabelecido (24). O impedimento da captação de ferro por enterobactinas de *K. pneumoniae* através da Lipocalina 2, um inibidor de enterobactina secretado por células como os neutrófilos, impede o crescimento bacteriano e permite a resolução da infecção pelo sistema imune. Além disso, tem sido mostrado que diferentes tipos de sideróforos podem ser importantes em diferentes estágios e compartimentos anatômicos durante a infecção (25).

### 1.2.3.4 Vesículas de membrana externa

As vesículas de membrana externa (OMVs) são bicamadas esféricas com um diâmetro que varia de 50 a 250 nm (32). Essas vesículas liberadas naturalmente por bactérias Gram-negativas são derivadas da membrana externa bacteriana, portanto tipicamente são

compostas por LPS, proteínas de membrana externa e fosfolipídios de membrana, mas podem também carrear outras moléculas que se encontrem no periplasma bacteriano. Assim, as OMVs são como sistemas de entrega de longa distância que permitem com que as bactérias sejam capazes de disseminar proteínas, lipídios e material genético sem ter a necessidade de aproximação ou contato direto com o alvo, ou seja, elas podem modular o sistema imune ou disparar um efeito citotóxico sem que haja o contato célula-célula (32,33). OMVs de *K. pneumoniae* induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-8 em células epiteliais. Camundongos neutropênicos desafiados com OMVs apresentam severas patologias pulmonares similares às encontradas durante a infecção por *K. pneumoniae* (33).

#### 1.2.3.5 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica bacteriana é uma estrutura de superfície que recobre toda a célula e está fisicamente associada a ela, diferentemente de outros polissacarídeos que são liberados no meio extracelular. Bactérias encapsuladas formam colônias gomosas e brilhantes, enquanto aquelas não encapsuladas possuem colônias de tamanho reduzido e uma textura com aspecto seco. Elas podem ser formadas de até 90% de água, o que requer que o método para análise de ultraestrutura seja bem formulado e cuidadoso. Elas podem ser identificadas por microscopia de luz ou microscopia eletrônica, utilizando anticorpos ou coloração inespecífica. Na microscopia de luz, o material polissacarídico é revelado através de colorações realizadas com tinta nanquim, por exemplo, onde a cápsula bacteriana é identificada como um halo claro ao redor da célula mediante o fundo enegrecido. Em microscopia eletrônica, a visualização é alcançada por diversos preparos, e no caso da eletrônica de transmissão, um contrastante é utilizado (34,35). Recentemente, artigos têm retratado cápsulas bacterianas também através da microscopia de força atômica com o emprego de diferentes métodos de preparo da amostra (36). O primeiro método de marcação da cápsula foi descrito em 1885 por Friedländer e, durante 15 anos, a coloração de cápsulas foi uma das principais formas de identificação de bactérias patogênicas (37,38).

Existem atualmente 79 sorotipos capsulares descritos para *Klebsiella spp*, conhecidos como antígenos K, devido ao método de identificação de sorotipagem, estabelecido e utilizado para a categorização dos diferentes tipos capsulares entre 1929 e 1977. Atualmente, a identificação de tipos capsulares é realizada por métodos de genotipagem molecular, por

meio da caracterização de genes responsáveis pela síntese da cápsula polissacarídica. A região *cps* onde são codificados os genes capsulares é composta por um conjunto de 6 genes - *galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb* and *wzc*. No sentido 5' da região *cps* são codificados genes envolvidos na translocação e processamento de estruturas de superfície bacterianas, altamente conservados entre diferentes tipos capsulares. Já no sentido 3', são encontrados genes como a glicose-6-fosfato desidrogenase (*gnd*) e UDP-glicose-desidrogenase (*ugd*). A região central do locus de *cps* é variável e compreende genes responsáveis pela polimerização e montagem das subunidades da cápsula, sendo considerados essenciais para a identificação de variações de sorotipos capsulares. Primeiramente, o gene *wzy*, que codifica uma polimerase, foi utilizado para esse propósito, sendo atualmente substituído pela sequência de *wzi* (39).

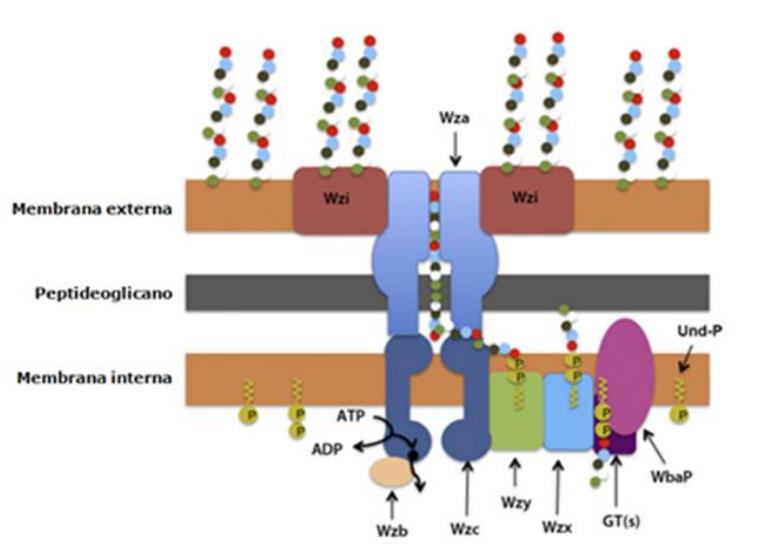
A organização e existência dos genes dentro do locus *cps* definem a estrutura capsular e podem interferir na virulência de espécies desse gênero. A cápsula polissacarídica é considerada o principal fator de virulência em *K. pneumoniae*, e o tipo capsular está relacionado à severidade das infecções (40). Os sorotipos mais virulentos são K1 e K2 porém, além de sua composição de açúcares serem diferentes, nem todas as cepas K1 e K2 são virulentas, o que indica que existem outros fatores que também contribuem para a sua patogenicidade (4,39).

A cápsula polissacarídica é formada a partir de sequências repetidas de unidades de oligossacarídeos que podem ser lineares ou com forma ramificada, possuindo estrutura primária e secundária. Em muitas Gram-negativas, o fim dessa sequência é limitado por uma unidade lipídica, que tem sido considerado como uma âncora da cápsula à superfície da célula bacteriana através de interações hidrofóbicas com a membrana externa. Aparentemente, *Klebsiella* possui ligado ao fim de sua sequência de oligossacarídeos capsulares um núcleo de lipídio "A", que é um típico componente de LPSs de enterobactérias. Cápsulas bacterianas ligadas a um núcleo de lipídio "A" são denominadas K<sub>LPS</sub> (37).

Vários açúcares podem compor a cápsula polissacarídica de *Klebsiella spp*, tais como manose, ramnose, fucose, galactofuranose, glicose e galactose. A composição da cápsula de cepas com sorotipo K2, como da cepa Kp52.145, é de manose (*manCB*) e glicose (*wcaJ*) (39).

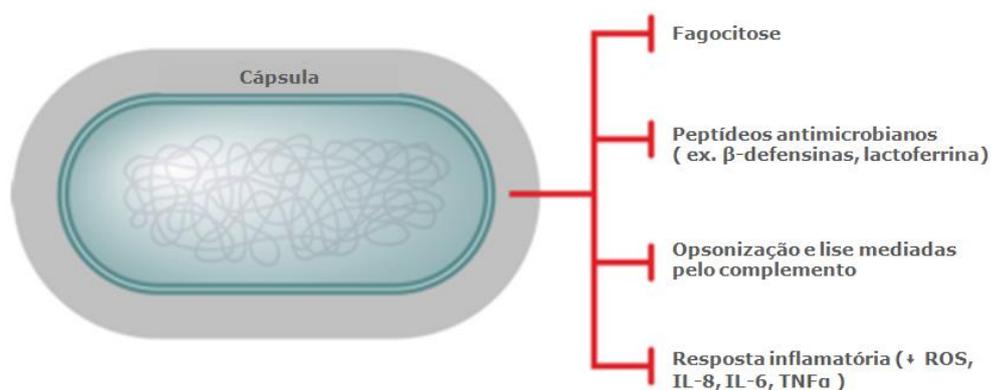
A síntese da cápsula polissacarídica pode ser feita por três diferentes vias, baseadas no modo de elongação e translocação da cadeia. Elas podem ser dependentes de Wzy, dependentes de transportadores ABC ou por uma via dependente de sintase. Existem quatro grupos de classificação para as características capsulares, sendo o grupo 1, onde *Klebsiella* é encontrada, dependente de Wzy (Figura 1.3).

A montagem pelo sistema Wzy se inicia quando a enzima WbaP catalisa uma reação que liga o açúcar inicial a Und-P (undecaprenilfosfato). Em seguida, glicosiltransferases (GTs) adicionam açúcares específicos à extremidade redutora do polímero de oligossacarídeo que está ligado ao suporte lipídico Und-P, formando a unidade de repetição CPS. As unidades de repetição são então transportadas por Wzx através da membrana interna para o periplasma, onde elas são polimerizadas por uma proteína integral de membrana, a Wzy polimerase. Um canal formado por Wzc e Wza é responsável pela translocação para a membrana externa, onde elas são ancoradas por uma proteína integral de membrana, a Wzi polimerase. A atividade de Wzc e Wza é controlada pela autofosforilação e desfosforilação de Wzb tirosina fosfato. Ao final, a cápsula madura é então ancorada à superfície celular por intermédio da proteína Wzi (37).



**Figura 1.3: Modelo de síntese da cápsula através do mecanismo dependente de Wzy.** As unidades de repetição são transportadas para o periplasma por Wzx, onde são polimerizadas por Wzy. Wza e Wzc são responsáveis pela translocação dos polímeros elongados para a membrana externa, onde são ancorados por um mecanismo dependente de Wzi. Adaptado de: (37).

Durante a infecção por *K. pneumoniae*, a cápsula polissacarídica pode conferir diversas vantagens ao patógeno. Ela tem sido considerada como um dos principais fatores de virulência dessa espécie. Estudos têm mostrado que a cápsula fornece proteção contra o reconhecimento e a fagocitose por células do sistema imune. De fato, bactérias não capsuladas são mais fagocitadas que cepas produtoras de cápsula (41). Além disso, diferentemente das cepas produtoras de cápsula, as não encapsuladas induzem maiores níveis de produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, enquanto produtoras de cápsula induzem a produção de citocinas antiinflamatórias como IL-10 e diminuem a de citocinas pró-inflamatórias (42). Tem sido mostrado que cepas encapsuladas de *K. pneumoniae* atenuam a produção de IL-8 induzida por IL-1 $\beta$  por meio da ativação de receptores do tipo NOD. IL-8 é uma importante citocina para a ativação e recrutamento de neutrófilos para a área e eliminação da infecção (43). Embora tradicionalmente seja considerada como um patógeno extracelular, *K. pneumoniae* tem demonstrado ser capaz de invadir culturas de células epiteliais e sobreviver em macrófagos (44,45). Porém, essa habilidade é atenuada em cepas mutantes não produtoras de cápsula. O número de bactérias mutantes capsulares capazes de colonizar o intestino de camundongos é menor que o da cepa selvagem (46) e o mesmo é relatado para outras regiões anatômicas, como a bexiga (41). Tem sido mostrado que *K. pneumoniae* exerce efeito citotóxico contra células de epitélio pulmonar e que cepas mutantes para a produção de cápsula perdem essa capacidade (47). A cápsula polissacarídica também pode ajudar impedindo a interação de peptídeos antimicrobianos produzidos pelo sistema imune, e curiosamente a cápsula tem sua expressão aumentada na presença de antibióticos como polimixina B (48).



**Figura 1.4:** A cápsula de *K. pneumoniae* e sua relação com o sistema imunológico. A bactéria está representada em azul, a cápsula polissacarídica em cinza. Linhas vermelhas indicam funções da resposta imune que são inibidas por cepas de *K. pneumoniae* encapsuladas. Adaptado de: (25)

### 1.2.3.6 Sistemas de secreção

Bactérias têm desenvolvido numerosos mecanismos de transportar proteínas do seu citoplasma para o meio extracelular ou para o interior de outras células, sejam estas procarióticas ou eucarióticas. Uma dessas ferramentas são os sistemas de secreção. Existem diferentes classes de sistemas de secreção bacterianos que foram inicialmente identificados através de evidências genéticas e fenotípicas, e atualmente métodos de imageamento e biologia estrutural têm ajudado a compreender melhor o funcionamento desses sistemas. Sistemas de secreção podem atravessar uma, duas ou até mesmo uma terceira membrana (49). Foram identificados no genoma de *K. pneumoniae* Kp52.145, genes que codificam membros de quatro diferentes sistemas de secreção: sistema de secreção de tipo I (T1SS), sistema de secreção de tipo II (T2SS), de tipo IV (T4SS) e tipo VI (T6SS) (50).

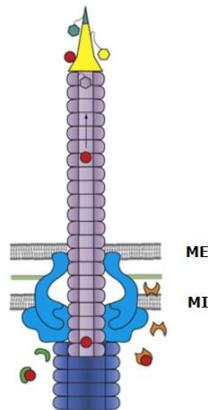
O T1SS transporta substratos em etapa única, através das duas membranas bacterianas. Esse sistema se assemelha aos transportadores ABC, podendo exportar moléculas como antibióticos ou toxinas para fora da célula. O sistema de secreção de tipo II está localizado na membrana externa e transporta proteínas do periplasma para o meio extracelular. Já o sistema de secreção de tipo IV é um complexo macromolecular que pode transportar um substrato tanto pela membrana interna quanto pela membrana externa, podendo ainda alcançar uma terceira membrana, liberando proteínas para o citoplasma da célula hospedeira ou mesmo uma bactéria alvo. O T4SS é capaz de transferir proteínas únicas, DNA, ou mesmo complexos proteína-proteína ou proteína-DNA (49).

#### 1.2.3.6.1 Sistema de Secreção do Tipo VI

O T6SS é um sistema descrito em 2006, em *Vibrio cholerae* por Pukatzki e colaboradores (51). Esse sistema está presente entre 25% das bactérias Gram-negativas e contribui diretamente para a virulência de algumas bactérias patogênicas, como por exemplo *V. cholerae*, *Burkholderia thailandensis* e *Pseudomonas aeruginosa* (52). Um conjunto de 13 proteínas se mostra essencial para a montagem desse sistema, mas ele também é composto de proteínas acessórias e efetores que podem facilitar ou conferir novas funções ao sistema. A estrutura do T6SS lembra a cauda de bacteriófagos e está ancorada ao envelope celular

através de um complexo associado à membrana interna (52–54). O T6SS é formado por um tubo de Hcp que é montado no citoplasma bacteriano. Ao redor do tubo de Hcp existem proteínas VipA e VipB que se contraem de forma que o tubo é empurrado para fora das membranas bacterianas levando consigo seus efetores, podendo alcançar uma terceira membrana. A montagem e remontagem do tubo é mediada pela ATPase ClpV (52).

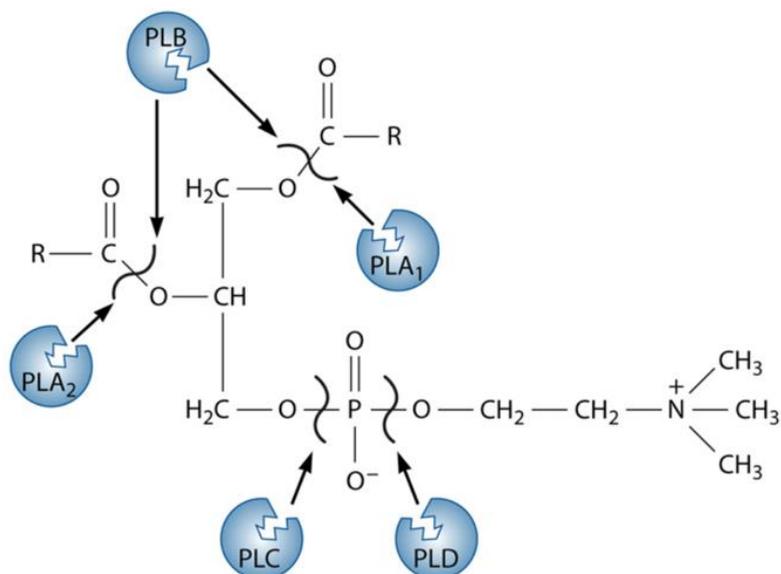
Uma das características desse sistema é a secreção das proteínas Hcp (*hemolysin co-regulated protein*) e VgrG (*Valine Glycine repeat protein*). Hcps são proteínas que formam anéis hexaméricos de cerca de 80-90 Å com diâmetro central medindo de 35-40 Å que podem comportar tanto uma proteína desenovelada quando enovelada. A união entre os anéis de Hcp pode acontecer por ligações cabeça-cauda, cauda-cauda ou cabeça-cabeça levando a formação de um tubo (55). A proteína VgrG é encontrada na ponta desse tubo. O recrutamento da proteína VgrG para o complexo protéico da base aumenta a eficiência de formação do tubo de Hcp (56). Proteínas Hcp e VgrG são encontradas no sobrenadante de cultura apenas quando o sistema é composto por ambas. Ao analisar o sobrenadante de culturas de cepas *hcp<sup>-</sup>*, a proteína VgrG não é encontrada. A situação reversa também acontece, indicando que a presença da proteína VgrG em conjunto à Hcp é essencial para o funcionamento do sistema (53,57,58).



**Figura 1.5: Sistema de Secreção de Tipo VI.** Em roxo é representado o tubo central do sistema formado por anéis hexaméricos de Hcp. O triângulo amarelo representa a proteína VgrG. Os círculos vermelhos são proteínas secretadas pelo sistema que terão ação sobre a célula alvo, conhecidas como efetores. Em laranja estão representadas proteínas complementares ao efector que conferem imunidade. Em verde, chaperonas. O complexo de base está em azul claro e em azul escuro estão as proteínas que compõem a bainha, VipA/VipB. ME= membrana externa. MI= membrana interna. Adaptado de (59).

### 1.2.3.7 As fosfolipases

Fosfolipases são enzimas que têm sido identificadas em mamíferos, fungos, vírus, plantas e bactérias (60). As fosfolipases são esterases lipolíticas que clivam os glicerofosfolipídios, os principais lipídios estruturais de membrana. Os glicerofosfolipídios contêm dois ácidos graxos esterificados, um esqueleto de glicerol e um grupamento de cabeça polar, que definem à qual classe de fosfolipídeos eles pertencem. As fosfolipases podem ser classificadas em PLA, PLB, PLC e PLD, de acordo com o seu local de clivagem do substrato (Figura 1.6) (61).



**Figura 1.6: Sítios de clivagem das fosfolipases.** PLA<sub>1</sub> remove o ácido graxo da posição *sn*-1 do glicerol, já PLA<sub>2</sub> remove na posição *sn*-2. PLBs podem hidrolisar ambas as reações nos grupamentos acil de glicerofosfolipídios. PLC hidrolisa a ligação fosfodiéster orientada ao glicerol, liberando um diacilglicerol e um grupamento de cabeça fosforilado. PLDs clivam a ligação fosfodiéster orientada ao álcool, liberando o grupamento de cabeça. Adaptado de (61).

### 1.2.3.7.1 Fosfolipases D na virulência bacteriana

Enzimas membros da família fosfolipase D (PLD) eram inicialmente designadas por sua habilidade de hidrolisar fosfatidilcolina (PC), no entanto, com o avanço na área de bioinformática e sequenciamento genômico, a superfamília PLD tem crescido e incluído proteína com outras atividades bioquímicas (62). Atualmente, a classificação de proteínas da família PLD é baseada principalmente na conservação do motivo catalítico HxKx<sub>4</sub>D (62). As fosfolipases D bacterianas compreendem até quatro classes de proteínas com funções distintas, como a verdadeira fosfolipase, a cardiolipina sintetase, fosfatidilserina sintetase e endonucleases (63).

Proteínas da família fosfolipase D têm sido correlacionadas à virulência bacteriana. PLDs expressas por procariotos possuem uma ampla gama de funções que vão desde hidrolisar as cadeias de DNA, manipular vias do hospedeiro através de interações proteína-proteína, além da clássica função de lipase. Algumas dessas têm sido associadas com sistemas de secreção bacterianos, como o T6SS (*Type VI Secretion System*), onde agem como efetores secretados por esse sistema, conhecidos como Tle (*Type VI lipase effectors*) (59). As lipases possuem cinco famílias divergentes (Tle 1-5) que não possuem homologia de sequência. No entanto, em Gram-negativas, as famílias são reunidas através de seus motivos conservados. As lipases efetoras de 1-4 exibem o motivo catalítico GxSxG, comum para estearases, com função de fosfolipases A<sub>1</sub> ou A<sub>2</sub>. Já a quinta (Tle5) possui dois motivos HxKx<sub>4</sub>D conservados, encontrados em enzimas fosfolipases D (64).

Tle1-5 são codificadas adjacentes a proteínas de imunidade, conhecidas como Tli1-5 (*Type VI lipase immunity*) (65). Essas proteínas são essenciais para proteger o próprio patógeno contra os efeitos dos efetores do sistema de secreção através de um mecanismo de inativação direto. Sendo assim, a localização à qual a proteína de imunidade é direcionada, indica o compartimento celular visado pela proteína efetora. Análises genômicas têm mostrado que algumas proteínas de imunidade são proteínas periplasmáticas, assim reforçando a ideia de que essas lipases efetoras possuem um papel na competição interbacteriana, visando fosfolipídeos acessíveis a partir do periplasma, no caso de bactérias Gram-negativas (64).

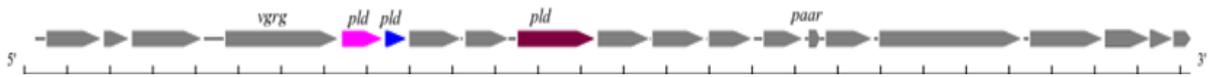
Proteínas fosfolipases D não são comumente expressas em bactérias, como ocorre com outras classes de fosfolipase. Porém, PLDs têm sido cada vez mais observadas em bactérias patogênicas, geralmente Gram-negativas intracelulares obrigatórias, para facilitar a invasão celular e replicação no hospedeiro (60). Na tabela abaixo estão descritas algumas bactérias produtoras de fosfolipases D e seu envolvimento na virulência:

**Tabela 1.1: Fosfolipases D na virulência bacteriana.** Fosfolipases D de espécies bacterianas distintas possuem ação tanto contra procariotos quanto células eucarióticas e podem ser secretadas por sistemas de secreção.

<b>Fosfolipase</b>	<b>Espécie</b>	<b>Secretada</b>	<b>Ação</b>	<b>Ref.</b>
<b>PldA</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H2-T6SS	Competição interbacteriana Modulação lipídica Internalização por modulação de PI3K-Akt Sobrevivência <i>in vivo</i>	(66)
<b>PldB</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H3-T6SS	Competição interbacteriana Modulação lipídica Internalização por modulação de PI3K-Akt	(66,67)
<b>NgPLD</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	?	Adesão Invasão por ligação a Akt e remodelamento de actina Modulação lipídica	(68)
<b>LpdA</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	T6SS	Hidrolisa PIP3, PIP4, PG e PA Rompimento do complexo de Golgi Envolvimento com Rabs	(61,69)
<b>PLD</b>	<i>Rickettsia prowazekii</i>	?	Citotoxicidade Escape fagossomal	(70,71)
<b>Ymt</b>	<i>Yersinia pestis</i>	?	Hidrolisa PC, PE e outros Colapso vascular e falha cardíaca Sobrevivência e transmissão <i>in vivo</i>	(72,73)
<b>3 PLDs</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	?	Invasão Disseminação sanguínea	(60,61)
<b>PLD</b>	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	?	Dispara resposta imune para a produção de placas de ateroma	(61)

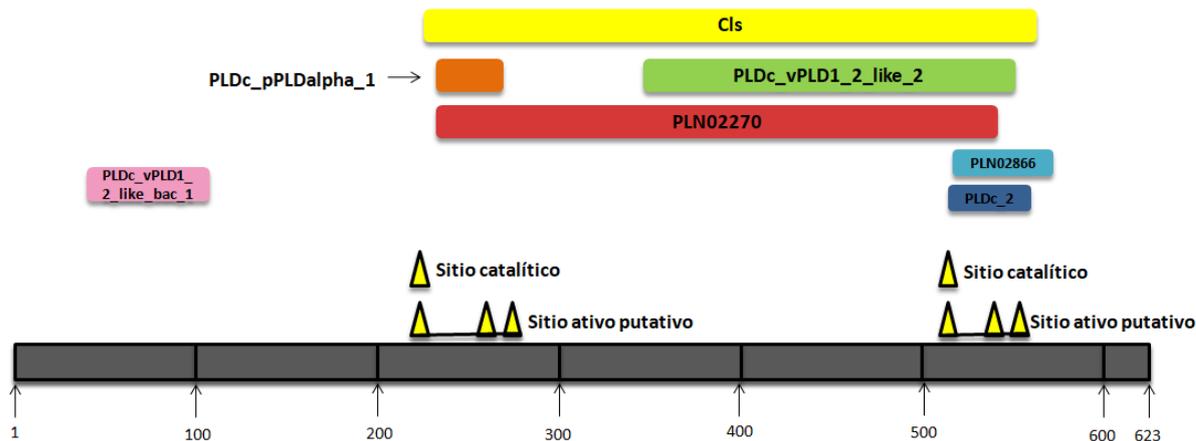
### 1.2.3.7.2 Fosfolipase D hipotética de Kp52.145

Dentro do genoma de *K. pneumoniae* Kp52.145 foram encontradas três regiões diferentes para o T6SS. Em uma delas, a terceira, existem genes adjacentes conservados como *imcF/impG/impH* e *impJ/ompA/vgrG*. Entre essas duas sequências, nove genes estão inseridos e codificam uma proteína hipotética, cinco lipoproteínas contendo repetições de Sell1 e três possíveis proteínas Fosfolipases D. Um dos quadros de leitura codifica uma proteína fosfolipase D (PLD<sup>KP</sup>) completa (BN49\_RS18775) com 623 aminoácidos. A frequência de distribuição clonal deste gene *pld* em *K. pneumoniae* (3082 genomas analisados) é de 8%. Outros dois genes nesta mesma região codificam partes complementares de proteínas da família fosfolipase D, sendo um gene que codifica uma região C-terminal (BN49\_RS29980, 187 a.a.) e o outro uma N-terminal (BN49\_RS2985, 335 a.a.).



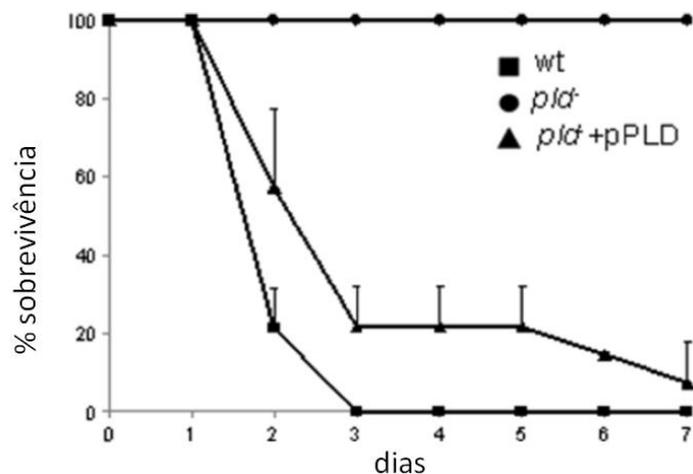
**Figura 1.7: Região do T6SS codificadora de possíveis PLDs no genoma de Kp52.145.** Em cinza, estão representados genes associados ao T6SS hipotético, com destaque para o gene que codifica a proteína VgrG e para a PAAR, componentes estruturais da ponta do sistema que podem carrear efetores. Nas demais cores estão representados genes que codificam para proteínas que contém domínios de fosfolipase D, sendo: rosa um gene que contém apenas a região N-terminal de fosfolipase D, azul apenas a região C-terminal de fosfolipases D e em vinho um gene que codifica uma fosfolipase D completa, a PLD<sup>KP</sup> (BN49\_RS18775), que é objeto de estudo deste trabalho. Traços indicam distância de 1 kb.

A proteína completa (PLD<sup>KP</sup>) de Kp52.145 exhibe similaridade de sequência com fosfolipases D de outras espécies, na região do motivo conservado de fosfolipase D (HxKx<sub>4</sub>D).



**Figura 1.8:** Esquema representativo de domínios e sítios ativos da proteína PLD<sup>kp</sup> de Kp52.145. A barra em cinza representa a sequência da proteína PLD<sup>kp</sup> com 623 a.a. Triângulos amarelos representam as posições dos resíduos que compõem os sítios catalíticos e sítios ativos HxKx<sub>4</sub>D. Em rosa, uma região de similaridade com o domínio de PLD<sub>1</sub> e PLD<sub>2</sub> de vertebrados (cd09140). Em amarelo, está indicado o domínio Cls, presente em cardioplipina sintases (COG1502), em laranja o domínio catalítico de fosfolipase D do tipo alfa de plantas (cd09197), em verde o domínio catalítico de PLD<sub>1</sub> e PLD<sub>2</sub> (cd09105), em vermelho, fosfolipase D alfa (Banco de dados PLN02270). Em azul, fosfolipase D (Banco de dados PLN02866). Em azul marinho está representado um domínio do tipo PLD (Banco de dados pfam13091). Informações obtidas no *Conserved Domains Database* do *NCBI*.

Já foi caracterizado que esses três genes que codificam proteínas fosfolipase D são expressos quando a bactéria cresce em meio GTCS (*Trypto Casein Soy broth medium* - Meio Tripto Caseína de Soja) por 4 horas, bem como em pulmões de camundongos Balb/c infectados por 24 horas (50). Para averiguar se a PLD<sup>kp</sup> tem envolvimento na virulência de Kp52.154, camundongos foram infectados intranasalmente com 10<sup>8</sup> células tanto da bactéria selvagem, quanto de uma mutante no gene que codifica a PLD<sup>kp</sup> e também uma cepa mutante *pld* complementada com o gene *pld*. Enquanto a cepa selvagem levou todos os camundongos à morte ao terceiro dia de experimento, a cepa mutante *pld* se mostrou completamente avirulenta (Figura 1.9). Desse modo, fica clara a importância da proteína PLD<sup>kp</sup> na virulência de *K. pneumoniae*, porém seu mecanismo de ação ainda precisa ser investigado (50).



**Figura 1.9: Envolvimento da PLD<sup>kp</sup> na virulência de *K. pneumoniae*.** O gráfico mostra a sobrevivência de camundongos infectados com a cepa selvagem (*wt*), uma mutante *pld*<sup>-</sup> e a cepa complementada (*pld*<sup>-</sup> + pPLD) durante o período de sete dias. Adaptado de: (50)

Para averiguar se a PLD<sup>kp</sup> possui atividade antibacteriana, Lery e colaboradores realizaram ensaios de competição interbacteriana. A cepa selvagem Kp52.145 ou a mutante *pld*<sup>-</sup> foram crescidas e misturadas na proporção 5:1 com a cepa de *E. coli* MG1655, para que houvesse a interação bacteriana. A mistura foi incubada por 4 horas. As células foram recuperadas e plaqueadas em meio seletivo de modo a obter o número de bactérias sobreviventes. Os ensaios mostraram que nem a cepa selvagem Kp52.145, ou a mutante *pld*<sup>-</sup> possuem atividade antibacteriana, sugerindo que sua implicação na virulência dessa cepa se dá por outras vias (50). Ensaios realizados por cromatografia de camada fina mostram que a cepa mutante *pld*<sup>-</sup> possui alterações no conjunto lipídico quando comparada à cepa selvagem. Cepas de *E. coli* SD9 deficientes em fosfatidilserina e cardiolipina foram transformadas com um plasmídeo carreando o gene *pld*. A análise dos perfis lipídicos da cepa selvagem SD9 e da cepa complementada revelou diferenças. Por espectrometria de massas e pelo banco de dados LipidMaps, foi identificado que o conjunto lipídico que estava presente na cepa selvagem, mas não na complementada com o gene *pld*, era fosfatidilglicerol (PG). Isso indica que a proteína PLD de Kp52.145 pode ter a função de cardiolipina sintetase, convertendo moléculas de fosfatidilglicerol em glicerol e cardiolipina ou catalisando a reação oposta (50). Já tem sido mostrado que existe um aumento da presença de cardiolipina nos pulmões de camundongos e humanos durante a pneumonia, o que atrapalha a função surfactante, a mecânica pulmonar, a modulação da sobrevivência celular além de sua rede de citocinas (74). Assim, a influência da

proteína PLD de Kp52.145 pode estar relacionada tanto a alterações de componentes bacterianos, quanto à modulação de células eucarióticas na interação patógeno-hospedeiro.

Considerando as informações sobre PLDs de outras espécies junto com as informações sobre a PLD<sup>kp</sup> descritas na literatura, acreditamos que a PLD<sup>kp</sup> possa ser uma proteína secretada por *K. pneumoniae* e que tenha atividade tóxica ou modulatória sobre células do hospedeiro. Assim, pretendemos neste estudo avaliar essa hipótese, visando caracterizar o papel da PLD<sup>kp</sup> na virulência bacteriana.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo avaliar o envolvimento da proteína PLD<sup>kp</sup> da cepa Kp52.145 de *Klebsiella pneumoniae* na patogênese bacteriana, caracterizando sua função mediante à interação com macrófagos murinos e correlacionando-a à expressão de outros fatores de virulência apresentados por essa cepa.

### 2.2 Objetivos específicos:

- 1) Determinar se a PLD<sup>kp</sup> possui atividade citotóxica sobre macrófagos murinos;
- 2) Determinar se a PLD<sup>kp</sup> influencia a adesão de *K. pneumoniae* à superfície de macrófagos;
- 3) Verificar se a PLD<sup>kp</sup> afeta a taxa de internalização e sobrevivência bacteriana em macrófagos;
- 4) Identificar se a PLD<sup>kp</sup> contribui para o escape bacteriano da fagocitose por macrófagos;
- 5) Caracterizar se a expressão da PLD<sup>kp</sup> altera de forma global o perfil de expressão de proteínas totais e proteínas de membrana externa bacterianas;
- 6) Caracterizar a relação entre PLD<sup>kp</sup> e estruturas de superfície bacterianas, em especial a cápsula polissacarídica.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas Utilizadas

Macrófagos RAW 264.7 representam uma linhagem de células sanguíneas aderentes obtidas de camundongos *Mus musculus* BALB/c transformadas pelo vírus de leucemia murina de Abelson, segundo o banco de células norte americano ATCC (*American Type Culture Collection* - Manassas, Virgínea- USA).

CIP52.145 de *Klebsiella pneumoniae* é um isolado de sorotipo K2 derivado da cepa de referência B5055. É uma cepa que carrega importantes fatores de virulência, tais como um plasmídeo contendo o gene *rmpA*, regulador do fenótipo mucóide e um *cluster* de aerobactinas, sendo altamente virulenta (32). *wca* é um mutante capsular de Kp52.145 (75) e *pld* é um mutante no gene que codifica a proteína PLD<sup>kp</sup> (50) .

##### 3.1.1 Cultivo de Células RAW 264.7

As células utilizadas neste trabalho foram adquiridas do banco de células da ATCC e mantidas congeladas em nitrogênio líquido em criotubos com 10% de DMSO (dimetil sulfóxido – *Sigma Chemical Company*) em soro fetal bovino com  $1 \times 10^6$  células. O descongelamento foi realizado por imersão da parte inferior do criotubo de células em banho-maria a 37°C até que o conteúdo se mostre completamente líquido, consistindo em um modo de descongelamento rápido. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 – (*Roswell Park Memorial Institute, LGC Biotecnologia*) suplementado com 10% de SFB - soro fetal bovino (*Cripion Biotecnologia LTDA*).

Para iniciar o cultivo, as células foram descongeladas e o conteúdo do criotubo foi pipetado em 9 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C em 300 x g (*CS-6R centrifuge Beckman*) para a retirada do crioprotetor DMSO e então ressuspensas em meio novo completo (RPMI 1640+ SFB). A incubação foi realizada a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em garrafas de cultura (*KASVI*) que possuem fundo carregado negativamente para favorecer a adesão celular, que ocorre em até 4 horas após a deposição das células. As células foram mantidas até alcançarem cerca de 70 a 90% de confluência, quando foi então realizado repique das células. Este repique foi

realizado por remoção mecânica das células em meio de cultura através da raspagem com o auxílio de um raspador estéril e aprotogênico (*KASVI*), de modo a minimizar a ativação celular e mudanças no perfil de resposta celular. As células foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4°C, contadas e ressuspensas em meio novo completo de acordo com o volume recomendado pela ATCC. A contagem das células foi realizada pelo método de exclusão por azul de tripan 0.4% (*Sigma*) em câmara de Neubauer.

### 3.1.2 Cultivo bacteriano

As cepas Kp52.145 selvagem, e mutantes *wca*<sup>-</sup> e *pld*<sup>-</sup> foram mantidas congeladas em meio LB - *Luria Bertani* (*KASVI*) com 10% de glicerol em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, foi realizada a raspagem de uma pequena quantidade do conteúdo do criotubo com o auxílio de uma alça estéril. Os cristais contendo bactérias foram depositados em tubos contendo meio LB e a cultura foi deixada a 37°C sob agitação de 180 rpm por 16 horas (*Incubadora TE-420 TECNAL*). As bactérias foram estriadas em placas Petri contendo meio LB ágar suplementado com antibióticos na concentração de 50 µg/mL, sendo rifampicina para *wca*<sup>-</sup> e canamicina para *pld*<sup>-</sup>, e mantidas em estufa a 37°C por 16 horas (*Estufa de Cultura TE 392/1 TECNAL*). As placas contendo colônias bacterianas foram mantidas a 4°C por cerca de dois meses, servindo como fonte de colônias bacterianas para o uso de rotina.

Para cada experimento, uma colônia isolada de cada cepa a ser utilizada foi retirada da placa com auxílio de uma alça ou palito estéril, homogeneizada em meio LB e incubada a 37°C em agitador orbital, a 180 rpm, por aproximadamente 16 horas em meio LB suplementado com antibióticos quando necessário. Essas culturas foram utilizadas ou repicadas para a realização de cada experimento, conforme detalhado nas seções abaixo. O crescimento bacteriano foi acompanhado através da medição da densidade ótica a 600nm em leitor *CO8000 Cell Density Meter - Biowave WPA* até uma O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5 para os experimentos de microscopia e entre 0.7 e 0.8 para os demais experimentos.

### **3.2 Avaliação da citotoxicidade em células RAW 264.7 por ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo)**

Células RAW 264.7 foram plaqueadas em uma densidade de  $2 \times 10^6$  células por poço, num volume de 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 contendo 2 % de SFB em uma placa de 96 poços (KASVI) e deixadas na incubadora com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 16 horas.

Bactérias Kp52.145, *wca*<sup>-</sup> e *pld*<sup>-</sup> cultivadas por 16 horas foram repicadas em 4 mL de meio LB suplementado com antibióticos quando necessário, em agitador orbital a 37°C com 180 rpm. Ao atingir a O.D.  $600_{\text{nm}}$  0.7, onde o número de unidades formadoras de colônia por mL é de aproximadamente  $8 \times 10^8$ , o inóculo foi preparado para uma MOI de 50:1. As células foram infectadas e centrifugadas por 10 minutos a 300 x g em 4°C (*CS-6R centrifuge Beckman*) para sincronizar a infecção, ou seja, para que todas as bactérias estivessem na mesma posição no tempo inicial da infecção. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$  por 4 horas. Os poços foram lavados três vezes com PBS (tampão fosfato de sódio) para retirar as bactérias e então 50  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 + 2% de SFB foi adicionado. Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  de MTT 5 mg/mL foram adicionados, e a placa foi levemente agitada de modo a homogeneizar o conteúdo dos poços. O MTT consiste em um ensaio colorimétrico que permite acessar a viabilidade celular por meio da sua capacidade respiratória. Essa capacidade é mensurada pela metabolização de cristais amarelo claro solúveis de tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo) por células viáveis. Enzimas mitocondriais são capazes de reduzir o tetrazólio a formazan insolúvel, que possui coloração de cor roxa a negra. Dessa forma, quanto maior a toxicidade, menor a quantidade de células vivas para metabolizar os cristais, o que conseqüentemente culminará em poços com meio de cultura mais claros, com uma absorbância menor. A placa foi deixada na incubadora por 2 horas, e depois foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio). Os poços foram homogeneizados por pipetagem para dissolução dos cristais e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a  $590_{\text{nm}}$ .

### **3.3 Adesão e internalização bacteriana por citometria de fluxo**

Células RAW 264.7 foram liberadas da garrafa de cultura por ação mecânica, ou seja, por raspagem em meio de cultura e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4°C (*CS-6R centrifuge Beckman*). O sobrenadante foi retirado, e as células foram ressuspensas em meio

fresco. As células foram contadas pelo método de exclusão por azul de tripan e  $1 \times 10^7$  células foram plaqueadas em duas placas de 48 poços (KASVI) em volume de 200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. As placas foram deixadas na incubadora a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 4 horas para a adesão celular.

Enquanto isso, células bacterianas das três cepas cultivadas por 16 horas foram repicadas em 4 mL de meio LB contendo antibiótico e incubadas em agitador orbital a  $37^\circ\text{C}$ . Sua densidade óptica foi acompanhada até que atingisse  $\text{O.D.}_{600\text{nm}}$  0.7. Ao atingirem a densidade necessária, as bactérias foram marcadas com PKH26 (*Fluorescent Cell Linker Kit for General Membrane Labeling* - Sigma-Aldrich), um corante para marcação de membrana celular que possui excitação no comprimento de onda de  $551_{\text{nm}}$  e emissão em  $567_{\text{nm}}$  na faixa do vermelho. A marcação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Para iniciar o protocolo, 1 mL da cultura bacteriana foi coletada e centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm em temperatura ambiente (*Centrifuge 5424-Eppendorf-Bioresearch*). O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em 1 mL de PBS estéril e novamente centrifugadas. O sedimento foi ressuspenso em 99  $\mu\text{L}$  do diluente C do kit e 1  $\mu\text{L}$  do corante PKH26. A mistura foi homogeneizada a cada 5 minutos durante 15 minutos. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de soro fetal bovino foram adicionados durante 1 minuto para competir pelo corante e parar a reação. As bactérias foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640, mantendo uma concentração de  $8 \times 10^8$  CFU/mL.

Inóculos com MOI de 50:1 de bactérias marcadas com PKH26 foram preparados e adicionados às placas. Uma das placas foi deixada em incubadora com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  e a outra foi deixada em geladeira por 1 h. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante dos poços foi coletado e 100  $\mu\text{L}$  de meio foram adicionados aos poços. As células foram retiradas por ação mecânica e transferidas para microtubos. As amostras foram centrifugadas a  $400 \times g$  por 5 min em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de PBS com 2% de SFB. Após serem centrifugadas novamente (*Centrifuge 5424-Eppendorf-Bioresearch*), foi adicionado PBS em volume de 200  $\mu\text{L}$  de modo a ressuspender a células, evitando a formação de grumos. Em seguida, o mesmo volume de paraformaldeído 8% foi adicionado aos microtubos, e homogeneizados para a fixação das células. As amostras foram acondicionadas em geladeira para análise em até 24 horas. As

análises foram realizadas por citometria de fluxo em citômetro *Accuri® C6 - BD C Sample™* e os dados extraídos através do programa *FlowJo™ 10*.

### **3.4 Sobrevivência e escape bacteriano**

Células RAW 264.7 foram soltas da garrafa e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4°C (*CS-6R centrifuge Beckman*). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio fresco. As células foram contadas pelo método de exclusão por azul de tripan e  $2 \times 10^7$  células foram plaqueadas em placas de 24 poços (*KASVI*) em volume de 500 µL de meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. A placa foi deixada na incubadora por 4 horas para a adesão celular antes da infecção.

Enquanto isso, células bacterianas das três cepas cultivadas foram repicadas em meio LB fresco com antibiótico e incubadas em agitador orbital a 37°C. Sua O.D. <sub>600nm</sub> foi acompanhada até que a cultura atingisse 0.7.

Foram preparados inóculos bacterianos em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB em uma MOI de 50:1 e as bactérias foram então adicionadas aos poços. A placa foi centrifugada a 300 x g por 10 minutos a 4°C para sincronizar a infecção e em seguida incubada por 1 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A partir dos inóculos, foi realizada uma diluição seriada para determinar a quantidade de unidades formadoras de colônia e estas foram plaqueadas em placas de LB ágar. Esse procedimento foi realizado para garantir que a MOI aplicada estava correta e para normalizar os dados de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de sobrevivência e escape pelo valor do inóculo.

De modo a eliminar as bactérias extracelulares, os poços foram lavados três vezes com PBS e foram adicionados 500 µL de meio com 300 µg/mL de gentamicina. As placas foram incubadas por 1.5 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para medir a sobrevivência em 2.5 h, as células foram lavadas três vezes com PBS e foram adicionados 300 µL de saponina 0.5% para a lise dos macrófagos e liberação do conteúdo intracelular, onde estariam bactérias fagocitadas. Para medir a sobrevivência no tempo de 24 h, as células foram lavadas três vezes com PBS e meio fresco contendo 10% de SFB foi adicionado aos poços. Após 24 horas, os poços foram novamente lavados três vezes e foram adicionados 300 µL de saponina 0.5% para a lise dos macrófagos e liberação do conteúdo intracelular. Já para a medida de escape,

as células foram lavadas três vezes com PBS e meio fresco contendo 10% de SFB foi adicionado aos poços. Após 24 horas, o sobrenadante dos poços foi coletado. Por fim, 10 µL de cada poço foram utilizados para uma diluição seriada de  $10^{-1}$  até  $10^{-6}$ . As diluições foram plaqueadas em triplicatas técnicas em placas Petri de meio LB ágar contendo antibióticos, quando necessário, e incubadas a 37° C por cerca de 16 horas. No dia seguinte foi feita a contagem de UFCs.

### **3.5 Avaliação do envolvimento da proteína PLD<sup>kp</sup> nas estruturas de superfície por microscopia de força atômica**

#### **3.5.1 Método de fixação por paraformaldeído 8%**

A cepa selvagem Kp52.145, a mutante *pld<sup>-</sup>* e a mutante no gene *wca<sup>-</sup>*, foram crescidas por 16 horas em meio LB e repicadas em meio fresco até atingirem a O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5.

Para o preparo de amostras para análise a seco, 100 µL da cultura de cada cepa foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente (*MIKRO 120- Hettich-Zentrifugen*). O sobrenadante foi então desprezado e o material sedimentado ressuspense em 100 µL de PBS. Os microtubos foram novamente centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o sedimentado foi ressuspense em uma solução de paraformaldeído a 8% em PBS a fim de fixá-las. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 2 horas. Depois foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente, ressuspensas e centrifugadas duas vezes em 100 µL de água Milli-Q. A amostra (25 µL) foi diluída em 75 µL de água para facilitar a visualização. As amostras foram acondicionadas a 4°C.

O preparado para análise em MFA deve estar em uma superfície lisa para que não haja interferência nas imagens já que elas são produzidas a partir de uma escala muito pequena. Para isso é utilizada a mica, um mineral que possui uma divisão altamente perfeita, o que torna sua superfície lisa atômica. A mica foi clivada, ou seja, as ligações entre as camadas do mineral foram rompidas com o auxílio de fita adesiva e, 10 µL da amostra foram pipetados sobre sua superfície. A amostra foi seca sob gás nitrogênio de 5 a 10 minutos variando de acordo com o tamanho da mica. A amostra foi analisada em equipamento MFA

em ar (*Dimension FastScan with ScanAsyst<sup>TM</sup> - Bruker*) no Laboratório de Física Biológica, localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### **3.5.2 Método de Diluição Seriada**

Bactérias cultivadas por 16 horas foram repicadas em meio LB suplementado com antibiótico quando necessário e incubadas até a O.D.<sub>600 nm</sub> 0.4 sob agitação em 180 rpm a 37°C. O protocolo foi baseado na metodologia de diluição seriada conforme análises realizadas por Hai-Nan Su, (2012). Cem microlitros da cultura foram coletados e misturados a 50 µL de água destilada. Em seguida, mais três diluições de 1:10 foram realizadas. Dez microlitros da amostra foram pipetados sobre uma mica e esta foi seca por 90 minutos em temperatura ambiente. De modo a ter certeza de que toda a amostra estava seca, um jato de gás nitrogênio foi aplicado sobre a amostra. As amostras foram analisadas com equipamento MFA, *Icon - Bruker*.

### **3.5.3 Ponto crítico**

Bactérias cultivadas por 16 horas foram repicadas em meio LB suplementado com antibióticos quando necessário e incubadas até a O.D.<sub>600 nm</sub> 0.5 sob agitação em 180 rpm a 37°C.

Enquanto as cepas bacterianas se multiplicavam, as lamínulas foram preparadas. Elas foram lavadas por fricção mecânica com detergente Extran e colocadas em água Milli-Q. As lamínulas foram lavadas quatro vezes com Milli-Q e em seguida com acetona. Elas foram mantidas em acetona no sonicador de banho por 5 minutos. Em seguida, elas foram secas sobre papel filtro. Vinte microlitros de Poli-L-lisina foram depositados sobre um pedaço de Parafilm<sup>®</sup> e as lamínulas foram colocadas sobre as gotas. Após 15 minutos, as lamínulas foram retiradas e levadas para a estufa para que o filme de Poli-L-lisina secasse. Ao adquirir tom esbranquiçado, as lamínulas foram lavadas com água destilada para remover o excesso do polímero e deixadas para secar em temperatura ambiente.

Foi coletado 1 mL da cultura de cada cepa e este foi centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em PBS e centrifugadas novamente. Essa etapa foi realizada por mais duas vezes para lavagem das células. As células

foram ressuspensas em paraformaldeído 4% e mantidas por 15 minutos até serem centrifugadas a 10000 por 5 minutos e ressuspensas em PBS. Essa lavagem foi feita por mais duas vezes, sendo ressuspensa em 400 µL de PBS após a última lavagem.

Com as lamínulas secas, 100 µL das bactérias foram depositados, e deixados por 15 minutos para adesão. Depois elas foram lavadas com Milli-Q estéril por três vezes para retirar o excesso. As células foram desidratadas de forma seriada, iniciando em 30% de etanol, e passando por 50% e 70% de etanol por 15 minutos. O etanol foi substituído por CO<sub>2</sub> líquido em aparelho de ponto crítico da *Baltec – CPD 30* em condições de pressão e temperatura definidas. As imagens foram obtidas por PeakForce Tapping em equipamento *Dimension FastScan with ScanAsyst<sup>TM</sup> - Bruker*, do Laboratório de Física Biológica da UFRJ.

### **3.6 Avaliação do envolvimento da proteína PLD nas estruturas de superfície por microscopia eletrônica de transmissão**

Bactérias Kp52.145, *wca*<sup>-</sup> e *pld*<sup>-</sup> crescidas por 16 horas foram repicadas em meio LB fresco suplementado com antibiótico, quando necessário, e incubadas por 4 horas. Foram coletados 1.5 mL da cultura de cada cepa e centrifugados a 5000 rpm por 8 minutos em temperatura ambiente. As células foram então centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS por mais duas vezes, concentrando a amostra em 100 µL durante a última lavagem. Dez microlitros de cada amostra foram pipetados sobre grades de cobre recobertas por um fino filme de carbono e formvar. O líquido foi absorvido com papel filtro por baixo da grade. Para visualização da amostra, foi utilizado 10 µL de um corante de contraste negativo, o PTA (ácido fosfotúngstico) em concentração de 2%. As grades foram secas e analisadas no microscópio eletrônico *Philips Morgagni D268* a 80 kV do Laboratório de Ultraestrutura Celular - IBCCF/UFRJ.

### **3.7 Extração de proteínas totais**

Bactérias Kp52.145 selvagem e mutante *pld*<sup>-</sup> cultivadas por 16 horas foram repicadas em 10 mL de meio LB suplementado com antibióticos e incubadas até o dia seguinte em agitador orbital a 37°C em 180 rpm. A densidade óptica (O.D.<sub>600nm</sub>) foi medida e ajustada de modo a coletar a mesma quantidade inicial de bactérias. Cerca de 2 mL foram centrifugados (*Allegra<sup>TM</sup> X-12R - Beckman Coulter*) a 14000 rpm por 10 minutos em temperatura

ambiente. As amostras foram ressuspensas em 100 µL de Tampão Laemmli. As amostras foram fervidas a 100°C por 10 minutos e novamente centrifugadas a 10000 rpm por 3 minutos sob temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o total de proteínas solúveis foi transferido para um tubo novo e acondicionado a -20°C.

### **3.8 Extração de proteínas de membrana externa**

Bactérias Kp52.145 selvagem e mutante *pld<sup>-</sup>* cultivadas por 16 horas foram repicadas em 10 mL de meio LB suplementado com antibióticos e incubadas até o dia seguinte em agitador orbital a 37°C em 180 rpm. A O.D.<sub>600nm</sub> foi medida e ajustada de modo a coletar a mesma quantidade inicial de bactérias. Cerca de 2 mL foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos. As amostras foram ressuspensas em 1 mL de água Milli-Q e passadas para um tubo de 50 mL. Foram adicionados 8 mL de água Milli-Q gelada. O conteúdo foi sonicado com sonificador de ponta (*Kasanic Processor*) por três vezes com duração de 60 segundos a 4°C. Para solubilizar a membrana citoplasmática, 800 µL de Sarcosyl 20% foram adicionados e as amostras foram deixadas por 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram em seguida centrifugadas a 50000 x g em ultracentrífuga (*Sorval WX Ultra Series*, rotor *TI50-2 - Thermo Scientific*) por 60 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras ressuspensas em 200 µL de água Milli-Q.

### **3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Tanto as amostras de OMPs, quanto as de extrato proteico total foram fervidas por 10 minutos. Nove microlitros da amostra de proteínas totais ou OMPs, foram misturados a 3 µL de tampão de corrida e centrifugadas por 3 minutos a 10000 rpm em temperatura ambiente. Doze microlitros foram aplicados em gel de poliacrilamida 12.5% e a corrida foi realizada sob 100 V, por aproximadamente 2.5 h em equipamento *Might Small II SE250/260 - HOEFER*. A visualização das bandas foi feita por coloração com *Coomassie Blue R-250*.

### **3.10 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA) de fator único, onde  $p < 0,05$  é considerado estatisticamente significativo.

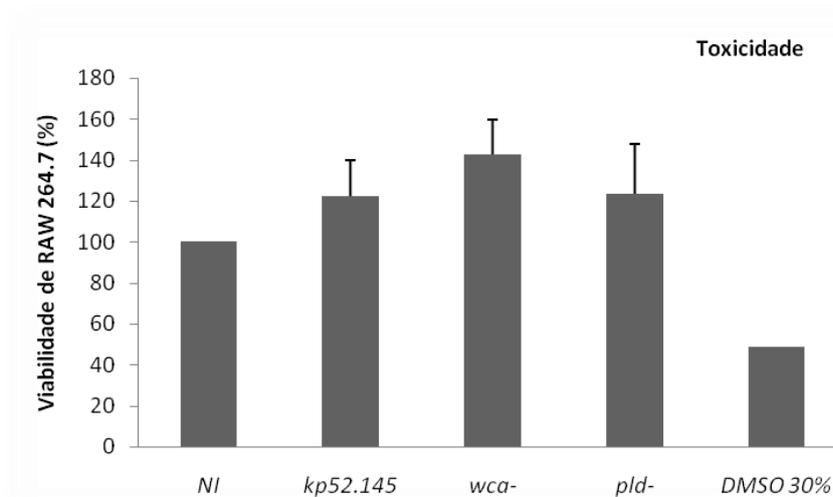
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação de efeito citotóxico da proteína PLD<sup>kp</sup> em células RAW 264.7

Como foi demonstrado por Lery e colaboradores, a proteína fosfolipase D de *K. pneumoniae* Kp52.145 é essencial para a virulência dessa cepa em modelo de pneumonia em camundongos. De acordo com a literatura, algumas proteínas bacterianas da família das fosfolipases D são proteínas translocadas para o meio extracelular ou para uma célula vizinha por sistemas de secreção e exercem atividade citotóxica, tanto contra células eucarióticas do hospedeiro, quanto contra outros procaríotos (76). Desse modo, especulamos que a PLD<sup>kp</sup> poderia ter atividade citotóxica também. Por compor uma das primeiras linhas de defesa do sistema imune e pela virulência de Kp52.145 ter sido estabelecida em modelo murino, macrófagos murinos RAW 264.7 foram escolhidos para testar o envolvimento da proteína PLD<sup>kp</sup> na patogênese, através de ensaio de citotoxicidade.

Neste experimento, células RAW 264.7 foram incubadas com uma MOI de 50:1 das três cepas: selvagem e mutantes *wca*<sup>-</sup> e *pld*<sup>-</sup> por 4 h com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Com base em dados da literatura, acredita-se que este tempo seria suficiente para uma bactéria injetar seus efetores na célula hospedeira e, se for o caso, afetar a viabilidade celular. A análise foi realizada pelo ensaio de MTT, um ensaio colorimétrico que permite acessar a viabilidade celular por meio da sua capacidade respiratória. Nesse ensaio, quanto mais células metabolicamente ativas, mais escuro o meio de cultura dos poços se torna.

Os resultados obtidos (Figura 4.1) indicam que não há diferença de citotoxicidade entre células controle não infectadas e aquelas infectadas com qualquer uma das três cepas testadas. Assim, é possível concluir que nenhuma das cepas testadas possui citotoxicidade sobre células RAW 264.7, no tempo analisado.



**Figura 4.1: Viabilidade de células RAW 264.7 por ensaio de redução do MTT.** Células RAW 264.7 infectadas com um MOI de 50:1 das cepas de *K. pneumoniae* Kp52.145 foram incubadas por 4 h a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. DMSO foi utilizado como controle positivo. O MTT foi adicionado e, após 2 horas, os cristais de MTT foram solubilizados com SDS e a absorbância lida a 590<sub>nm</sub>. Tanto a cepa selvagem quanto as respectivas mutantes parecem não ter efeito citotóxico em células RAW 264.7 nas condições testadas. n=4. NI = Não infectada.

Como nem mesmo a cepa selvagem apresenta efeito citotóxico em células RAW 264.7, foi levantada a hipótese de que a atenuação da virulência da cepa *pld*<sup>-</sup> poderia estar relacionada com a proteção bacteriana contra mecanismos de resposta imune. De fato, *K. pneumoniae* é uma bactéria conhecida por se esconder do sistema imune e dessa forma escapar das defesas do hospedeiro. Então, é possível que a PLD<sup>kp</sup> esteja envolvida neste processo, e se for este o caso, o mutante *pld*<sup>-</sup> seria mais susceptível à fagocitose.

#### 4.2 Envolvimento da proteína PLD<sup>kp</sup> na interação bactéria-macrófago

Mediante contato de bactérias com uma monocamada de células em cultura, parte das bactérias adere à superfície das células, e parte continua em suspensão. Das que aderem, parte pode ser internalizada pelas células. Das que forem internalizadas, algumas podem ser degradadas nos vacúolos fagocíticos e outras podem escapar da fagocitose, alcançando novamente o meio extracelular. *K. pneumoniae* é um patógeno tipicamente de vida extracelular, que normalmente evita a fagocitose. Sendo pouco reconhecida pelas células fagocíticas, consegue se manter no hospedeiro por mais tempo. Ainda, há estudos que mostram que *K. pneumoniae*, quando fagocitada, pode escapar da fagocitose e utilizar este mecanismo para sua disseminação, atravessando por exemplo, epitélios por via transcelular

(9). Assim, para testar a hipótese de que a PLD<sup>Kp</sup> poderia participar de algumas dessas etapas de adesão, internalização ou escape da fagocitose, os experimentos a seguir foram realizados. Abaixo estão representadas, em linha temporal, as etapas de interação patógeno-hospedeiro analisadas.



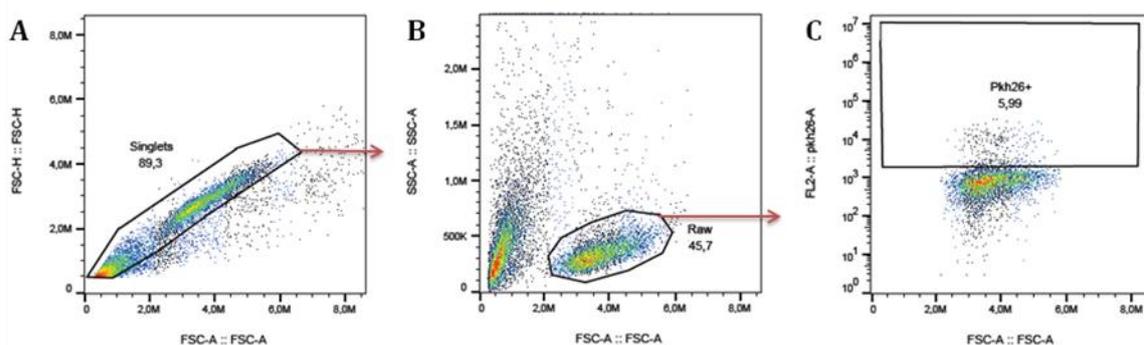
**Figura 4.2: Representação temporal do monitoramento da interação patógeno-hospedeiro.** A adesão, internalização, sobrevivência e escape de cepas de Kp52.145 em macrófagos RAW 264.7 foram investigados em diferentes tempos.

#### 4.2.1 Adesão de cepas Kp52.145 em macrófagos murinos

Um dos muitos artifícios utilizados por diversos patógenos para se estabelecer no hospedeiro é a adesão a células e mucosas. Por exemplo, a adesão possibilita que a bactéria se mantenha em um ambiente propício e se proteja de condições adversas e fatores físico-químicos que poderiam levar a sua eliminação. Pilis, fímbrias e a cápsula polissacarídica são moléculas bacterianas que sabidamente medeiam a adesão, proporcionando sua permanência em locais específicos e contato para ação direta sobre células alvo.

Para avaliar a se a PLD<sup>Kp</sup> poderia afetar a capacidade de adesão de *K. pneumoniae* (etapa 1 na figura 4.2), as bactérias foram marcadas com corante PKH26, que emite fluorescência no comprimento de onda do vermelho e inoculadas em uma MOI de 50:1 sobre cultura de macrófagos murinos RAW 264.7. A infecção foi mantida por 1 hora, sob temperatura de 4°C, situação em que a atividade celular cai e, conseqüentemente, processos como a fagocitose, que são dependentes do rearranjo de citoesqueleto, são prejudicados. Assim, nessas condições, as bactérias são capazes de aderir às células, porém incapazes de invadir as mesmas. Decorrido o tempo de incubação, as bactérias não aderidas foram removidas através de lavagem, e as células foram soltas, fixadas e analisadas por citometria

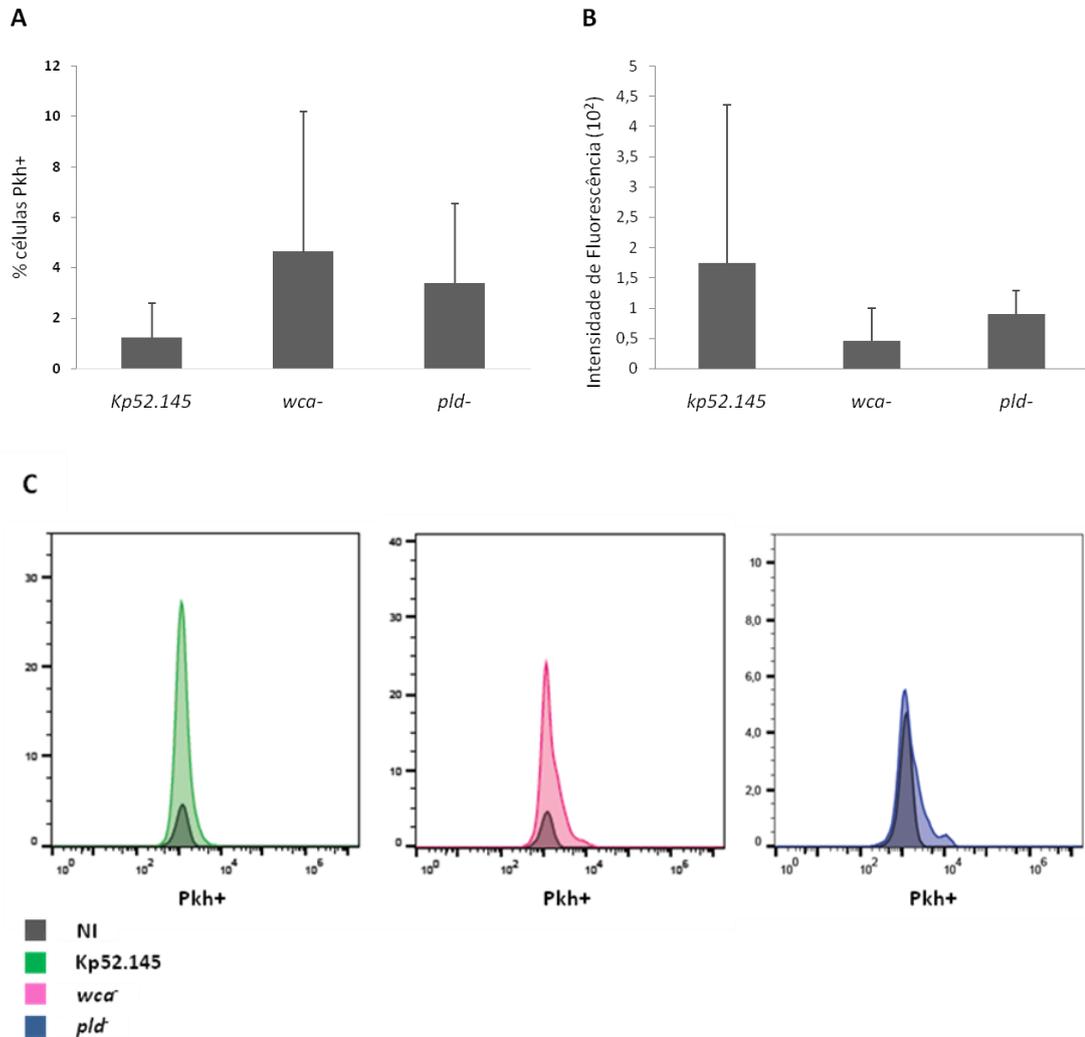
de fluxo. Para identificação da população de células RAW 264.7, as células individuais (*Singlets*) foram selecionadas através de parâmetros de dispersão frontal medida pela área (FSC-A do inglês, *Forward Scatter Area*) e altura (FSC-H do inglês, *Forward Scatter Height*) utilizados para eliminar grumos de células que poderiam gerar dados tendenciosos. Em seguida, a região da população característica de células RAW 264.7 foi definida por FSC-A e dispersão lateral medida pela área (SSC-A-do inglês, *Side Scatter Area*). Considerando apenas as células RAW 264.7 individualizadas, avaliamos a população de células positiva para PKH26 (ou seja, que continham bactéria associada) por FSC-A e pela emissão de fluorescência no canal FL2. Esta estratégia está ilustrada na figura 4.3.



**Figura 4.3: Representação esquemática da estratégia de quantificação da taxa de adesão e internalização bacteriana a células RAW 264.7 por citometria de fluxo.** Inicialmente foram selecionados eventos que correspondem a células individualizadas (*singlets*, região delimitada dentro da área de contorno preto em A). Após a exclusão de aglomerados, os eventos foram analisados quanto a medidas de tamanho e granulosidade para seleção de eventos com características típicas das células RAW 264.7 (área demilitada em preto em B). As células RAW 264.7 individualizadas foram então analisadas quanto a intensidade de emissão de fluorescência em FL2, correspondente a emissão do PKH26 e indicando a presença de uma ou mais bactérias associadas à célula (retângulo preto em C).

Os resultados obtidos (Figura 4.4) mostram que tanto a bactéria selvagem quanto as mutantes apresentam medianas de intensidade de fluorescência e porcentagem de células positivas para o marcador bacteriano parecidas. Isso indica que a capacidade de adesão a

macrófagos RAW 264.7 por Kp52.145 não é afetada pela proteína PLD<sup>kp</sup>, ou mesmo pela ausência de cápsula nas condições testadas.

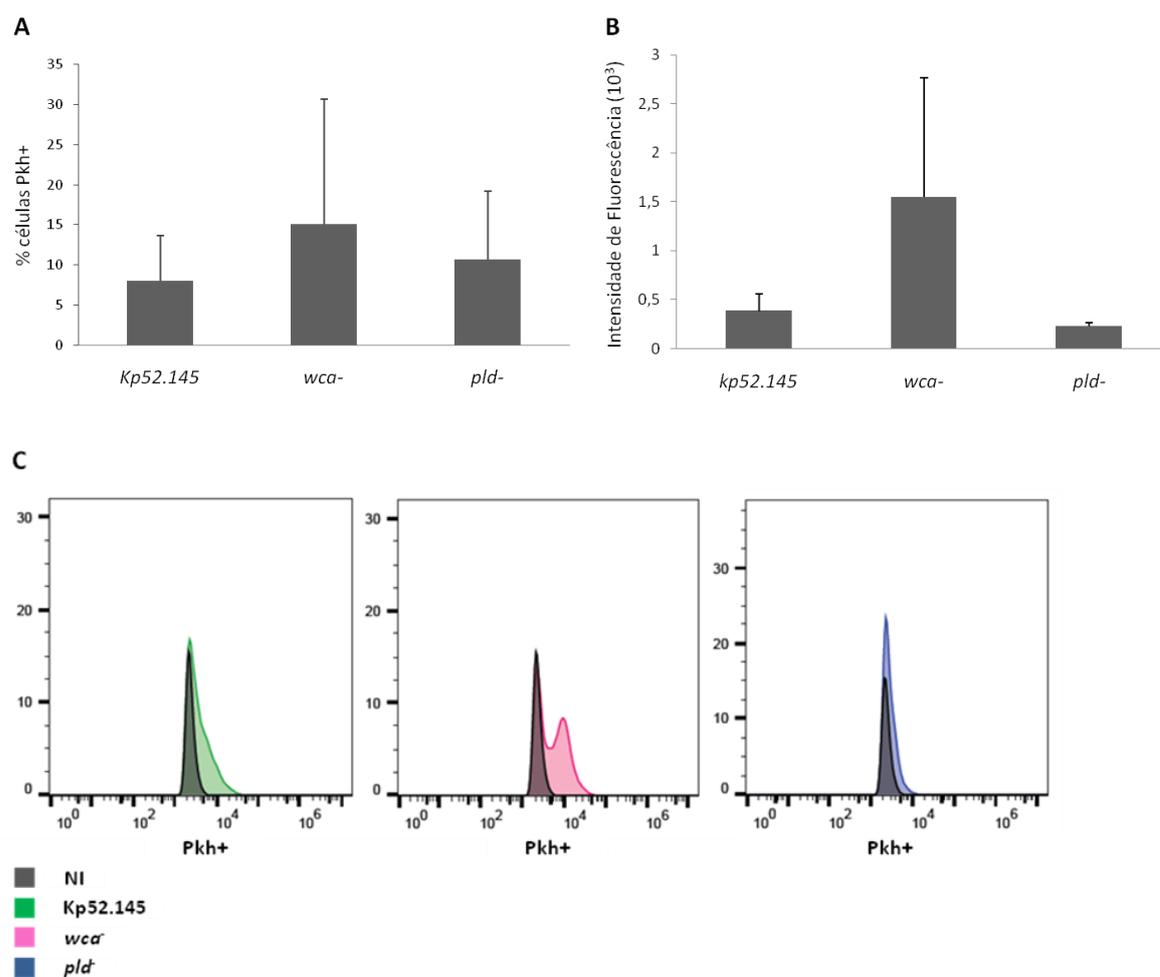


**Figura 4.4:** Adesão de cepas de *K. pneumoniae* a macrófagos RAW 264.7 após 1 hora de interação. Macrófagos foram infectados com as cepas selvagem Kp52.145, e mutantes *wca*<sup>-</sup> e *pld*<sup>-</sup> marcadas com PKH26, na MOI 1:50 e mantidos a 4°C. Após o período de incubação, as células foram fixadas e analisadas por citometria de fluxo para identificação do grau de associação das diferentes cepas. **A:** Porcentagem de células positivas para o marcador bacteriano em canal FL2; **B:** Adesão em células representada pela mediana de intensidade de fluorescência em FL2; **C:** Histogramas ilustrativos de um dos experimentos. n=2.

#### 4.2.2 Internalização de cepas Kp52.145 em macrófagos murinos

Considerando que as taxas de adesão bacteriana a macrófagos das três cepas analisadas foram equivalentes, levantamos a hipótese de que etapas subsequentes à adesão poderiam ser afetadas pela PLD<sup>kp</sup>. Assim, avaliamos o perfil de internalização de *K. pneumoniae* por citometria de fluxo (etapa 2 da figura 4.2). As bactérias foram marcadas com corante PKH26 e inoculadas em uma MOI de 50:1 em cultura de macrófagos murinos RAW 264.7. A infecção foi mantida a 37°C em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora. Bactérias não aderidas foram removidas por lavagem. Ao fim, as células foram soltas, fixadas e analisadas. Considerando que estas células poderiam conter sinal de fluorescência de bactérias aderidas na superfície externa das células e também de bactérias internalizadas, os valores de mediana de intensidade de fluorescência obtidos no experimento de adesão foram subtraídos dos valores obtidos nesse experimento, sendo esta diferença representativa do perfil de internalização.

Os resultados obtidos (Figura 4.5) mostram que as cepas selvagem e mutante *pld* apresentam o mesmo grau de internalização em macrófagos RAW 264.7. Ainda que não estatisticamente, o mutante *wca*<sup>-</sup> apresenta uma tendência de internalização mais elevada que as demais, de acordo com dados da literatura para mutantes capsulares de Kp52.145 (77).

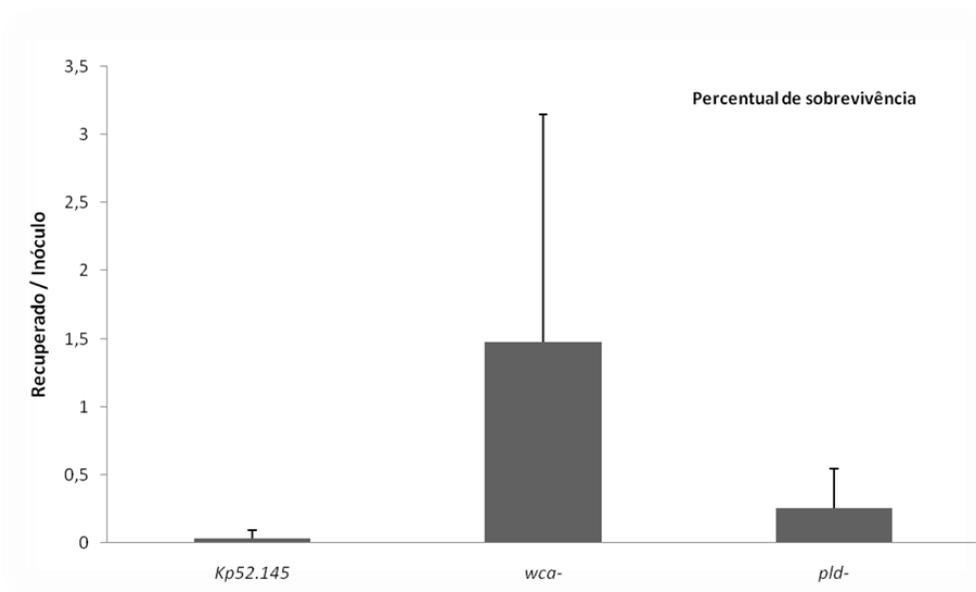


**Figura 4.5: Internalização de *K. pneumoniae* por macrófagos em período de 1 hora.** Macrófagos murinos RAW 264.7 foram infectados com a cepa selvagem Kp52.145 e mutantes *wca-* e *pld-* marcadas com PKH26, na MOI 50:1. A incubação foi mantida a 37°C durante 1 hora. **A:** Porcentagem de células positivas para o marcador bacteriano, subtraída da porcentagem obtida no experimento de adesão (dados da Fig. 4.4), indicando aqui apenas internalização; **B:** Grau de bactérias internalizadas obtido pela mediana de intensidade de fluorescência das células positivas para PKH26 nesse experimento subtraída da mediana de intensidade de fluorescência de bactérias aderidas (dados da Fig. 4.4). **C:** Histograma ilustrando intensidade de fluorescência de um dos experimentos realizados. n= 2.

Como não observamos nenhuma influência da PLD<sup>kp</sup> na taxa de internalização bacteriana, resolvemos verificar a viabilidade das bactérias internalizadas. Bactérias internalizadas por macrófagos podem tanto ser degradadas por enzimas lisossomais ou a bactéria pode evitar a fusão fagolisossomal, resistir a esta fagocitose e sobreviver. Assim, avaliamos a sobrevivência das diferentes cepas de *K. pneumoniae*, por contagem de unidades formadoras de colônia. Nesta técnica são contadas apenas as bactérias viáveis.

Macrófagos foram infectados com MOI 50:1 da cepa selvagem, mutantes da cápsula e mutante *pld* e incubados por 1 hora. Após este período, bactérias extracelulares, aderidas ou não, foram mortas por tratamento com antibiótico gentamicina por 90 minutos a 37°C enquanto as bactérias internalizadas ficaram protegidas da ação do antibiótico. As células foram lisadas e as bactérias internalizadas recuperadas foram plaqueadas em meio LB ágar para a contagem de UFCs.

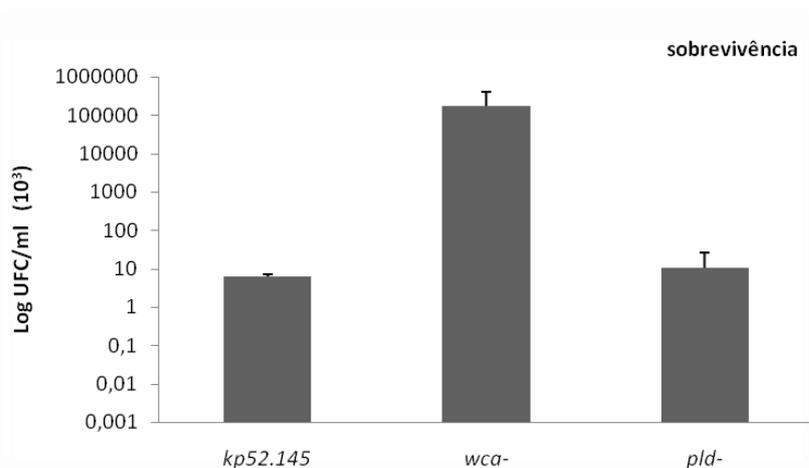
Os resultados obtidos (Figura 4.6) mostram maior número de bactérias da cepa mutante *wca* internalizadas e viáveis do que da cepa selvagem no tempo de 2.5 h. Considerando que esta cepa *wca* foi também mais internalizada, não é surpreendente que o número de bactérias viáveis seja maior. Curiosamente, a cepa deficiente na proteína PLD<sup>kp</sup> possui perfil intermediário entre Kp52.145 e *wca*.



**Figura 4.6: Percentual de sobrevivência de cepas de *K. pneumoniae* internalizadas por macrófagos 2.5 horas após a infecção.** Células RAW 264.7 foram infectadas com uma MOI de 50:1 de *K. pneumoniae* por 1 h, depois tratadas com gentamicina por 1.5 h e lisadas com saponina para liberar as bactérias internalizadas. A partir de uma diluição seriada, o material recuperado da lise celular foi plaqueado. O percentual de bactérias intracelulares viáveis ao tempo de 2.5 h foi expresso pela divisão da contagem de UFC do recuperado da cultura pela contagem de UFC do inóculo de cada experimento independente, multiplicado por  $10^2$ . n= 7.  $P = 0,0274$  (ANOVA).

Como mencionado anteriormente, *K. pneumoniae* é um patógeno tipicamente extracelular, porém autores têm mostrado que algumas cepas dessa espécie possuem a capacidade de sobreviver intracelularmente por alguns dias (45,78). Para checar se a proteína PLD<sup>kp</sup> poderia afetar a sobrevivência bacteriana em células do hospedeiro, as UFCs foram analisadas 24 horas após infecção (Figura 4.7).

Novamente, a cepa mutante capsular apresentou viabilidade mais elevada que a cepa selvagem. Esse dado pode estar correlacionado ao maior número de bactérias internalizadas, indicando que ambas possuem capacidade de sobrevivência. Já a cepa mutante *pld*<sup>-</sup> não apresenta diferença de viabilidade em relação a cepa selvagem 24 horas após infecção.

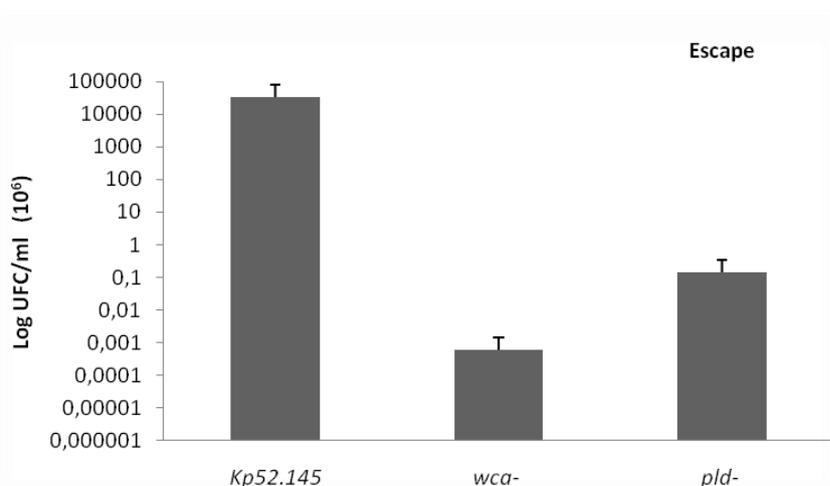


**Figura 4.7: Sobrevivência de cepas de *K. pneumoniae* internalizadas por macrófagos, 24 horas após a infecção.** Cepas de Kp52.145 foram inoculadas em poços de células RAW 264.7 e a infecção foi mantida por 1 hora. Em seguida, bactérias extracelulares foram mortas e meio fresco foi adicionado. As células foram mantidas em incubadora a 37°C por 24 horas. As bactérias viáveis foram acessadas através da lise de macrófagos RAW 264.7 e plaqueamento em meio LB ágar. n=2

Tem sido mostrado que *K. pneumoniae* é capaz de modular vias da célula hospedeira para escapar da via canônica de fagocitose (45). Assim, foi averiguado se a PLD<sup>kp</sup> poderia estar envolvida no escape de *K. pneumoniae* da fagocitose por células do hospedeiro. Para esta finalidade, culturas de macrófagos RAW 264.7 foram infectadas com MOI 50:1 de cada uma das três cepas, por 1 hora. Em seguida, as bactérias extracelulares foram mortas por tratamento com gentamicina. Após 1.5 horas do tratamento com antibiótico, o meio foi trocado para meio sem antibiótico, de forma a permitir a sobrevivência de bactérias que porventura tenham escapado dos macrófagos. Vinte e quatro horas após o início da infecção,

os sobrenadantes da cultura foram coletados e o número de bactérias viáveis foi contado por diluição seriada e plaqueamento em LB ágar.

O resultado (Figura 4.8) indica que 24 horas após a infecção, apenas as cepas selvagem e mutante *pld*<sup>-</sup> foram capazes de escapar para o meio extracelular, enquanto não pudemos detectar a cepa *wca*<sup>-</sup>, indicando que boa parte desta ficou restrita ao interior de macrófagos RAW 264.7, como mostrado na figura 4.7.



**Figura 4.8: Escape de *K. pneumoniae* da fagocitose por macrófagos, 24 horas após a infecção.** Macrófagos RAW 264.7 infectados com MOI 50:1 foram mantidos em incubadora a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora. Em seguida, meio de cultura suplementado com gentamicina foi adicionado para matar bactérias extracelulares e mantido por 90 minutos. Logo após, os poços foram lavados e meio fresco sem antibiótico foi adicionado. As células foram mantidas por 24 horas. O escape bacteriano foi medido pelo número de UFC de bactérias recuperadas do sobrenadante da cultura de 24 horas. n=2.

### 4.3 Envolvimento da proteína Pld<sup>kp</sup> no arranjo estrutural de moléculas da superfície de *K. pneumoniae*

Os resultados apresentados até aqui mostram que a PLD<sup>kp</sup> apresenta um papel na interação de *K. pneumoniae* com macrófagos murinos, influenciando a sobrevivência e o escape de bactérias fagocitadas. Para detalhar de que forma a PLD<sup>kp</sup> poderia desempenhar este papel, a cepa mutante *pld*<sup>-</sup> foi analisada, de modo a identificar possíveis alterações que possam estar envolvidas no mecanismo molecular de ação da PLD<sup>kp</sup>.

Os principais fatores de virulência de *K. pneumoniae* são moléculas expressas na sua superfície, tais como cápsula, LPS, adesinas, OMPs (proteínas de membrana externa), etc. De fato, grande parte dos fatores de virulência microbianos estão localizados na superfície celular ou são secretados, pois assim podem interagir diretamente com moléculas do hospedeiro. Técnicas de microscopia foram empregadas para avaliar se a proteína PLD<sup>kp</sup> poderia afetar alguma das estruturas da superfície dessa bactéria. Para isso, foram investigadas a cepa selvagem Kp25.145, o mutante *wca*<sup>-</sup> e um mutante no gene *pld*<sup>-</sup>. A cepa Kp25.145 é um isolado mucoide produtor de cápsula do sorotipo K2. A cepa *wca*<sup>-</sup> não produz cápsula polissacarídica, e foi utilizada neste estudo como um controle negativo - para facilitar a determinação do que é a cápsula nas imagens adquiridas. Duas técnicas de microscopia foram empregadas para a visualização das estruturas de superfície: Microscopia de Força Atômica (MFA) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

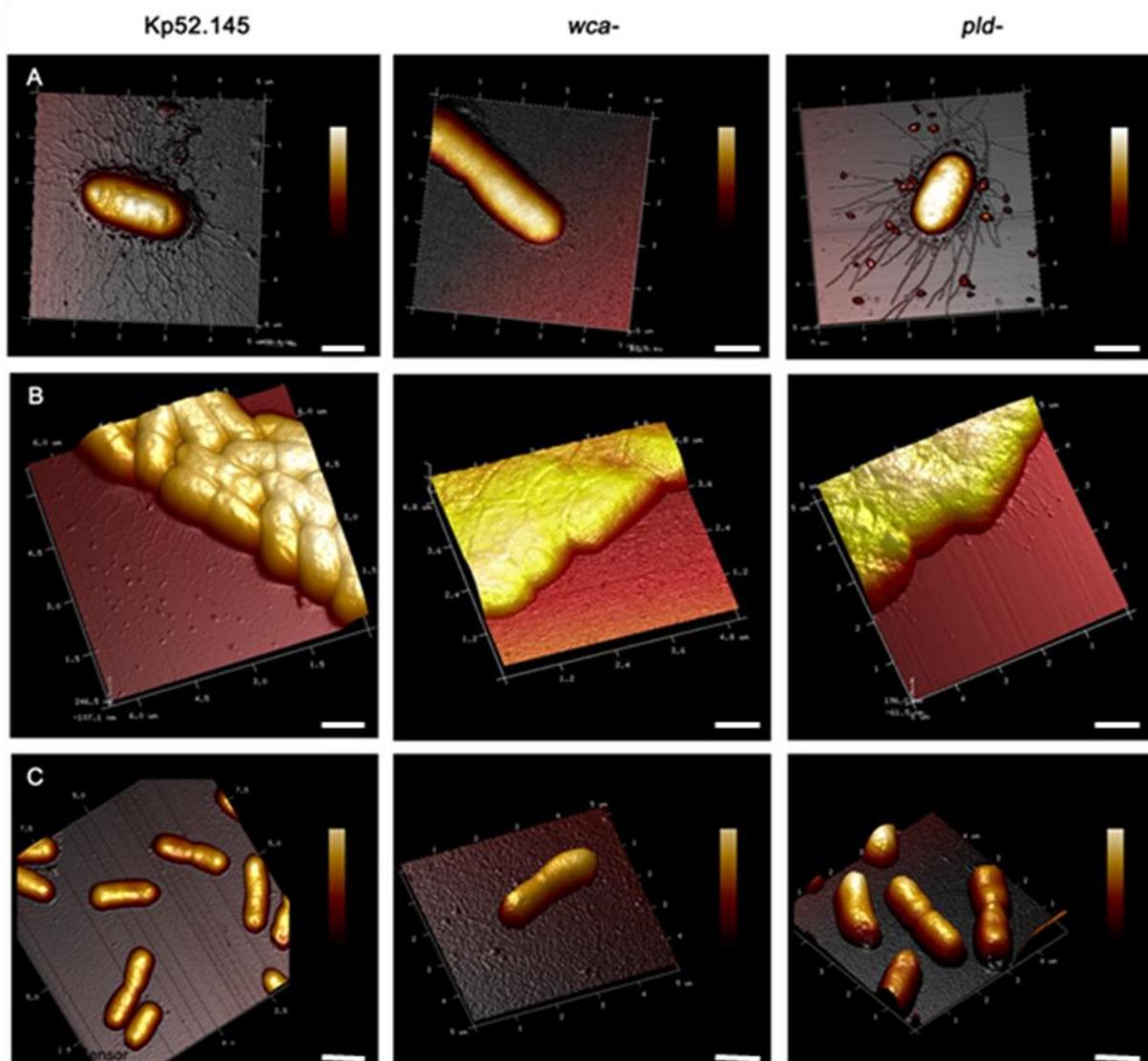
A MFA é uma tecnologia moderna, que permite a varredura da superfície de uma amostra, utilizando uma sonda e possibilitando a obtenção de imagens que refletem características da amostra que vão além do campo visual, tais como topografia, elasticidade e adesividade. Além disso, a MFA permite a análise de amostras em ambiente líquido, o que permite caracterizar estruturas biológicas em um estado mais próximo ao seu natural.

Na primeira linha da figura 4.9, são mostradas as imagens 3D de topografia obtidas por microscopia de força atômica através do protocolo de fixação por paraformaldeído, onde podemos notar que a cepa Kp52.145 *wt* apresenta estruturas alongadas e finas que irradiam da membrana celular, sendo bastante interconectadas e densas próximas da membrana celular e mais espaçadas quanto mais distantes da célula. Essas imagens se assemelham a estruturas da cápsula polissacarídica de outras espécies bacterianas visualizadas por MFA já descritas na literatura (36). Nas imagens obtidas da cepa *wca*<sup>-</sup> (Figura 4.9, linha A) não foi observada nenhuma estrutura similar à da cepa selvagem, nos levando a acreditar que esta estrutura observada se trata da cápsula polissacarídica. Na cepa *pld*<sup>-</sup>, foram observadas estruturas ao redor das bactérias (Figura 4.9, linha A), porém estas estruturas não apresentavam mais um perfil altamente ramificado e entrelaçado como uma rede, e sim, um perfil mais delineado, onde as estruturas seguem sem se cruzar. Ainda, são observadas falhas e interrupções nessas estruturas alongadas, que não podemos definir se são artefatos do preparo da amostra ou refletem características da estrutura biológica. Por um lado, estes resultados sugerem que a

cepa *pld* apresenta uma alteração na organização da cápsula polissacarídica, que consequentemente poderia contribuir para a redução drástica da virulência desta cepa em relação à cepa selvagem. Por outro lado, nas imagens abaixo, é possível observar que as bactérias se apresentaram com aspecto enrugado, como se tivessem murchado antes da fixação. Esta observação levantou a suspeita de que as estruturas que inferimos ser a cápsula, poderiam ser um artefato experimental do preparo da amostra.

Desse modo, novas amostras foram preparadas, agora através de um novo protocolo baseado em Hai-Nan Su (2012). Nesse protocolo, as bactérias são apenas diluídas em água, secas sob nitrogênio gasoso e analisadas por AFM. As imagens de topografia 3D obtidas com este preparo estão representadas na segunda linha da figura 4.9. Essas imagens mostram estruturas muito similares àquelas observadas com o preparo anterior. Embora condizente com o resultado anterior, não foi possível observar células individualizadas, pois as bactérias foram encontradas sempre em grumos. Assim, é possível que a morfologia/estrutura da cápsula observada em bactérias em grumos não corresponda à estrutura da cápsula de bactérias individualizadas e que essas estruturas observadas ainda fossem um artefato.

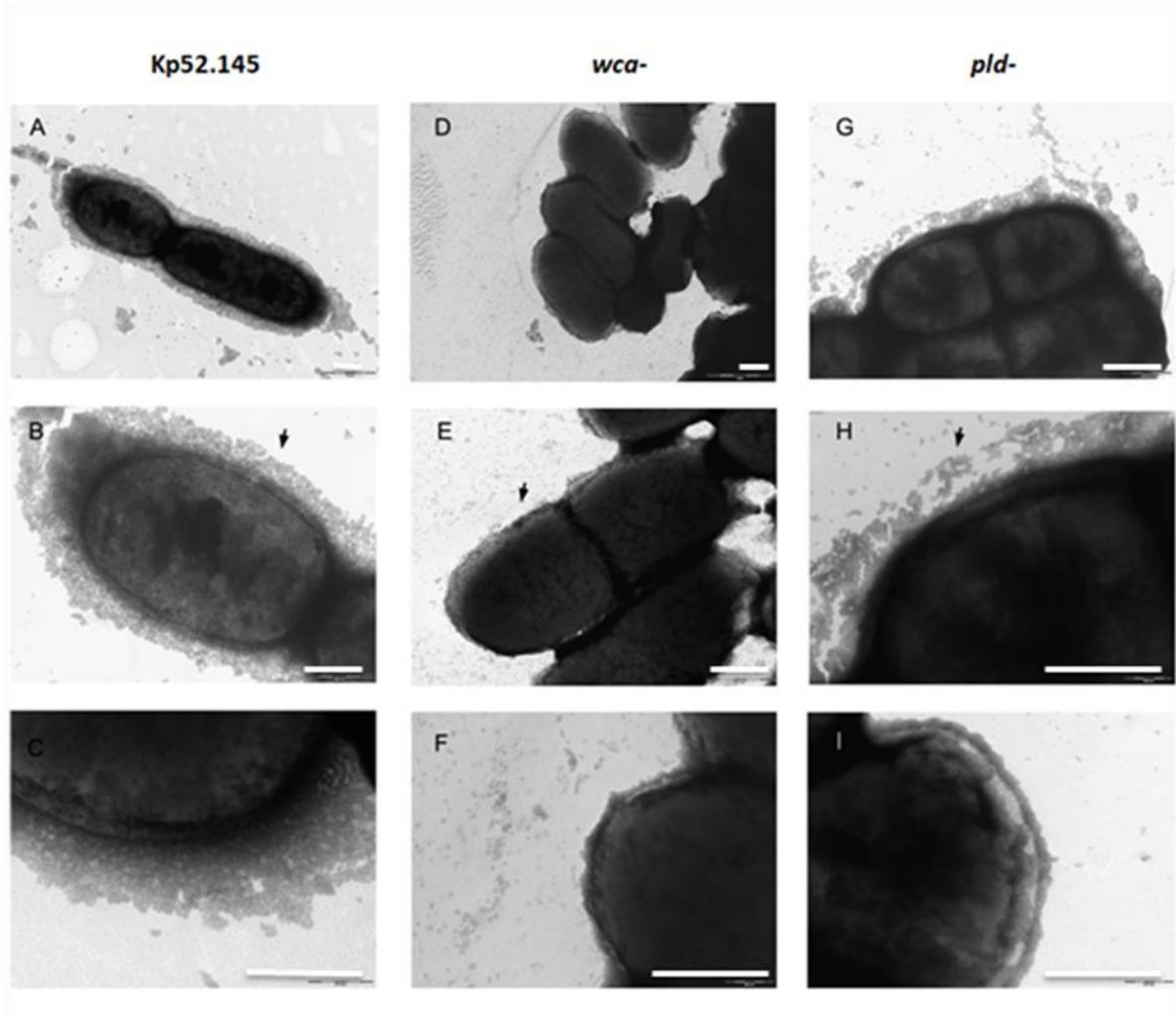
Portanto, foi testado um terceiro protocolo, no qual as bactérias fixadas foram submetidas ao protocolo de ponto crítico antes da análise por MFA. A análise destas amostras mostrou que este preparo permitiu a observação de células em estado mais natural que o preparo anterior, sem o aspecto enrugado observado na análise de MFA. Contudo, a estrutura capsular não foi identificada facilmente (Figura 4.9, linha C).



**Figura 4.9: Imagens de topografia 3D de cepas de *K. pneumoniae* visualizadas por Microscopia de Força Atômica.** A imagem mostra em coluna, por ordem, a cepa selvagem Kp52.145, a cepa mutante no gene capsular *wca* e por último, a cepa mutante do gene que codifica a proteína fosfolipase D, *pld*. As amostras representadas na primeira linha (A) foram centrifugadas, fixadas com paraformaldeído 8% e secas com nitrogênio gasoso. Na segunda linha (B) temos imagens de amostras não fixadas e diluídas em água como no método de Hai-Nan Su, também secas com nitrogênio gasoso. Na terceira linha (C), imagens de amostras processadas por Ponto Crítico. Barra de escala medindo 1  $\mu$ m.

A mesma cultura utilizada para o preparo do protocolo de ponto crítico foi preparada para análises por MET e as imagens adquiridas (Figura 4.10) mostram diferenças entre as estruturas de superfície bacteriana das três cepas testadas. A cepa selvagem Kp52.145 apresentou um envoltório denso, enquanto a *pld* apresentou uma cápsula disforme, mais

frouxa e em alguns momentos chega a não apresentar qualquer estrutura, se equiparando a cepa controle *wca*<sup>-</sup>.



**Figura 4.10: Microscopia de estruturas de superfície de cepas de *K. pneumoniae* visualizadas por contração negativa em microscopia eletrônica de transmissão.** As cepas Kp52;145, *wca*<sup>-</sup> e *pld*<sup>-</sup>, em fase exponencial de crescimento, foram depositadas em grades de microscopia recobertas com formvar e foram tratadas com o contrastante PTA a 2%. A imagem mostra na primeira coluna, de A à C, a cepa selvagem Kp52.145. Na segunda coluna, de D à F, a cepa *wca*<sup>-</sup>, mutante que não expressa cápsula; e na terceira coluna, a cepa mutante na proteína de interesse, *pld*<sup>-</sup> de G à I. Setas pretas destacam: em B, a presença da cápsula polissacarídica; em E, a ausência dessa estrutura no mutante capsular e em H, a fragilidade da cápsula da cepa deficiente na proteína PLD<sup>kp</sup>. n=1. Barra de escala representa 500 nm.

Dessa forma, conclui-se que a mutação em *pld*<sup>-</sup> afeta a organização e estrutura da cápsula polissacarídica. Considerando que os genes responsáveis pela síntese da cápsula se

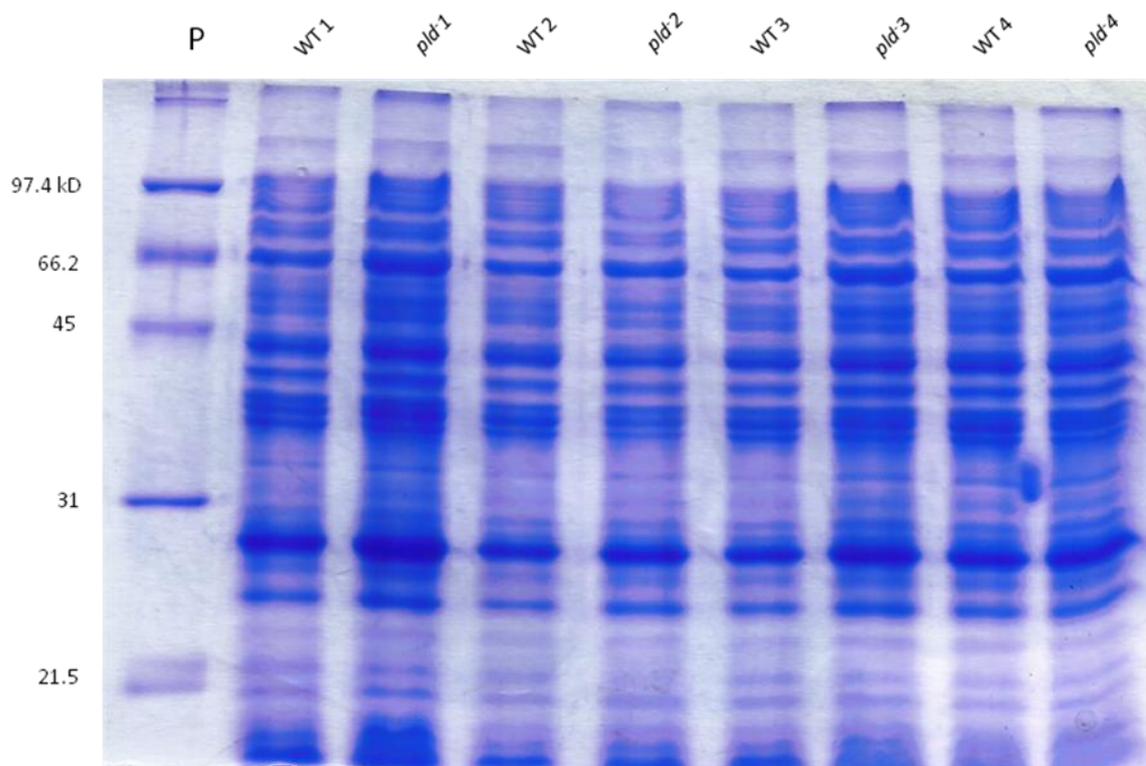
encontram numa região genômica distinta daquela que codifica a proteína PLD<sup>kp</sup>, este efeito não parece estar relacionado a mutação propriamente dita, e sim um efeito da ação da proteína PLD<sup>kp</sup>.

Contudo, de que forma a atividade da PLD<sup>kp</sup>, uma possível fosfolipase, afeta este arranjo da cápsula, ainda precisa ser estudado. As hipóteses levantadas foram de que a PLD<sup>kp</sup> poderia: 1) direta ou indiretamente regular negativamente a expressão dos genes envolvidos na síntese da cápsula polissacarídica; 2) ter alguma atividade fosfolipásica que afete a composição lipídica da membrana plasmática, conseqüentemente afetando a ligação entre cápsula e membrana, 3) afetar a expressão de proteínas envolvidas na translocação ou ancoramento da cápsula na membrana.

A primeira hipótese (PLD<sup>kp</sup> afeta a expressão de genes envolvidos na síntese da cápsula) foi considerada menos provável, visto que a cepa *pld* apresenta cápsula, apesar da organização estrutural dela ser diferente. A segunda hipótese já havia sido avaliada na literatura (50). Neste trabalho, Lery e colaboradores mostraram que cepas de *E. coli* que expressam a PLD<sup>kp</sup> apresentam alterações nos níveis de CL e PG, porém foi mostrado que a composição lipídica de membranas das bactérias selvagem e *pld* não apresenta diferenças significativas, quando analisadas por cromatografia em camada fina. Ou seja, mesmo que a PLD<sup>kp</sup> tenha alguma atividade sobre fosfolipídios da membrana bacteriana, a composição global é mantida através de mecanismos compensatórios e portanto não deve ser responsável pela alteração estrutural observada. Assim, avaliamos o perfil global de expressão de proteínas totais e de membrana externa da cepa *pld* em comparação com a cepa selvagem.

#### **4.4 Perfil de extrato proteico total**

Proteínas totais de Kp52.145 selvagem e da mutante *pld* foram extraídas em quadruplicatas e analisadas por gel de SDS-PAGE 12.5% com coloração por *Coomassie Brilliant Blue R-250*. O perfil de bandas apresentado por ambas as cepas apresentou uma grande diversidade de proteínas na faixa entre ~10 e 100 kDa (Figura 4.11), porém não foram observadas diferenças significativas entre as cepas nas condições testadas, indicando que a PLD<sup>kp</sup> não afeta de forma global a expressão proteica bacteriana.

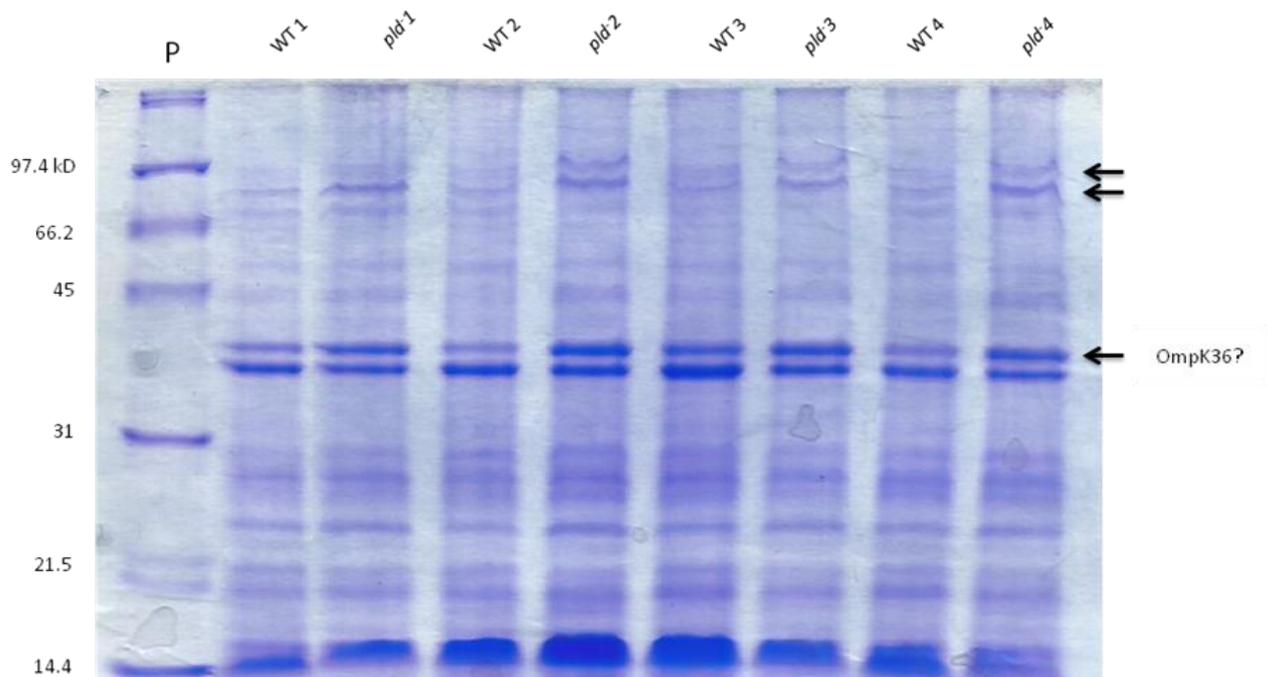


**Figura 4.11: Perfis de expressão de proteínas totais por de SDS-PAGE.** Bactérias cultivadas por 16 horas foram submetidas ao protocolo de extração de proteínas totais e analisadas por gel de poliacrilamida 12.5%. O gel representa quatro replicatas biológicas da cepa selvagem (*wt*) e da mutante *pld*. Padrão de peso molecular LOW RANGE (Bio-Rad).

#### 4.5 Perfil de proteínas de membrana externa

Considerando que proteínas de membrana externa (OMPs) são importantes para a virulência bacteriana e que são fracamente representadas no extrato total, OMPs foram extraídas em quadruplicatas, por solubilização diferencial seguida de ultracentrifugação e analisadas por SDS-PAGE 12.5% (Figura 4.12). De uma forma geral, o perfil de expressão de OMPs é similar entre as cepas, contudo, diferenças minoritárias e quantitativas foram identificadas em todas as quatro replicatas biológicas analisadas. Ao todo, três bandas se mostram mais nítidas em extratos da *pld*. No centro do gel, entre 45 e 31 kDa, aparecem duas bandas protéicas em destaque. Baseando-se no perfil de peso molecular, acredita-se que essas bandas correspondem às porinas OmpK35 e OmpK36, envolvidas em resistência e virulência de *K. pneumoniae* (79). Localizadas na membrana externa de bactérias Gram-negativas e funcionando como transportadores-não específicos, essas proteínas permitem a passagem de

moléculas como nutrientes, toxinas e antibióticos, por exemplo (80). Dessas duas, apenas a proteína OmpK36 se mostra diferencialmente expressa entre *K. pneumoniae* selvagem e o mutante *pld*. Bactérias mutantes no gene que codifica a proteína PLD<sup>kp</sup> apresentam uma expressão mais elevada da porina OmpK36.



**Figura 4.12: Perfis de expressão de proteínas de membrana externa por SDS-PAGE.** Bactérias cultivadas por 16 horas foram submetidas ao protocolo de extração de proteínas de membrana externa e analisadas por gel de poliacrilamida 12.5%. Setas indicam proteínas com expressão diferencial entre as cepas selvagem e mutante *pld*. P = Padrão de peso molecular LOW RANGE (Bio-Rad).

## 5 DISCUSSÃO

Assim como diversos agentes patogênicos, *K. pneumoniae* precisa enfrentar algumas barreiras antes de conseguir estabelecer a infecção. As barreiras iniciais são mecanismos físico-químicos de defesa do sistema imune, como o mecanismo mucociliatório do sistema respiratório, ou o baixo pH e fluxo urinário, que removem micro-organismos que tentam colonizar o hospedeiro. Ao passar por esse primeiro desafio, o patógeno é obrigado a enfrentar células do sistema imune conhecidas como fagócitos profissionais. A fagocitose é o processo pelo qual partículas são reconhecidas, se ligam à superfície das células e são internalizadas em um vacúolo intracelular derivado da membrana plasmática, conhecido como fagossomo. Em mamíferos, as principais células fagocíticas são monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Quando um microorganismo invade determinados compartimentos do corpo, ou gera lesões, células fagocíticas são atraídas quimiotaticamente para a região, ingerindo e eliminando o agente patogênico (77).

Macrófagos e neutrófilos possuem um papel crítico na eliminação de bactérias pulmonares e tem sido mostrado que a depleção dessas células resulta em uma redução da eliminação de *K. pneumoniae in vivo* (77). Considerando que macrófagos são células fagocíticas diretamente implicadas na resolução de infecções causadas por *K. pneumoniae*, e que a relação da proteína PLD<sup>kp</sup> com a virulência foi estabelecida em um modelo murino de pneumonia, macrófagos RAW 264.7 foram escolhidos para o desenvolvimento desse estudo.

Diversas enzimas fosfolipases D tem sido relacionadas à virulência bacteriana, podendo agir de maneiras bastante distintas. Algumas delas podem exercer a função de proteínas efetoras de sistemas de secreção, como as do T6SS (59). Como demonstrado por Jiang e colaboradores, proteínas fosfolipases D de *P. aeruginosa* são translocadas para o meio extracelular ou para células vizinhas por sistemas de secreção e exercem atividade citotóxica, tanto contra células eucarióticas do hospedeiro, quanto contra outros procariotos (76). Considerando que o gene que codifica a PLD<sup>kp</sup> está localizado dentro de uma região genômica que codifica para proteínas de um possível T6SS, acreditamos que a PLD<sup>kp</sup> pode ser um efetor desse sistema, possuindo células eucarióticas como alvo (50). Desse modo, a

primeira hipótese sugeria que a fosfolipase D de *K. pneumoniae* poderia estar envolvida na virulência dessa cepa através de uma ação citotóxica contra células do hospedeiro.

Para avaliar o envolvimento da proteína PLD<sup>kp</sup> na virulência dessa espécie, um ensaio de viabilidade por redução de MTT em macrófagos RAW 264.7 foi realizado. Os macrófagos foram desafiados com a cepa selvagem Kp52.145, uma mutante no gene capsular *wca* e uma cepa mutante no gene que codifica a proteína PLD. Curiosamente, nenhuma das três cepas foi capaz de causar toxicidade à linhagem murina nas condições testadas, refutando a hipótese de que este seria o seu mecanismo de ação.

Porém, a interação de *K. pneumoniae* e células de epitélio pulmonar tem sido avaliada, e os dados revelam que a infecção por Kp52.145 é capaz de disparar um efeito citotóxico em células A549, evidenciado pelo arredondamento celular e destacamento do substrato em uma MOI de 500:1 durante 5 horas (47). Sendo assim, embora Kp52.145 não tenha demonstrado atividade citotóxica contra macrófagos RAW 264.7, ainda é possível que a PLD<sup>kp</sup> tenha um papel direto agindo como toxina em outros tipos celulares.

A partir desse resultado, outras etapas da interação patógeno-hospedeiro foram avaliadas. Diversos patógenos utilizam a capacidade de adesão para se estabelecer no hospedeiro. Pilis e fímbrias são os fatores de virulência mais relacionados à capacidade de adesão bacteriana, possuindo um importante papel na adesão a mucosas, invasão celular e formação de biofilmes (25). Para avaliar se a proteína PLD<sup>kp</sup> poderia exercer influência sobre a adesão de Kp52.145, o número de bactérias aderidas foi mensurado após uma hora de interação bactéria-célula a 4°C. Nessa condição, é esperado que a bactéria seja capaz de aderir, mas não de entrar nas células. As três cepas aderiram de forma similar às células nas condições testadas. Este resultado compreende dados de duas replicatas biológicas, cada uma com três replicatas técnicas. Um terceiro experimento será realizado em breve para confirmar estes resultados, mas como não foi observada nenhuma tendência clara com os dados já obtidos, acreditamos que o papel da PLD<sup>kp</sup> não está relacionado à capacidade de *K. pneumoniae* de aderir a macrófagos.

Em seguida, avaliamos o percentual de internalização de *K. pneumoniae* por macrófagos, após 1 hora de interação, por citometria de fluxo. Aparentemente, as cepas selvagem e *pld* possuem níveis de internalização semelhantes. Esse resultado também

compreende dados de apenas dois experimentos, cada um com três replicatas técnicas. Um terceiro experimento será realizado em breve para aprimorar os dados, contudo sugerimos que a PLD<sup>kp</sup> não afeta a capacidade de macrófagos fagocitarem *K. pneumoniae*.

Como mencionado anteriormente, células fagocíticas internalizam patógenos em vacúolos, que ao transitar pela via endocítica se fundem com lisossomos, que contém enzimas com atividade antimicrobiana, que por sua vez teriam a função de eliminar o patógeno. Assim, resolvemos analisar se a internalização de *K. pneumoniae* selvagem e mutante *pld* resulta em taxas de eliminação das bactérias internalizadas de forma equivalente ou não. Para isso, avaliamos a viabilidade bacteriana em 2.5 horas após a infecção. Macrófagos RAW 264.7 foram lisados e o conteúdo celular plaqueado para contagem de UFC. Durante esse tempo, a cepa *wca*<sup>-</sup>, que mostrou maior internalização, permanece viável nas células infectadas com uma taxa superior as demais. A sobrevivência do mutante capsular parece contradizer a literatura, mas é justificada pela ausência de opsonização no modelo de cultura. Mutantes capsulares não opsonizados são mais fagocitados do que a cepa selvagem, porém sobrevivem mais que àqueles mutantes opsonizados (45) Já a cepa mutante no gene que codifica a proteína PLD<sup>kp</sup> mostrou uma sobrevivência intermediária entre as bactérias selvagem e *wca*<sup>-</sup>. Estes dados referem-se ao conjunto de sete experimentos independentes, cada um com três replicatas técnicas, e portanto, são dados confiáveis. Por um lado, este resultado mostra que a cepa *pld* (avirulenta) se comporta de forma intermediária entre a cepa selvagem (virulenta) e a cepa *wca*<sup>-</sup> (controle, avirulenta), o que justifica em parte o fenótipo avirulento da cepa *pld* que estamos tentamos explicar. Por outro lado, estranhamente, estes dados mostram que encontra-se maior número de bactérias viáveis de ambas as cepas mutantes, em 2.5 horas após a infecção, que da cepa selvagem. Uma das possíveis explicações para esta aparente contradição seria que a cepa selvagem é menos internalizada (embora não tenha significância estatística, é observada uma diferença) e escapa mais da fagocitose. Assim, as mutantes permanecem em maior número e por mais tempo dentro dos macrófagos, o que não significa que elas sobreviverão. Portanto, avaliamos também a sobrevivência bacteriana após 24 horas. O número de bactérias viáveis se equipara entre Kp52.145 selvagem e a mutante *pld*. Esses dados são representativos de apenas dois experimentos que apresentaram grande variação e, portanto, ainda serão repetidos para que tenhamos dados conclusivos.

Como dito anteriormente, *K. pneumoniae* tem demonstrado a capacidade de invadir e se translocar através de células do epitélio intestinal, onde ela subverte os sinais da via PI3K-Akt, por um mecanismo ainda desconhecido (9). Sendo assim, o potencial de escape bacteriano foi analisado. A cepa selvagem mostrou-se mais apta ao escape de células fagocíticas do que a mutante *pld*<sup>-</sup>. Já a cepa mutante capsular, parece não conseguir escapar dos mecanismos microbicidas do macrófago, embora mantenha-se viável até 24 horas. Esse dado indica que a proteína PLD de Kp52.145 pode estar relacionada ao escape de células fagocíticas.

Embora tradicionalmente seja considerada como um patógeno extracelular, *K. pneumoniae* tem demonstrado ser capaz de sobreviver em macrófagos, onde modula a interação e previne a fusão do lisossomo ao vacúolo contendo a bactéria. Essa modulação acontece via Akt-PI3K-Rab14 (44,45). Tem sido mostrado que proteínas PLD podem estar relacionadas à modulação de vias do hospedeiro, como por exemplo, as PLDs de *P. aeruginosa* que contribuem para a internalização bacteriana em células de epitélio humanas, através da modulação da via PI3K-Akt, que por sua vez pode regular o rearranjo do citoesqueleto de actina (59,76). Outra proteína, a NgPLD, se liga a Akt de forma independente de PI3K e estimula o rearranjo de actina levando a perturbações membranares e o recrutamento de CR3 para a membrana. Desse modo, acreditamos que a proteína PLD<sup>kP</sup> pode ter envolvimento no escape bacteriano de células fagocíticas.

*K. pneumoniae* é um patógeno conhecido por resistir aos mecanismos e ter grande evasão frente às defesas do sistema imune. Ela é uma bactéria altamente resistente à fagocitose e essa resistência se dá devido à produção de uma extensa cápsula polissacarídica que a protege da opsonização e de fatores bactericidas do soro (81). A cápsula de *K. pneumoniae* é um fator na colonização do trato gastrointestinal de camundongo que contribui para uma maior virulência da cepa (46). Linhagens de *K. pneumoniae* mutantes para genes capsulares são mais fagocitadas do que as cepas parentais (41). Além disso, cepas mutantes no gene capsular são mais internalizadas que cepas encapsuladas em células de epitélio pulmonar. Bactérias *K. pneumoniae* produtoras de cápsula inibem a produção de IL-8, enquanto cepas mutantes capsulares não conseguem atenuar a resposta pró-inflamatória (43). A cápsula de *K. pneumoniae* também é responsável por induzir a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em infecção pulmonar em modelo murino (42). A cápsula está

completamente relacionada à capacidade de infectividade e dano de *K. pneumoniae*. Assim, as cepas mutantes CPS são avirulentas e não possuem a habilidade de causar pneumonia ou infecções de trato urinário (47).

Para entender um pouco melhor a relação de fagocitose entre Kp52.145 e macrófagos RAW 264.7, a cápsula polissacarídica dessa cepa foi analisada tanto por microscopia de força atômica quanto por microscopia eletrônica de transmissão. As imagens revelam que a bactéria mutante no gene que codifica a proteína PLD<sup>kp</sup> apresenta uma estrutura capsular mais desorganizada, que pode estar desfavorecendo processos biológicos essenciais para a manutenção da infectividade desse patógeno. O papel da proteína PLD<sup>kp</sup> na virulência, em parte, parece estar relacionado à estrutura da cápsula polissacarídica de Kp52.145.

A fim de analisar se havia uma mudança no perfil de proteínas bacterianas na cepa selvagem, e mutante *pld*<sup>-</sup>, proteínas totais e OMPs foram extraídas. Na fração correspondente às proteínas totais, nenhuma diferença foi observada. Já na fração de OMPs, três bandas se mostravam diferencialmente expressas, estando mais presentes no mutante *pld*<sup>-</sup>. Uma das bandas com expressão alterada, possivelmente corresponde, baseando-se no padrão molecular, a uma das proteínas de membrana externa encontradas em *K. pneumoniae*: OmpK36, demonstrando que a proteína PLD<sup>kp</sup> pode desempenhar uma ação que reflete na composição de proteínas de membrana externa.

Proteínas de membrana externa possuem um papel muito importante para a interação bacteriana com o meio, sendo responsáveis pelo transporte de diversas moléculas. Alguns trabalhos têm mostrado o envolvimento de porinas na resistência e virulência de *K. pneumoniae* (82,83). Tem sido visto que cepas de *K. pneumoniae* mutantes sem OmpK36 são mais resistentes a cefazolina, cefalotina e cefoxitina. Já cepas deficientes tanto em OmpK35, quanto em OmpK36 simultaneamente mostram um aumento na concentração mínima inibitória para praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos porém, essa resistência é mais evidente em cepas que já possuem outros mecanismos de resistência (84).

Quando falamos do papel de OmpK36 na virulência, os dados mostram funções distintas e não muito claras, sendo as vezes até mesmo contraditórias. Experimentos *in vitro* usando mutantes OmpK36 de *Klebsiella pneumoniae* Kp52.145 tem demonstrado que essa ausência resulta em um aumento do número de bactérias fagocitadas por *Dictyostelium*

*discoideum* e experimentos *in vivo* revelam que existe uma diminuição da sobrevivência bacteriana em modelo murino (79). Dessa forma, a ideia que surge é a de que ter maior expressão de OmpK36 do que a cepa selvagem poderia tornar o mutante *pld*- mais virulento, contradizendo o que já foi visto em experimento *in vivo* (50)

Porém, foi visto que a presença de OmpK36 pode ativar a via clássica do complemento, tornando a bactéria mais susceptível a resposta do hospedeiro (85). Além disso, bactérias sem OmpK36 são mais resistentes a morte por opsonização (82). A falta de OmpK36 também é responsável pela diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6 (83). Bactérias deficientes em OmpK36 geram uma produção diminuída de MIP-2 (proteína inflamatória de macrófago-2), um potente fator quimiotático de neutrófilos, principal população responsável pela eliminação de *K. pneumoniae*. Desse modo, a presença elevada de OmpK36 no mutante *pld* pode fazer com que essa bactéria seja mais reconhecida por mecanismos do sistema imune inato e eliminada mais facilmente (79). Essa resposta pró-inflamatória também pode explicar o dano tecidual em fígado causado pela infecção de bactérias produtoras de OmpK36, já que essas mesmas bactérias não possuem citotoxicidade sobre células hepáticas (83). Aliado a esses dados, um estudo demonstrou que proteínas de membrana OmpK36 exercem um efeito protetor vacinal contra a infecção por *K. pneumoniae*, aumentando a produção de IgG (imunoglobulina G) (86).

Dentro dessa perspectiva, a proteína PLD<sup>kp</sup> poderia ter um efeito sobre a organização de lipídios e conseqüentemente na composição de proteínas da membrana externa de *K. pneumoniae*. Essa mudança no perfil de proteínas se reflete inclusive na composição protéica de vesículas de membrana externa. Bactérias deficientes em OmpK36 produzem vesículas de membrana externa (OMVs) com uma composição de proteínas diferenciada e que elicitam menor resposta imune (79) tornando a cepa deficiente em OmpK36 menos visível ao hospedeiro.

Alterações na proteína de membrana externa OmpK36 também influenciam no fenótipo de colônias de *K. pneumoniae* crescidas em ágar sangue. Essa alteração de fenótipo pode estar diretamente relacionada a mudanças morfológicas na cápsula polissacarídica, um dos principais fatores de virulência dessa espécie (87). O que ressaltaria os resultados obtidos pela microscopia neste trabalho. Porém, a forma como essa relação se dá, ainda não foi

estabelecida. Dessa forma, os dados aqui apresentados nos permitiram iniciar a caracterização da proteína PLD<sup>kp</sup>, contudo, eles também levantaram novos questionamentos que serão futuramente estudados pelo nosso grupo.

## 6 CONCLUSÕES

Cepas de *K. pneumoniae* Kp52.145 selvagem e mutantes *wca<sup>-</sup>* e *pld<sup>-</sup>* não são capazes de exercer citotoxicidade sobre macrófagos RAW 267.4 mediante infecção com duração de 4 horas.

A proteína PLD<sup>kp</sup> não está envolvida na adesão de *K. pneumoniae* em macrófagos RAW 267.4 durante o tempo de 1 hora.

PLD<sup>kp</sup> não afeta a internalização de *K. pneumoniae* em macrófagos durante período de 1 hora.

PLD<sup>kp</sup> afeta a sobrevivência intracelular de *K. pneumoniae* em macrófagos. Comparando as três cepas analisadas, encontramos maior número de bactérias internalizadas viáveis da cepa mutante *wca<sup>-</sup>*, valores intermediários da cepa *pld<sup>-</sup>* e menores da cepa selvagem, no tempo de 2.5 horas.

PLD<sup>kp</sup> parece estar implicada no escape bacteriano da fagocitose. Comparando as três cepas analisadas, encontramos que a cepa selvagem escapa mais do que a cepa mutante *pld<sup>-</sup>*, que por sua vez escapa mais que a cepa *wca<sup>-</sup>*.

Análises de microscopia de força atômica e eletrônica de transmissão revelam que a cepa *pld<sup>-</sup>* possui um arranjo capsular menos organizado que a cepa selvagem.

A cepa *pld<sup>-</sup>* apresenta diferenças no perfil de expressão de proteínas de membrana externa, indicando que a mutação no gene *pld* pode afetar a expressão de outros componentes bacterianos, que por sua vez afetam a virulência.

De uma forma geral, este trabalho mostra que a PLD<sup>kp</sup> afeta estruturas da superfície bacteriana e influencia a sobrevivência de bactérias fagocitadas por macrófagos. Contudo, de que forma a atividade bioquímica/molecular da PLD<sup>kp</sup> leva a estas alterações, ainda será estudado futuramente. Como perspectivas, pretendemos compreender melhor se o papel da PLD<sup>kp</sup> em outros tipos celulares do hospedeiro também é relevante para o destino da infecção.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brisse S, Grimont F, Grimont P D. The Genus *Klebsiella* Taxonomic History and Structure. *The Prokaryotes*. 2006;159–96.
2. Brooks GF, Carroll KC, Butel J, Morse SA, Mietzner T. *Medical Microbiology*. Jawetz, Melnick, & Adelberg's *Medical Microbiology*. 2013. 1 p.
3. Von Frisch A. Zur aetiologie des rhinoskleroms. *Wien Med Wschr Jahrg*. 1882;32:969–972.
4. Ullmann U. Podschun, Ullmann - 1998 - *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. 1998;11(4):589–603.
5. Perez-Lopez A, Behnsen J, Nuccio S-P, Raffatellu M. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(3):135–48.
6. Trabulsi, L. Richard; Alterthum F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2008.
7. Sikarwar a. S, Batra H V. Identification of *Klebsiella pneumoniae* by Capsular Polysaccharide Polyclonal Antibodies. *Int J Chem Eng Appl [Internet]*. 2011;2(2):130–4. Available from: <http://www.ijcea.org/show-30-358-1.html>
8. Koneman EW AS, Janda WM, Schreckenberger PC WW. *Diagnóstico Microbiológico*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medisi; 2001.
9. Hsu CR, Pan YJ, Liu JY, Chen CT, Lin TL, Wanga JT. *Klebsiella pneumoniae* translocates across the intestinal epithelium via rho GTPase-and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent cell invasion. *Infect Immun*. 2015;83(2):769–79.
10. Ghotaslou R, Ghorashi Z, Nahaei MR. *Klebsiella pneumoniae* in neonatal sepsis: A 3-year-study in the pediatric hospital of Tabriz, Iran. *Jpn J Infect Dis*. 2007;60(2–3):126–8.
11. Broberg CA, Palacios M, Miller VL. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. 2014;12(August).
12. Keen EF, Robinson BJ, Hospenthal DR, Aldous WK, Wolf SE, Chung KK, et al. Incidence and bacteriology of burn infections at a military burn center. *Burns*. 2010;36(4):461–8.
13. Bengoechea JA. *Klebsiella* sweet deadly kiss. *Virulence*. 2016;0(0):1–3.
14. Harbarth S, Kahlmeter G, Kluytmans J, Mendelson M, Hospital GS, Town C, et al. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research , discovery , and development of.

15. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol*. 2016;7(JUN):1–30.
16. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(9):785–96.
17. Girmenia C, Serrao A, Canichella M. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in Mediterranean countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):1–9.
18. Pereira PS, Felipe C, Araujo M De, Seki LM, Zahner V, Paula A, et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). 2017;11(November):312–6.
19. Janeiro D, Felipe C, Araujo M De, Silva M, Carneiro T, Ribeiro S, et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio. 2016;60(7):4380–3.
20. Pereira-Maia EC, Silva PP, De Almeida WB, Dos Santos HF, Marcial BL, Ruggiero R, et al. Tetraciclinas e glicilciclinas: Uma visão geral. *Quim Nova*. 2010;33(3):700–6.
21. Keyser P, Elofsson M, Rosell S, Wolf-Watz H. Virulence blockers as alternatives to antibiotics: Type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *J Intern Med*. 2008;264(1):17–29.
22. Sekirov I, Russell S, Antunes L. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev [Internet]*. 2010;90(3):859–904.
23. Antunes LC, McDonald JA, Schroeter K, Carlucci C, Ferreira RB, Wang M, et al. Antivirulence activity of the human gut metabolome. *TL - 5. MBio*. 2014;5 VN-re(4):14.
24. Casadevall A, Pirofski LA. Virulence factors and their mechanisms of action: The view from a damage-response framework. *J Water Health*. 2009;7(SUPPL. 1):2–18.
25. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629–61.
26. Guilhen C, Charbonnel N, Parisot N, Gueguen N, Iltis A, Forestier C, et al. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics*. 2016;17(1):237.
27. Mah TC, Toole GAO. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. 2001;9(1):34–9.
28. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. 2016;
29. Vinogradov E, Fridrich E, MacLean LL, Perry MB, Petersen BO, Duus J, et al. Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*: Elucidation of the

- structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25070–81.
30. Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedí VJ, Tomas JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun.* 1992;60(6):2529–35.
  31. Lawlor MS, Connor CO, Miller VL. Yersiniabactin Is a Virulence Factor for *Klebsiella pneumoniae* during Pulmonary Infection □. 2007;75(3):1463–72.
  32. Perez Vidakovics MLA, Jendholm J, Mörgelin M, Månsson A, Larsson C, Cardell LO, et al. B cell activation by outer membrane vesicles - A novel virulence mechanism. *PLoS Pathog.* 2010;6(1).
  33. Lee JC, Lee EJ, Lee JH, Jun SH, Choi CW, Kim S II, et al. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;331(1):17–24.
  34. Red R, Microbiology D. The Ultrastructure of the Capsules of. 1972;(1969):21–31.
  35. Amako K, Meno Y, Takade A. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol.* 1988;170(10):4960–2.
  36. Su HN, Chen ZH, Liu SB, Qiao LP, Chen XL, He HL, et al. Characterization of bacterial polysaccharide capsules and detection in the presence of deliquescent water by atomic force microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(9):3476–9.
  37. Wen Z, Zhang J. Chapter 3. Bacterial Capsules [Internet]. *Molecular Medical Microbiology, Three-Volume Set.* Elsevier Ltd; 2015. 33-54 p.
  38. Friedländer C. Notiz, die Färbung der Kapselmicrococcen betreffend. *Fortschr d Med.* 1885;3:757.
  39. Pan Y-J, Lin T-L, Chen C-T, Chen Y-Y, Hsieh P-F, Hsu C-R, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep.* 2015;5(October 2014):15573.
  40. Pan YJ, Lin TL, Chen YH, Hsu CR, Hsieh PF, Wu MC, et al. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by wzc sequencing. *PLoS One.* 2013;8(12).
  41. Struve C, Krogfelt KA. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;218(1):149–54.
  42. Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, Uchida K, Tsujimoto S, Yamaguchi K. Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. *J Med Microbiol.* 2001;50(5):456–61.

43. Regueiro V, Moranta D, Frank CG, Larrarte E, Margareto J, March C, et al. *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. *Cell Microbiol.* 2011;13(1):135–53.
44. Maisonneuve E, Cateau E, Delouche M, Quellard N, Rodier M-H. An observational study of phagocytes and *Klebsiella pneumoniae* relationships: Different behaviors. *Microbes Infect.* 2017;(January):8–15.
45. Cano V, March C, Insua JL, Aguiló N, Llobet E, Moranta D, et al. *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell Microbiol.* 2015;17(11):1537–60.
46. Favre-Bonté S, Licht TR, Forestier C, Krogfelt KA. *Klebsiella pneumoniae* capsule expression is necessary for colonization of large intestines of streptomycin-treated mice. *Infect Immun.* 1999;67(11):6152–6.
47. Cano V, Moranta D, Llobet-brossa E, Bengoechea JA, Garmendia J. *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. 2009;9:1–9.
48. Llobet E, Campos MA, Giménez P, Moranta D, Bengoechea JA. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun.* 2011;79(9):3718–32.
49. Green ER, Meccas and J. Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiol Spectr.* 2016;4(1):1–32.
50. Lery LM, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biol.* 2014;12(1):41.
51. Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(5):1528–33.
52. Cianfanelli FR, Monlezun L, Coulthurst SJ. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends Microbiol.* 2016;24(1):51–62.
53. Cascales E, Cambillau C. Structural biology of type VI secretion systems. 2012;1102–11.
54. Coulthurst SJ. The Type VI secretion system is a widespread and versatile cell targeting system. *Res Microbiol.* 2013;164(6):640–54.
55. Cascales E. Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. *PLoS Pathog.* 2014;10(3):e1003911.
56. Brunet YR, Zoued A, Boyer F, Douzi B, Cascales E. The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. *PLoS Genet.* 2015;11(10):1–21.

57. Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(39):15508–13.
58. Hachani A, Lossi NS, Hamilton A, Jones C, Bleves S, Albesa-Jové D, et al. Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: Secretion and multimerization of VgrG proteins. *J Biol Chem*. 2011;286(14):12317–27.
59. Hachani A, Wood TE, Filloux A. Type VI secretion and anti-host effectors. *Curr Opin Microbiol*. 2016;29:81–93.
60. Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D: Enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev*. 2011;111(10):6064–119.
61. Flores-Díaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, Alape-Girón A, Flieger A. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):597–628.
62. Spencer C. Biochemical characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase D. 2015;
63. Ponting CP, Kerr ID. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci*. 1996;5(5):914–22.
64. Russell AB, Leroux M, Hathazi K, Agnello DM, Ishikawa T, Wiggins PA, et al. Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors Alistair. *Nature*. 2013;496(7446):508–12.
65. Yang X, Li Z, Gao Z, Wang W, Geng Z, Xu J, et al. Structural and SAXS analysis of Tle5 – Tli5 complex reveals a novel inhibition mechanism of H2-T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. 2017;26:2083–91.
66. Jiang F, Waterfield NR, Yang J, Yang G, Jin Q. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe*. 2014;15(5):600–10.
67. Yang XY, Li ZQ, She Z, Geng Z, Xu JH, Gao ZQ, et al. Structural analysis of *Pseudomonas aeruginosa* H3-T6SS immunity proteins. *FEBS Lett*. 2016;2787–96.
68. Edwards JL, Apicella MA. *Neisseria gonorrhoea* PLD directly interacts with Akt kinase upon infection of primary, human, cervical epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2006;8(8):1253–71.
69. Hiller M, Lang C, Michel W, Flieger A. International Journal of Medical Microbiology Secreted phospholipases of the lung pathogen *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*. 2017;(June):1–9.
70. Driskell LO, Yu XJ, Zhang L, Liu Y, Popov VL, Walker DH, et al. Directed mutagenesis of the *Rickettsia prowazekii* pld gene encoding phospholipase D. *Infect*

- Immun. 2009;77(8):3244–8.
71. Whitworth T, Popov VL, Yu X, David H, Bouyer DH, Walker DH. Expression of the *Rickettsia prowazekii* *pld* or *tlyC* gene in *Salmonella enterica* serovar typhimurium mediates phagosomal escape. *Infect Immun*. 2005;73(10):6668–73.
  72. Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, Dixon JE, Schwan TG, Forsberg A. Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*. 2002;296(5568):733–5.
  73. Rudolph AE, Stuckey JA, Zhao Y, Matthews HR, Patton WA, Moss J, et al. Expression , Characterization , and Mutagenesis of the *Yersinia pestis* Murine Toxin , a Phospholipase D Superfamily Member 1999;274(17):11824–31.
  74. Schlame M. *Thematic Review Series: Glycerolipids*. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res*. 2008;49(8):1607–20.
  75. Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*. 2008;154(12):3877–86.
  76. Jiang F, Waterfield NR, Yang J, Yang G, Jin Q. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe*. 2014;15(5):600–10.
  77. March C. Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. 2013;8(2):1–16.
  78. Oelschlaeger T a, Tall BD. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect Immun*. 1997;65(7):2950–8.
  79. Turner KL, Cahill BK, Dilello SK, Gutel D, Brunson DN, Albertí S, et al. Porin loss impacts the host inflammatory response to outer membrane vesicles of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(3):1360–9.
  80. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(2):185–230.
  81. Campos M a, Vargas M a, Regueiro V, Llompарт CM, Albertí S, José A. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. *Infect Immun*. 2004;72(12):7107–14.
  82. Chen JH, Siu LK, Fung CP, Lin JC, Yeh KM, Chen TL, et al. Contribution of outer membrane protein K36 to antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(5):986–90.
  83. Article O, Access O. Contribution of Outer Membrane Porin (Omp) K36 to *Klebsiella pneumoniae* induced Liver Abscess. *Int J Clin Med Microbiol*. 2016;1:1–5.

84. Hernández-Allés S, Conejo MD, Pascual A, Tomás JM, Benedí VJ, Martínez-Martínez L. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(2):273–7.
85. Albertí S, Marqués G, Hernández-Allés S, Rubires X, Tomás JM, Vivanco F, et al. Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect Immun.* 1996;64(11):4719–25.
86. Hussein KE, Bahey-El-Din M, Sheweita SA. Immunization with the outer membrane proteins OmpK17 and OmpK36 elicits protection against *Klebsiella pneumoniae* in the murine infection model. *Microb Pathog.* 2018;119(April):12–8.
87. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae* Outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1485–93.