Hugo de Alencar Izabel

**Estudo da proteína OppA em amostras diarreio gênicas de
Escherichia coli, *Shigella* e *Salmonella***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

**São Paulo
2007**

RESUMO

Izabel HÁ. Estudo da proteína OppA em linhagens patogênicas de *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella*. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

O sistema de captação de oligopeptídeos (Opp), responsável pela captação de peptídeos com 3 ou mais resíduos de aminoácidos, representa um mecanismo importante de obtenção de nutrientes em bactérias. O operon *opp* é constituído por 5 genes, sendo *oppD* e *F* responsáveis pela codificação dos componentes geradores, *oppB* e *C* codificantes para as proteínas que delimitam o poro da membrana e *oppA* que codifica o componente ligante. Neste trabalho identificamos uma alta identidade entre as proteínas OppA expressas por diferentes cepas de *E. coli*, 4 espécies do gênero *Shigella* (99 %) e diferentes sorovares de *Salmonella enterica* (85%) e registramos a ocorrência de vários sítios polimórficos inter-específicos. A presença do gene *oppA* foi confirmada em 58 cepas diarreiogênicas de *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella*. A partir da proteína OppA recombinante foi obtido soro policlonal específico que revelou a presença da proteína em todas as linhagens estudadas. Desta forma, concluímos que a proteína OppA está presente e conservada em espécies e linhagens dos três gêneros de *Enterobacteriaceae* estudados.

Palavras chave: 1: *E. coli* 2: Sistema ABC de transporte 3: Sistema Opp;4: Oligopeptídeo permease 5: Proteínas ligadoras de peptídeos; 6: OppA

ABSTRACT

Izabel HA. Studies of OppA protein expressed by diarrheogenic *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* strains. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

The oligopeptide uptake system (Opp), involved with the uptake of peptides formed by 3 or more amino acid residues, represent important nutrient uptake mechanism. The *opp* operon is usually represented by 5 structural genes, including *oppD* and *oppF* encoding proteins involved generation of energy , *oppB* and *oppC*, encoding membrane proteins delimiting a pore and *oppA* encoding the protein responsible both for specificity and affinity of the transport system toward different peptide substrates. In this study, we demonstrated that the OppA proteins expressed by different *E. coli* strains,⁴ *Shigella* species (99%) and different serovars of *Salmonella enterica* (85%) were quite conserved but the occurrence of inter-species polymorphism was demonstrated. The *oppA* gene was detected in 58 diarrheogenic *E. coli*, *Shigella* and *Salmonella* strains. Using a recombinant OppA protein produced in *E. coli*, specific polyclonal sera were generated and successfully applied in the immunological detection of the proteins expressed by the tested strains. Thus, we conclude that the OppA protein is present and conserved among species and strains of the three test *Enterobacteriaceae* genera.

Key words: 1: *E. coli*; 2: ABC de transporter 3: Opp system; 4: Oligopeptide permease 5: Substrate Binding Protein; 6: OppA

1 Introdução

1.1 Bactérias diarreio gênicas

As diarreias infecciosas representam um grande problema de saúde pública em todo mundo. Os subúrbios das grandes cidades e regiões rurais em países em desenvolvimento são locais onde a falta de higiene e a subnutrição fazem da diarreia uma importante causa de mortalidade, principalmente infantil. Dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que diarreias são responsáveis por 1,5 bilhões de episódios que causam cerca de 3 milhões de óbitos anuais (WHO, 2006). Adultos também estão sujeitos às diarreias infecciosas, no entanto, as principais vítimas são as crianças que podem apresentar até 12 episódios de diarreia em um ano, sobretudo menores de 5 anos de idade. Esse quadro não está presente apenas nos países em desenvolvimento visto que, embora menos frequente, a diarreia ocorre em países desenvolvidos, com gastos elevados em tratamento médico e eventual perdas humanas (WHO, 2006; Nataro e Kapper, 1998).

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é um bacilo gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbico facultativo, móvel e é facilmente isolado de espécimes clínicos em meios de cultivo comuns incubados a 37°C em atmosfera de aerobiose (Famer, 1995). Essa eubactéria possui componentes de superfície que representam os antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K), sendo sua classificação sorológica baseada na identificação desses antígenos. A espécie *E. coli* é composta por linhagens com ampla distribuição no ambiente, como rios, oceanos e solos, além de estarem presentes em relação de mutualismo com diferentes espécies de mamíferos como parte da microbiota intestinal. Apesar de serem, em geral, habitantes saprófitas do organismo, alguns componentes desta espécie bacteriana adquiriram genes que os permitiram causar doenças intestinais ou extra intestinais, levando sua classificação de acordo com suas características patogênicas.

As linhagens patogênicas são divididas em entéricas e não-entéricas, sendo estas últimas responsáveis por infecções do trato urinário (*Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC), meningite, pneumonia e septicemias. Tomando-se por base a produção de fatores de virulência específicos, os tipos de interação com linhagens celulares e a patogenicidade para animais de laboratório, as amostras de *E. coli* diarreio gênicas podem ser classificadas em seis categorias: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* que adere

está associada com a presença de um plasmídeo de 230 Kb que codifica várias proteínas envolvidas no processo de invasão (Small e Falkow, 1988). Embora o mecanismo de patogenicidade de EIEC não tenha sido esclarecido em detalhes, acredita-se que seja muito semelhante ao descrito para *Shigella*, devido à proximidade entre os gêneros, no entanto ao contrário de *Shigella dysenteriae* 1 a EIEC não produz a toxina de Shiga, fato esse que justifica a ausência da síndrome hemolítica urêmica em infecções por EIEC. (Levine, 1987; Lan et al., 2004). Para que ocorra o processo infeccioso por *Shigella* é necessário um inóculo maior de bactérias se comparado ao de EIEC (DuPont et al., 1971).

A bactéria *Shigella*, um bacilo gram-negativo está dividido em 4 grupos (ou espécies); *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* e *S. boydii* (Parsot, 2005). A *Shigella boydii* e a *Shigella sonnei* são predominantes em áreas mais desenvolvidas, ao passo que amostras de *Shigella flexneri* e *Shigella dysenteriae* são responsáveis por shigelose endêmica em regiões menos desenvolvidas e em países em desenvolvimento. Epidemias de shigelose são quase sempre acometidas pela *Shigella dysenteriae* tipo I, produtora da toxina de Shiga (Na-Ubol et al., 2006). A presença de uma toxina foi observada em amostras de *S. flexneri* que é codificada por genes cromossômicos e se assemelha a uma enterotoxina detectada em duas amostras de EIEC. Essa enterotoxina, denominada de ShET2, é termolábil e de massa molecular de 62 kDa, cujos genes foram seqüenciados em EIEC, e estaria associada com a fase de diarreia aquosa no estágio da doença que antecede a disenteria (Fasano et al., 1990; Nataro et al., 1995). Essa bactéria possui patogenicidade semelhante à de EIEC, sendo o modelo mais aceito para o seu processo de infecção a penetração da bactéria no epitélio intestinal através de células M, permitindo seu engolfamento por um macrófago residente. Dentro do macrófago, *Shigella* escapa do fagossomo e mata esta célula por indução de apoptose. Estudos *in vitro* mostraram que após a entrada, a bactéria lisa a membrana do fagossomo, multiplica-se e se espalha no citoplasma através de filamentos de actina, em torno de 40 minutos. Uma resposta inflamatória promove sua fagocitose por células não fagocíticas, o que permite a invasão e disseminação da bactéria nos enterócitos, levando a destruição dos mesmos (LaBrec et al., 1964).

O processo de entrada de *Shigella* em enterócitos ocorre via um processo de macropinocitose, semelhante a *Salmonella*. Do contato da bactéria com a superfície da célula epitelial, rearranjos do citoesqueleto são induzidos, causando ondulações (*ruffles*) localizadas na membrana da célula. Esses rearranjos do citoesqueleto são caracterizados pela indução ou

difusamente (DAEC) *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) (Levine, 1987; Yamamoto et al., 1992; Nataro e Kaper, 1998).

A EPEC é o principal agente etiológico de diarreia em crianças menores de 1 ano de idade em países em desenvolvimento (Carbonare et al., 2003). Esse grupo é composto por sorotipos bem definidos de *E. coli* que são subdivididos em EPEC típicas; os quais caracterizam-se, principalmente pela produção da fímbria BFP (*bundle forming pilus*) (Girón et al., 1991-a), por seu padrão de aderência localizada (LA) a células HeLa (Scaletsky et al., 1984), e pela presença da região LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) (McDaniel et al., 1995), além de produzir a característica lesão A/E (*attachment and effacement*) e por EPEC atípicas, que não possuem o plasmídeo EAF e, portanto não produzem BFP (Moon, et al, 1983; Nataro e Kaper, 1998).

A EHEC apresenta diversos fatores de virulência em comum com as EPEC como a presença da região LEE e a capacidade de produzir lesões do tipo *attachment and effacement*. Esta categoria patogênica está associada a quadros de colite hemorrágica que em 10% dos casos são sucedidos pela síndrome urêmica-hemolítica (SHU), quadros esses associados à sua capacidade de elaborar duas citotoxinas, *Shiga-like toxin 1* (Stx1) e *Shiga-like toxin 2* (Stx2) (Tarr, 1995).

A ETEC é o principal agente causador da diarreia do viajante. Esse grupo compreende cepas de *E. coli* que colonizam a mucosa do intestino delgado e elaboram pelo menos um dos membros de dois grupos definidos de enterotoxinas, termo-lábil (LT) e termo-estável (ST) (Levine, 1987). A toxina LT de *E. coli* é oligomérica e intimamente relacionada à toxina colérica (CT) produzida por *Vibrio cholerae* (Sixma et al., 1993). LT promove o aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico via ativação da adenilato ciclase o que leva à ativação da quinase A (proteína quinase dependente de cAMP) que fosforila os canais de cloreto. Isto resulta na estimulação da secreção de cloreto pelas células da cripta e inibição da absorção de cloreto de sódio pelas células da ponta das vilosidades. O conteúdo aumentado de íons no lúmen intestinal resulta em uma diarreia osmótica (Nataro e Kaper, 1998). Ao contrário de LT, ST é uma toxina pequena com vários resíduos de cisteína que formam pontes de dissulfeto, as quais contribuem para a estabilidade ao calor desta molécula. ST promove aumento de GMP cíclico, levando à estimulação da secreção de cloreto e/ ou inibição da absorção de cloreto de sódio, resultando em secreção intestinal de fluido (Crane et al., 1992).

Além destas toxinas, as cepas de ETEC produzem os fatores de colonização (CFAs) que promovem aderência e colonização da mucosa intestinal (Gaastra e Svennerholm, 1996).

A DAEC representa o termo “aderência difusa” que foi usado inicialmente para descrever cepas de *E. coli* que aderiam a células HEp-2, mas que não formavam microcolônias (LA) como EPEC. O padrão de aderência apresentado por estas cepas foi denominado de adesão difusa (DA) (Scaletsky et al., 1984), o qual caracteriza-se pela presença de bactérias aderidas sobre toda a superfície celular, e está associada à expressão de uma das duas adesinas descritas até o momento, a adesina afimbrial AIDA-1 e a fimbria F1845 (Benz e Schimit, 1989; Bilge et al., 1989). Sua importância como agente diarréico ainda é controversa, há relatos mostrando nenhuma correlação com DAEC e diarreia (Gomes et al., 1989) enquanto outros demonstram uma relação estreita entre estas bactérias e diarreia infantil (Girón et al., 1991-b; Jallat et al., 1993).

A EAEC é caracterizada por sua habilidade de aderir a monocamadas de células em cultura em padrão agregativo (AA) ou de “tijolos empilhados” (Nataro et al., 1987). O fenótipo AA está associado com a presença de um plasmídeo de aproximadamente 65 MDa, pAA (Nataro et al., 1985). Estas bactérias constituem um grupo bastante heterogêneo, compreendendo diferentes sorotipos que possuem vários prováveis fatores de virulência. Dentre estes, podemos citar a produção de diferentes tipos de toxinas, proteínas de membrana externa, fímbrias envolvidas no processo de adesão e a indução da liberação de IL-8 (Czczulin et al., 1997; Steiner et al., 2000).

Na década de 60, alguns autores observaram que várias amostras de *E. coli* compartilhavam com bactérias do gênero *Shigella* a capacidade de induzir uma ceratoconjuntivite ao serem inoculadas nos olhos de cobais, sugerindo uma capacidade de invasão das amostras de *E. coli* (Sereny, 1963; Trabulsi et al., 1965; Trabulsi et al., 1967). Em vários casos, a disenteria causada por essas amostras era semelhante àquela provocada por *Shigella* spp. (Trabulsi et al., 1965; Ogawa et al., 1968), observações foram confirmadas posteriormente por DuPont et al., (1971) em um experimento com voluntários. Essa nova classe de enteropatógeno, com capacidade de invadir e proliferar dentro das células epiteliais, causando morte dessas células foi denominado EIEC. A EIEC caracteriza-se por sua capacidade de invadir e proliferar dentro de células intestinais, causando morte celular e acúmulo de polimorfonucleares, produzindo um quadro disentérico. A capacidade de invasão

recrutamento de numerosos focos de filamentos de actina na face interna da membrana citoplasmática no sítio de interação entre superfícies bacteriana e celular (Adam et al., 1995; Zychlinsky et al., 1996).

Salmonella é um patógeno entérico de alta prevalência e importância em humanos e animais. O mecanismo de contaminação por *Salmonella* se dá, em geral, através do consumo do alimento contaminado de origem animal (principalmente carne, aves domésticas, ovos e leite), embora muitos outros alimentos, incluindo os vegetais verdes contaminados mal lavados, sejam implicados em sua transmissão (WHO, 2006). Taxonomicamente são descritos dois gêneros de *Salmonella*: *S. enterica* (6 subespécies) e *S. bongori* (1 subespécie). Membros dessas sete subespécies podem ser sorotipados em um ou mais de 2500 diferentes sorovares de acordo com o antígeno somático (O) e flagelar (H). Os sorovares do gênero *S. enterica* possuem sua patogênese bem definida, sendo responsáveis por morbidades e mortalidades em diferentes partes do mundo, apresentando a capacidade de infectar diversos hospedeiros e de promover infecções persistentes nesses, servindo como reservas para sua transmissão (Brenner et al., 2000; Boyle et al., 2007). Alguns sorovares como *S. Typhi* e *S. Paratyphi* são altamente adaptados a humanos, enquanto outros como *S. Typhimurium* tem um largo espectro de hospedeiros, infectando uma grande variedade de animais (Chiu et al., 2005).

S. Typhimurium causa no homem gastroenterite sem graves complicações não necessitando de tratamento. No entanto, em pacientes mais jovens, nas pessoas idosas e em imunocomprometidos, as gastroenterites podem gerar seqüelas ou conseqüências mais graves como a bacteremia (Lai et al, 2007). As gastroenterites constituem um grande problema em saúde pública, representando um custo significativo à sociedade. Poucos países relatam dados do custo econômico da doença, por exemplo, nos Estados Unidos da América o custo total associado com salmonelose é estimado em US\$ 3 bilhões anuais enquanto que na Dinamarca, este custo é estimado em aproximadamente US\$ 15.5 milhões representando aproximadamente 0.009% do PIB (WHO, 2006).

O sucesso para a colonização e infecção de bactérias patogênicas entéricas depende da capacidade de obter nutrientes dos ambientes que as envolvem. São conhecidos quatro tipos de sistemas de transportes de nutrientes em bactérias. O primeiro sistema utiliza canais protéicos que formam poros na membrana citoplasmática que funcionam por difusão facilitada sem gasto de energia. O segundo catalisa o transporte “uni”, “anti” ou “simporte” de solutos. O terceiro é representado pelos transportadores primários que empregam a hidrólise do ATP

como fonte de energia para transporte ativo e o quarto e último grupo de transportadores consiste nos translocadores que fosforilam seus substratos durante o seu transporte (Paulsen et al., 2000).

1.2 Sistemas de transporte

Os sistemas de transporte dependentes de energia são classificados como primários e secundários, em função do tipo de energia empregada. Os sistemas primários utilizam energia gerada pela clivagem do ATP, enquanto que os sistemas secundários fazem uso de outras fontes de energia celulares, como força protomotora. Entre os transportadores primários, destacam-se aqueles que ligam ATP, também chamados de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassete*). Os transportadores ABC são amplamente distribuídos em todos os organismos vivos, em particular, entre as bactérias (Ames et al., 1992) e apresentam uma estrutura conservada entre archaea, eubactéria e eucarionte (Leprohon et al., 2006).

1.3 Sistema ABC

Os sistemas de transporte do tipo ABC são constituídos por complexos formados por várias subunidades, envolvidas no transporte de substâncias, como diversos íons, aminoácidos, peptídeos, polissacarídeos e proteínas, através de membranas biológicas. Transportadores ABC são classificados como importadores ou exportadores dependendo da direção de deslocamento da substância em relação à célula. Sistemas ABC de transporte dedicados à importação ou captação de substâncias são encontrados exclusivamente em bactérias (Braibant, et al., 2000).

Os sistemas ABC são constituídos por dois domínios hidrofóbicos que atravessam a membrana citoplasmática denominados DIMs (Domínios Integrais de Membrana) que são representadas pelas proteínas integradas nas membranas formando poros e são associadas com dois domínios citoplasmáticos ligadores de nucleotídeos, denominados DLNs (Domínios de Ligação de Nucleotídeos), proteínas associadas a membrana citoplasmática que estão associadas a hidrólise do ATP para energizar o sistema. Em muitos transportadores ABC bacterianos, estes quatro domínios são expressos como polipeptídeos independentes codificados por genes organizados em operon(s) (figura 1).

Os sistemas de transporte ABC de bactérias envolvidos na captação de nutrientes possuem, em geral, um terceiro e último componente envolvido com a ligação do substrato,

denominado proteína ligadora de substrato (LS-Ligador do Substrato). Em bactérias gram-negativas, este componente aparece disperso no espaço periplasmático (figura 1A) e em bactérias gram-positivas, as quais não possuem um espaço periplasmático, as LSs são lipoproteínas extracelulares ligadas a face externa da membrana citoplasmática por uma acil-gliceril-cisteína na porção N-terminal. Essa ancoragem é responsável por manter as LSs próximas da vizinhança dos componentes de membrana (figura 1B) (Dassa, 2000).

Figura 1: Esquema representativo da captação de oligopeptídeos pelo sistema Opp em bactérias gram-negativas A e gram-positivas B, respectivamente. Nas bactérias gram-negativas a proteína OppA encontra-se no periplasma e nas gram-positivas está ancorada à membrana citoplasmática na forma de uma lipoproteína

A bactéria *E. coli* possui 57 ABC transportadores, destes 44 são importadores e 13 são exportadores, e podem estar envolvidos em processos de transporte de açúcares, aminoácidos e peptídeos, sais e metais entre outros (Linton , 2007).

Os DLNs dos transportadores ABC, ligam-se ao ATP e os hidrolizam para o processo de transporte e possuem diversas regiões conservadas apresentando uma similaridade de aproximadamente 30-40%. As regiões de alta conservação deste domínio são representados pelos motivos Walker A e Walker B, seqüências curtas de 6 aminoácidos envolvidas diretamente com a ligação a molécula de ATP (Linton e Higgins, 1998). Além destas os DLNs apresentam uma seqüência consenso denominada de assinatura ABC (LSGGQ), comum para todas as ATPases e característico de transportadores ABC. Esses três motivos são extremamente importantes, pois são estruturas conservadas das ATPases nos três reinos: archaea, bacteria e eucaria e seu elevado grau de conservação permite a identificação

presuntiva de transportadores ABC em genomas bacterianos (Figura 2 e 3) (Doolittle et al., 1986; Linton e Higgins, 1998; Chakraborty, 1999; Braibant et al., 2000; Linton, 2007).

Os DIMs consistem de quatro a oito α -hélices (usualmente seis) formadores de um canal que permite a translocação do substrato através da membrana e são conhecidos por apresentarem grande diversidade em suas seqüências, diferindo dos DLNs. Apesar desta variabilidade de seqüências, os DIMs podem ser classificados em algumas sub-famílias envolvidas com transporte de substâncias relacionadas. Essa característica é devida a presença de algumas seqüências compartilhadas como a alça EAA (ácido glutâmico e 2 argininas) que se localiza a 100 resíduos da porção C-terminal (Mourez et al., 1997).

A disposição espacial dos quatro domínios supra citados pode diferir dentre os diferentes substratos transportados e os diversos organismos em que estejam presentes. Esses domínios podem estar presentes como proteínas independentes ou fusionadas (Higgins, 2001). Esta fusão pode implicar na ausência de determinados motivos, como demonstrado pela ausência da alça EAA, característica da fusão entre os domínios DIMs e DLNs, confirmando uma hipótese de que este sítio tem uma função na interação entre os mesmos (Braibant et al., 2000).

Figura 2: Estrutura de um sistema de transporte ativo exportador pertencente à família ABC. DIM, representa os Domínios Integrais de Membrana; DLN, representa os Domínios de Ligação de Nucleotídeo. As regiões mais conservadas, que caracterizam as proteínas da família ABC, estão destacadas na figura com suas seqüências de aminoácidos apresentadas.

FONTE: Adaptado de Linton 2007, com permissão.

Figura 3: Disposição estrutural do Domínio de Ligação de Nucleotídeo. As regiões conservadas e suas relações estruturais são demonstradas na figura

FONTE: Adaptado de Linton 2007, com permissão.

1.4 Sistema Opp

Os peptídeos representam um elemento importante na nutrição da maioria dos seres vivos, em particular das bactérias. Assim sendo, a capacidade de captar peptídeos torna-se uma propriedade essencial para a sobrevivência das bactérias em diferentes ambientes (Payne e Gilvarg, 1968; Hilles e Higgins, 1986). Em bactérias entéricas como *E. coli* e *S. Typhimurium* existem pelo menos três sistemas distintos de transporte de peptídeos que foram detalhadamente estudados: o sistema de transporte de dipeptídeos (Dpp), o sistema de transporte de tripeptídeos (Tpp) e o sistema de captação de oligopeptídeos (Opp) (Guyer et al., 1985; Hilles e Higgins 1986).

O sistema Opp representa o principal sistema de transporte de peptídeos nas enterobactérias e é codificado por 5 genes, localizados na região correspondente aos 37 minutos do mapa genético de *E. coli* K12. O componente DIM do sistema Opp em *E. coli* e *S. Typhimurium* é responsável pela definição do poro na membrana citoplasmática e corresponde aos produtos dos genes *oppB* e *oppC*. O segundo componente do sistema Opp, os DLNs, são codificados pelos genes *oppD* e *oppF*. Finalmente, o componente LS é codificado pelo gene *oppA*, o primeiro cístron do operon *opp*. Em *E. coli* e *Salmonella*, os genes responsáveis pela síntese destas proteínas estão organizados na forma de um operon policistrônico (Higgins et al., 1983; Hilles e Higgins 1986; Hilles et al., 1987; Young e Holland, 1999).

Sistemas Opp de transporte têm sido descritos em diferenças espécies bacterianas, sendo os oligopeptídeos internalizados via esse sistema de transporte a chave para identificar

seu papel na nutrição, sinalização e virulência em bactérias. Dois operons *opp*, *opp-1* e *opp-2* foram primariamente identificados em *Staphylococcus aureus*, no entanto, análises sistemáticas *in silico* de 11 diferentes genomas de *S. aureus*, revelaram a existência de dois novos operons, *opp-3* e *opp-4* e um gene isolado, *opp-5A*, responsável por codificar a proteína ligadora de substratos. Estudos com mutantes nos genes destes operons demonstraram que apenas o operon *opp-3* demonstrou ser o responsável pela captação de oligopeptídeos necessários para o crescimento. O papel dos demais sistemas Opp desta bactéria ainda precisam ser descobertos (Hiron et al., 2007).

Em *Bacillus subtilis*, foram descritos dois sistemas de captação de peptídeos, os sistemas Opp e App. O sistema Opp mostra-se funcional e desempenha um papel importante na esporulação e no desenvolvimento do estado de competência genética (Perego et al., 1991; Rudner et al., 1991). O sistema App não foi caracterizado, mas aparentemente não é funcional, em virtude da presença de uma mutação de troca de referencial no gene que codifica o componente LS (Koide e Hoch, 1994).

A doença de Lyme é causada por um grupo de espiroquetas do gênero *Borrelia*. Proteínas do envoltório celular dessas bactérias são importantes na interação hospedeiro-parasita durante a infecção, incluindo a participação em processos de aderência e invasão celular e na ativação de células do sistema imunológico. Ao contrário da maioria das espécies de bactérias nas quais foi identificado o sistema Opp, *Borrelia burgdorferie*, assim como outras espécies do gênero, apresentam 3 cópias do gene responsável pela síntese do componente LS, o que segundo os autores reforçaria a importância do sistema Opp na patogênese das espécies desse gênero de bactérias (Kornacki e Oliver, 1998).

1.5 Proteína OppA

Os componentes LSs dos sistemas de transporte são responsáveis pela afinidade e especificidade desses aos seus respectivos substratos. Em bactérias gram-negativas esses componentes são representados por proteínas ligantes localizadas no periplasma. As proteínas ligadoras de oligopeptídeos (OppA) de diferentes espécies bacterianas possuem tamanhos que variam de 55 a 77 kDa e sua afinidade, bem como especificidade, variam de acordo com o microrganismo em que se encontram (Guyer et al., 1985; Hilles e Higgins, 1986; Tame et. al., 1994; Monnet, 2003). Essas proteínas são versáteis e podem acomodar peptídeos de 2 a 18 resíduos, independentes da composição de aminoácidos. A importância dessa proteína pode

ser mensurada pela observação de sua alta concentração quando comparada com os outros componentes do sistema Opp, como observado em *S. Typhimurium*, na qual a proteína OppA supera em aproximadamente 50 vezes a concentração dos outros componentes Opp (Higgins et al., 1983; Monnet, 2003).

A OppA é, em geral, uma das proteínas mais abundantes no periplasma de enterobactérias (Hiles e Higgins, 1986). O estudo da estrutura cristalina desta proteína em *S. Typhimurium* revelou três domínios de organização: Domínio I compreendendo os aminoácidos entre 1 a 44, 169 a 270 e 487 a 517; Domínio II compreendido entre 45 a 168; Domínio III compreendido entre 271 a 486 e ao contrário de outras proteínas ligadoras, o seu ligante fica acomodado numa cavidade composta de cadeias laterais de peptídeos formada pelo domínio I (aminoácidos 32 a 34) e III (aminoácidos 415 a 417).

Dois dos domínios presentes nas superfícies da OppA são estruturalmente análogos ao de outras proteínas ligadoras de substrato. Estes dois domínios, I e III, são ligados por dois segmentos que permitem a abertura e fechamento dos mesmos e, apesar de sua estrutura semelhante, não existe sequência similar entre OppA e outras proteínas periplasmáticas de estrutura conhecida. Por outro lado, o domínio II, não possui sua função conhecida, nem semelhança, com os domínios de outras proteínas periplasmáticas.

Em *S. Typhimurium*, alguns aminoácidos são responsáveis pela interação com o ligante, como os aminoácidos R⁴¹³, H³⁷¹ que aparecem como formadores de pontes salinas com o grupo carboxílico de ligantes tri e tetrapeptídeos enquanto o aminoácido K³⁰⁷ o faz com ligantes pentapeptídeos. Duas cadeias laterais mostram-se importantes para a conformação dos “*pockets*” (estrutura que envolve o ligante). A primeira cadeia lateral é composta pelos aminoácidos V³⁴ e C^{271 e 417} enquanto que a segunda é composta pelos aminoácidos W^{397 e 416} e L⁴⁰¹ (Tame et. al., 1994).

Existem também evidências de que a proteína OppA possa ter um papel relevante na comunicação celular através de sinais químicos constituídos por peptídeos. O comportamento quimiotático em bactérias e a ativação de genes em função da densidade da cultura bacteriana são exemplos de respostas que podem depender de OppA para sua expressão (Park et al., 1998; Fuqua et al., 1994).

Em *E. coli* K12, existe um parólogo da OppA, a MppA, similar em tamanho e com identidade de 46% em relação a OppA, mas sua concentração no periplasma é muito menor se comparada a OppA. A MppA trabalha com os mesmos componentes de membrana do sistema Opp, demonstra uma alta afinidade por muropeptídeos e atua na captação e reciclagem de peptídeos da parede celular (Park et al., 1998; Bina et al., 2002).

6 Conclusões

- Como principal conclusão desse estudo destaca-se a demonstração do alto grau de conservação do sistema Opp em três espécies de *Enterobacteriaceae* e, particularmente, da proteína OppA. Esses resultados demonstram a aparente relevância desse sistema de transporte de captação de peptídeos e abrem perspectivas para pesquisas relacionadas à nutrição, fisiologia e virulência nessas espécies bacterianas.
- O sistema Opp de transporte de *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella* é constituído de 5 genes (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*) organizados na forma de um operon em cópia única, de acordo com análise feita a partir dos genomas conhecidos dessas espécies de *Enterobacteriaceae*.
- As análises de similaridade feitas com as seqüências de aminoácidos das proteínas OppA de cepas de *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella* confirmaram a maior proximidade filogenética entre as *Shigella* e linhagens de *E. coli*.
- A seqüência de aminoácidos da proteína OppA de *E. coli* / *Shigella* apresentam vários sítios polimórficos em relação a *Salmonella*.
- O gene *oppA*, detectado por reação em cadeia da polimerase (PCR), e a proteína *oppA*, detectada com anticorpo anti-OppA, foram demonstrados em todas as amostras estudadas de *E.coli*, *Shigella* e *Salmonella*.
- Testes de sensibilidade a triornitina demonstraram a funcionalidade do sistema Opp de duas amostras patogênicas de *E. coli*.

Bibliografia

Adam T, Arpin M, Prévost MC, Gounon P e Sansonetti PJ (1995) Cytoskeletal rearrangements and functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cell. J. Cell Biol. v. 129, p. 367-381.

Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, L. Leomil, et al (2007) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. Inter. J. Food Microbiol. v. 115, p. 297-306.

Ames GF, Mimura CS, Holbrook SR e Shyamala V (1992) Traffic ATPases: a superfamily of transport proteins operating from *Escherichia coli* to humans. Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. v. 65, p. 1-47.

Benz I e Schmidt MA (1989) Cloning and expression of an adhesion (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. J. infect. Immun. v. 63, p. 3417-3421.

Bilge SS, Clausen CR, Lau W e Morseley SL (1989) Molecular characterization of a fimbrial adhesion, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. J. Bacteriol v. 171, p. 4281-4289.

Bina X, Perreten V e Levy SB (2002) The periplasmatic protein MppA requires an additional mutated locus to repress marA expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriology. p. 1465-1469.

Blanco M, Blanco JE, Blanco J, de Carvalho VM e Onuma DL (2004) Typing of Intimin (*eae*) Genes in Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains from Monkeys. J. Clin. Microbiol. v. 42, p. 1382-1383.

Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, et al (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. J. Science, v. 277, p. 1453-1474.

Boyle EC, Bishop JL, Grassl GA e Finlay BB (2007) *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. J. Bacteriol v. 189, p. 1489-1495.

Braibrant M, Gilot P e Content J (2000) The ATP binding cassette transport systems of *Micobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol.v. 24, p. 449-467.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R e Swaminathan B (2000) *Salmonella* Nomenclature. J. Clin. Microbiol. p. 2465-2467.

Carbonare CB, Carbonare SB e Carneiro-Sampaio MMS (2003) Early acquisition of serum and saliva antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins by infants living in an endemic area. Pediatr. Allergy. Immunol. v. 14, p. 222-228.

Chakraborty H (1999) Functional interaction of yeast elongation factor 3 with yeast ribosomes. Int. J. Biochem. Cell. Biol. v. 31, p. 163-173.

Chen LS, Hung CS, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, et al (2006) Identificação of gene subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: A comparative genomics approach. J. PNAS v. 103, nº15, p. 5977-5982.

Chiu CH, Tang P, Chu C, Hu S, Bao Q, et al (2005) The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive resistant zoonotic pathogen. J. Nucleic Acids 33:1690-8.

Crane JK, Wehner MS, Bolen EJ, Sando EJ, Linden J, et al (1992) Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) and protein kinase C. J Infect. Immun. v. 60, p. 5004-5012.

Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R et al. (1997) Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. v. 65, p. 4135-4145.

Dassa E (2000) ABC transport. New York, USA: Academic Press, 2000. p. 1-12.

Doolittle RF, Johnson MS, Husain I, Van Houten B, Thomas DC, et al (1986) Domainal evolution of prokaryotic DNA repair protein and its relationship to active-transport proteins. J. Nature v. 323, p. 451-453.

DuPONT HP, Formal SB, Hornick RB, Snyder MJ, LibonatiJP, et al (1971) Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. J Med. N. Engl.v. 285, p. 1-9.

Famer JJ (1995) *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. Manual of Clinical Microbiology. 6° ed. Washington, D .C.

Fasano A, Kay BA, Russel RG, Manewal DR e Levine MM (1990) Enterotoxin and citoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. J. Infect. Immun. v. 58, p. 3714-3723.

Fuqua WC, Winans SC e Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol. v. 176, p. 269-275.

Gaastra W e Svennerholm AM (1996) Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). J Trends Microbiol v. 4, p. 444-452.

Girón JA, Ho ASY e Schoolnik GK (1991)a An Inducible bundle forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. J Science v. 254, p. 710-713.

Girón JA, Jones T, Millán-Velasco F, Castro-Muños E, Zarate L, et al (1991)b Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. J Infect. Dis v. 163, p. 507-513.

Gomes TAT, Blake PA e Trabulsi LR (1989) Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. J. Clin. Microbiol v. 27, p. 266-269.

Guyer CA, Morgan DG, Osheroff N e Staros JV (1985) Purification and characterization of a periplasmic oligopeptide binding protein from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. v. 260, p. 10812-10818.

Guyer DM, Kao J-S e Mobley HLT (1998) Genomic Analysis of a Pathogenicity Island in Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: Distribution of Homologous Sequences among Isolates from Patients with Pyelonephritis, Cystitis, and Catheter-Associated Bacteriuria and from Fecal Samples. Infect. Immun. v. 66, p. 4411–4417.

Higgins CF, Hardie MM, Jamieson D e Powell LM (1983) Genetic map of the *opp* Oligopeptide permease locus of *Salmonella* Typhimurium. J. Bacteriol., v. 153, p. 830-836.

Hilles ID, Gallagher MP, Jamieson DJ e Higgins CF (1987) Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella* Typhimurium, J. Mol. Biol., v.195, p. 125-142.

Hilles ID, Higgins CF (1986) Peptide uptake by *Salmonella* Typhimurium The periplasmatic oligopeptide-binding protein. Eur. J. Biochem., v.158, p.561-567.

Hiron A, Borezée-Durant E, Piard JC e Juillard V (2007) Only One of Four Oligopeptide Transport Systems Mediates Nitrogen Nutrition in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol.v. 189, p. 5119-5129.

Jallat C, Livrelli V, Darfeuille-Michaud A e Rich JB (1993) *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. J. Clin. Microbiol. v. 31, p. 2031-2037.

Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, et al (2002) Genome sequence of *Shigella flexneri* 2A: insight into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. J. Nucleic Acids v. 30, p. 4432-4441.

Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamale P e Johnson SJ (2007) The Genome Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1:H7 Shares Strong Similarities with Human Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Genomes. J. Bacteriol. v. 189, p. 3228-3236.

Koide A, Hoch J (1994) Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation. Mol. Microbiol, v. 13, p. 417-426.

Kornacki JA, Oliver DB (1998) Lyme disease-causing *Borrelia* species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters. J. Infect. Immun. v. 66, p. 4115-4122.

LaBrec EH, Schneider H, Magnani TJ, Formal SB, et al (1964) Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. J Bacteriol v. 88, p. 1503-1518.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. v.227, p.680-685.

Lai CY, Huang LT, Ko SF, Chuang JH, Lin JW, Tiao MM (2007). *Salmonella* gastroenteritis complicated with bacteremia and ruptured cholangitis in an infant with congenital choledochal cyst. J. Formos. Med. Assoc. v. 106, p. s20-s23.

Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB e Reeves PR (2004) Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J. Infect. Immun. v. 72, p. 5080–5088.

Leprohon P, Le'gare' D, Girard I, Papadopoulou B e Ouellette M (2006) Modulation of *Leishmania* ABC Protein Gene Expression through Life Stages and among Drug-Resistant Parasites. J Eukariotic Cell p. 1713–1725.

Levine MM (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. v. 155, p. 377-389.

Linton JK (2007) Structure and Function of ABC Transporters. J Physiology v. 22, p122-130.

Linton KJ e Higgins CF (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. Mol. Microbiol. v. 28, p. 5-13.

Liou WDS-R, Plunkett III G, Mayhew GF, Rose DJ e Burland V (2003) Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18. J. Bacteriol. v. 185, p. 2330–2337.

Liu SL, Sanderson KE (1995) The chromosome of *Salmonella* paratyphi A is inverted by recombination between *rrnH* and *rrnG*. J. Bacteriol. v. 177, p. 6585-6592.

Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C, Lopes MM (1999) A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase reaction. J. Microbiol. Methods. v. 37, p. 23 –31.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AC e Randall RJ (1951) Protein measurement with the foling phenol reagent. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265-275.

McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, et al (2001) Complete genome sequence of *Salmonella entérica serovar* Typhimurium LT2. J. Nature v. 413, p. 852-856.

McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS e Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enerobacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA v. 92, p. 1664-1668.

Monnet V (2003) Bacterial oligopeptide-binding proteins. Cell Mol Life Sci. v. 60, p. 2100-2014.

Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Gianella RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. J Infect. Immun v. 41, p. 1340-1351.

Mourez M, Hofnung J, Dassa E (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. J EMBO v. 4, p. 2287-2293.

Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval DR, Guers LD, et al (1995) Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strais. J Infec. Immun. v. 63, p. 4721-4727.

Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. v. 11, p. 142-201.

Nataro JP, Steiner TS, Guerrant RR (1998b) Enteroaggregative *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. v. 4, p. 251-261.

Na-Ubol M, Samosorornsuk S, Seidlein V, Tapchaisri P, Ali M, et al (2006) Molecular characteristics of *Shigela* spp. Isolated from patients with diarrhoea in new industrialized area of Thailand. Epidemiol. Infect. p. 1-7.

Neu HC e Hepell LA (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. J. Biol Chem. v. 240, p. 3685-3692.

Nicholas HBJR e McClain WH (1995) Searching tRNA sequences for relatedness to aminoacyl-tRNA synthetase families. J. Mol. Evol. v. 40, p. 482-486.

Ogawa H, Nakamura A, Sakazaki R (1968) Pathogenic properties of enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhea from children and adults. J Jap. Med. Sci. Biol. v. 21, p. 339-349.

Park JT, Raychaudhuri D, Li H, Normak S e Mengin-Lecreulx D (1998) MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl- γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelate. J. Bacteriol v. 180, p. 1215-1223.

Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, et al (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar CT18. J. Nature 413:858-52.

Parsot C (2005) *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. J. Microbiol. Letters. v. 252, p. 11-18.

Paulsen IT, Nguyen L, Sliwinski MK, Rabus R, Saier MHJR (2000) Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. J. Mol. Biol. v. 301, p. 75-100

Perego M, Higgins CF, Pearce SR, Gallagher MP e Hoch JA (1991) The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. Mol. Microbiol., v. 5, p.173-185.

Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, et al (2001) Genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J. Nature 409:529-33.

Rudner DZ, Ledeaux JR, Ireton K, Grossman AD (1991) The SPOOK locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. J. Bacteriol. v. 173, p. 1388-1398.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 1.24-1.26.

Scaletsky ICA, Silva MLM e Trabulsi LR (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. J Infect. Immun. v. 45, p. 534-536.

Serény B (1963) Biochemical reactions and virulence of *E. coli* O124, K72 (B17). J. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. v. 10, p. 8-11.

Sixma TK, Kalk KH, Van Zanten BA, Dauter Z, Kingma J, et al (1993) Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. J. Mol. Biol. v. 230, p. 890-918.

Small PLC, Falkonw S (1988) Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells. J. Infect. Immun. v. 56, p. 225-229.

Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith CE, Smith JA, et al (2000) Enteraggative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. J. Clin. Invest. v. 105, p. 1769-1777.

Sugawara H, Abe T, Gojobori T, Tateno Y (2007) DDBJ working on evaluation and classification of bacterial genes in INSDC. Nucleic Acids. v. 35, p. 13-15.

Tame JRH, Murshudov GN, Dodson EJ, Neil TK, Dodson GG, et al (1994) The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. J Science v. 264, p. 1578-1581.

Tarr PI (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. J. Infect. Immun. v. 60, p. 1-10.

Trabulsi LR, Fernandes MRF e Zuliani ME (1967) Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. Revista Inst. Méd. Trop. v. 9, p. 31-39.

Trabulsi LR, Zuliani ME e Serrano JA (1965) On two new enterobacteria pathogenic to the guinea pig eye (cultures 185T-64 and 193T-64). J. Inst. Med. Trop. v. 7, p. 241-246.

WHO., Initiative for vaccine research (IVR). Disponible in:
http://www.who.int/vaccine_research/diseases/e_e_coli/en/http:www.who.org/infectious-disease-report/ Acesso em data (10/04/2006).

Yamamoto T, Escheverria P e Yokota T (1992) Drug resistance and adherence to human intestines of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Infect. Dis., v. 165, p. 744-749.

Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, et al (2005) Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. J. Nucleic Acids v. 33, p. 6445-6458.

Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, Watanabe M e Kimura S (2000) Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. v. 258, p. 12139

Young J, Holland IB (1999) ABC transporters: Bacterial exporters-revisited five years on. Biochim. Biophys. Acta. v. 1461, p. 177-200.

Zychlinsky A, Thirumalai K, Arondel J, Cantey JR, Aliprantis AO, et al (1996) In Vivo Apoptosis in *Shigella flexneri* Infections. Infect. Immun. v. 64, n. 12, p. 5357-5365.