

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**ESTUDO GENÉTICO E FENOTÍPICO DOS**  
**OPERÕES *fsr* E *gelE-sprE* EM DIFERENTES**  
**ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS***

**Neuza dos Prazeres Lima Teixeira**  
**Mestrado em Microbiologia Clínica**

**2008**

**Esta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa de 14 de Outubro de 2008.**

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**ESTUDO GENÉTICO E FENOTÍPICO DOS**  
**OPERÕES *fsr* E *gelE-sprE* EM DIFERENTES**  
**ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS***

**Neuza dos Prazeres Lima Teixeira**

**Mestrado em Microbiologia Clínica**

**Dissertação orientada pela Doutora Maria de Fátima Silva Lopes**

**Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.**

## **AGRADECIMENTOS**

### **AGRADEÇO....**

Ao ITQB e IBET, instituições que me acolheram e me permitiram realizar este trabalho. À Faculdade de Medicina por me ter permitido frequentar este mestrado e ao meu co-orientador Mário Ramirez pela gentileza de me ter aceite e auxiliado na dissertação.

À minha orientadora Fátima Lopes, por me ter aceite orientar este trabalho e por ter acreditado em mim desde o primeiro momento, pelas oportunidades para crescer no mundo científico, pela força incondicional e, claro, pela amizade sincera e carinho que sempre me deu.

Ao meu orientador Paulo Marujo por me ter ajudado em todas as fases do meu projecto de mestrado, por me ter ensinado tudo o que sei sobre RNA e por me ter ajudado a compreender a Biologia Molecular, pelo tempo que passou comigo a discutir resultados, pela sincera amizade, força e, claro, pela paciência que sempre demonstrou.

À minha colega e amiga Teresa pela força, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório e pela ajuda na microbiologia. À minha colega Tânia pela ajuda que me deu desde os primeiros dias no laboratório, pela força, amizade e alegria. Ao meu colega Tiago pelos bons momentos de “partilha de secretária e bancada” e aos meus restantes colegas de laboratório: Martas, Renata, Daniela e Doudou, pela força e boa disposição. À Doutora Teresa Crespo pela oportunidade de bolsa que me deu. À Paula pela força, amizade, alegria e ajuda no laboratório.

Aos meus pais, pelo carinho e apoio incondicional em toda a minha formação académica e profissional. À minha irmã Susana, ao Nuno e ao Afonso pela força, alegria e partilha de momentos únicos.

Ao Ricardo pelo seu grande amor, pela paciência nos dias de maior stress, pela ajuda na escrita da dissertação, pelo ombro amigo, pelo sorriso e alegria que sempre me deu.

Às minhas grandes amigas Margarida e Cláudia por estarem sempre lá quando precisei de um ombro amigo.

Aos meus amigos David, Carina e Rita pelo apoio e força nos momentos bons e maus da elaboração desta dissertação.

A todos os restantes familiares, amigos e colegas que ao longo deste tempo me deram uma palavra de apoio!

**OBRIGADO A TODOS .....**

## RESUMO

*Enterococcus spp.* são bactérias Gram-positivas presentes em diversos ambientes e que tem emergido como causadores de infecções nosocomiais graves. Têm sido identificados em diferentes espécies genes envolvidos na sua virulência, entre eles os operões *fsr* e *gelE-sprE*. A expressão do operão *gelE-sprE* é regulada pelo operão *fsr* via “quorum sensing” envolvendo o péptido GBAP. Recentes estudos mostraram a existência de estirpes com todos os genes destes operões mas sem a capacidade de degradar a gelatina em meio sólido (teste da gelatinase). O objectivo deste trabalho foi o estudo desta incongruência.

A presença dos genes dos referidos operões e a actividade da gelatinase foram estudados em *E. faecalis* (LN68, LN66, QSE125 e QA29b), *E. durans* (QN8, QSE15 e LSE4) e *E. faecium* (QSE32). Apesar de todas as estirpes apresentarem todos os genes dos operões somente duas estirpes, QSE32 e QA29b, apresentaram fenótipo gelatinase positivo. Os operões *fsr* e *gelE-sprE* foram sequenciados nas estirpes QSE32 e LN68 e as sequências comparadas com a sequência da estirpe V583. Identificaram-se diferentes mutações, destacando-se na estirpe QSE32 uma mutação que conduz à produção de GBAP com uma estrutura diferente e, na estirpe LN68, uma mutação responsável pela síntese da histidina cinase FsrC truncada afectando o domínio HATpase.

O possível efeito das mutações encontradas foi também analisado sobre o processamento dos transcritos primários produzidos por estes operões nas estirpes QSE32 e LN68. Os resultados preliminares obtidos parecem indicar um processamento dos transcritos *fsrA* e *fsrBDC* nas estirpes QSE32 e LN68 distinto do observado na estirpe V583.

A virulência das estirpes *E. faecalis* LN68 e QA29b, *E. durans* LSE4 e *E. faecium* QSE32, foi estudada nos modelos *C. elegans* e *G. mellonella*, verificando-se que as espécies

*E. faecium* e *E. durans* são menos virulentas que *E. faecalis* e não foi encontrada correlação entre a virulência e o fenótipo gelatinase.

**Palavras-chave:** *Enterococcus*; *fsr*; GBAP; Gelatinase; virulência.

## ABSTRACT

*Enterococcus spp.* are Gram Positive bacteria found in diverse environments and which have emerged as the cause of serious nosocomial infections. Genes involved in its virulence, in particular *fsr* and *gelE-sprE* operons, have been detected in different species. The expression of *gelE-sprE* operon is regulated by the *fsr* operon in a quorum sensing way involving the GBAP peptide. Recent studies have shown the existence of strains with all genes of those operons, but without the ability to degrade gelatinase in solid medium (gelatinase test). The objective of this work was the study of this incongruity.

The presence of the genes of those operons and the gelatinase activity were screened in *E. faecalis* (LN68, LN66, QSE125 and QA29b), *E. durans* (QN8, QSE15 and LSE4) and *E. faecium* (QSE32) strains. All strains had all genes, but only two, QSE32 and QA29b were, able to degrade gelatinase. The *fsr* and *gelE-sprE* operons were sequenced in the strains QSE32 and LN68 and compared with the sequence of *E. faecalis* V583 strain. Different mutations were identified, of which we highlight, in QSE32 strain, one mutation leading to the production of GBAP with a different structure and, in LN68 strain, one responsible for a truncated histidine kinase FsrC affecting the HATpase domain.

The possible effects of the mutations were also analyzed on the processing of the primary transcripts produced by those operons from QSE32 and LN68 strains. Preliminary results suggest that the processing of *fsrA* and *fsrBDC* transcripts in these strains is distinct of that of V583 strain.

The virulence of *E. faecalis* LN68 and QA29b, *E. durans* LSE4 and *E. faecium* QSE32 strains was studied in *C.elegans* and *G. mellonella* animal models. The species

*E. faecium* and *E. durans* were less virulent than *E. faecalis* and no correlation between the gelatinase phenotype and virulence was found in these species.

**Keys - words:** *Enterococcus*; *fsr*; GBAP; Gelatinase; Virulence.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

*agr* – accessory gene regulator

AIP – autoinducer peptide

AIs - autoinducers

BHI – brain heart infusion

*C. elegans*- Caenorhabditis elegans

D.O.P. – denominação de origem protegida

DSMZ – Deutsch Sammlung von Mikroorganism and Zellkulturen

DNA - deoxyribonucleic acid

DNTPs – deoxyribonucleotide trisphosphate

*E. durans* – Enterococcus durans

*E. faecalis* – Enterococcus faecalis

*E. faecium* – Enterococcus faecium

*E. coli* - Escherichia coli

EUA – Estados Unidos da América

*fsr* – *E. faecalis* regulator

*G. mellonella* – Galleria mellonella

GBAP – gelatinase biosyntheses activating pheromone

GelE - gelatinase

h - horas

IBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica

INRA - l' institut National de la Recherche Agronomique

ITQB – Instituto de Tecnologia Quimica e Biológica

kb – kilo pares de base

LN – leite de niza

LN66 – *E. faecalis* LN66

LN68 – *E. faecalis* LN68

LSE – leite da serra da estrela

LSE4 – *E. durans* LSE4

MDR - Multi-Drug Resistance

min - minutos

mRNA – RNA messageiro

NCBI - National Center for Biotecnology Information

nt - nucleótidos

pb – pares de base

PCR – polimerase chain reaction

QA – queijo de Azeitão

QA29b – *E. faecalis* QA29b

QN – queijo de Niza

QN8 – *E. durans* QN8

QS – qorum sensing

QSE – queijo da serra da estrela

QSE15 – *E. durans* QSE15

QSE32 – *E. faecium* QSE32

QSE125 – *E. faecalis* QSE125

*S. aureus* – Staphylococcus aureus

S.A.V.E. – Stress Antibiotic and Virulence in Enterococci

SD – shine dalgarno

SprE – serine protease

sRNA – small RNA

TM – temperatura de melting

tRNA – RNA de transferência

VRE – vancomycin resistance Enterococci

V583 – *E. faecalis* V583

RHK – receptor histidine kinase

RNA – Ribonucleic Acid

RR – response regulator

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1 – Estirpes usadas neste estudo.</b> Identificação, espécie e origem alimentar das estirpes utilizadas. ...	21
<b>Quadro 2 – “Primers” utilizados, sequências e temperaturas de “melting” (TM).</b> .....	24
<b>Quadro 3 – Programa padrão utilizado nos PCRs utilizados.</b> .....	25
<b>Quadro 5 – Tipos de Mutações Gênicas.</b> Apresentação dos três tipos de mutações genicas e respectivas sub-categorias <sup>38</sup> .....	39
<b>Quadro 6 – Classificação dos aminoácidos.</b> A classificação dos aminoácidos divide-se em quatro grupos: apolares, polares neutros, polares básicos e polares ácidos. Este quadro foi efectuado com base de Griffiths <i>et al.</i> <sup>38</sup> .....	40
<b>Quadro 7 – Mutações identificadas nos operões <i>fsr</i> e <i>gelE-sprE</i> na estirpe <i>E. faecium</i> QSE32.</b> Identificação das mutações nos operões <i>fsr</i> e <i>gelE-sprE</i> da estirpe QSE32, respectiva posição na cadeia 3’-5’ (cadeia -), zona do operão (gene afectado), mudança de nucleótido e aminoácido e respectivo tipo de mutação. (*) Indica que são mutações dentro da zona intergénica e por isso não têm classificação de mutações de substituição. ....	43
<b>Quadro 7 – (continuação)</b> .....	44
<b>Quadro 8 – Mutações observadas nos operões <i>fsr</i> e <i>gelE-sprE</i> na estirpe <i>E. faecalis</i> LN68.</b> Identificação das mutações nos operões <i>fsr</i> e <i>gelE-sprE</i> da estirpe Ln68, respectiva posição na cadeia 3’-5’ (cadeia -), zona do operão (gene afectado), mudança de nucleótido e aminoácido (com a comparação do V583), e respectivo tipo de mutação. (*) Indica que são mutações dentro da zona intergénica e por isso não têm classificação de mutações de substituição. ....	47
<b>Quadro 8 – (continuação)</b> .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1 – Esquema comparativo de QS em bactérias Gram positivas (A) e negativas (B).** (A) A ligação de um péptido (assinalado a verde) a um receptor da histidina cinase (RHKs) (assinalada a vermelho) activa as fosforilações ou desfosforilações, e, por sua vez, activa a resposta reguladora (RR), resultando no controlo da expressão de um ou mais genes. (B) Pequenas moléculas (“homoserine lactones”) (assinaladas a azul) difundem-se do meio extra para o intracelular ligando-se ao regulador (R), estabilizando-o e desencadeando a expressão dos genes respectivos <sup>70</sup> ..... 10

**Figura 2 – Esquema do funcionamento do sistema de QS *agr* em *Staphylococcus sp.*** Este esquema foi adaptado de Kong *et al.* (2006). A proteína AgrB localizada na membrana está envolvida na maturação e exportação do péptido AIP. Quando se atinge uma determinada concentração de células e consequentemente de AIP, este péptido liga-se à proteína AgrC que promove a fosforilação do AgrA, que por sua vez activa os promotores P2 e P3, originando os transcritos RNAII e RNAIII <sup>63</sup> ..... 11

**Figura 3 – Organização geenómica dos operões *fsr* e *gelE-sprE* em *E. faecalis*.** Apresentação dos genes *fsrA* e *fsrB/fsrD/fsrC* e *gelE/sprE*, respectivos promotores Pe, Pb e Pa, e tamanho. Os genes dos operões *fsr* e *gelE-sprE* encontram-se na cadeia 3’-5’. Os “harpins” localizados a jusante do gene *fsrA*, *fsrB/fsrD/fsrC* e *gelE/sprE* representam os terminadores transcripcionais (⌘) ..... 12

**Figura 4 - Esquema representativo do mecanismo proposto para a activação transcricional do operão *fsr* e respectivo efeito na síntese de gelatinase e protease sérica em *E. faecalis*.** Este esquema é adaptado (com actualizações) de Gilmore, *et al.* (2002). Neste modelo, a GBAP é sintetizada sob a forma de uma molécula precursora (GBAP\* vermelha) através do *fsrD*, e processada pela proteína FsrB originando a GBAP madura (GBAP verde). Esta, ao ser secretada para o meio extracelular e depois de atingir uma determinada concentração, interage com a histidina cinase (FsrC), que fosforila o regulador (FsrA) que por sua vez regula os promotores Pb e Pe. Gilmore *et al.* (2002) propõe a existência de uma molécula X para a regulação dos promotores Pb e Pe <sup>34</sup>. ..... 13

**Figura 5 – Estrutura da GBAP (“Gelatinase Biosynthesis Activating Pheromone”) <sup>82</sup> ..... 13**

**Figura 6 - Esquema dos operões *fsr* e *gelE-sprE* em *E. faecalis*.** Identificação das zonas amplificadas por cada par de “primer”. A azul está representada a zona de amplificação dos “primers” *fsrA5EcoRI* e *fsrA3PstI* (1153 pb); a verde para os primers *fsrB5’EcoRI* e *fsrB3’PstI* (976 pb); a laranja para os “primers” *fsrC5’EcoRI* e *fsrC3’PstI* (1573 pb); a rosa para os primers *gelE5’EcoRI* e *gelE3’PstI* (1868 pb); a cinzenta *sprE5’EcoRI* e *sprE3’PstI* (1065 pb). Os promotores transcripcionais estão identificados por Pa, Pb e Pe. Os “harpins”

localizados a jusante do gene *fsrA*, *fsrB/fsrD/fsrC* e *gelE/sprE* representam os terminadores transcripcionais (⊘).  
 ..... 23

**Figura 7 – Esquema representativo da síntese dos RNAs *in vitro*.** **A** - Síntese dos RNAs controlos *in vitro*. Foram utilizados os pares de primers *rfsrD/T7mfsrD* e *fsrB/T7mfsrB* para a amplificação de fragmentos de DNA para os genes *fsrD* e *fsrB*, respectivamente. A extensão T7 foi adicionada na extremidade 5' do primer da cadeia codificante para os genes *fsrB* e *fsrD* (cadeia negativa) para que o RNA produzido seja igual aos RNAs da estirpe V583. **B** – Síntese das sondas radioactivas. Foram utilizados os pares de primers *T7fsrD/mfsrD*, *T7fsrB/mfsrB* e *T7fsrA/mfsrA* para a amplificação de fragmentos de DNA para os genes *fsrD*, *fsrB* e *fsrA*, respectivamente. Estes amplicons foram amplificados com a extensão correspondente ao promotor da RNA polimerase T7 na extremidade 5' (extensão a vermelho) do primer da cadeia complementar da cadeia codificante dos genes estudados. .... 31

**Figura 8 – Esquema do ciclo de vida de *C. elegans*.** O ciclo de vida de *C. elegans* é constituído por 4 estadios de larvas – L1, L2, L3 e L4 até chegar a fase adulta. Em condições de ausência de alimento, este nemátodo entra no estadio “dauer larva” conseguindo sobreviver a condições adversas durante vários meses. Quando as condições se tornam favoráveis, a larva sai deste estadio e entra no L4<sup>49</sup>. .... 32

**Figura 9 – Identificação das mutações identificadas nas zonas intergénicas dos genes *fsrA*, *fsrB*- *fsrD*- *fsrC* e *gelE-sprE* da estirpe QSE32.** Sequências intergénicas dos operões *fsr* e *gelE-sprE* com identificação das zonas reguladoras (sublinhados a verde), mutações (vermelho) e respectivas posições apresentadas no quadro 7 e Anexo 1 (números a preto)..... 42

**Figura 10 – Identificação das mutações identificadas nas zonas intergénicas dos genes *fsrA*, *fsrB*- *fsrD*- *fsrC* e *gelE-sprE* da estirpe LN68.** Sequências intergénicas dos operões *fsr* e *gelE-sprE* com identificação das zonas reguladoras (sublinhado verde), mutações (vermelho) e posições apresentadas no quadro 7 e no Anexo 1(números a preto). .... 46

**Figura 11 – Sequência das proteínas FsrA das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento da sequência das proteínas FsrA da estirpe controlo V583 e das estudadas LN68 e QSE32 - e alterações de aminoácidos que foram identificados. O Alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.1..... 50

**Figura 12 – Domínios putativos da proteína FsrA.** Esquema representativo dos domínios da FsrA das estirpes LN68 e QSE32, constituído por um REC (“Signal receiver domain”), LytTR (“LytTr DNA-binding domain”) e LytT (“Response regulator of the LytR/AlgR family”) <sup>48</sup>..... 50

- Figura 13 – Sequências das proteínas FsrB das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteínas FsrB da estirpe controlo V583 e das estudadas LN68 e QSE32 - e alterações de aminoácidos que foram identificados. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.2. .... 52
- Figura 14 – Domínio putativo da proteína FsrB.** Esquema representativo do domínio da proteína FsrB identificado nas estirpes LN68 e QSE32, constituído por um domínio AgrB (“Accessory gene regulator B”) <sup>47</sup>. 52
- Figura 15 - Sequência das proteínas FsrD das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteínas FsrD das estirpes estudadas e controlo – e alterações de aminoácidos que foram identificadas. Esta sequência encontra-se entre o aminoácido 190 e aminoácido 243 da proteína FsrB. O quadrado preto identifica a sequência da GBAP madura. A identificação do codão de iniciação foi efectuada conforme a literatura <sup>84</sup>. ..... 53
- Figura 16 – Sequência das proteínas FsrC das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteínas FsrC da estirpe controlo V583 e das estudadas LN68 e QSE32 – alterações de aminoácidos que foram identificados. O quadro preto identifica a mutação sem sentido. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.3. .... 54
- Figura 17 – Domínios putativos da proteína FsrC de *E. faecalis* V583.** Esquema representativo dos domínios de FsrC de *E. faecalis*, constituído por um domínio envolvendo HATPase\_c (“Histidine kinase”) e 7tm\_4 (envolvido no mecanismo de transmissão de sinal) <sup>47</sup>. .... 55
- Figura 18 - Sequências das gelatinases das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteínas gelatinases da estirpe controlo V583 e das estudadas LN68 e QSE32. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.4. .... 56
- Figura 19 – Domínios putativos da gelatinase.** Esquema representativo dos domínios da gelatinase das estirpes LN68 e QSE32, constituído por um FTP (“Fungalysin/Thermolysin Propetide Motif”), Peptidase\_M4 (“Termolysin metallopeptidase”), Peptidase\_M4\_C (“Termolysin metallopeptidase”) e LasB (“Zinc Metalloprotease”) <sup>47</sup>. .... 57
- Figura 20 – Sequências de aminoácidos das zonas conservadas do centro activo das gelatinases das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das zonas conservadas do centro activo das gelatinases em que se mantém inalterados. O quadro preto identifica o domínio conservado. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.4. .... 57

**Figura 21 - Sequência das proteases séricas das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteases séricas da estirpe controlo V583 e das estudadas LN68 e QSE32 – alterações de aminoácidos que foram identificadas. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.5..... 58

**Figura 22 – Domínios putativos da protease sérica.** Esquema representativo do domínio COG3591 da protease sérica das estirpes LN68 e QSE32 <sup>47</sup> ..... 58

**Figura 23 – Sequências nucleótídicas da zona da mutação sem sentido encontrada na estirpe LN68, das estirpes V583, QSE32, LN68, LN66, QN8, QSE125 e QSE15.** Alinhamento das sequências das estirpes em estudo, na zona da mutação sem sentido (nucleótido n.º. 3004) identificada na estirpe LN68. O alinhamento completo também se encontra no Anexo 1.2. .... 59

**Figura 24 – Curvas de crescimento das estirpes *E. faecalis* V583, *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32.** Leitura da Absorvância (600nm) ao longo do tempo (min) ..... 63

**Figura 25- Curvas de crescimento das estirpes *E. faecalis* LN68, *E. faecium* QSE32 e *E. faecalis* V583 (A1, A2 e A3) e respectivos RNAs extraídos (B1, B2 e B3).** A1- Curva de crescimento da estirpe LN68 A2- Curva de crescimento da estirpe QSE32. A3- Curva de crescimento da estirpe V583. B1 – Imagem da migração do RNA total da estirpe LN68. B2 – Imagem da migração do RNA total da estirpe QSE32. B3 – Imagem da migração do RNA total da estirpe V583. Os pontos em que se extraíram RNA encontram-se identificados a laranja nos gráficos A1, A2 e A3 e identificados pelos números: 1 (meio da fase exponencial), 2 (final da fase exponencial), 3 (final da fase exponencial), 4 (início da fase estacionária) e 5 (fase estacionária). As imagens dos géis apresentadas (B1, B2 e B3) são o resultado da migração de 2,5 µg de RNA num gel 0,8% de agarose por electroforese. Os RNAs ribossomais (23S, 16S e 5S) estão identificados. A quantidade de RNA obtida correspondente ao ponto 1 da estirpe V583 não foi suficiente para migrar num gel de agarose..... 64

**Figura 26- Identificação das sondas *fsrD*, *fsrB* e RNAs controlo *in vitro* *fsrB* e *fsrD* num excerto do operão *fsr*.** A sonda *fsrD*, assinalada a vermelho, foi construída com os primers T7fsrD(1) e mfsrD e tem um tamanho de 193 nt. A sonda *fsrB* (laranja) foi construída com os primers T7fsrB e mfsrB e tem um tamanho de 537 nt. O *fsrB in vitro* (RNA controlo), representado com setas verdes, foi construído com os primers T7mfsrB e fsrB e têm um tamanho de 707 nt. O *fsrD in vitro* (RNA controlo), assinalado a azul, foi construído com os primers T7mfsrD e rfsrD e têm um tamanho de 182 nt..... 65

**Figura 27- Curva de crescimento da estirpe *E. faecalis* V583 (A3) e respectiva análise por Northern-blot do transcrito *fsrD* (C3) utilizando a sonda *fsrD*.** A3- Curva de crescimento da estirpe V583. C3 – Imagem do Northern-blot obtido com a sonda *fsrD* para a estirpe V583. O Northern-blot foi efectuado num gel de acrilamida

de 6% e o xileno cianol migrou 14 cm. **M1** corresponde ao marcador pUC Mix Marker 8 (Fermentas); **M2** ao marcador pBR322-*MspI* digest (Biolabs). Os controlos estão identificados como *fsrB* e *fsrD*, que correspondem aos RNAs *fsrD* e *fsrB* sintetizados *in vitro*. As setas a vermelho identificam os transcritos *fsrB-fsrD* (739 nt) e *fsrD* (174 nt). Os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 assinalados no gráfico A3 correspondem aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 da imagem C3. Estes representam as zonas da curva de crescimento em que foi extraído RNA total. .... 65

**Figura 28- Transcritos esperados (A) e observados (B) na estirpe controlo V583.** **A-** Esquema representativo dos genes *fsrB*, *fsrD* e *fsrC* do operão *fsr* e respectivos transcritos esperados. O transcrito putativo *fsrB-fsrD-fsrC* corresponde a um valor aproximado de 2080 nt; o transcrito putativo *fsrB-fsrD* corresponde a um valor aproximado de 740 nt e o transcrito putativo *fsrD* aproximadamente 174 nt. Estes tamanhos moleculares foram medidos a partir de SD (Shine-Dalgarno) até ao codão de terminação. **B** – Parte da imagem do gel de acrilamida da figura 27 com a identificação dos transcritos obtidos (quadrado e seta vermelha). O transcrito *fsrB-fsrD* e o transcrito *fsrD* identificados em B têm um tamanho molecular aproximado aos transcritos esperados apresentados em A. SD” – Shine-Dalgarno putativa. A SD e a SD” têm como base a literatura<sup>84,94</sup>. .... 66

**Figura 29- Curva de crescimento da estirpe *E. faecium* QSE32 (C2) e respectiva análise por Northern-blot do transcrito *fsrD* (C2) utilizando a sonda *fsrD*.** **A2-** Curva de crescimento da estirpe QSE32. **C2** – Imagem do Northern-blot obtido com a sonda *fsrD* para a estirpe QSE32. O Northern-blot foi efectuado num gel de acrilamida de 6% e o xileno cianol migrou 19 cm. **M2** - ao marcador pBR322 *MspI* digest (Biolabs). O controlo identificado como *fsrD* corresponde ao RNA *fsrD* sintetizado *in vitro*. Os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 assinalados no gráfico A2 correspondem aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 da imagem C2. Estes representam as zonas da curva de crescimento em que foi extraído RNA total. .... 67

**Figura 30- Análise por Northern-blot do transcrito *fsrB* nas estirpes *E. faecalis* V583, *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 utilizando a sonda *fsrB*.** Os pontos 1, 2, 3 4 e 5 de cada uma estirpe (figura 25) estão apresentados como V1,V2, V3 e V4 para V583, L1, L2, L3, L4 e L5 para LN68 e Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5 para QSE32. A V2, L2 e Q3 sublinhadas são amostras em que foram migrados 10 µg de RNA total, enquanto as restantes têm 5 µg. A aplicação de diferentes quantidades de RNA foi importante, pois com a utilização do dobro de RNA total poderia vir a se detectar RNA pouco abundantes e por sua vez, importantes para o funcionamento dos operões *fsr* e *gelE-sprE*. O Northern-blot foi efectuado num gel de acrilamida de 5% e o xileno cianol migrou 38 cm. **M1** corresponde ao marcador pUC Mix Marker 8 (Fermentas); **M2** ao marcador pBR322 -*MspI* digest (Biolabs). O controlo RNA está identificado como *fsrB*. A seta a vermelho indica o possível transcrito *fsrB*. .... 68

**Figura 31- Análise por Northern-blot do transcrito *fsrA* nas estirpes estirpes *E. faecalis* V583, *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 utilizando a sonda *fsrA*.** Os pontos 1, 2, 3 4 e 5 de cada uma estirpe (figura 25) estão apresentados como V1,V2, V3 e V4 para V583, L1, L2, L3, L4 e L5 para LN68 e Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5 n

para QSE32. O Northern-blot foi efectuado num gel de acrilamida de 5% e o xileno cianol migrou 30 cm. **M1** corresponde ao marcador pUC Mix Marker 8 (Fermentas); **M2** ao marcador pBR322 *MspI* digest (Biolabs). As setas a vermelho indicam os possíveis transcritos *fsrA*. ..... 69

**Figura 32 – Estudo da virulência de diferentes estirpes de *Enterococcus* em *C. elegans*.** Percentagem de sobrevivência de *C. elegans* (%) ao longo do tempo (horas) que esteve em contacto com as estirpes *E. faecalis* OG1RF (estirpe controlo), *E. faecalis* LN68 (gráfico 1), *E. durans* LSE4 (gráfico 2), *E. faecalis* QA29B (gráfico 3) e *E. faecium* QSE32 (gráfico 4). ..... 72

**Figura 33 – Estudo da virulência de diferentes estirpes de *Enterococcus* em *G. mellonella*.** Percentagem de sobrevivência da *G. mellonella* ao longo tempo (horas) para a estirpe controlo OG1RF e as estirpes *E. faecalis* LN68 (gráfico nº.5), *E. durans* LSE4 (gráfico nº.6), *E. faecalis* QA29B (gráfico nº.7) e *E. faecium* QSE32 (gráfico nº.8). ..... 73

**Figura 34 – Estruturas intramembranares das histidinas cinases FsrC das estirpes *E. faecalis* V583 e *E. faecalis* LN68.** Estas estruturas foram construídas através do programa de previsão de estruturas membranares SOSUI 1.11<sup>43</sup>. **34A** Estrutura membranar da proteína FsrC da estirpe V583. Esta proteína é constituída por sete hélices das quais uma é uma hélice secundária. Nesta estão identificadas as mutações encontradas na estirpe LN68. As mutações identificadas na estirpe LN68 estão numeradas (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e assinaladas com um círculo vermelho. O início e final do domínio HATpase está assinalado com as letras A e B, e supostamente inicia-se na Isoleucina e acaba na Arginina. **34B** Estrutura intramembranar da proteína FsrC da estirpe LN68. Esta proteína é constituída por sete hélices primárias. Nesta estão identificadas as mutações encontradas na estirpe LN68. .... 77

# Índice Geral

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE QUADROS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Historial.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Características do género <i>Enterococcus</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Patogenese em <i>Enterococcus</i>.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Resistência a antibióticos.....	6
1.3.2 Virulência de <i>Enterococcus</i> .....	8
1.3.2.1 Sistema QS em <i>E. faecalis</i> - <i>fsr</i> .....	12
1.3.2.1.1 Proteinase Sérica, Gelatinase e Sistema <i>fsr</i> .....	14
1.3.2.2 Sistema <i>fsr</i> e virulência em modelos animais – <i>C.elegans</i> e <i>G. mellonella</i> .....	17
<b>1.4 Objectivos do estudo .....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Material biológico.....</b>	<b>21</b>
2.1.1 Descrição dos isolados.....	21
2.1.2 Conservação e crescimento.....	21
2.1.3 Teste da actividade de gelatinase.....	22
<b>2.2 Análise de DNA.....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Extracção de DNA cromossómico.....	22
2.2.2 Amplificação de DNA por PCR – “Polymerase Chain Reaction” .....	23

2.2.3 Electroforese em gel de agarose .....	25
2.2.4 Purificação dos produtos de PCR e sequênciação .....	26
<b>2.3 Análise de RNA.....</b>	<b>26</b>
2.3.1 Extracção de RNA ao longo da curva de crescimento.....	26
2.3.2 Análise dos RNAs extraídos.....	28
2.3.2.1 Separação dos RNAs em gel desnaturante de acrilamida e transferência por membrana (Northern-blot)....	28
2.3.2.2 Hibridação .....	29
2.3.2 Síntese de moléculas de RNA.....	30
<b>2.4 Análise da virulência de enterococos .....</b>	<b>31</b>
2.4.1 Testes de virulência de <i>Enterococcus</i> utilizando o nemátodo <i>C. elegans</i> .....	31
2.4.2 Testes de virulência de <i>Enterococcus</i> utilizando o nematodo <i>G. mellonella</i> .....	33
2.4.3 Análise estatística .....	33
<b>CAPITULO 3. DESCRIÇÃO DAS ESTIRPES ESTUDADAS, CONFIRMAÇÃO DO GENÓTIPO <i>fsr/gelE-sprE</i> E FENÓTIPO GELATINASE .....</b>	<b>34</b>
3.1 Objectivos do estudo .....	35
3.2 Resultados e Discussão.....	36
<b>CAPITULO 4. SEQUÊNCIAÇÃO DOS OPERÕES <i>fsr</i> E <i>gelE-sprE</i> .....</b>	<b>37</b>
4.1 Objectivos do estudo .....	38
4.2 Resultados e discussão.....	39
4.2.1 – Identificação das mutações encontradas na estirpe <i>E. faecium</i> QSE32 .....	41
4.2.2 – Identificação das mutações encontradas na estirpe <i>E. faecalis</i> LN68.....	45
4.2.3 Análise do efeito das mutações identificadas nas proteínas dos operões <i>fsr</i> e <i>gelE-sprE</i> .....	49
4.2.3.1 Proteína FsrA (Regulador).....	49
4.2.3.2 Proteína FsrB e FsrD (GBAP) .....	51
4.2.3.3 Proteína FsrC (Histidina Cinase) .....	54
4.2.3.4 Gelatinase .....	55
4.2.3.5 Proteinase Sérica .....	57

4.2.3.6 Análise da mutação encontrada no gene <i>fsrC</i> da estirpe <i>E. faecalis</i> LN68 em outras estirpes com fenótipo gelatinase negativo .....	59
<b>CAPITULO 5. ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DOS OPERÕES <i>fsr</i> E <i>gelE-sprE</i>.....</b>	<b>61</b>
5.1 Objectivos do estudo .....	62
5.2 Resultados e discussão.....	63
<b>CAPITULO 6. ESTUDO DA VIRULÊNCIA EM MODELOS ANIMAIS – <i>C. elegans</i> E <i>G. mellonella</i> 70</b>	
6.1 Objectivos do estudo .....	71
6.2 Resultados e Discussão.....	72
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>
<b>Anexo 1. Alinhamento de DNA.</b> Alinhamento dos operões <i>fsr</i> e <i>gelE-sprE</i> das estirpes <i>E. faecalis</i> LN68 e <i>E. faecium</i> QSE32 com a estirpe controlo <i>E. faecalis</i> V583.....	<b>97</b>
<b>Anexo 2. Alinhamento de proteínas.</b> Alinhamento das proteínas dos operões <i>fsr</i> e <i>gelE-sprE</i> das estirpes <i>E. faecalis</i> LN68 e <i>E. faecium</i> QSE32 com a estirpe controlo <i>E. faecalis</i> V583.....	<b>115</b>
Anexo 2.1 Proteínas FsrA, Regulador.....	116
Anexo 2.2 Proteínas FsrB (incluindo a FsrD), “Accessory gene regulator B”.....	117
Anexo 2.3 Proteínas FsrC, Histidina Cinase.....	118
Anexo 2.4 Proteínas Gelatinase.....	120
Anexo 2.5 Proteínas Protease sérica.....	122
<b>Anexo 3. Análise da mutação encontrada no gene <i>fsrC</i> na estirpe <i>E. faecalis</i> LN68 nas estirpes <i>E. faecalis</i> LN66, <i>E. durans</i> QN8, <i>E. durans</i> QSE125 e <i>E. faecalis</i> QSE15.....</b>	<b>123</b>

# **CAPITULO 1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS**

## **1.1 Historial**

## **1.2 Características do género *Enterococcus***

## **1.3 Patogenese em *Enterococcus***

1.3.1 Resistência a antibióticos

1.3.2 Virulência de *Enterococcus*

1.3.2.1 Sistema QS em *E. faecalis* - *fsr*

1.3.2.1.1 Proteinase Serínica, Gelatinase e Sistema *fsr*

1.3.2.2 Sistema *fsr* e virulência em modelos animais – *C.elegans* e *G. mellonella*

## **1.4 Objectivo do estudo**

## CAPITULO 1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS

### 1.1 Historial

O nome “entérococoque” foi utilizado pela primeira vez por Thiercelin em 1899 para nomear uma nova espécie de diplococcus gram-positivos encontrados no tracto intestinal humano <sup>117</sup>. No mesmo ano, MacCallum e Hastings descreveram um caso de endocardite provocado por um microrganismo a que chamaram *Micrococcus zymogenes* <sup>71</sup>. Posteriormente, foi sugerido que esse microrganismo fosse um enterococo hemolítico. Em 1906, Andrewes e Horder chamaram-lhe *Streptococcus faecalis* (*faecalis* devido a ter sido isolado das fezes) <sup>2</sup>. Durante a década seguinte, vários autores analisaram isolados de *S. faecalis*, e em 1919 Orla-Jensen e colaboradores descreveram as espécies *S. glycerinaceus* e *S. faecium* como sendo filogeneticamente próximas de *S. faecalis* <sup>91</sup>.

Sherman, em 1937, desenvolveu um esquema de classificação no qual os streptococos eram divididos em quatro grupos: “enterococos”, “lácticos”, “viridans” e “piogénicos” <sup>106</sup>. Aproximadamente quatro décadas depois da designação da espécie *Streptococcus faecalis*, Kalina propôs a sua substituição por *Enterococcus faecalis*, bem como a da espécie *S. faecium*, proposta por Orla-Jensen em 1919, para *Enterococcus faecium* <sup>58</sup>. O género *Streptococcus* manteve-se para designar um grupo distinto de bactérias. Somente em 1984, Schleifer e Kilpper-Balz utilizando técnicas moleculares de hibridação DNA-DNA e DNA-rRNA, demonstraram que as espécies *S. faecalis* e *S. faecium* pertenciam a um género distinto do género *Streptococcus* <sup>101</sup> e foram incluídas neste género cerca de vinte espécies <sup>101</sup>. Actualmente o género *Enterococcus* inclui 38 espécies, nomeadamente, *E. avium*, *E. asini*, *E. aquimarinus*, *E. cecorum*, *E. canis*, *E. columbae*, *E. caccae*, *E. canintestini*,

*E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. díspar*, *E. devriesei*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. hirae*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermannienseis*, *E. italicus*, *E. mundtii*, *E. moravienseis*, *E. malodoratus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. porcínus*, *E. pseudoavium*, *E. raffínosus*, *E. ratti*, *E. solitarius*, *E. sacharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. silesiacus*, *E. saccharominimus*, *E. seriolicida*, *E. termitis* e *E. villorum*<sup>45</sup>.

## 1.2 Características do género *Enterococcus*

Os enterococcus são bactérias lácticas Gram-positivas, com forma circular (cocos) que se podem apresentar isolados, aos pares ou em pequenas cadeias. São anaeróbios facultativos e a sua temperatura óptima de crescimento situa-se entre os 35 e os 37°C, podendo também crescer entre os 10 e os 45°C. Os enterococos crescem em meios com elevada concentração salina, tais como, 6,5 % de NaCl, com elevados valores de pH, tais como, pH 9,6, e hidrolizam a esculina em presença de 40% de sais biliares<sup>25, 79</sup>. Alguns são móveis e poucos produzem pigmentos. No que respeita à reacção catalase são negativos, embora alguns possuam pseudocatalases<sup>25, 79</sup>. Exceptuando *E. faecalis*, todas as outras espécies possuem paredes celulares com o mesmo tipo de peptidoglicano, com lisina-asparagina. São quimiotróficos e quase todas as espécies são homofermentativas, sendo o ácido láctico o produto final da via glicolítica. A maioria das espécies produz um antigénio específico, o ácido teicóico, associado á parede celular, que é identificado como antigénio do grupo D dos *Streptococcus*<sup>25, 79</sup>.

A identificação do género *Enterococcus* através de testes fisiológicos foi sempre difícil devido à sua considerável diversidade fenotípica<sup>90</sup>. Por outro lado, a sua identificação por testes convencionais requer tempos de incubação longos<sup>90</sup>. Os métodos de identificação

genotípica, utilizando os genes dos RNAs ribossomais 16 e 23S, são mais exactos pois permitem a identificação do género, mas, por sua vez, não permitem diferenciar espécies (por exemplo, *E. gallinarium* e *E. casseliflavus* apresentam 99,8% de homologia no gene do RNA ribossomal 16S)<sup>1, 90</sup>. Neste contexto, métodos alternativos têm sido desenvolvidos, tais como, a amplificação de genes específicos, como por exemplo *ddl* (gene que codifica para a proteína D-alanina-D-alanina ligase), genes do operão *van* (genes relacionados com a resistência à vancomicina), *sodA* (gene que codifica a proteína superóxido dismutase dependente do manganês)<sup>20, 52, 60, 81, 100</sup>. Existem igualmente testes disponíveis comercialmente, como por exemplo, o API 20S, API Rapid ID 32, *Vitek system*, *MicroScan gram positive identificacion panel*, *Crystal gram positive* e *Crystal Rapid gram positive kits*<sup>19, 25</sup>.

Os enterococos crescem em ambientes muito distintos, tais como, solo, alimentos, águas, areias, animais e humanos. Nos humanos, tal como nos animais, existem nos tractos gastrointestinais e genitourinário<sup>25</sup>. A espécie *E. faecalis* é a mais frequentemente isolada do tracto gastrointestinal humano, seguida de *E. faecium*<sup>25, 35</sup>. Este género de bactérias pode ser encontrado no leite e nos queijos, pois, como referido anteriormente, têm a capacidade de sobreviver em meios com características físico-químicas muito distintas, tais como, valores de pH, temperatura e salinidade extremos<sup>27, 29, 35</sup>. A sua presença nos queijos tradicionais poderá ser positiva, segundo alguns autores, pois parecem ter um papel importante na maturação dos mesmos - podendo isto estar relacionado com uma das suas características essenciais, a sua capacidade de hidrolisar os triglicéridos do leite libertando ácidos gordos voláteis. Os enterococos, também têm a capacidade de produzir enzimas proteolíticas endo e exocelulares, importantes no desenvolvimento do sabor e aroma<sup>27, 35, 90</sup>. Adicionalmente, espécies como *E. faecalis* e *E. faecium* produzem uma variedade de bacteriocinas que poderão ser usadas para combater outras espécies bacterianas como por exemplo *Listeria monocytogenes*,

*Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Vibrio cholerae*<sup>27</sup>,<sup>35</sup>. Estas espécies de enterococos também parecem ser importantes no processamento das carnes, nomeadamente chouriços e salsichas<sup>29</sup>. Todavia, a presença destas bactérias durante a maturação de alimentos poderá ter aspectos negativos, como por exemplo, poderem produzir aminas biogénicas. Esta característica já foi detectada em algumas espécies de *Enterococcus* encontrados em queijos e chouriços fermentados<sup>90</sup>.

Devido à sua natureza comensal, os enterococos também são utilizados na produção de produtos probióticos para humanos e animais<sup>27, 29, 114</sup>. Estes podem ser usados na produção de iogurtes, leites fermentados e não fermentados e produtos farmacêuticos, podendo apresentar aspectos benéficos para a saúde humana<sup>27</sup>. Como evidenciado por tudo o que foi dito, existe controvérsia acerca da sua utilização na maturação dos alimentos. A sua capacidade de transferirem resistências microbianas e factores de virulência para outras espécies bacterianas existentes no homem é um dos factores mais preponderantes na argumentação contra a presença destas bactérias nos alimentos<sup>28</sup>.

### 1.3 Patogenese em *Enterococcus*

Os *Enterococcus* têm emergido como causa de um número crescente de infecções nosocomiais graves, incluindo bacteremia, infecções intrabdominais, endocardites, infecções do sistema nervoso central e do tracto urinário<sup>27, 116</sup>. Estas bactérias, são nos Estados Unidos da América a terceira causa nosocomial de bacteremias, e, na Europa, a quarta causa nosocomial<sup>46, 120</sup>.

Apesar de várias espécies de *Enterococcus* terem sido identificadas como causadoras de infecções humanas, existem duas espécies que prevalecem nas infecções, nomeadamente

*E. faecalis* e *E. faecium* <sup>11, 96</sup>. Entre estas, *E. faecalis* é a espécie predominante, sendo responsável por 85 a 90% das infecções clínicas, enquanto que *E. faecium* é apenas responsável por 5 a 10 % <sup>11, 90, 96</sup>. Estudos recentes têm demonstrado que as infecções provocadas por *E. faecium* têm vindo a aumentar e que esse aumento está relacionado com a acumulação de resistências a antibióticos nesta espécie <sup>7, 11, 118</sup>. As espécies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium* e *E. raffinosus*, têm também sido encontradas, mas são apenas responsáveis por 5% dos casos identificados <sup>74, 90</sup>. Todavia, as estirpes de enterococos isoladas do meio clínico têm sido maioritariamente de indivíduos internados em unidades de cuidados intensivos, no fim de doença prolongada ou com sistema imunitário debilitado, pelo que são designados por patogénicos oportunistas <sup>90</sup>. Assim, os enterococos, por serem patogénicos nosocomiais, têm um impacto directo e significativo na economia, devido a implicarem o prolongamento das estadias hospitalares e a requerem tratamentos terapêuticos adicionais <sup>119</sup>.

### 1.3.1 Resistência a antibióticos

O aparecimento de resistências a antibióticos é uma consequência do uso clínico de drogas antimicrobianas. Inicialmente, este problema foi resolvido através da descoberta de novas classes de antibióticos, como os aminoglicósidos, macrólidos e glicopéptidos, bem como pela modificação química de antimicrobianos previamente existentes. Contudo, parece não haver certezas de que o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos acompanhe a capacidade das bactérias desenvolverem resistência a um determinado composto <sup>36</sup>.

Entre os mecanismos de resistência conhecidos, contam-se a inactivação enzimática do antibiótico (exemplo, as  $\beta$ -lactamases), eliminação dos locais de entrada de antibióticos

(exemplo, as proteínas de ligação à penicilina), modificação do alvo (exemplo, mutações que conduzam a uma alteração da sequência de aminoácidos) e mecanismos de exportação de antibióticos antes de estes encontrarem o seu alvo <sup>13</sup>.

O uso de antibióticos promoveu a colonização e infecção por enterococos com resistências variadas, MDR (“Multi-Drug Resistance”). A razão para a emergência da MDR em enterococos deve-se à resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos e à resistência adquirida através da aquisição de genes de resistência associados a elementos móveis, como por exemplo, plasmídeos e transposões <sup>79</sup>. Relativamente ao primeiro ponto, existem algumas bactérias que devido a não terem o local alvo para o antibiótico ou a este não conseguir chegar ao seu local alvo, estas adquirem resistência, como por exemplo, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e cefalosporinas <sup>36</sup>. No que se refere à resistência adquirida existe o exemplo da tetraciclina, cloranfenicol, aminoglicósidos e glicopéptidos <sup>79</sup>.

No entanto, nos enterococos a fonte de resistência a antibióticos não se confina aos meios hospitalares. A própria comunidade consumidora de antibióticos, as águas de esgotos, a utilização de antibióticos na agricultura, tanto como promotores de crescimento como no tratamento de animais, constituem fontes e reservatórios de genes de resistência a antibióticos <sup>15, 67</sup>. Pelo seu impacto clínico, a resistência a antibióticos de *E. faecalis* e *E. faecium* tem sido mais estudada. As suas características genéticas conferem tolerância a baixas concentrações de várias classes de antibióticos, incluindo aminoglicósídeos, beta-lactâmicos (terceira geração das cefalosporinas) e quinolonas <sup>90</sup>. Em particular, estirpes clínicas de *E. faecium* são resistentes a altas concentrações de penicilina <sup>57</sup>. Adicionalmente tem sido demonstrado que *E. faecium* pode também adquirir determinantes genéticos que conferem resistência a várias classes de antibióticos, nomeadamente a glicopéptidos (vancomicina e teicoplanina), e produzem efeitos sinérgicos com beta-lactâmicos e

aminoglicosídeos<sup>22</sup>. Ao longo dos anos, utilizou-se gentamicina para o tratamento de endocardites, mas, com o aumento de resistência a este antibiótico, começou-se a utilizar a vancomicina<sup>97</sup>.

A resistência dos *Enterococcus* aos antibióticos da classe dos glicopéptidos deve-se à síntese de precursores modificados da parede celular que apresentam uma afinidade diminuída para a vancomicina e teicoplanina. A alteração do precursor do peptidoglicano de D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lac (D-alanina-D-lactato) não parece ter qualquer efeito sobre a rigidez dos peptidoglicanos ou na sua capacidade para formar ligações cruzadas, mas diminui a afinidade da vancomicina<sup>4, 16</sup>. Durante a última década houve um aumento da resistência à vancomicina em enterococos (“vancomycin-resistant enterococci” (VRE)) constituindo uma das maiores preocupações<sup>97</sup>. Este antibiótico tem sido utilizado como último recurso no combate a casos de resistências múltiplas observadas em enterococos<sup>10, 51</sup>.

A estirpe *E. faecalis* V583 foi isolada pela primeira vez nos EUA como VRE. Esta estirpe tem sido caracterizada e é a única estirpe totalmente sequenciada<sup>44</sup>. Neste momento a sequenciação do genoma de *E. faecium* D.O. encontra-se no final das anotações e a sequencia do genoma de *E. faecalis* OG1RF acabou de ser publicada, mas não está ainda disponível<sup>44</sup>.

### 1.3.2 Virulência de *Enterococcus*

A associação entre *Enterococcus* e virulência está inteiramente relacionada com a identificação destas bactérias<sup>71</sup>. Em 1899, MacCallum e Hastings descreveram um caso fatal de endocardite no Hospital Johns Hopkins causado pelo organismo *Micrococcus zymogenes*. Neste caso, a bactéria expressava actividade hemolítica e actividade gelatinase<sup>71</sup>. Desde então a virulência destas bactérias tem sido alvo de numerosos estudos. Alguns destes estudos têm

sido efectuados no sentido de identificação de genes com uma função na virulência de enterococos, nomeados por factores de virulência. Têm sido identificados factores de virulência relacionados com a aderência às células dos hospedeiros, a matrizes de proteínas extracelulares, a resistência a macrófagos, a deterioração das células e tecidos e à evasão ao sistema imunitário<sup>34, 115</sup>. Uma questão interessante relacionada com a identificação de genes envolvidos na virulência de *Enterococcus* prende-se com a observação de que alguns desses genes estarem disseminados tanto em estirpes de origem clínica como alimentar<sup>28, 65, 102</sup>.

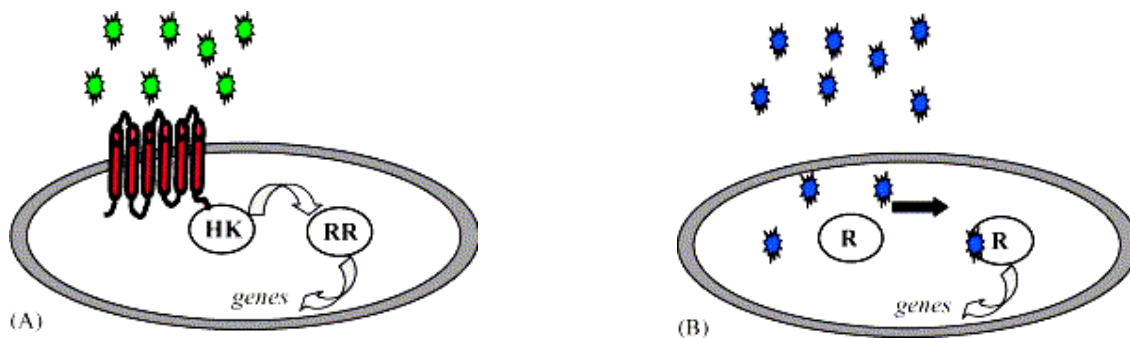
Embora tenham sido identificados diversos genes envolvidos na virulência de *Enterococcus*, a regulação da sua expressão tem sido pouco estudada. Existem dois estudos que mostram variações nos níveis dos transcritos correspondentes a diversos factores de virulência, variações que dependem do ponto da curva de crescimento, do ambiente e da origem do isolado<sup>42, 105</sup>.

Nos últimos anos tem sido demonstrado que as células bacterianas regulam também a expressão dos seus genes como resultado da sua interacção com outras células bacterianas da mesma espécie ou de espécies distintas (quase como um organismo multicelular). Este mecanismo é denominado de “Quorum Sensing” (QS). Assim, as bactérias controlam a expressão génica em resposta à densidade celular<sup>5, 73, 113</sup>. Estes sistemas QS têm sido encontrados tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas.

Os mecanismos de QS são caracterizados pela libertação pelas células de pequenas moléculas que actuam como um sinal químico, designadas por “autoinducers” (AIs)<sup>63</sup>. Estas moléculas ao acumularem-se no meio extracelular e quando o “quórum” é atingido, as células respondem com uma série de mecanismos que passam normalmente pela activação transcricional de um conjunto de genes, incluindo genes envolvidos na virulência<sup>30, 63</sup>.

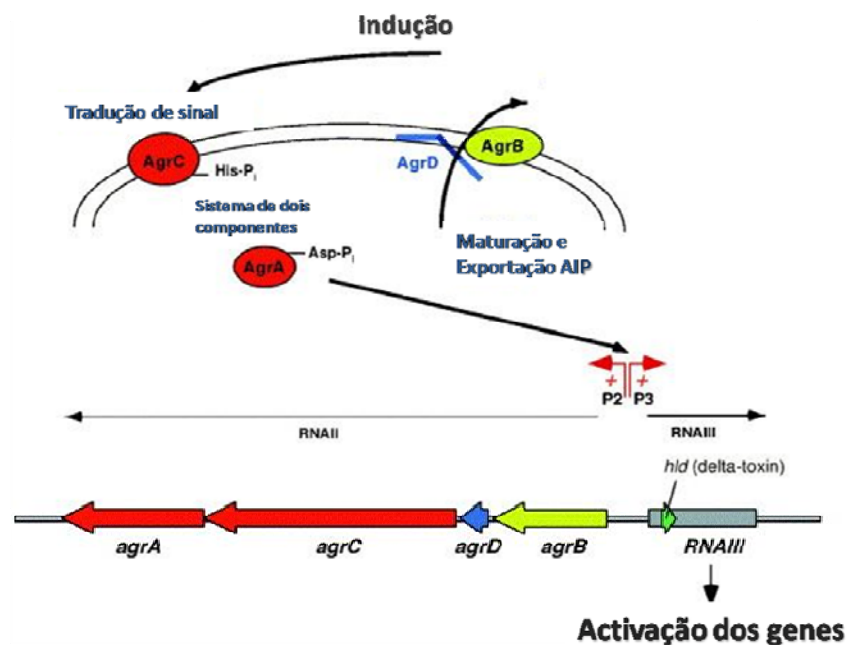
Entre as bactérias Gram-negativas, *Vibrio harveyi* tem sido extensivamente usado como organismo modelo no estudo de mecanismos de “quorum sensing”. Estas bactérias possuem dois sistemas de QS que controlam a expressão da bioluminescência (*lux*) (dependente da densidade celular) <sup>113</sup>. Estes são caracterizados pela produção e libertação de uma molécula sinal (AI), “homoserine lactones”, que é acumulada no meio extracelular até a densidade celular atingir um determinado valor <sup>41, 113</sup>.

Em bactérias Gram-positivas têm sido caracterizados sistemas de QS em que os péptidos (AI) apresentam diferentes estruturas <sup>41</sup>. Estes sistemas de QS, ao contrário dos encontrados em bactérias Gram-negativas, normalmente, ligam os AIs a uma proteína localizada na membrana que faz parte de um sistema de dois componentes <sup>70</sup>. Esta, por sua vez, activa uma resposta intracelular envolvendo uma cascata de fosforilações e/ou desfosforilações, cuja resposta final é a expressão de um gene regulador que controla a expressão de um ou mais genes (figura 1) <sup>70</sup>.



**Figura 1 – Esquema comparativo de QS em bactérias Gram positivas (A) e negativas (B).** (A) A ligação de um péptido (assinalado a verde) a um receptor da histidina cinase (RHKs) (assinalada a vermelho) activa as fosforilações ou desfosforilações, e, por sua vez, activa a resposta reguladora (RR), resultando no controlo da expressão de um ou mais genes. (B) Pequenas moléculas (“homoserine lactones”) (assinaladas a azul) difundem-se do meio extra para o intracelular ligando-se ao regulador (R), estabilizando-o e desencadeando a expressão dos genes respectivos <sup>70</sup>.

Um exemplo de QS bem caracterizado em bactérias Gram-positivas é o sistema *agr* (“*accessory gene regulator*”) em *Staphylococcus aureus*. Este sistema é composto por quatro genes estruturais, designados por *agrA-D*<sup>33, 88</sup>. *AgrB* é uma proteína membranar envolvida no processamento do pró-peptido *AgrD* (que codifica o AIP - *autoinducer peptide*), resultando na excreção de AIP maduro de aproximadamente 8 resíduos de aminoácidos (figura 2)<sup>33, 55, 56, 70, 99, 121</sup>. A proteína *AgrC* é uma histidina cinase que, ao ligar-se ao AIP, fosforila o regulador transcricional *AgrA*, o qual vai activar os promotores P2 e P3 originando os transcritos RNAII e RNAIII, respectivamente<sup>62, 66</sup> (figura 2). O transcrito RNAIII é um RNA regulador, podendo também codificar uma delta toxina (gene *hld*) (figura 2). A concentração de delta toxina é elevada no final da fase exponencial e a sua síntese é controlada positivamente pelo sistema *agr* e pela extremidade 5' do RNAIII<sup>54, 78, 89</sup>. Diversos estudos têm demonstrado que o sistema *agr* está envolvido na formação de biofilmes e virulência em *Staphylococcus sp*<sup>63</sup>.

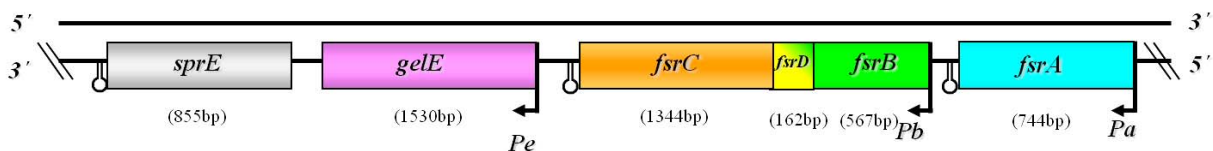


**Figura 2 – Esquema do funcionamento do sistema de QS *agr* em *Staphylococcus sp*.** Este esquema foi adaptado de Kong *et al.* (2006). A proteína *AgrB* localizada na membrana está envolvida na maturação e exportação do péptido AIP. Quando se atinge uma determinada concentração de células e conseqüentemente de AIP, este péptido liga-se à proteína *AgrC* que promove a fosforilação do *AgrA*, que por sua vez activa os promotores P2 e P3, originando os transcritos RNAII e RNAIII<sup>63</sup>.

O RNAlIII é um RNA regulador de 514 nucleótidos cuja estrutura secundária é constituída por 14 domínios <sup>6</sup> e está envolvido na regulação da expressão de vários genes, inclusivé genes envolvidos na virulência de *S. aureus* <sup>8, 32, 50</sup>.

### 1.3.2.1 Sistema QS em *E. faecalis* - *fsr*

Em 2000, Qin *et al.* identificou um sistema de QS em *E. faecalis* OG1RF homólogo ao sistema *agr* descrito anteriormente, que designou por *fsr* (*E. faecalis* regulator) <sup>95</sup>. Este sistema é constituído por 4 genes, nomeadamente *fsrA*, *fsrB*, *fsrD* e *fsrC*, localizados a montante dos genes *gelE* e *sprE*, que codificam duas proteases extracelulares (figura 3) <sup>84, 95, 94</sup>. O gene *fsrA* transcrito a partir do promotor Pa, codifica o regulador que vai actuar nos promotores Pb (responsável pela transcrição dos genes *fsrB*, *fsrD* e *fsrC*) e Pe (responsável pela transcrição dos genes *gelE* e *sprE*) (figura 3) <sup>95, 94</sup>. O gene *fsrB* codifica a proteína FsrB, possivelmente envolvida no processamento da proteína FsrD (codificada pelo gene *fsrD*) também denominada por GBAP (“Gelatinase Biosynthesis Activating Pheromone”) <sup>84, 95, 94</sup>. O gene *fsrC* codifica uma histidina cinase transmembranar, que ao ligar-se à GBAP extracelular, fosforila a proteína FsrA, tendo sido sugerido que esta activação se efectue através de uma molécula intermediária ainda não identificada (molécula X da figura 4) os promotores Pb e Pe (figura 4) <sup>34, 95, 94</sup>.



**Figura 3 – Organização genómica dos operões *fsr* e *gelE-sprE* em *E. faecalis*.** Apresentação dos genes *fsrA* e *fsrB/fsrD/fsrC* e *gelE/sprE*, respectivos promotores Pe, Pb e Pa, e tamanho. Os genes dos operões *fsr* e *gelE-sprE* encontram-se na cadeia 3'-5'. Os “harpins” localizados a jusante do gene *fsrA*, *fsrB/fsrD/fsrC* e *gelE/sprE* representam os terminadores transcripcionais (⌞).

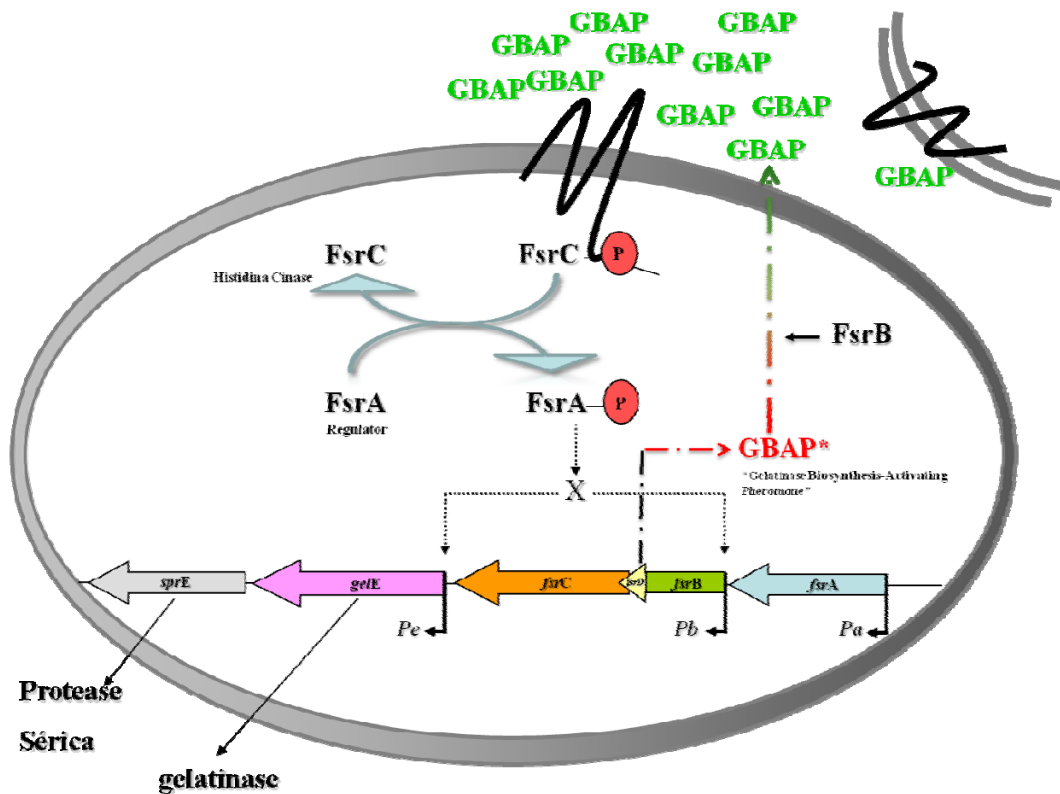


Figura 4 - Esquema representativo do mecanismo proposto para a activação transcricional do operação *fsr* e respectivo efeito na síntese de gelatinase e protease sérica em *E. faecalis*. Este esquema é adaptado (com actualizações) de Gilmore, *et al.* (2002). Neste modelo, a GBAP é sintetizada sob a forma de uma molécula precursora (GBAP\* vermelha) através do *fsrD*, e processada pela proteína FsrB originando a GBAP madura (GBAP verde). Esta, ao ser secretada para o meio extracelular e depois de atingir uma determinada concentração, interage com a histidina cinase (FsrC), que fosforila o regulador (FsrA) que por sua vez regula os promotores Pb e Pe. Gilmore *et al.* (2002) propõe a existência de uma molécula X para a regulação dos promotores Pb e Pe <sup>34</sup>.

A GBAP é um péptido de 11 resíduos de aminoácidos com um anel lactona entre o grupo  $\alpha$ -carboxil da metionina C-terminal e o grupo hidroxil da serina localizada na terceira posição <sup>83</sup> (figura 5). A sequência de resíduos de aminoácidos corresponde à extremidade C-terminal da proteína FsrB <sup>82</sup>.

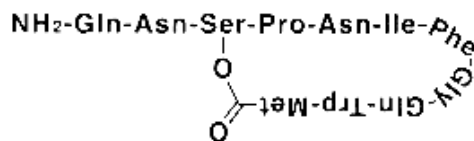


Figura 5 – Estrutura da GBAP (“Gelatinase Biosynthesis Activating Pheromone”) <sup>82</sup>.

Em 2006, Nakayama *et al.* identificaram o gene *fsrD* que codifica o pró-péptido GBAP', o qual tem 53 resíduos de aminoácidos (ver GBAP' da figura 5)<sup>84</sup>. Em analogia com o sistema *agr* em que a AgrB está envolvida no processamento e transporte da AgrD, a GBAP' poderá ser processada pela proteína FsrB, resultando na GBAP madura<sup>84</sup> (figura 5). Após este processamento, a GBAP é transportada para fora da célula, através de um mecanismo desconhecido. Esta acumula-se no meio extracelular até atingir uma determinada concentração máxima (final da fase estacionária) o que desencadeia a activação transcricional dos operões *fsrB-fsrD-fsrC* e *gelE-sprE* através do sistema de dois componentes FsrC/FsrA (figura 4). Nakayama *et al.* mediram a actividade da GBAP e da gelatinase ao longo da curva de crescimento e observaram que ambas tinham o seu máximo no início da fase estacionária<sup>82</sup>. Recentemente a GBAP têm vindo a ser alvo de estudo para o desenvolvimento de um novo antibiótico de forma a atenuar a virulência associada a *E. faecalis*<sup>86</sup>.

#### 1.3.2.1.1 Proteinase Sérica, Gelatinase e Sistema *fsr*

Tal como o sistema *agr* de *S. aureus*, o sistema *fsr* está relacionado com a virulência de *E. faecalis*. Estão identificados dois genes que são regulados por este sistema, nomeadamente o *gelE* (gelatinase) e *sprE* (protease sérica). Estas duas proteases tem sido alvo de diversos estudos, no entanto, a gelatinase tem sido mais intensamente estudada.

A protease sérica tem uma similaridade elevada com as glutamil-endopeptidases de *Staphylococcus*, no entanto, não foi ainda caracterizada e purificada<sup>61</sup>. Estudos efectuados indicam que esta protease tem a mesma importância na formação de biofilmes que a gelatinase<sup>61, 76</sup>.

A gelatinase foi referenciada pela primeira vez em 1975 por Gold *et al.* que sugeriram a existência de uma protease em *E. faecalis* OG1-10 responsável pela hidrólise da gelatina oral humana, sugerindo que se tratava de um factor de virulência <sup>37</sup>. Esta proteína é uma endopeptidase extracelular (metaloendopeptidase II, proteinase microbiana, EC 3.4.24.4) capaz de hidrolisar numerosos substratos, incluindo a gelatina, colagénio, caseína, hemoglobina e outros pequenos péptidos bioactivos <sup>72</sup>. A gelatinase produzida pela estirpe *E. faecalis* OG1-10 (isolado de via oral humana) foi isolada e caracterizada por Makinen *et al.*, em 1989 <sup>72</sup>. Posteriormente o gene que codifica esta enzima foi identificado e a sua sequência determinada <sup>111</sup>. Estudos recentes indicaram que esta proteína é produzida em estirpes clínicas de enterococos <sup>110</sup>. Mutantes de gelatinase demonstraram que esta proteína tem uma forte influência na virulência em modelos de peritonites, endocardites, endoftalmites e na formação de biofilmes <sup>23, 39, 64, 76, 109, 110</sup>. Por outro lado, estudos realizados em estirpes com origens distintas indicam que a presença dos genes *fsr* e da gelatinase não são necessários para o organismo provocar infecção, mas por sua vez, em modelos animais aumentam a severidade da doença <sup>98</sup>.

Numerosos estudos têm demonstrado que em organismos patogénicos a produção de biofilmes é regulada por sistemas de QS, incluindo o sistema *fsr* em *E. faecalis* <sup>39, 76, 93</sup>. Os biofilmes são uma população de células ligadas irreversivelmente a superfícies bióticas ou abióticas, encerradas numa matriz hidratada de substâncias exopoliméricas, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos <sup>12</sup>. O seu estudo em enterococos é importante porque tem sido observado um aumento da resistência a antibióticos por parte destas bactérias quando associadas em biofilmes <sup>75</sup>. Adicionalmente, a aderência e a formação de biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium* em diferentes biomateriais, tem vindo a demonstrar uma capacidade de estes organismos aderirem a vários materiais médicos, facilitando a infecção <sup>75</sup>.

Recentemente, foi demonstrado que estirpes deficientes nas proteínas gelatinase e protease sérica apresentavam uma diminuição na capacidade de produção de biofilmes<sup>76, 95, 109</sup>. Adicionalmente, outros estudos mostraram que a complementação de uma estirpe mutante *fsrB* e com fenótipo gelatinase negativo, com os genes *fsrABC* e *fsrABC/gelE/sprE* resulta na produção de gelatinase e na formação de biofilmes<sup>39</sup>.

Estudos epidemiológicos efectuados em estirpes clínicas de *E. faecalis* indicam que não existe relação entre a formação de biofilmes e a gelatinase, ao contrário do que os resultados de manipulação genética indicam<sup>75, 77</sup>.

Estudos efectuados em *E. faecalis* OG1RF têm demonstrado a importância do sistema *fsrABC* e gelatinase na virulência em diferentes modelos animais<sup>9, 92</sup>. Em modelos de endoflalmite de coelhos e em *Caenorhabditis elegans*, foi demonstrado que mutantes dos genes *fsrB* e *fsrC* tem virulência mais atenuada que estirpes mutantes *gelE-sprE*, indicando a possibilidade de o sistema *fsr* poder regular outros genes envolvidos na virulência de *Enterococcus*<sup>23, 80, 108</sup>. De facto, a análise transcricional comparativa entre a estirpe *E. faecalis* OG1RF e a estirpe isogénica com deleção no gene *fsrB* indicou que o sistema *fsrABC* regula, quer positiva quer negativamente, a expressão de vários genes entre o fim da fase exponencial e o início da fase estacionária<sup>9</sup>.

Recentemente, infecções provocadas por *E. faecalis* em *Galleria mellonella* demonstraram que a gelatinase produz efeitos virulentos no sistema de defesa de *G. mellonella* e no sistema complementar inerente ao soro humano, ao contrário da protease sérica que não produz qualquer efeito contra o sistema imunitário do insecto ou no soro humano<sup>92</sup>.

### 1.3.2.2 Sistema *fsr* e virulência em modelos animais – *C.elegans* e *G. mellonella*

A virulência envolvida em doenças humanas provocadas por infecções bacterianas tem vindo a ser alvo de vários estudos. Recentemente, quatro modelos invertebrados – *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* e *G. mellonella* – têm atraído interesse no seu potencial para estudos de virulência bacteriana<sup>24, 53, 92, 104, 107</sup>. Este interesse deve-se ao facto destes organismos terem um sistema de defesa próximo do sistema de defesa dos mamíferos e, adicionalmente, os testes de virulência realizados com estes organismos serem menos dispendiosos que os realizados com modelos de mamíferos<sup>31</sup>.

Em 2001, Garsin e colaboradores demonstraram a praticabilidade de *C. elegans* para estudos de virulência envolvendo bactérias Gram-positivas, incluindo *E. faecalis* e *E. faecium*<sup>31</sup>. Neste estudo foi demonstrado que ambas as espécies matam os ovos das *C. elegans* e proliferam no intestino do nemátodo, mas somente a espécie *E. faecalis* causa infecção persistente e letal<sup>31, 87</sup>. Para além deste resultado, também foi demonstrado a influência de outros factores de virulência, citolisina e FsrB, no aumento da mortalidade de *C. elegans*<sup>31, 87</sup>. Em 2002, foi demonstrado que mutantes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *gelE* e *sprE* apresentam morte atenuada em *C. elegans*<sup>108</sup>. Desde então o estudo da virulência de enterococos tem vindo a ser alargado para outros modelos animais, com por exemplo *G. mellonella*. A larva deste insecto tem um tamanho apropriado para ser injectada, ao contrário dos modelos *C. elegans* e *D. melanogaster*<sup>92</sup>. Estudos efectuados com *Pseudomonas aeruginosa* indicam resultados idênticos entre *G. mellonella* e ratos<sup>53</sup>. Comparando com os invertebrados referidos anteriormente, *G. mellonella* tem um sistema de defesa antimicrobiano elaborado, um sistema circulatório e resposta imunológica inata<sup>53</sup>. Desta forma, o sistema imunitário da

*G. mellonella* é capaz de efectuar fagocitose, encapsular os microrganismos invasores e produzir pequenas proteínas antimicrobianas, chamadas “cecropins”<sup>14, 53</sup>. Recentemente, foi demonstrado que ao injectar a proteína gelatinase em *G. mellonella* as “cecropins” eram degradadas pela gelatinase, tornando o insecto mais vulnerável<sup>92</sup>.

A análise dos resultados obtidos com os modelos *C. elegans* e *G. mellonella* foi efectuada recorrendo a métodos estatísticos, nomeadamente, o método “Kaplan-Meier”. Este, também conhecido por estimador produto limite, trata-se de um método que estima a sobrevivência em função do tempo de vida, tendo a vantagem de poder ser utilizado mesmo com dados censurados (por exemplo, perda de amostras antes do final do estudo), neste caso pequenas linhas verticais são apresentadas no gráfico. No caso de não ocorrer perda de dados, a curva Kaplan-Meier é equivalente à distribuição empírica. Para comparar diferentes curvas de Kaplan-Meier poderá ser utilizando o teste “long rank” (construído através de programa de computador)<sup>59</sup>.

#### 1.4 Objectivos do estudo

Desde a descoberta do sistema *fsr* e da sua implicação na virulência de *E. faecalis*, numerosos estudos têm sido efectuados com o objectivo de compreender esta correlação. Estes mesmos estudos têm demonstrado que, possivelmente, este sistema será tão complexo como o seu homólogo *agr* de *Staphylococcus*.

Os operões *fsr* e *gelE-sprE* têm sido estudados maioritariamente em estirpes de *E. faecalis*, no entanto, estudos realizados no laboratório “Stress by Antibiotic and Virulence in *Enterococcus*” (S.A.V.E.) (IBET/ITQB) demonstraram que estes dois operões também estão presentes em outras espécies do género *Enterococcus*, nomeadamente, *E. faecium* e

*E. durans*<sup>68</sup>. Este estudo demonstrou que a presença de todos os genes dos operões *fsr* e *gelE-sprE* não era suficiente para que o fenótipo do teste da gelatinase fosse positivo<sup>68</sup>. Assim, no presente trabalho decidiu-se estudar em diferentes espécies de *Enterococcus*, nomeadamente *E. faecium* e *E. durans*, a incongruência entre a presença de todos os genes dos referidos operões e o resultado do teste gelatinase. *E. faecalis* V583 foi considerada a estirpe referência - estirpe cuja sequência do genoma é conhecida e acessível.

Assim, o trabalho experimental foi dividido em três partes:

- ✓ Determinação e análise das sequências dos operões *fsr* e *gelE-sprE* em estirpes com todos os genes dos operões *fsr* e *gelE-sprE* e com fenótipo gelatinase negativo e positivo;
- ✓ Estudo dos transcritos dos operões *fsr* e *gelE-sprE* ao longo da curva de crescimento;
- ✓ Análise da virulência em *C. elegans* e *G. mellonella*.

## **CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material biológico**

- 2.1.1 Descrição dos isolados
- 2.1.2 Conservação e Crescimento
- 2.1.3 Teste da actividade de gelatinase

### **2.2 Análise de DNA**

- 2.2.1 Extracção de DNA cromossómico
- 2.2.2 Amplificação de DNA por PCR – “Polymerase Chain Reaction”
- 2.2.3 Electroforese em gel de agarose
- 2.2.4 Purificação dos produtos amplificados e sequenciação

### **2.3 Análise de RNA**

- 2.3.1 Extracção de RNA ao longo da curva de crescimento
- 2.3.2 Análise dos RNAs extraídos
  - 2.3.2.1 Separação dos RNAs em gel desnaturante de acrilamida e transferência por membrana (Northern-blot)
  - 2.3.2.2 Hibridação
- 2.3.2 Síntese de moléculas de RNA

### **2.4 Análise da virulência de enterococos**

- 2.4.1 Testes de virulência de *Enterococcus* utilizando o nemátodo *C. elegans*
- 2.4.2 Testes de virulência de *Enterococcus* utilizando nematodo *G. mellonella*
- 2.4.3 Análise estatística

## CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material biológico

#### 2.1.1 Descrição dos isolados

As estirpes de *Enterococcus* utilizadas neste trabalho (espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*) pertencem à colecção de culturas do laboratório de Microbiologia do IBET (Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica) (quadro 1), tendo sido previamente caracterizadas por métodos fenotípicos e moleculares<sup>1, 69</sup>. As estirpes usadas foram isoladas de produtos alimentares portugueses, nomeadamente queijo (Q) e leite (L), provenientes de 3 regiões de Denominação de Origem Protegida (D.O.P.) (Decreto-Lei nº 146/84\*): Nisa (N), Azeitão (A) e Serra da Estrela (SE) (quadro 1).

**Quadro 1 – Estirpes usadas neste estudo.** Identificação, espécie e origem alimentar das estirpes utilizadas.

Estirpes	Espécie	Origem alimentar	D.O.P.
LN68	<i>E. faecalis</i>	Leite	Nisa
LN66	<i>E. faecalis</i>	Leite	
QN8	<i>E. durans</i>	Queijo	
QSE32	<i>E. faecium</i>	Queijo	Serra da Estrela
QSE15	<i>E. durans</i>	Queijo	
QSE125	<i>E. faecalis</i>	Queijo	
LSE4	<i>E. durans</i>	Leite	
QA29b	<i>E. faecalis</i>	Queijo	Azeitão

#### 2.1.2 Conservação e crescimento

Todos os isolados estão conservados na colecção de culturas do laboratório de Microbiologia, a -80 °C numa concentração final de glicerol de 20 %. Existem duplicados conservados a -20 °C (numa concentração final de glicerol de 45 %) a partir dos quais foram preparados os inóculos. Os inóculos foram preparados em meio BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid, Inglaterra) e crescidos a 37 °C sem agitação durante a noite (~16 h).

\*Decreto-lei nº.146/84, de 9/5/1984, Ministério da Agricultura, Florestas e Alimentação, Diário da Republica nº. 107, Série-A, página 1507.

### 2.1.3 Teste da actividade de gelatinase

A actividade enzimática da gelatinase foi detectada usando o protocolo descrito por Sue *et al.*, 199<sup>111</sup>. O meio utilizado tem a seguinte composição: peptona (5 g/l) (Oxoid, Inglaterra), extracto de levedura (3 g/l) (Oxoid, Inglaterra), agar (15 g/l) (Oxoid, Inglaterra) e gelatina (30 g/l) (Oxoid, Inglaterra), pH 7. Adicionou-se 15µl da cultura crescida durante a noite na placa e incubou-se durante 48 h a 37°C. Após este período, adicionou-se solução de sulfato de amónio saturado (Merck, Portugal), que promove a precipitação da gelatina e consequentemente o aparecimento de um halo transparente em torno das colónias com capacidade de degradar a gelatina.

## 2.2 Análise de DNA

### 2.2.1 Extracção de DNA cromossómico

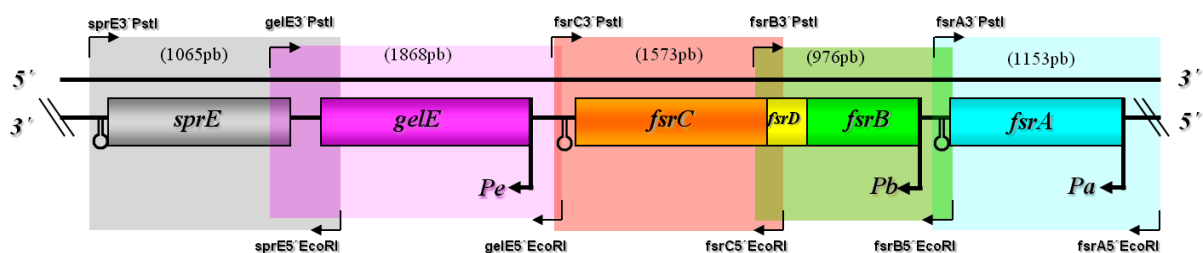
A extracção de DNA cromossómico foi efectuada de acordo com o protocolo inicialmente descrito por Fouet *et al.* (1990), com algumas alterações realizadas por Serror *et al.* (2002)<sup>26, 103</sup>.

Inoculou-se 6 ml de meio BHI e incubou-se durante a noite 37°C. Dividiu-se esta cultura em 3 tubos de 2 ml e recolheu-se as células para centrifugar a 10000 rpm, 10 min, à temperatura ambiente. As células foram lavadas com 1 ml de TES (Sacarose 250 g/l; TE 100x 10 ml/l; autoclavado). Centrifugou-se novamente a 10000 rpm durante 10 min, à temperatura ambiente. O “pellet” de células foi ressuspendido numa solução de lisozima (15 mg/l em TES) e incubado a 37 °C durante 30 min; em seguida, adicionou-se 300 µl de solução salina (150 mM NaCl; 10mM EDTA pH 8) e 20 µl de SDS 20%, para lisar as células. Misturou-se por inversão – se a solução ficou transparente tal indica a eficácia da lise celular. Adicionou-se

um volume igual de mistura fenol (pH 7,5): clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e misturou-se até formar emulsão. Centrifugou-se a 13000 rpm, durante 30 min à temperatura ambiente. Separou-se a fase superior e repetiu-se duas vezes a extracção fenólica como anteriormente descrito. Retirou-se a fase superior e adicionou-se igual volume de clorofórmio. Misturou-se até formar emulsão. Centrifugou-se a 13000 rpm, 5 min à temperatura ambiente. À fase superior adicionou-se igual volume de isopropanol e misturou-se por inversão até o aparecimento de novos brancos correspondentes ao DNA cromossômico. Centrifugou-se a 13000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o “pellet” com 800 µl de etanol 70% frio. Centrifugou-se a 13000 rpm, 10 min a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e secou-se o “pellet” à temperatura ambiente, ressuspendeu-se em 50 µl de água miliQ e quantificou-se no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

### 2.2.2 Amplificação de DNA por PCR – “Polymerase Chain Reaction”

Neste trabalho, os fragmentos de DNA, contendo os operões *fsr* e *gelE-sprE*, e que foram sequenciados, foram obtidos por PCR. Inicialmente foram utilizados “primers”, representados na figura 6, externos aos genes.



**Figura 6 - Esquema dos operões *fsr* e *gelE-sprE* em *E. faecalis*.** Identificação das zonas amplificadas por cada par de “primer”. A azul está representada a zona de amplificação dos “primers” *fsrA5'EcoRI* e *fsrA3'PstI* (1153 pb); a verde para os primers *fsrB5'EcoRI* e *fsrB3'PstI* (976 pb); a laranja para os “primers” *fsrC5'EcoRI* e *fsrC3'PstI* (1573 pb); a rosa para os primers *gelE5'EcoRI* e *gelE3'PstI* (1868 pb); a cinzenta *sprE5'EcoRI* e *sprE3'PstI* (1065 pb). Os promotores transcripcionais estão identificados por Pa, Pb e Pe. Os “harpins” localizados a jusante do gene *fsrA*, *fsrB/fsrD/fsrC* e *gelE/sprE* representam os terminadores transcripcionais (⤴).

foram desenhados “primers” internos para completar a sequenciação (o numero máximo de nucleótidos por reacção de sequenciação foi de 800).

A escolha das sequências dos “primers” foi efectuada através do programa Vector NTI (Invitrogen), tendo como base a sequencia do genoma da estirpe *E. faecalis* V583 (quadro 2).

Quadro 2 – “Primers” utilizados, sequências e temperaturas de “melting” (TM).

“primer” <sup>†</sup>	Sequência (5' → 3')	TM (°C)
fsrA5' EcoRI	GAA TCG AAT TCG TTT TTG TTT GCA GG	60,1
fsrA3' PstI	GAA TCC TGC AGT TCG CTT AAC GTC CC	66,4
fsrB5' EcoRI	GAA TCG AAT TCT TAC TTA GGG AGG G	61,3
fsrB3' PstI	GAA TCC TGC AGA ACA TTA ATG CCG C	63,0
fsrC5' EcoRI	GAA TCG AAT TCG ACA ATG GAT GGG AC	63,2
fsrC3' PstI	GAA TCC TGC AGT TGC TTT ATC CTC CC	64,8
gelE5' EcoRI	GAA TCG AAT TCT TGA GTT ATG AGG GG	61,6
gelE3' PstI	GAA TCC TGC AGC AAG CTA AAA CCG GC	66,4
sprE5' EcoRI	GAA TCG AAT TCT GAA TCT GTT CTG GTC	61,9
mfsrA	ATG AGT GAA CAA ATG GC	47,9
T7fsrA	T7 - GT AAG AAA TAG TGC C	65,9
fsrA_2	CTA GGA AAA AGA TAT TTA GTT GGG C	58,1
mfsrA_2	CAA GAA CAG TTT GGC GGT TG	57,3
mfsrB	TTG AAG AGG AGG GCG	50,6
T7fsrB	T7 - GT CCA AAT ATA TTG GGC	67,2
T7mfsrB	T7 - GC AAT ACT TGA AGA GGA GGG	70,5
fsrB	GTC CAA ATA TAT TGG GC	47,9
fsrC_2	TTT ATA ATC ATG ACG AAA CAT CGC	55,9
mfsrC_2	TGA AGA AAC GAT TGC ACC AAC C	58,4
fsrC_3	TTT CTT TTT ACA TAT AAC AAT CCC C	54,8
mfsrC_3	TTT TTG TGT TTT TGA TTT CGC C	52,8
mfsrC	TTT GTT CGT TTG CGG C	49,2
T7fsrC	T7 - GT TGA GTG ACC GCT CC	70,6
mgelE	AAT ATT TAC GCA GGG	42,4
T7gelE	T7 - GT TTA CCT GAA TGT CC	67,1
T7mgelE	T7 - GC AAC AAA TAT TTA CGC AGG G	69,5
gelE	TCA TTC ATT GAC CAG	42,4
gelE_2	GTG TAA AGC AAT TCC CG	50,4
mgelE_2	AAC GGA TAA CAC AGG GG	52,8
gelE_3	CAA CAC TCT GAG TAT CCG CAC C	62,1
mgelE_3	TCT TCG CCA ACT GGT GAC C	58,8
msprE	TAA CTT TGA TCG CCG G	49,2
T7sprE	T7 - GC TGC TGG CAC AGC GG	73,0
sprE_2	TCA AAC AAA CGA AAC TGG C	52,4
msprE_2	TTT GTT TAG TAA AAG TAC TCT GG	53,5
sprE_3	CAT TCT TAA AAC TTT CAG CCA C	54,7
T7mfsrD	T7 GA AAT TTG GTA AAA A	62,2

As reacções de PCR foram efectuadas com a enzima *Taq* DNA Polimerase Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> (Roche). Esta enzima foi utilizada para diminuir a introdução de erros nos fragmentos de DNA amplificados, facto importante para garantir a máxima segurança nos

<sup>†</sup> Alguns destes primers foram utilizados para a análise RNA (protocolo 2.3.2).

resultados da sequenciação. As misturas de reacção foram realizadas num volume total de 50  $\mu$ l que continha 250 ng de DNA genómico, 0,4  $\mu$ M de cada “primer”, 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1x tampão e 2,5U de *Taq* DNA polimerase e a reacção de PCR teve lugar no termociclador da Biometra®.

Os programas de PCR utilizados foram elaborados de acordo com o TM de cada par de “primers” usados (quadro 3).

**Quadro 3 – Programa padrão utilizado nos PCRs utilizados.**

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	94	2 min	1x
Desnaturação	94	30 segundos	35x
“Annealing”	TM <sup>‡</sup> - 4°C	30 segundos	
Extensão	68	4 min	
Extensão final	68	7 min	1x

### 2.2.3 Electroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram separados e visualizados em electroforese em gel de agarose (0,8% (p/v) em tampão TBE 1x (0,89 M Tris Base, 0,89M ácido bórico, 0,02M EDTA, 1 $\mu$ g/ml de brometo de etídeo (Sigma, Portugal))). Sendo este o mesmo tampão utilizado para a corrida, incorporando-se no gel uma solução de brometo de etídeo com uma concentração final de 1% (v/v), de modo a tornar possível a posterior visualização do DNA recorrendo à radiação ultravioleta. Aplicaram-se no gel 5  $\mu$ l de cada produto de PCR com 1 $\mu$ l de tampão de corrida (Sigma, Portugal). Utilizou-se o marcador 1Kb “Ladder Plus” (100-12000 pb) (Invitrogen) para confirmação do tamanho aproximado dos fragmentos de DNA obtidos. A migração das amostras foi efectuada a 80 volts durante 2 h, após o que o gel foi visualizado e fotografado recorrendo á radiação ultravioleta (tempo de exposição de 4 segundos) (Kodak 1D 3.6).

<sup>‡</sup> TM do primer que no par respectivo tenha o TM menor.

#### 2.2.4 Purificação dos produtos de PCR e sequenciação

Os fragmentos de DNA obtidos foram purificados usando o “Kit QIAquick PCR Purification” (Qiagen) e posteriormente quantificados pelo aparelho espectofotômetro NanoDrop 1000, como anteriormente descrito. Os produtos purificados (2 ng/μl por 100pb do produto PCR) juntamente com os respectivos pares de “primers” (10 pmol/μl) foram enviados para a empresa MWG-Biotech (Alemanha) para a sequenciação. A análise das sequências foi efectuada recorrendo ao programa VectorNTI da Invitrogen. As sequências, apresentadas são o resultado da sequenciação das duas cadeias de DNA.

### 2.3 Análise de RNA

#### 2.3.1 Extracção de RNA ao longo da curva de crescimento

A extracção do RNA total foi realizada por dois métodos distintos, os quais diferiam no tamanho das moléculas de RNA obtidas. Assim, um dos métodos utilizados foi baseado no método de extracção de RNA pelo fenol quente, utilizada para a extracção de RNA de bactérias Gram-negativas, nomeadamente *Escherichia coli*<sup>3</sup>. Este método permite a obtenção de moléculas de RNA de qualquer tamanho, todavia, é um protocolo moroso e que envolve produtos muito tóxicos (fenol quente). Por esta razão foi também utilizado um kit de extracção de RNA (*RNeasy Mini Kit* da Qiagen) que, contudo, permite apenas recuperar moléculas de RNA superiores a 200 ribonucleótidos.

Recolheram-se amostras de RNA representativas da curva de crescimento. Para esse efeito preparou-se um pré-inóculo em 3ml BHI e incubou-se durante a noite, a 37°C, sem agitação. No dia seguinte, inoculou-se 1 ml de pré-inóculo em 200 ml de BHI, num erlenmayer de 1 litro, e incubou-se a 37°C sem agitação. Retiraram-se 25 ml de cultura para os pontos iniciais

(fase lag e início da fase exponencial) e 12 ml de cultura para os restantes pontos (fase exponencial e fase estacionária) para a extracção por fenol quente. Para a extracção por kit foi retirado 1 ml de cultura para todos os pontos. Os volumes de cultura retirados foram adicionados a um igual volume de etanol frio (-80 °C) de forma a parar o metabolismo celular.

O protocolo seguinte constitui uma fusão de dois protocolos distintos: protocolo de extracção de DNA <sup>26</sup>, para a lise celular, e protocolo de extracção de RNA de *E. coli* pelo método do fenol quente, para a purificação do RNA total <sup>3</sup>. As amostras de cultura recolhidas e colocadas em etanol foram centrifugadas a 7500 rpm, 4°C durante 10 min. Lavaram-se as células com 6 ml de SET (20% Sacarose; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-Hcl pH 7,6; autoclavado). Centrifugou-se a 4°C, durante 10 min. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 3 ml de uma solução contendo lisozima (50 mg/l em SET) e 20 U de Inibidor de RNAses (Promega) e incubou-se a 37°C durante 60 min. Em seguida adicionou-se solução salina (150 mM NaCl; 10mM EDTA pH 8) e SDS 10% numa proporção de 1:2 (solução salina: SDS 10%). Misturou-se por inversão, e a cor transparente indicava a eficácia da lise celular.

De seguida procedeu-se à extracção e purificação do RNA total, para tal adicionou-se 1 volume da mistura fenol (saturado em água): clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e misturou-se até formar emulsão. Aqueceu-se a 65°C durante 10 min. Centrifugou-se a 7500 rpm durante 10 min. Retirou-se a fase superior aquosa e repetiu-se a extracção fenólica. Retirou-se a fase superior e adicionou-se 1 volume da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Misturou-se até formar emulsão, durante 10 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 7500 rpm durante 10 min. Para precipitar o RNA foi adicionado NaCl para uma concentração final de 0,3M e 2,5 volumes de etanol 100% e foi colocado a -80°C durante 30 min. Centrifugou-se a 4°C a 7500 rpm durante 50 min. Ressuspendeu-se o pellet em 200 µl

de água miliQ (sem RNAses) e precipitou-se novamente o RNA como anteriormente referido. Centrifugou-se a 7500 rpm a 4°C durante 10 min e lavou-se o “pellet” com etanol 70%. Centrifugou-se a 7500 rpm a 4°C, 10 min e deixou-se secar à temperatura ambiente. Por fim resuspendeu-se em água miliQ (sem RNAses) e quantificou-se recorrendo ao aparelho espectrofotômetro NanoDrop 1000.

A extracção e purificação de RNA efectuada por kit foi executada de acordo com o protocolo apresentado “RNeasy Mini Kit” da Qiagen. Este procedimento consiste na retenção do RNA por colunas e a posterior purificação recorrendo a tampões do kit e eluição em água.

Os RNAs extraídos foram visualizados por electroforese em gel de agarose 0,8% TBE 1X para avaliar a integridade e quantificação dos RNAs extraídos bem como a quantificação previamente efectuada

### **2.3.2 Análise dos RNAs extraídos**

De acordo com o tamanho dos transcritos que se quis analisar, os RNAs totais foram separados por electroforese em gel de agarose, para RNAs geralmente com tamanho superior ~700 ribonucleótidos, ou em gel de acrilamida para RNAs de tamanho inferior a ~700 ribonucleótidos.

#### **2.3.2.1 Separação dos RNAs em gel desnaturante de acrilamida e transferência por membrana (Northern-blot)**

O gel utilizado tinha a seguinte composição: acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6 % (Biorad), ureia 7 M (Sigma), TBE x1 (USB). Para a polimerização do gel foram adicionados APS 10% e TEMED na proporção 1:100 e 1:1000, respectivamente.

As amostras de RNA foram preparadas da seguinte forma: a 5µg de RNA total adicionou-se o tampão de migração desnaturante (azul bromofenol 0,03%, xileno cianol 0,03%, EDTA 10 mM e formamida desionizada (Ambion)).

A migração do gel foi precedida de uma pré-corrida à potência constante de 18 W durante 1 hora. As amostras de RNA previamente preparadas foram desnaturadas a 85°C durante 5 min e colocadas imediatamente no gelo para evitar renaturação. Em seguida as amostras foram aplicadas no gel e separadas por electroforese também à potência constante de 18 W (o tempo de migração variou de acordo com o tamanho dos transcritos estudados).

Após a electroforese os RNAs foram transferidos para uma membrana de nylon Hybond+ (Amersham), recorrendo-se ao aparelho Royal Genie Blotter (Ideia Scientific). A transferência foi efectuada em TAE1x (Tris 0,01M; acetato de sódio 0,005M; EDTA 0,5x10<sup>-5</sup>M; pH 7,8), a 7 V, durante 2 horas e 30 min horas a 4°C.

Posteriormente os RNAs foram fixados à membrana utilizando uma solução de NaOH 50 mM, seguida de neutralização numa solução de SSPE 2x (NaCl 3,6M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; EDTA 0,02M; pH 7,4).

### **2.3.2.2 Hibridação**

A hibridação das membranas foi precedida de uma pré-hibridação durante 1 hora a 42 °C (estufa Biometra OV3) com a mesma solução de hibridação (formamida 50%, SSPE 5x, reagente “Denhart” 5x (1% Ficoll 400; 1% polivilpirrolidona; 1% Albumina bovina)), SDS 0,5% e RNA levedura (200 ng/ml) previamente desnaturado. Em seguida adicionou-se a sonda radioactiva e procedeu-se à hibridação durante a noite a 55°C.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas - 3 lavagens, a 68°C durante 30 min cada, com os seguintes tampões: SSPE 2x com SDS 0,1%; SSPE 1x com SDS 0,1% e a SSPE

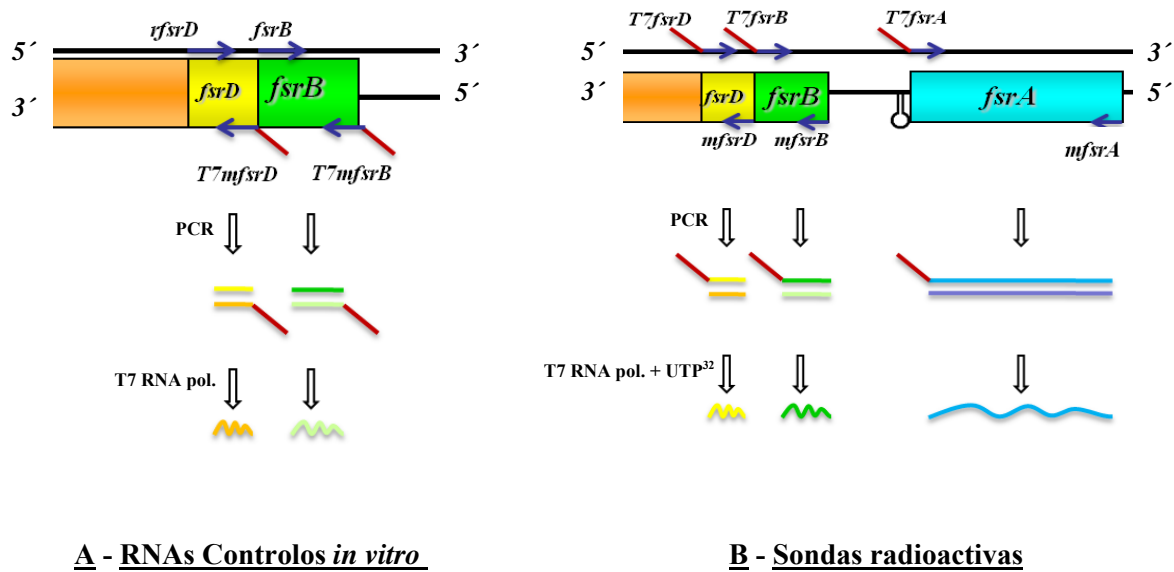
0,1% com SDS 0,1%, respectivamente. Em seguida secaram-se e expuseram-se as membranas no laser scanner Storm 860 (Molecular Dynamics).

### 2.3.2 Síntese de moléculas de RNA

Na análise dos RNAs totais realizada usaram-se RNAs sintetizados *in vitro* como controlos, os quais foram sintetizados utilizando a RNA polimerase (Promega) do bacteriófago T7 de *E. coli*. Para se efectuar uma transcrição *in vitro* construíram-se fragmentos de DNA, por PCR utilizando o DNA cromossómico de *E. faecalis* V583 como matriz, os quais tinham numa das suas extremidades a sequência correspondente ao promotor da RNA polimerase T7 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG G – 3') (figura 8). Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram purificados com o Kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen).

Para se efectuar a síntese de moléculas de RNA adicionou-se a, aproximadamente, 200 ng de fragmento de DNA, 4 µl tampão de transcrição 5x, 40 U de RNAsin (Promega), 2 µl DTT 100 mM, 4 µl rNTPs 2,5 mM de cada, 20 U de T7 RNA polimerase e água para um volume total de 20 µl. Incubou-se a 37°C durante 1 hora para efectuar a transcrição, após o que se degradou o fragmento de DNA com 5U DNase (Roche) incubando a 37°C durante 30 min. Em seguida os RNAs sintetizados foram purificados como descrito no protocolo 2.3.1.

Para sintetizar as sondas utilizadas na hibridação dos Northern efectuaram-se igualmente transcrições *in vitro*, como descrito no parágrafo anterior, com a diferença de que se adicionou [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (ILC) (figura 7). Após a transcrição efectuou-se a purificação das sondas através do kit MicroSpin G-25 columns (GE Healthcare).



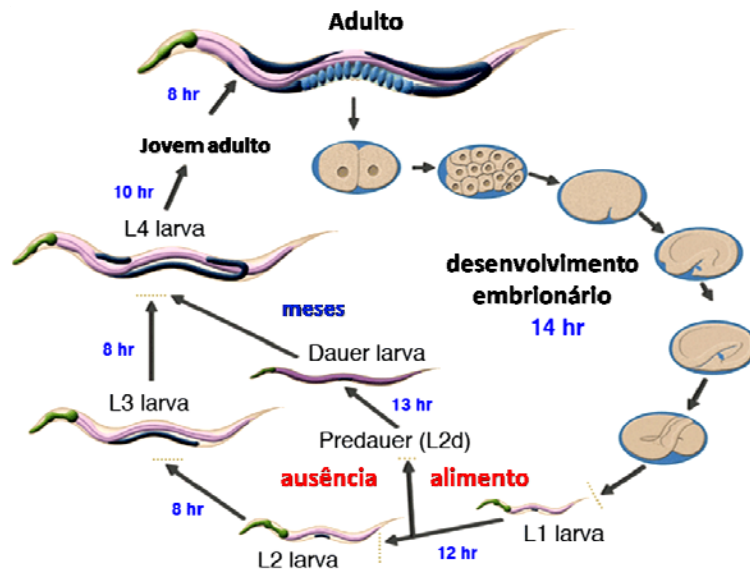
**Figura 7 – Esquema representativo da síntese dos RNAs *in vitro*.** **A** - Síntese dos RNAs controlos *in vitro*. Foram utilizados os pares de primers rfsrD/T7mfsrD e fsrB/T7mfsrB para a amplificação de fragmentos de DNA para os genes *fsrD* e *fsrB*, respectivamente. A extensão T7 foi adicionada na extremidade 5' do primer da cadeia codificante para os genes *fsrB* e *fsrD* (cadeia negativa) para que o RNA produzido seja igual aos RNAs da estirpe V583. **B** - Síntese das sondas radioativas. Foram utilizados os pares de primers T7fsrD/mfsrD, T7fsrB/mfsrB e T7fsrA/mfsrA para a amplificação de fragmentos de DNA para os genes *fsrD*, *fsrB* e *fsrA*, respectivamente. Estes amplicons foram amplificados com a extensão correspondente ao promotor da RNA polimerase T7 na extremidade 5' (extensão a vermelho) do primer da cadeia complementar da cadeia codificante dos genes estudados.

## 2.4 Análise da virulência de enterococos

### 2.4.1 Testes de virulência de *Enterococcus* utilizando o nemátodo *C. elegans*

Este procedimento foi efectuado conforme descrito por Garsin *et al.*<sup>31</sup>. Ressuspendeu-se 1 colónia bacteriana da estirpe em estudo em 5 ml de meio M17 suplementado com 0,5% glucose (cresceu a 37°C 7-8h). Prepararam-se placas de meio M17 contendo 40mM piruvato, fumarato e gentamicina 25 µg/ml, para evitar o crescimento de *E. coli*. Adicionou-se 10 µl de cada estirpe em cada placa e incubou-se a 37°C durante a noite. Deixaram-se as placas à temperatura ambiente durante 30 - 60 min, antes de se adicionar *C. elegans*. A estirpe

*C. elegans* N2 foi mantida e propagada em *E. coli* OP50 utilizando as técnicas standard <sup>112</sup>. Adicionaram-se entre 25 a 30 *C. elegans* em estágio L4 ou jovens adultos hermafroditas (transferidos da *E. coli* OP50) à placa com a estirpe em estudo (figura 8). Este procedimento foi efectuado em triplicado.



**Figura 8 – Esquema do ciclo de vida de *C. elegans*.** O ciclo de vida de *C. elegans* é constituído por 4 estádios de larvas – L1, L2, L3 e L4 até chegar a fase adulta. Em condições de ausência de alimento, este nemátodo entra no estádio “dauer larva” conseguindo sobreviver a condições adversas durante vários meses. Quando as condições se tornam favoráveis, a larva sai deste estádio e entra no L4 <sup>49</sup>.

As placas foram incubadas a 25°C e a partir do terceiro dia foram iniciadas as contagens de mortes de *C. elegans* e depois, repetidas em cada 24 horas. A viabilidade das *C. elegans* foi verificada através da dissecação ao microscópio. As larvas *C. elegans* foram consideradas mortas quando não respondiam a toques ou picadas com pinças. As *C. elegans* que morriam por ficarem encostadas na parede das placas não foram consideradas para o estudo.

### **2.4.2 Testes de virulência de *Enterococcus* utilizando o nematodo *G. mellonella***

Foram utilizadas 30 larvas de *G. mellonella* com peso aproximado de 200 mg. Estas foram infectadas com 10 µl de bactérias ( $2 \times 10^6$  bactérias) com uma agulha de 0,5 por 25 mm (Burckard Manufacturing) e microinjector. O grupo controlo de larvas foi injectado com NaCl 0,9%. As larvas foram mantidas em caixas individuais a 37°C. O número de mortes foram contadas de 24 em 24h durante 5 dias.

### **2.4.3 Análise estatística**

A sobrevivência dos modelos animais foi calculada pelo método “Kaplan – Meier” e a diferença de sobrevivência foi testada pela significância usando “the log rank test” (GraphPad Prism, version 4.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA). Valores de P <0,01 foram considerados estatisticamente.

## **CAPITULO 3. DESCRIÇÃO DAS ESTIRPES ESTUDADAS, CONFIRMAÇÃO DO GENÓTIPO *fsr/gelE-sprE* E FENÓTIPO GELATINASE**

### **3.1 Objectivos do estudo**

### **3.2 Resultados e Discussão**

## CAPITULO 3. DESCRIÇÃO DAS ESTIRPES ESTUDADAS, CONFIRMAÇÃO DO GENÓTIPO *fsr/gelE-sprE* E FENÓTIPO GELATINASE

### 3.1 Objectivos do estudo

No início deste estudo, foi necessário confirmar o genótipo, bem como o fenótipo gelatinase, uma vez que têm sido descritos na literatura como bastante lábil. Por exemplo, Nakayama e colaboradores demonstraram o aparecimento de frequentes deleções no operão *fsr* de *E. faecalis* e *E. faecium*, de isolados clínicos<sup>85</sup>. Os isolados com deleção de 23,4 kb (eliminando o *fsrA*, *fsrB* e parte do *fsrC*), apresentavam fenótipo gelatinase negativo e não tinham actividade da GBAP<sup>85</sup>. Em estudos preliminares, Nakayama *et al.* observaram que ao final de seis gerações as estirpes se tornavam gelatinase negativas, facto que Eaton e Gasson já tinham referido<sup>21, 85</sup>. Desta forma, chegou-se à conclusão que este tipo de deleções ocorre com frequência em *Enterococcus*<sup>68, 85</sup>. Assim, este capítulo teve como objectivos:

- ✓ Verificar a presença dos genes completos *fsrA* (EF1822), *fsrB* (EF1821), *fsrC* (EF1820), *gelE* (EF1818) e *sprE* (EF1817) através da técnica de PCR;
- ✓ Confirmação do fenótipo gelatinase, através do teste gelatinase.

Para a confirmação do genótipo foi necessária a escolha de primers que abrangessem os genes completos. Esta foi efectuada com base na sequência do genoma de *E. faecalis* V583 e das indicações publicadas dos operões *fsr* e *gelE-sprE*<sup>84, 95, 94</sup>.

### 3.2 Resultados e Discussão

Para a realização deste estudo, foram seleccionadas estirpes de espécies diferentes (*E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*) anteriormente analisadas, e com congruência/incongruência entre o genótipo *fsr* e *gelE-sprE* e fenótipo gelatinase <sup>68</sup>. Os resultados obtidos estão apresentados no quadro 4.

**Quadro 4 – Confirmação dos resultados anteriormente obtidos.** Para cada estirpe o respectivo genótipo (presença dos genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *gelE* e *sprE*) e fenótipo (teste da actividade gelatinase) foram realizados para as estirpes apresentadas.

Isolados	Espécie	Genótipo					Fenótipo
		<i>fsrA</i>	<i>fsrB</i>	<i>fsrC</i>	<i>gelE</i>	<i>sprE</i>	Gelatinase
LN68	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	-
LN66	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	-
QN8	<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	-
QSE32	<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+
QSE15	<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	-
QSE125	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	-
LSE4	<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	-
QA29b	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+

Os resultados obtidos mostram que não ocorreram perdas de genes e/ou mudanças de fenótipo nas estirpes escolhidos, pelo que, as incongruências/congruências entre o genótipo e o fenótipo em todas as estirpes mantiveram-se relativamente aos resultados publicados por Lopes *et al.* <sup>68</sup>.

O estudo foi iniciado com duas estirpes diferentes com genótipo e fenótipo positivo (QSE32 e QA29b) e seis estirpes com genótipo positivo e fenótipo negativo (LN68, LN66, QN8, QSE15, QSE125 e LSE4).

## **CAPITULO 4. SEQUÊNCIAÇÃO DOS OPERÕES *fsr* E *gelE-sprE***

### **4.1 Objectivos do estudo**

### **4.2 Resultados e discussão**

4.2.1 – Identificação das mutações encontradas na estirpe *E. faecium* QSE32

4.2.2 – Identificação das mutações encontradas na estirpe *E. faecalis* LN68

4.2.3 Análise do efeito das mutações identificadas nas proteínas dos operões *fsr* e *gelE-sprE*

4.2.3.1 Proteína FsrA (Regulador)

4.2.3.2 Proteína FsrB e FsrD (GBAP)

4.2.3.3 Proteína FsrC (Histidina Cinase)

4.2.3.4 Gelatinase

4.2.3.5 Proteínase serínica

4.2.3.6 Análise da mutação encontrada no gene *fsrC* na estirpe *E. faecalis* LN68 em outras estirpes com fenótipo gelatinase negativo

## CAPITULO 4. SEQUÊNCIAÇÃO DOS OPERÕES *fsr* E *gelE-sprE*

### 4.1 Objectivos do estudo

A presença de mutações nos genes dos operões *fsr* e *gelE-sprE* pode ser a explicação molecular para a incongruência de genótipo/fenótipo encontrada em algumas estirpes deste estudo (LN66, LN68, QN8, QSE15, QSE125 e LSE4). Sequenciaram-se os operões *fsr* e *gelE-sprE* em duas estirpes anteriormente referidas: uma estirpe com genótipo positivo e fenótipo gelatinase negativo (LN68) e outra com genótipo/fenótipo positivo (QSE32). A estirpe *E. faecium* QSE32 foi também escolhida para perceber as possíveis diferenças nestes operões existentes entre espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Assim, este capítulo tem como objectivos:

- ✓ Sequênciação e análise dos operões *fsr* e *gelE-sprE* das estirpes *E. faecium* QSE32 e *E. faecalis* LN68;
- ✓ Análise do efeito das mutações encontradas sobre a expressão dos operões.

## 4.2 Resultados e discussão

Foram sequenciadas um total de 6058 pb para a estirpe *E. faecium* QSE32 e de 6106 pb para a estirpe *E. faecalis* LN68, incluindo os genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrD*, *fsrC*, *gelE* e *sprE* e respectivas zonas intergénicas. A sequênciação das zonas intergénicas foi efectuada com o objectivo de detectar possíveis mutações em regiões importantes para a regulação da expressão destes operões quer a nível transcricional, pós-transcricional e/ou tradução.

As mutações são mudanças de pares de bases que podem ocorrer num gene e nas zonas intergénicas de um organismo. Neste capítulo, as mutações procuradas foram a nível pontual dos genes dos operões *fsr* e *gelE-sprE* (quadro 5).

**Quadro 5 – Tipos de Mutações Génicas.** Apresentação dos três tipos de mutações genicas e respectivas sub-categorias <sup>38</sup>.

<b>Substituição</b> (substituição de uma só base do DNA)	<b>Mutação silenciosa</b> ("Silence")	Substituição de uma base do DNA por outra (no 3º nucleótido de cada codão), resultando num codão que codifica o mesmo aminoácido, devido à redundância do código genético.
	<b>Mutação com perda de sentido</b> ("Missense")	Substituição de uma base do DNA por outra, que tem como consequência a substituição de um aminoácido por outro na proteína codificada. A conformação da proteína pode ser alterada.
	<b>Mutação sem sentido</b> ("Nonsense")	Substituição de uma base do DNA de tal modo que, no mRNA, um codão que especifica um aminoácido é alterado para um codão de STOP, ou o contrário. Origina uma proteína mais curta ou mais longa do que a proteína normal.
<b>Delecção</b> (remoção de uma ou mais bases do DNA)	Pode ser removida uma única base ou mais bases do DNA.	
<b>Inserção</b> (Adição de uma ou mais bases ao DNA)	O número de bases adicionadas ao DNA pode variar. Quando é inserida uma sequência igual a outra ocorre uma duplicação.	

As mutações que conduzem a uma alteração do aminoácido podem ter efeitos distintos na funcionalidade da proteína; por exemplo se um aminoácido for alterado por outro pertencente ao mesmo grupo de classificação o seu efeito poderá ser inferior ao efeito de uma alteração que conduza a um aminoácido pertencente a um grupo diferente (quadro 6) <sup>38</sup>.

**Quadro 6 – Classificação dos aminoácidos.** A classificação dos aminoácidos divide-se em quatro grupos: apolares, polares neutros, polares básicos e polares ácidos. Este quadro foi efectuado com base de Griffiths *et al.*<sup>38</sup>

GRUPO DE AMINOÁCIDOS				
Apolares		Polares Neutros	Polares Básicos	Polares Ácidos
Aminoácido (Abreviatura/Símbolo)		Aminoácido (Abreviatura/Símbolo)	Aminoácido (Abreviatura/Símbolo)	Aminoácido (Abreviatura/Símbolo)
Glicina (Gly /G)	Fenilalanina (Phe/F)	Serina (Ser/S)	Arginina (Arg/R)	Ácido aspártico (Asp/D)
Alanina (Ala/A)	Triptofano (Trp/W)	Treonina (Thr/T)	Lisina (Lys/K)	Ácido glutâmico (Glu/E)
Leucina (Leu/L)	Metionina (Met/M)	Cisteína (Cys/C)	Histidina (His/H)	
Isoleucina (Ile/I)	Valina (Val /V)	Tirosina (Tyr/Y)		
Prolina (Pro/P)		Asparagina (Asn/N)		
		Glutamina (Gln/Q)		

No caso de as mutações ocorrerem em regiões não codificantes, ditas reguladoras, também podem interferir na expressão do gene. Este facto deve-se a estas regiões consistirem em sequências envolvidas na transcrição, processamento e/ou estabilidade do transcrito respectivo e/ou tradução do gene.

As sequenciações foram efectuadas pela MWG e foram sequenciadas as duas cadeias dos fragmentos de DNA enviados. A análise dos resultados das sequenciações foi efectuada com o programa Vector NTI (Invitrogen). As sequências recebidas correspondentes às duas cadeias complementares foram alinhadas e apenas se consideraram fiáveis as sequenciações em que havia complementaridade das duas cadeias. Em caso de dúvida foram efectuadas novas sequenciações. Com as sequências recebidas efectuou-se a construção dos operões para ambos as estirpes (QSE32 e LN68) e os alinhamentos apresentados no Anexo 1. Estes alinhamentos foram efectuados com as sequências das cadeias codificantes (cadeia 3'-5') dos operões *fsr* e *gelE-sprE* da estirpe controlo *E. faecalis* V583. Os resultados obtidos evidenciaram a existência de vários tipos de mutações em ambas as estirpes (quadro 7). A identificação e posicionamento das mutações permitiu prever a possível alteração da

sequência de aminoácidos das proteínas, bem como, alterações nas regiões envolvidas na regulação da transcrição e/ou tradução.

#### 4.2.1 – Identificação das mutações encontradas na estirpe *E. faecium* QSE32

Na estirpe QSE32 detectaram-se 68 mutações, destacando-se 33 mutações silenciosas, 20 com perda de sentido, 13 nas zonas intergênicas, 1 deleção e 1 inserção (quadro 7).

Nas regiões codificantes dos genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrD*, *fsrC*, *gelE* e *sprE* foram observados vários tipos de mutações de substituição de bases que resultaram em mutações de perda de sentido, mutações silenciosas e uma deleção. Assim, no gene *fsrA* foram identificadas 2 mutações de perda de sentido e 2 mutações silenciosas; no gene *fsrB* identificou-se 8 mutações de perda de sentido e 7 silenciosas; no gene *fsrC* identificou-se 1 mutação perda de sentido e 5 silenciosas; no *gelE* 6 mutações perda de sentido, 13 silenciosas e 1 deleção; no gene *sprE* identificaram-se 3 mutações perda de sentido e 6 silenciosas (quadro 7). As mutações de perda de sentido identificadas em todos os genes e a deleção identificada no gene *gelE* serão analisadas em pormenor.

Nas regiões não codificantes foram identificadas um total de 14 mutações de mudança de nucleótido e uma inserção: 2 mutações a montante da sequência promotora -35 do gene *fsrA*; 2 mutações a montante da sequência promotora -35 do *fsrB-fsrD-fsrC* (uma delas é uma inserção); 2 mutações entre as regiões promotoras -35 e -10 do *fsrB-fsrD-fsrC*; 2 mutações a montante da sequência promotora -35 do *gelE-sprE*; 2 mutações a jusante da sequência promotora +1 do *gelE-sprE*; 1 mutação a jusante da sequência de Shine-Dalgarno dos genes *gelE-sprE* e 3 mutações a jusante da região codificante do *sprE* (figura 9) (quadro 7).

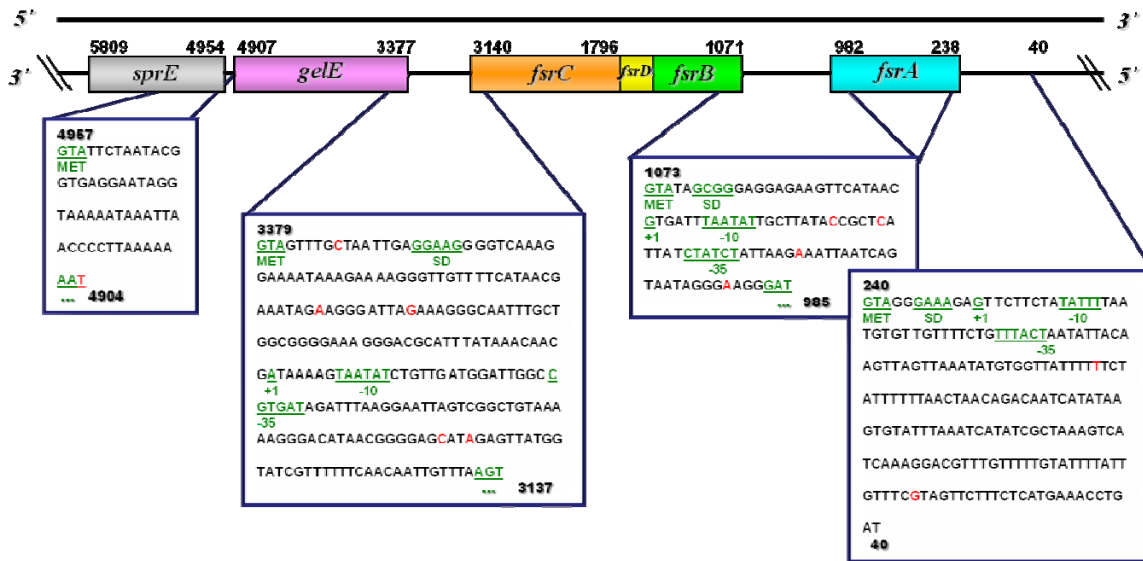


Figura 9 – Identificação das mutações identificadas nas zonas intergênicas dos genes *fsrA*, *fsrB*- *fsrD*- *fsrC* e *gelE-sprE* da estirpe QSE32. Sequências intergênicas dos operões *fsr* e *gelE-sprE* com identificação das zonas reguladoras (sublinhados a verde), mutações (vermelho) e respectivas posições apresentadas no quadro 7 e Anexo 1 (números a preto).

**Quadro 7 – Mutações identificadas nos operões *fsr* e *gelE-sprE* na estirpe *E. faecium* QSE32.** Identificação das mutações nos operões *fsr* e *gelE-sprE* da estirpe QSE32, respectiva posição na cadeia 3'-5' (cadeia -), zona do operão (gene afectado), mudança de nucleótido e aminoácido e respectivo tipo de mutação. (\*) Indica que são mutações dentro da zona intergénica e por isso não têm classificação de mutações de substituição.

Mutação n.º	Posição (do Anexo 1.1)	Zona do operão	Mudança de nucleótido (V583-QSE32)	Mudança de aminoácido (V583-QSE32)	Tipo de Mutação	
1	64	129 pb a montante do -35 <i>fsrA</i>	C-G	(*)	(*)	
2	158	35 pb a montante do -35 <i>fsrA</i>	C-T	(*)	(*)	
3	302	<i>fsrA</i>	T-C	Val-Ala	Perda de sentido	
4	759		G-A	-	Silenciosa	
5	801		G-T	-	Silenciosa	
6	941		G-A	Arg-Lys	Perda de sentido	
7	985		26 pb a montante -35 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	-A	# inserção	Inserção
8	1004		7 pb a montante -35 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	G-A	(*)	(*)
9	1022	Entre -10 e -35 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	G-C	(*)	(*)	
10	1027	Entre -10 e -35 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	T-C	(*)	(*)	
11	1184	<i>fsrB</i>	C-T	Leu-Phe	Perda de sentido	
12	1337		C-T	-	Silenciosa	
13	1340		C-T	-	Silenciosa	
14	1403		G-T	Met-Ile	Perda de sentido	
15	1415		C-T	-	Silenciosa	
16	1442		A-C	Gln-His	Perda de sentido	
17	1451		C-A	-	Silenciosa	
18	1465		G-A	-	Silenciosa	
19	1581		A-G	Ile-Val	Perda de sentido	
20	1642		A-C	Lys-Thr	Perda de sentido	
21	1651		A-C	Lys-Thr	Perda de sentido	
22	1691		A-G	-	Silenciosa	
23	1694		T-C	-	Silenciosa	
24	1695		A-C	Ser-Arg	Perda de sentido	
25	1741	A-T	Asn-Ile	Perda de sentido		
26	1988	<i>fsrC</i>	A-G	-	Silenciosa	
27	2050		G-A	Ile-Val	Perda de sentido	
28	2053		T-C	-	Silenciosa	
29	2506		C-T	-	Silenciosa	
30	2776		T-C	-	Silenciosa	
31	2986		T-C	-	Silenciosa	
32	3173		49pb a montante -35 <i>gelE-sprE</i>	T-A	(*)	(*)
33	3176		46pb a montante -35 <i>gelE-sprE</i>	T-C	(*)	(*)

Quadro 7 – (continuação)

Mutação n.º	Posição (do Anexo 1.1)	Zona do operão	Mudança de nucleótido (V583-QSE32)	Mudança de aminoácido (V583-QSE32)	Tipo de Mutação	
34	3303	47pb a jusante +1 <i>gelE-sprE</i>	A-G	(*)	(*)	
35	3312	56pb a jusante +1 <i>gelE-sprE</i>	G-A	(*)	(*)	
36	3371	8 pb a jusante SD <i>gele-sprE</i>	T-C	(*)	(*)	
37	3460	<i>gelE</i>	C-A	-	Silenciosa	
38	3663		G-A	Arg-Lys	Perda de sentido	
39	3667		T-C	-	Silenciosa	
40	3777		C-T	Pro-Leu	Perda de sentido	
41	3783		C-A	Thr-Asn	Perda de sentido	
42	3791		C-A	Leu-Ile	Perda de sentido	
43	3829		G-A	-	Silenciosa	
44	3865		G-A	-	Silenciosa	
45	3881		G-A	Val-Ile	Perda de sentido	
46	3901		G-A	-	Silenciosa	
47	3904		C-T	-	Silenciosa	
48	3989		G-A	Ala-Thr	Perda de sentido	
49	4000		G-A	-	Silenciosa	
50	4141		C-T	-	Silenciosa	
51	4198		C-T	-	Silenciosa	
52	4375		A-G	-	Silenciosa	
53	4819		A-G	-	Silenciosa	
54	4858		G-A	-	Silenciosa	
55	4894		G-A	-	Silenciosa	
56	4905		G-	# deleção	Deleção	
57	5020		<i>sprE</i>	C-A	-	Silenciosa
58	5230			C-T	-	Silenciosa
59	5343			C-T	Thr-Ile	Perda de sentido
60	5626			C-A	-	Silenciosa
61	5629			C-T	-	Silenciosa
62	5658			A-C	Asp-Ala	Perda de sentido
63	5663			G-T	Val-Phe	Perda de sentido
64	5713			T-C	-	Silenciosa
65	5755	T-C		-	Silenciosa	
66	5829	20 pb a jusante <i>sprE</i>		G-A	(*)	(*)
67	5852	43 pb a jusante <i>sprE</i>		C-T	(*)	(*)
68	6028	219 pb a jusante <i>sprE</i>	C-T	(*)	(*)	

#### 4.2.2 – Identificação das mutações encontradas na estirpe *E. faecalis* LN68

As sequenciações relativas à estirpe LN68 permitiram identificar 60 mutações no total, sendo 31 mutações silenciosas, 19 de perda de sentido 1 sem sentido, 1 inserção e 8 mutações nas zonas intergênicas.

Nas regiões codificantes *fsrA*, *fsrB*, *fsrD*, *fsrC*, *gelE* e *sprE* foram observados vários tipos de mutações de substituição de bases que resultaram em mutações de perda de sentido, mutações silenciosas e uma deleção. Assim, no gene *fsrA* foram identificadas 2 mutações silenciosas e 2 mutações de perda de sentido; no gene *fsrB* identificaram-se 3 mutações perda de sentido e 4 silenciosas; no gene *fsrC* identificaram-se 5 mutação perda de sentido, 5 silenciosas e 1 sem sentido; no gene *gelE* identificaram-se 5 mutações perda sem sentido, 12 silenciosas; no gene *sprE* identificaram-se 3 mutações perda de sentido e 8 silenciosas. As mutações de perda de sentido identificadas em todos os genes e a mutação sem sentido identificada no gene *fsrC* serão analisadas em pormenor.

Nas regiões não codificantes foram identificadas um total de 9 mutações de mudança de nucleótido e uma inserção: 3 mutações a montante da sequência promotora -35 do *fsrA*; 2 mutações a montante da sequência promotora -35 do *fsrB-fsrD-fsrC* (uma delas é a inserção); 2 mutações entre as sequências promotoras -35 e -10 do *fsrB-fsrD-fsrC*; 1 mutação no -10 do *fsrB-fsrD-fsrC*; 1 mutações a jusante da parte codificante do *sprE* (figura 10).

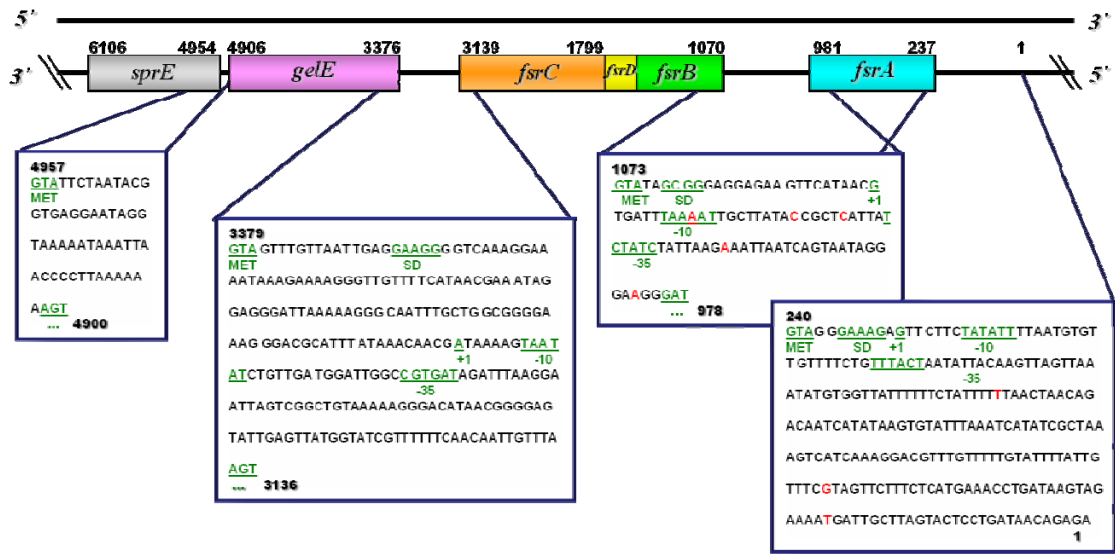


Figura 10 – Identificação das mutações identificadas nas zonas intergênicas dos genes *fsrA*, *fsrB*- *fsrD*- *fsrC* e *gelE-sprE* da estirpe LN68. Sequências intergênicas dos operões *fsr* e *gelE-sprE* com identificação das zonas reguladoras (sublinhado verde), mutações (vermelho) e posições apresentadas no quadro 7 e no Anexo 1(números a preto).

**Quadro 8 – Mutações observadas nos operões *fsr* e *gelE-sprE* na estirpe *E. faecalis* LN68.** Identificação das mutações nos operões *fsr* e *gelE-sprE* da estirpe Ln68, respectiva posição na cadeia 3'-5' (cadeia -), zona do operão (gene afectado), mudança de nucleótido e aminoácido (com a comparação do V583), e respectivo tipo de mutação. (\*) Indica que são mutações dentro da zona intergénica e por isso não têm classificação de mutações de substituição.

Mutação n.º	Posição (do Anexo 1.1)	Zona do operão	Mudança de nucleótido (V583-Ln68)	Mudança de aminoácido (V583-Ln68)	Tipo de Mutação
1	29	164 pb a montante -35 <i>fsrA</i>	A-T	(*)	(*)
2	64	129 pb a montante -35 <i>fsrA</i>	C-G	(*)	(*)
3	158	44 pb a montante -35 <i>fsrA</i>	C-T	(*)	(*)
4	302	<i>fsrA</i>	T-C	Val-Ala	Perda de sentido
5	759		G-A	-	Silenciosa
6	801		G-T	-	Silenciosa
7	941		G-A	Arg-Lys	Perda de sentido
8	985	28 pb a montante -35 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	-A	#	Inserção de 1 base
9	1004	8 pb a montante -35 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	G-A	(*)	(*)
10	1022	Entre o -10 e -35 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	G-C	(*)	(*)
11	1027	Entre o -10 e -35 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	T-C	(*)	(*)
12	1038	-10 <i>fsrB-fsrD-fsrC</i>	T-A	(*)	(*)
13	1109	<i>fsrB</i>	G-A	Met-Ile	Perda de sentido
14	1185		C-T	Leu-Phe	Perda de sentido
15	1298		T-C	-	Silenciosa
16	1395		C-T	-	Silenciosa
17	1403		G-T	Met-Ile	Perda de sentido
18	1451		G-A	-	Silenciosa
19	1454		T-C	-	Silenciosa
20	1954	<i>fsrC</i>	C-T	-	Silenciosa
21	1956		A-G	Tyr-Cys	Perda de sentido
22	2165		C-A	Leu-Ile	Perda de sentido
23	2549		T-A	Tyr-Asn	Perda de sentido
24	2776		T-C	-	Silenciosa
25	2949		A-G	Lys-Arg	Perda de sentido
26	2986		T-C	-	Silenciosa
27	3004		G-A	Trp-Stop	Sem sentido
28	3051		T-C	-	Silenciosa
29	3076		G-T	Ala-Ser	Perda de sentido
30	3082		C-T	-	Silenciosa

Quadro 8 – (continuação)

Mutação n°	Posição (do Anexo 1.1)	Zona do operão	Mudança de nucleótido (V583-Ln68)	Mudança de aminoácido (V583-Ln68)	Tipo de Mutação	
31	3576	<i>gelE</i>	T-C	-	Silenciosa	
32	3663		G-A	Arg-Lys	Perda de sentido	
33	3667		T-C	-	Silenciosa	
34	3709		A-T	-	Silenciosa	
35	3783		C-A	Thr-Asn	Perda de sentido	
36	3829		G-A	-	Silenciosa	
37	3865		G-A	-	Silenciosa	
38	3989		G-A	Ala-Thr	Perda de sentido	
39	4000		G-A	-	Silenciosa	
40	4105		A-G	-	Silenciosa	
41	4116		T-C	Val-Ala	Perda de sentido	
42	4117		A-G	Val-Ala	Perda de sentido	
43	4118		G-A	Ala-Thr	Perda de sentido	
44	4375		A-G	-	Silenciosa	
45	4420		G-C	-	Silenciosa	
46	4819		A-G	-	Silenciosa	
47	4861		C-T	-	Silenciosa	
48	4867		G-A	-	Silenciosa	
49	5110		<i>sprE</i>	G-A	-	Silenciosa
50	5230			C-T	-	Silenciosa
51	5353	C-T		-	Silenciosa	
52	5414	G-A		Gly-Ser	Perda de sentido	
53	5626	C-A		-	Silenciosa	
54	5629	C-T		-	Silenciosa	
55	5644	A-C		-	Silenciosa	
56	5658	A-C		Asp-Ala	Perda de sentido	
57	5663	G-T		Val-Phe	Perda de sentido	
58	5713	T-C		-	Silenciosa	
59	5755	T-C		-	Silenciosa	
60	6032	223 pb a jusante <i>sprE</i>		A-T	(*)	(*)

### 4.2.3 Análise do efeito das mutações identificadas nas proteínas dos operões *fsr* e *gelE-sprE*

Após a identificação das mutações em cada um dos genes dos operões *fsr* e *gelE-sprE*, analisou-se o seu posicionamento de forma a tentar perceber se estas provocam algum efeito na actividade de cada uma das proteínas das estirpes QSE32 e LN68. Assim, com as sequências de nucleótidos dos operões *fsr* e *gelE-sprE* obtiveram-se as sequências das proteínas e efectuou-se o alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas (FsrA, FsrB, FsrD, FsrC, gelatinase e protease sérica) das duas estirpes estudadas com a estirpe controlo V583. Analisou-se cada gene afectado com mutações perda de sentido, sem sentido, deleções e inserções e consequentemente identificaram-se os aminoácidos modificados. Após esta análise, efectuou-se um blastp (programa do site NCBI) de forma a procurar os domínios putativos das proteínas estudadas e tentar correlacionar as mutações com os domínios encontrados<sup>47</sup>.

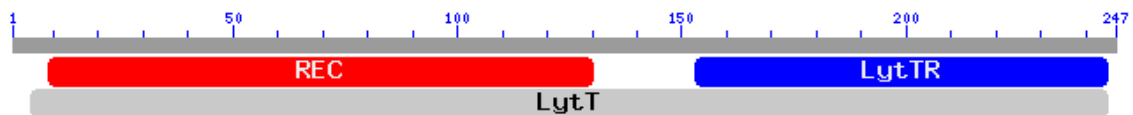
#### 4.2.3.1 Proteína FsrA (Regulador)

Nas estirpes analisadas, LN68 e QSE32, verificou-se que estas apresentam as mesmas duas mutações perda de sentido no gene *fsrA*. A análise dos alinhamentos efectuados relativos às proteínas FsrA, permitiu verificar que estas mutações provocam a substituição de dois aminoácidos (figura 11). Os aminoácidos 22 e 235 foram substituídos: a Valina 22 (V) foi substituída por uma Alanina (A)), sendo ambos aminoácidos apolares; a Arginina (R) foi substituída por Lisina 235 (K), e pertencem ambos ao grupo de aminoácidos básicos (figura 11).

		1	10	20	30	40	50	60	70	80
FsrA	V583	MSEQMAIYILEDQIIQAKALEVLLTNILHSRNIYNETIHLFSRSDLELQVAHQDAQLNIFFLDIQMNNHIOAGFEVAKAIRK								
FsrA	LN68	MSEQMAIYILEDQIIQAKALEALLTNILHSRNIYNETIHLFSRSDLELQVAHQDAQLNIFFLDIQMNNHIOAGFEVAKAIRK								
FsrA	QSE32	MSEQMAIYILEDQIIQAKALEALLTNILHSRNIYNETIHLFSRSDLELQVAHQDAQLNIFFLDIQMNNHIOAGFEVAKAIRK								
(...)										
		170	180	190	200	210	220	230		248
FsrA	V583	YDHRVSMVGKNFKREFYGTLSKIEQLHPDLIRVHQSIIINKKYASKLNYKTHLLTMRDGEVPSRRYYTQVKALFLT-								
FsrA	LN68	YDHRVSMVGKNFKREFYGTLSKIEQLHPDLIRVHQSIIINKKYASKLNYKTHLLTMRDGEVPSKRYYTQVKALFLT-								
FsrA	QSE32	YDHRVSMVGKNFKREFYGTLSKIEQLHPDLIRVHQSIIINKKYASKLNYKTHLLTMRDGEVPSKRYYTQVKALFLT-								

**Figura 11 – Sequência das proteínas FsrA das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento da sequência das proteínas FsrA da estirpe controle V583 e das estudadas LN68 e QSE32 - e alterações de aminoácidos que foram identificados. O Alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.1.

A proteína FsrA, de acordo com o programa Blastp, tem três domínios diferentes: REC (“Signal receiver domain”), LytTR (“LytTr DNA-binding domain”) e LytT (“Response regulator of the LytR/AlgR family”) (Figura 12) <sup>48</sup>. O domínio REC tem a função de receber o sinal de um sensor de um sistema de dois componentes, e na sua constituição tem um local de fosforilação onde é fosforilado por um homólogo de uma histidina cinase, e normalmente é encontrado na extremidade N-terminal um domínio de ligação ao DNA <sup>48</sup>. O domínio LytTR é um domínio de ligação ao DNA que é encontrado, normalmente, em reguladores transcricionais, e está envolvido na ligação a uma sequência específica de DNA <sup>48</sup>. Por último, o domínio LytT também está envolvido nos mecanismos de tradução de sinal e regulação transcricional <sup>48</sup>.



**Figura 12 – Domínios putativos da proteína FsrA.** Esquema representativo dos domínios da FsrA das estirpes LN68 e QSE32, constituído por um REC (“Signal receiver domain”), LytTR (“LytTr DNA-binding domain”) e LytT (“Response regulator of the LytR/AlgR family”) <sup>48</sup>.

As mutações perda de sentido encontradas no gene *fsrA* são as mesmas em ambas as estirpes, provocam as mesmas mudanças de aminoácidos pelo que não devem constituir uma resposta para a incongruência do genótipo/fenótipo encontrada na estirpe LN68.

#### 4.2.3.2 Proteína FsrB e FsrD (GBAP)

Relativamente ao gene *fsrB* foram identificadas mutações diferentes entre as estirpes QSE32 e LN68. No caso da estirpe LN68, foram detectadas somente três mutações de perda de sentido em comparação com a estirpe controlo V583. Assim, estas mutações traduziram-se na substituição dos aminoácidos 13, 39 e 111 (figura 13). Todas as mutações de perda de sentido conduzem à mudança de aminoácidos dentro do grupo dos aminoácidos polares (Metioninas 13 e 111 (M) por Isoleucinas (I) e Leucina 39 (L) por Fenilalanina (F)).

Na estirpe QSE32 identificaram-se oito mutações de perda de sentido que provocaram: 4 mudanças de aminoácidos entre o grupo polar neutro e o grupo polar básico - Glutamina 124 (Q) por Histidina (H)), Lisina 191 e 194 (K) por Treonina (T) e Serina 209 (S) por Arginina (R); 3 mudanças de aminoácidos dentro do grupo polar - Leucina 39 (L) foi substituída por Fenilalanina (F), Metionina 111 (M) por Isoleucina (I) e Isoleucina 171 (I) por Valina (V); e 1 mudança de aminoácido entre os grupos polar neutro e apolar – Asparagina 224 (N) por Isoleucina (I) (figura 11). As mutações que provocaram a substituição dos aminoácidos 39 e 111 já foram identificadas em estudos publicados<sup>39</sup>.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80
FsrB V583 MLIDWILKNIMDMQEDQSGKTQWTKYYLTVYFSGLFNLLMILILSVLFGTLSETFIVYVVLIFLRPVAGGWHAKTKWLCRLESIVIYV
FsrB LN68 MLIDWILKNIMDIDQEDQSGKTQWTKYYLTVYFSGLFNLLMILILSVLFGTLSETFIVYVVLIFLRPVAGGWHAKTKWLCRLESIVIYV
FsrB QSE32 MLIDWILKNIMDMQEDQSGKTQWTKYYLTVYFSGLFNLLMILILSVLFGTLSETFIVYVVLIFLRPVAGGWHAKTKWLCRLESIVIYV

96      110      120      130      140
FsrB V583 KNSSVSLPFIYKILLMCLLVVLFYWYAPQGTAIEPVQPSDLNVLKKQSLIRVC
FsrB LN68 KNSSVSLPFIYKILLICLLVVLFWYWYAPQGTAIEPVQPSDLNVLKKQSLIRVC
FsrB QSE32 KNSSVSLPFIYKILLICLLVVLFWYWYAPHGTAIEPVQPSDLNVLKKQSLIRVC

149      160      170      180      190      200      210      220      230
FsrB V583 LLILCSLFFVKEKIASVILYGLVIQGLMILPVTKNLIEGSVFMKFGKKI IKNVIEKRVAKVSDGVGTPKRLNQNSPNIIFGQWMGQTEK
FsrB LN68 LLILCSLFFVKEKIASVILYGLVIQGLMILPVTKNLIEGSVFMKFGKKI IKNVIEKRVAKVSDGVGTPKRLNQNSPNIIFGQWMGQTEK
FsrB QSE32 LLILCSLFFVKEKIASVILYGLVIVQGLMILPVTKNLIEGSVFMTFGTKI IKNVIEKRVAKVRDGVGTPKRLNQNSPIIFGQWMGQTEK

```

**Figura 13 – Sequências das proteínas FsrB das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteínas FsrB da estirpe controle V583 e das estudadas LN68 e QSE32 - e alterações de aminoácidos que foram identificados. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.2.

Ao efectuar-se o Blastp, verificou-se que ambas as estirpes têm um domínio putativo AgrB (figura 14) o qual pertence ao sistema *agr* de *S. aureus* e é essencial para a síntese e transporte do AIP (cf. Introdução)<sup>47, 48</sup>.



**Figura 14 – Domínio putativo da proteína FsrB.** Esquema representativo do domínio da proteína FsrB identificado nas estirpes LN68 e QSE32, constituído por um domínio AgrB (“Accessory gene regulator B”)<sup>47</sup>.

Algumas das mutações encontradas no gene *fsrB* que se traduziram na substituição de aminoácidos na proteína FsrB nas estirpes QSE32 e LN68 encontram-se dentro deste domínio. As substituições de aminoácidos identificadas na estirpe LN68 por serem dentro do mesmo grupo de aminoácidos poderão não ser relevantes na função desta proteína. Por outro lado, as mutações no *fsrB* da estirpe QSE32 que conduzem à mudança de aminoácidos entre diferentes grupos parecem não ter efeito no fenótipo gelatinase. A presença destas poderá estar relacionada com a diferença entre espécies.

Como referido, recentemente foi identificado o gene *fsrD* o qual codifica a GBAP, molécula sensora do sistema do QS *fsr* (cf. Introdução). Este foi identificado na extremidade 3' do gene *fsrB* (162 pb *E. faecalis* OG1SP), e corresponde aos 54 aminoácidos do C-terminal da proteína FsrB. O alinhamento das proteínas FsrD das estirpes QSE32 e LN68 com a da estirpe controlo V583, revelou que somente a estirpe QSE32 têm mutações que provocam substituições de aminoácidos (já identificadas na FsrB – aminoácidos 191, 194, 209 e 224) (figura 15).

		1	10	20	30	40	54			
FsrD V583		MKFGK	KIIK	NVIEKRVAKV	SDGVG	TKPRLM	QNSPNI	IFGQWM	GQTEKPKK	NIEK-
FsrD LN68		MKFGK	KIIK	NVIEKRVAKV	SDGVG	TKPRLM	QNSPNI	IFGQWM	GQTEKPKK	NIEK-
FsrD QSE32		MTFGT	KIIK	NVIEKRVAKV	RDGVG	TKPRLM	QNSP	IIFGQWM	GQTEKPKK	NIEK-

**Figura 15 - Sequência das proteínas FsrD das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteínas FsrD das estirpes estudadas e controlo – e alterações de aminoácidos que foram identificadas. Esta sequência encontra-se entre o aminoácido 190 e aminoácido 243 da proteína FsrB. O quadrado preto identifica a sequência da GBAP madura. A identificação do codão de iniciação foi efectuada conforme a literatura <sup>84</sup>.

Como indicado na figura 15, a mutação que provoca a mudança de aminoácido 35 (Asparagina por Isoleucina) afecta a estrutura da GBAP madura. Esta mudança afecta a indução da produção da gelatinase, ou seja, esta alteração de estrutura faz com que seja necessária maior quantidade de GBAP para induzir a produção da gelatinase (resultados não publicados comunicados por Jiro Nakayama).

Relativamente ao Blastp efectuada com esta sequência de aminoácidos, não foram encontrados domínios na base de dados do NCBI.

No mesmo trabalho que o gene *fsrD* foi identificado, também foram identificados aminoácidos da proteína FsrB essenciais para a produção, maturação e possível transporte da GBAP para fora da célula (Arginina 66, Glicina 71, Histidina 73, Cisteína 80, Prolina 123 e Prolina 130) <sup>84</sup>. O alinhamento efectuada entre as proteínas FsrB das estirpes QSE32 e LN68

e a estirpe controlo V583 (figura 13) permitiu verificar que estes aminoácidos não foram alterados.

#### 4.2.3.3 Proteína FsrC (Histidina Cinase)

Ao analisar-se o alinhamento dos genes *fsrC* das estirpes QSE32 e LN68 com o da estirpe V583, verificou-se que a estirpe QSE32 tem uma mutação de perda de sentido, enquanto a estirpe LN68 têm 5 mutações perda de sentido e 1 mutação sem sentido (Anexo 2.3). Relativamente à mutação identificada no QSE32 verificou-se que esta faz com que haja uma alteração de aminoácido dentro do mesmo grupo, apolar – Isoleucina 65 (I) por Valina (V) (figura 16). No que respeita às mutações encontradas na estirpe LN68 verificou-se que dentro das mutações sem sentido, somente uma provoca mudança de aminoácido entre grupos diferentes, grupo apolar para polar neutro – Alanina 428 (A) por Serina (S) (figura 16). As restantes mutações fazem com que as trocas sejam dentro do mesmo grupo: polar neutro - Tirosina 54 (Y) por Cisteína (C) e Tirosina 252 (Y) por Asparagina (N); apolar - Leucina 124 (L) por Isoleucina (I); grupo polar básico - Lisina 385 (K) por Arginina (R) (Figura 16).

		40	50	60	70	80	90	100	110	125	
FsrC	V583	SLLIVINLCSFAALMLGYSWLIYALTVVIFTGFLLIHKRFSIFKAIPLSVFTLLMVSFINYTEQTILSVFFQQIYQNKLLWIASNVLL									
FsrC	LN68	SLLIVINLCSFAALMLGCSWLIYALTVVIFTGFLLIHKRFSIFKAIPLSVFTLLMVSFINYTEQTILSVFFQQIYQNKLLWIASNVIL									
FsrC	QSE32	SLLIVINLCSFAALMLGYSWLIYALTVVVFTGFLLIHKRFSIFKAIPLSVFTLLMVSFINYTEQTILSVFFQQIYQNKLLWIASNVLL									
(...)											
		209	220	230	240	250	260	270	280	290	
FsrC	V583	IEAYLEEQRINTQLLNNLTIYTEKIESINEELAMFRHDYKNLLYSLQIAISYEDILEIKRIYEETIAPTCKIIDNEEFELMKNLRLKN									
FsrC	LN68	IEAYLEEQRINTQLLNNLTIYTEKIESINEELAMFRHDYKNLLNSLQIAISYEDILEIKRIYEETIAPTCKIIDNEEFELMKNLRLKN									
FsrC	QSE32	IEAYLEEQRINTQLLNNLTIYTEKIESINEELAMFRHDYKNLLYSLQIAISYEDILEIKRIYEETIAPTCKIIDNEEFELMKNLRLKN									
(...)											
		345	350	360	370	380	390	400	410	420	430
FsrC	V583	DNAIENSAKSELKMFALISIFNKNETQEFVITNSVQAEFDFKVMKKTFFSSKSNPHEHGGLIYVKEIVDFSDQFDLQTSFNEGAVTQHL									
FsrC	LN68	DNAIENSAKSELKMFALISIFNKNETQEFVITNSVQAEFDFRVMKKTFFSSKSNPHEHG-GLIYVKEIVDFSDQFDLQTSFNEGAVTQHL									
FsrC	QSE32	DNAIENSAKSELKMFALISIFNKNETQEFVITNSVQAEFDFKVMKKTFFSSKSNPHEHGGLIYVKEIVDFSDQFDLQTSFNEGAVTQHL									

**Figura 16 – Sequência das proteínas FsrC das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteínas FsrC da estirpe controlo V583 e das estudadas LN68 e QSE32 – alterações de aminoácidos que foram identificados. O quadro preto identifica a mutação sem sentido. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.3.

Relativamente à mutação sem sentido encontrada na estirpe LN68 verificou-se que esta provoca a mudança do Triptofano 403 para um codão STOP. Assim, esta alteração faz com a proteína FsrC desta estirpe seja uma proteína truncada relativamente à proteína da estirpe V583. A proteína FsrC da estirpe LN68 fica com menos 45 resíduos de aminoácidos na extremidade C-terminal. Este facto poderá ser importante para a explicação da incongruência de genótipo/ fenótipo encontrada na estirpe LN68.

A análise Blastp para ambas as estirpes não permitiu encontrar os domínios da proteína FsrC neste programa. Assim, analisou-se os domínios da proteína FsrC da estirpe V583 (EF1820) num outro programa e comparou-se esta com as proteínas FsrC do QSE32 e do LN68<sup>47</sup> (figura 17). A proteína FsrC de *E. faecalis* V583 tem dois domínios, o primeiro é o domínio de histidina cinase com uma zona de ATPase, e um outro (7tm\_4) ligado ao mecanismo de trasdução de sinal com na extremidade C-terminal ATPase<sup>48</sup>. Ao se efectuar a comparação entre as proteínas FsrC do V583 e as das estirpes estudadas verificou-se que a mutação da estirpe QSE32 (Isoleucina 65) poderá ter um efeito sob o domínio 7tm\_4 e a mutação sem sentido da estirpe LN68 (triptofano 403) sob o domínio HATPase\_c (figura 17).



**Figura 17 – Domínios putativos da proteína FsrC de *E. faecalis* V583.** Esquema representativo dos domínios de FsrC de *E. faecalis*, constituído por um domínio envolvendo HATPase\_c (“Histidine kinase”) e 7tm\_4 (envolvido no mecanismo de transmissão de sinal)<sup>47</sup>.

#### 4.2.3.4 Gelatinase

Analisando os alinhamentos efectuados com as sequências das estirpes estudadas, verificou-se que as 6 mutações de perda de sentido encontradas no gene *gelE* da estirpe

QSE32 provocam mudanças de aminoácidos – Arginina 96 (R) por Lisina (K); Prolina 134 (P) por Leucina (L); Treonina 136 (T) por Asparagina (N); Leucina 139 (L) por Isoleucina (I) e Valina 169 (V) por Isoleucina (I). Estas mudanças são dentro do mesmo grupo de classificação, ou seja, dentro do grupo apolares, polares neutros e polares básicos (figura 18). O aminoácido Alanina 205 (A) foi substituída por Treonina (T), em que há troca de um aminoácido apolar por um polar neutro. Para além destas mutações, foi identificada uma deleção no final do gene *gelE* da estirpe QSE32. Esta provocou a mudança do codão STOP “AGT” para o codão STOP “TAA”.

No caso do gene *gelE* da estirpe LN68 identificaram-se quatro mutações de perda de sentido que provocam mudanças de aminoácidos dentro do mesmo grupo de classificação – polar básico (Arginina 96 (R) por Lisina (K)); polar neutro (Tirosina 136 (T) por Asparagina (N)) e apolar (Valina 247 (V) por Alanina (A)). A Alanina 205 e 248 (T) foram substituídas por Treonina (A), em que há troca de um aminoácido apolar por um polar neutro (figura 18).

		94	100	110	120	130	140	150	160	170																																																																								
GelE	V583	LD	R	N	G	A	V	T	S	V	T	G	N	P	V	D	Q	V	V	K	I	Q	S	V	D	A	I	G	E	E	G	V	K	I	I	A	S	D	N	P	E	T	K	D	L	V	F	L	A	I	D	K	R	V	N	N	E	G	Q	L	F	Y	K	V	R	V	T	S	S	P	T	G	D	P	V	S	L	V	Y	K	V	N
GelE	LN68	LD	K	N	G	A	V	T	S	V	T	G	N	P	V	D	Q	V	V	K	I	Q	S	V	D	A	I	G	E	E	G	V	K	I	I	A	S	D	N	P	E	N	K	D	L	V	F	L	A	I	D	K	R	V	N	N	E	G	Q	L	F	Y	K	V	R	V	T	S	S	P	T	G	D	P	V	S	L	V	Y	K	V	N
GelE	QSE32	LD	K	N	G	A	V	T	S	V	T	G	N	P	V	D	Q	V	V	K	I	Q	S	V	D	A	I	G	E	E	G	V	K	I	I	A	S	D	N	L	E	N	K	D	L	V	F	L	A	I	D	K	R	V	N	N	E	G	Q	L	F	Y	K	V	R	V	T	S	S	P	T	G	D	P	I	S	L	V	Y	K	V	N

(...)

		186	200	210	220	230	240	250	260	270																																																																														
GelE	V583	Q	D	L	T	E	H	V	G	S	E	V	T	L	K	N	S	F	Q	V	T	F	N	V	P	V	E	K	S	N	T	G	I	A	L	H	G	T	D	N	T	G	V	Y	H	A	V	V	D	G	K	N	N	Y	S	I	I	Q	A	P	S	L	V	A	L	N	Q	N	A	V	D	A	Y	T	H	G	K	F	V	K	T	Y	Y	E	D	H	F	Q
GelE	LN68	Q	D	L	T	E	H	V	G	S	E	V	T	L	K	N	S	F	Q	V	T	F	N	V	P	V	E	K	S	N	T	G	I	A	L	H	G	T	D	N	T	G	V	Y	H	A	V	V	D	G	K	N	N	Y	S	I	I	Q	A	P	S	L	A	T	L	N	Q	N	A	V	D	A	Y	T	H	G	K	F	V	K	T	Y	Y	E	D	H	F	Q
GelE	QSE32	Q	D	L	T	E	H	V	G	S	E	V	T	L	K	N	S	F	Q	V	T	F	N	V	P	V	E	K	S	N	T	G	I	A	L	H	G	T	D	N	T	G	V	Y	H	A	V	V	D	G	K	N	N	Y	S	I	I	Q	A	P	S	L	V	A	L	N	Q	N	A	V	D	A	Y	T	H	G	K	F	V	K	T	Y	Y	E	D	H	F	Q

Figura 18 - Sequências das gelatinases das estirpes V583, LN68 e QSE32. Alinhamento das sequências das proteínas gelatinases da estirpe controlo V583 e das estudadas LN68 e QSE32. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.4.

Ao se efectuar o Blastp, verificou-se que as gelatinases das estirpes QSE32 e LN68 têm quatro domínios putativos (figura 19)<sup>47</sup>. O domínio FTP encontra-se em bactérias com propéptidos peptidases M4 e propéptidos M36 de fungos. A sua função ainda não está bem definida mas pensa-se que inibe a peptidase para prevenir a sua activação prematura<sup>48</sup>. Já o

domínio Peptidase\_M4, é um domínio catalítico, enquanto o domínio Peptidase\_M4\_C é um domínio alfa-helical <sup>48</sup>. Por último, o domínio LasB tem função no metabolismo e no transporte de aminoácidos <sup>48</sup> (figura 19).



**Figura 19 – Domínios putativos da gelatinase.** Esquema representativo dos domínios da gelatinase das estirpes LN68 e QSE32, constituído por um FTP (“Fungalysin/Thermolysin Propetide Motif”), Peptidase\_M4 (“Termolysin metallopeptidase”), Peptidase\_M4\_C (“Termolysin metallopeptidase”) e LasB (“Zinc Metalloprotease”)<sup>47</sup>.

Analisando as zonas em que as mutações identificadas no *gelE* provocam alterações nos aminoácidos das proteínas gelatinases das estirpes QSE32 e do LN68, verificou-se que estas poderão afectar somente os domínios Peptidase\_M4 e LasB. Como membro da família M4 das metaloproteases dependentes de zinco, a gelatinase possui um domínio conservado responsável pela coordenação do zinco no centro activo, que em *E. faecalis* é caracterizado pela sequência de aminoácidos **HEMTH** <sup>17</sup>. Nas estirpes LN68 e QSE32 esta sequência não foi alterada (figura 20).

	288	300	310	320	330	340
GelE V583	DEQHPDAYD	NAFWDGKAMRYGETSTPTGKTYASSLDVV	HEMTHG	VTEHTAGLE	YLGQSGA	
GelE LN68	DEQHPDAYD	NAFWDGKAMRYGETSTPTGKTYASSLDVV	HEMTHG	VTEHTAGLE	YLGQSGA	
GelE QSE32	DEQHPDAYD	NAFWDGKAMRYGETSTPTGKTYASSLDVV	HEMTHG	VTEHTAGLE	YLGQSGA	

**Figura 20 – Sequências de aminoácidos das zonas conservadas do centro activo das gelatinases das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das zonas conservadas do centro activo das gelatinases em que se mantém inalterados. O quadro preto identifica o domínio conservado. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.4.

#### 4.2.3.5 Proteínase Sérica

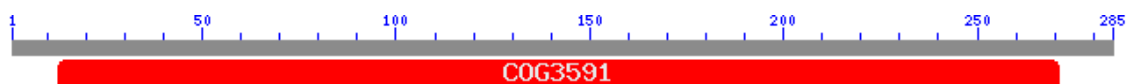
Analisando as mutações de perda de sentido identificadas no gene *sprE* das estirpes LN68 e QSE32, verificou-se que uma das mutações de perda de sentido encontradas na estirpe

QSE32 provoca mudança de aminoácidos dentro do mesmo grupo: apolares (Valina 237 (V) por Fenilalanina (F)). Duas mutações provocam a mudança de grupo de aminoácido: polar básico para apolar - (Treonina 130 (T) por Isoleucina (I)) e polar ácido para apolar - (ácido aspartico 235 (D) por Alanina (A)) (figura 21). Sendo esta última também encontrada na estirpe LN68. Na estirpe LN68 também foram identificadas duas mutações perda de sentido as quais são responsáveis pela mudança de aminoácido de diferentes grupos de classificação, do grupo apolar para polar neutro, glicina 154 (G) por Serina (S)) e, dentro do grupo apolar, Valina 237 (V) por Fenilalanina (F)) (figura 21).

		97	110	120	130	140	150	160	170	180	
SprE	V583	TNNHVAESFKNAKVLNPNNAKDDAWFY PGRDGSAT PFGKFKVIDVAFSPNADIAVVTV GKQND RPDGPELGEILTPFVLK KFESSDTHV									
SprE	LN68	TNNHVAESFKNAKVLNPNNAKDDAWFY PGRDGSAT PFGKFKVIDVAFSPNADIAVVTV SKQND RPDGPELGEILTPFVLK KFESSDTHV									
SprE	QSE32	TNNHVAESFKNAKVLNPNNAKDDAWFY PGRDGSAT PFGKFKVIDVAFSPNADIAVVTV GKQND RPDGPELGEILTPFVLK KFESSDTHV									
(...)											
		191	200	210	220	230	240	250	260	270	
SprE	V583	GEKNHTQWSHENDLFTSNFTDLENPLLFYDIDITGGQSGSPIYNDQVEVVG VHSNGGIKQTGNHGQRLNEVNYNFI VNRVNEEENKR									
SprE	LN68	GEKNHTQWSHENDLFTSNFTDLENPLLFYDIDITGGQSGSPIYNAQFEVVG VHSNGGIKQTGNHGQRLNEVNYNFI VNRVNEEENKR									
SprE	QSE32	GEKNHTQWSHENDLFTSNFTDLENPLLFYDIDITGGQSGSPIYNAQFEVVG VHSNGGIKQTGNHGQRLNEVNYNFI VNRVNEEENKR									

**Figura 21 - Sequência das proteases séricas das estirpes V583, LN68 e QSE32.** Alinhamento das sequências das proteases séricas da estirpe controlo V583 e das estudadas LN68 e QSE32 – alterações de aminoácidos que foram identificadas. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 2.5.

Efectuando um Blastp, verificou-se que as proteases séricas das estirpes QSE32 e LN68 têm um domínio putativo COG3591 (figura 22)<sup>47</sup>, o qual corresponde a uma endopeptidase envolvida no metabolismo e no transporte de aminoácidos<sup>48</sup>.



**Figura 22 – Domínios putativos da protease sérica.** Esquema representativo do domínio COG3591 da protease sérica das estirpes LN68 e QSE32<sup>47</sup>.

#### 4.2.3.6 Análise da mutação encontrada no gene *fsrC* da estirpe *E. faecalis* LN68 em outras estirpes com fenótipo gelatinase negativo

A análise dos alinhamentos efectuados anteriormente para as estirpes *E. faecium* QSE32 e *E. faecalis* LN68 permitiu a observação de alguns factos importantes dos quais se destaca a mutação sem sentido no gene *fsrC* da estirpe LN68 que conduz à síntese de uma proteína FsrC truncada (cf. mutação n.º 27 do quadro 8 ou aminoácido 403 do Anexo 2.3). A comparação entre as proteínas FsrC de *E. faecalis* V583 e FsrC da estirpe LN68, bem como dos domínios putativos, revelou que alteração do aminoácido 403 poderá afectar o domínio HATPase\_c e consequentemente poder explicar a incongruência de genótipo/fenótipo desta estirpe (figura 17).

Em seguida analisou-se a mutação n.º27 da estirpe LN68 em outras estirpes com a mesma incongruência. Esta análise foi realizada nas estirpes inicialmente referidas<sup>§</sup> – *E. faecalis* LN66, *E. faecalis* QN8, *E. durans* QSE15 e *E. faecalis* QSE125. Procedeu-se à sequenciação da zona em que se encontra a respectiva mutação. Estas sequenciações permitiram verificar que esta mutação encontra-se nas estirpes LN66, QN8 e QSE15 e não na estirpe QSE125, como as outras mutações encontradas no gene *fsrC* da estirpe LN68 foram igualmente observadas nas outras estirpes (figura 23 e Anexo 3).

	2946	2960	2970	2980	2990	3000	3010
<i>E. faecalis</i> V583	TTAAGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAATCCAGAAGAGCACGGTTGGGGATTGTTATA'						
<i>E. faecium</i> QSE32	TTAAGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAACCCAGAAGAGCACGGTTGGGGATTGTTATA'						
<i>E. faecalis</i> LN68	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAACCCAGAAGAGCACGGTTGAGGATTGTTATA'						
<i>E. faecalis</i> LN66	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAACCCAGAAGAGCACGGTTGAGGATTGTTATA'						
<i>E. durans</i> QN8	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAACCCAGAAGAGCACGGTTGAGGATTGTTATA'						
<i>E. durans</i> QSE125	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAACCCAGAAGAGCACGGTTGGGGATTGTTATA'						
<i>E. faecalis</i> QSE15	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAACCCAGAAGAGCACGGTTGAGGATTGTTATA'						

Figura 23 – Sequências nucleótídicas da zona da mutação sem sentido encontrada na estirpe LN68, das estirpes V583, QSE32, LN68, LN66, QN8, QSE125 e QSE15. Alinhamento das sequências das estirpes em estudo, na zona da mutação sem sentido (nucleótido n.º. 3004) identificada na estirpe LN68. O alinhamento completo também se encontra no Anexo 1.2.

<sup>§</sup> A estirpe *E. durans* LSE4 não foi envolvida nesta pesquisa devido a já estar integrada em outros projectos.

Estas observações não excluem a hipótese de que a mutação na estirpe LN68, que conduz à síntese da proteína FsrC truncada, seja responsável pela incongruência genótipo/fenótipo observada nesta estirpe. É de referir que as estirpes analisadas são estirpes não caracterizadas molecularmente e que os operões *fsr gelE-sprE* não foram totalmente sequenciados. Neste contexto está em curso a construção de um mutante na estirpe LN68 em que é substituído o codão STOP encontrado por um codão que codifica para um triptofano, aminoácido encontrado na estirpe controlo V583. Paralelamente está a ser construído um mutante na estirpe V583 o qual introduz o mesmo codão STOP encontrado na estirpe LN68. Adicionalmente seria interessante analisar as sequências completas dos operões *fsr* e *gelE-sprE* nas estirpes QSE15, QN8 e LN66, bem como em outras estirpes em que observasse a mesma incongruência genótipo/fenótipo. Todavia esta abordagem não exclui a hipótese de outras diferenças no genoma destas estirpes.

## **CAPITULO 5. ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DOS OPERÕES *fsr* E *gelE-sprE***

### **5.1 Objectivos do estudo**

### **5.2 Resultados e discussão**

## CAPÍTULO 5. ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DOS OPERÕES *fsr* E *gelE-sprE*

### 5.1 Objectivos do estudo

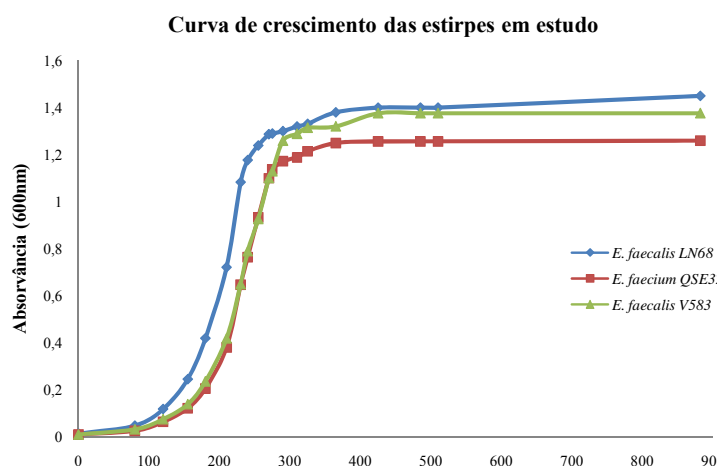
A sequenciação dos operões *fsr* e *gelE-sprE* das estirpes *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 e a respectiva análise dos resultados (cf. Capítulo 4) permitiram verificar que, embora na estirpe LN68 a mutação encontrada no gene *fsrC* (a qual conduz à síntese de uma proteína FsrC truncada) possa explicar a incongruência genótipo/fenótipo observada nesta estirpe, as mutações observadas poderiam também ter algum efeito sobre o processamento e/ou estabilidade dos transcritos destes operões. É de salientar que na estirpe LN68 foi encontrada uma mutação na região promotora -10 do transcrito *fsrB-fsrD-fsrC*, a qual poderá afectar a quantidade de transcrito na célula. Adicionalmente deverá ser realçado que as estirpes analisadas não estão caracterizadas molecularmente podendo ter mutações em genes envolvidos na regulação da expressão génica e por conseguinte afectar a expressão destes operões. Esta parte do trabalho centralizou-se na análise dos transcritos destes operões e os resultados apresentados são apenas preliminares.

Estudos efectuados com os operões *fsr* e *gelE-sprE* têm mostrado que existe maior quantidade de transcritos dos genes destes operões no final da fase exponencial/ início da fase estacionária<sup>9, 83, 95</sup>. Devido a este facto o estudo transcricional incidiu essencialmente nesta zona das fases de crescimento. Assim, este capítulo foi dividido em três fases:

1. Estudo do crescimento de cada uma das estirpes;
2. Extração de RNA total na fase exponencial e estacionária das estirpes em estudo;
3. Análise dos transcritos, *fsrA*, *fsrB*, *fsrD*, *fsrC* e *gelE*.

## 5.2 Resultados e discussão

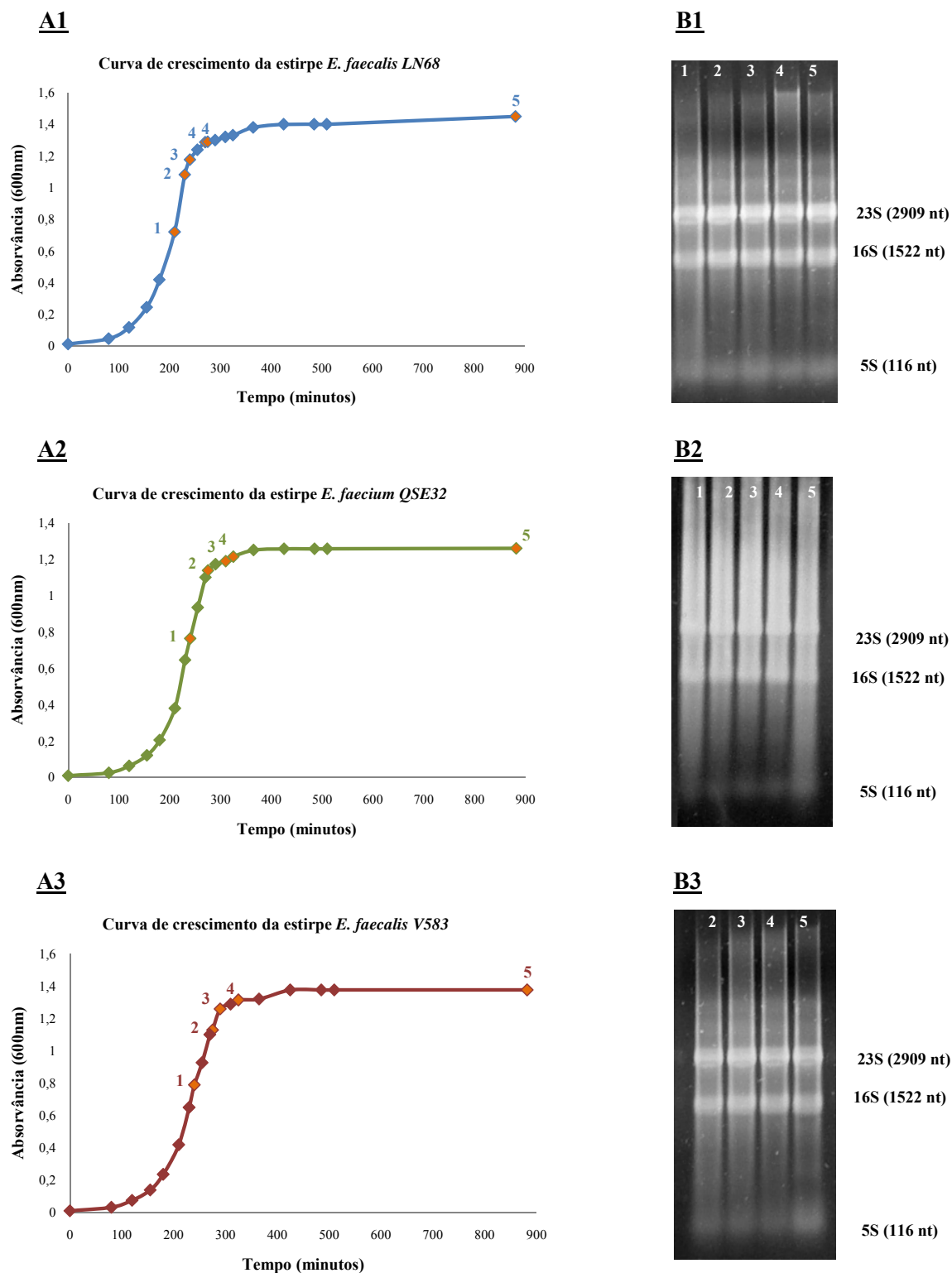
As curvas de crescimento das estirpes QSE32, LN68 e V583 foram efectuadas (figura 24). Em seguida extraiu-se RNA em dez pontos ao longo da curva de crescimento para cada uma das estirpes (figura 25). Estes pontos foram escolhidos com base no que foi descrito relativamente à expressão destes genes e de forma a serem representativas da curva de crescimento.



**Figura 24** – Curvas de crescimento das estirpes *E. faecalis* V583, *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32. Leitura da Absorvância (600nm) ao longo do tempo (min).

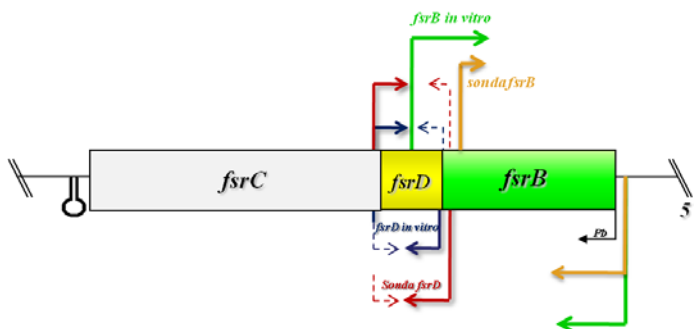
Como já foi referido no Capítulo 2, é de salientar que os RNAs totais foram extraídos por dois protocolos distintos – kit (que não retêm os RNAs com um tamanho inferior a 200 ribonucleótidos) e um outro optimizado para *Enterococcus*.

Com a análise das curvas de crescimento decidiu-se extrair RNA em cinco pontos da curva (meio da fase exponencial; 2 pontos no final da fase exponencial; início da fase estacionária; fase estacionária) os quais seriam representativos das curvas de crescimento das estirpes em estudo (figura 25). Os RNAs totais extraídos foram migrados num gel de agarose o que permitiu verificar que os RNAs ribossomais (23S, 16S e 5S) não se encontravam degradados o que indicava que os mRNAs possivelmente não estavam degradados (figura 25).



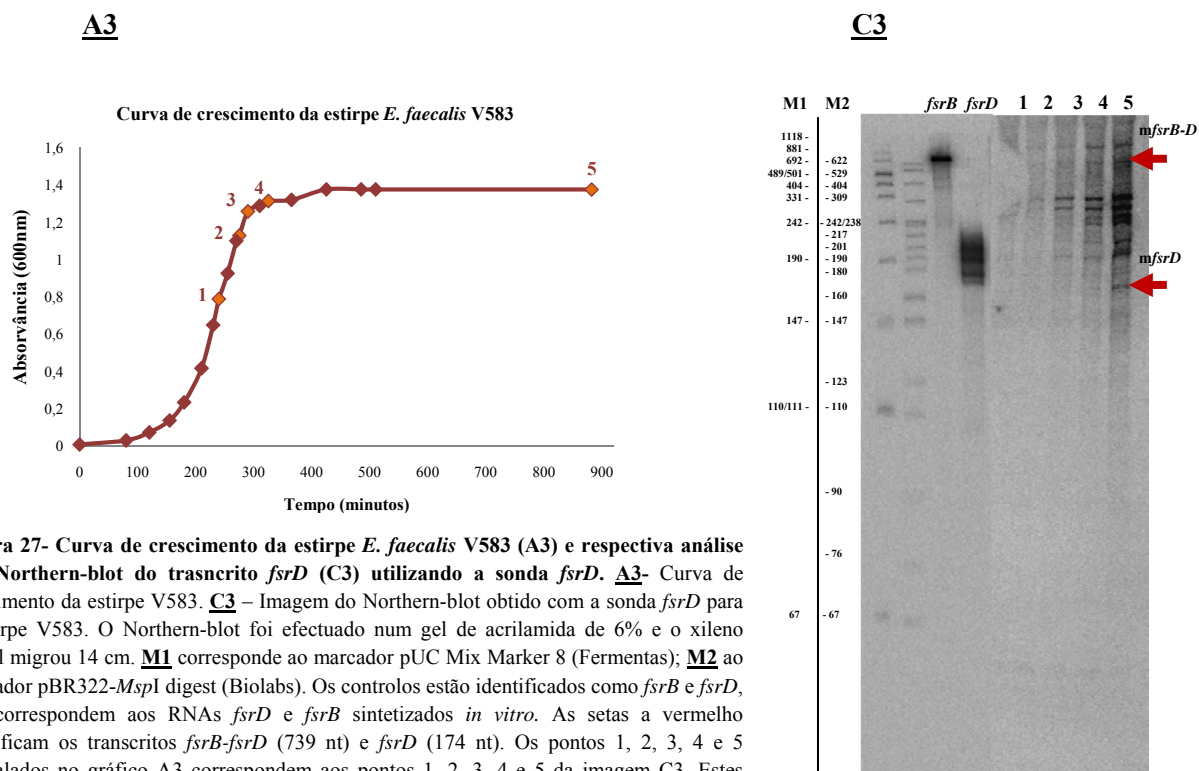
**Figura 25-** Curvas de crescimento das estirpes *E. faecalis* LN68, *E. faecium* QSE32 e *E. faecalis* V583 (A1, A2 e A3) e respectivos RNAs extraídos (B1, B2 e B3). **A1-** Curva de crescimento da estirpe LN68 **A2-** Curva de crescimento da estirpe QSE32. **A3-** Curva de crescimento da estirpe V583. **B1** – Imagem da migração do RNA total da estirpe LN68. **B2** – Imagem da migração do RNA total da estirpe QSE32. **B3** – Imagem da migração do RNA total da estirpe V583. Os pontos em que se extraíram RNA encontram-se identificados a laranja nos gráficos A1, A2 e A3 e identificados pelos números: 1 (meio da fase exponencial), 2 (final da fase exponencial), 3 (final da fase exponencial), 4 (início da fase estacionária) e 5 (fase estacionária). As imagens dos géis apresentadas (B1, B2 e B3) são o resultado da migração de 2,5 µg de RNA num gel 0,8% de agarose por electroforese. Os RNAs ribossomais (23S, 16S e 5S) estão identificados. A quantidade de RNA obtida correspondente ao ponto 1 da estirpe V583 não foi suficiente para migrar num gel de agarose.

Em seguida, procedeu-se à análise dos transcritos recorrendo à técnica de Northern-blot. Inicialmente, decidiu-se estudar o transcrito *fsrD* na estirpe controlo, *E. faecalis* V583 (figura 26). Como RNAs controlo construíram-se *in vitro* os transcritos *fsrD* e *fsrB* (figura 26).



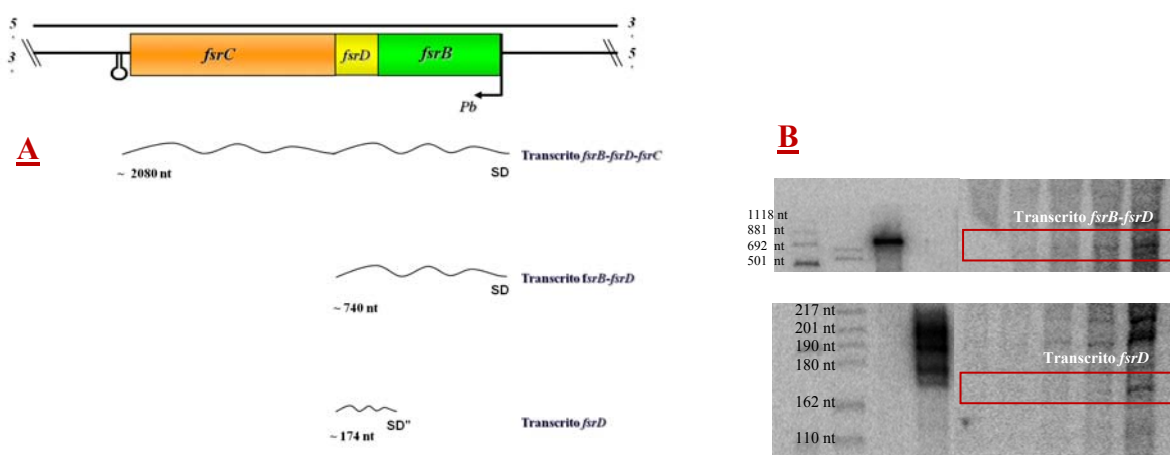
**Figura 26- Identificação das sondas *fsrD*, *fsrB* e RNAs controlo *in vitro* *fsrB* e *fsrD* num excerto do operão *fsr*.** A sonda *fsrD*, assinalada a vermelho, foi construída com os primers T7*fsrD*(1) e *mfsrD* e tem um tamanho de 193 nt. A sonda *fsrB* (laranja) foi construída com os primers T7*fsrB* e *mfsrB* e tem um tamanho de 537 nt. O *fsrB in vitro* (RNA controlo), representado com setas verdes, foi construído com os primers T7*mfsrB* e *fsrB* e têm um tamanho de 707 nt. O *fsrD in vitro* (RNA controlo), assinalado a azul, foi construído com os primers T7*mfsrD* e *rfsrD* e têm um tamanho de 182 nt.

Os resultados obtidos por Northern-blot relativamente ao transcrito *fsrD* na estirpe V583 estão apresentados na figura 27.



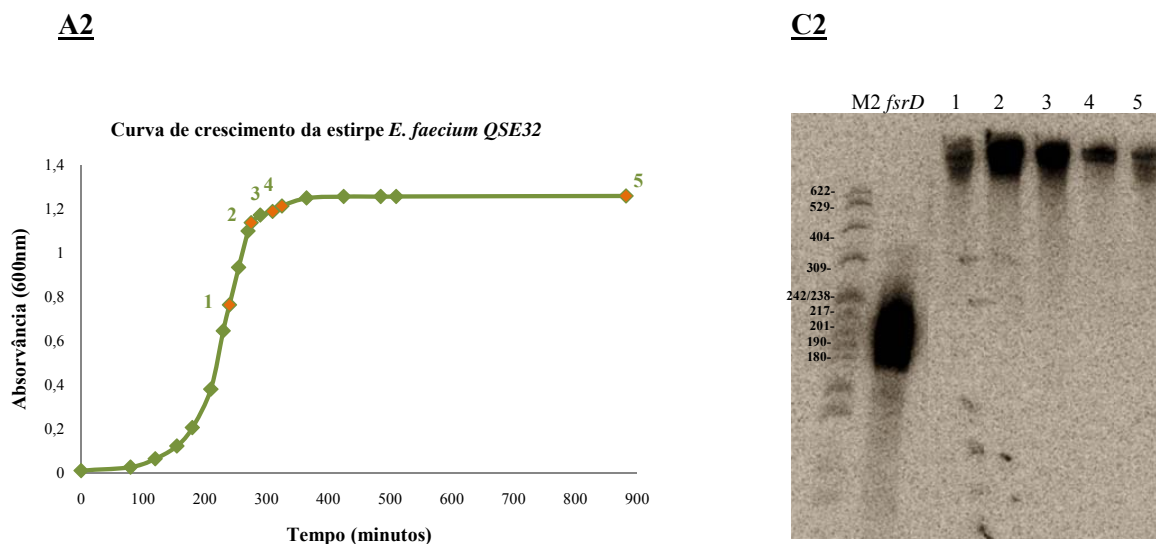
A análise da figura 27 permitiu observar um aumento da quantidade de transcrito *fsrD* ao longo da curva de crescimento. Esta observação poderá estar correlacionada com o

aumento da produção da GBAP com o aumento do número de células. No que respeita ao RNA controlo *in vitro fsrD* apresentou a banda esperada (182 nt) e outras com um tamanho aproximado. Este facto deve-se à terminação da transcrição pela T7 RNA polimerase não se efectuar num nucleótido preciso <sup>40</sup>. No caso do RNA controlo *in vitro fsrB*, este também foi identificado com a sonda *fsrD* uma vez que a sonda *fsrD* contém parte do transcrito *fsrB* (figura 26). Analisando os pontos 1 a 5 identificados na figura 27, verifica-se o aparecimento de um conjunto de bandas entre os 1000 a 150 nucleótidos. Este facto, possivelmente, poderá estar relacionado com a maturação do transcrito *fsrB-fsrD-fsrC* sintetizado a partir de promotor Pb. Como o *fsrD* é transcrito conjuntamente com o *fsrB* e o *fsrC*, a as bandas observadas poderão corresponder a várias fases de maturação do transcrito *fsrB-fsrD-fsrC*. Assim, com esta sonda, seria de esperar pelo menos três transcritos: *fsrB-fsrD-fsrC*; *fsrB-fsrD* e *fsrD* bem como os intermediários do processamento. Como o tamanho do primeiro transcrito é relativamente grande para a sua correcta separação num gel de acrilamida, identificaram-se os restantes dois (figura 28). O facto da extremidade 3' não estar mapeada faz com que não seja possível a identificação exacta do tamanho dos transcritos esperados (figura 28).



**Figura 28- Transcritos esperados (A) e observados (B) na estirpe controlo V583.** **A.** Esquema representativo dos genes *fsrB*, *fsrD* e *fsrC* do operão *fsr* e respectivos transcritos esperados. O transcrito putativo *fsrB-fsrD-fsrC* corresponde a um valor aproximado de 2080 nt; o transcrito putativo *fsrB-fsrD* corresponde a um valor aproximado de 740 nt e o transcrito putativo *fsrD* aproximadamente 174 nt. Estes tamanhos moleculares foram medidos a partir de SD (Shine-Dalgarno) até ao codão de terminação. **B.** Parte da imagem do gel de acrilamida da figura 27 com a identificação dos transcritos obtidos (quadrado e seta vermelha). O transcrito *fsrB-fsrD* e o transcrito *fsrD* identificados em B têm um tamanho molecular aproximado aos transcritos esperados apresentados em A. SD'' – Shine-Dalgarno putativa. A SD e a SD'' têm como base a literatura <sup>84, 94</sup>.

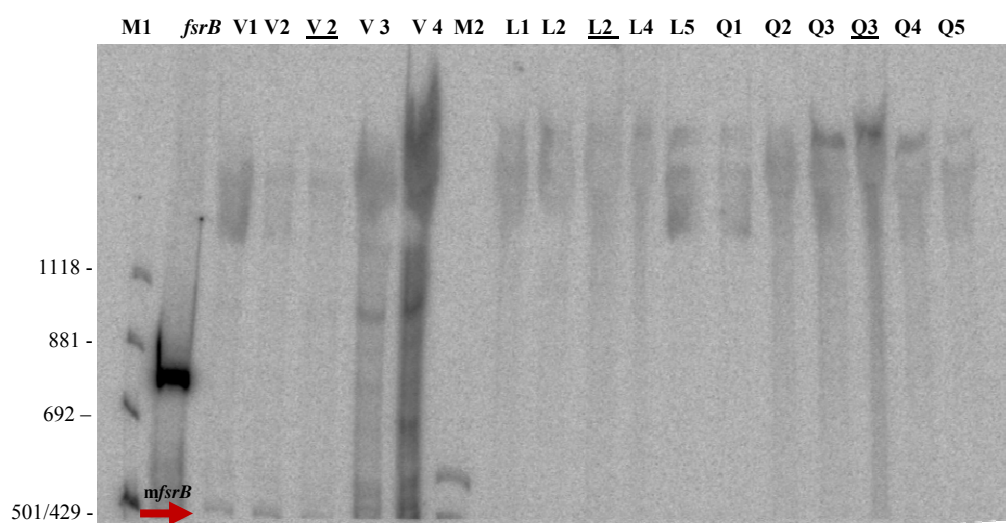
Relativamente às estirpes *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 os resultados obtidos não permitiram chegar a conclusões, isto porque tecnicamente não correram bem. Todavia, como se pode ver na figura 29 respeitante à estirpe QSE32, não se viram as bandas esperadas como observadas nas figuras 27 e 28, no entanto, verificou-se uma banda com tamanho superior que poderá indicar um deficiente ou não processamento do transcrito primário *fsrB-fsrD-fsrC*. Novas experiências terão que ser realizadas para analisar esta hipótese e, possivelmente, terá que se recorrer à separação destes fragmentos de RNA de peso molecular superior num gel de agarose.



**Figura 29-** Curva de crescimento da estirpe *E. faecium* QSE32 (A2) e respectiva análise por Northern-blot do transcrito *fsrD* (C2) utilizando a sonda *fsrD*. **A2-** Curva de crescimento da estirpe QSE32. **C2** – Imagem do Northern-blot obtido com a sonda *fsrD* para a estirpe QSE32. O Northern-blot foi efectuado num gel de acrilamida de 6% e o xileno cianol migrou 19 cm. **M2** - ao marcador pBR322 *MspI* digest (Biolabs). O controlo identificado como *fsrD* corresponde ao RNA *fsrD* sintetizado *in vitro*. Os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 assinalados no gráfico A2 correspondem aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 da imagem C2. Estes representam as zonas da curva de crescimento em que foi extraído RNA total.

De seguida analisou-se o transcrito *fsrB* nas três estirpes. Para esta análise utilizaram-se os 5 pontos de cada estirpe representativos das diferentes fases da curva de crescimento. Os resultados obtidos parecem mostrar diferentes transcritos entre a estirpe controlo V583 e as estirpes LN68 e QSE32. Enquanto na estirpe V583 observaram-se bandas com tamanhos inferiores a 1000 nt, nas estirpes LN68 e QSE32 observaram-se apenas bandas com tamanho

superior. Esta diferença detectada entre a estirpe controlo e as restantes poderá estar novamente correlacionada com a diferente maturação/processamento dos RNAs. Com a sonda *fsrB* utilizada (figura 26) seria de esperar a detecção de três transcritos: *fsrB-fsrD-fsrC*, *fsrB-FsrD* e *fsrB*, parecendo este último ser detectado apenas na estirpe V583. Tal facto sugere uma diferença entre a estirpe controlo e as duas estirpes analisadas, todavia, o Northern-blot terá que ser repetido para confirmar este resultado.

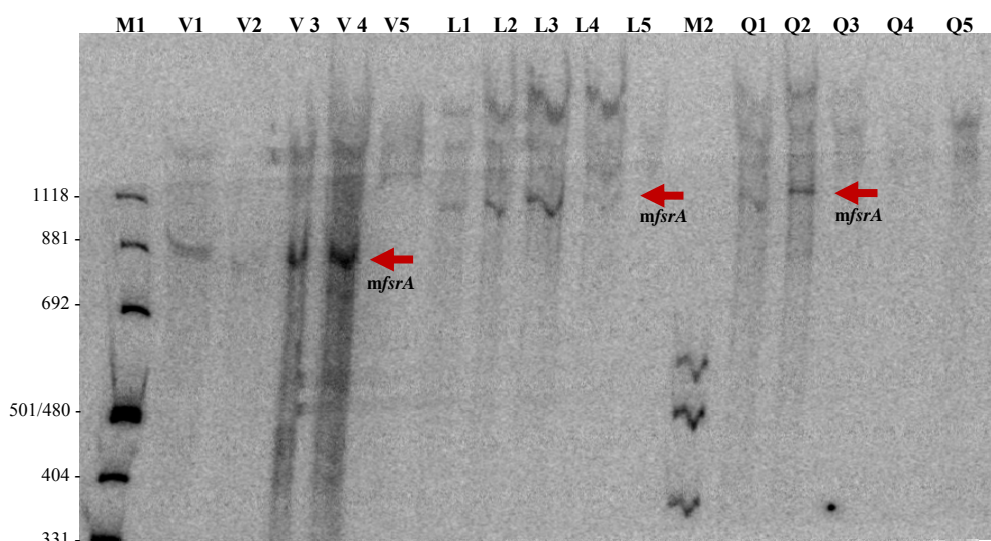


**Figura 30- Análise por Northern-blot do transcrito *fsrB* nas estirpes *E. faecalis* V583, *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 utilizando a sonda *fsrB*.** Os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 de cada uma estirpe (figura 25) estão apresentados como V1, V2, V3 e V4 para V583, L1, L2, L3, L4 e L5 para LN68 e Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5 para QSE32. A V2, L2 e Q3 sublinhadas são amostras em que foram migrados 10 µg de RNA total, enquanto as restantes têm 5 µg. A aplicação de diferentes quantidades de RNA foi importante, pois com a utilização do dobro de RNA total poderia vir a se detectar RNA pouco abundantes e por sua vez, importantes para o funcionamento dos operões *fsr* e *gelE-sprE*. O Northern-blot foi efectuado num gel de acrilamida de 5% e o xileno cianol migrou 38 cm. **M1** corresponde ao marcador pUC Mix Marker 8 (Fermentas); **M2** ao marcador pBR322 -MspI digest (Biolabs). O controlo RNA está identificado como *fsrB*. A seta a vermelho indica o possível transcrito *fsrB*.

O mesmo tipo de análise foi efectuada para o transcrito *fsrA*, e novamente foram detectados nas estirpes QSE32 e LN68 transcritos com tamanho distinto e superior ao da estirpe V583. Assim, analisou-se os RNAs totais extraídos nos cinco pontos da curva de crescimento de cada estirpe num Northern-blot de acrilamida (figura 31).

A observação da figura 31, permitiu verificar novamente diferenças entre a estirpe controlo e as estirpes QSE32 e LN68. Apesar da difícil nitidez da imagem, observou-se a

presença de uma banda na estirpe V583 com o tamanho aproximado de 880 nt a qual poderá corresponder ao transcrito *fsrA* (apesar da extremidade 5' deste transcrito estar mapeada<sup>95</sup>, a sua extremidade 3', ou seja, a qual corresponde o fim da transcrição não foi mapeada logo não se sabe o tamanho exacto do transcrito *fsrA*). Já nas outras estirpes, esta banda parece ter um tamanho superior. Com a observação desta figura também foi perceptível o aparecimento de bandas superiores ao 1000 nucleótidos. Este facto poderá ser interessante para estudos posteriores devido a estar descrito que o gene *fsrA* tem o seu próprio promotor e ser transcrito sozinho<sup>94</sup>.



**Figura 31-** Análise por Northern-blot do transcrito *fsrA* nas estirpes *E. faecalis* V583, *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 utilizando a sonda *fsrA*. Os pontos 1, 2, 3 e 4 de cada uma estirpe (figura 25) estão apresentados como V1, V2, V3 e V4 para V583, L1, L2, L3, L4 e L5 para LN68 e Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5 para QSE32. O Northern-blot foi efectuado num gel de acrilamida de 5% e o xileno cianol migrou 30 cm. **M1** corresponde ao marcador pUC Mix Marker 8 (Fermentas); **M2** ao marcador pBR322 *MspI* digest (Biolabs). As setas a vermelho indicam os possíveis transcritos *fsrA*.

Adicionalmente foram também analisados os transcritos *fsrC* e *gelE*, recorrendo à separação dos RNAs totais em gel de agarose devido a estes transcritos terem um tamanho molecular elevado (aproximadamente 1500 nt (*fsrC*) e 1700 nt (*gelE*)). No entanto não se detectaram bandas. Este facto poderá significar que estes transcritos são muito pouco abundantes na célula e consequentemente difíceis de serem visualizados por Northern-blot.

## **CAPITULO 6. ESTUDO DA VIRULÊNCIA EM MODELOS ANIMAIS – *C. elegans* E *G. mellonella***

### **6.1 Objectivos do estudo**

### **6.2 Resultados e Discussão**

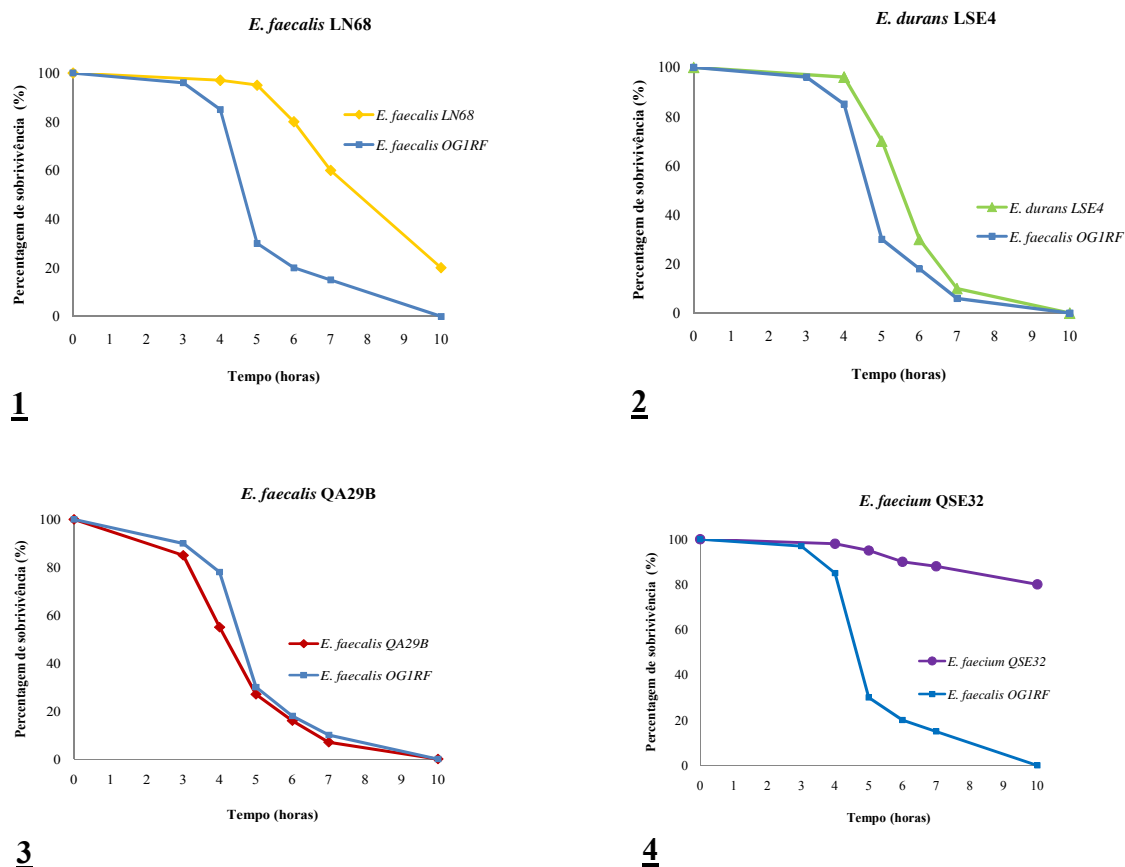
## **CAPITULO 6. ESTUDO DA VIRULÊNCIA EM MODELOS ANIMAIS – *C. elegans* E *G. mellonella***

### **6.1 Objectivos do estudo**

Os nematódos *C. elegans* e *G. mellonella* têm sido descritos como bons modelos animais para o estudo da virulência associada à gelatinase em *E. faecalis*. Assim, este capítulo teve como objectivo analisar a virulência de três espécies, nomeadamente *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans* nestes nematódos. Os estudos de virulência em *C. elegans* e *G. mellonella* e o respectivo tratamento de resultados foram efectuados pelo grupo de investigação “Opportunism and pathogenicity of Enterococci” do Instituto INRA (“l’institut National de la Recherche Agronomique”) com as estirpes *E. faecalis* LN68, *E. faecium* QSE32, *E. faecalis* QA29B e *E. durans* LSE4.

## 6.2 Resultados e Discussão

Inicialmente foram efectuados os estudos de virulência em *C. elegans*. Os resultados obtidos estão apresentados nos gráficos 1, 2, 3 e 4 da figura 32.

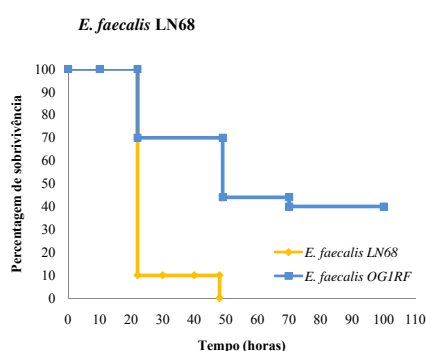


**Figura 32 – Estudo da virulência de diferentes estirpes de *Enterococcus* em *C. elegans*.** Percentagem de sobrevivência de *C. elegans* (%) ao longo do tempo (horas) que esteve em contacto com as estirpes *E. faecalis* OG1RF (estirpe controlo), *E. faecalis* LN68 (gráfico 1), *E. durans* LSE4 (gráfico 2), *E. faecalis* QA29B (gráfico 3) e *E. faecium* QSE32 (gráfico 4).

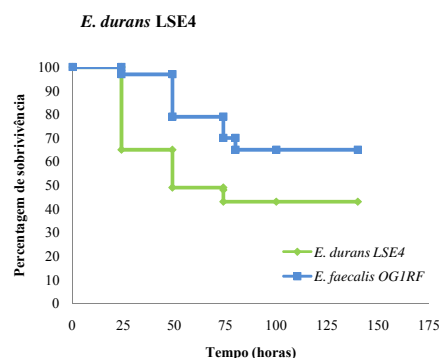
A análise da figura 32 permitiu verificar que a estirpe QA29B é a mais virulenta, a estirpe QSE32 a menos virulenta e que as estirpes LSE4 e LN68 apresentaram virulência atenuada (figura 32). A análise destes resultados conjuntamente com a presença dos operões *fsr* e *gelE-sprE* mostrou incongruência, pois, por exemplo, a estirpe LN68 ( $GelE^-$ ) é mais virulenta do que a estirpe QSE32 ( $GelE^+$ ). Esta observação sugere que para além da

actividade gelatinase, a espécie possa também ser relevante para a virulência em *C. elegans* e/ou que poderá existir outros factores distintos nas duas estirpes que sejam responsáveis pela diferença observada.

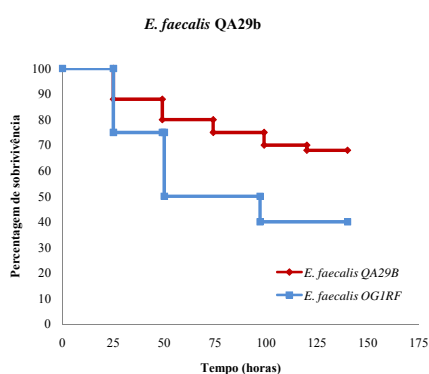
Uma vez que não é possível saber a quantidade exacta de *Enterococcus* ingeridos por cada *C. elegans* será difícil estabelecer uma correlação correcta entre o número de nematódos sobreviventes e a virulência da estirpe em estudo. Neste contexto decidiu-se utilizar um outro modelo animal, *G. mellonella*, no qual se sabe a quantidade exacta de células que são injectadas. Os resultados obtidos apresentam-se nos gráficos 5, 6, 7 e 8 da figura 33. Neste modelo, a estirpe LN68 apresentou-se como a mais virulenta e a estirpe QSE32 a menos virulenta. Por outro lado, as estirpes QA29B e LSE4 apresentaram virulência atenuada.



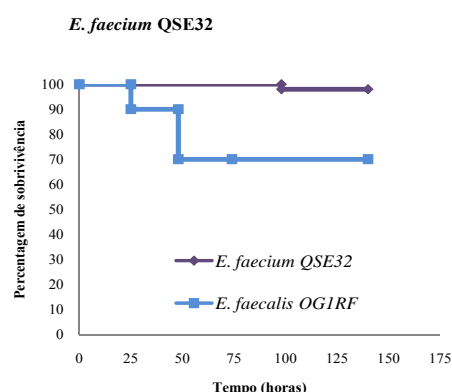
**5**



**6**



**7**



**8**

**Figura 33 – Estudo da virulência de diferentes estirpes de *Enterococcus* em *G. mellonella*.** Percentagem de sobrevivência da *G. mellonella* ao longo tempo (horas) para a estirpe controlo OG1RF e as estirpes *E. faecalis* LN68 (gráfico nº.5), *E. durans* LSE4 (gráfico nº.6), *E. faecalis* QA29B (gráfico nº.7) e *E. faecium* QSE32 (gráfico nº.8).

As estirpes QSE32 e LSE4 apresentam resultados idênticos em ambos os modelos, o que pode indicar que a espécie *E. faecium* não é virulenta e a espécie *E. durans* produz virulência atenuada.

Os resultados obtidos pelas estirpes LN68 (GelE<sup>-</sup>) e QA29B (GelE<sup>+</sup>) em ambos nematódos mostraram-se contraditórios. Este facto aponta para que a gelatinase pode não ser o único factor que esteja a provocar esta diferença de virulência. Estes factores podem estar nas diferenças existentes no genoma de cada estirpe ou até mesmo na diferença dos sistemas de defesa dos nematódos (cf. Introdução).

Ao analisar ambos os ensaios efectuados com *C. elegans* e *G. mellonella*, não foi possível efectuar uma correlação entre ambos os modelos animais e a virulência das três espécies de *Enterococcus* estudadas. Este estudo terá que ser alargado para um maior número de estirpes de cada espécie de *Enterococcus* para se poder obter um grau de confiança maior e, possivelmente, para encontrar níveis de virulência diferentes em diferentes espécies.

## **CAPITULO 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS**

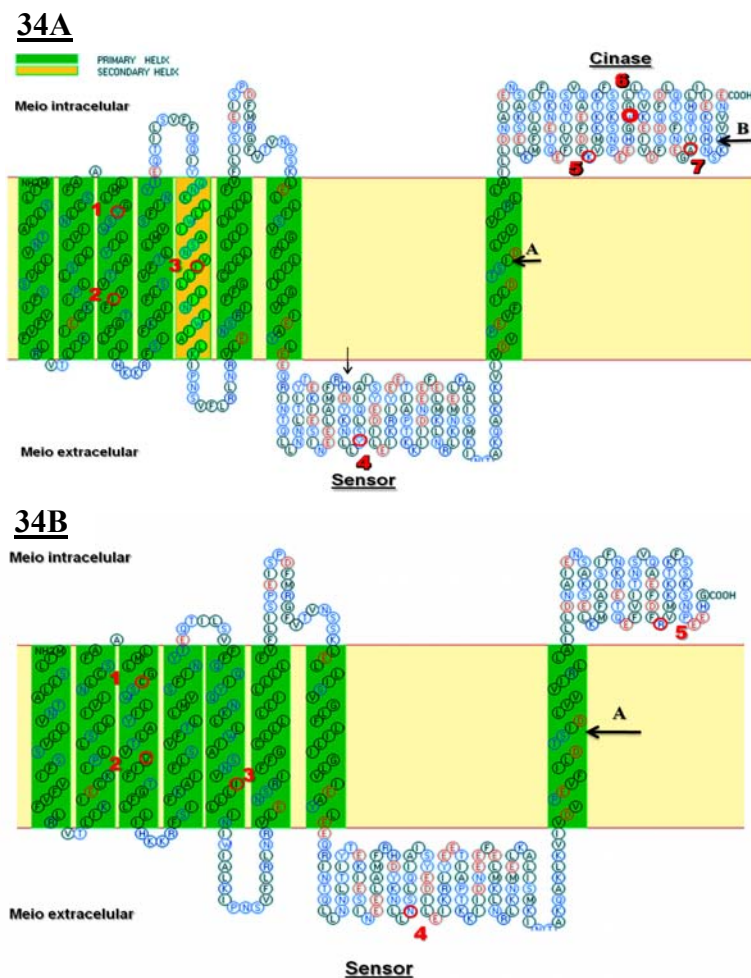
## CAPITULO 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho pretendeu-se aprofundar o conhecimento sobre a regulação da expressão dos operões *fsr* e *gelE-sprE* em *Enterococcus*, bem como, procurar compreender a relação existente entre este operão e a virulência de *Enterococcus*. Assim, é de referir que se teve em consideração a homologia existente entre o operão *fsr* e o operão *agr* de *Staphylococcus*, o qual tem sido demonstrado regular a virulência e a patogenicidade de *Staphylococcus* (cf. Introdução geral).

Este estudo foi iniciado pela análise da incongruência observada entre o genótipo e o fenótipo gelatinase associado aos operões *fsr* e *gelE-sprE* em diferentes estirpes de *Enterococcus* representativas de três espécies: *E. faecalis* (estirpes LN68, LN66, QSE125 e QA29b), *E. durans* (estirpes QN8, LSE4 e QSE15) e *E. faecium* (estirpe QSE32). Das oito estirpes iniciais foram escolhidas duas para analisar molecularmente: uma com congruência genótipo/fenótipo e pertencente a uma espécie diferente da estirpe controlo *E. faecalis* V583, *E. faecium* QSE32, e outra com incongruência genótipo/fenótipo pertencente à mesma espécie da estirpe controlo, *E. faecalis* LN68. Os resultados obtidos, para além dos efeitos directos sobre a proteína FsrC (estirpe LN68) e o péptido GBAP (estirpe QSE32), sugerem que a regulação da expressão dos operões estudados é efectuada a diversos níveis, por exemplo, a nível da iniciação da transcrição, bem como a nível do e processamento dos transcritos primários.

Na estirpe *E. faecalis* LN68 os resultados obtidos sugerem uma deficiente transdução de sinal no sistema de dois componentes entre as proteínas FsrC e a proteína FsrA. A mutação identificada no gene *fsrC* nesta estirpe (cf. Capítulo 4) faz com que o domínio HATpase seja afectado. Este facto leva a supor que a fosforilação da proteína FsrA seja afectada e

consequentemente a activação do promotor Pb, responsável pela transcrição dos genes *fsrB-fsrD-fsrC*, e Pe, responsável pela transcrição dos genes *gelE-sprE* (cf. Figura 4). Recorrendo ao programa SOSUI 1.11, foi possível prever que a estrutura intramembranar da proteína FsrC da estirpe V583 é constituída por oito domínios transmembranares, sete dos quais têm estrutura em hélice primária e um outro em hélice secundária\*\* (figura 34A)<sup>43</sup>. A mesma análise para a proteína FsrC da estirpe LN68 mostra que esta mantém os oito domínios transmembranares, mas todos com estruturas em hélice primária e com uma zona C-terminal menor (devido a ser uma proteína truncada) do que a FsrC de V583 (figura 34B). O mesmo tipo de análise para a proteína homóloga AgrC, histidina cinase do sistema *agr* mostra que a zona censora e a zona cinase estão nos locais assinalados na figura 34<sup>66</sup>.



**Figura 34 – Estruturas intramembranares das histidinas cinases FsrC das estirpes *E. faecalis* V583 e *E. faecalis* LN68.** Estas estruturas foram construídas através do programa de previsão de estruturas membranares SOSUI 1.11<sup>43</sup>. **34A** Estrutura membranar da proteína FsrC da estirpe V583. Esta proteína é constituída por sete hélices das quais uma é uma hélice secundária. Nesta estão identificadas as mutações encontradas na estirpe LN68. As mutações identificadas na estirpe LN68 estão numeradas (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e assinaladas com um círculo vermelho. O início e final do domínio HATpase está assinalado com as letras A e B, e supostamente inicia-se na Isoleucina e acaba na Arginina. **34B** Estrutura intramembranar da proteína FsrC da estirpe LN68. Esta proteína é constituída por sete hélices primárias. Nesta estão identificadas as mutações encontradas na estirpe LN68.

**Legenda:**

1- Tirosina 54 (Y) – Cisteína (C); 2- Isoleucina 65 (I) – Valina (V); 3- Leucina 124 (L) - Isoleucina (I); 4- Tirosina 252 (Y); 5 –Lisina 385 (K) – Arginina (R); 6- Triptofano (W) – STOP; 7 – Alanina 428 (A) - Serina (S).

\*\* Os autores do programa SOSUI indicam que estas têm a função de estabilizar a interacção com outros segmentos transmembranares e têm na sua constituição grupos polares<sup>41,42</sup>

A mudança de estrutura dos domínios intramembranares é provocada por uma das mutações perda de sentido, identificada na sequência do gene *fsrC*, a qual conduz à alteração de aminoácido assinalada com o número 3 na figura 34. Esta observação poderá indicar que as mutações perda de sentido que conduzem às substituições de aminoácidos, assinaladas na proteína FsrC da estirpe LN68, poderão também contribuir para a incongruência entre o genótipo e fenótipo e, possivelmente, afectar a actividade da proteína. Na realidade e apesar do programa SOSUI 1.11 não ser preciso, este demonstrou que as mutações identificadas nesta estirpe afectam a conformação da proteína FsrC e, possivelmente, a sua actividade. Assim, como referido no Capítulo 4, está em curso a construção de um mutante no qual será substituído o codão STOP encontrado por um codão que codifica para um Triptofano, aminoácido encontrado na estirpe controlo V583. Paralelamente, e para averiguar se as outras mutações encontradas que conduzem a substituições de aminoácidos são relevantes para a função desta proteína, está também a ser construído um mutante na estirpe V583 no qual se está a introduzir apenas o codão STOP encontrado na estirpe LN68. Mesmo que se venha a confirmar o papel desta mutação na alteração do fenótipo da estirpe LN68, não se pode excluir a hipótese da existência de outros elementos reguladores da expressão destes operões, exteriores às regiões sequenciadas.

No que respeita à estirpe *E. faecium* QSE32, os resultados obtidos indicam a existência de uma GBAP madura com uma sequência de aminoácidos e actividade diferente (GBAP madura com a substituição da Aspargina por Isoleucina). De facto, resultados não publicados e comunicados por Jiro Nakayama (“Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Japan”) indicam que GBAPs com uma mudança de aminoácido, de Aspargina para Alanina, são menos activas e é necessário um maior número de moléculas de GBAP para a indução do sistema de dois componentes

FsrC/FsrA. Sendo assim, será interessante estudar a actividade da GBAP produzida por esta estirpe de forma a verificar se a mutação encontrada poderá provocar alteração na funcionalidade deste péptido e, conseqüentemente, na activação dos promotores Pb e Pe.

A análise realizada dos transcritos dos operões *fsr* e *gelE-sprE* nas estirpes V583, LN68 e QSE32 parece indicar que o processamento dos transcritos primários difere de estirpe para estirpe, no entanto, esta hipótese terá que ser aprofundada. Por outro lado, tal como acontece no sistema *agr* em *S. aureus*, a expressão do sistema *fsr* pode também ser regulada por RNAs reguladores a nível pós-transcricional. Assim, será interessante estudar no futuro a possível existência deste tipo de moléculas envolvidas na regulação do sistema *fsr*.

No que se refere ao estudo de virulência, realizados usando *C. elegans* e *G. mellonella*, foram analisadas quatro estirpes: *E. faecium* QSE32 (Gel<sup>+</sup>), *E. durans* LSE4 (Gel<sup>-</sup>) *E. faecalis* LN68 (Gel<sup>-</sup>) e *E. faecalis* QA29b (Gel<sup>+</sup>) - e comparadas com a estirpe controlo *E. faecalis* OG1RF. Estes estudos permitiram concluir que nestes dois nematódos as espécies *E. faecium* e *E. durans* são menos virulentas que a espécie *E. faecalis*. No entanto, para confirmar esta hipótese terão de ser estudada um maior número de estirpes representativas de cada espécie. Relativamente à correlação entre o fenótipo gelatinase e a virulência, os resultados sugerem não existir correlação com a espécie *E. faecium*. Este facto deve-se, possivelmente, à GBAP que a estirpe *E. faecium* QSE32 produz. Sabendo que é necessário um maior número de GBAPs para activar o sistema *fsr*, possivelmente também será necessário um maior número de células para a produção do efeito virulento. Neste contexto é interessante notar que se observaram diferenças na virulência das estirpes LN68 e QA29b (ambas *E. faecalis*) em *C. elegans* e *G. mellonella*. Estes resultados apontam para que a virulência de cada estirpe, mesmo da espécie, seja o resultado de um conjunto de factores

intrínsecos ao próprio genoma de cada estirpe ou a diferenças no sistema de defesa dos nematódos. Mais estudos terão que ser efectuados para a confirmação desta hipótese.

O presente trabalho sugere que a incongruência genótipo/fenótipo identificada e estudada em diferentes estirpes de *Enterococcus* poderá estar relacionada com as mutações encontradas no genoma de cada estirpe e que a virulência destas bactérias é o resultado de uma série de factores intrínsecos aos genomas de cada estirpe, o qual não pode ser explicado somente pela presença dos operões *fsr* e *gelE-sprE*. Neste contexto, estudos recentes demonstraram que o regulador FsrA em *E. faecalis* OG1RF afecta o operão etonolamina enquanto em *E. faecalis* V583 já não se verifica o mesmo<sup>9, 18</sup>. Com estes estudos sugere-se que cada estirpe de enterococcus pode apresentar o seu próprio comportamento e que ainda se sabe muito pouco relativamente aos mecanismos envolvidos na expressão da virulência destas bactérias Gram-positivas.

**BIBLIOGRAFIA**

1. **Alves, P. I., M. P. Martins, T. Semedo, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. Barreto Crespo.** 2004. Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**:237-52.
2. **Andrewes, F. W., and T. J. Horder.** 1906. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* **ii**:708-713.
3. **Bardwell, J. C., P. Regnier, S. M. Chen, Y. Nakamura, M. Grunberg-Manago, and D. L. Court.** 1989. Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing. *EMBO J* **8**:3401-7.
4. **Barna, J. C., and D. H. Williams.** 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu Rev Microbiol* **38**:339-57.
5. **Bassler, B. L.** 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2**:582-7.
6. **Benito, Y., F. A. Kolb, P. Romby, G. Lina, J. Etienne, and F. Vandenesch.** 2000. Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA* **6**:668-79.
7. **Bhavnani, S. M., J. A. Drake, A. Forrest, J. A. Deinhart, R. N. Jones, D. J. Biedenbach, and C. H. Ballow.** 2000. A nationwide, multicenter, case-control study comparing risk factors, treatment, and outcome for vancomycin-resistant and -susceptible enterococcal bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **36**:145-58.

8. **Boisset, S., T. Geissmann, E. Huntzinger, P. Fechter, N. Bendridi, M. Possedko, C. Chevalier, A. C. Helfer, Y. Benito, A. Jacquier, C. Gaspin, F. Vandenesch, and P. Romby.** 2007. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* **21**:1353-66.
9. **Bourgogne, A., S. G. Hilsenbeck, G. M. Dunny, and B. E. Murray.** 2006. Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J Bacteriol* **188**:2875-84.
10. **Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall.** 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* **13**:686-707.
11. **Coque, T. M., R. J. Willems, J. Fortun, J. Top, S. Diz, E. Loza, R. Canton, and F. Baquero.** 2005. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2693-700.
12. **Costerton, J. W.** 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* **9**:50-2.
13. **Courvalin, P.** 1990. Resistance of enterococci to glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:2291-6.
14. **Cytrynska, M., P. Mak, A. Zdybicka-Barabas, P. Suder, and T. Jakubowicz.** 2007. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* **28**:533-46.

15. **de Fatima Silva Lopes, M., T. Ribeiro, M. Abrantes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. Crespo.** 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int J Food Microbiol* **103**:191-8.
16. **de Jonge, B. L., S. Handwerger, and D. Gage.** 1996. Altered peptidoglycan composition in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:863-9.
17. **Del Papa, M. F., L. E. Hancock, V. C. Thomas, and M. Perego.** 2007. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J Bacteriol* **189**:8835-43.
18. **Del Papa, M. F., and M. Perego.** 2008. Ethanolamine activates a sensor histidine kinase regulating its utilization in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **190**:7147-56.
19. **Domig, K. J., H. K. Mayer, and W. Kneifel.** 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol* **88**:165-88.
20. **Duh, R. W., K. V. Singh, K. Malathum, and B. E. Murray.** 2001. In vitro activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb Drug Resist* **7**:39-46.
21. **Eaton, T. J., and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**:1628-35.
22. **Endtz, H. P., N. van den Braak, H. A. Verbrugh, and A. van Belkum.** 1999. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**:683-90.

23. **Engelbert, M., E. Mylonakis, F. M. Ausubel, S. B. Calderwood, and M. S. Gilmore.** 2004. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun* **72**:3628-33.
24. **Erickson, D. L., J. L. Lines, E. C. Pesci, V. Venturi, and D. G. Storey.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun* **72**:5638-45.
25. **Facklam, R. R., Maria da Gloria S. Carvalho, Lucia M. Teixeira.** 2002. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic, p. 1-54. *In* M. S. Gilmore (ed.), *The Enterococci- Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washington.
26. **Fouet, A., and A. L. Sonenshein.** 1990. A target for carbon source-dependent negative regulation of the *citB* promoter of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **172**:835-44.
27. **Foulque Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* **106**:1-24.
28. **Franz, C. M., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, and W. H. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* **67**:4385-9.
29. **Franz, C. M., M. E. Stiles, K. H. Schleifer, and W. H. Holzapfel.** 2003. Enterococci in foods--a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* **88**:105-22.
30. **Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**:269-75.

31. **Garsin, D. A., C. D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K. V. Singh, B. E. Murray, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel.** 2001. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10892-7.
32. **Geisinger, E., R. P. Adhikari, R. Jin, H. F. Ross, and R. P. Novick.** 2006. Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol Microbiol* **61**:1038-48.
33. **George, E. A., and T. W. Muir.** 2007. Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent staphylococci. *Chembiochem* **8**:847-55.
34. **Gilmore, M. S., Phillip S. Coburn, Sreedhar R. Nallapareddy, Barbara E. Murray.** 2002. Enterococcal Virulence, p. 301-354. *In* M. S. Gilmore (ed.), *The Enterococci- Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washington.
35. **Giraffa, G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* **88**:215-22.
36. **Gold, H. S., and R. C. Moellering, Jr.** 1996. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* **335**:1445-53.
37. **Gold, O. G., H. V. Jordan, and J. van Houte.** 1975. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Arch Oral Biol* **20**:473-7.
38. **Griffiths, A. J. F., Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart** 2002. *Gene Mutation*, 7 edition ed. W. H. Freeman And Company, New York.

39. **Hancock, L. E., and M. Perego.** 2004. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol* **186**:5629-39.
40. **Hartvig, L., and J. Christiansen.** 1996. Intrinsic termination of T7 RNA polymerase mediated by either RNA or DNA. *EMBO J* **15**:4767-74.
41. **Henke, J. M., and B. L. Bassler.** 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol* **14**:648-56.
42. **Hew, C. M., M. Korakli, and R. F. Vogel.** 2007. Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in response to different environments. *Syst Appl Microbiol* **30**:257-67.
43. **<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>.** Setembro de 2008.
44. **<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gef>.** Outubro de 2007.
45. **<http://www.dsmz.de/microorganisms/>.** Junho de 2007.
46. **<http://www.earss.rivm.nl>.** Novembro 2007.
47. **<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.** Janeiro de 2008.
48. **<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.** Janeiro 2008.
49. **<http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Celegans.html>.** Maio 2008. .
50. **Huntzinger, E., S. Boisset, C. Saveanu, Y. Benito, T. Geissmann, A. Namane, G. Lina, J. Etienne, B. Ehresmann, C. Ehresmann, A. Jacquier, F. Vandenesch, and P. Romby.** 2005. *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J* **24**:824-35.

51. **Huycke, M. M., D. F. Sahm, and M. S. Gilmore.** 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* **4**:239-49.
52. **Jackson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, and J. B. Barrett.** 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol* **42**:3558-65.
53. **Jander, G., L. G. Rahme, and F. M. Ausubel.** 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* **182**:3843-5.
54. **Janzon, L., and S. Arvidson.** 1990. The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Embo J* **9**:1391-9.
55. **Ji, G., R. Beavis, and R. P. Novick.** 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**:2027-30.
56. **Ji, G., R. C. Beavis, and R. P. Novick.** 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:12055-9.
57. **Kacmaz, B., and A. Aksoy.** 2005. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* **25**:535-8.
58. **Kalina, A. P.** 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal of Systematic Bacteriology* **20**:185–189.
59. **Kaplan, E. L., Paul Meirer.** 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* **53**:457-481.

60. **Kariyama, R., R. Mitsuhashi, J. W. Chow, D. B. Clewell, and H. Kumon.** 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* **38**:3092-5.
61. **Kawalec, M., J. Potempa, J. L. Moon, J. Travis, and B. E. Murray.** 2005. Molecular diversity of a putative virulence factor: purification and characterization of isoforms of an extracellular serine glutamyl endopeptidase of *Enterococcus faecalis* with different enzymatic activities. *J Bacteriol* **187**:266-75.
62. **Koenig, R. L., J. L. Ray, S. J. Maleki, M. S. Smeltzer, and B. K. Hurlburt.** 2004. *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region. *J Bacteriol* **186**:7549-55.
63. **Kong, K. F., C. Vuong, and M. Otto.** 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* **296**:133-9.
64. **Kristich, C. J., Y. H. Li, D. G. Cvitkovitch, and G. M. Dunny.** 2004. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **186**:154-63.
65. **Lepage, E., S. Brinster, C. Caron, C. Ducroix-Crepy, L. Rigottier-Gois, G. Dunny, C. Hennequet-Antier, and P. Serror.** 2006. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *J Bacteriol* **188**:6858-68.
66. **Lina, G., S. Jarraud, G. Ji, T. Greenland, A. Pedraza, J. Etienne, R. P. Novick, and F. Vandenesch.** 1998. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **28**:655-62.

67. **Lopes Mde, F., T. Ribeiro, M. P. Martins, R. Tenreiro, and M. T. Crespo.** 2003. Gentamicin resistance in dairy and clinical enterococcal isolates and in reference strains. *J Antimicrob Chemother* **52**:214-9.
68. **Lopes Mde, F., A. P. Simoes, R. Tenreiro, J. J. Marques, and M. T. Crespo.** 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol* **112**:208-14.
69. **Lopes, M. F., C. I. Pereira, F. M. Rodrigues, M. P. Martins, M. C. Mimoso, T. C. Barros, J. J. Figueiredo Marques, R. P. Tenreiro, J. S. Almeida, and M. T. Barreto Crespo.** 1999. Registered designation of origin areas of fermented food products defined by microbial phenotypes and artificial neural networks. *Appl Environ Microbiol* **65**:4484-9.
70. **Lyon, G. J., and R. P. Novick.** 2004. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* **25**:1389-403.
71. **MacCallum, W. G., and T. W. Hastings.** 1899. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus Zymogenes* (Nov. spec), with description of the microorganism *Journal of Experimental Medicine* **4**:521-534.
72. **Makinen, P. L., D. B. Clewell, F. An, and K. K. Makinen.** 1989. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain 0G1-10). *J Biol Chem* **264**:3325-34.
73. **Miller, M. B., and B. L. Bassler.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**:165-99.
74. **Moellering, R. C., Jr.** 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* **14**:1173-6.

75. **Mohamed, J. A., and D. B. Huang.** 2007. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol* **56**:1581-8.
76. **Mohamed, J. A., W. Huang, S. R. Nallapareddy, F. Teng, and B. E. Murray.** 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* **72**:3658-63.
77. **Mohamed, J. A., and B. E. Murray.** 2005. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* **43**:5405-7.
78. **Morfeldt, E., D. Taylor, A. von Gabain, and S. Arvidson.** 1995. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* **14**:4569-77.
79. **Murray, B. E.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* **3**:46-65.
80. **Mylonakis, E., M. Engelbert, X. Qin, C. D. Sifri, B. E. Murray, F. M. Ausubel, M. S. Gilmore, and S. B. Calderwood.** 2002. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect Immun* **70**:4678-81.
81. **Naimi, A., G. Beck, and C. Branlant.** 1997. Primary and secondary structures of rRNA spacer regions in enterococci. *Microbiology* **143 ( Pt 3)**:823-34.
82. **Nakayama, J., Y. Cao, T. Horii, S. Sakuda, A. D. Akkermans, W. M. de Vos, and H. Nagasawa.** 2001. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* **41**:145-54.

83. **Nakayama, J., Y. Cao, T. Horii, S. Sakuda, and H. Nagasawa.** 2001. Chemical synthesis and biological activity of the gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis* and its analogs. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**:2322-5.
84. **Nakayama, J., S. Chen, N. Oyama, K. Nishiguchi, E. A. Azab, E. Tanaka, R. Kariyama, and K. Sonomoto.** 2006. Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to *staphylococcal agrD*. *J Bacteriol* **188**:8321-6.
85. **Nakayama, J., R. Kariyama, and H. Kumon.** 2002. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl Environ Microbiol* **68**:3152-5.
86. **Nakayama, J., E. Tanaka, R. Kariyama, K. Nagata, K. Nishiguchi, R. Mitsuata, Y. Uemura, M. Tanokura, H. Kumon, and K. Sonomoto.** 2007. Siamycin attenuates *fsr* quorum sensing mediated by a gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **189**:1358-65.
87. **Nickerson, C. A.** 2001. Putting *C. elegans* to Gram-positive use. *Trends Microbiol* **9**:581.
88. **Novick, R. P., S. J. Projan, J. Kornblum, H. F. Ross, G. Ji, B. Kreiswirth, F. Vandenesch, and S. Moghazeh.** 1995. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **248**:446-58.
89. **Novick, R. P., H. F. Ross, S. J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth, and S. Moghazeh.** 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J* **12**:3967-75.

90. **Ogier, J. C., and P. Serror.** 2007. The *Enterococcus* genus. Int J Food Microbiol.
91. **Orla-Jensen, S.** 1919. The latic acid bacteria. Mem. Acad. R. Soc. Danemark Sect. Sci. Ser. **5**:81-197.
92. **Park, S. Y., K. M. Kim, J. H. Lee, S. J. Seo, and I. H. Lee.** 2007. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. Infect Immun **75**:1861-9.
93. **Pillai, S. K., G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., B. E. Murray, and R. T. Inouye.** 2004. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. J Infect Dis **190**:967-70.
94. **Qin, X., K. V. Singh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 2001. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. J Bacteriol **183**:3372-82.
95. **Qin, X., K. V. Singh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 2000. Effects of *Enterococcus faecalis fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. Infect Immun **68**:2579-86.
96. **Reynolds, R., N. Potz, M. Colman, A. Williams, D. Livermore, and A. MacGowan.** 2004. Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001-2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. J Antimicrob Chemother **53**:1018-32.
97. **Ribeiro, T., M. Abrantes, F. Lopes Mde, and M. T. Crespo.** 2007. Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry *vanA* and *vanB* genes. Int J Food Microbiol **113**:289-95.

98. **Roberts, J. C., K. V. Singh, P. C. Okhuysen, and B. E. Murray.** 2004. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* **42**:2317-20.
99. **Saenz, H. L., V. Augsburger, C. Vuong, R. W. Jack, F. Gotz, and M. Otto.** 2000. Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch Microbiol* **174**:452-5.
100. **Satake, S., N. Clark, D. Rimland, F. S. Nolte, and F. C. Tenover.** 1997. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* **35**:2325-30.
101. **Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Balz.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:31-34.
102. **Semedo, T., M. A. Santos, M. F. Lopes, J. J. Figueiredo Marques, M. T. Barreto Crespo, and R. Tenreiro.** 2003. Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol* **26**:13-22.
103. **Serror, P., T. Sasaki, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2002. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *Appl Environ Microbiol* **68**:46-52.
104. **Shankar, N., A. S. Baghdayan, and M. S. Gilmore.** 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* **417**:746-50.

105. **Shepard, B. D., and M. S. Gilmore.** 2002. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun* **70**:4344-52.
106. **Sherman, J. M.** 1937. The streptococci. *Bacteriol. Rev.* **1**:3-97.
107. **Sifri, C. D., A. Baresch-Bernal, S. B. Calderwood, and C. von Eiff.** 2006. Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infect Immun* **74**:1091-6.
108. **Sifri, C. D., E. Mylonakis, K. V. Singh, X. Qin, D. A. Garsin, B. E. Murray, F. M. Ausubel, and S. B. Calderwood.** 2002. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect Immun* **70**:5647-50.
109. **Singh, K. V., S. R. Nallapareddy, E. C. Nannini, and B. E. Murray.** 2005. Fsr-independent production of protease(s) may explain the lack of attenuation of an *Enterococcus faecalis* *fsr* mutant versus a *gelE-sprE* mutant in induction of endocarditis. *Infect Immun* **73**:4888-94.
110. **Singh, K. V., X. Qin, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 1998. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis* **178**:1416-20.
111. **Su, Y. A., M. C. Sulavik, P. He, K. K. Makinen, P. L. Makinen, S. Fiedler, R. Wirth, and D. B. Clewell.** 1991. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* **59**:415-20.
112. **Sulston, J. H., J.** 1988. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Lab. Press.

113. **Surette, M. G., M. B. Miller, and B. L. Bassler.** 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1639-44.
114. **Tannock, G. W. C., G. .** 2002. Enterococci as member of intestinal microflora of humans p. 101-132. *In* ASM (ed.), *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, Washington.
115. **Tendolkar, P. M., A. S. Baghdayan, and N. Shankar.** 2003. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* **60**:2622-36.
116. **Teuber, M., L. Meile, and F. Schwarz.** 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**:115-37.
117. **Thiercelin, M. E.** 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogen. *C. R. Soc. Biol.* **5**:269-271.
118. **Treitman, A. N., P. R. Yarnold, J. Warren, and G. A. Noskin.** 2005. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol* **43**:462-3.
119. **Wenzel, R. P., and M. B. Edmond.** 2001. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* **7**:174-7.
120. **Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**:309-17.
121. **Zhang, L., L. Gray, R. P. Novick, and G. Ji.** 2002. Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **277**:34736-42.

## ANEXOS

**Anexo 1. Alinhamento de DNA. Alinhamento dos operões *fsr* e *gelE-sprE* das estirpes *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 com a estirpe controlo *E. faecalis* V583.**

**Anexo 2. Alinhamento de proteínas. Alinhamento das proteínas dos operões *fsr* e *gelE-sprE* das estirpes *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 com a estirpe controlo *E. faecalis* V583.**

Anexo 2.1 Proteínas FsrA, Regulador.

Anexo 2.2 Proteínas FsrB (incluindo a FsrD), “Accessory gene regulator B”.

Anexo 2.3 Proteínas FsrC, Histidina Cinase.

Anexo 2.4 Proteínas Gelatinase.

Anexo 2.5 Proteínas Protease sérica.

**Anexo 3. Análise da mutação encontrada no gene *fsrC* na estirpe *E. faecalis* LN68 nas estirpes *E. faecalis* LN66, *E. durans* QN8, *E. durans* QSE125 e *E. faecalis* QSE15.**

**Anexo 1. Alinhamento de DNA.** Alinhamento dos operões *fsr* e *gelE-sprE* das estirpes *E.faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 com a estirpe controlo *E.faecalis* V583.

						Section 1
	(1)	1	10	20	30	40 50
V583	(1)	AGAGACAATAGTCCTCATGATTCGTTAGAAAAAGATGAA				TAGTCCAAAGT
LN68	(1)	AGAGACAATAGTCCTCATGATTCGTTAGTAAAAGATGAA				TAGTCCAAAGT
QSE32	(1)	-----				TAGTCCAAAGT
						Section 2
	(51)	51	60	70	80	90 100
V583	(51)	ACTCTTTCTTGATCCTTTGTTATTTTATGTTTTTGTTCAGGAAACTAC				
LN68	(51)	ACTCTTTCTTGATGCTTTGTTATTTTATGTTTTTGTTCAGGAAACTAC				
QSE32	(12)	ACTCTTTCTTGATGCTTTGTTATTTTATGTTTTTGTTCAGGAAACTAC				
						Section 3
	(101)	101	110	120	130	140 150
V583	(101)	TGAAATCGCTATACTAAATTTATGTGAATATACTAACAGACAATCAATTT				
LN68	(101)	TGAAATCGCTATACTAAATTTATGTGAATATACTAACAGACAATCAATTT				
QSE32	(62)	TGAAATCGCTATACTAAATTTATGTGAATATACTAACAGACAATCAATTT				
						Section 4
	(151)	151	160	170	180	190 200
V583	(151)	TTTATCTCTTTTATTGGTGTATAAATTGATTGAACATTATAATCATTGT				
LN68	(151)	TTTATCTTTTTTATTGGTGTATAAATTGATTGAACATTATAATCATTGT				
QSE32	(112)	TTTATCTTTTTTATTGGTGTATAAATTGATTGAACATTATAATCATTGT				
						Section 5
	(201)	201	210	220	230	240 250
V583	(201)	CTTTTGTGTGTAATTTTATATCTTCTTGAGAAAGGGATGAGTGAACAAA				
LN68	(201)	CTTTTGTGTGTAATTTTATATCTTCTTGAGAAAGGGATGAGTGAACAAA				
QSE32	(162)	CTTTTGTGTGTAATTTTATATCTTCTTGAGAAAGGGATGAGTGAACAAA				
						Section 6
	(251)	251	260	270	280	290 300
V583	(251)	TGGCTATTTATATATTAGAAGACCAAATTTATTCAAGCAAAGCGTTAGAA				
LN68	(251)	TGGCTATTTATATATTAGAAGACCAAATTTATTCAAGCAAAGCGTTAGAA				
QSE32	(212)	TGGCTATTTATATATTAGAAGACCAAATTTATTCAAGCAAAGCGTTAGAA				
						Section 7
	(301)	301	310	320	330	340 350
V583	(301)	GTATTGTTAACAAATATCCTACATTCAAGAAATATTTATAATGAAACAAT				
LN68	(301)	GCATTGTTAACAAATATCCTACATTCAAGAAATATTTATAATGAAACAAT				
QSE32	(262)	GCATTGTTAACAAATATCCTACATTCAAGAAATATTTATAATGAAACAAT				
						Section 8
	(351)	351	360	370	380	390 400
V583	(351)	CCATTTATTTTCACGTTTCAGATGAATTATTACAAGTGGCACACCAGGACG				
LN68	(351)	CCATTTATTTTCACGTTTCAGATGAATTATTACAAGTGGCACACCAGGACG				
QSE32	(312)	CCATTTATTTTCACGTTTCAGATGAATTATTACAAGTGGCACACCAGGACG				

							Section 9
	(401)	401	410	420	430	440	450
V583	(401)	CCCAACTAAATATCTTTTTCTAGATATTCAAATGAACAATCATATCCAG					
LN68	(401)	CCCAACTAAATATCTTTTTCTAGATATTCAAATGAACAATCATATCCAG					
QSE32	(362)	CCCAACTAAATATCTTTTTCTAGATATTCAAATGAACAATCATATCCAG					
							Section 10
	(451)	451	460	470	480	490	500
V583	(451)	GCAGGATTTGAGGTTGCTAAAGAAATCAGAAAAACAGACAGTGAAAGTCT					
LN68	(451)	GCAGGATTTGAGGTTGCTAAAGAAATCAGAAAAACAGACAGTGAAAGTCT					
QSE32	(412)	GCAGGATTTGAGGTTGCTAAAGAAATCAGAAAAACAGACAGTGAAAGTCT					
							Section 11
	(501)	501	510	520	530	540	550
V583	(501)	GATTGTATTTATTTCTACTCACACAGAATTAGTTTTAACTTCCTACAAAT					
LN68	(501)	GATTGTATTTATTTCTACTCACACAGAATTAGTTTTAACTTCCTACAAAT					
QSE32	(462)	GATTGTATTTATTTCTACTCACACAGAATTAGTTTTAACTTCCTACAAAT					
							Section 12
	(551)	551	560	570	580	590	600
V583	(551)	ATATGGTTTCAGCTCTTCAATTTATTCAAAGAACGTGGATTTTCTAGAT					
LN68	(551)	ATATGGTTTCAGCTCTTCAATTTATTCAAAGAACGTGGATTTTCTAGAT					
QSE32	(512)	ATATGGTTTCAGCTCTTCAATTTATTCAAAGAACGTGGATTTTCTAGAT					
							Section 13
	(601)	601	610	620	630	640	650
V583	(601)	TTCCAAAAAGAGGTCGAAACATGTGTTCGATGCATATATTCAACAAAAAGA					
LN68	(601)	TTCCAAAAAGAGGTCGAAACATGTGTTCGATGCATATATTCAACAAAAAGA					
QSE32	(562)	TTCCAAAAAGAGGTCGAAACATGTGTTCGATGCATATATTCAACAAAAAGA					
							Section 14
	(651)	651	660	670	680	690	700
V583	(651)	AAATATAAAGACAAAAAGTGAATATATTATCATTAACCTTAAAAGCGTCTT					
LN68	(651)	AAATATAAAGACAAAAAGTGAATATATTATCATTAACCTTAAAAGCGTCTT					
QSE32	(612)	AAATATAAAGACAAAAAGTGAATATATTATCATTAACCTTAAAAGCGTCTT					
							Section 15
	(701)	701	710	720	730	740	750
V583	(701)	CTATAAAAATGGATATTAATGATATTTATTTCTTTCAAACGGAATACGAT					
LN68	(701)	CTATAAAAATGGATATTAATGATATTTATTTCTTTCAAACGGAATACGAT					
QSE32	(662)	CTATAAAAATGGATATTAATGATATTTATTTCTTTCAAACGGAATACGAT					
							Section 16
	(751)	751	760	770	780	790	800
V583	(751)	CATCGTGTGTC AATGGTTGGTAAAAATTTTAAAAGAGAATTTTATGGAAC					
LN68	(751)	CATCGTGTGTC AATGGTTGGTAAAAATTTTAAAAGAGAATTTTATGGAAC					
QSE32	(712)	CATCGTGTGTC AATGGTTGGTAAAAATTTTAAAAGAGAATTTTATGGAAC					

Section 17

	(801)	801	810	820	830	840	850
V583	(801)	GTTATCAAAAATTGAACAACCTGCATCCAGATTTGATTAGAGTCCATCAAT					
LN68	(801)	TTTATCAAAAATTGAACAACCTGCATCCAGATTTGATTAGAGTCCATCAAT					
QSE32	(762)	TTTATCAAAAATTGAACAACCTGCATCCAGATTTGATTAGAGTCCATCAAT					

Section 18

	(851)	851	860	870	880	890	900
V583	(851)	CAATCATCATCAATAAAAAATATGCGTCAAAAATTAATTATAAAACGCAT					
LN68	(851)	CAATCATCATCAATAAAAAATATGCGTCAAAAATTAATTATAAAACGCAT					
QSE32	(812)	CAATCATCATCAATAAAAAATATGCGTCAAAAATTAATTATAAAACGCAT					

Section 19

	(901)	901	910	920	930	940	950
V583	(901)	CTTTTAACTATGAGAGACGGAACGGAAGTACCAGTCTCAAAGAGATATTA					
LN68	(901)	CTTTTAACTATGAGAGACGGAACGGAAGTACCAGTCTCAAAGAGATATTA					
QSE32	(862)	CTTTTAACTATGAGAGACGGAACGGAAGTACCAGTCTCAAAGAGATATTA					

Section 20

	(951)	951	960	970	980	990	1000
V583	(951)	TACTCAGGTCAAGGCACTATTTCTTACTTAGGGA - GGGATAATGACTAAT					
LN68	(951)	TACTCAGGTCAAGGCACTATTTCTTACTTAGGGAAGGGATAATGACTAAT					
QSE32	(912)	TACTCAGGTCAAGGCACTATTTCTTACTTAGGGAAGGGATAATGACTAAT					

Section 21

	(1001)	1001	1010	1020	1030	1040	1050
V583	(1000)	TAAGGAATTATCTATCTATTAGTCGCTATATTCGTTATTAATTTAGTGCAA					
LN68	(1001)	TAAAGAATTATCTATCTATTACTCGCCATATTCGTTAAATTTAGTGCAA					
QSE32	(962)	TAAAGAATTATCTATCTATTACTCGCCATATTCGTTATTAATTTAGTGCAA					

Section 22

	(1051)	1051	1060	1070	1080	1090	1100
V583	(1050)	TACTTGAAGAGGAGGGCGATATGCTAATCGATTGGATTCTAAAAAATATT					
LN68	(1051)	TACTTGAAGAGGAGGGCGATATGCTAATCGATTGGATTCTAAAAAATATT					
QSE32	(1012)	TACTTGAAGAGGAGGGCGATATGCTAATCGATTGGATTCTAAAAAATATT					

Section 23

	(1101)	1101	1110	1120	1130	1140	1150
V583	(1100)	ATGGATATGGATCAGGAAGATCAATCAGGAAAAACACAATGGACAAAGTA					
LN68	(1101)	ATGGATATAGATCAGGAAGATCAATCAGGAAAAACACAATGGACAAAGTA					
QSE32	(1062)	ATGGATATGGATCAGGAAGATCAATCAGGAAAAACACAATGGACAAAGTA					

Section 24

	(1151)	1151	1160	1170	1180	1190	1200
V583	(1150)	TTATCTAACCGTTTATTTTTCTGGCTTATTTAATCTTCTGATGATTCTGA					
LN68	(1151)	TTATCTAACCGTTTATTTTTCTGGCTTATTTAATTTTCTGATGATTCTGA					
QSE32	(1112)	TTATCTAACCGTTTATTTTTCTGGCTTATTTAATTTTCTGATGATTCTGA					

Section 25							
	(1201)	1201	1210	1220	1230	1240 1250	
V583	(1200)	TTTTATCAGTTTTTATTTGGGACGTTAAGCGAAACCTTTATTGTATACGTC					
LN68	(1201)	TTTTATCAGTTTTTATTTGGGACGTTAAGCGAAACCTTTATTGTATACGTC					
QSE32	(1162)	TTTTATCAGTTTTTATTTGGGACGTTAAGCGAAACCTTTATTGTATACGTC					
Section 26							
	(1251)	1251	1260	1270	1280	1290 1300	
V583	(1250)	GTACTGATTTTTTTTACGGCCTGTCGCAGGTGGCTGGCATGCAAAAACCTAA					
LN68	(1251)	GTACTGATTTTTTTTACGGCCTGTCGCAGGTGGCTGGCATGCAAAAACCAA					
QSE32	(1212)	GTACTGATTTTTTTTACGGCCTGTCGCAGGTGGCTGGCATGCAAAAACCTAA					
Section 27							
	(1301)	1301	1310	1320	1330	1340 1350	
V583	(1300)	ATGGCTCTGTCGTCTAGAAAGCATTGTTATCTATGTCGCCATACCATTG					
LN68	(1301)	ATGGCTCTGTCGTCTAGAAAGCATTGTTATCTATGTCGCCATACCATTG					
QSE32	(1262)	ATGGCTCTGTCGTCTAGAAAGCATTGTTATCTATGTTGCTATACCATTG					
Section 28							
	(1351)	1351	1360	1370	1380	1390 1400	
V583	(1350)	TATTGAAAAATTCTTCTGTGAGCTTACCGTTTATTTATAAAATTCTATTG					
LN68	(1351)	TATTGAAAAATTCTTCTGTGAGCTTACCGTTTATTTATAAAATTCTATTG					
QSE32	(1312)	TATTGAAAAATTCTTCTGTGAGCTTACCGTTTATTTATAAAATTCTATTG					
Section 29							
	(1401)	1401	1410	1420	1430	1440 1450	
V583	(1400)	ATGTGCCTCTTAGTCTGTATTATTTTATTGGTATGCGCCACAAGGGAACAGC					
LN68	(1401)	ATGTGCCTCTTAGTCTGTATTATTTTATTGGTATGCGCCACAAGGGAACAGC					
QSE32	(1362)	ATGTGCCTCTTAGTCTGTATTATTTTATTGGTATGCGCCACACGGAACAGC					
Section 30							
	(1451)	1451	1460	1470	1480	1490 1500	
V583	(1450)	GATTGAACCTGTTCAAGCCATCTGATTTAAACGTGCTCAAAAAGCAAAGCC					
LN68	(1451)	AATCGAACCTGTTCAAGCCATCTGATTTAAACGTGCTCAAAAAGCAAAGCC					
QSE32	(1412)	AATTGAACCTGTTCAAGCCATCTGATTTAAACGTGCTCAAAAAGCAAAGCC					
Section 31							
	(1501)	1501	1510	1520	1530	1540 1550	
V583	(1500)	TTATAAGGGTGTGTTTACTTATTTTATGTAGTCTGTTTGTCAAAGAAAAG					
LN68	(1501)	TTATAAGGGTGTGTTTACTTATTTTATGTAGTCTGTTTGTCAAAGAAAAG					
QSE32	(1462)	TTATAAGGGTGTGTTTACTTATTTTATGTAGTCTGTTTGTCAAAGAAAAG					
Section 32							
	(1551)	1551	1560	1570	1580	1590 1600	
V583	(1550)	ATTGCTTCAGTAATACTCTACGGTCTCGTCAATCCAAGGTCTGATGATACT					
LN68	(1551)	ATTGCTTCAGTAATACTCTACGGTCTCGTCAATCCAAGGTCTGATGATACT					
QSE32	(1512)	ATTGCTTCAGTAATACTCTACGGTCTCGTCAATCCAAGGTCTGATGATACT					

Section 33

	(1601)	1601	1610	1620	1630	1640	1650
V583 (1600)		CCCTGTAACAAAAAATTTAATTGAAGGAAGTGT	TTTTATGAA	ATTTGGTA			
LN68 (1601)		CCCTGTAACAAAAAATTTAATTGAAGGAAGTGT	TTTTATGAA	ATTTGGTA			
QSE32 (1562)		CCCTGTAACAAAAAATTTAATTGAAGGAAGTGT	TTTTATGAC	CATTTGGTA			

Section 34

	(1651)	1651	1660	1670	1680	1690	1700
V583 (1650)		AAAAAATAAATTA	AAAAATGTTATTGAAAAAAGAGTTGCAAAA	AGTTAGTGAT			
LN68 (1651)		AAAAAATAAATTA	AAAAATGTTATTGAAAAAAGAGTTGCAAAA	AGTTAGTGAT			
QSE32 (1612)		CAAAAATAAATTA	AAAAATGTTATTGAAAAAAGAGTTGCAAAG	GTC	CCGTGAT		

Section 35

	(1701)	1701	1710	1720	1730	1740	1750
V583 (1700)		GGTGTGGGAAC	TAAGCCTAGATTAAATCAAAAATTCGCCCA	ATATATTTGG			
LN68 (1701)		GGTGTGGGAAC	TAAGCCTAGATTAAATCAAAAATTCGCCCA	ATATATTTGG			
QSE32 (1662)		GGTGTGGGAAC	TAAGCCTAGATTAAATCAAAAATTCGCCCA	TTATATTTGG			

Section 36

	(1751)	1751	1760	1770	1780	1790	1800
V583 (1750)		ACAATGGATGGGACAAACTGAAAAACCTAAAAAGAA	TATTGAAAAATGAT				
LN68 (1751)		ACAATGGATGGGACAAACTGAAAAACCTAAAAAGAA	TATTGAAAAATGAT				
QSE32 (1712)		ACAATGGATGGGACAAACTGAAAAACCTAAAAAGAA	TATTGAAAAATGAT				

Section 37

	(1801)	1801	1810	1820	1830	1840	1850
V583 (1800)		TTTGTCGTTATTAGCTACTAACGTTTTGCTTGTATCTAGCTTTATCGTTT					
LN68 (1801)		TTTGTCGTTATTAGCTACTAACGTTTTGCTTGTATCTAGCTTTATCGTTT					
QSE32 (1762)		TTTGTCGTTATTAGCTACTAACGTTTTGCTTGTATCTAGCTTTATCGTTT					

Section 38

	(1851)	1851	1860	1870	1880	1890	1900
V583 (1850)		TTGTCTTTTTTACGAGTAACATTGATCAAGATTGAATGTAAAATACCGTTA					
LN68 (1851)		TTGTCTTTTTTACGAGTAACATTGATCAAGATTGAATGTAAAATACCGTTA					
QSE32 (1812)		TTGTCTTTTTTACGAGTAACATTGATCAAGATTGAATGTAAAATACCGTTA					

Section 39

	(1901)	1901	1910	1920	1930	1940	1950
V583 (1900)		CTTTCATTGCTTATTGTCATTAATCTTTGTTTCGTTTGCGGCATTAATGTT					
LN68 (1901)		CTTTCATTGCTTATTGTCATTAATCTTTGTTTCGTTTGCGGCATTAATGTT					
QSE32 (1862)		CTTTCATTGCTTATTGTCATTAATCTTTGTTTCGTTTGCGGCATTAATGTT					

Section 40

	(1951)	1951	1960	1970	1980	1990	2000
V583 (1950)		GGGCTACTCTTGTTGATTTATGCGCTGACAGTCGTTA	TTTTTACAGGAT				
LN68 (1951)		GGGTTGCTCTTGTTGATTTATGCGCTGACAGTCGTTA	TTTTTACAGGAT				
QSE32 (1912)		GGGCTACTCTTGTTGATTTATGCGCTGACAGTCGTTG	TTTTTACAGGAT				

Section 41

	(2001)	2001	2010	2020	2030	2040	2050
V583 (2000)		TTTTACTCATT	CACAAAAAGAGGTTCTCAATTTTTAAAGCGATATTTTTG				
LN68 (2001)		TTTTACTCATT	CACAAAAAGAGGTTCTCAATTTTTAAAGCGATATTTTTG				
QSE32 (1962)		TTTTACTCATT	CACAAAAAGAGGTTCTCAATTTTTAAAGCGATATTTTTA				

Section 42

	(2051)	2051	2060	2070	2080	2090	2100
V583 (2050)		TCTGTTTTTACATTGCTTATGGTTTCGTTTATCAATTACACGGAGCAAAC					
LN68 (2051)		TCTGTTTTTACATTGCTTATGGTTTCGTTTATCAATTACACGGAGCAAAC					
QSE32 (2012)		TCCGTTTTTACATTGCTTATGGTTTCGTTTATCAATTACACGGAGCAAAC					

Section 43

	(2101)	2101	2110	2120	2130	2140	2150
V583 (2100)		GATTTTAAGTGTTTTTTTTCAACAGATTTATCAAAAATAAATTATTATGGA					
LN68 (2101)		GATTTTAAGTGTTTTTTTTCAACAGATTTATCAAAAATAAATTATTATGGA					
QSE32 (2062)		GATTTTAAGTGTTTTTTTTCAACAGATTTATCAAAAATAAATTATTATGGA					

Section 44

	(2151)	2151	2160	2170	2180	2190	2200
V583 (2150)		TTGCCTCAAATGTTCTTCTGTTGCTTATAAATATCTGGATTGCTTTAAAA					
LN68 (2151)		TTGCCTCAAATGTTATTCTGTTGCTTATAAATATCTGGATTGCTTTAAAA					
QSE32 (2112)		TTGCCTCAAATGTTCTTCTGTTGCTTATAAATATCTGGATTGCTTTAAAA					

Section 45

	(2201)	2201	2210	2220	2230	2240	2250
V583 (2200)		ATTCCCAATAGTGTTTTTTTTAAGATTAAATCGTGTGTTAGAAAATAGCCG					
LN68 (2201)		ATTCCCAATAGTGTTTTTTTTAAGATTAAATCGTGTGTTAGAAAATAGCCG					
QSE32 (2162)		ATTCCCAATAGTGTTTTTTTTAAGATTAAATCGTGTGTTAGAAAATAGCCG					

Section 46

	(2251)	2251	2260	2270	2280	2290	2300
V583 (2250)		AATTTTTTTTTGGTTGTTTACTTTTTATTGTTGATTCTGTTGTTACTTTTTG					
LN68 (2251)		AATTTTTTTTTGGTTGTTTACTTTTTATTGTTGATTCTGTTGTTACTTTTTG					
QSE32 (2212)		AATTTTTTTTTGGTTGTTTACTTTTTATTGTTGATTCTGTTGTTACTTTTTG					

Section 47

	(2301)	2301	2310	2320	2330	2340	2350
V583 (2300)		TGTTTTTGATTTTCGCCAGAGATTTACCTGACTTTTATGCGAGGATTTGTC					
LN68 (2301)		TGTTTTTGATTTTCGCCAGAGATTTACCTGACTTTTATGCGAGGATTTGTC					
QSE32 (2262)		TGTTTTTGATTTTCGCCAGAGATTTACCTGACTTTTATGCGAGGATTTGTC					

Section 48

	(2351)	2351	2360	2370	2380	2390	2400
V583 (2350)		ACGGTAAATAGTTCTAAATTGGAGTTATTAATAAGTGTAGGTTTATTTTT					
LN68 (2351)		ACGGTAAATAGTTCTAAATTGGAGTTATTAATAAGTGTAGGTTTATTTTT					
QSE32 (2312)		ACGGTAAATAGTTCTAAATTGGAGTTATTAATAAGTGTAGGTTTATTTTT					

Section 49							
	(2401)	2401	2410	2420	2430	2440	2450
V583 (2400)		AATTCTGATTGGCTTAGTCATTGAAGCTTATTTGGAAGAACAACGTATCA					
LN68 (2401)		AATTCTGATTGGCTTAGTCATTGAAGCTTATTTGGAAGAACAACGTATCA					
QSE32 (2362)		AATTCTGATTGGCTTAGTCATTGAAGCTTATTTGGAAGAACAACGTATCA					
Section 50							
	(2451)	2451	2460	2470	2480	2490	2500
V583 (2450)		ACACTCAATTATTGAATAATTTAACGATTTATACTGAAAAAATAGAATCC					
LN68 (2451)		ACACTCAATTATTGAATAATTTAACGATTTATACTGAAAAAATAGAATCC					
QSE32 (2412)		ACACTCAATTATTGAATAATTTAACGATTTATACTGAAAAAATAGAATCC					
Section 51							
	(2501)	2501	2510	2520	2530	2540	2550
V583 (2500)		ATTAACGAAGAGCTAGCGATGTTTCGTCATGATTATAAAAAATTTATTGTA					
LN68 (2501)		ATTAACGAAGAGCTAGCGATGTTTCGTCATGATTATAAAAAATTTATTGAA					
QSE32 (2462)		ATTAATGAAGAGCTAGCGATGTTTCGTCATGATTATAAAAAATTTATTGTA					
Section 52							
	(2551)	2551	2560	2570	2580	2590	2600
V583 (2550)		TAGTTTACAAATTGCTATTTTCATACGAAGATATTCTGGAAATCAAAAGAA					
LN68 (2551)		TAGTTTACAAATTGCTATTTTCATACGAAGATATTCTGGAAATCAAAAGAA					
QSE32 (2512)		TAGTTTACAAATTGCTATTTTCATACGAAGATATTCTGGAAATCAAAAGAA					
Section 53							
	(2601)	2601	2610	2620	2630	2640	2650
V583 (2600)		TTTATGAAGAAACGATTGCACCAACCAAAAAAATTATTGATAATGAAGAA					
LN68 (2601)		TTTATGAAGAAACGATTGCACCAACCAAAAAAATTATTGATAATGAAGAA					
QSE32 (2562)		TTTATGAAGAAACGATTGCACCAACCAAAAAAATTATTGATAATGAAGAA					
Section 54							
	(2651)	2651	2660	2670	2680	2690	2700
V583 (2650)		TTTGAACTTATGAAGTTAAATCGTTTGAAAAATATGGAACTTAAGGCACT					
LN68 (2651)		TTTGAACTTATGAAGTTAAATCGTTTGAAAAATATGGAACTTAAGGCACT					
QSE32 (2612)		TTTGAACTTATGAAGTTAAATCGTTTGAAAAATATGGAACTTAAGGCACT					
Section 55							
	(2701)	2701	2710	2720	2730	2740	2750
V583 (2700)		CATAAGTATGAAAATTAATACCGCAAAGCAAGCAAACTAAAAGTGATTG					
LN68 (2701)		CATAAGTATGAAAATTAATACCGCAAAGCAAGCAAACTAAAAGTGATTG					
QSE32 (2662)		CATAAGTATGAAAATTAATACCGCAAAGCAAGCAAACTAAAAGTGATTG					
Section 56							
	(2751)	2751	2760	2770	2780	2790	2800
V583 (2750)		TTGATGTGCCAGAAGTATTTATTCTTGATACATCAATCGACTTAGTGGTT					
LN68 (2751)		TTGATGTGCCAGAAGTATTTATTCTCGATACATCAATCGACTTAGTGGTT					
QSE32 (2712)		TTGATGTGCCAGAAGTATTTATTCTCGATACATCAATCGACTTAGTGGTT					

Section 57

	(2801)	2801	2810	2820	2830	2840	2850
V583 (2800)		GTGATTCGTTT	GTTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGC				
LN68 (2801)		GTGATTCGTTT	GTTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGC				
QSE32 (2762)		GTGATTCGTTT	GTTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGC				

Section 58

	(2851)	2851	2860	2870	2880	2890	2900
V583 (2850)		AAAATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAAATGAAA					
LN68 (2851)		AAAATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAAATGAAA					
QSE32 (2812)		AAAATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAAATGAAA					

Section 59

	(2901)	2901	2910	2920	2930	2940	2950
V583 (2900)		CACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATTTTAAAG					
LN68 (2901)		CACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATTTTAAAG					
QSE32 (2862)		CACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATTTTAAAG					

Section 60

	(2951)	2951	2960	2970	2980	2990	3000
V583 (2950)		GTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAATCCAGAAGAGCACGG					
LN68 (2951)		GTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAACCCAGAAGAGCACGG					
QSE32 (2912)		GTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAACCCAGAAGAGCACGG					

Section 61

	(3001)	3001	3010	3020	3030	3040	3050
V583 (3000)		TTGGGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTTTTCAGATCAATTTG					
LN68 (3001)		TTGAGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTTTTCAGATCAATTTG					
QSE32 (2962)		TTGGGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTTTTCAGATCAATTTG					

Section 62

	(3051)	3051	3060	3070	3080	3090	3100
V583 (3050)		ATTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGAGCGGTCACTCAACATTTAATTATT					
LN68 (3051)		ACTTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGATCGGTTACTCAACATTTAATTATT					
QSE32 (3012)		ATTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGAGCGGTCACTCAACATTTAATTATT					

Section 63

	(3101)	3101	3110	3120	3130	3140	3150
V583 (3100)		GAAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGTTAACGAATGAATTTGTTAACA					
LN68 (3101)		GAAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGTTAACGAATGAATTTGTTAACA					
QSE32 (3062)		GAAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGTTAACGAATGAATTTGTTAACA					

Section 64

	(3151)	3151	3160	3170	3180	3190	3200
V583 (3150)		ACTTTTTTGCTATGGTATTGAGTTATGAGGGGCAATACAGGGAAAAATGT					
LN68 (3151)		ACTTTTTTGCTATGGTATTGAGTTATGAGGGGCAATACAGGGAAAAATGT					
QSE32 (3112)		ACTTTTTTGCTATGGTATTGAGTATGAGGGGCAATACAGGGAAAAATGT					

Section 65						
	(3201)	3201	3210	3220	3230	3240 3250
V583	(3200)	CGGCTGATTAAGGAATTTAGATAGTGCCGGTTAGGTAGTTGTCTATAATG				
LN68	(3201)	CGGCTGATTAAGGAATTTAGATAGTGCCGGTTAGGTAGTTGTCTATAATG				
QSE32	(3162)	CGGCTGATTAAGGAATTTAGATAGTGCCGGTTAGGTAGTTGTCTATAATG				
Section 66						
	(3251)	3251	3260	3270	3280	3290 3300
V583	(3250)	AAAATAGCAACAAATATTTACGCAGGGAAAGGGCGGTCTTTAACGGGA				
LN68	(3251)	AAAATAGCAACAAATATTTACGCAGGGAAAGGGCGGTCTTTAACGGGA				
QSE32	(3212)	AAAATAGCAACAAATATTTACGCAGGGAAAGGGCGGTCTTTAACGGGA				
Section 67						
	(3301)	3301	3310	3320	3330	3340 3350
V583	(3300)	AAAATTAGGGAGGATAAAGCAATACTTTTGTGGGAAAAGAAATAAAAGG				
LN68	(3301)	AAAATTAGGGAGGATAAAGCAATACTTTTGTGGGAAAAGAAATAAAAGG				
QSE32	(3262)	AAGATTAGGGAGGATAAAGCAATACTTTTGTGGGAAAAGAAATAAAAGG				
Section 68						
	(3351)	3351	3360	3370	3380	3390 3400
V583	(3350)	AAACTGGGGAAGGAGTTAATGTGTTTGATGAAGGGAAATAAAATTTTATAC				
LN68	(3351)	AAACTGGGGAAGGAGTTAATGTGTTTGATGAAGGGAAATAAAATTTTATAC				
QSE32	(3312)	AAACTGGGGAAGGAGTTAATCGTTTGATGAAGGGAAATAAAATTTTATAC				
Section 69						
	(3401)	3401	3410	3420	3430	3440 3450
V583	(3400)	ATTTTAGGTACAGGCATCTTTGTTGGAAGTTCATGTCTATTTTCTTCACT				
LN68	(3401)	ATTTTAGGTACAGGCATCTTTGTTGGAAGTTCATGTCTATTTTCTTCACT				
QSE32	(3362)	ATTTTAGGTACAGGCATCTTTGTTGGAAGTTCATGTCTATTTTCTTCACT				
Section 70						
	(3451)	3451	3460	3470	3480	3490 3500
V583	(3450)	TTTTGTAGCCGCAGAAGAACAAGTTTATTCAGAAAGTGAAGTTTCAACAG				
LN68	(3451)	TTTTGTAGCCGCAGAAGAACAAGTTTATTCAGAAAGTGAAGTTTCAACAG				
QSE32	(3412)	TTTTGTAGCAGCAGAAGAACAAGTTTATTCAGAAAGTGAAGTTTCAACAG				
Section 71						
	(3501)	3501	3510	3520	3530	3540 3550
V583	(3500)	TTTTATCGAAGTTGGAAAAGGAGGCAATTTCTGAGGCAGCTGCTGAACAA				
LN68	(3501)	TTTTATCGAAGTTGGAAAAGGAGGCAATTTCTGAGGCAGCTGCTGAACAA				
QSE32	(3462)	TTTTATCGAAGTTGGAAAAGGAGGCAATTTCTGAGGCAGCTGCTGAACAA				
Section 72						
	(3551)	3551	3560	3570	3580	3590 3600
V583	(3550)	TATACGGTTGTAGATCGAAAAGAAGATGCGTGGGGGATGAAGCATCTTAA				
LN68	(3551)	TATACGGTTGTAGATCGAAAAGAAGACGCGTGGGGGATGAAGCATCTTAA				
QSE32	(3512)	TATACGGTTGTAGATCGAAAAGAAGATGCGTGGGGGATGAAGCATCTTAA				

---

Section 73

	(3601)	3601	3610	3620	3630	3640	3650
V583 (3600)		GTTAGAAAAGCAAACGGAAGGCGTTACTGTTGATTCAGATAAATGTGATTA					
LN68 (3601)		GTTAGAAAAGCAAACGGAAGGCGTTACTGTTGATTCAGATAAATGTGATTA					
QSE32 (3562)		GTTAGAAAAGCAAACGGAAGGCGTTACTGTTGATTCAGATAAATGTGATTA					

---

Section 74

	(3651)	3651	3660	3670	3680	3690	3700
V583 (3650)		TTCATTTAGATAGAAATGGTGCAGTAACAAGTGTTACAGGAAATCCAGTT					
LN68 (3651)		TTCATTTAGATAAAAAACGGTGCAGTAACAAGTGTTACAGGAAATCCAGTT					
QSE32 (3612)		TTCATTTAGATAAAAAACGGTGCAGTAACAAGTGTTACAGGAAATCCAGTT					

---

Section 75

	(3701)	3701	3710	3720	3730	3740	3750
V583 (3700)		GATCAAGTAA GTGAAAATTCAATCGGTTGATGCAATCGGTGAAGAAGGAGT					
LN68 (3701)		GATCAAGTTGTGAAAATTCAATCGGTTGATGCAATCGGTGAAGAAGGAGT					
QSE32 (3662)		GATCAAGTAA GTGAAAATTCAATCGGTTGATGCAATCGGTGAAGAAGGAGT					

---

Section 76

	(3751)	3751	3760	3770	3780	3790	3800
V583 (3750)		TAAAAAAATTATTGCTTCTGATAATCCGGAAACTAAAGATCTTGTCTTTT					
LN68 (3751)		TAAAAAAATTATTGCTTCTGATAATCCGGAAATAAAAGATCTTGTCTTTT					
QSE32 (3712)		TAAAAAAATTATTGCTTCTGATAATCTGGAAATAAAAGATAATTGTCTTTT					

---

Section 77

	(3801)	3801	3810	3820	3830	3840	3850
V583 (3800)		TAGCTATTGACAAACGTGTAATAATGAGGGGCAATTATTTTATAAAGTC					
LN68 (3801)		TAGCTATTGACAAACGTGTAATAATGAAAGGGCAATTATTTTATAAAGTC					
QSE32 (3762)		TAGCTATTGACAAACGTGTAATAATGAAAGGGCAATTATTTTATAAAGTC					

---

Section 78

	(3851)	3851	3860	3870	3880	3890	3900
V583 (3850)		AGAGTAACTTCTTCCGCCAACTGGTGACCCCGTATCATTGGTTTATAAAGT					
LN68 (3851)		AGAGTAACTTCTTCAACCAACTGGTGACCCCGTATCATTGGTTTATAAAGT					
QSE32 (3812)		AGAGTAACTTCTTCAACCAACTGGTGACCCCATATCATTGGTTTATAAAGT					

---

Section 79

	(3901)	3901	3910	3920	3930	3940	3950
V583 (3900)		GAAACGCTACAGATGGAACAATTATGGAAAAACAAGATTTAACGGAACATG					
LN68 (3901)		GAAACGCTACAGATGGAACAATTATGGAAAAACAAGATTTAACGGAACATG					
QSE32 (3862)		AAATGCTACAGATGGAACAATTATGGAAAAACAAGATTTAACGGAACATG					

---

Section 80

	(3951)	3951	3960	3970	3980	3990	4000
V583 (3950)		TCGGTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAGCGTTTAATGTG					
LN68 (3951)		TCGGTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAATGTA					
QSE32 (3912)		TCGGTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAATGTA					

---

---

Section 81

(4001)	4001	4010	4020	4030	4040	4050
V583 (4000)	CCAGTTGAAAAAAGCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAACAC					
LN68 (4001)	CCAGTTGAAAAAAGCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAACAC					
QSE32 (3962)	CCAGTTGAAAAAAGCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAACAC					

---

Section 82

(4051)	4051	4060	4070	4080	4090	4100
V583 (4050)	AGGGGTTTACCATGCAGTAGTTGATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTC					
LN68 (4051)	AGGGGTTTACCATGCAGTAGTTGATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTC					
QSE32 (4012)	AGGGGTTTACCATGCAGTAGTTGATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTC					

---

Section 83

(4101)	4101	4110	4120	4130	4140	4150
V583 (4100)	AAGCA	CCATCACTAG	TAG	CATTAAATCAGAATGCTGTTGA	CGCCTATACG	
LN68 (4101)	AAGCG	CCATCACTAG	CGA	CATTAAATCAGAATGCTGTTGA	CGCCTATACG	
QSE32 (4062)	AAGCA	CCATCACTAG	TAG	CATTAAATCAGAATGCTGTTGA	TGCCTATACG	

---

Section 84

(4151)	4151	4160	4170	4180	4190	4200
V583 (4150)	CATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTTCCAACGACACAG					
LN68 (4151)	CATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTTCCAACGACACAG					
QSE32 (4112)	CATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTTCCAACGACATAG					

---

Section 85

(4201)	4201	4210	4220	4230	4240	4250
V583 (4200)	TATTGATGATCGAGGGATGCCCATCTTGTCAGTTGTTGATGAACAACATC					
LN68 (4201)	TATTGATGATCGAGGGATGCCCATCTTGTCAGTTGTTGATGAACAACATC					
QSE32 (4162)	TATTGATGATCGAGGGATGCCCATCTTGTCAGTTGTTGATGAACAACATC					

---

Section 86

(4251)	4251	4260	4270	4280	4290	4300
V583 (4250)	CAGATGCTTATGACAATGCTTTTTTGGGATGGAAAAGCAATGCGTTATGGT					
LN68 (4251)	CAGATGCTTATGACAATGCTTTTTTGGGATGGAAAAGCAATGCGTTATGGT					
QSE32 (4212)	CAGATGCTTATGACAATGCTTTTTTGGGATGGAAAAGCAATGCGTTATGGT					

---

Section 87

(4301)	4301	4310	4320	4330	4340	4350
V583 (4300)	GAAACAAGTACACCAACAGGAAAAACGTATGCTTCCTCTTTAGATGTAGT					
LN68 (4301)	GAAACAAGTACACCAACAGGAAAAACGTATGCTTCCTCTTTAGATGTAGT					
QSE32 (4262)	GAAACAAGTACACCAACAGGAAAAACGTATGCTTCCTCTTTAGATGTAGT					

---

Section 88

(4351)	4351	4360	4370	4380	4390	4400
V583 (4350)	TGGTCATGAAATGACACATGGTGTAAACGGAACATACTGCCGTTTTAGAAT					
LN68 (4351)	TGGTCATGAAATGACACATGGTGTGACGGAACATACTGCCGTTTTAGAAT					
QSE32 (4312)	TGGTCATGAAATGACACATGGTGTGACGGAACATACTGCCGTTTTAGAAT					

---

Section 89						
	(4401)	4401	4410	4420	4430	4440 4450
V583 (4400)		ATTTAGGACAATCAGGTGCG	TTGAATGAATCTTATTCTGATTTGATGGGT			
LN68 (4401)		ATTTAGGACAATCAGGTGCG	TTGAATGAATCTTATTCTGATTTGATGGGT			
QSE32 (4362)		ATTTAGGACAATCAGGTGCG	TTGAATGAATCTTATTCTGATTTGATGGGT			
Section 90						
	(4451)	4451	4460	4470	4480	4490 4500
V583 (4450)		TATATTATTTTCGGGTGCATCTAATCCAGAAATTGGTGCGGATACTCAGAG				
LN68 (4451)		TATATTATTTTCGGGTGCATCTAATCCAGAAATTGGTGCGGATACTCAGAG				
QSE32 (4412)		TATATTATTTTCGGGTGCATCTAATCCAGAAATTGGTGCGGATACTCAGAG				
Section 91						
	(4501)	4501	4510	4520	4530	4540 4550
V583 (4500)		TGTTGACCGAAAAACAGGTATTCGAAATTTACAAACGCCAAGTAAACACG				
LN68 (4501)		TGTTGACCGAAAAACAGGTATTCGAAATTTACAAACGCCAAGTAAACACG				
QSE32 (4462)		TGTTGACCGAAAAACAGGTATTCGAAATTTACAAACGCCAAGTAAACACG				
Section 92						
	(4551)	4551	4560	4570	4580	4590 4600
V583 (4550)		GACAACCAGAAACCATGGCTCAATACGACGATCGAGCACGGTATAAAGGA				
LN68 (4551)		GACAACCAGAAACCATGGCTCAATACGACGATCGAGCACGGTATAAAGGA				
QSE32 (4512)		GACAACCAGAAACCATGGCTCAATACGACGATCGAGCACGGTATAAAGGA				
Section 93						
	(4601)	4601	4610	4620	4630	4640 4650
V583 (4600)		ACGCCTTATTATGATCAAGGCGGTGTTTCATTATAATAGTGGAATTATTAA				
LN68 (4601)		ACGCCTTATTATGATCAAGGCGGTGTTTCATTATAATAGTGGAATTATTAA				
QSE32 (4562)		ACGCCTTATTATGATCAAGGCGGTGTTTCATTATAATAGTGGAATTATTAA				
Section 94						
	(4651)	4651	4660	4670	4680	4690 4700
V583 (4650)		TCGGATTGGTTACACCATTATCCAGAACTTAGGCATTGAAAAAGCACAGA				
LN68 (4651)		TCGGATTGGTTACACCATTATCCAGAACTTAGGCATTGAAAAAGCACAGA				
QSE32 (4612)		TCGGATTGGTTACACCATTATCCAGAACTTAGGCATTGAAAAAGCACAGA				
Section 95						
	(4701)	4701	4710	4720	4730	4740 4750
V583 (4700)		CTATTTTCTACAGCTCGTTAGTAAATTACTTAAACACCTAAAGCACAAATTC				
LN68 (4701)		CTATTTTCTACAGCTCGTTAGTAAATTACTTAAACACCTAAAGCACAAATTC				
QSE32 (4662)		CTATTTTCTACAGCTCGTTAGTAAATTACTTAAACACCTAAAGCACAAATTC				
Section 96						
	(4751)	4751	4760	4770	4780	4790 4800
V583 (4750)		AGTGATGCTCGTGATGCGATGCTTGCTGCTGCAAAAGTTCAATATGGCGA				
LN68 (4751)		AGTGATGCTCGTGATGCGATGCTTGCTGCTGCAAAAGTTCAATATGGCGA				
QSE32 (4712)		AGTGATGCTCGTGATGCGATGCTTGCTGCTGCAAAAGTTCAATATGGCGA				

Section 97							
	(4801)	4801	4810	4820	4830	4840	4850
V583 (4800)		TGAAGCAGCTTCAGTGGT	A	TCAGCAGCCTTTAACTCTGCTGGAATCGGAG			
LN68 (4801)		TGAAGCAGCTTCAGTGGT	G	TCAGCAGCCTTTAACTCTGCTGGAATCGGAG			
QSE32 (4762)		TGAAGCAGCTTCAGTGGT	G	TCAGCAGCCTTTAACTCTGCTGGAATCGGAG			
Section 98							
	(4851)	4851	4860	4870	4880	4890	4900
V583 (4850)		CTAAAGAGGACATTCA	G	GTAAACCAACCAAGTGAATCTGTTCTG			GTCAAT
LN68 (4851)		CTAAAGAGGATATTCA	A	GTAAACCAACCAAGTGAATCTGTTCTG			GTCAAT
QSE32 (4812)		CTAAAGAAGACATTCA	G	GTAAACCAACCAAGTGAATCTGTTCTA			GTCAAT
Section 99							
	(4901)	4901	4910	4920	4930	4940	4950
V583 (4900)		GAATG	AAAAAAATTCCCCAATTAAATAAAAAATGGATAAGGAGTGGCATAA				
LN68 (4901)		GAATG	AAAAAAATTCCCCAATTAAATAAAAAATGGATAAGGAGTGGCATAA				
QSE32 (4862)		GAAT-	AAAAAAATTCCCCAATTAAATAAAAAATGGATAAGGAGTGGCATAA				
Section 100							
	(4951)	4951	4960	4970	4980	4990	5000
V583 (4950)		TCTTATGAAAAAGTTCTCCATACGAAAAATTAGTGCTGGTTTTTTGTTTC					
LN68 (4951)		TCTTATGAAAAAGTTCTCCATACGAAAAATTAGTGCTGGTTTTTTGTTTC					
QSE32 (4911)		TCTTATGAAAAAGTTCTCCATACGAAAAATTAGTGCTGGTTTTTTGTTTC					
Section 101							
	(5001)	5001	5010	5020	5030	5040	5050
V583 (5000)		TGATTTTAGTAACTTTGAT	C	GCCGGTTTTAGCTTGTCTGCAAATGCAGAA			
LN68 (5001)		TGATTTTAGTAACTTTGAT	C	GCCGGTTTTAGCTTGTCTGCAAATGCAGAA			
QSE32 (4961)		TGATTTTAGTAACTTTGAT	A	GCCGGTTTTAGCTTGTCTGCAAATGCAGAA			
Section 102							
	(5051)	5051	5060	5070	5080	5090	5100
V583 (5050)		GAGTATATCGTTCCTGCCGAAAGTCATTCACGACAAAAAAGATCGTTACT					
LN68 (5051)		GAGTATATCGTTCCTGCCGAAAGTCATTCACGACAAAAAAGATCGTTACT					
QSE32 (5011)		GAGTATATCGTTCCTGCCGAAAGTCATTCACGACAAAAAAGATCGTTACT					
Section 103							
	(5101)	5101	5110	5120	5130	5140	5150
V583 (5100)		GGACCCTGAG	G	GACAGAAGACAAGAAGTGGCAGATACAACCGAAGCGCCTT			
LN68 (5101)		GGACCCTGAA	G	GACAGAAGACAAGAAGTGGCAGATACAACCGAAGCGCCTT			
QSE32 (5061)		GGACCCTGAG	G	GACAGAAGACAAGAAGTGGCAGATACAACCGAAGCGCCTT			
Section 104							
	(5151)	5151	5160	5170	5180	5190	5200
V583 (5150)		TTGCGTCAATCGGAAGAATCATTTCCCCTGCCAGTAAACCAGGCTATATT					
LN68 (5151)		TTGCGTCAATCGGAAGAATCATTTCCCCTGCCAGTAAACCAGGCTATATT					
QSE32 (5111)		TTGCGTCAATCGGAAGAATCATTTCCCCTGCCAGTAAACCAGGCTATATT					

Section 105						
(5201)	5201	5210	5220	5230	5240	5250
V583 (5200)	TCTTTAGGAACAGGCTTTGTTGTTGGAAC	C	CAATACAATTGTCACCAATAA			
LN68 (5201)	TCTTTAGGAACAGGCTTTGTTGTTGGAAC	T	TAATACAATTGTCACCAATAA			
QSE32 (5161)	TCTTTAGGAACAGGCTTTGTTGTTGGAAC	T	TAATACAATTGTCACCAATAA			
Section 106						
(5251)	5251	5260	5270	5280	5290	5300
V583 (5250)	TCATGTGGCTGAAAGTTTTAAGAATGCCAAAGTATTA	A	ATCCGAATGCCA			
LN68 (5251)	TCATGTGGCTGAAAGTTTTAAGAATGCCAAAGTATTA	A	ATCCGAATGCCA			
QSE32 (5211)	TCATGTGGCTGAAAGTTTTAAGAATGCCAAAGTATTA	A	ATCCGAATGCCA			
Section 107						
(5301)	5301	5310	5320	5330	5340	5350
V583 (5300)	AAGATGATGCTTGGTTTTATCCAGGTCGAGATGGCAGTGC	G	ACCATTT			
LN68 (5301)	AAGATGATGCTTGGTTTTATCCAGGTCGAGATGGCAGTGC	G	ACCATTT			
QSE32 (5261)	AAGATGATGCTTGGTTTTATCCAGGTCGAGATGGCAGTGC	G	ATACCATTT			
Section 108						
(5351)	5351	5360	5370	5380	5390	5400
V583 (5350)	GGCAAATTCAAAGTGATTGATGTAGCTTTTTTCCCCGAATGC	G	CGGATATTGC			
LN68 (5351)	GGTAAATTCAAAGTGATTGATGTAGCTTTTTTCCCCGAATGC	G	CGGATATTGC			
QSE32 (5311)	GGCAAATTCAAAGTGATTGATGTAGCTTTTTTCCCCGAATGC	G	CGGATATTGC			
Section 109						
(5401)	5401	5410	5420	5430	5440	5450
V583 (5400)	GGTAGTGACTGTCC	G	GCAAACAAAACGATCGTCCAGATGGCCCAGAGTTGG			
LN68 (5401)	GGTAGTGACTGTCC	A	GCAAACAAAACGATCGTCCAGATGGCCCAGAGTTGG			
QSE32 (5361)	GGTAGTGACTGTCC	G	GCAAACAAAACGATCGTCCAGATGGCCCAGAGTTGG			
Section 110						
(5451)	5451	5460	5470	5480	5490	5500
V583 (5450)	GAGAAATTTTAACGCCATTTGTTTTGAAAAAGTTTGAATCTTC	A	CAGATACC			
LN68 (5451)	GAGAAATTTTAACGCCATTTGTTTTGAAAAAGTTTGAATCTTC	A	CAGATACC			
QSE32 (5411)	GAGAAATTTTAACGCCATTTGTTTTGAAAAAGTTTGAATCTTC	A	CAGATACC			
Section 111						
(5501)	5501	5510	5520	5530	5540	5550
V583 (5500)	CATGTCACAATATCAGGCTATCCAGGTGAGAAAAACACACACA	A	ATGGTC			
LN68 (5501)	CATGTCACAATATCAGGCTATCCAGGTGAGAAAAACACACACA	A	ATGGTC			
QSE32 (5461)	CATGTCACAATATCAGGCTATCCAGGTGAGAAAAACACACACA	A	ATGGTC			
Section 112						
(5551)	5551	5560	5570	5580	5590	5600
V583 (5550)	TCATGAAAATGATTTGTTTACATCTAACTTTACAGACTTAGAAA	A	ATCCAT			
LN68 (5551)	TCATGAAAATGATTTGTTTACATCTAACTTTACAGACTTAGAAA	A	ATCCAT			
QSE32 (5511)	TCATGAAAATGATTTGTTTACATCTAACTTTACAGACTTAGAAA	A	ATCCAT			

Section 113						
(5601)	5601	5610	5620	5630	5640	5650
V583 (5600)	TACTATTTTATGATATCGATACAACC	GGG	CGGTCAATCTGGTTC	ACCAATC		
LN68 (5601)	TACTATTTTATGATATCGATACAACA	AGGT	GGTCAATCTGGTTC	CCCAATC		
QSE32 (5561)	TACTATTTTATGATATCGATACAACA	AGGT	GGTCAATCTGGTTC	ACCAATC		
Section 114						
(5651)	5651	5660	5670	5680	5690	5700
V583 (5650)	TATAATGATCAGGTTGAAGTAGTTGGTGTTCATTCCAATGGC	GGCATTAA				
LN68 (5651)	TATAATGCTCAGTTTGAAGTAGTTGGTGTTCATTCCAATGGC	GGCATTAA				
QSE32 (5611)	TATAATGCTCAGTTTGAAGTAGTTGGTGTTCATTCCAATGGC	GGCATTAA				
Section 115						
(5701)	5701	5710	5720	5730	5740	5750
V583 (5700)	GCAAACAGGAAATCATGGTCAAAGACTAAATGAAGTGAATTATAACTTTA					
LN68 (5701)	GCAAACAGGAAACCATGGTCAAAGACTAAATGAAGTGAATTATAACTTTA					
QSE32 (5661)	GCAAACAGGAAACCATGGTCAAAGACTAAATGAAGTGAATTATAACTTTA					
Section 116						
(5751)	5751	5760	5770	5780	5790	5800
V583 (5750)	TTGTTAATCGAGTGAATGAAGAAGAAAATAAACGTTTATCCGCTGTGCCA					
LN68 (5751)	TTGTCAATCGAGTGAATGAAGAAGAAAATAAACGTTTATCCGCTGTGCCA					
QSE32 (5711)	TTGTCAATCGAGTGAATGAAGAAGAAAATAAACGTTTATCCGCTGTGCCA					
Section 117						
(5801)	5801	5810	5820	5830	5840	5850
V583 (5800)	GCAGCGTAAAGAACCATAAAAATACTCGGAATTTCCAGAATCACGGGAAA					
LN68 (5801)	GCAGCGTAAAGAACCATAAAAATACTCGGAATTTCCAGAATCACGGGAAA					
QSE32 (5761)	GCAGCGTAAAGAACCATAAAAATACTCGGAATTTCCAGAATCACGGGAAA					
Section 118						
(5851)	5851	5860	5870	5880	5890	5900
V583 (5850)	TCTCGAGTATTTTTGTTTTTTAAGATAGTGTAAGTTACGATAAAAAGTACC					
LN68 (5851)	TCTCGAGTATTTTTGTTTTTTAAGATAGTGTAAGTTACGATAAAAAGTACC					
QSE32 (5811)	TTTTCGAGTATTTTTGTTTTTTAAGATAGTGTAAGTTACGATAAAAAGTACC					
Section 119						
(5901)	5901	5910	5920	5930	5940	5950
V583 (5900)	TTGTAATTATCGGTTAAAAGCATATAAATAGTGCTGAAAAGAAGGCAAATA					
LN68 (5901)	TTGTAATTATCGGTTAAAAGCATATAAATAGTGCTGAAAAGAAGGCAAATA					
QSE32 (5861)	TTGTAATTATCGGTTAAAAGCATATAAATAGTGCTGAAAAGAAGGCAAATA					
Section 120						
(5951)	5951	5960	5970	5980	5990	6000
V583 (5950)	ATCCGATTAAGTTAGTATTTCTAAACCATCATAACTCGTAATGATTTTCAT					
LN68 (5951)	ATCCGATTAAGTTAGTATTTCTAAACCATCATAACTCGTAATGATTTTCAT					
QSE32 (5911)	ATCCGATTAAGTTAGTATTTCTAAACCATCATAACTCGTAATGATTTTCAT					

---

Section 121

	(6001)	6001	6010	6020	6030	6040	6050
V583 (6000)		GCTTTT	GAGATAAA	GCCG	CATCTCCG	CATAA	GACAAGCCGCCATTGTGA
LN68 (6001)		GCTTTT	GAGATAAA	GCCG	CATCTCCG	CATA	TGACAAGCCGCCATTGTGA
QSE32 (5961)		GCTTTT	GAGATAAA	GCCG	CATCTCCG	TATAA	GACAAGCCGCCATTGTGA

---

Section 122

	(6051)	6051	6060	6070	6080	6090	6100
V583 (6050)		GAAAAATGGTTGGCAACG	TAAATCGTTTTATCTGTGACGAGTTTTCTTTC				
LN68 (6051)		GAAAAATGGTTGGCAACG	TAAATCGTTTTATCTGTGACGAGTTTTCTTTC				
QSE32 (6011)		GAAAAATGGTTGGCAACG	TAAATCGTTTTATCTGTGACGAGTTTTCTT				--

---

Section 123

	(6101)	6101	6106
V583 (6100)		TTTTAA	
LN68 (6101)		TTTTAA	
QSE32 (6059)		-----	

**Anexo 2. Alinhamento de proteínas.** Alinhamento das proteínas dos operões *fsr* e *gelE-sprE* das estirpes *E. faecalis* LN68 e *E. faecium* QSE32 com a estirpe controlo *E. faecalis* V583.

Anexo 2.1 Proteínas FsrA, Regulador.

Anexo 2.2 Proteínas FsrB (incluindo a FsrD), “Accessory gene regulator B”.

Anexo 2.3 Proteínas FsrC, Histidina Cinase.

Anexo 2.4 Proteínas Gelatinase.

Anexo 2.5 Proteínas Protease sérica.

		Section 1																																																	
		1	10	20	30	40	50																																												
FsrA V583	(1)	M	S	E	Q	M	A	I	Y	I	L	E	D	Q	I	I	Q	A	K	A	L	E	V	L	L	T	N	I	L	H	S	R	N	I	Y	N	E	T	I	H	L	F	S	R	S	D	E	L	L	Q	V
FsrA QSE32	(1)	M	S	E	Q	M	A	I	Y	I	L	E	D	Q	I	I	Q	A	K	A	L	E	A	L	L	T	N	I	L	H	S	R	N	I	Y	N	E	T	I	H	L	F	S	R	S	D	E	L	L	Q	V
FsrA LN68	(1)	M	S	E	Q	M	A	I	Y	I	L	E	D	Q	I	I	Q	A	K	A	L	E	A	L	L	T	N	I	L	H	S	R	N	I	Y	N	E	T	I	H	L	F	S	R	S	D	E	L	L	Q	V
		Section 2																																																	
		51	60	70	80	90	100																																												
FsrA V583	(51)	A	H	Q	D	A	Q	L	N	I	F	F	L	D	I	Q	M	N	N	H	I	Q	A	G	F	E	V	A	K	E	I	R	K	T	D	S	E	S	L	I	V	F	I	S	T	H	T	E	L	V	L
FsrA QSE32	(51)	A	H	Q	D	A	Q	L	N	I	F	F	L	D	I	Q	M	N	N	H	I	Q	A	G	F	E	V	A	K	E	I	R	K	T	D	S	E	S	L	I	V	F	I	S	T	H	T	E	L	V	L
FsrA LN68	(51)	A	H	Q	D	A	Q	L	N	I	F	F	L	D	I	Q	M	N	N	H	I	Q	A	G	F	E	V	A	K	E	I	R	K	T	D	S	E	S	L	I	V	F	I	S	T	H	T	E	L	V	L
		Section 3																																																	
		101	110	120	130	140	150																																												
FsrA V583	(101)	T	S	Y	K	Y	M	V	S	A	L	Q	F	I	Q	K	N	V	D	F	L	D	F	Q	K	E	V	E	T	C	V	D	A	Y	I	Q	Q	K	E	N	I	K	T	K	S	E	Y	I	I	I	N
FsrA QSE32	(101)	T	S	Y	K	Y	M	V	S	A	L	Q	F	I	Q	K	N	V	D	F	L	D	F	Q	K	E	V	E	T	C	V	D	A	Y	I	Q	Q	K	E	N	I	K	T	K	S	E	Y	I	I	I	N
FsrA LN68	(101)	T	S	Y	K	Y	M	V	S	A	L	Q	F	I	Q	K	N	V	D	F	L	D	F	Q	K	E	V	E	T	C	V	D	A	Y	I	Q	Q	K	E	N	I	K	T	K	S	E	Y	I	I	I	N
		Section 4																																																	
		151	160	170	180	190	200																																												
FsrA V583	(151)	L	K	A	S	S	I	K	M	D	I	N	D	I	Y	F	F	Q	T	E	Y	D	H	R	V	S	M	V	G	K	N	F	K	R	E	F	Y	G	T	L	S	K	I	E	Q	L	H	P	D	L	I
FsrA QSE32	(151)	L	K	A	S	S	I	K	M	D	I	N	D	I	Y	F	F	Q	T	E	Y	D	H	R	V	S	M	V	G	K	N	F	K	R	E	F	Y	G	T	L	S	K	I	E	Q	L	H	P	D	L	I
FsrA LN68	(151)	L	K	A	S	S	I	K	M	D	I	N	D	I	Y	F	F	Q	T	E	Y	D	H	R	V	S	M	V	G	K	N	F	K	R	E	F	Y	G	T	L	S	K	I	E	Q	L	H	P	D	L	I
		Section 5																																																	
		201	210	220	230	248																																													
FsrA V583	(201)	R	V	H	Q	S	I	I	I	N	K	K	Y	A	S	K	L	N	Y	K	T	H	L	L	T	M	R	D	G	T	E	V	P	V	S	R	R	Y	Y	T	Q	V	K	A	L	F	L	T	-		
FsrA QSE32	(201)	R	V	H	Q	S	I	I	I	N	K	K	Y	A	S	K	L	N	Y	K	T	H	L	L	T	M	R	D	G	T	E	V	P	V	S	K	R	Y	Y	T	Q	V	K	A	L	F	L	T	-		
FsrA LN68	(201)	R	V	H	Q	S	I	I	I	N	K	K	Y	A	S	K	L	N	Y	K	T	H	L	L	T	M	R	D	G	T	E	V	P	V	S	K	R	Y	Y	T	Q	V	K	A	L	F	L	T	-		

		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	40	50
FsrB V583	(1)	MLIDWILKNIMD	MDQEDQSGKTQWTKYYLTVYFSGLFN	LLMILILSVLFG			
FsrB Ln68	(1)	MLIDWILKNIMD	IDQEDQSGKTQWTKYYLTVYFSGLFN	FLMILILSVLFG			
FsrB QSE32	(1)	MLIDWILKNIMD	MDQEDQSGKTQWTKYYLTVYFSGLFN	FLMILILSVLFG			
		Section 2					
	(51)	51	60	70	80	90	100
FsrB V583	(51)	TLSETFIVYVVLIFLRPVAGGWHAKTKWLCRLESIVIYVAIPFVLKNSSV					
FsrB Ln68	(51)	TLSETFIVYVVLIFLRPVAGGWHAKTKWLCRLESIVIYVAIPFVLKNSSV					
FsrB QSE32	(51)	TLSETFIVYVVLIFLRPVAGGWHAKTKWLCRLESIVIYVAIPFVLKNSSV					
		Section 3					
	(101)	101	110	120	130	140	150
FsrB V583	(101)	SLPFIYKILLM	CLLVVLFYWYAPQ	GTAIEPVQP	SDLNVLKKQ	SLIRVCLL	
FsrB Ln68	(101)	SLPFIYKILLI	CLLVVLFYWYAPQ	GTAIEPVQP	SDLNVLKKQ	SLIRVCLL	
FsrB QSE32	(101)	SLPFIYKILLI	CLLVVLFYWYAPH	GTAIEPVQP	SDLNVLKKQ	SLIRVCLL	
		Section 4					
	(151)	151	160	170	180	190	200
FsrB V583	(151)	ILCSLFVKEKIASVILYGLV	IQGLMILPVTKNLIEGSVFMK	FGKKI	IKNV		
FsrB Ln68	(151)	ILCSLFVKEKIASVILYGLV	IQGLMILPVTKNLIEGSVFMK	FGKKI	IKNV		
FsrB QSE32	(151)	ILCSLFVKEKIASVILYGLV	VQGLMILPVTKNLIEGSVFM	TFGTKI	IKNV		
		Section 5					
	(201)	201	210	220	230	243	
FsrB V583	(201)	IEKRVAKVSD	DGVGTKPRLNQNSP	NI	FGQWMGQTEKPKK	NIK-	
FsrB Ln68	(201)	IEKRVAKVSD	DGVGTKPRLNQNSP	NI	FGQWMGQTEKPKK	NIK-	
FsrB QSE32	(201)	IEKRVAKVR	DGVGTKPRLNQNSP	I	FGQWMGQTEKPKK	NIK-	

		Section 1					
		1	10	20	30	40	50
FsrC V583	(1)	MILSLLATNVLLVSSFIVFVFLRVTLIKIECKIPLLSLLIVINLCSFAAL					
FsrC Ln68	(1)	MILSLLATNVLLVSSFIVFVFLRVTLIKIECKIPLLSLLIVINLCSFAAL					
FsrC QSE32	(1)	MILSLLATNVLLVSSFIVFVFLRVTLIKIECKIPLLSLLIVINLCSFAAL					
		Section 2					
		51	60	70	80	90	100
FsrC V583	(51)	MLGYSWLIYALTVVVIFTGFLLIHKKRFSIFKAIFLSVFTLLMVSFINYTE					
FsrC Ln68	(51)	MLGCSWLIYALTVVVIFTGFLLIHKKRFSIFKAIFLSVFTLLMVSFINYTE					
FsrC QSE32	(51)	MLGYSWLIYALTVVVFTGFLLIHKKRFSIFKAIFLSVFTLLMVSFINYTE					
		Section 3					
		101	110	120	130	140	150
FsrC V583	(101)	QTILSVFFQQIYQNKLLWIASNVLLLLINIWIWIALKIPNSVFLRLNRVLEN					
FsrC Ln68	(101)	QTILSVFFQQIYQNKLLWIASNVILLLLINIWIWIALKIPNSVFLRLNRVLEN					
FsrC QSE32	(101)	QTILSVFFQQIYQNKLLWIASNVLLLLINIWIWIALKIPNSVFLRLNRVLEN					
		Section 4					
		151	160	170	180	190	200
FsrC V583	(151)	SRIFFGCLLLLLILLLLFVFLISPEISPDFMRGFVTVNSSKLELLISVGL					
FsrC Ln68	(151)	SRIFFGCLLLLLILLLLFVFLISPEISPDFMRGFVTVNSSKLELLISVGL					
FsrC QSE32	(151)	SRIFFGCLLLLLILLLLFVFLISPEISPDFMRGFVTVNSSKLELLISVGL					
		Section 5					
		201	210	220	230	240	250
FsrC V583	(201)	FLILIGLVIEAYLEEQRINTQLLNNLTIYTEKIESINEELAMFRHDYKNL					
FsrC Ln68	(201)	FLILIGLVIEAYLEEQRINTQLLNNLTIYTEKIESINEELAMFRHDYKNL					
FsrC QSE32	(201)	FLILIGLVIEAYLEEQRINTQLLNNLTIYTEKIESINEELAMFRHDYKNL					
		Section 6					
		251	260	270	280	290	300
FsrC V583	(251)	LYSLQIAISYEDILEIKRIYEETIAPTKKIIDNEEFELMKNLRLKNMELK					
FsrC Ln68	(251)	LNSLQIAISYEDILEIKRIYEETIAPTKKIIDNEEFELMKNLRLKNMELK					
FsrC QSE32	(251)	LYSLQIAISYEDILEIKRIYEETIAPTKKIIDNEEFELMKNLRLKNMELK					
		Section 7					
		301	310	320	330	340	350
FsrC V583	(301)	ALISMKINTAKQAKLKVIVDVPEVFILDTSIDLVVVIRLLAILLDNAIEN					
FsrC Ln68	(301)	ALISMKINTAKQAKLKVIVDVPEVFILDTSIDLVVVIRLLAILLDNAIEN					
FsrC QSE32	(301)	ALISMKINTAKQAKLKVIVDVPEVFILDTSIDLVVVIRLLAILLDNAIEN					
		Section 8					
		351	360	370	380	390	400
FsrC V583	(351)	SAKSELKMFASIFNKNETQEFVITNSVQAEFDFKVMKKTkFSSKSNPEE					
FsrC Ln68	(351)	SAKSELKMFASIFNKNETQEFVITNSVQAEFDFRVMKKTkFSSKSNPEE					
FsrC QSE32	(351)	SAKSELKMFASIFNKNETQEFVITNSVQAEFDFKVMKKTkFSSKSNPEE					

---

	(401)	401	410	420	430	447
FsrC V583	(401)	HGW	GLLYVKEIVDFSDQFDLQTSFNEG	AVTQHLLIEKNHNSKKVVNE		
FsrC Ln68	(401)	HG-	GLLYVKEIVDFSDQFDLQTSFNEG	SVTQHLLIEKNHNSKKVVNE		
FsrC QSE32	(401)	HGW	GLLYVKEIVDFSDQFDLQTSFNEG	AVTQHLLIEKNHNSKKVVNE		

		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	40	50
GeE V583	(1)	MKGNKILYILGTGIFVGS SCLFSSLFVAAEEQVYSESEVSTVLSKLEKEA					
GeE Ln68	(1)	MKGNKILYILGTGIFVGS SCLFSSLFVAAEEQVYSESEVSTVLSKLEKEA					
GeE QSE32	(1)	MKGNKILYILGTGIFVGS SCLFSSLFVAAEEQVYSESEVSTVLSKLEKEA					
		Section 2					
	(51)	51	60	70	80	90	100
GeE V583	(51)	ISEAAA EQYTVVDRKEDAWGMKHLKLEKQTEGVTVDSDNVI IHLDRNGAV					
GeE Ln68	(51)	ISEAAA EQYTVVDRKEDAWGMKHLKLEKQTEGVTVDSDNVI IHLDRNGAV					
GeE QSE32	(51)	ISEAAA EQYTVVDRKEDAWGMKHLKLEKQTEGVTVDSDNVI IHLDRNGAV					
		Section 3					
	(101)	101	110	120	130	140	150
GeE V583	(101)	TSVTGNPVDQVVKIQSVDAIGEEGVKKIIASDNPE TKDLVFLAIDKRVNN					
GeE Ln68	(101)	TSVTGNPVDQVVKIQSVDAIGEEGVKKIIASDNPE NKDLVFLAIDKRVNN					
GeE QSE32	(101)	TSVTGNPVDQVVKIQSVDAIGEEGVKKIIASDNLE NKDLVFLAIDKRVNN					
		Section 4					
	(151)	151	160	170	180	190	200
GeE V583	(151)	EGQLFYKVRVTSSPTGDPVSLVYKVNATDGTIMEKQDLTEHVGSEVTLKN					
GeE Ln68	(151)	EGQLFYKVRVTSSPTGDPVSLVYKVNATDGTIMEKQDLTEHVGSEVTLKN					
GeE QSE32	(151)	EGQLFYKVRVTSSPTGDPISLVYKVNATDGTIMEKQDLTEHVGSEVTLKN					
		Section 5					
	(201)	201	210	220	230	240	250
GeE V583	(201)	SFQVA FNV PVEKSNTGIALHGTDNTGVYHAVVDGKNNYSIIQAPSLVALN					
GeE Ln68	(201)	SFQVTFNV PVEKSNTGIALHGTDNTGVYHAVVDGKNNYSIIQAPSLATLN					
GeE QSE32	(201)	SFQVTFNV PVEKSNTGIALHGTDNTGVYHAVVDGKNNYSIIQAPSLVALN					
		Section 6					
	(251)	251	260	270	280	290	300
GeE V583	(251)	QNAVDAYTHGKFVKTYIEDHFQRHSIDDRGMPILSVVDEQHPDAYDNAFW					
GeE Ln68	(251)	QNAVDAYTHGKFVKTYIEDHFQRHSIDDRGMPILSVVDEQHPDAYDNAFW					
GeE QSE32	(251)	QNAVDAYTHGKFVKTYIEDHFQRHSIDDRGMPILSVVDEQHPDAYDNAFW					
		Section 7					
	(301)	301	310	320	330	340	350
GeE V583	(301)	DGKAMRYGETSTPTGKTYASSLDVVGHEMTHGVTEHTAGLEYLGQSGALN					
GeE Ln68	(301)	DGKAMRYGETSTPTGKTYASSLDVVGHEMTHGVTEHTAGLEYLGQSGALN					
GeE QSE32	(301)	DGKAMRYGETSTPTGKTYASSLDVVGHEMTHGVTEHTAGLEYLGQSGALN					
		Section 8					
	(351)	351	360	370	380	390	400
GeE V583	(351)	ESYSDLMGYIIISGASNPEIGADTQSVDRKTGIRNLQTPSKHGQPETMAQY					
GeE Ln68	(351)	ESYSDLMGYIIISGASNPEIGADTQSVDRKTGIRNLQTPSKHGQPETMAQY					
GeE QSE32	(351)	ESYSDLMGYIIISGASNPEIGADTQSVDRKTGIRNLQTPSKHGQPETMAQY					

---

Section 9

(401)	401	410	420	430	440	450
GeE V583 (401)	DDRARYKGTPYYDQGGVHYNSGI INRIGYTI IQNLGIEKAQTIFYSSLVN					
GeE Ln68 (401)	DDRARYKGTPYYDQGGVHYNSGI INRIGYTI IQNLGIEKAQTIFYSSLVN					
GeE QSE32 (401)	DDRARYKGTPYYDQGGVHYNSGI INRIGYTI IQNLGIEKAQTIFYSSLVN					

---

Section 10

(451)	451	460	470	480	490	500
GeE V583 (451)	YLTPKAQFSDARDAMLAAAKVQYGDEAASVVSAAFNSAGIGAKEDIQVNQ					
GeE Ln68 (451)	YLTPKAQFSDARDAMLAAAKVQYGDEAASVVSAAFNSAGIGAKEDIQVNQ					
GeE QSE32 (451)	YLTPKAQFSDARDAMLAAAKVQYGDEAASVVSAAFNSAGIGAKEDIQVNQ					

---

Section 11

(501)	501	510
GeE V583 (501)	PSESVLVNE-	
GeE Ln68 (501)	PSESVLVNE-	
GeE QSE32 (501)	PSESVLVNE-	

						Section 1	
	(1)	1	10	20	30	40	50
SprE V583	(1)	MKKFSIRKISAGFLFLILVTLIAGFSLSANAEYYIVPAESHRSRQKRSLLD					
SprE Ln68	(1)	MKKFSIRKISAGFLFLILVTLIAGFSLSANAEYYIVPAESHRSRQKRSLLD					
SprE QSE32	(1)	MKKFSIRKISAGFLFLILVTLIAGFSLSANAEYYIVPAESHRSRQKRSLLD					
						Section 2	
	(51)	51	60	70	80	90	100
SprE V583	(51)	PEDRRQEVADTTEAPFASIGRIISPASKPGYISLGTGFVVGTNTIVTNNH					
SprE Ln68	(51)	PEDRRQEVADTTEAPFASIGRIISPASKPGYISLGTGFVVGTNTIVTNNH					
SprE QSE32	(51)	PEDRRQEVADTTEAPFASIGRIISPASKPGYISLGTGFVVGTNTIVTNNH					
						Section 3	
	(101)	101	110	120	130	140	150
SprE V583	(101)	VAESFKNAKVLNPNNAKDDAWFYPPGRDGSATIPFGKFKVIDVAFSPNADIIV					
SprE Ln68	(101)	VAESFKNAKVLNPNNAKDDAWFYPPGRDGSATIPFGKFKVIDVAFSPNADIIV					
SprE QSE32	(101)	VAESFKNAKVLNPNNAKDDAWFYPPGRDGSATIPFGKFKVIDVAFSPNADIIV					
						Section 4	
	(151)	151	160	170	180	190	200
SprE V583	(151)	VTVGGKQNDRPDGPPELGEILTPFVLKKFESSDTHVTISGYPGGEKNHTQWSH					
SprE Ln68	(151)	VTVSKQNDRPDGPPELGEILTPFVLKKFESSDTHVTISGYPGGEKNHTQWSH					
SprE QSE32	(151)	VTVGGKQNDRPDGPPELGEILTPFVLKKFESSDTHVTISGYPGGEKNHTQWSH					
						Section 5	
	(201)	201	210	220	230	240	250
SprE V583	(201)	ENDLFTSNFTDLENPLLFDIDTTGGQSGSPIYNDQVEVVGVHSNGGIKQ					
SprE Ln68	(201)	ENDLFTSNFTDLENPLLFDIDTTGGQSGSPIYNAQFEVVGVHSNGGIKQ					
SprE QSE32	(201)	ENDLFTSNFTDLENPLLFDIDTTGGQSGSPIYNAQFEVVGVHSNGGIKQ					
						Section 6	
	(251)	251	260	270	285		
SprE V583	(251)	TGNHGQRLNEVNYNFIVNVRVNEEENKRLSAVPAA-					
SprE Ln68	(251)	TGNHGQRLNEVNYNFIVNVRVNEEENKRLSAVPAA-					
SprE QSE32	(251)	TGNHGQRLNEVNYNFIVNVRVNEEENKRLSAVPAA-					

**Anexo 3. Análise da mutação encontrada no gene *fsrC* na estirpe *E. faecalis* LN68 nas estirpes *E. faecalis* LN66, *E. durans* QN8, *E. durans* QSE125 e *E. faecalis* QSE15.**

---

Section 21

	(921)	921	930	940	950	968
fsrC V583	(921)	TAATACCGCAAAGCAAGCAAAACTAAAAGTGATTGTTGATGTGCCA				
fsrC QSE32	(921)	TAATACCGCAAAGCAAGCAAAACTAAAAGTGATTGTTGATGTGCCA				
fsrC LN68	(921)	TAATACCGCAAAGCAAGCAAAACTAAAAGTGATTGTTGATGTGCCA				
<i>E. durans</i> QSE125	(61)	TAATACCGCAAAGCAAGCAAAACTAAAAGTGATTGTTGATGTGCCA				
<i>E. durans</i> QN8	(61)	TAATACCGCAAAGCAAGCAAAACTAAAAGTGATTGTTGATGTGCCA				
<i>E. faecalis</i> LN66	(61)	TAATACCGCAAAGCAAGCAAAACTAAAAGTGATTGTTGATGTGCCA				
<i>E. faecalis</i> QSE15	(48)	TAATACCGCAAAGCAAGCAAAACTAAAAGTGATTGTTGATGTGCCA				

---

Section 22

	(967)	967	980	990	1000	1012
fsrC V583	(967)	GAAGTATTTATTCTTGATACATCAATCGACTTAGTGGTTGTGATTC				
fsrC QSE32	(967)	GAAGTATTTATTCTCGATACATCAATCGACTTAGTGGTTGTGATTC				
fsrC LN68	(967)	GAAGTATTTATTCTCGATACATCAATCGACTTAGTGGTTGTGATTC				
<i>E. durans</i> QSE125	(107)	GAAGTATTTATTCTCGATACATCAATCGACTTAGTGGTTGTGATTC				
<i>E. durans</i> QN8	(107)	GAAGTATTTATTCTCGATACATCAATCGACTTAGTGGTTGTGATTC				
<i>E. faecalis</i> LN66	(107)	GAAGTATTTATTCTCGATACATCAATCGACTTAGTGGTTGTGATTC				
<i>E. faecalis</i> QSE15	(94)	GAAGTATTTATTCTCGATACATCAATCGACTTAGTGGTTGTGATTC				

---

Section 23

	(1013)	1013	1020	1030	1040	1058
fsrC V583	(1013)	GTTTGTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGCAAA				
fsrC QSE32	(1013)	GTTTGTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGCAAA				
fsrC LN68	(1013)	GTTTGTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGCAAA				
<i>E. durans</i> QSE125	(153)	GTTTGTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGCAAA				
<i>E. durans</i> QN8	(153)	GTTTGTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGCAAA				
<i>E. faecalis</i> LN66	(153)	GTTTGTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGCAAA				
<i>E. faecalis</i> QSE15	(140)	GTTTGTGGCTATTCTATTAGATAACGCGATTGAAAACAGTGCAAA				

---

Section 24

	(1059)	1059	1070	1080	1090	1104
fsrC V583	(1059)	ATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAATGAA				
fsrC QSE32	(1059)	ATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAATGAA				
fsrC LN68	(1059)	ATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAATGAA				
<i>E. durans</i> QSE125	(199)	ATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAATGAA				
<i>E. durans</i> QN8	(199)	ATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAATGAA				
<i>E. faecalis</i> LN66	(199)	ATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAATGAA				
<i>E. faecalis</i> QSE15	(186)	ATCAGAATTGAAAATGTTTCGCTATCTCAATTTTCAATAAAAATGAA				

---

Section 25

	(1105)	1105	1110	1120	1130	1140	1150
fsrC V583	(1105)	ACACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATT					
fsrC QSE32	(1105)	ACACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATT					
fsrC LN68	(1105)	ACACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATT					
<i>E. durans</i> QSE125	(245)	ACACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATT					
<i>E. durans</i> QN8	(245)	ACACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATT					
<i>E. faecalis</i> LN66	(245)	ACACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATT					
<i>E. faecalis</i> QSE15	(232)	ACACAAGAGTTTGTGATAACAAATAGTGTCCAAGCCGAATTTGATT					

Section 26

	(1151)	1151	1160	1170	1180	1196
fsrC V583	(1151)	TTAAGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAAT				CCAGA
fsrC QSE32	(1151)	TTAAGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAAC				CCAGA
fsrC LN68	(1151)	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAAC				CCAGA
<i>E. durans</i> QSE125	(291)	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAAC				CCAGA
<i>E. durans</i> QN8	(291)	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAAC				CCAGA
<i>E. faecalis</i> LN66	(291)	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAAC				CCAGA
<i>E. faecalis</i> QSE15	(278)	TTAGGGTTATGAAGAAAACCAAATTTAGTTCTAAAAGTAAC				CCAGA

Section 27

	(1197)	1197	1210	1220	1230	1242
fsrC V583	(1197)	AGAGCACGGTTGGGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTT				
fsrC QSE32	(1197)	AGAGCACGGTTGGGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTT				
fsrC LN68	(1197)	AGAGCACGGTTGAGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTT				
<i>E. durans</i> QSE125	(337)	AGAGCACGGTTGGGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTT				
<i>E. durans</i> QN8	(337)	AGAGCACGGTTGAGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTT				
<i>E. faecalis</i> LN66	(337)	AGAGCACGGTTGAGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTT				
<i>E. faecalis</i> QSE15	(324)	AGAGCACGGTTGAGGATTGTTATATGTAAAAGAAATTGTTGATTTT				

Section 28

	(1243)	1243	1250	1260	1270	1288
fsrC V583	(1243)	TCAGATCAATTTGATTTTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGAGCGGTCA				
fsrC QSE32	(1243)	TCAGATCAATTTGATTTTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGAGCGGTCA				
fsrC LN68	(1243)	TCAGATCAATTTGACTTTTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGATCGGTTA				
<i>E. durans</i> QSE125	(383)	TCAGATCAATTTGACTTTTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGATCGGTTA				
<i>E. durans</i> QN8	(383)	TCAGATCAATTTGACTTTTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGATCGGTTA				
<i>E. faecalis</i> LN66	(383)	TCAGATCAATTTGACTTTTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGATCGGTTA				
<i>E. faecalis</i> QSE15	(370)	TCAGATCAATTTGACTTTTGCAAACGTCCTTCAATGAAGGATCGGTTA				

Section 29

	(1289)	1289	1300	1310	1320	1334
fsrC V583	(1289)	CTCAACATTTAATTATTGAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGT				
fsrC QSE32	(1289)	CTCAACATTTAATTATTGAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGT				
fsrC LN68	(1289)	CTCAACATTTAATTATTGAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGT				
<i>E. durans</i> QSE125	(429)	CTCAACATTTAATTATTGAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGT				
<i>E. durans</i> QN8	(429)	CTCAACATTTAATTATTGAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGT				
<i>E. faecalis</i> LN66	(429)	CTCAACATTTAATTATTGAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGT				
<i>E. faecalis</i> QSE15	(416)	CTCAACATTTAATTATTGAAAAAATCATAACAGTAAAAAAGTTGT				

Section 30

	(1335)	1335	1340	1350	1360	1370	1380
fsrC V583	(1335)	TAACGAATGA	-----				
fsrC QSE32	(1335)	TAACGAATGA	-----				
fsrC LN68	(1335)	TAACGAATGA	-----				
<i>E. durans</i> QSE125	(475)	TAACGAATGA	ATTTGTTAACAAC	TTTTTTGCTATGGTATTGAGTTA			
<i>E. durans</i> QN8	(475)	TAACGAATGA	ATTTGTTAACAAC	TTTTTTGCTATGGTATTGAGTTA			
<i>E. faecalis</i> LN66	(475)	TAACGAATGA	ATTTGTTAACAAC	TTTTTTGCTATGGTATTGAGTTA			
<i>E. faecalis</i> QSE15	(462)	TAACGAATGA	ATTTGTTAACAAC	TTTTTTGCTATGGTATTGAGTTA			

---

Section 31

	(1381)	1381	1390	1400	1410	1426
fsrC V583	(1345)	-----				
fsrC QSE32	(1345)	-----				
fsrC LN68	(1345)	-----				
E. durans QSE125	(521)	TGAGGGGCAATACAGGGAAAAATGTCGGCTGATTAAGGAATTTAGA				
E. durans QN8	(521)	TGAGGGGCAATACAGGGAAAAATGTCGGCTGATTAAGGAATTTAGA				
E. faecalis LN66	(521)	TGAGGGGCAATACAGGGAAAAATGTCGGCTGATTAAGGAATTTAGA				
E. faecalis QSE15	(508)	TGAGGGGCAATACAGGGAAAAATGTCGGCTGATTAAGGAATTTAGA				

---

Section 32

	(1427)	1427	1440	1450	1460	1472
fsrC V583	(1345)	-----				
fsrC QSE32	(1345)	-----				
fsrC LN68	(1345)	-----				
E. durans QSE125	(567)	TAGTGCCGGTTAGGTAGTTGTCTATAATGAAAATAGCAACAAATAT				
E. durans QN8	(567)	TAGTGCCGGTTAGGTAGTTGTCTATAATGAAAATAGCAACAAATAT				
E. faecalis LN66	(567)	TAGTGCCGGTTAGGTAGTTGTCTATAATGAAAATAGCAACAAATAT				
E. faecalis QSE15	(554)	TAGTGCCGGTTAGGTAGTTGTCTATAATGAAAATAGCAACAAATAT				

---

Section 33

	(1473)	1473	1480	1491
fsrC V583	(1345)	-----		
fsrC QSE32	(1345)	-----		
fsrC LN68	(1345)	-----		
E. durans QSE125	(613)	TTACGCAGGGAAAGGGGCG		
E. durans QN8	(613)	T-----		
E. faecalis LN66	(613)	TTACGCAGG-----		
E. faecalis QSE15	(600)	T-----		