



Universiteit
Leiden
The Netherlands

New tools and insights in physiology and chromosome dynamics of *Clostridioides difficile*

Oliveira Paiva, A.M.

Citation

Oliveira Paiva, A. M. (2021, March 30). *New tools and insights in physiology and chromosome dynamics of Clostridioides difficile*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3158165>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3158165>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3158165> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Oliveira Paiva, A.M.

Title: New tools and insights in physiology and chromosome dynamics of *Clostridioides difficile*

Issue Date: 2021-03-30

Portuguese Summary (Sumário)

Clostridioides difficile é uma bactéria anaeróbia, ou seja, é um organismo que necessita de um ambiente sem oxigénio para se desenvolver, como o encontrado no intestino humano. *C. difficile* pode colonizar o cólon dos humanos, mas também pode ser encontrado no ambiente, como células dormentes chamadas de esporos. Os esporos são um tipo de célula filha capaz de resistir a condições adversas, como antibióticos ou produtos de limpeza, mas também a níveis de oxigénio que normalmente são tóxicos para *C. difficile*. Devido à capacidade de produzir esporos, pode permanecer no meio ambiente por longos períodos.

A infecção por *C. difficile* foi identificada em 1978 em pacientes com colite pseudomembranosa e é uma das principais causas de diarreia adquirida em ambiente hospitalar. A infecção pode manifestar-se com diversos sintomas, desde diarreia relativamente leve até inflamação grave do cólon, que pode levar à morte do paciente. Os pacientes adquirem *C. difficile* ao ingerir esporos do ambiente e ao entrar em contacto com superfícies contaminadas. A infecção pode facilmente passar de paciente para paciente. *C. difficile* também pode ser encontrado em pessoas que não demonstram os sintomas da doença, chamados de portadores assintomáticos. Até 15% das pessoas que são hospitalizadas são portadoras de *C. difficile* sem qualquer desenvolvimento da doença.

Após a ingestão dos esporos, estes podem crescer e transformar-se em células bacterianas no trato intestinal quando encontram condições favoráveis. O trato intestinal contém uma comunidade complexa de bactérias (microbioma) que nos ajudam a metabolizar os alimentos e nos protegem de organismos patogénicos. No entanto, como por exemplo, quando tomamos antibióticos, parte do nosso microbioma é eliminada. Nessas condições, é possível o crescimento de microrganismos causadores de doenças, como *C. difficile*. Outros factores como a idade da pessoa ou a presença de outras doenças podem também levar à alteração do microbioma e/ou promover o desenvolvimento de infecções. Quando *C. difficile* coloniza o tracto intestinal, prolifera e é capaz de produzir toxinas que danificam as paredes intestinais, causando inflamação e podendo levar ao desenvolvimento dos sintomas da doença.

O primeiro passo no tratamento da infecção por *C. difficile* é interromper o uso dos antibióticos que podem ter desencadeado a doença. A necessidade de tratamento adicional depende da gravidade da doença e das comorbidades do paciente. Actualmente, existem três antibióticos recomendados para combater a infecção por *C. difficile*. No entanto, em média, 15 a 30% dos pacientes tratados apresentam recorrência dos sintomas. Embora as razões para isso não sejam muito bem compreendidas, esses pacientes têm um microbioma menos diverso do que pessoas saudáveis, o que pode limitar a recuperação da infecção.

Recentemente, uma nova técnica chamada de transplante de microbiota fecal, foi desenvolvida. Nesta, um microbioma estável e diverso de voluntários saudáveis é transferido para o paciente. Isso evita com sucesso o desenvolvimento da doença até 90% dos casos, mesmo quando os tratamentos anteriores falharam várias vezes.

Desde 2000, a incidência e a gravidade das infecções por *C. difficile* aumentaram. Vários surtos em unidades de saúde em todo o mundo foram descritos, com taxas de mortalidade mais altas. Como resultado, o estudo deste organismo e seu ciclo de vida ganhou particular interesse nos últimos anos. O conhecimento actual relevante para a pesquisa descrita nesta tese é resumido no **Capítulo 1**.

Neste projecto de doutoramento era nosso objectivo explorar detalhes moleculares de processos que são importantes para células de *C. difficile*, como a forma como a informação genética (ADN) é copiada, num processo chamado replicação de ADN, e como esta é organizada dentro da célula. No entanto, rapidamente percebemos que para isso era necessário desenvolver novas ferramentas que nos permitissem responder às questões deste estudo.

Uma das ferramentas que desenvolvemos envolve a produção de uma proteína, a luciferase, que emite luz na presença de um substrato. Esta proteína pode ser usada como um indicador de quando e como a bactéria transcreve genes e, como resultado, produz proteínas. *C. difficile* contém mecanismos que permitem à célula direccionar as proteínas produzidas para o exterior da célula. Aproveitámos essa capacidade para direccionar a secreção da luciferase e assim desenvolver uma nova ferramenta, que nos permitiu avaliar a expressão de componentes celulares por colheita da amostra no meio em que as células foram cultivadas. A luciferase, que chamamos de sLuc^{opt}, tem a mesma sequência de aminoácidos que uma luciferase disponível comercialmente, com a adição de um sinal de secreção de uma proteína de *C. difficile*. Usando a mesma estratégia, produzimos também uma proteína excretada que pode degradar o amido, chamada de AmyE^{opt}. Ambas as proteínas estão descritas no **Capítulo 2**. Noutro trabalho, estendemos o kit de ferramentas da luciferase derivando sistemas do sLuc^{opt} para diferentes ensaios *in vivo*; esses sistemas aproveitam o facto de que se pode dividir a proteína luciferase em pedaços que, quando reunidos novamente, formam a proteína funcional. O sistema HiBit^{opt} permitiu-nos determinar se um lado da proteína está dentro de uma célula bacteriana, ou se está exposto no exterior, descrito no **Capítulo 3**; o outro sistema, bitLuc^{opt}, foi usado para estudar se as proteínas interagem nas células bacterianas e é descrito no **Capítulo 5**.

Também usámos pela primeira vez outra ferramenta em *C. difficile*, o HaloTag. Esta é uma pequena proteína que emite fluorescência quando combinada com um substrato (os substratos podem ser adquiridos com cores diferentes). Fomos capazes de explorar as limitações e vantagens do HaloTag para microscopia de fluorescência em células vivas de *C. difficile*, mas também de outras proteínas fluorescentes que foram usadas anteriormente em *C. difficile* (CFP^{opt}, mCherry^{opt}, phiLOV2.1 e SNAP^{cd}). Este estudo levou ao **Capítulo 6**. Observámos durante este trabalho que o próprio *C. difficile* também emite fluorescência, no espectro verde, o que constitui uma limitação para o uso de proteínas fluorescentes verdes para estudos em *C. difficile*. O nosso trabalho elucidou aspectos da fluorescência verde de *C. difficile*, que aumenta quando as culturas crescem por mais tempo e quando as células são expostas ao oxigénio.

Conforme indicado, aplicámos as nossas ferramentas às nossas investigações sobre os mecanismos moleculares de processos celulares importantes. Por exemplo, o sistema HiBiT^{opt} permitiu-nos investigar a proteína TcdC, uma proteína com um papel controverso na regulação das toxinas que causam a doença por *C. difficile*. No **Capítulo 3**, caracterizámos essa proteína enigmática, que está presente no mesmo contexto genético das toxinas. Acreditava-se que esta proteína reprimia a expressão dos genes das toxinas, interferindo com a actividade do regulador positivo de produção das toxinas, a proteína TcdR, que está localizada dentro da célula. Descobrimos, no entanto, que a parte mais importante do TcdC está localizada fora da célula. Esta observação não é compatível com a hipotética função, já que a localização parece sugerir um papel na detecção de estímulos presentes no ambiente.

Dois outros capítulos experimentais tratam de como a informação genética de *C. difficile* é organizada e copiada.

No **Capítulo 4**, identificámos o local onde a replicação do ADN é iniciada, chamada de origem de replicação (*oriC*). A primeira etapa deste processo é mediada por uma proteína chamada DnaA e consiste na abertura do ADN de dupla cadeia (desenrolamento). Usando análises de bioinformática e experiências bioquímicas, mostrámos *in vitro* onde a DnaA induz esse desenrolamento. Também mostramos que é provável que as primeiras etapas na cópia do ADN sejam semelhantes em outros clostrídios (incluindo, por exemplo, *Clostridium botulinum*, conhecido por sua capacidade de produzir a neurotoxina botox ou *Clostridium perfringens*, que pode causar intoxicações alimentares) e possivelmente em outras bactérias relacionadas.

No **Capítulo 5**, examinámos os efeitos da proteína HupA, que pertence a uma família de proteínas que frequentemente protegem o ADN ou mudam sua forma. Usámos experiências bioquímicas, incluindo medições de moléculas individuais e microscopia fluorescente para

mostrar que essa proteína pode alterar o forma do ADN *in vitro*, e, nas células, faz com que o ADN seja compactado. O que é semelhante, em alguns aspectos, às proteínas chamadas histonas, que são proteínas que compactam o ADN em células humanas e, portanto, proteínas como o HupA, às vezes são chamadas de proteínas bacterianas semelhantes às histonas.

Finalmente, resumimos os resultados de todos os nossos estudos no **Capítulo 7**, e com base no nosso trabalho, discutimos algumas das implicações das nossas descobertas e as perspectivas para pesquisas futuras em *C. difficile*.