

Livia Carvalho Barbosa

**Análise proteômica da formação de
biofilme induzida por sais biliares em
limitação de fosfato inorgânico em
Vibrio cholerae O1**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Livia Carvalho Barbosa

**Análise proteômica da formação de
biofilme induzida por sais biliares em
limitação de fosfato inorgânico em
Vibrio cholerae O1**

Rio de Janeiro
2008

Ficha Catalográfica

Barbosa, Livia Carvalho

Análise proteômica da formação de biofilme induzida por sais biliares em limitação de fosfato inorgânico em *Vibrio cholerae* O1 / Livia Carvalho Barbosa. Rio de Janeiro: UFRJ, IBCCF, 2008.

x, 120f., il.

Orientadora: Wanda Maria Almeida von Krüger

Dissertação (mestrado) – UFRJ / IBCCF / Ciências Biológicas - Modalidade Biofísica 2008.

Referências Bibliográficas: f. 72-87.

1. *Vibrio cholerae*. 2. Biofilme. 3. Proteoma

I. von Krüger, Wanda Maria Almeida. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Wanda von Krüger pela orientação e principalmente pela paciência. Por todo o apoio, agradeço ao Dr. Paulo Bisch.

Ao pessoal do laboratório Bia, Camacho, Carol, Celso, Letícia, Lili, Michelle e Simone que sempre fizeram o trabalho parecer diversão.

Aos meus pais Ricardo e Selma e minha avó Judith por quererem sempre que eu alcance todos os meus sonhos e dar suporte, em todos os aspectos, para que eles aconteçam.

À minha irmã Mariana pelo companheirismo, por todos os momentos de alegria.

Ao meu namorado por estar sempre ao meu lado, por me amar do jeito que sou.

Resumo

A formação de biofilme tem um papel importante no sucesso de *Vibrio cholerae* como patógeno e como organismo ambiental, portanto, é um processo afetado por muitos fatores. Os ácidos biliares, por exemplo, estimulam a formação de biofilme por *V. cholerae*. Os níveis de Pi (fosfato inorgânico) ambiental também podem afetar a formação de biofilme. No caso de *V. cholerae* esse efeito não era conhecido. Portanto, neste estudo foi feita uma avaliação inicial do efeito dos níveis de Pi na presença e ausência de um componente da bile (ácido deoxicólico, DOC) na formação de biofilme em *V. cholerae* O1 a 22 e 37°C. A cepa El Tor N16961, utilizada nos testes, formou pouco biofilme em ambas as temperaturas sob limitação de Pi em comparação com a quantidade formada em um meio complexo. A adição de DOC no meio mínimo estimulou a formação de biofilme principalmente em baixo Pi em ambas temperaturas. Para obter informações mais detalhadas sobre o efeito do Pi e DOC na formação de biofilme por N16961 foi feita uma análise proteômica comparativa. Proteínas expressas em 48h por células planctônicas e biofilmes sob limitação de Pi e presença de DOC foram analisadas por eletroforese bidimensional. A maioria das proteínas apresentou pI entre 4,5-6,5 e MM entre 15-100kDa. Das 253 proteínas diferencialmente expressas 130 foram identificadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) sendo a grande maioria proveniente de spots específicos. Análise do conjunto de proteínas específico de cada condição permitiu relacionar as características metabólicas aos estados fisiológicos das células livres e de biofilmes. As células planctônicas mostraram características de fase estacionária de cultura e as do biofilme, de células em fase exponencial. Além disso a análise proteômica permitiu identificar proteínas do biofilme sem funções definidas na produção de biofilme em *V. cholerae* mas já descritas por participarem desse processo em outras espécies bacterianas.

Abstract

Biofilm formation seems to play important roles in *Vibrio cholerae*'s success as a pathogen and as an environmental organism. Bacterial biofilm formation is affected by many factors. Bile acids, for instance, stimulate biofilm formation by *V. cholerae*. Pi (inorganic phosphate) levels also affect biofilm production, however, its effects depend on the bacterial species and contrasting results have been found. The ability of *V. cholerae* El Tor strain N16961 to form biofilm under low and high Pi levels in the presence or absence of bile, at 22 and 37°C, has been examined. Independently of the Pi level in the media, N16961 produced low amounts of biofilm at both temperatures. Addition of DOC greatly stimulated the formation of biofilm under Pi-limitation, at both temperatures. In order to obtain a broad molecular picture of the effect of Pi and DOC on biofilm formation by *V. cholerae* El Tor strain N16961, we did a proteomic analysis by 2D electrophoresis. Most proteins on the gels presented pIs between 4.5-6.5 and MM from 15-100kDa. Comparative analysis of the electrophoretic patterns showed 243 proteins expressed and 145 were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) the great majority was provenient from unique spots. Some were identified in the *Vibrio* sps databank entries and are related to cell maintenance, stress response and biofilm. Analysis of the set of proteins specific to each growth condition, permitted to establish a relationship between the metabolic characteristics and the physiological state of each, planktonic cells and biofilm. The free cells presented characteristics of those at the stationary phase of culture whereas, biofilm cells, behavior of cells at the exponential culture phase. The proteomic analysis identified biofilm proteins without defined functions in biofilm formation *V. cholerae* but they have already been described in another bacterial species

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ASB-14	Amidosulfobetaína-14
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Ciclo do ácido tricarboxílico
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico
CT	Toxina colérica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
DOC	Ácido deoxicólico
DTT	Ditiotreitol
EPS	Exopolissacarídeo
FI	Focalização Isoelétrica
HK	Histidina cinase
HP	Alto fosfato
kDa	kiloDaltons
LB	Lysogenic Broth (Luria-Bertani)
LP	Baixo fosfato
LPS	Lipopolissacarídeo
MM	Massa molecular
MG	MOPS glicose
MSHA	Hemaglutinina sensível à manose
MS/MS	Espectometria de massas em seqüência
OMP	Proteína de membrana externa
PAGE	Eletroforese em gel de acrilamida
Pg	Peptídeo glicana

PMSF	<i>Fenilmetilsulfonil fluoride</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PPi	Pirofosfato inorgânico
pI	Ponto isoelétrico
RR	Reguladora de resposta
SAH	S-adenosil homocisteína
SAM	S-adenosil metionina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricluoroacético
TCP	Pilus corregulado à toxina
TG	Tris glicose
VPS	Síntese de polissacarídeos de víbrio

Sumário

1	Introdução _____	12
1.1	<i>Vibrio cholerae</i> e cólera _____	13
1.2	A cólera _____	15
1.3	Fatores de virulência _____	18
1.4	Adaptação ao ambiente: o sistema de dois componentes _____	21
1.4.1	Resposta a níveis extracelulares de fosfato: o sistema PhoB/PhoR _____	22
1.5	Sais biliares: detergentes biológicos do trato intestinal _____	24
1.6	Proteínas de membrana externa (OMPs) _____	27
1.7	Biofilme: uma resposta ao estresse _____	28
1.7.1	Fatores ambientais que induzem a formação de biofilmes em <i>V. cholerae</i> _____	31
2	Objetivos _____	34
2.1	Objetivos gerais _____	35
2.1.1	Objetivos específicos _____	35
3	Material e Métodos _____	36
3.1	Cepas bacterianas e meios de cultura. _____	37
3.2	Crescimento celular e preparação de lisado total para eletroforese bidimensional (2D) 38	
3.2.1	Método 1 _____	38
3.2.2	Método 2 _____	39
3.2.3	Método 3 _____	39
3.3	Extração das proteínas de membrana externa ligadas à parede celular (OMPs-Pg) _____	40
3.4	Análise eletroforética de proteínas _____	41
3.4.1	Gel unidimensional (SDS-PAGE) _____	41
3.4.2	Gel bidimensional (Focalização isoeétrica e SDS-PAGE) _____	41

3.5	Análise de imagens dos géis bidimensionais _____	42
3.6	Análise das proteínas por espectrometria de massas _____	43
3.7	Identificação das proteínas _____	44
3.8	Análise computacional das proteínas hipotéticas _____	45
3.9	Ensaio de formação de biofilme _____	45
4	Resultados _____	46
4.1	Efeito do meio de cultura e temperatura de incubação na formação de biofilme pela cepa N16961 de <i>V. cholerae</i> O1 _____	47
4.2	Análise proteômica da formação de biofilme: eletroforese unidimensional _____	48
4.3	Análise proteômica da formação de biofilme: eletroforese bidimensional (2D) _____	49
4.3.1	Crescimento bacteriano e análise dos lisados preparados como descrito no item 3.2.1- Método 1 _____	50
4.3.2	Crescimento bacteriano e análise dos lisados preparados como descrito no item 3.2.2- Método 2 _____	53
4.3.3	Crescimento bacteriano e análise dos lisados preparados como descrito no item 3.2.3- Método 3 _____	54
4.4	Análise dos lisados contendo proteínas de membrana externa ligadas ao peptídeo glicano (OMPs-Pg). _____	60
4.5	Proteínas expressas por células planctônicas e biofilme identificadas por espectrometria de massas _____	61
4.5.1	Proteínas de células planctônicas e de biofilme analisadas de acordo com as categorias funcionais _____	74
4.6	Identificação de operons _____	81
4.7	Efeito de mutações em genes <i>phoB</i> , <i>vca1008</i> , <i>ompU</i> e <i>toxR</i> na formação de biofilme pela cepa de N16961 de <i>V. cholerae</i> O1 _____	83
5	Discussão _____	87

6	Conclusões	101
	Referências	103
	Apêndice	118

1.1 *Vibrio cholerae* e cólera

A descoberta da bactéria *Vibrio cholerae* é creditada a Filippo Pacini e Félix, em 1849, por terem visto no conteúdo intestinal de vítimas da cólera embora Robert Koch tenha sido o primeiro cientista a isolá-la e caracterizá-la como agente causador da cólera, em 1883 (Barua & Greenough, 1992). *V. cholerae* é uma bactéria Gram-negativa do gênero *Vibrio*, da família *Vibrionaceae* (Baumann *et al.*, 1984). É um bastonete curvado em forma de vírgula, possuindo de 1,4 a 2,6µm de comprimento (Figura 1). Elas são aeróbias facultativas, móveis e com flagelo polar único (Kay *et al.*, 1994).

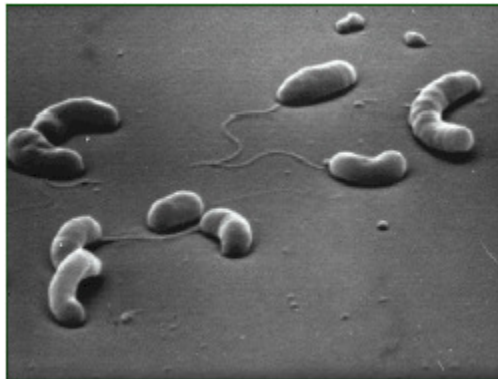


Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura de *Vibrio cholerae*. Fonte: http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC420/lecture_notes/vibrio/vibrio_general.html

V. cholerae pode ser encontrado em diversos ecossistemas aquáticos, variando de águas doces a salobras, costeiras ou estuarinas (Colwell & Spira, 1992; Colwell & Huq, 1994). A espécie *V. cholerae* está dividida em mais de 200 sorogrupos (Chatterjee & Chaudhuri, 2003) de acordo com reações sorológicas dos diversos antígenos somáticos O, um dos elementos que constituem o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa bacteriana (Faruque *et al.*, 1998a). Cepas toxigênicas são aquelas que possuem a toxina colérica e o pilus coregulado da toxina e são principalmente isoladas do meio ambiente em áreas contaminadas por indivíduos infectados (Chakraborty *et al.*, 2000; Faruque *et al.*, 1998b; Rivera *et al.*, 2001; Sharma & Chaturvedi, 2006).

Algumas cepas são patogênicas ao homem e pertencem a dois sorogrupos principais, O1 e O139. As cepas O1 podem ser de dois biótipos: o clássico, descrito por Koch em 1883, e o El Tor, isolado por Gotschlich em 1906, de peregrinos provenientes de Meca, em quarentena em El Tor, no Egito (Sack *et al.*, 2004). Esta classificação se baseia em diferenças em suas propriedades bioquímicas e susceptibilidade a bacteriófagos. Cada biótipo reúne cepas de três diferentes sorotipos ou formas antigênicas O1, Ogawa, Inaba e Hikojima (Filinkelstein, 1996). Recentemente, entretanto, cepas híbridas foram isoladas de pacientes com diarreia. Este é o caso dos variantes Matlab de *V. cholerae* O1, definidos como híbridos entre os biótipos El Tor e clássico, encontrados em Bangladesh (Nair *et al.*, 2002; Safa *et al.*, 2006) e em Moçambique (Lee *et al.*, 2006), onde foram isolados de pacientes após um surto de cólera, causado por cepas do biótipo El Tor portadoras do DNA do bacteriófago CTX do biótipo clássico, integrado no genoma. Todos os híbridos identificados até o momento são cepas El Tor que adquiriram atributos genéticos de cepas clássicas por transferência horizontal (Safa *et al.*, 2006).

Aparentemente, os humanos são os únicos hospedeiros naturais de *V. cholerae*, apesar de que estas bactérias podem também ser encontradas associadas a fitoplâncton, ao exoesqueleto de quitina dos crustáceos, copépodos e insetos (Figura 2) (Butler & Camilli, 2005; Colwell & Spira, 1992; Colwell & Huq, 1994; Fotedar, 2001; Huq *et al.*, 1983). Mudanças no clima interferem no crescimento do plâncton, o que conseqüentemente afetam o crescimento de *V. cholerae* associada a estes microorganismos, comprovando que fatores ambientais estão relacionados com o reaparecimento de epidemias de cólera (Pascual *et al.*, 2000).

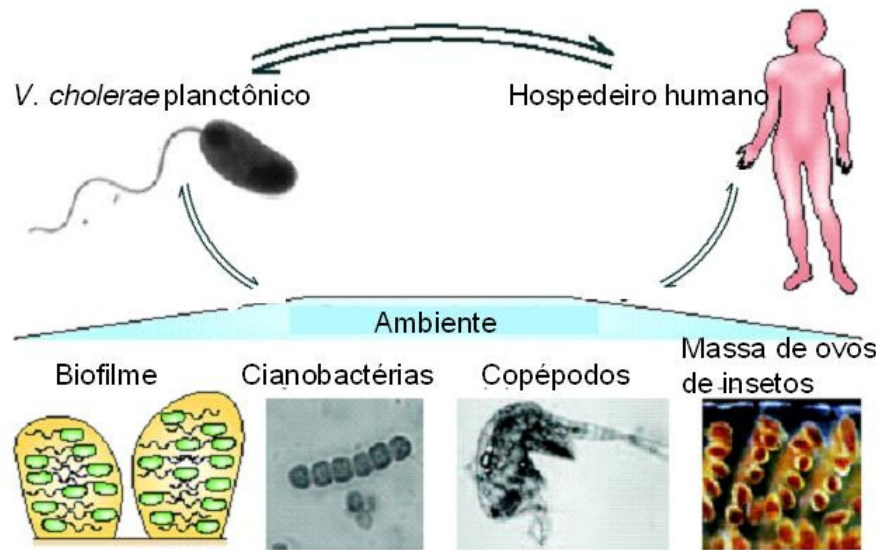


Figura 2 - Ciclo de vida de *V. cholerae* patogênico. (Adaptado de Butler & Camilli, 2005).

1.2 A cólera

A cólera é uma das doenças de maior impacto em saúde pública e vigilância sanitária em algumas partes do mundo, principalmente em países em desenvolvimento. A cólera é endêmica na parte oriental da Índia e Bangladesh e tem se propagado dessas áreas para outros países, causando epidemias e pandemias, com altos números de casos (Figura 3 e 4, World Health Organization, 2007).

A história da cólera no mundo foi dividida em pandemias. No período de 1817-1923 ocorreram seis pandemias de cólera. O agente das quatro primeiras, entre 1817-1879, não foi determinado, mas a quinta e sexta pandemias, que ocorreram entre 1881-1923, foram causadas pelo biótipo clássico da *V. cholerae* O1. Entre 1926 e 1960, casos de cólera não foram registrados na Europa, mas ainda ocorriam, principalmente na Ásia e norte da África. A partir de 1961 surgiu a sétima pandemia causada pelo biótipo El Tor que, em uma década, substituiu todas as cepas clássicas como causa da cólera nas áreas em que a cólera é endêmica (Yoon & Mekalanos, 2006). A sétima pandemia ocorreu também no Brasil em 1992 e

inúmeros casos de cólera foram registrados nos anos que se seguiram (World Health Organization, 2006). Em 2005 foram relatados à Organização Mundial de Saúde cinco casos de cólera sem óbitos no Brasil. Desde 1991, um novo sorogrupo de *V. cholerae*, denominado O139 surgiu no sul da Índia e se espalhou para outras partes do país e para países vizinhos, iniciando o que poderia vir a ser a 8ª pandemia de cólera (Albert *et al.*, 1993). Entretanto, poucos anos após a detecção das cepas O139, em partes de Bangladesh e Índia, o sorogrupo foi substituído por novos clones de El Tor, aparentemente distintos dos clones responsáveis pela cólera antes do aparecimento do clone O139 (Dutta *et al.*, 2006; Faruque *et al.*, 1997). Atualmente em países onde a cólera é endêmica, tais como o Sul da Ásia, os casos de cólera se devem principalmente a *V. cholerae* O1 El que é encontrada nos ambientea aquáticos costeiros durante o ano todo (Alam *et al.*, 2006).

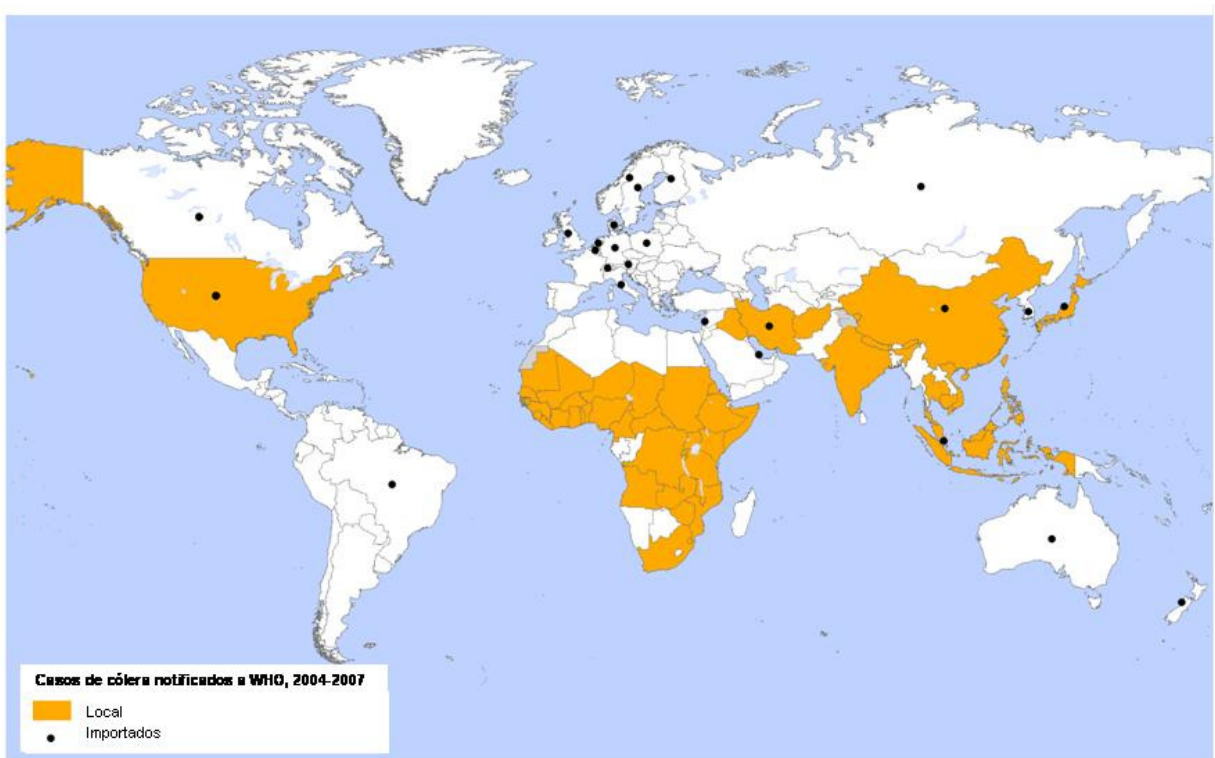


Figura 3 - Fonte: Weekly Epidemiological Record, NO. 31, 5 Agosto 2007 <http://www.who.int/wer>

A ingestão de água contaminada por fezes ou vômitos de pacientes de cólera ou de portadores da bactéria, assim como o uso de alimentos e utensílios contaminados pela água, pelo manuseio com mãos sujas ou mesmo moscas, são os principais responsáveis pela propagação da doença (Hughes *et al.*, 1982). Devido à sua sensibilidade a baixos pHs, a maioria das bactérias morre no estômago e as que conseguem sobreviver podem colonizar o intestino delgado sem invasão das células ou alteração da estrutura do epitélio (Filinkelstein, 1996). Quanto ao inóculo, alguns autores demonstraram que deve ser igual ou maior a dez mil vibriões em alimentos ou na água, para produzir infecção, entretanto este número pode variar dependendo do hospedeiro (Sack *et al.*, 2004).

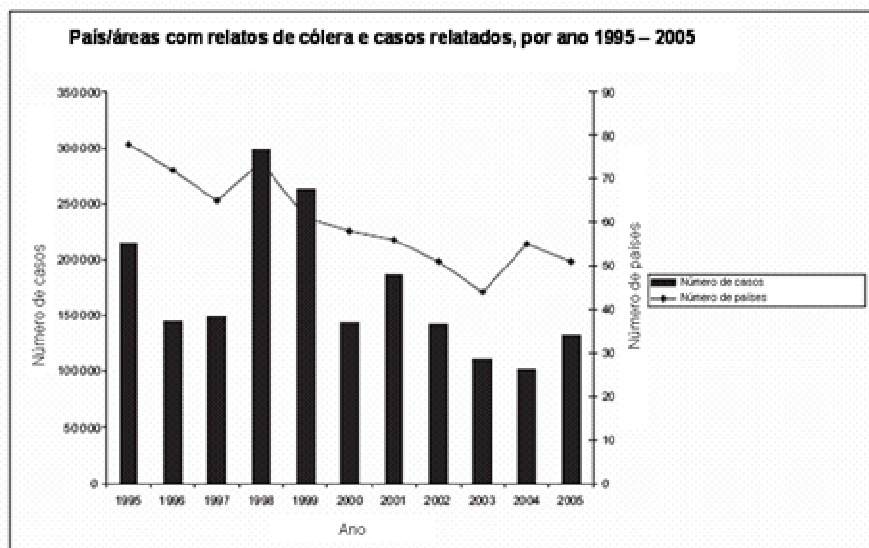


Figura 4 - Fonte: Weekly Epidemiological Record, NO. 31, 5 Agosto 2007 <http://www.who.int/wer>

A cólera é caracterizada por uma intensa perda de água na forma de diarreia (“água de arroz”) acompanhada de vômitos, chegando a um 1 litro de líquido por hora nos casos mais severos (Barua & Greenough, 1992). Cerca de 75% das pessoas infectadas não apresentam sintomas, e das que apresentam, menos de 10% desenvolvem as formas mais severas (World Health Organization, 2007). Quando os pacientes são tratados adequadamente, a mortalidade é

baixa, porém, quando não tratados a tempo, 50% dos pacientes chegam ao óbito (Sack *et al.*, 2004).

O período de incubação é de algumas horas a cinco dias, mas na maioria dos casos, dois a três dias. O período de transmissibilidade perdura enquanto houver eliminação do vibrião nas fezes, o que ocorre, geralmente, poucos dias após a cura (Reidl & Kloese, 2002).

O tratamento da cólera é feito com reidratação oral, nos casos mais brandos, e intravenosos nos casos mais graves. Antibióticos só são utilizados em casos extremos para eliminar as bactérias e encurtar o período da doença; eles também diminuem a necessidade de reidratação e o tempo de hospitalização (Sack *et al.*, 2004). A prevenção da doença consiste em medidas sanitárias simples, como tratamento de água, rede de esgoto e o cozimento de alimentos de alto risco, principalmente frutos do mar (Sack *et al.*, 2004). Além das medidas profiláticas, as vacinas orais contra a cólera causada por cepas O1, recentemente desenvolvidas, têm se mostrado seguras e imunogênicas, oferecendo 70% de proteção por cerca de um ano (Holmgren *et al.*, 1989; Tacket *et al.*, 1999; Trach *et al.*, 2002). Entretanto, vacinas anti-cepas do sorogrupo O1 não protegem contra *V. cholerae* O139 e vice-versa (World Health Organization, 2006).

1.3 Fatores de virulência

Para causar infecção, *V. cholerae* precisa aderir ao epitélio e se multiplicar no ambiente intestinal, portanto, a bactéria precisa, inicialmente, penetrar uma camada mucosa. No caso de cepas do biótipo El Tor, verificou-se que mutantes de motilidade (não flagelados ou flagelados sem motilidade) são atenuados cerca de 10 vezes em comparação a capacidade de colonização da cepa selvagem em camundongos neo-natos, sugerindo um papel para motilidade no processo de infecção (Butler & Camilli, 2005). Entretanto, estudos semelhantes

com cepas clássicas, produziram resultados conflitantes a respeito da importância da motilidade para infecção (Gardel & Mekalanos, 1996; Richardson, 1991).

A adesão depende principalmente do pilus co-regulado à toxina (TCP), que promove a interação da bactéria às células epiteliais do intestino do hospedeiro. Após a adesão, *V. cholerae* passa a secretar a toxina colérica (CT), uma toxina do tipo AB₅, que se liga a oligossacarídeos do gangliosídeo GM1 na superfície da membrana plasmática da célula epitelial do intestino pelas subunidades B. Esta interação causa uma mudança de conformação da holoenzima e a quebra de uma ponte dissulfeto entre as subunidades A₁ de 23,5 kDa e A₂ de 5,5 kDa. Enzimaticamente ativa, A₁ entra na célula por mecanismo desconhecido e promove a transferência de ADP-ribose da nicotinamina adenina dinucleotídeo (NAD) para uma proteína G associada a adenilato ciclase, levando a um aumento nos níveis intracelulares de AMP cíclico. Ocorre, então, nas células entéricas, uma intensa perda de água e eletrólitos e a eliminação das bactérias, fazendo-as voltar ao ambiente (Bennish, 2004; Field *et al.*, 1972; Gangarosa *et al.*, 1960; Morris & Black, 1985; Owen *et al.*, 1986). O efeito tóxico de CT é essencial à patogênese da bactéria, mas sua função na fisiologia da bactéria quando fora do hospedeiro é desconhecida.

Outras toxinas, tais como a toxina Zot, Ace e outros fatores de colonização importantes à patogenicidade da bactéria já foram descritos, sugerindo que é um processo multifatorial e complexo ainda não completamente entendido (Kaper *et al.*, 1995; von Kruger *et al.*, 1999).

A regulação da expressão de CT e TCP envolve uma cascata de sinalização ativada por inúmeros fatores ambientais (Figura 5). Genes cujos produtos regulam a expressão de CT e TCP, como *tcpP*, *tcpH*, *toxR*, *toxS* e *toxT*, são portanto, importantes na patogenicidade da bactéria (Miller *et al.*, 1989; Miller & Mekalanos, 1984; Osorio & Klose, 2000). As proteínas ToxR e ToxS ativam diretamente a expressão de *toxT*, cujo produto, ToxT, por sua vez, ativa diretamente a expressão de CT e TCP (Champion *et al.*, 1997; DiRita *et al.*, 1991). Além de

ativar *toxT*, ToxR/S regulam positivamente a expressão da porina OmpU e negativamente a porina OmpT (Provenzano & Klose, 2000).

Duas outras proteínas reguladoras transmembranares, TcpP e TcpH, também ativam diretamente a transcrição de *toxT* (Hase & Mekalanos, 1998; Krukoniš *et al.*, 2000). AphA e AphB, por outro lado, também afetam a expressão de *toxT* via TcpH e TcpP (Ali *et al.*, 2000; Hase & Mekalanos, 1998; Krukoniš *et al.*, 2000).

Como ilustrado na figura 5, estímulos ambientais tais como pH, temperatura, sais biliares, e fontes de carbono regulam a expressão dos principais fatores de virulência em *V. cholerae*. (Provenzano & Klose, 2000). O conjunto de genes regulados por ToxR/S em resposta a sinais ambientais constituem o regulon ToxR (Wong *et al.*, 1998).

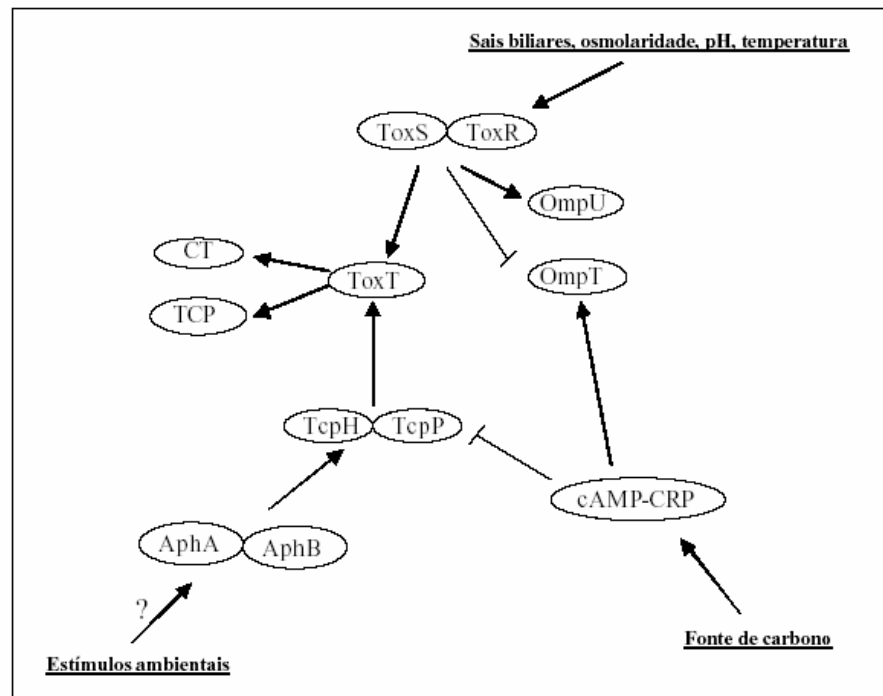


Figura 5 – Esquema representativo das vias de regulação da expressão dos fatores de virulência CT e TCP em *V. cholerae*. CT = toxina colérica, TCP = pilus co-regulado à toxina, OmpT e OmpU são proteínas de membrana externa (porinas). (Adaptado de Li *et al.*, 2002).

Ainda que o regulon ToxR tenha um papel central no controle da virulência da bactéria nem todos os genes envolvidos no processo estão sob o controle de ToxR/S (Goldberg *et al.*, 1990; von Kruger *et al.*, 1999) e a patogênese de *V. cholerae* é afetada por vários outros fatores além dos apresentados na Figura 5 (Behari *et al.*, 2001; Kovacicova & Skorupski, 2001; Nye *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002).

1.4 Adaptação ao ambiente: o sistema de dois componentes

Para sobreviver e se multiplicar em diferentes ambientes, *V. cholerae* bem como outras bactérias regulam, de forma coordenada, a expressão de genes envolvidos em respostas adaptativas. As bactérias, portanto, monitoram o ambiente e podem responder a uma variedade de estímulos ambientais através de sistemas constituídos por duas proteínas. Em um sistema de dois componentes típico, uma das proteínas é transmembranar com atividade histidina cinase (HK). Seu domínio extracitoplasmático é o sensor dos estímulos externos que transmite o sinal através do domínio transmembranar à porção citoplasmática da proteína com atividade HK. A segunda proteína, a reguladora da resposta (RR), é citoplasmática e possui um domínio amino-terminal receptor. Sua porção carboxi-terminal apresenta um domínio de ligação ao DNA para regular a expressão gênica (Figura 6) (Gross *et al.*, 1989).

O mecanismo de transdução de sinal comum a todos esses sistemas envolve a autofosforilação de um resíduo de histidina no domínio transmissor carboxi-terminal da proteína sensora em resposta a um estímulo ambiental determinado e a transferência do grupamento fosfato para um resíduo de aspartato no domínio receptor da proteína RR, com subsequente ativação do seu domínio efetor (Figura 6) (Miller *et al.*, 1989).

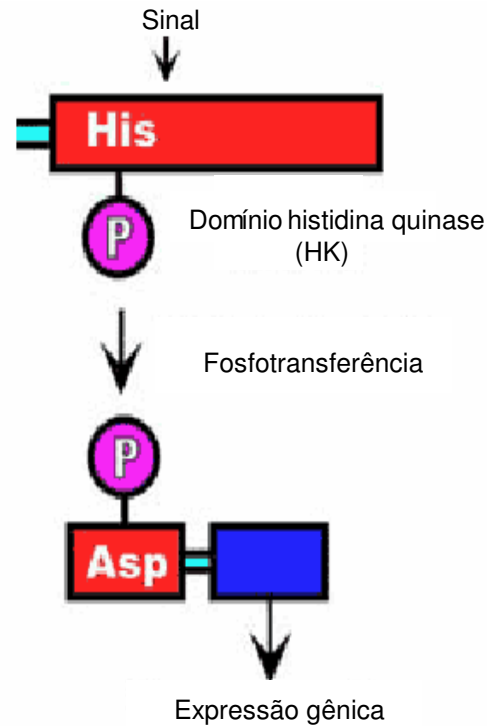


Figura 6 – Esquema de transdução de sinais via sistema de dois componentes. Adaptado de <http://www.mcgill.ca/microimm/department/professors/lemoual>.

Em bactérias, os sistemas de dois componentes estão envolvidos em processos tão diversos como esporulação, quimiotaxia, assimilação de nitrogênio, osmorregulação, resistência a antibióticos e patogenicidade (Stock *et al.*, 1989). Em *E. coli*, são conhecidos pelo menos 30 sistemas de dois componentes (Oshima *et al.*, 2002).

1.4.1 Resposta a níveis extracelulares de fosfato: o sistema PhoB/PhoR

O fósforo (P) é um componente essencial na nutrição bacteriana, fazendo parte de ácidos nucleicos, fosfolípidos e lipopolissacarídeos, por exemplo. A assimilação de vários componentes fosforilados, que garantem o suprimento de fósforo necessário ao metabolismo bacteriano, consiste de duas etapas: o transporte desses componentes para dentro da célula e a incorporação do fósforo no ATP (Wanner, 1996). A fonte de fósforo mais utilizada pelas bactérias é o fosfato inorgânico (Pi) (Wanner, 1993).

A limitação de fosfato inorgânico (Pi) no meio leva muitas bactérias a sintetizar uma série de proteínas, muitas das quais envolvidas em aquisição, transporte e metabolismo de fosfato. Em *E. coli* mais de 40 genes estão envolvidos nesses processos e constituem o regulon Pho (Makino *et al.*, 1994). O controle primário da expressão dos membros do regulon Pho em bactérias é o nível de Pi extracelular: inibição quando Pi está em excesso ($\geq 4\mu\text{M}$) e ativação em condições limitantes de Pi (Lamarche *et al.*, 2008).

Em *E. coli* e outras bactérias, a regulação da expressão de proteínas em resposta à limitação de Pi requer as proteínas PhoB e PhoR, membros de um sistema de dois componentes onde PhoR é a sensora com atividade HK e PhoB a RR cognata. A fosforilação de PhoB ocorre concomitantemente com a capacidade de ativar a transcrição devido a interação entre PhoB~Pi e caixas Pho, seqüências reguladoras dentro de promotores dos genes do regulon Pho, normalmente a -35 do início da transcrição, cujo consenso em *E. coli* é CTGTCATATATCTGTCAT (Makino *et al.*, 1996). *V. cholerae* possui um sistema homólogo ao sistema PhoB/PhoR de *E. coli* (von Kruger *et al.*, 1999). A análise da seqüência gênica revelou que, assim como em *E. coli*, os genes *phoB* e *phoR* de *V. cholerae* constituem um operon que é precedido por uma seqüência Shine-Dalgarno (AGG), uma caixa Pribnow e uma seqüência similar a uma caixa Pho (Makino *et al.*, 1986b). As seqüências de aminoácidos deduzidas para PhoB e PhoR de *V. cholerae* revelam proteínas com o mesmo número de resíduos (279 e 430 respectivamente) e com 72% e 58%, respectivamente, de identidade em relação a PhoB e a PhoR de *E. coli* (Makino *et al.*, 1986a; Makino *et al.*, 1986b; von Kruger *et al.*, 1999).

Recente análise proteômica comparativa de cepas selvagem e de um mutante isogênico *phoB* de *V. cholerae* O1 cultivados em baixos níveis de Pi evidenciou funções relacionadas ao metabolismo e transporte de Pi dependentes de PhoB/PhoR e funções importantes à patogenicidade e sobrevivência mas nem todas dependentes de PhoB/PhoR (von Kruger *et al.*, 2006). O conjunto de genes cuja expressão é controlada pelo sistema de dois componentes PhoB/PhoR em resposta às concentrações extracelulares de Pi constitui o regulon Pho e têm

funções na captação, transporte e metabolismo de Pi e até mesmo em virulência (von Kruger *et al.*, 2006). Dentre estes podemos destacar o gene *vc_a0033* da fosfatase alcalina (PhoA), considerada repórter do regulon Pho em bactéria (Majumdar *et al.*, 2005) e uma OMP, produto do gene *vc_a1008*, uma porina putativa, aparentemente essencial ao processo de colonização intestinal de camundongos (Osorio *et al.*, 2004). Uma observação importante foi a de que a mutação em *phoB* causou uma redução na habilidade de colonização intestinal das cepas de *V. cholerae*, indicando que realmente algum(ns) fator(es) de virulência da bactéria seja(m) regulado(s) pelo sistema PhoB/PhoR (von Kruger *et al.*, 1999; von Kruger *et al.*, 2006)

1.5 Sais biliares: detergentes biológicos do trato intestinal

A presença de sais biliares, assim como alteração na osmolaridade, pH, temperatura e nível de oxigênio, entre outros, é sinal que a bactéria deve perceber e responder adaptativamente quando entra em um determinado ambiente. No trato gastrointestinal humano, por exemplo, ela encontra a bile, uma secreção digestiva aquosa de compostos orgânicos e inorgânicos (Tabela 1) com papel de emulsificação e solubilização de lipídeos. A bile também afeta os fosfolipídeos e proteínas das membranas e perturba, assim, a homeostase celular.

Os ácidos biliares, cerca de 50% dos compostos orgânicos da bile, são sintetizados no fígado a partir do colesterol por um complexo multienzimático (Figura 7). Após secreção no duodeno, os ácidos biliares são conjugados por ligações peptídicas a glicina ou taurina e os produtos são denominados sais biliares, completamente solúveis em pHs fisiológicos ao contrário de seus ácidos. Durante sua passagem, pelo intestino grosso, a flora residente transforma os sais biliares que sofrem desconjugação, liberando ácidos biliares livres modificados (Figura 7) (Begley *et al.*, 2005).

A ação microbiana dos sais biliares é dada por sua propriedade detergente que desestabiliza a membrana plasmática, além disto, eles induzem a formação de estruturas

secundárias em moléculas de RNAs, causam danos no DNA, desnaturação de proteínas e estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio (Begley *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Constituintes majoritários e propriedades da bile hepática humana.

Constituinte/ propriedade	
Sódio (mmol/L)	145
Potássio (mmol/L)	4
Cloro (mmol/L)	90
Sais biliares (mmol/L)	40
Colesterol (mmol/L)	3
Fosfolípídeos (mmol/L)	7
Peso seco (mg/mL)	20
Osmolaridade (mOsm/L)	280
pH	7,5-8,0

Adaptado de Begley, Gahan *et al.*, 2005

Microorganismos entéricos são sujeitos a concentrações de bile que podem variar entre 0,2-2,0% no intestino delgado (Hung & Mekalanos, 2005). Os mecanismos usados pelas bactérias gram-negativas para resistir aos efeitos deletérios da bile são os lipopolissacarídeos (LPS) (Nesper *et al.*, 2002), bombas de efluxo e alterações da permeabilidade da membrana externa, por meio de alteração ou perda de porinas (Poole, 2002).

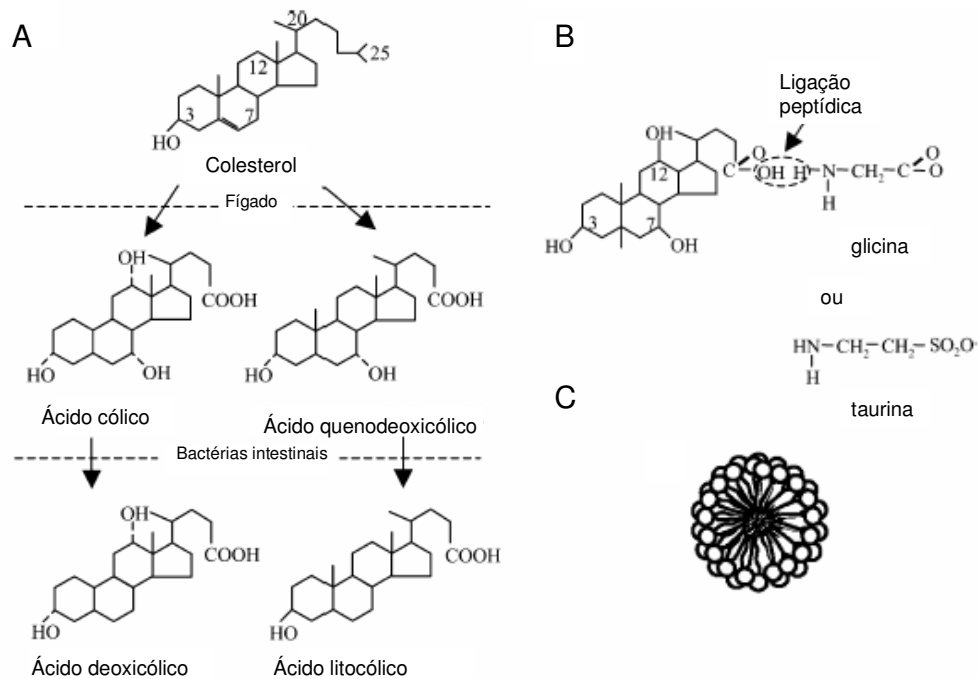


Figura 7 – A- Estruturas químicas dos principais ácidos biliares da bile humana. B-Todos os sais biliares são conjugados com glicina ou taurina antes da secreção. C- Ácidos biliares são anfipáticos e podem auto associar para formar agregados macromoleculares chamados micelas Adaptado de Begley, Gahan *et al.*, 2005.

Existem evidências de que ácidos biliares servem como estímulo *in vivo* para modular a expressão de muitos processos e fatores celulares (Alvarez *et al.*, 2003; Provenzano & Klose, 2000; Wibbenmeyer *et al.*, 2002). Aparentemente os ácidos biliares funcionam como um sinal quimiotático e induzem a hipermotilidade, mudanças na composição de porinas da membrana externa da célula e formação de biofilme (Begley *et al.*, 2005). Além disto, a bile modula a produção de fatores de virulência dependentes e independentes de ToxT (Butler & Camilli, 2004; Gupta & Chowdhury, 1997; Hung *et al.*, 2006; Prouty *et al.*, 2005; Provenzano & Klose, 2000). Há evidências de que a bile causa uma redução na expressão de CT e TCP em cepas do biótipo clássico (Gupta & Chowdhury, 1997). Curiosamente, estudos recentes utilizando ácidos biliares purificados mostraram uma ativação da expressão de CT e TCP, de modo independente de ToxT, mas dependente de ToxR/ToxS também em cepas clássicas de *V. cholerae* (Hung & Mekalanos, 2005). Além destes efeitos a bile ou sais biliares purificados

causam aumento na expressão de OmpU (Chakrabarti *et al.*, 1996), porina cuja expressão é diretamente regulada por ToxR/ToxS (Figura 5). Não se sabe, entretanto, como estes reguladores centrais de genes de virulência são afetados pela bile.

Em *V. cholerae*, LPS, bombas de efluxo (ToIC) e uma expressão aumentada da porina OmpU, são os fatores descritos até o momento como importantes à tolerância a bile *in vitro* (Begley *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que a bile estimula a produção de biofilme em duas cepas de *V. cholera* O1 e que as células dentro do biofilme são mais resistentes à toxicidade da bile que as células planctônicas (Hung *et al.*, 2006).

1.6 Proteínas de membrana externa (OMPs)

As proteínas de membrana externa (OMPs) em *V. cholerae* são um dos diversos fatores que estão envolvidos na interação entre a bactéria e o meio ambiente, incluindo o epitélio intestinal, e conferem resistência à sais biliares e a fatores de defesa do hospedeiro (Nikaido & Vaara, 1985). Em *V. cholerae* já foram identificadas oito OMPs principais e dentre elas, OmpU e OmpT são as mais bem caracterizadas. Ambas são porinas com diferentes propriedades eletrofisiológicas, OmpU é mais permeável a cátions e OmpT possui baixa seletividade iônica (Chakrabarti *et al.*, 1996; Simonet *et al.*, 2003). Além disto, OmpU, aparentemente possui um papel na adesão bacteriana (Sperandio *et al.*, 1995) e está relacionada à proteção contra peptídeos antimicrobianos e aos sais biliares (Mathur & Waldor, 2004). Quando *V. cholerae* se encontra na presença de bile a porina OmpU tem sua expressão aumentada com concomitante redução nos níveis de OmpT na membrana externa, sugerindo que OmpU seja necessária para resistência à bile. Isto provavelmente se deve ao fato de que os poros de OmpT são bloqueados por sais biliares enquanto que OmpU não é afetada por componentes da bile, já que seu poro possui seletividade catiônica (Provenzano *et al.*, 2001). Além disto, OmpU é essencial para *V. cholerae* montar uma resposta de tolerância a ácidos orgânicos *in vitro*

(Merrell *et al.*, 2001). Apesar destas funções atribuídas a OmpU *in vitro*, mutantes em *ompU* não têm a capacidade de colonização alterada em modelos animais, sugerindo que esta porina não é requerida *in vivo*; resultado semelhante foi observado para mutantes em *ompT* (Osorio *et al.*, 2004; Provenzano *et al.*, 2001).

Recentemente, uma nova proteína de *V. cholerae*, VC_A1008, foi caracterizada como uma OMP expressa em *V. cholerae* sob limitação de fosfato inorgânico (Pi) (von Kruger *et al.*, 2006). A montante do gene correspondente foi detectada uma seqüência com características de caixa Pho sugerindo que *vc_a1008* seja membro do regulon Pho de *V. cholerae*. Diferentemente do que foi observado para *ompU* e *ompT*, mutação no gene *vc_a1008* tornou a *V. cholerae* 40 vezes menos infectiva em camundongos do que as cepas selvagens, sugerindo que VC_A1008 seja necessária para a colonização intestinal (Osorio *et al.*, 2004).

1.7 Biofilme: uma resposta ao estresse

As bactérias em ambientes aquáticos são raramente encontradas na forma planctônica ou de vida livre, na sua maioria estão associadas a superfícies sólidas na forma de biofilme (Costerton *et al.*, 1987). O biofilme é uma comunidade estruturada de bactérias imersa em uma matriz de exopolissacarídeos que se adere a superfícies bióticas e abióticas (Costerton *et al.*, 1987). É um problema médico, industrial e ambiental, em grande parte porque essas comunidades têm características tais como resistência extrema a antibióticos e a biocidas químicos, diferentemente das bactérias de vida livre (Hoyle & Costerton, 1991). Exemplo de biofilmes bacterianos são os formados sobre rochas em minas, em dutos de água potável e tubulações de aparelhos de ar condicionado (Edwards *et al.*, 2000) nas superfícies expostas dos dentes, causando corrosões, cáries dentárias e outros problemas com implicações indesejáveis à saúde (Kolenbrander & London, 1993).

V. cholerae também forma biofilmes e esta propriedade, crucial ao seu sucesso como

um organismo ambiental, também tem contribuído para o surgimento de epidemias e pandemias e também para patogenicidade propriamente dita (Kierek & Watnick, 2003; Watnick & Kolter, 1999). Formação de biofilme e a entrada em um estado viável, mas não cultivável, em resposta a falta de nutrientes, são fatores importantes por facilitar a persistência no habitat aquático natural durante períodos entre epidemias, quando a bactéria se encontra em associação com plânctons, crustáceos, insetos, e plantas (Reidl & Klose, 2002).

Os biofilmes formados por *V. cholerae* oferecem defesa contra diferentes estresses ambientais incluindo predação por protozoários (Matz *et al.*, 2005), luz ultravioleta (Espeland & Wetzel, 2001), agentes oxidantes (Elkins *et al.*, 1999), metais tóxicos (Teitzel & Parsek, 2003), sistema imune do hospedeiro (Jefferson, 2004) e agentes antimicrobianos (Jefferson, 2004).

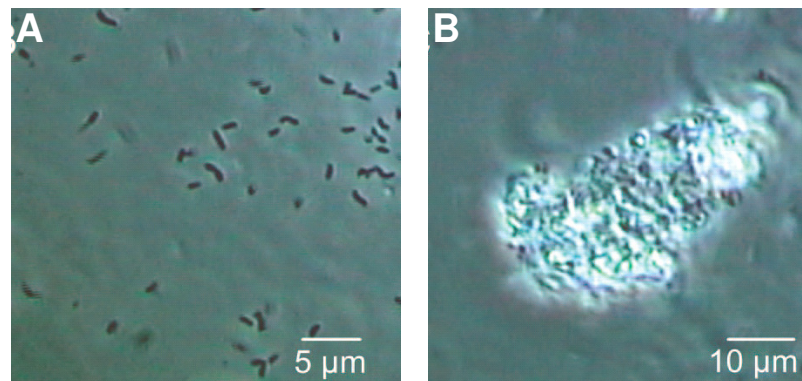


Figura 8 - Micrografias de diferentes frações de fezes de pacientes com cólera. A- células planctônicas e B- biofilme. Adaptado de Faruque, Biswas *et al.*, 2006.

A formação de biofilme por *V. cholerae* envolve três estágios distintos, o planctônico, a monocamada e finalmente o biofilme, controlados por várias vias reguladoras (Figuras 8 e 9). O estágio planctônico consiste em bactérias de vida livre que podem possuir ou não apêndices como flagelo e pili tais como o pilus regulado por quitina e TCP (Kachlany *et al.*, 2001; Sauer & Camper, 2001). A ausência destes apêndices aparentemente não impede o processo, mas há relatos de que eles aceleram a formação dos biofilmes (Klausen *et al.*, 2003; Watnick & Kolter, 1999; Watnick *et al.*, 2001).

A monocamada é formada por células planctônicas associadas a uma superfície (Figura 9-1), esse processo pode ser estimulado pela hemaglutinina sensível a manose (MSHA), um pilus do tipo IV (Watnick *et al.*, 1999). Para formar microcolônias as bactérias se movem ao longo do substrato (Figura 9-2) e aderem umas às outras e iniciam a síntese de exopolissacarídeos através da expressão de genes *vps* (síntese de polissacarídeo em *Vibrio*) (Yildiz & Schoolnik, 1999) (Figura 9-3). Finalmente uma estrutura tridimensional organizada, o biofilme, é formada (Figura 9-4). Esta estrutura é composta de pilares de bactérias cercados por canais de água pelos quais nutrientes atingem as bactérias associadas ao biofilme e metabólitos tóxicos podem ser transportados para fora da estrutura (Costerton *et al.*, 1995). Bactérias podem se desassociar dos biofilmes para aumentar o número de formas planctônicas no meio, que podem aderir em outras superfícies para formar novos biofilmes (Figura 9-5).

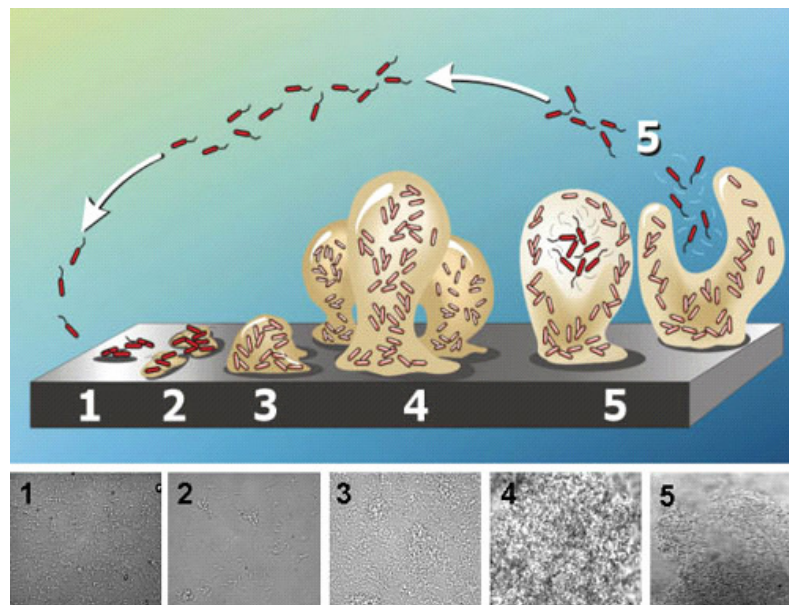


Figura 9 - Etapas na formação de biofilme. Fonte: <http://biology.binghamton.edu/davies/research.htm>

A passagem do estágio planctônico para o biofilme e vice-versa, envolve uma série de mudanças na expressão gênica e na fisiologia da bactéria (Watnick & Kolter, 1999). *V. cholerae* apresenta duas variantes de colônias morfológicamente distintas denominadas lisas e rugosas. A transição de morfotipos é uma resposta a estresses ambientais. Formação de biofilme e resistência a estresses são aumentadas pela transição do morfotipo liso para o rugoso, que forma biofilmes bem desenvolvidos e mostram maior resistência a estresse osmótico e oxidativo do que colônias lisas. Maior produção de VPS por colônias rugosas é a grande responsável por esse fenótipo (Morris *et al.*, 1996; Rice *et al.*, 1993; Wai *et al.*, 1998; Yildiz & Schoolnik, 1999).

1.7.1 Fatores ambientais que induzem a formação de biofilmes em *V. cholerae*

A formação de biofilmes proporciona vantagens adaptativas para as bactérias na natureza, portanto é um modo adequado de sobrevivência em ambientes dinâmicos, com várias alterações fisicoquímicas, incluindo concentrações e disponibilidade de nutrientes. Ambientes naturais tais como o solo, sedimentos e ambientes aquáticos são em geral deficitários de nutrientes e condições limitantes de nutrientes, em geral, favorecem a formação de biofilmes (Steinberger *et al.*, 2002). Entretanto, muito pouco se sabe sobre a relação entre baixa disponibilidade de nutrientes específicos e a formação de biofilmes. Alguns estudos têm mostrado uma ligação entre a resposta aos níveis extracelulares de Pi, ou seja, expressão do regulon Pho, e produção de biofilmes em bactérias. Em *Pseudomonas sp*, por exemplo, foi demonstrado que gene(s) do regulon Pho controla(m) negativamente a formação de biofilme em meios deficientes em Pi (Monds *et al.*, 2001). No patógeno de plantas, *Agrobacterium tumefaciens*, por outro lado, um aumento na produção de biofilme ocorre sob limitação de Pi via sistema PhoR-PhoB (Danhorn *et al.*, 2004).

Vários outros sinais ambientais tais como monossacarídeos, nucleosídeos e bile foram descritos como ativadores da transcrição dos genes *vps* e, portanto, induzem a formação de

biofilme em *V. cholerae* (Haugo & Watnick, 2002). O processo de sinalização celular via pequenas moléculas difusíveis, conhecido como *quorum sensing*, por outro lado, regula negativamente a expressão do operon *vps*, e conseqüentemente, a formação de biofilmes por cepas clássicas de *V. cholerae*. Porém, não é certo que esta observação se aplica para cepas de *V. cholerae* do biótipo El Tor (Hammer & Bassler, 2003; Wai *et al.*, 1999; Zhu & Mekalanos, 2003). Motilidade (Watnick *et al.*, 2001), temperatura (Alam *et al.*, 2007) e composição do meio ambiente (Kierek & Watnick, 2003) também são fatores que afetam a produção de biofilmes por *V. cholerae*. No intestino delgado do hospedeiro são encontrados os sais biliares, detergentes biológicos que induzem um aumento na formação biofilme por *V. cholerae* em LB (Hung *et al.*, 2006).

Portanto, nos interessamos por saber qual seria o efeito de sais biliares na produção de biofilme por *V. cholerae* em condições em que o regulon Pho estivesse ativo. Resultados preliminares sugerem que sob limitação de Pi em presença sais biliares ocorre um aumento expressivo na produção de biofilme *in vitro* pelas cepas clássicas a 30 e 37°C e pela cepa El Tor a 22, 30 e 37°C, em relação aos controles, na ausência de um componente da bile. Além disto, o incremento de biofilme foi acompanhado por uma alteração no padrão das proteínas sintetizadas pela bactéria (Barbosa, 2006).

Como discutido acima, muito se sabe sobre fatores que induzem a formação de biofilme e sobre genes envolvidos no processo em *V. cholerae*. Mas, ainda que a formação de biofilme por bactérias, em geral, ocorra segundo três etapas principais (Costerton *et al.*, 1995), resultados têm mostrado que os mecanismos moleculares, e portanto, as proteínas envolvidas no processo, variam com a espécie e até mesmo de cepa para cepa (Pruzzo *et al.*, 2008) e não há na literatura dados sobre as proteínas do biofilme maduro e como se comparam às expressas pelas células planctônicas. Estas informações dariam uma visão mais geral das características fenotípicas e metabólicas das bactérias em ambas as condições. Com isto em mente, resolveu-se analisar o biofilme maduro de *V. cholerae* O1 N16961 em termo das

proteínas expressas em comparação às células livres. Os resultados desta análise poderiam levar ao desenvolvimento de estratégias para o bloqueio do processo e à descoberta de alvos para o futuro desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra a cólera. Para análise proteômica comparativa das células planctônicas versus biofilme a cepa escolhida foi a cepa El Tor, N16961, que é uma das atuais responsáveis pelos surtos de cólera em vários países do mundo e, dentre as cepas previamente testadas, foi a que apresentou maior produção de biofilme nas condições estabelecidas (Barbosa, 2006).

2.1 Objetivos gerais

- Identificar as proteínas expressas diferencialmente pelo biofilme maduro e células planctônicas de *Vibrio cholerae* O1 e verificar o efeito de mutações em genes específicos na formação do biofilme.

2.1.1 Objetivos específicos

- Analisar e identificar as proteínas diferencialmente expressas por biofilme e células planctônicas da cepa selvagem N16961 El Tor de *Vibrio cholerae* sob limitação de fosfato inorgânico na presença e ausência de deoxicolato de sódio.
- Analisar os efeitos de mutações em genes relacionados à virulência e à resistência a bile, na formação de biofilme pela cepa N16961 El Tor de *Vibrio cholerae*, sob limitação de fosfato na presença ou ausência de deoxicolato de sódio.

3.1 Cepas bacterianas e meios de cultura.

As cepas de *V. cholerae* utilizadas estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Cepas de *V. cholerae* O1 utilizadas neste trabalho.

Cepas*	Descrição
N16961SR	mutante Sm ^r espontâneo derivado da cepa El Tor N16961
WK10	mutante <i>phoB</i> de N16961SR, Sm ^r e Km ^r
CG4	mutante <i>vca1008</i> de N16961SR, Sm ^r e Km ^r
CG6	mutante <i>ompU</i> de N16961SR, Sm ^r e Km ^r
CG5	mutante <i>toxR</i> de N16961SR, Sm ^r e Km ^r

* As cepas listadas foram obtidas no laboratório; Sm^r – resistente à estreptomicina e Km^r – resistente à canamicina

Os meios de cultura utilizados foram LB (bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) pH 7,4 ou LB-ágar 1,5% (Sambrook *et al.*, 1989). Para o cultivo em concentrações conhecidas de fosfato inorgânico (Pi) foi utilizado o meio TG (Tris-glicose) contendo: uma mistura de sais (NaCl 80mM; KCl 20mM; NH₄Cl 20mM; Na₂SO₄ 3mM; MgCl₂ 1mM; CaCl₂ 0,2mM) em Tris-HCl pH 7,4, suplementado com glicose 0,2%, tiamina 0,01M e KH₂PO₄ nas concentrações finais de 65µM para crescimento em nível baixo (LP) ou 6,5mM para crescimento em nível alto de Pi (HP) (Echols *et al.*, 1961; von Kruger *et al.*, 1999). A composição básica do MG é a mesma do TG, exceto pelo uso do ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS) 1,65mM pH 7,4 como agente tamponante ao invés do Tris-HCl. Para MGHP ou MGLP foram utilizadas as mesmas concentrações finais de KH₂PO₄ mencionadas acima para TGHP/LP. O meio MG também foi utilizado para o cultivo em concentrações conhecidas de Pi. Quando necessário deoxicolato de sódio (DOC) a 0,2%,

estreptomicina (Sm) a 100µg/mL e canamicina (Km) a 50µg/mL foram adicionados aos meios. A temperatura de incubação para os crescimentos em LB, TG e MG foi de 37°C sob agitação de 200rpm.

3.2 Crescimento celular e preparação de lisado total para eletroforese bidimensional (2D)

O crescimento celular para preparo de lisados para análise por eletroforese bidimensional foi feito por diversos métodos para conseguir quantidade de células formando biofilme.

3.2.1 Método 1

As bactérias foram crescidas em TGLP sem e com DOC (0,2%), em frascos cônicos de vidro, sob agitação de 200rpm a 37°C por 24 ou 48h. Cada frasco cônico tinha capacidade de 125ml, dentro do qual foram adicionados 20 mL do meio. As culturas em TGLP continham apenas células planctônicas, as culturas em TGLP/DOC continham células planctônicas e biofilme, formado por células aderidas às paredes do frasco. Células livres foram coletadas por centrifugação das culturas (12.000g por 10min a 15°C) e o biofilme foi coletado por raspagem da superfície do frasco, seguido de centrifugação nas mesmas condições. Células e biofilme foram lavados 1 vez com tampão fosfato-salino, PBS (NaCl 140mM, KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,5mM, pH 7,4) e os sedimentos foram ressuspensos em tampão de lise 1 [uréia 8M, tiouréia 2M, Triton X-100 4% v/v, DTT 50mM, *Pharmalyte* (SIGMA) 0,5% v/v] (Berkelman & Stenstedt, 2003) por 2 horas à temperatura ambiente (von Kruger *et al.*, 1999). Para uma DO₆₀₀=10 foram usados 500µL do tampão de lise. As proteínas nos lisados foram precipitadas com TCA 10% por 30min em gelo e o precipitado foi coletado por centrifugação 30.000g por 30min a 14°C (Sambrook *et al.*, 1989). Os sedimentos contendo as proteínas não solubilizadas

no tampão de lise 1 foram ressuspensos no tampão de hidratação (uréia 8M; ASB-14 1% v/v; DTT 50mM; *Pharmalyte*[®] (*SIGMA*[®]) 0,5% v/v; azul de bromofenol 0,002% p/v) (Berkelman & Stenstedt, 2003) e as soluções foram submetidas a ultracentrifugação a 66.000g/30min/4°C. Sobrenadantes e sedimentos foram separados e esses foram ressuspensos no tampão de hidratação mencionado acima. Ambas as soluções foram utilizadas para reidratar tiras de poliacrilamida *Ready strip IPG strip*[®] de 7cm, pH 4-7 (*GE Healthcare*), para a focalização isoelétrica, a primeira parte da análise 2-D.

3.2.2 Método 2

As bactérias foram crescidas em meio TGLP sem e com DOC (0,2%), em placas de Petri de plástico sem agitação por 48h a 37°C. As culturas em TGLP continham apenas células planctônicas, as culturas em TGLP/DOC continham células planctônicas e biofilme, formado por células aderidas à placa. Células e biofilme foram coletados por centrifugação seguida de 3 lavagens com PBS e os lisados foram preparados exatamente como descrito no item 3.2.1 “Método 1”.

3.2.3 Método 3

As células foram cultivadas por 48h em MGLP pH 7,4 sem e com DOC (0,2%) a 37°C, sem agitação, em placas de Petri de plástico. As culturas em MGLP só continham células planctônicas e as culturas em MGLP/DOC só continham biofilme. Os sedimentos das células planctônicas e biofilme, após serem lavados 3 vezes com PBS, foram ressuspensos diretamente em tampão de lise 2 (uréia 8M, tiouréia 2M, ASB-14 1% v/v, DTT 50mM, *Pharmalyte* (*SIGMA*) 0.5% v/v) (Berkelman & Stenstedt, 2003) e os lisados foram preparados como descrito no item 3.2.1, Método 1. Após a ultracentrifugação, os sedimentos (muito pequenos) foram desprezados

e os sobrenadantes de ambos, células planctônicas e biofilme, foram tratados com reagentes do “*Clean Up Kit*” (*GE Healthcare*).

3.3 Extração das proteínas de membrana externa ligadas à parede celular (OMPs-Pg)

OMPs-Pg (*outer membrane proteins* ligadas ao peptídeo glicana) foram extraídas de bactérias e biofilme cultivados como descrito no item 3.2.3, segundo o método de Rosembusch (1974), com modificações. Sedimentos lavados de células planctônicas e biofilme foram ressuspensos em 500 μ L de Tris-HCl 20mM pH 7,5 com PMSF 5mM e rompidos por sonicação (quatro ciclos de 20 pulsos de 1 segundo, em banho de gelo). Aos lisados foram adicionados 5 μ L de RNase (10mg/mL) e 3 μ L de DNase (1mg/mL). O material foi incubado por 20min a 37°C, e ultracentrifugado, em seguida, a 66.000g por 30min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos individualmente em 500 μ L de PBS com N-lauril sarcosinato de sódio 1% e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido de ultracentrifugação a 66.000g por 60min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos, ressuspensos em 500 μ L de SDS 2% em Tris-HCl 20mM pH 7,5, foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. O material foi novamente ultracentrifugado a 66.000g/60min/15°C, os sedimentos foram ressuspensos em 500 μ L de solução (NaCl 0,4M; EDTA 5mM; azida de sódio 5mM e β -mercaptoetanol 0,05%) e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Após uma nova etapa de ultracentrifugação (66.000g por 2h a 15°C) os sobrenadantes foram analisados por SDS-PAGE, como descrito no item 3.4.1.

3.4 Análise eletroforética de proteínas

3.4.1 Gel unidimensional (SDS-PAGE)

O lisado total para análise por eletroforese unidimensional foi feito a partir de células ressuspendidas em PBS na proporção: $DO_{600nm} \times \text{volume de cultura (ml)} = 0,25$, foi utilizado 20 μ L de mistura 1:1 de PBS e tampão de amostra 2x (glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, DTT 122mM, Tris-HCl 0,1M pH 6,8). Após 100°C/5min a suspensão foi centrifugada a 16.000g por 10min e o sobrenadante submetido à eletroforese (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras protéicas dos lisados de células planctônicas e biofilme foram analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% (Laemeli, 1970). O gel foi corado com solução de azul de Coomassie (Coomassie *Blue* R-250 0,25% em metanol 45% e ácido acético glacial 10%) durante a noite e descorado com uma solução contendo metanol 30% e ácido acético glacial 10%.

3.4.2 Gel bidimensional (Focalização isoeétrica e SDS-PAGE)

Para a primeira dimensão, a focalização isoeétrica (FI), foram utilizadas *Immobiline Dry Strips*[®] (GE Healthcare) de 7cm ou 11cm e a focalização foi realizada no equipamento Multiphor II[®] (GE Healthcare) acoplado à fonte *EPS-3501XL*[®] (GE Healthcare), sob refrigeração a 20°C. Amostras de proteínas contendo cerca de 100 μ g/120 μ L ou 200 μ g/200 μ L foram utilizadas para reidratar, respectivamente, tiras de poliacrilamida *Immobiline Dry strip* de 7cm e de 11cm, pH 4-7 (GE Healthcare) durante a noite no suporte *Immobiline Dry Strip Reswelling Tray*[®] (GE Healthcare). Cada tira reidratada foi submetida à FI de acordo com instruções da GE Healthcare. Após a focalização isoeétrica e antes da segunda dimensão, cada tira foi incubada em solução de equilíbrio (Tris-HCl 50mM pH 7,8; uréia 6M; glicerol 30% v/v; SDS 2% p/v; azul

de bromofenol 0,002% p/v) em duas etapas de 15min, à temperatura ambiente e agitação suave: (a) em solução acrescida de 10mg/mL de DTT como agente redutor e (b) na mesma solução contendo 25mg/mL de iodoacetamida como agente alquilante. Por fim, cada tira foi apoiada lateralmente sobre um papel de filtro, para retirada do excesso de solução, e aplicada sobre o gel de poliacrilamida 12,5%, ao lado de uma amostra de um padrão de proteínas (14,4-116kDa, *Fermentas*), para futura determinação das massas moleculares relativas de cada *spot*. A segunda dimensão, SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5%, de dimensões 12,5cm x 26cm x 0,5mm de espessura montado sobre um filme GelBond PAG film (Amersham Pharmacia Biotech)(Westermeier, 2001), também foi realizada no MultiphorII (*GE Healthcare*) de acordo com as instruções do fabricante. Após a eletroforese, o gel foi incubado por uma hora na solução de fixação (etanol 30%, ácido fosfórico 2%), lavado rapidamente (ácido fosfórico 2%) e corado (Coomassie *Blue* G-250 0,1% p/v em etanol 18%, ácido fosfórico 2%) por 72 horas. Os géis foram digitalizados no ImageMaster LabScan v3.01 (com resolução de 300dpi) e analisados no programa ImageMaster Platinum v1.0 (*GE Healthcare*). Para dosagens de proteínas nas amostras dos lisados foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976) e solução de albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.5 Análise de imagens dos géis bidimensionais

A análise das imagens foi feita pelo programa ImageMaster Platinum v1.0 (*GE Healthcare*), conforme recomendações do manual (Berkelman & Stenstedt, 1998). Resumidamente os *spots* nos géis foram inicialmente detectados automaticamente e, em seguida, submetidos a uma análise manual mais apurada para identificar possíveis erros de detecção. A seguir foi feita a remoção do *background* e normalização.

Para análise das proteínas diferencialmente expressas foram comparadas amostras de duas condições: células planctônicas versus biofilme. Para cada condição foram obtidos géis

em triplicata. Cada gel do conjunto de triplicatas foi denominado “gel membro”. Os três géis membros foram sobrepostos e um “gel mestre” foi obtido para cada condição, contendo apenas os *spots* comuns aos géis membros. A posição e densidade ótica de cada *spot* nos géis “mestre” é uma média dos valores obtido para o *spot* nos géis membros. *Spot* não presente em todos os 3 géis membros ou cujo volume relativo diferiu mais de 20% entre eles não foi considerado para as futuras análises.

Para identificar proteínas específicas de cada condição estudada, interseções de dois géis mestres foram obtidas e comparadas. *Spots* comuns aos três géis mestres foram considerados diferencialmente expressos quando seu volume relativo variou em mais de 3 vezes de um gel para o outro. O volume relativo de um *spot* protéico (% Vol) é um valor normalizado, que o torna relativamente independente de variações entre géis, geralmente causadas pelas condições experimentais (Amersham Biosciences & Genenbio, 2003). O volume relativo, %Vol, é expresso como abaixo: onde, Vol é o volume do *spot* de interesse e Vol_s é o volume de cada *spot* S em um gel contendo n *spots*.

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{S=1}^n Vol_s} \times 100$$

3.6 Análise das proteínas por espectrometria de massas

Fragmentos do gel bidimensional contendo *spots* individuais foram removidos com o auxílio de uma lâmina e transferidos para um tubo, previamente lavado com metanol. Cada *spot* no fragmento de gel foi descorado com 1mL de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25mM pH 8,0 por 40min à temperatura ambiente. O líquido foi descartado e sobre cada fragmento foram colocados 10µL de acetonitrila 100%; após seco sob vácuo em *Speed-Vac* por 20 minutos, cada fragmento foi incubado com 10µL de uma solução de tripsina 10µg/mL em

bicarbonato de amônio 25mM pH 8,0 (*Porcine Trypsin*, Promega), durante a noite a 37°C, para digestão da proteína *in-gel*. O volume remanescente da solução de tripsina, que não foi absorvido pelo gel, foi transferido para um tubo limpo. Cada fragmento foi lavado duas vezes por 30 minutos com 25µL de uma solução contendo acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 5%, e as soluções de lavagem foram reunidas ao tubo com a solução de tripsina. O volume da mistura foi reduzido para 5µL sob vácuo (*Speed–Vac*) e então passado em colunas de C18 para remover possíveis contaminantes. A amostra foi misturada com a matriz de ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico (CHCA) em solução 50% de acetonitrila e 1% de ácido trifluoroacético e analisados no aparelho MALDI-TOF/TOF (4700 *Explorer Proteomics Analyzer*, *Applied Biosystems*). Nesta técnica, para a dissociação por colisão do íon precursor, foi utilizado N₂ como gás indutor, a pressão de $2,8 \times 10^{-6}$ torr. As massas dos picos do espectro resultante, devidamente calibradas, foram utilizadas para buscas no banco de dados através do programa Mascot (*Matrix Science*) (Perkins *et al.*, 1999).

3.7 Identificação das proteínas

As buscas nos bancos de dados foram feitas pela interface do Mascot (Perkins *et al.*, 1999), utilizando o banco de dados do NCBI, e o modo de busca por identidade e considerando o incremento de massa resultante da alquilação das cisteínas pela iodoacetamida durante a etapa de equilíbrio das tiras eletrofocalizadas.

3.8 Análise computacional das proteínas hipotéticas

Uma série de ferramentas computacionais foi usada com o intuito de prever funções para as proteínas hipotéticas. O programa BLASTp foi usado para procurar similaridades de sequências (Altschul *et al.*, 1990). Os óperons foram preditos utilizando o programa *Operon Predicting in Microbial Genomes* (Ermolaeva *et al.*, 2001).

3.9 Ensaio de formação de biofilme

As cepas bacterianas selvagem e mutantes foram crescidas durante a noite sob agitação a 37°C em meio LB com os antibióticos apropriados. No dia seguinte as culturas foram diluídas para uma densidade ótica (DO_{600}) de 0,5 nos meios LB, MGLP e MGLP/DOC e 100µL foram colocados em poços de placas de microtitulação de PVC com fundos arredondados. As placas foram, então, cobertas com um plástico adesivo, pequenos furos foram feitos no plástico sobre cada poço e as placas foram incubadas a 22°C e 37°C.

Após 24h, os poços foram lavados com água destilada, cobertos individualmente com 200µL de solução aquosa de cristal violeta 0,1% e deixados por 1 hora em temperatura ambiente. Os poços foram lavados rapidamente com água destilada e as bactérias aderidas foram solubilizadas com 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade ótica da solução foi medida por espectrofotometria a 570nm (Utrospec 3000, Pharmacia Biotech) tendo DMSO puro como branco.

Os resultados foram analisados como o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc) e o teste ANOVA com $P < 0,05$.

4.1 Efeito do meio de cultura e temperatura de incubação na formação de biofilme pela cepa N16961 de *V. cholerae* O1

Análises preliminares mostraram que a formação de biofilme pela cepa N16961 de *V. cholerae* O1 varia no meio em que as células se encontram e também com a temperatura de incubação. Além disto, a adição de componentes da bile a meios de cultura, definidos e ricos, leva a um aumento na produção de biofilme pela cepa (Barbosa, 2006; Hung *et al.*, 2006). No presente trabalho reavaliamos a formação de biofilme pelas bactérias em meio LB, e meio definido com altas (HP) e baixas (LP) concentrações de Pi, na ausência ou presença de DOC 0,2% e em temperaturas de 22°C (temperatura média dos meios aquáticos) e 37°C (temperatura média do hospedeiro animal) (Figuras 10 e 11).

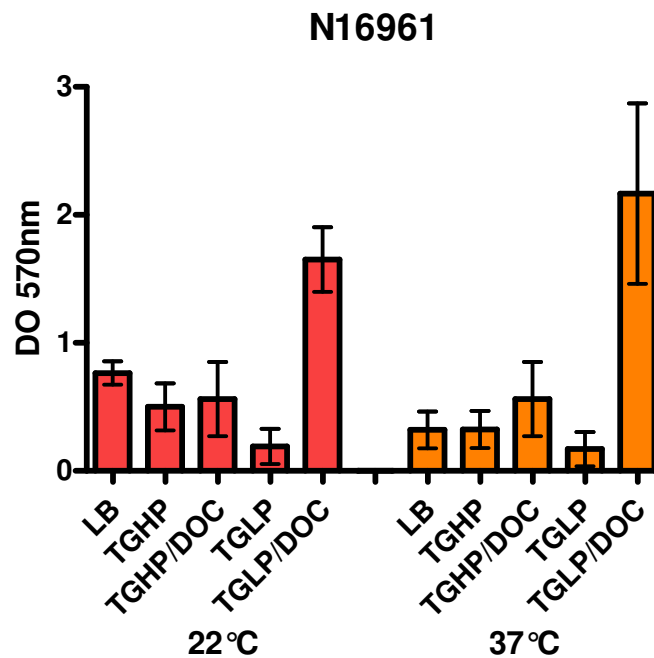


Figura 10 – Formação de biofilme pela cepa selvagem N16961 em LB, TGHP, TGHP/DOC, TGLP e TGLP/DOC a 22°C e 37°C. Número de experimentos para cada parâmetro ≥ 3 . As barras representam a média dos valores obtidos e o desvio padrão.

O padrão de formação de biofilme pela cepa N16961 a 22°C e 37°C foi semelhante. Ou seja, em ambas as temperaturas quantidades semelhantes de biofilme foram produzidas em meios ricos em Pi, LB e TGHP, e uma produção reduzida foi observada em baixos níveis de Pi, TGLP. A adição de um componente da bile, o deoxicolato de sódio (DOC), não alterou significativamente a formação de biofilme em meio definido com alto Pi, TGHP, entretanto, causou um aumento significativamente maior ($P < 0,05$) em TGLP. Quando as duas temperaturas são comparadas, (Figuras 10 e 11), observamos que o DOC causou um incremento na produção de biofilme em TGLP de cerca 7 vezes a 22°C e de 9 vezes a 37°C, ou seja, um aumento maior a 37°C ($P < 0,05$).

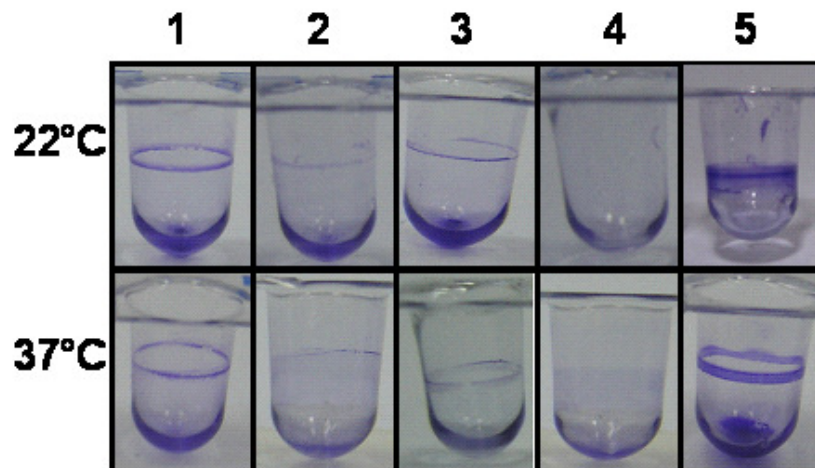


Figura 11 - Biofilme produzido por N16961 a 22°C e 37°C C, após 24 h, nos meios: 1- LB, 2 – TGHP, 3 - TGHP/DOC, 4 -TGLP e 5 -TGLP/DOC. O biofilme foi corado com solução de cristal violeta 0,1%.

4.2 Análise proteômica da formação de biofilme: eletroforese unidimensional

A formação de biofilme em bactérias é acompanhada de uma profunda alteração na expressão gênica e, portanto, no perfil das proteínas expressas. Portanto, analisamos inicialmente o conjunto de proteínas expressas pela cepa N16961 na forma planctônica versus biofilme a 37°C em TGLP e TGLP/DOC 0,2%, isto é, nas condições onde produção de biofilme foi mais abundante. Para isto as células foram cultivadas nas condições descritas no item 3.2.1

(Método 1, Material e Métodos) e os lisados totais de células planctônicas e biofilme foram preparados e analisados por SDS-PAGE, como no item 3.4.1 (Material e Métodos).

Os padrões protéicos de células planctônicas e biofilme apresentaram diferenças marcantes (Figura 12). Nos pontos em vermelho na figura 12 podem ser vistas regiões do géis com algumas das bandas protéicas distintas entre as duas amostras. Portanto, decidiu-se fazer uma segunda análise, por eletroforese bidimensional, para que as diferenças entre os padrões fossem resolvidas com mais detalhes e as proteínas individuais pudessem ser removidas do gel para futura identificação.

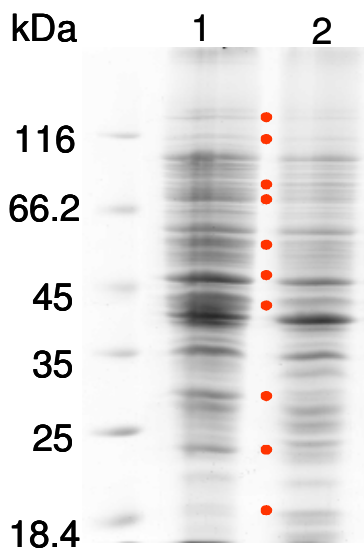


Figura 12 - Análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% de células planctônicas (1, TGLP) e biofilme (2, TGLP/DOC) após 37°C/24h. Proteínas expressas diferencialmente estão marcadas com pontos vermelhos. À esquerda é apresentado o padrão de massa molecular de proteínas.

4.3 Análise proteômica da formação de biofilme: eletroforese bidimensional (2D)

Para uma análise proteômica por eletroforese 2D seria necessário cultivar volumes maiores de culturas para que tivéssemos as massas protéicas necessárias. Três protocolos, que diferiram basicamente nas condições e meio de cultivo, foram testados antes de se decidir pelo mais adequado para a análise 2D.

4.3.1 Crescimento bacteriano e análise dos lisados preparados como descrito no item 3.2.1- Método 1

O crescimento foi feito em frascos cônicos (Erlenmeyer) em meio TGLP ou TGLP/DOC 0,2% por 48 horas/37°C com agitação de 200rpm, como descrito no item 3.2.1. Após o período de incubação, a cultura em TGLP só continha células planctônicas enquanto que a cultura em TGLP/DOC continha, além das células planctônicas, halos de bactérias aderidas às paredes do frasco (biofilme) (Figura 13).

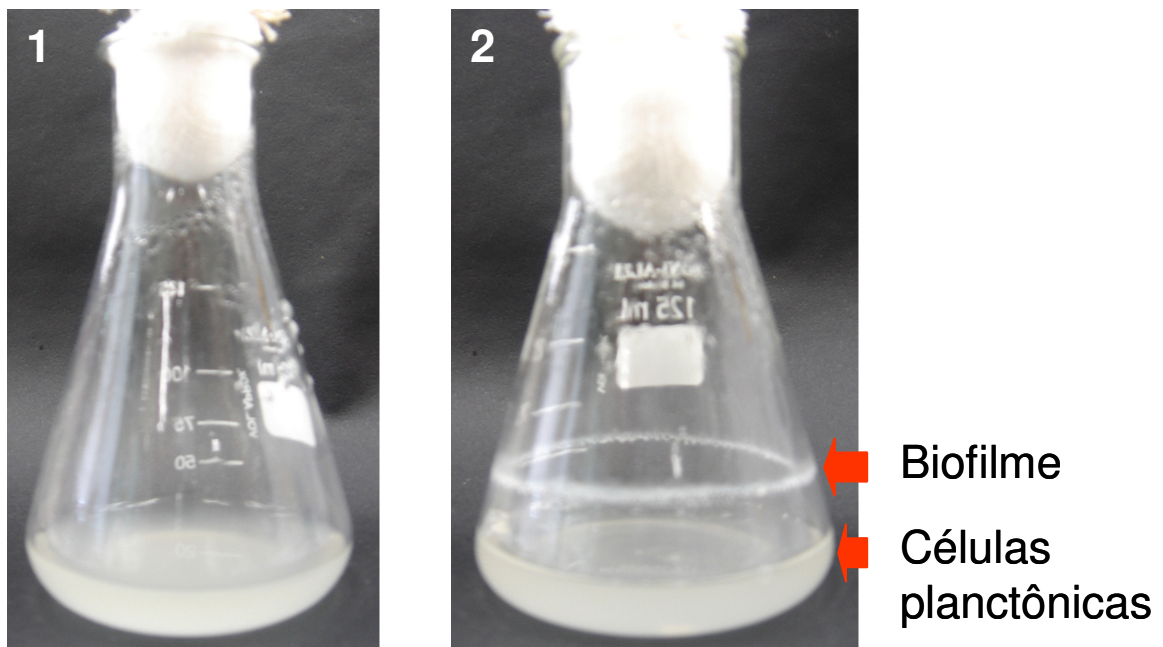


Figura 13 – Crescimento das bactérias da cepa N16961 por 48h/37°C/200rpm, em frascos cônicos de 125mL aos quais foram inoculados 20 mL de meio TGLP (1) e TGLP/DOC (2).

Lisados de células planctônicas e de biofilme derivados dessas culturas foram preparados como descrito no item 3.2.1. Ao final desse protocolo, cada amostra deu origem a duas soluções protéicas: (a) que deveriam conter, preferencialmente, as proteínas do citoplasma, periplasma e membrana citoplasmática da célula, que foram solubilizadas com Triton X-100 (Schnaitman, 1971) e (b) outra contendo, na sua maioria, as proteínas de membrana externa, solubilizadas pelo detergente ASB-14 (Molloy *et al.*, 2000). Na figura 14

podem ser vistos seis minigéis (A-F), resultantes de uma análise por eletroforese 2D, de lisados de células planctônicas e biofilme cultivado e preparado pelo Método 1. Para a focalização isoeétrica das proteínas foram utilizadas tiras *Immobiline Dry Strips*[®] de 7cm, gradiente de pH 4-7 e para o SDS-PAGE, minigéis de poliacrilamida a 12,5% de 10cm X 7cm x 0,75mm. Os géis A e B mostram, respectivamente, as proteínas da amostra (a- solúveis em Triton X-100) e (b- solúveis em ASB-14) preparadas a partir das bactérias cultivadas em TGLP, ou seja, de células planctônicas. Os géis C e D contêm, respectivamente, as proteínas das soluções (a) e (b) das células planctônicas de TGLP/DOC 0,2% e os géis E e F, as proteínas de (a) e (b) derivadas do biofilme em TGLP/DOC 0,2%. Uma comparação preliminar permite verificar diferenças entre os perfis protéicos das células planctônicas derivadas de TGLP (minigel A) e TGLP/DOC (minigel C). A pequena quantidade de proteínas das amostras (a) e (b) do biofilme impede uma comparação dos perfis de proteínas nos géis E e F com os demais. Análise de cada par de gel (A x B; C x D e E x F) mostra, para todos os casos, que o gel derivado da solução (a) contém inúmeras proteínas presentes também no gel da solução (b). Isto foi demonstrado pelo fato de que proteínas nos *spots* majoritários marcados com círculos vermelho nos géis abaixo (A-F), foram identificadas como OmpU, OmpT, VC_A1008 (fosfoporina putativa) e VC_1770 (hipotética), que são, na sua maioria, típicas de membrana externa. Além disto, a quantidade de proteínas na solução (b), resolvidas nos géis B, D e F foi baixa. Outra limitação desse método foi a pequena quantidade de biofilme (géis E e F) obtida a partir dos 20mL de cultura testados inicialmente, o que implicaria na utilização de inúmeros frascos para obter a quantidade de biofilme necessária para uma única análise. Por esse motivo outros métodos de crescimento foram testados.

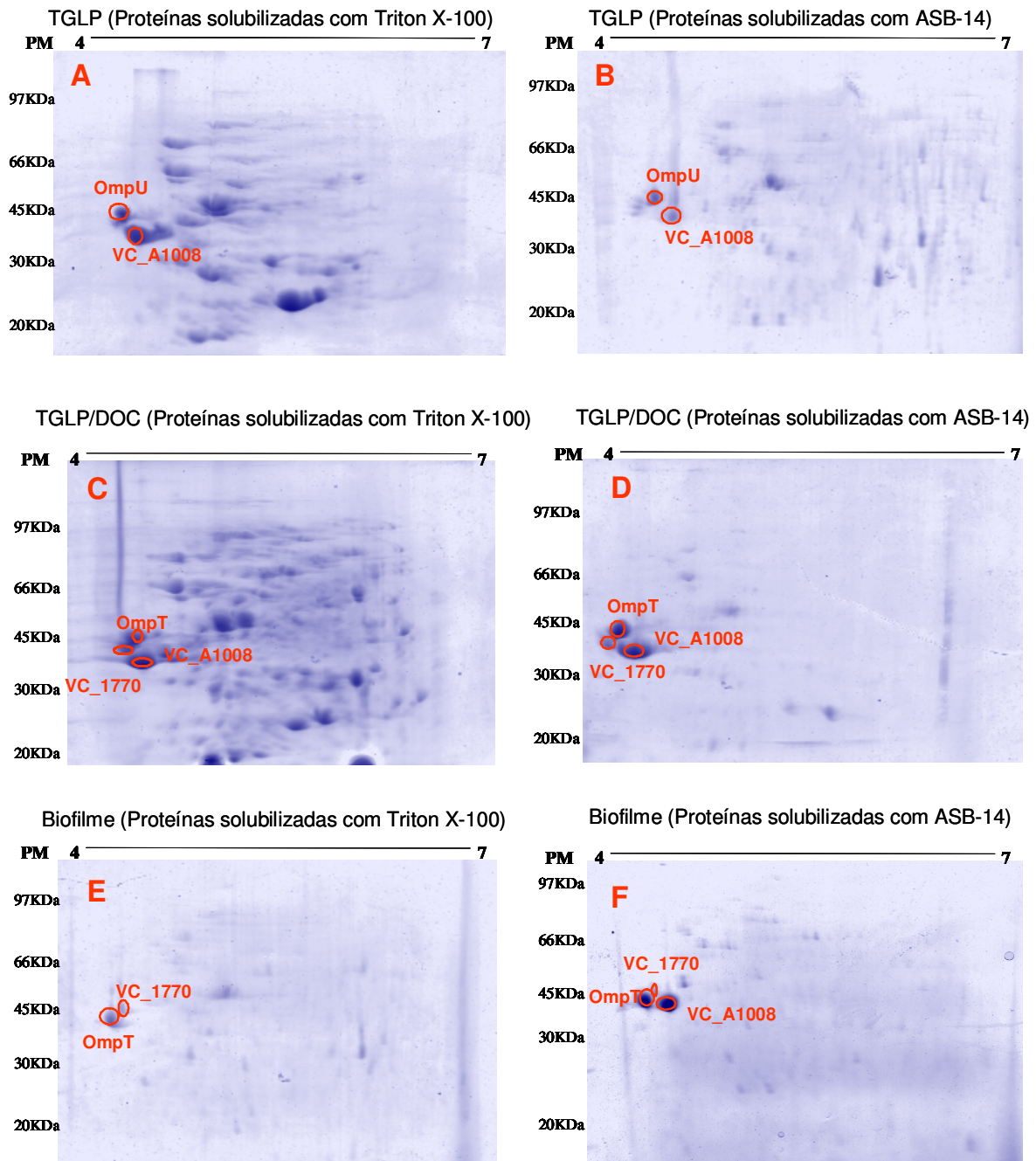


Figura 14 - Géis bidimensionais de células planctônicas e biofilme. Focalização isoeétrica em gradiente de pH 4 a 7 em tiras de poliácridamida de 7cm e SDS-PAGE em minigel de poliácridamida de 12,5%. Proteínas nos géis A, C e E foram solubilizadas com Triton X-100; proteínas nos géis B, D e F foram solubilizadas em ASB-14. Géis: A e B- células planctônicas de TGLP; C e D- planctônicas de TGLP/DOC, E e F biofilme de TGLP/DOC. À esquerda é apresentado o padrão de massa molecular de proteínas.

4.3.2 Crescimento bacteriano e análise dos lisados preparados como descrito no item 3.2.2- Método 2

Para tentar obter uma quantidade maior de biofilme para a análise por eletroforese 2D as células foram cultivadas em placas de petri, em 20 mL de meio, sem agitação, a 37°C. Para compensar a falta da aeração, as placas foram incubadas por 48h ao invés de 24h. Após este tempo nas placas com meio com TGLP/DOC, observamos a presença de material particulado, que consideramos ser biofilme.

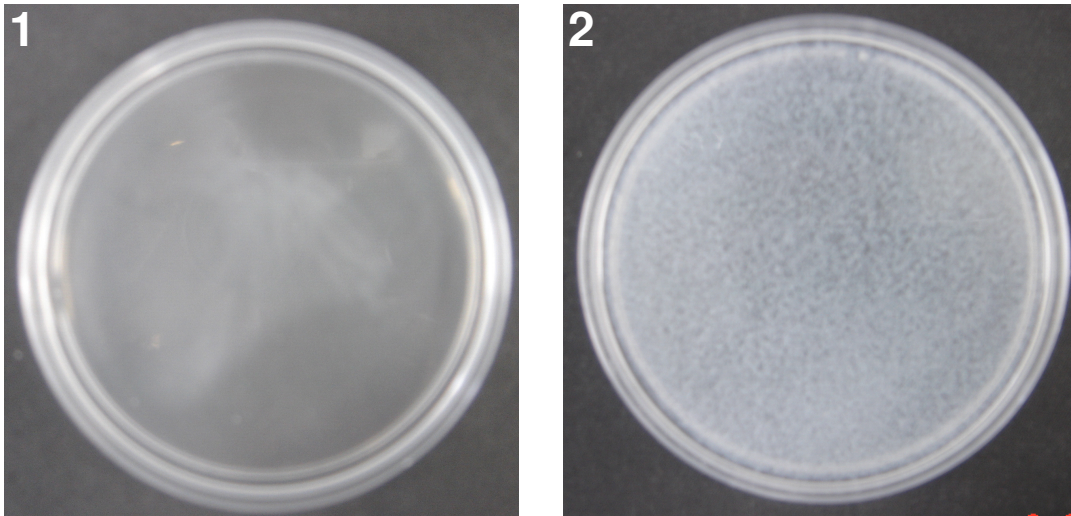


Figura 15 - Crescimento de células N16961 em placa de Petri, sem agitação a 37°C. 1- TGLP (células planctônicas) e 2- TGLP/DOC (biofilme).

Uma análise mais detalhada do material particulado da placa TGLP/DOC ao microscópio óptico de contraste de fase indicou que ele era formado por células em alta densidade e orientadas paralelamente uma as outras em um arranjo típico de biofilme (Cho *et al.*, 2007). Porém, esse material continha ainda fragmentos cristalinos em forma de agulhas; nossa hipótese é de que fossem cristais de ácido deoxicólico derivados do DOC, o que poderia ocorrer caso o meio tivesse sido acidificado durante a incubação. Realmente, análise do pH mostrou

que, ao fim da incubação de 48 horas, o pH do meio era de cerca de 5, uma queda de 2,4 unidades. Consideramos que todas as células em TGLP/DOC se encontravam em biofilme e as derivadas da cultura em TGLP, na forma planctônica (Figura 15). Para coletar as células do biofilme em TGLP/DOC, a cultura foi centrifugada, lavada com PBS e centrifugada novamente. Nesse processo, além de perder parte do biofilme, não conseguimos separar todo o precipitado cristalino do biofilme. Ainda assim, lisados foram preparados, como descrito no item 3.2.2 e analisados em géis uni e bidimensionais. Uma série de problemas foi observada nos géis SDS-PAGE do biofilme, tais como, arrastes das bandas protéicas, provavelmente decorrentes de uma má focalização das amostras, e resolução pobre dos *spots*, portanto, estas amostras não foram analisadas posteriormente e outra condição de crescimento foi testada. Nesta preparação, entretanto, conseguimos obter uma massa maior de biofilme a partir do volume de 20mL de cultura do que no Método 1, sugerindo que o crescimento da bactéria em placa, sem agitação, era mais eficiente.

4.3.3 Crescimento bacteriano e análise dos lisados preparados como descrito no item 3.2.3- Método 3

Para resolver o problema da alteração do pH do meio durante o cultivo a solução foi mudar o agente tamponante. Muitos pesquisadores que trabalham com bactérias sob deficiência de Pi em pH~7,0 usam o ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico ou MOPS, que tampona o meio entre 6,5 – 7,9 (VanBogelen *et al.*, 1996). Assim sendo, mantivemos a mesma composição de sais, glicose e vitaminas do meio TG, o pH em 7,4, e substituímos o Tris-HCl pelo MOPS no meio MG (item 3.2.3, Material e Métodos). Testes iniciais de crescimento da bactéria em MGLP a 37°C em placas sem agitação e em frascos cônicos a 200rpm, mostraram que nessas condições o pH do meio permaneceu constante. Portanto, para o crescimento das células planctônicas e biofilme para análise por eletroforese 2D foram utilizados meio MGLP

pH7,4 sem e com DOC em placas. Ao final da incubação de 48 horas, a diferença entre as culturas era visível. Enquanto a cultura em MGLP era líquida e turva, a cultura em MGLP/DOC apresentava grumos esbranquiçados e um aspecto gelatinoso. Uma observação mais detalhada das culturas ao microscópio óptico em contraste de fase mostrou apenas células planctônicas no meio MGLP e arranjos multicelulares altamente organizados imersos no meio gelatinoso (biofilme) em MGLP/DOC (Figuras 16 e 17). Foi notória também a diferença do número de células em cada cultura e ainda que o número de unidade formadora de colônias (ufc/mL cultura) não tenha sido determinado, foi fácil observar ao microscópio que o ufc/mL em MGLP era bem maior que no biofilme. Portanto, para se obter amostra protéica suficiente para análise por eletroforese 2D, para cada placa de cultura em MGLP eram feitas 4 placas com MGLP/DOC. Para lise de bactérias livres e biofilme, neste caso, foi utilizado o tampão de lise 2 com o detergente ASB-14 ao invés do Triton X-100 (Material e Métodos item 3.2.3) que conhecidamente tem maior capacidade de solubilização. Ao final do procedimento os dois lisados das bactérias planctônicas em MGLP e do biofilme em MGLP/DOC foram analisados por eletroforese 2D.

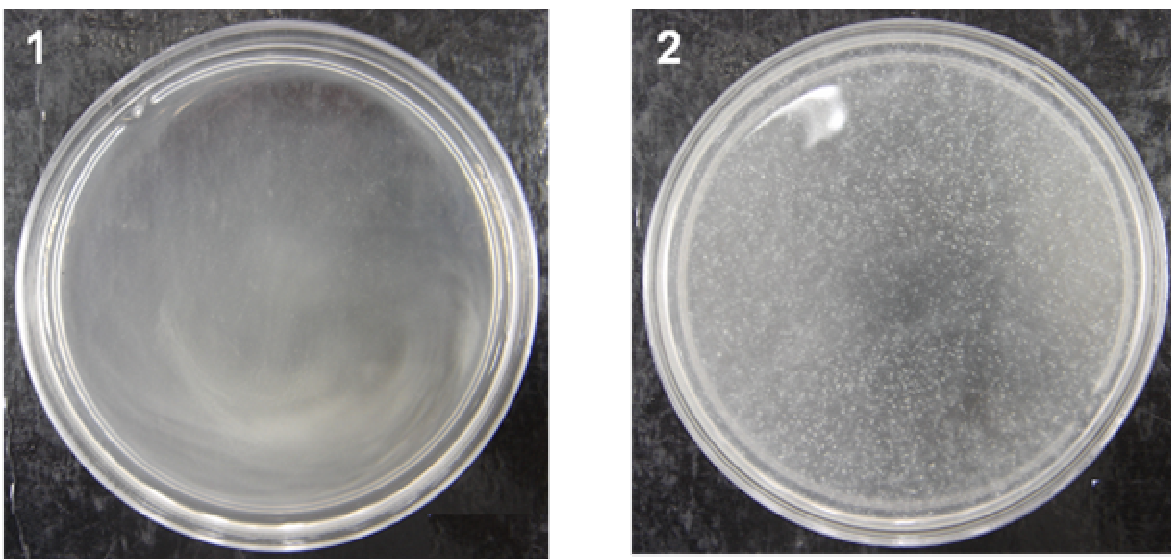


Figura 16 - Crescimento de células N16961 em placa de petri, sem agitação a 37°C por 48 horas. 1- MGLP (células planctônicas) e 2- MGLP/DOC (biofilme).

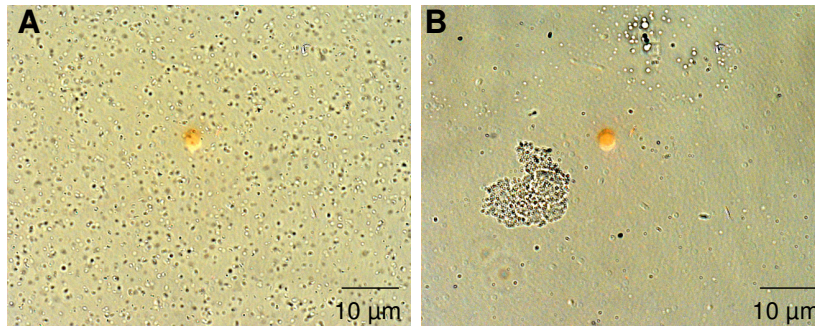


Figura 17 – Micrografia de *V. cholerae* N16961 em MGLP, células planctônicas (A) e em MGLP/DOC, biofilme (B).

Para permitir a visualização do maior número de *spots* protéicos diferenciais entre células planctônicas e biofilme na faixa de massa molecular ≥ 20 kDa, utilizamos para a primeira dimensão tiras de poliacrilamida *Immobiline Dry strip* de 11cm, pH 4-7 e para a segunda dimensão géis de poliacrilamida a 12,5% de 15cm x 12cm x 0,5mm.

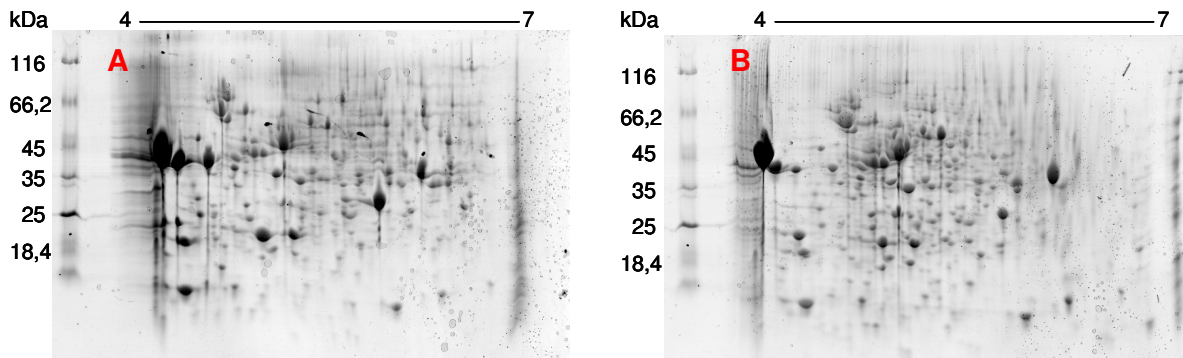


Figura 18 – Proteomas de células planctônicas e biofilme da cepa N16961 obtidos por eletroforese 2D: focalização em gradiente de pH 4-7 em tiras de poliacrilamida *Immobiline Dry strip* de 11cm e segunda dimensão por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 12,5%. Lisado total de células planctônicas de N16961 em MGLP (A) e biofilme em MGLP/DOC (B).

A maioria das proteínas de células planctônicas e biofilme nos géis da figura 18 focalizaram entre pH 4-7, mas em torno do pH 7,0, em ambos géis, pode-se observar uma coluna de proteínas básicas ($pI > 7,0$) precipitadas, que não foram resolvidas nesta análise. A grande maioria das proteínas das duas amostras também aparenta ter massa molecular relativa entre 15 e 70kDa. Apesar destas semelhanças, uma primeira análise mostra que há diferenças

marcantes entre os perfis das proteínas expressas pelas células cultivadas em MGLP e MGLP/DOC a 37°C (Figura 18).

Para um exame mais detalhado dos géis foi empregado o *ImageMaster Platinum* (GE Healthcare), como descrito no Material e Métodos (item 3.5). Este programa permitiu selecionar 243 *spots* protéicos diferencialmente expressos, ou seja, *spots* únicos a uma condição, ou presente nos dois géis, porém em volumes maiores que três vezes de um gel para outro. Quando um *spot* selecionado como diferencialmente expresso estava presente nos dois géis, somente o *spot* expresso em maior quantidade foi coletado para identificação da proteína correspondente. Dos *spots* selecionados 97 foram expressos preferencialmente em MGLP e 146 em MGLP/DOC (Figuras 19 e 20).

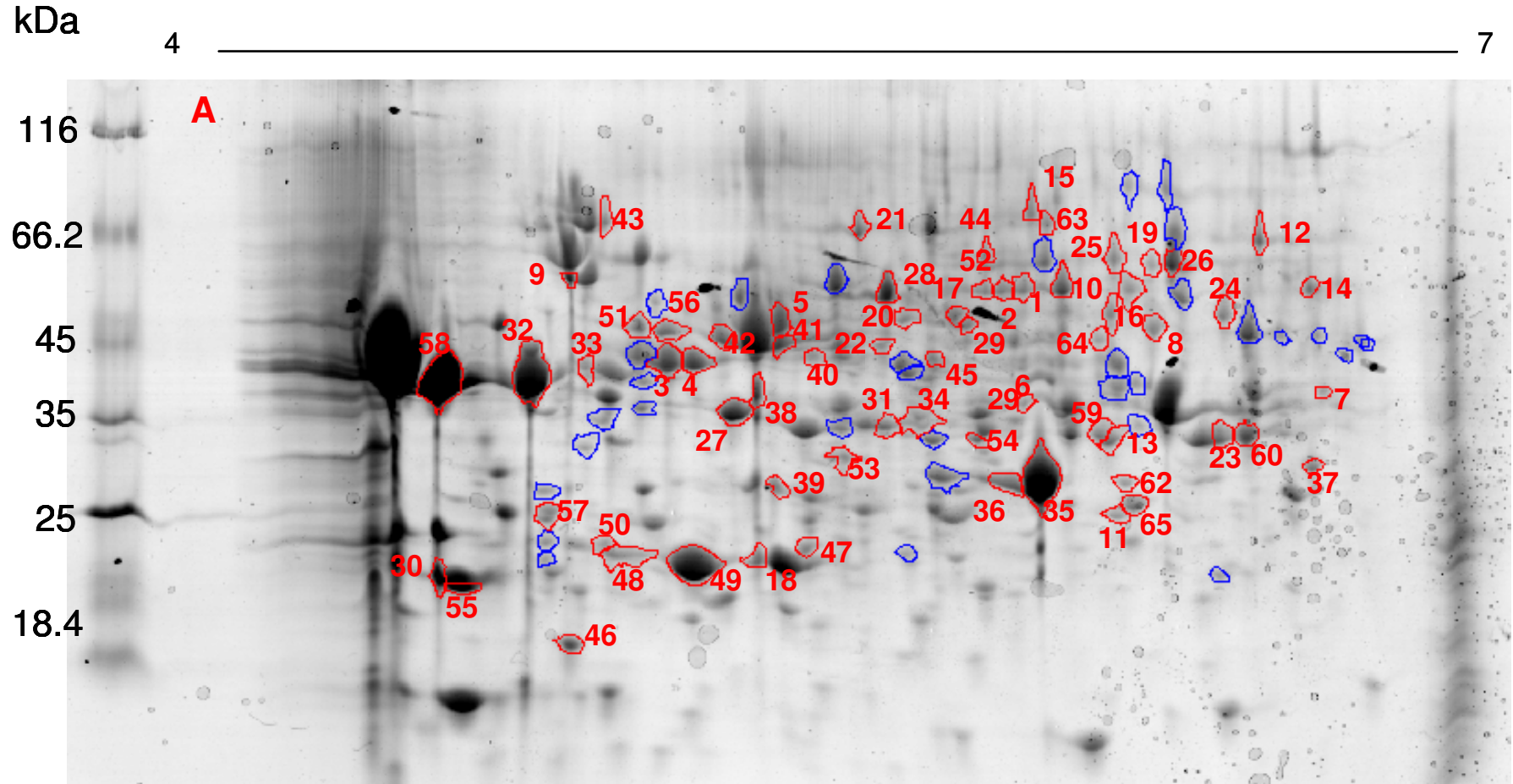


Figura 19 - Proteoma de células planctônicas da cepa N16961 obtido por eletroforese 2D: focalização em gradiente de pH 4-7 em tiras de poliacrilamida *Immobiline Dry strip* de 11cm e segunda dimensão por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 12,5%. Spots selecionados, envolvidos em vermelho e azul, foram diferencialmente expressos e os numerados em vermelho foram identificados. À esquerda é apresentado o padrão de massa molecular de proteínas.

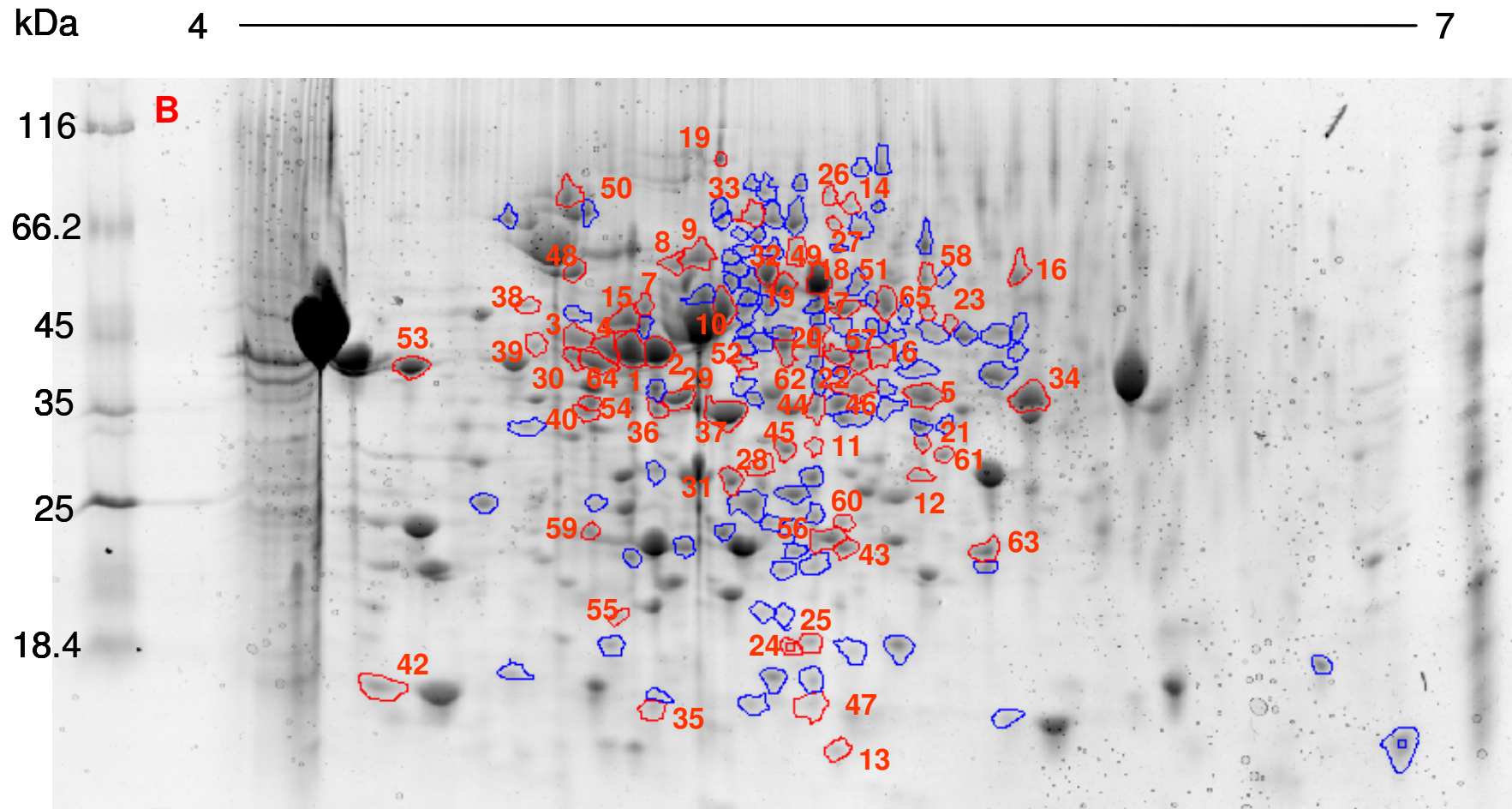


Figura 20 - Proteoma de biofilme da cepa N16961 obtido por eletroforese 2D: focalização em gradiente de pH 4-7 em tiras de poliacrilamida *Immobiline Dry strip* de 11cm e segunda dimensão por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 12,5. Spots selecionados, envolvidos em vermelho e azul foram diferencialmente expressos e os numerados em vermelho foram identificados. À esquerda é apresentado o padrão de massa molecular de proteínas.

4.4 Análise dos lisados contendo proteínas de membrana externa ligadas ao peptídeo glicano (OMPs-Pg).

Embora o tampão de lise utilizado para preparar as amostras descritas no ítem 3.2.3 tenha solubilizado proteínas de membrana além das solúveis, para se ter uma visão mais detalhada das OMPs de células livre e biofilme, amostras do envelope celular foram preparadas e analisadas separadamente. Devido à baixa diversidade de OMPs nas células fez-se uma análise eletroforética em gel 1D (Material e Métodos, itens 3.3 e 3.4.1).

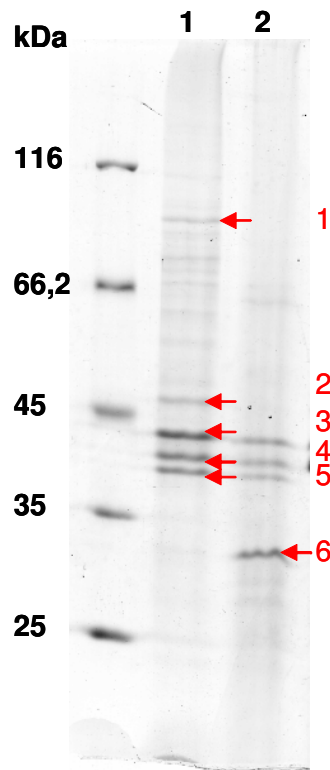


Figura 21 - Proteínas de membrana externa de células planctônicas (1) e biofilme (2) de N16961 analisados por SDS-PAGE em gel de poli-acrilamida de 11%. Proteínas diferencialmente expressas estão marcadas e foram identificadas. À esquerda é apresentado o padrão de massa molecular de proteínas.

A figura 21 mostra o gel das Omps-Pg preparadas a partir de células livres e biofilme de N16961, cultivadas em MGLP e MGLP/DOC, respectivamente. Apesar da tentativa de aplicar quantidades semelhantes de proteínas das amostras no gel da figura 21, vê-se que as pistas 1 e 2 contêm quantidades distintas de proteínas. No entanto, perfil de OMPs das duas amostras foi bem semelhante e as proteínas majoritárias de ambas apresentaram MM entre 35-45 kDa, confirmando dados anteriores de análise de OMPs em amostras de *V. cholerae* cultivadas sob limitação de Pi (von Kruger *et al.*, 1999; von Kruger *et al.*, 2006). As OMPs putativas de células livres e biofilme marcadas no gel foram identificadas por espectrometria de massas (Material e Métodos, item 3.6). Na tabela 5 pode-se notar que, além de OMPs, proteínas solúveis tais como a ribossomal RplB (*spot* 6, VC_2593) e dois fatores de alongamento FusA-2 (*spot* 1, VC_2342) e TufB (*spot* 2, VC_0321) foram isoladas com as OMPs. Contaminações de preparações de proteínas de membrana de bactérias com fatores de tradução e outras proteínas do citoplasma e periplasma são normais e já foram detectadas em preparações de envelope celular, por exemplo, de *E. coli* (Fountoulakis & Gasser, 2003) e *V. cholerae* (von Kruger *et al.*, 2006). As OMPS propriamente ditas nas duas preparações foram OmpT, OmpU e a fosfoporina putativa VC_A1008, identificada pela primeira vez em outra cepa de *V. cholerae* também sob limitação de Pi (von Kruger *et al.*, 1999; von Kruger *et al.*, 2006), sugerindo que células livres e biofilme apresentam perfis semelhantes de OMP-Pg.

4.5 Proteínas expressas por células planctônicas e biofilme identificadas por espectrometria de massas

As proteínas diferenciais entre células planctônicas (MGLP) e biofilme (MGLP/DOC 0,2%) da cepa N16961 somaram 243 *spots*. Das 97 proteínas expressas preferencialmente pela bactéria em MGLP 65 (~70%) foram identificadas e das 146 mais expressas em MGLP/DOC foram identificadas 65 (~50%). Todas as análises foram feitas por espectrometria de massas no

MALDI/TOFTOF, com base no perfil no *peptide mass fingerprinting* (PMF) e seqüência de um ou mais peptídeos trípticos derivados da proteína em análise (Figuras 19 e 20, Tabelas 3 e 4). As proteínas não identificadas provavelmente estavam em pouca quantidade para serem analisadas pelo MALDI/TOFTOF ou não puderam ser identificadas no banco de dados de *V. cholerae* El Tor N16961 e outras espécies de *vibrio* no NCBI. Vale ressaltar que somente 9% dos genes das proteínas identificadas estão localizados no cromossomo II, enquanto a grande maioria (91%) se encontra no cromossomo I de *V. cholera* El Tor, N16961.

Nas tabelas 3 e 4 estão listados números dos *spots* nos géis 2D, dados de MM e pl, genes, nomes e funções correspondentes às proteínas identificadas neste estudo de acordo com TIGR CMR (Ermolaeva *et al.*, 2001). A maioria das proteínas apresentou valores experimentais de massa molecular e pl (MM_e e pl_e) comparável aos teóricos (MM_t e pl_t), uma vez que as diferenças de MM não excederam 10kDa e os valores de pl não diferiram em mais que 1 unidade de pH . Algumas proteínas, no entanto, apresentaram valores experimentais de MM_e e pl_e muito distintos de MM_t e pl_t . Valores menores de MM_e podem ser explicados por perda de peptídeos sinal, no caso de proteínas secretadas e/ou clivagem proteolítica da proteína, valores maiores de MM_e podem ser atribuídos a outras modificações pós-tradução tais como fosforilação, glicosilação, metilação e cofatores (Davidson, 2007). Além disto, a grande maioria das proteínas identificadas foi proveniente de *spots* únicos de cada condição. Assim, dentre as de células planctônicas ~88% eram *spots* únicos, no caso de biofilme os *spots* exclusivos representaram ~84 % das identificadas. Curiosamente, algumas proteínas aparecem nas duas condições, porém em isoformas diferentes, ou seja, com valores de MM_e e ou pl_e distintos. As figuras 22A e B apresentam um agrupamento de todas as proteínas identificadas de acordo com funções celulares na cepa N16961, como definido no TIGR CMR (Ermolaeva *et al.*, 2001).

Tabela 3 - Proteínas diferencialmente expressas em MGLP

Spot	Gene	MM_t	MM_e	pI_t	pI_e	Proteína	Função	Único (*)
Metabolismo de energia								
1	VC_2738	59843	54000	5,6	5,9	Fosfoenolpiruvato carboxicinase PckA	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (6)
2	VC_2738	59843	54000	5,6	5,8	Fosfoenolpiruvato carboxicinase PckA	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (14)
3	VC_0477	41564	20000	4,6	4,8	Fosfoglicerato cinase Pck	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (3)
4	VC_0478	38918	20000	4,6	4,9	Frutose-bisfosfato aldolase, classe II FbaA	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (1)
5	VC_2447	45806	48000	4,7	5,1	Enolase Eno	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (3)
6	VC_2000	35282	35000	6,0	5,9	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase GapA-1	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (1)
7	VC_A0774	36971	50000	6,5	6,8	UDP-glicose 4-epimerase GalE-2	Metabolismo de energia: açúcares	X (3)
8	VC_1905	39838	47000	6,2	6,3	Alanina desidrogenase Ald	Metabolismo de energia: aminoácidos e aminas	X (3)
9	VC_2764	50520	56000	4,5	4,5	ATP sintase F1, subunidade beta AtpD	Metabolismo de energia: interconversão de força motora	X (3)
10	VC_2766	56781	55000	5,4	6,0	ATP sintase F1, subunidade alfa AtpA	Metabolismo de energia: interconversão de força motora	X (6)
11	VC_2767	19558	25000	5,6	6,2	ATP sintase F1, subunidade delta AtpH	Metabolismo de energia: interconversão de força motora	X (3)
12	VC_2089	64509	65000	6,5	6,6	Succinato desidrogenase, subunidade flavoproteína SdhA	Metabolismo de energia: ciclo do CAT	X (1)
13	VC_2084	29940	32000	6,0	6,2	Succinil-CoA sintase, subunidade alfa SucD	Metabolismo de energia: ciclo do CAT	X (5)
14	VC_2295	50638	54000	7,0	6,8	NADH:ubiquinona oxidoreductase, translocação de Na, subunidade alfa	Metabolismo de energia: transporte de elétrons	X (16)

15	VC_1098	42842	76000	5,8	5,9	NqrA Acetato cinase AckA-1	Metabolismo de energia: fermentação	X (11)
16	VC_2412	50994	54000	6,0	6,2	Piruvato desidrogenase, componente E3, lipoamida desidrogenase LpdA	Metabolismo de energia: piruvato desidrogenase	X (8)
17	VC_2656	66405	49000	5,9	5,7	Fumarato redutase, subunidade flavoproteína FrdA	Metabolismo de energia: anaeróbico	X (11)
18	VC_2493	22546	21000	4,8	5,1	Biossíntese de aminoácidos 3-isopropilmalato desidratase, subunidade pequena LeuD	Biossíntese de aminoácidos: família do piruvato	(5)
19	VC_0031	59073	59000	6,1	6,3	Acetolactato sintase II, subunidade grande	Biossíntese de aminoácidos: família do piruvato	X (4)
20	VC_2642	44465	49000	5,0	5,5	Argininosuccinato sintase ArgG	Biossíntese de aminoácidos: família do glutamato	X (5)
21	VC_2641	50331	68000	5,1	5,4	Argininosuccinato liase ArgH	Biossíntese de aminoácidos: família do glutamato	X (8)
22	VC_2362	46228	22000	5,0	5,5	Treonina sintase ThrC	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (6)
23	VC_2685	33956	33000	6,5	6,5	5,10-metilenetetrahidrofolato redutase MetF	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (5)
24	VC_0941	47506	50000	5,9	6,5	Serina hidroximetiltransferase GlyA-1	Biossíntese de aminoácidos: família da serina	X (5)
25	VC_1091	61139	55000	6,3	6,0	Proteínas de transporte e ligação Transportador de oligopeptídeo ABC OppA	Proteínas de transporte e ligação: aminoácidos, peptídeos e aminas	X (9)
26	VC_1091	61139	60000	6,3	6,4	Transportador de oligopeptídeo ABC OppA	Proteínas de transporte e ligação: aminoácidos, peptídeos e aminas	X (3)
27	VC_1362	36850	23000	4,9	5,0	Transportador de aminoácido ABC	Proteínas de transporte e	(4)

28	VC_0171	60614	54000	5,8	5,5	Transportador de peptídeos ABC	ligação: aminoácidos, peptídeos e aminas Proteínas de transporte e ligação: aminoácidos, peptídeos e aminas	X (7)
29	VC_0964	18022	48000	4,3	5,7	Sistema PTS, glicose-específico componente IIA Crr	Proteínas de transporte e ligação: carboidratos, alcóois orgânicos e ácidos	X (5)
30	VC_0964	18022	20000	4,0	4,1	Sistema PTS, glicose-específico componente IIA Crr	Proteínas de transporte e ligação: carboidratos, alcóois orgânicos e ácidos	X (1)
31	VC_1929	37095	34000	5,3	5,5	Proteína periplasmática ligadora de C4-dicarboxilato DctP-2	Proteínas de transporte e ligação: carboidratos, alcóois orgânicos e ácidos	X (2)
32	VC_A0945	43806	20000	4,6	4,4	Transportador de maltose ABC MalE	Proteínas de transporte e ligação: carboidratos, alcóois orgânicos e ácidos	(10)
33	VC_A0945	43806	10000	4,6	4,5	Transportador de maltose ABC MalE	Proteínas de transporte e ligação: carboidratos, alcóois orgânicos e ácidos	X (4)
34	VC_A0070	31671	33000	9,3	5,6	Transportador de fosfato ABC PstS	Proteínas de transporte e ligação: ânions	X (2)
35	VC_A0070	31671	27000	9,3	5,9	Transportador de fosfato ABC PstS	Proteínas de transporte e ligação: ânions	(4)
36	VC_A0070	31671	28000	9,3	5,8	Transportador de fosfato ABC PstS	Proteínas de transporte e ligação: ânions	(5)
37	VC_A0073	28246	30000	6,3	6,8	Transportador de fosfato ABC , proteína ligadora de ATP PstB-2	Proteínas de transporte e ligação: ânions	X (4)
38	VC_1549	48244	60000	6,9	5,1	Transportador de glicerol-3-fosfato ABC UgpB	Proteínas de transporte e ligação: outros	X (6)
Síntese de proteínas								
39	VC_2660	20576	27000	4,6	5,1	Fator de alongamento Efp	Síntese de proteínas: fatores de tradução	X (1)
40	VC_0321	43185	22000	4,8	5,3	Fator de alongamento TufB	Síntese de proteínas: fatores de tradução	X (7)
41	VC_0321	43185	25000	4,8	5,1	Fator de alongamento TufB	Síntese de proteínas: fatores de tradução	X (6)

42	VC_2259	29847	45000	4,8	5,0	Fator de alongamento Tsf	Síntese de proteínas: fatores de tradução	X (3)	
43	VC_1915	61051	71000	4,5	4,6	Proteína ribossomal S1RpsA	Síntese de proteínas: Proteínas ribossomais, síntese e modificação	X (3)	
44	VC_0664	58336	61000	5,0	5,8	Lisil-tRNA sintetase, induzida por calor LysU	Síntese de proteínas: tRNA aminoacilação	X (6)	
45	VC_1219	37049	40000	5,1	5,6	Fenilalanil-tRNA sintetase, cadeia alfa PheS	Síntese de proteínas: tRNA aminoacilação	X (5)	
Processos celulares									
46	VC_0076	15706	15000	4,5	4,5	Proteína de estresse universal A UspA	Processos celulares: adaptação a condições atípicas	X (1)	
47	VC_0576	24271	22000	4,7	5,2	Proteína estrigente de estarvação A SspA	Processos celulares: adaptação a condições atípicas	X (4)	
48	VC_0731	22862	21000	5,3	4,6	Antioxidante, família AhpC/Tsa	Processos celulares: detoxificação	X (5)	
49	VC_0731	22862	20000	5,3	4,9	Antioxidante, família AhpC/Tsa	Processos celulares: detoxificação	(5)	
50	VC_0731	22862	22000	5,3	4,6	Antioxidante, família AhpC/Tsa	Processos celulares: detoxificação	X (3)	
51	VC_1621	49375	48000	4,8	4,7	Proteína de aglutinação	Processos celulares: patogênese	X (5)	
Proteínas hipotéticas									
52	VC_1872	74113	54000	5,5	5,8	Proteína hipotética conservada	Proteínas hipotéticas: conservada	X (11)	
53	VC_1101	33282	50000	5,4	6,2	Proteína hipotética conservada	Proteínas hipotéticas: conservada	(1)	
54	VC_1334	34835	32000	5,8	5,8	Proteína hipotética conservada	Proteínas hipotéticas: conservada	X (3)	
55	VC_1154	20133	19000	4,5	4,2	Proteína hipotética	Proteína hipotética	(4)	
Destino das proteínas									
56	VC_2436	47751	47000	4,8	4,8	Proteína de membrana externa TolC	Destino das proteínas: secreção e tráfego de proteínas e peptídeos	X (7)	
57	VC_2568	22240	25000	4,4	4,4	Peptidil-prolil cis-trans isomerase, tipo	Destino das proteínas:	X (4)	

						FKBP FkIB		dobramento e estabilização das proteínas	
						Envelope celular			
58	VC_A1008	35913	40000	4,4	4,2	Proteína de membrana externa putativa	Envelope celular: outros	(14)	
59	VC_0430	35254	33000	7,1	6,1	Proteína imunogênica	Envelope celular: outros	X (3)	
60	VC_0430	35254	33000	7,1	6,6	Proteína imunogênica	Envelope celular: outros	X (3)	
						Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos			
61	VC_2602	46818	50000	5,9	6,2	Adenilosuccinato sintetase PurA	Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos: biossíntese do ribonucleotídeo purina	X (4)	
62	VC_A0053	26739	28000	6,3	6,2	Purina nucleosídeo fosforilase DeoD-2	Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos: outros	X (6)	
						Metabolismo de DNA			
63	VC_0543	45242	70000	6,2	6,0	Proteína RecA	Metabolismo de DNA: replicação, recombinação e reparo de DNA	X (8)	
						Metabolismo intermediário central			
64	VC_0748	44808	45000	5,9	6,1	Aminotransferase NifS, classe V	Metabolismo intermediário central: outros	X (2)	
						Transcrição			
65	VC_0323	20650	25000	5,4	6,2	Proteína de antiterminação da transcrição NusG	Transcrição: fatores de transcrição	X (3)	

¹ Spots únicos no gel e número de peptídeos identificados

² Proteína PhoE (von Kruger *et al.*, 2006)

Tabela 4 - Proteínas diferencialmente expressas em MGLP/DOC

Spot	Gene	MM_t	MM_e	pI_t	pI_e	Proteína	Função	Único (*)
Metabolismo de energia								
1	VC_0478	38918	42000	4,6	4,9	Frutose-bisfosfato aldolase, classe II FbaA	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	(13)
2	VC_0477	41564	42000	4,6	4,8	Fosfoglicerato cinase Pgk	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (15)
3	VC_0477	41564	44000	4,6	4,7	Fosfoglicerato cinase Pgk	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (1)
4	VC_0477	41564	42000	4,6	4,7	Fosfoglicerato cinase Pgk	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (2)
5	VC_2000	35282	37000	6,0	5,6	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase GapA-1	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (3)
6	VC_2000	35282	38000	6,0	5,4	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase GapA-1	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (2)
7	VC_2000	35282	50000	6,0	4,9	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase GapA-1	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (1)
8	VC_0336	55364	58000	4,8	4,9	Fosfoglicerato mutase, 2,3- bisfosfoglicerato-independente YibO	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (1)
9	VC_0336	55364	60000	4,8	5,0	Fosfoglicerato mutase, 2,3- bisfosfoglicerato-independente YibO	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (2)
10	VC_2447	45806	48000	4,7	5,1	Enolase eno	Metabolismo de energia: glicólise/gliconeogênese	X (3)
11	VC_2657	27989	31000	5,1	5,3	Fumarato redutase, proteína ferro enxofre FrdB	Metabolismo de energia: anaeróbio	X (2)
12	VC_A0897	25804	28000	5,5	5,6	6-fosfogluconolactonase Pgl	Metabolismo de energia: via da pentose fosfato	X (2)
13	VC_1146	10512	10000	5,1	5,4	Glutaredoxina 1 GrxA	Metabolismo de energia: transporte de elétrons	X (6)
14	VC_1097	76891	76000	5,0	5,4	Fosfato acetiltransferase Pta	Metabolismo de energia: fermentação	X (4)
15	VC_2412	50994	47000	6,0	4,8	Piruvato desidrogenase, componente E3, lipoamida desidrogenase LpdA	Metabolismo de energia: piruvato desidrogenase	X (1)
16	VC_2766	56781	56000	5,4	5,9	ATP sintase F1, subunidade alfa AtpA	Metabolismo de energia: interconversão de força	(3)

							motora	
Biossíntese de aminoácidos								
17	VC_2641	46228	49000	5,0	5,4	Argininosuccinato liase ArgH	Biossíntese de aminoácidos: família do glutamato	X (7)
18	VC_2642	44465	54000	5,0	5,3	Argininosuccinato sintase ArgG	Biossíntese de aminoácidos: família do glutamato	X (2)
19	VC_2642	44465	54000	5,0	5,2	Argininosuccinato sintase ArgG	Biossíntese de aminoácidos: família do glutamato	X (3)
20	VC_2362	46228	45000	5,0	5,3	Treonina sintase ThrC	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (3)
21	VC_2157	31374	31000	5,5	5,6	Dihidrodipicolinato sintase DapA	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (2)
22	VC_1293	44925	41000	5,1	5,4	Aspartato aminotransferase AspC	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (3)
23	VC_0125	46276	47000	5,6	5,7	Diaminopimelato decarboxilase LysA	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (2)
24	VC_0125	46276	15000	5,6	5,2	Diaminopimelato decarboxilase LysA	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (3)
25	VC_0125	46276	15000	5,6	5,3	Diaminopimelato decarboxilase LysA	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (3)
26	VC_1704	85046	81000	5,2	5,4	5-metiltetrahydropteroiltriglutamato--homocisteína metiltransferase MetE	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (5)
27	VC_1704	85046	69000	5,2	5,4	5-metiltetrahydropteroiltriglutamato--homocisteína metiltransferase MetE	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato	X (3)
28	VC_1138	28338	28000	4,9	5,2	Proteína HisF (ciclase)	Biossíntese de	X (2)

							aminoácidos: família da histidina	
Proteínas de transporte e ligação								
29	VC_1362	36850	36000	4,9	4,9	transportador de aminoácido ABC	Proteínas de transporte e ligação: aminoácidos, peptídeos o aminas	(6)
30	VC_1863	28711	27000	5,0	5,1	Transportador de aminoácido ABC	Proteínas de transporte e ligação: aminoácidos, peptídeos o aminas	X (4)
31	VC_1091	61139	42000	6,3	4,6	Transportador de oligopeptídeo ABC OppA	Proteínas de transporte e ligação: aminoácidos, peptídeos o aminas	X (4)
32	VC_0171	60614	56000	5,8	5,2	Transportador de peptídeos ABC	Proteínas de transporte e ligação: aminoácidos, peptídeos o aminas	X (5)
33	VC_1549	48244	71000	6,9	5,2	Transportador de glicerol-3-fosfato ABC UgpB	Proteínas de transporte e ligação: outros	X (6)
34	VC_0538	36920	36000	6,5	5,9	Transportador de thiosulfato ABC CysP	Proteínas de transporte e ligação: ânions	X (6)
Síntese de proteína								
35	VC_2259	29847	35000	4,8	4,9	Fator de alongamento Tsf	Síntese de proteína: fatores de tradução	X (4)
36	VC_2259	29847	34000	4,8	5,1	Fator de alongamento Tsf	Síntese de proteína: fatores de tradução	(5)
37	VC_0321	43185	50000	4,8	4,5	Fator de alongamento TufB	Síntese de proteína: fatores de tradução	(16)
38	VC_0321	43185	43000	4,8	4,5	Fator de alongamento TufB	Síntese de proteínas: fatores de tradução	(2)
39	VC_0321	43185	35000	4,8	4,7	Fator de alongamento TufB	Síntese de proteína: fatores de tradução	X (5)
40	VC_2342	76481	103000	4,7	5,1	Fator de alongamento FusA-2	Síntese de proteína: fatores de tradução	X (1)
41	VC_1219	37049	40000	5,1	5,4	Fenilalanil-tRNA sintetase, cadeia alfa PheS	Síntese de proteínas: aminoacilação de tRNA	X (3)

Processos celulares

42	VC_0557	19080	21000	5,2	5,4	Proteína produtora do autoindutor-2 LuxS	Processos celulares: outros	X (1)
43	VC_2202	34278	35000	5,1	5,3	Proteína de quimiotaxia CheV	Processos celulares: quimiotaxia e motilidade	X (7)
Proteínas hipotéticas								
44	VC_0134	30863	30000	5,2	5,2	Proteína hipotética conservada	Proteínas hipotéticas: conservadas	X (2)
45	VC_2001	32720	42000	5,4	5,5	Proteína hipotética conservada	Proteínas hipotéticas: conservada	X (8)
Destino das proteínas								
46	VC_2665	10294	12000	5,7	5,3	Chaperonina, subunidade de 10 Kd GroES-1	Destino das proteínas: dobramento e estabilização das proteínas	X (5)
47	VC_2664	57153	56000	4,5	4,7	Chaperonina, subunidade de 60 Kd GroEL-1	Destino das proteínas: dobramento e estabilização das proteínas	X (1)
48	VC_A0820	56199	60000	5,0	5,3	Chaperonina, subunidade de 60 Kd GroEL-2	Destino das proteínas: dobramento e estabilização das proteínas	X (4)
49	VC_0855	68760	79000	4,5	4,6	Proteína DnaK	Destino das proteínas: dobramento e estabilização das proteínas	X (3)
50	VC_0566	48366	50000	5,6	5,5	Protease DO HtrA	Destino das proteínas: degradação de proteínas, peptídeos e glicopeptídeos	X (2)
51	VC_1343	39326	41000	4,9	5,1	Peptidase, família M20A	Destino das proteínas: degradação de proteínas, peptídeos e glicopeptídeos	(3)
52	VC_2653	17035	13000	4,2	4,1	Proteína transportadora de proteína SecB	Destino das proteínas: secreção e tráfego de	X (1)

								proteínas e peptídeos	
								Envelope celular	
53	VC_2213	34285	36000	4,7	4,7	Proteína de membrana externa OmpA	Envelope celular: outros	X (1)	
54	VC_2213	34285	16000	4,7	4,8	Proteína de membrana externa OmpA	Envelope celular: outros	X (2)	
								Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos	
55	VC_2225	22692	22000	5,1	5,4	Uracil fosforibosiltransferase Upp	Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos: recuperação de nucleosídeos e nucleotídeos	X (2)	
56	VC_1190	45799	40000	6,3	5,4	Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamide sintase, putativa	Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos: biossíntese do ribonucleotídeo purina	X (1)	
								Metabolismo intermediário central	
57	VC_2559	52879	55000	5,6	5,6	Sulfato adenilato transferase, subunidade 1 CysN	Metabolismo intermediário central: metabolismo de enxofre	X (2)	
58	VC_2239	12729	12000	4,6	4,9	Proteína reguladora de nitrogênio P-II GlnB-2	Metabolismo intermediário central: metabolismo de nitrogênio	X (12)	
59	VC_2545	19600	22000	4,6	4,7	Pirofosfatase inorgânica Ppa	Metabolismo intermediário central: compostos de fósforo	X (2)	
60	VC_A0637	24078	23000	5,1	5,4	NAD(P)H nitroreductase insensível a oxigênio	Metabolismo intermediário central: outros	X (2)	
								Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores	
61	VC_2458	26454	30000	5,5	5,7	Proteína biosintética de fosfato piridoxal PdxJ	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores: piridoxina	(9)	
62	VC_0472	42068	43000	5,0	5,2	S-adenosilmetionina sintase MetK	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores: outros	X (6)	

Transcrição

63	VC_0323	20650	21000	5,4	5,8	Proteína de antiterminação de transcrição NusG	Transcrição: fatores de transcrição	X (11)
64	VC_2571	36415	41000	4,5	4,7	RNA polimerase DNA dirigida, subunidade alfa RpoA	Transcrição: RNA polimerase DNA dependente	(6)
						Metabolismo de DNA		
65	VC_0543	45242	48000	6,2	5,6	Proteína RecA	Metabolismo de DNA: replicação, recombinação e reparo de DNA	X (4)

* Spots únicos no gel e número de peptídeos identificados

Tabela 5 – Proteínas de membrana externa

Spot	Gene	MM_t	MM_e	Proteína	Função
1	VC_2342	76481	86000	Fator de alongamento FusA-2	Síntese de proteínas: fatores de tradução
2	VC_0321	43185	46000	Fator de alongamento TufB	Síntese de proteínas: fatores de tradução
3	VC_1854	40140	44000	Proteína OmpT	Envelope celular: outros
4	VC_0633	37659	42000	Proteína de membrana externa OmpU	Envelope celular: outros
5	VC_A1008	35913	41000	Proteína de membrana externa, putativa ¹	Envelope celular: outros
6	VC_2593	29825	32000	Proteína ribossomal L2 RplB	Síntese de proteínas: proteínas ribossomais, síntese e modificação

¹ Proteína PhoE (von Kruger *et al.*, 2006)

4.5.1 Proteínas de células planctônicas e de biofilme analisadas de acordo com as categorias funcionais

As proteínas identificadas diferencialmente em células livres e biofilme (Tabelas 3 e 4) foram classificadas de acordo com suas funções celulares em 13 grupos, mostrados nas figuras 22A e B e descritos abaixo.

Metabolismo de energia- O maior grupo de proteínas expressas diferencialmente e identificadas em ambas, células planctônicas e biofilme foi formado por proteínas do metabolismo de energia, 26% das proteínas identificadas, em cada caso. Cerca de 50% (8 em 17) das proteínas do metabolismo de energia das células planctônicas têm envolvimento na glicólise/gliconeogênese e no caso do biofilme, este percentual foi de 63% (10 em 16). Além dessas, proteínas da síntese de ATP, do ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) e do metabolismo de acetato foram identificadas em células livres e planctônicas. As proteínas de metabolismo de energia detectadas apenas em células planctônicas foram uma alanina desidrogenase (Ald) e NqrA, uma subunidade da bomba de Na⁺ (Na⁺-NQR), que em *V. cholerae* funciona na captação de nutrientes acoplada a extrusão de Na⁺ (Duffy & Barquera, 2006). Proteínas específicas do biofilme foram a Pgl da via das pentoses e a GrxA da família das glutaredoxinas, que protegem contra os estresses oxidativo e ácido e choque osmótico (Fernandes & Holmgren, 2004). Em *V. cholerae* uma glutaredoxina putativa (VC_2044) foi identificada entre as expressas diferencialmente sob deficiência de Pi (von Kruger *et al.*, 2006). Entre as proteínas do metabolismo de energia de células livres e biofilme, listadas nas tabelas 3 e 4, algumas são específicas de crescimento sob anaerobiose, o que não é surpresa considerando que os cultivos em MGLP e MGLP/DOC foram feitos em placas sem agitação.

Proteínas de transporte e ligação- o segundo grupo com o maior número de representantes entre as identificadas em células planctônicas (21%) foi o de transporte de aminoácidos, peptídeos, açúcares, glicerolfosfato e Pi. Algumas destas são membros do

regulon Pho, a saber, os produtos dos genes *vc_a0070*, *vc_a0073* e *vc_1549* (respectivamente, PstS, PstB-2 e UgpB), cuja expressão é induzida em *V. cholerae* em resposta a níveis baixos de Pi, como já havia sido observado anteriormente (von Kruger *et al.*, 2006). Proteínas de “transporte e ligação” também foram identificadas em biofilme, mas representaram apenas 9% do total e na sua maioria são isoformas de proteínas detectadas nas células planctônicas. Curiosamente, apenas um membro do regulon Pho, a proteína UgpB (VC_1549), foi identificado em biofilme, apesar do meio MGLP/DOC ser deficiente em Pi. As proteínas de “transporte e ligação” identificadas só em biofilme foram a CysP, um transportador periplasmático de sulfato e tiosulfato, que é regulado em paralelo com a biossíntese da cisteína em *E. coli* e outras bactérias (Higgins, 1992), e o produto de *vc_1863*. VC_1863 foi anotada como uma proteína transportadora de aminoácido de um sistema ABC (Ermolaeva *et al.*, 2001), porém uma busca por homologia no banco de dados do NCBI (Altschul *et al.*, 1990) mostrou que a molécula tem cerca de 80% de identidade e 90% de similaridade em seqüência primária com uma proteína ligadora dos aminoácidos básicos lisina/arginina/ornitina de *V. fisheri* (VF1587), portanto, é possível que em *V. cholerae* VC_1863 tenha função semelhante.

Proteínas de biossíntese de aminoácidos- este foi o terceiro maior conjunto de proteínas identificadas em biofilme (19%) representado por 10% das proteínas das células planctônicas.

Proteínas de “síntese de proteínas- foram igualmente representadas em células livre e biofilme (10%) e em ambos os casos e na sua maioria são fatores de alongamento, (Tabelas 3 e 4; Figuras 22A e B), também expressos diferencialmente por outra cepa de *V. cholerae* sob limitação de Pi (von Kruger *et al.*, 2006).

Processos celulares- este foi um grupo bem representado em células planctônicas (14%) e compreende proteínas com funções em adaptação a condições ambientais severas e detoxicação, tipicamente expressas em bactérias sob condição de estresse como uma estratégia de sobrevivência (VanBogelen *et al.*, 1996; von Kruger *et al.*, 2006). Proteínas com funções em “processos celulares” representaram apenas 6% das identificadas em biofilme, que

não têm funções similares às identificadas nas células planctônicas. Foram elas, LuxS (produto de *vc_0557*), e a CheV (*vc_2202*). LuxS é a sintase terminal da biossíntese da molécula sinalizadora, denominada autoindutor AI-2 (borato de furanosila), já descrita em *V. cholerae* e outras bactérias como envolvida na comunicação celular entre espécies e formação de biofilme (Gonzalez Barrios *et al.*, 2006; Henke & Bassler, 2004; Higgins *et al.*, 2007; Xavier & Bassler, 2003). AI-2, por outro lado é derivada de S-adenosil homocisteína (SAH) que é sintetizada a partir do S-adenosil metionina (SAM), o principal agente metilante intracelular, que é produzido a partir de metionina. O fluxo metabólico da metionina, SAM e SAH é altamente regulado na célula; portanto, é possível que AI-2 além de sinalizador celular possa participar no controle da biossíntese de metionina nas células do biofilme (Winzer *et al.*, 2002). CheV é uma proteína envolvida no sistema quimio-sensitivo de muitas espécies bacterianas (Karatan *et al.*, 2001; Pittman *et al.*, 2001; Porter & Armitage, 2002), entretanto, seu papel na quimiotaxia não é conhecido.

Destino de proteínas- este grupo incluiu várias proteínas identificadas no biofilme (10%) e é representado por apenas 3% das proteínas das células livres. Entre as de biofilme a grande maioria foi de chaperoninas moleculares dos sistemas DnaK e GroE, que protegem proteínas recém sintetizadas e desnaturadas pelo estresse de um dobramento errôneo e agregação. Uma outra chaperona molecular identificada em biofilme foi a SecB (VC_2653), especializada em estabilizar polipeptídeos recém sintetizados que são exportados pelo sistema Sec de translocação de proteínas (Rusch & Kendall, 2007; Zhou & Xu, 2005). Ainda no grupo do “destino de proteínas” de biofilme foram identificadas a peptidase M20A e a protease DO (VC_0566), também conhecida como HtrA ou DegP, uma protease periplasmática com envolvimento na formação de biofilme, na resistência a estresses diversos e virulência em outras bactérias (Wilson *et al.*, 2006; Wonderling *et al.*, 2004). As proteínas do grupo “destino de proteínas” identificadas em células livres foram TolC (VC_2436) e FkIB (VC_2568). TolC é uma OMP de *V. cholerae* envolvida na exportação de toxinas, efluxo de drogas e resistência a

agentes antimicrobianos, portanto, importante na sobrevivência da bactéria a condições ambientais severas (Bina & Mekalanos, 2001). A função de FkIB em *V. cholerae* não é conhecida, mas em *E. coli* é induzida em condição de estresse e atua como uma chaperonina participando do dobramento de proteínas e solubilização de agregados protéicos heterólogos no citoplasma da bactéria (Han *et al.*, 2007).

Envelope celular- entre as proteínas deste grupo nos lisados de células planctônicas foram identificadas duas isoformas de VC_0430 anotadas como membro da família TRAP-T (*tripartite ATP-independent periplasmic transporters*). Busca por similaridade em banco de dados mostrou que VC_0430 compartilha 60% de identidade e 76% de similaridade em seqüência de aminoácidos com o receptor extracelular do sistema TRAP-T de *Rhodobacter*, envolvido no transporte de dicarboxilatos tais como malato e succinato (Kelly & Thomas, 2001), portanto, é uma outra proteína de “transporte e ligação”. Além desta, a fosfoporina putativa VC_A1008 também foi identificada no lisado de células planctônicas. Esta proteína é um membro do regulon Pho de *V. cholerae* O1 (von Kruger *et al.*, 2006), por isto, sua identificação entre as expressas pela bactéria nas condições do estudo não é surpresa. OmpA, a única proteína desta categoria expressa pelas células do biofilme, também já foi encontrada entre as mais expressas por *V. cholerae* sob limitação de Pi (von Kruger *et al.*, 2006); sua função na bactéria não é conhecida, mas em *E. coli* OmpA confere resistência a estresses ambientais e é vital para manutenção da estrutura celular (Wang, 2002). As três OMPs identificadas nas amostras de proteínas de membrana externa de células planctônicas e biofilme foram as duas porinas majoritárias de *V. cholerae* O1, OmpU e OmpT além de VC_A1008 (Figura 21). VC_A1008 é uma fosfoporina putativa, que também foi identificada entre as proteínas solúveis das células planctônicas. Esta proteína é um membro do regulon Pho de *V. cholerae* O1 (von Kruger *et al.*, 2006), por isto, sua identificação entre as expressas pela bactéria nas condições do estudo não é surpresa.

Proteínas de Metabolismo de purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos, Metabolismo de DNA e Transcrição- poucas proteínas de células planctônicas e biofilme, entre as identificadas, foram classificadas dentro destes três grupos. Em alguns casos, o produto do mesmo gene foi encontrado nas duas amostras em isoformas distintas; exemplos disto são as proteínas NusG e RecA (Tabelas 3 e 4). A RecA, uma proteína envolvida na recombinação homóloga e reparo de DNA (Clark, 1973; Walker, 1984), nas células planctônicas (*spot* 63, Tabela 3) apresentou um pI distinto e um $MM_e \sim 1,7$ vezes maior que o MM_i . Estas modificações poderiam ser explicadas por alterações pós-tradução, a serem estudadas no futuro.

Metabolismo intermediário central- Apenas uma proteína deste grupo denominada NifS (VC_0748) foi encontrada nas células planctônicas. Busca por homologia em bancos de dados, mostrou que VC_0748 apresenta cerca de 80% de identidade e 89,5% de similaridade com a proteína IcsS de *E. coli*. IcsS é uma cisteína-desulfurase, cuja atividade fornece o enxofre (S) que é incorporado *in vivo* no complexo Fe-S, que por sua vez é importante na síntese *de novo* de proteínas dependentes de Fe-S e no reparo das que tenham sido danificadas pelo estresse oxidativo (Schwartz *et al.*, 2000). Atividades dependentes do complexo Fe-S, são muito comuns a enzimas envolvidas em reações redox sob anaerobiose (Imlay, 2006).

Entre as proteínas do “Metabolismo intermediário central” no biofilme identificamos a CysN da via biosintética da cisteína em *E. coli* que tem papel na captação de enxofre pela bactéria (Matijasevic *et al.*, 1992). A GlnB, por outro lado, em *E. coli* é uma proteína sensora dos níveis de nitrogênio extracelulares e integra sistemas de resposta a baixos e altos níveis do elemento, através da ativação (em deficiência de N) e repressão (em abundância de N) da glutamina sintase (Leigh & Dodsworth, 2007). Portanto, é possível que a expressão diferencial de GlnB no biofilme de *V. cholerae* esteja relacionada ao seu envolvimento na captação de nitrogênio extracelular e regulação da biossíntese de glutamina. A Ppa, também identificada em células do biofilme, é uma enzima que catalisa a hidrólise reversível de pirofosfato (PPi), produzindo fosfato inorgânico (Pi) para as reações de fosforilação, portanto, é uma enzima

chave no controle dos níveis de PPI e na reciclagem do Pi intracelular (Gomez-Garcia *et al.*, 2007). Não há estudos sobre a Ppa em *V. cholerae*, mas em *Synechocystis* sp, Ppa é induzida em resposta a deficiência de Pi no meio extracelular para reciclar o Pi intracelular, um processo crítico em células sob limitação de Pi (Gomez-Garcia *et al.*, 2003).

A função do produto de VC_A0637, uma nitroredutase putativa insensível a oxigênio, também não é conhecida em *V. cholerae*, mas buscas por similaridade mostraram 57.6% identidade e 88% similaridade em seqüência de aminoácidos com a com NfnB/NfsB de *E. coli*, uma nitroredutase minoritária da bactéria que catalisa a nitroredução de uma variedade de compostos aromáticos estruturalmente semelhantes (Spain, 1995). NfsB de *E. coli* é induzida sob estresse oxidativo, portanto é um membro do *soxRS* regulon, o que sugere que seja um enzima que não gera estresse oxidativo mas protege a célula contra ele (Koder *et al.*, 2002).

Biossíntese de cofatores, grupo prostéticos e carreadores- este grupo só teve representantes entre as proteínas do biofilme e as identificadas foram PdxJ (VC_2458) e Metk (VC_0472). PdxJ ou piridoxina 5`- fosfato (vitamina B6) sintase participa da síntese da coenzima, que é requerida por inúmeras enzimas do metabolismo de aminoácidos, além disto a vitamina B6 também protege contra o estresse oxidativo (Bilski *et al.*, 2000). MetK, por outro lado catalisa a condensação de L-metionina e ATP para produzir o S-adenosil metionina (SAM) mais PPI e Pi. Análise da expressão gênica de *E. coli* por micro arranjo de DNA, mostrou que *metK* está entre os genes super expressos em biofilme (Ren *et al.*, 2004).

Hipotéticas- este grupo incluiu 6% (4) das mais expressas e identificadas em células livres contra 3% das de biofilme (Tabelas 3 e 4); no total 7 proteínas novas de *V. cholerae*, cujas funções não são conhecidas. Através de buscas por similaridade de seqüências em bancos de dados (Altschul *et al.*, 1990) foram feitas tentativas de inferir funções para estas proteínas anotadas como hipotéticas. Abaixo estão relacionadas as proteínas de células planctônicas com as funções hipotéticas que lhe foram atribuídas:

Proteínas de transporte e ligação- pelo menos três das proteínas de células livres podem pertencer a este grupo. São elas, VC_1334, que tem 73% de identidade com a proteína C, ligadora periplasmática de tricarboxilatos do sistema de transporte Tctl (Widenhorn *et al.*, 1989) também identificado por similaridade em *Vibrio sp* (Altschul *et al.*, 1990). A proteína VC_1101, por outro lado, possui entre 81-85% de identidade com proteínas periplásmicas ligadoras de substrato de um sistema de transporte ABC não caracterizado de *Vibrio sp*. Análise da seqüência de VC_1872 mostrou 85% identidade com o produto do gene b1783 de *E. coli* (YeaG), recentemente caracterizado como uma serina cinase, proteína de transdução de sinais que permite às células sentirem e responderem a estímulos ambientais. Em *E. coli* YeaG é superexpressa durante a fase estacionária de crescimento, resposta ácida e estresse salino, sugerindo que seja importante na proteção celular a estresses ambientais (Tagourti *et al.*, 2008). VC_1154 é uma proteína pequena com similaridade de seqüência (entre 37-76%) com outras proteínas hipotéticas de *Vibrio sp*, ainda não caracterizadas.

Entre as “hipotéticas” identificadas em biofilme estão duas proteínas com as funções putativas a seguir:

Processos celulares- a proteína VC_0134 possui 54% de identidade com a Cof hidrolase de *Psychromonas ingrahamii* e de outras espécies bacterianas tais como *Serratia*, *Yersinia* e *Aeromonas*. Cof hidrolases quebram a coformicina, que é um nucleosídeo incomum de origem microbiana (Nakamura *et al.*, 1974), homólogo estrutural da S-adenosil-L-metionina (SAM). Por isto, a coformicina é comumente utilizada na clínica médica como inibidor da SAM hidrolase (Lukey & Snyder, 1983). Essa enzima, por sua vez, quebra a molécula de SAM removendo-a da célula e assim inibindo uma variedade de reações SAM-dependentes (Hughes *et al.*, 1987). Não são conhecidas proteínas com atividade SAM hidrolase em bactérias, porém S-adenosilhomocisteine (SHA) hidrolases já foram identificadas em várias espécies (Shimizu *et al.*, 1984). Portanto, é possível que VC_0134, participe do controle dos níveis de SAM na célula

e assim, de todos os processos de que dependem deste cofator, incluindo biossíntese de metionina (Winzer *et al.*, 2002).

Metabolismo de energia- A proteína VC_2001 apresenta 55% de identidade em seqüência com aldose 1-epimerase de *Vibrio harveyi* HY01, mas não existem informações sobre esta proteína na literatura. Porém, muitas aldose epimerases descritas em bactérias participam do metabolismo de carboidratos e funcionam como mutarrotases, ou seja, enzimas que catalisam a interconversão entre formas α e β de açúcares, denominadas anômeros (Ryu *et al.*, 2004). Curiosamente, uma aldose-1 epimerase identificada na bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi identificada como uma galactose mutarotase com um papel central na formação de polissacarídeos extracelulares, que são os maiores constituintes de biofilmes bacterianos (Barreto *et al.*, 2005).

4.6 Identificação de operons

Com a ajuda de ferramentas computacionais foi possível prever que alguns dos genes adjacentes de proteínas identificadas fazem parte de operons no genoma da *V.cholerae*. Foram eles: da gliconeogênese, VC_0477 e VC_0478; de síntese de ATP, VC_2764, VC_2766 e VC_2767; do ciclo do CAT, VC_2084 e VC_2089; da biossíntese de arginina, VC_2641 e VC_2642; do transporte de fosfato, VC_A0070 e VC_A0073; de estabilização de proteínas, VC_2664 e VC_2665.

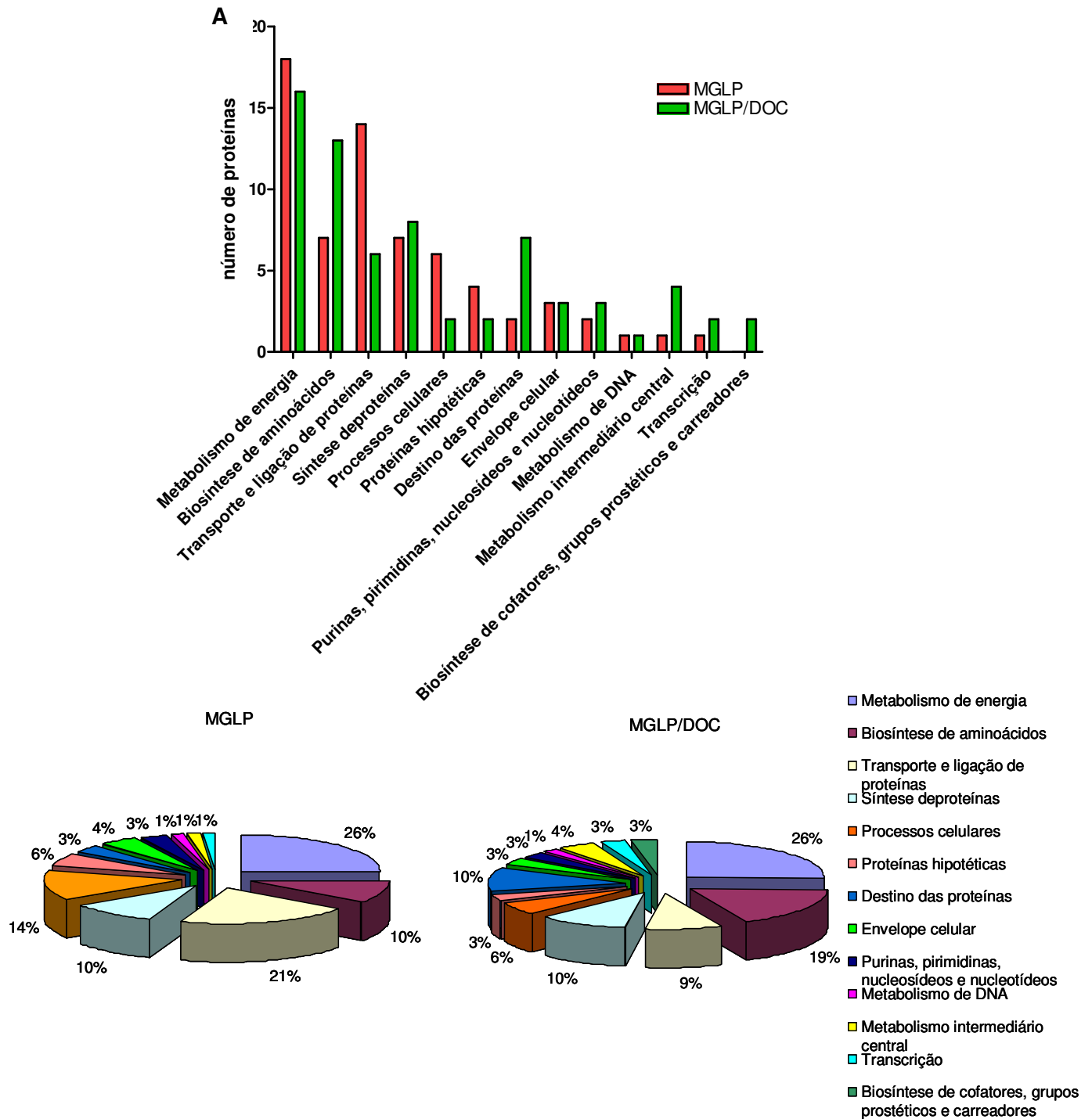


Figura 22 –Proteínas de células planctônicas (MGLP) e biofilme (MGLP/DOC) identificadas e agrupadas de acordo com as categorias funcionais definidas pelo TIGR CMR. (A) Comparação entre os números de proteínas identificadas por grupo funcional nas células livres e biofilme. (B) Percentual de proteínas dos diversos grupos funcionais identificadas em células planctônicas e biofilme.

4.7 Efeito de mutações em genes *phoB*, *vca1008*, *ompU* e *toxR* na formação de biofilme pela cepa de N16961 de *V. cholerae* O1

O efeito de mutações em quatro genes, ligados direta ou indiretamente com a virulência de *V. cholerae* O1 N16961, na formação de biofilme foi analisado nos meios LB, MGLP e MGLP/DOC, nas temperaturas de 22°C e 37°C. Entre os mutantes de N16961 analisados dois apresentam mutações em membros do regulon Pho de *V. cholerae* e, por isso foram utilizados com a finalidade de testar um possível envolvimento do regulon na formação de biofilme pela bactéria. Os mutantes selecionados foram *phoB* e *vca1008*, ambos deficientes na colonização intestinal (Osorio *et al.*, 2004; von Kruger *et al.*, 2006). O gene *phoB* codifica a proteína PhoB, reguladora de resposta do sistema de dois componentes PhoB/PhoR, que controla a expressão gênica em resposta aos níveis extracelulares de Pi. O gene *vca1008* ou *phoE* que codifica uma OMP, PhoE^{Vc}, é um membro do regulon Pho, portanto sua expressão é ativada pelo sistema PhoB/PhoR em condições de baixas concentrações extracelulares de Pi (von Kruger *et al.*, 2006). Os outros dois genes são: *ompU*, que codifica uma das porinas majoritárias da bactéria, OmpU que, entre suas funções, protege a célula contra sais biliares *in vitro* (Hung & Mekalanos, 2005) e *toxR*, que codifica o regulador central da cascata de virulência e controla positivamente a expressão de OmpU (Chakrabarti *et al.*, 1996).

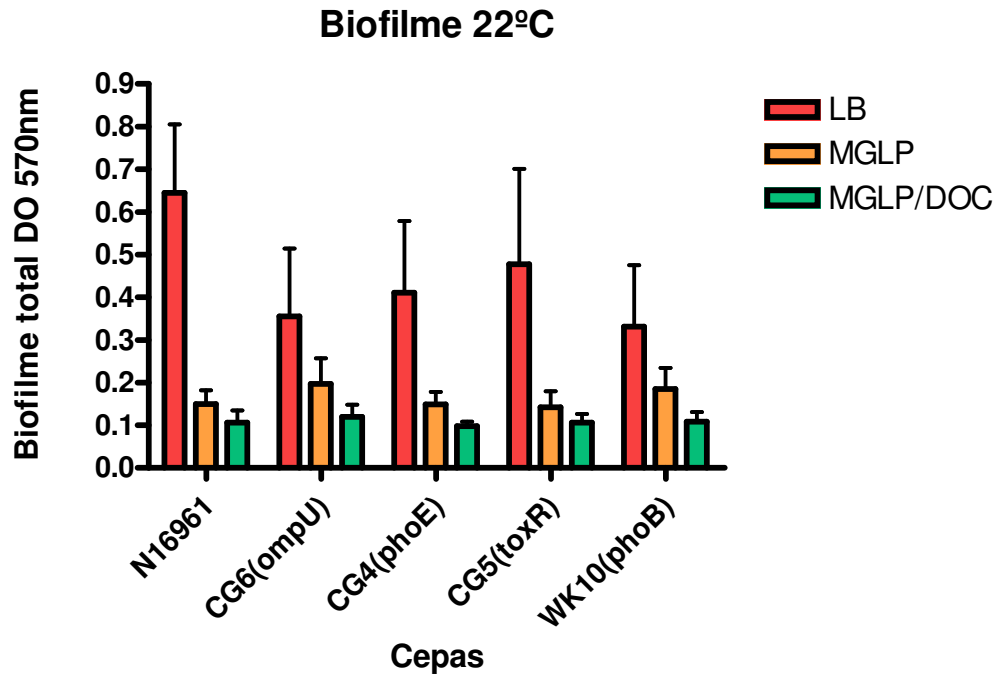


Figura 23 – Efeito de mutações em *ompU* (CG6), *phoE* (CG4), *toxR* (CG5) e *phoB* (WK10) na formação de biofilme a 22°C pela cepa selvagem N16961 em LB, meio definido com baixo nível de Pi (MGLP) e MGLP complementado com DOC 0,2% (MGLP/DOC). Número de experimentos para cada parâmetro ≥ 3 . As barras representam a média dos valores obtidos e o desvio padrão. O programa GraphPad Prism foi utilizado para as análises estatísticas.

A 22°C, temperatura normalmente encontrada nos ambientes aquáticos, todas as cepas apresentaram uma produção significativamente maior em LB que em MGLP e MGLP/DOC, onde os níveis de biofilme foram baixos e similares, ou seja, um padrão semelhante de biofilme nos meios analisados. Entre as cepas, a selvagem N16961 foi a que apresentou maior formação de biofilme em LB a 22°C, seguida pelo mutante CG5 (*toxR*). Os mutantes CG4 (*phoE*), CG6 (*ompU*) e WK10 (*phoB*), por outro lado, apresentaram produção similar e mais baixa que as cepas selvagem e CG5 (*toxR*) nas mesmas condições (Figura 23).

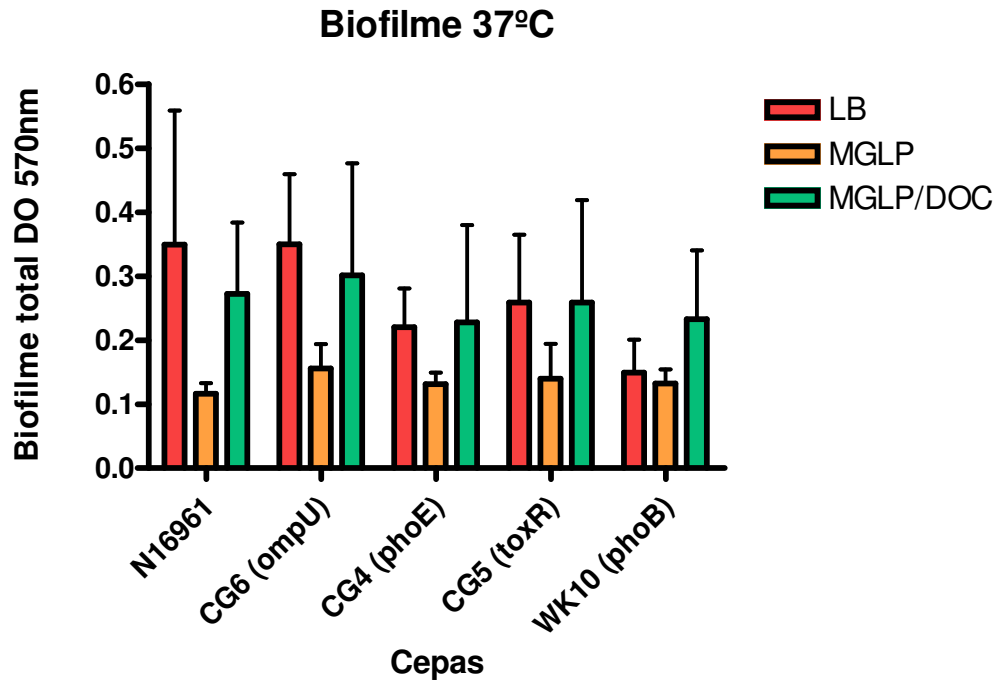


Figura 24 – Efeito de mutações em *ompU* (CG6), *phoE* (CG4), *toxR* (CG5) e *phoB* (WK10) na formação de biofilme a 37°C pela cepa selvagem N16961 em LB, meio definido com baixo nível de Pi (MGLP) e MGLP complementado com DOC 0,2% (MGLP/DOC). Número de experimentos para cada parâmetro ≥ 3 . As barras representam a média dos valores obtidos e o desvio padrão. O programa GraphPad Prism foi utilizado para as análises estatísticas.

A alteração na temperatura de incubação de 22°C para 37°C causou uma mudança drástica na produção de biofilme pelas cepas em análise (Figuras 23 e 24). Em LB, a 37°C, as cepas N16961 e CG6 (*ompU*) formaram uma quantidade de biofilme similar, alta e significativamente distinta da produzida pelas demais ($P < 0,001$). Em MGLP todas as cepas produziram menos biofilme que em LB, provavelmente porque neste meio elas crescem mais lentamente que em LB. A adição de DOC ao MGLP causou um incremento significativo ($P < 0,05$) na produção, principalmente para as cepas N16961, CG6 (*ompU*). Este resultado é inesperado, considerando que a OmpU tem um papel na resistência da bactéria. Curiosamente, o DOC não alterou a quantidade total de biofilme ($P > 0,05$) produzido pelas cepas mutadas nos genes do regulon Pho, ou seja, CG4 (*phoE*) e WK10 (*phoB*), a 37°C, produziram quantidades

semelhantes de biofilme em todos os meios e menores que a produzida pela cepa selvagem em LB e MGLP/DOC, sugerindo que a proteína PhoB e a fosfoproteína putativa, PhoE (VC_A1008) possam ser importantes na formação de biofilme pela bactéria, independentemente dos níveis de Pi no meio (Figura 24).

Vibrio cholerae tem como hábitat natural ambientes aquáticos altamente variáveis (nutrientes, temperatura, pH entre outros) onde milhões de organismos disputam os poucos recursos nutricionais e estão sujeitos a substâncias tóxicas produzidas pelos seus competidores. A temperatura média das superfícies aquáticas é de 20°C (Temperature of Ocean Water, University of Michigan. August 31, 2001) e a maior parte do fósforo encontra-se sob a forma de compostos insolúveis que não podem ser utilizados diretamente na nutrição bacteriana (Donohue & Irvine, 2008). Portanto, nestes ambientes *V. cholerae* se encontra preferencialmente em biofilmes, estruturas que conferem vantagens adaptativas, pois atuam como barreiras protetoras (Wai *et al.*, 1998), em grande parte devido a uma matriz exopolissacarídica, que diminui a susceptibilidade a agentes deletérios mais diversos (Jefferson, 2004).

Cepas patogênicas de *V. cholerae*, por outro lado, podem sobreviver também no hospedeiro humano, onde encontram condições variadas e distintas de seu hábitat natural em termos de temperatura, variações de pH, nutrientes, entre outros fatores. *In vivo* a bactéria encontra a temperatura em torno de 37°C, a concentração de nutrientes não é mais um fator limitante, mas a colonização do intestino humano requer que a bactéria atravesse a barreira ácida do estômago e resista aos efeitos deletérios dos sais biliares no duodeno. Vários processos em *V. cholerae* aparentemente co-regulam a expressão de biofilmes e de genes de virulência. Um modelo proposto para infecção sugere que a bactéria entre no hospedeiro em forma de biofilme resistente ao ambiente ácido do estômago, se disperse e então passe a expressar os fatores de virulência para a colonização intestinal (Zhu & Mekalanos, 2003). Portanto, acredita-se que a habilidade de formar biofilme tenha um papel também na infectividade e patogenicidade de *V. cholerae*.

Dados da literatura e do nosso grupo mostram que sais biliares induzem a formação de biofilme em LB (Hung *et al.*, 2006) e em meio definido sob limitação de Pi (Barbosa, 2006). Análises preliminares da produção de biofilme pela cepa selvagem N16961 do biotipo El Tor de

V. cholerae O1 a temperaturas distintas, 22°C (média dos ambientes aquáticos) e 37°C (média do hospedeiro) em meios complexo (LB) e definidos, na abundância (TGHP) e limitação de Pi (TGLP), com e sem adição de DOC, mostraram produção de biofilme significativa aumentada em TGLP/DOC, principalmente a 37°C (Barbosa, 2006). No entanto, a 37°C a produção de biofilme em TGLP e MGLP (Figuras 10, 11 e 23) foi menor que em LB. Baixos níveis de Pi, portanto parecem afetar o processo negativamente. Esses resultados mostram uma diferença entre o observado com na cepa N16961 de *V. cholerae* O1 e as espécies *Agrobacterium tumefaciens* (Danhorn *et al.*, 2004) e *S. typhimurium*, cuja produção de biofilme é aumentada sob deficiência de Pi (Danhorn *et al.*, 2004; Gerstel & Romling, 2001), mas similaridade com *Pseudomonas sp.* que quando submetida a esta condição produz menos biofilme que em abundância de Pi (Monds *et al.*, 2001).

V. cholerae, no entanto, forma biofilme tanto no meio ambiente, onde os níveis de Pi são em geral baixos (Steinberger *et al.*, 2002), condição apropriada para expressão dos membros do regulon Pho, quanto *in vivo*, no trato intestinal do hospedeiro (Faruque *et al.*, 2006), onde os níveis de Pi devem ser altos e, teoricamente, o regulon Pho da bactéria, em teoria, não deveria ser expresso (von Kruger *et al.*, 1999). No entanto, dados da literatura mostraram que alguns membros do regulon Pho de *V. cholerae* (*phoU*, *pstC*, *vca_1008*) são de fato expressos *in vivo* (Merrell *et al.*, 2002; Osorio *et al.*, 2004). Além disto, mutantes *phoB* e *vca_1008* de *V. cholerae* colonizam mal o intestino de modelos animais (Osorio *et al.*, 2004; von Kruger *et al.*, 1999).

Tomados em conjunto, estes dados indicam que o sistema PhoB/PhoR e alguns membros do regulon Pho devem ter algum papel importante na sobrevivência da bactéria no trato intestinal. No intestino delgado do hospedeiro ainda são encontrados os sais biliares, detergentes biológicos que induzem um aumento na formação biofilme por *V. cholerae in vitro* em LB (Hung *et al.*, 2006) e meio definido sob deficiência de Pi (Barbosa, 2006). Portanto, as condições escolhidas para produção de biofilme pela cepa N16961 para análise proteômica foram aquelas que permitiram sua maior produção *in vitro* e que, ao mesmo tempo, mais se

aproximam da condição *in vivo*, isto é, presença de sais biliares e baixos níveis de Pi para expressão do regulon Pho.

Já foi demonstrado que a passagem do estágio planctônico para o biofilme em *V. cholerae* envolve mudanças na transcrição genética, que resultam na produção da matriz extracelular e montagem da estrutura tridimensional do biofilme (Watnick & Kolter, 1999). Em outra análise, usando microarranjos de transcritos, os autores mostraram que genes distintos de *V. cholerae* são induzidos nas células planctônicas e nos estágios de monocamada e biofilme maduro (Moorthy & Watnick, 2005). Embora este tipo de estudo possibilite uma visão das etapas do processo a nível molecular, os resultados de uma análise de transcriptoma nem sempre refletem o que de fato ocorre na célula e para isto uma análise proteômica seria mais apropriada. Portanto, optamos por analisar células planctônicas e biofilme maduro do ponto de vista das proteínas, por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Esta estratégia, além de permitir verificar as proteínas expressas diferencialmente pelas células nas duas condições, permite ainda a detecção de isoformas, ou seja, de proteínas produtos de um mesmo gene que diferem nos valores de MM_e e/ou pl_e , e que, em muitos casos, são funcionalmente distintas.

Análise das amostras de células planctônicas versus biofilme por eletroforese 2D permitiu visualizar 243 *spots* protéicos expressos diferencialmente nas duas condições. Dos 97 *spots* das células planctônicas, foram identificadas proteínas em 65 deles (~70%) e destas 88% eram de *spots* únicos da condição. No caso do biofilme, dos 146 *spots* diferencialmente expressos, foram identificadas 65 (~50%) e cerca de 84% destas eram específicas do biofilme. Embora não tenha sido possível identificar todas as proteínas nos 243 *spots* diferenciais, a maioria das proteínas identificadas em células livres e biofilme foram provenientes de *spots* específicos a cada condição. Assim sendo, acreditamos que o conjunto de proteínas identificadas em células livres e biofilme poderiam dar uma visão global do metabolismo das células em cada caso.

Metabolismo nas células planctônicas

A maioria das proteínas identificadas das células planctônicas são de vias de metabolismo de energia, principalmente glicólise e gliconeogênese (Figura 1 do Apêndice). Dentre elas, entretanto, duas são isoformas da PckA (VC_2738), uma enzima específica da gliconeogênese, que catalisa a formação de oxalacetato a fosfoenolpiruvato, quando a célula enfrenta deficiência de oxigênio no meio. A L-alanina desidrogenase (Ald, VC_1905), outra proteína das células planctônicas, por sua vez, catalisa a deaminação oxidativa da L-alanina a piruvato e amônia, contribuindo assim com piruvato para a glicólise/gliconeogênese. A propósito, em inúmeras espécies bacterianas, tais como *Mycobacterium* sp, *Bacillus subtilis* e *Synechococcus elongatus*, Ald é expressa em resposta a apóxia e/ou deficiência nutricional (Lahmi *et al.*, 2006; Tam le *et al.*, 2007). AckA (VC_1098), ou acetato cinase funciona na via de Pta-AckA (acetil-CoA(CoA):Pi acetiltransferase--ATP:acetato fosfotransferase), que transformam acetil-fosfato em acetato e ATP e cuja atividade depende das condições ambientais. Em *E. coli*, por exemplo, deficiência de glicose e anaerobiose causam um aumento na expressão de componentes desta via com concomitante redução na expressão de algumas enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, portanto, Pta-AckA é uma via alternativa de geração de energia (CAT) (Wolfe, 2005). Curiosamente, em *Sinorhizobium meliloti* a expressão da via Pta-AckA é regulada positivamente em resposta a limitação de Pi (Summers *et al.*, 1999). Entre as três enzimas do CAT expressas pelas células livres, uma delas a SucD (VC_2084) é a subunidade α do complexo succinil-CoA sintase, que catalisa a interconversão do succinil-CoA a succinato no CAT. SucD pode catalisar a reação em um sentido ou no outro, dependendo se a célula está em aerobiose ou anaerobiose, portanto, é possível que sob baixo nível de oxigenação, condição das células planctônicas após 48h de crescimento em TGLP, a atividade reversa de SucD (succinato a succinil-CoA) contribua para manter baixa a atividade do CAT. A FrdA (VC_2656) ou fumarato redutase é outra enzima do CAT que catalisa a interconversão de

succinato e fumarato, no sentido contrário a succinato desidrogenase (SDH) do CAT. Em *E. coli* FrdA é expressa em condições de anaerobiose, quando os níveis de SDH e a atividade do CAT na célula são baixos (Maklashina *et al.*, 2006). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que as células planctônicas de N16961, após 48h em MGLP, sem agitação, obtêm energia através da biossíntese de ATP via ATP sintase (cujas subunidades foram identificadas no lisado) e Pta-AckA e fonte de carbono (glicose), através da gliconeogênese, para suprir a deficiência nutricional do meio. Esta via pode ainda receber o piruvato obtido a partir da alanina via proteína Ald (VC_1905) e UDP-glicose produzida via GalE-2 (VC_A0774) (Thoden *et al.*, 1996) (Figura 1 do Apêndice).

O segundo maior grupo de proteínas das células planctônicas foi o das transportadoras que incluiu não só as proteínas da classe de “transporte e ligação” mas, possivelmente também, a proteína VC_0430, com alta similaridade a um transportador periplasmático de dicarboxilatos (Kelly & Thomas, 2001) do grupo “envelope celular”. Além destas duas proteínas ‘hipotéticas’, a VC_1334, com a função putativa de ligadora periplasmática de tricarboxilatos do sistema TctI (Widenhorn *et al.*, 1989) e a VC_1101, com alta identidade com uma ligadora de substrato de um sistema de transporte ABC, podem ser incluídos neste grupo. Entre as transportadoras, em células planctônicas, foram identificadas várias do regulon Pho, em resposta à deficiência de Pi no meio. Entre elas, estão três isoformas da PstS, uma delas (*spot 35*) foi uma das proteínas mais expressas na condição, confirmando resultados anteriores (von Kruger *et al.*, 2006). Outra proteína do regulon Pho encontrada nas células planctônicas foi a VC_A1008, uma fosfoporina putativa, identificada anteriormente (von Kruger *et al.*, 2006). Proteínas de transporte de açúcares, peptídeos, aminoácidos e outros nutrientes são muito expressas em condição em que a habilidade biosintética da célula está reduzida, para permitir a obtenção de nutrientes do meio. Alta expressão deste grupo de proteínas já foi observado em células de outra cepa de *V. cholera* em fase estacionária da cultura, sob limitação de Pi (von Kruger *et al.*, 2006).

Além dessas, as células livres expressaram inúmeras proteínas de proteção contra estresse. Entre estas foram identificadas as seguintes: UspA (Nachin *et al.*, 2005) e AhpC/Tsa (Chae *et al.*, 1994) ambas com atividades antioxidantes, a SspA de resposta a deficiência nutricional (Hansen *et al.*, 2005), e a TolC, que em *V cholerae* é requerida para resistência a diversos agentes antimicrobianos (Bina & Mekalanos, 2001). Os diversos fatores de alongamento classificados entre as proteínas de “síntese de proteínas”, também podem atuar como chaperoninas moleculares (Caldas *et al.*, 2000) para o dobramento adequado de proteínas sob estresses, assim como FkIB, outra proteína de resposta a estresse, que além de facilitar dobramento, aumenta significativamente a solubilidade de muitos agregados de proteínas em *E. coli* (Han *et al.*, 2007). A proteína de aglutinação (VC_1621) foi anotada como relacionada à patogênese em *V cholerae*, mas em *Shewanella oneidensis* está envolvida com a agregação célula-célula e célula-superfície e também é induzida sob estresse. RecA (VC_0543), proteína de metabolismo de DNA, tem múltiplas funções que afetam diferentes processos celulares tais como, recombinação gênica (Kowalczykowski *et al.*, 1994), replicação translesão do DNA (Schlacher *et al.*, 2006) e indução de auto clivagem da LexA (Friedberg *et al.*, 2006). A presença de RecA nas células livres pode ser uma resposta ao estresse causado por metabólitos tóxicos produzidos pela bactéria, que podem estar, de alguma forma, agindo sobre o DNA bacteriano.

Tomadas em conjunto, estas informações são fortes indicativos de que as células planctônicas de N16961, após 48h em MGLP, sem agitação, se encontravam em deficiência nutricional, apóxia, baixa atividade biosintética, mas preparadas para o combate ao estresse em geral, condições compatíveis com a fase estacionária de crescimento celular.

Metabolismo celular no biofilme

Assim como as células planctônicas, o biofilme também expressou inúmeras proteínas do metabolismo de energia, principalmente da glicólise/gliconeogênese (Figura 2 do Apêndice). Mas, ao contrário das células livres, as do biofilme não expressaram proteínas específicas da gliconeogênese. Portanto, é possível que a glicólise seja mais importante no metabolismo de energia das células do biofilme. Além disto, a expressão de proteínas tais como a 6-P-gluconolactonase ou Pgl (VC_A0897), enzima chave da via das pentoses, mais a pirofosfatase inorgânica ou Ppa (VC_2545) envolvida na reciclagem do Pi intracelular e a fosfoacetil transferase, Pta (VC_1097) da via Pta—AckA, entre outras, sugere que as células em biofilme contam com várias vias de produção de energia (Figura 2 do Apêndice). O segundo maior grupo de proteínas expresso pelas células do biofilme, não foi o de transportadores como observado para as células planctônicas, mas, de biossíntese de aminoácidos. Como o meio MGLP não possui aminoácidos, as células têm que sintetizá-los de acordo com suas necessidades e a expressão destas proteínas sugere que as vias biosintéticas estão ativas nas células do biofilme. Além disto, duas proteínas dessas vias, a ArgG e ArgH (VC_2642 e VC_2641) também conferem resistência a ácidos e, *E. coli*, em condições de limitação de nutrientes pode usar a arginina como fonte de carbono e nitrogênio (Weerasinghe *et al.*, 2006). No caso de deficiência de Pi o metabolismo anaeróbico de arginina pode ser uma adaptação fisiológica importante e intimamente associada à sobrevivência da célula (Gerard *et al.*, 1999). Outras proteínas expressas no biofilme foram a PdxJ de biossíntese de vitamina B6 (VC_2458), Metk (VC_0472) de biossíntese de SAM, e LuxS (VC_0557) a sintase terminal do autoindutor AI-2 de *quorum sensing*, que regula a expressão de inúmeros processos celulares, incluindo biofilme em *V. cholerae* (Kaper & Sperandio, 2005; Schauder *et al.*, 2001).

O número de proteínas de "transporte e ligação" identificadas nas células de biofilme foi bem menor que os das células livres. Dentre elas vale ressaltar a proteína VC_1091 ou OppA

(*spot* 31) que foi identificada entre as proteínas do biofilme como uma isoforma de MM_e cerca de 20kDa menor do que suas isoformas das células planctônicas (*spots* 25 e 26). OppA é membro do sistema de transporte de peptídeos (Opp), que tem papel importante na nutrição bacteriana e em vários outros processos celulares tais como regulação da expressão gênica, quimiotaxia, conjugação e desenvolvimento de competência em *Vibrio fluvialis* (Lee *et al.*, 2004). Além disto, OppA atua como regulador negativo da formação de biofilme (Lee *et al.*, 2004), portanto é possível que a forma da proteína encontrada na amostra do biofilme da cepa N16961 seja um produto de degradação derivado da inativação de OppA. Uma observação relevante foi que, entre as proteínas de transporte conhecidas que são induzidas sob limitação de Pi em *V. cholerae*, só o transportador UgpB de glicerol fosfato (VC_1549) e a fosfoporina putativa VC_A1008 foram identificadas nas células em biofilme. A proteína ligadora de Pi, PstS, membro do regulon Pho de *V. cholerae*, uma das proteínas mais expressas nas células livres neste e em estudos anteriores (von Kruger *et al.*, 2006), não foi identificada em biofilme. No entanto, é possível que outros sistemas de captação de Pi estivessem funcionando nas células nessa condição. A proteína CysP (VC_0538), por exemplo, uma sulfato permease, tem alta identidade com a proteína PitA do sistema de transporte de baixa afinidade de Pi, portanto, CysP poderia ser uma outra via de captação do Pi pelo biofilme (Mansilla & de Mendoza, 2000). Além disto, as células de biofilme em MGLP/DOC expressaram a proteína Ppa (VC_2545), uma pirofosfatase inorgânica que libera Pi de moléculas de P_{Pi} intracelular (Gomez-Garcia *et al.*, 2003), sugerindo que este pode ser um outro mecanismo encontrado pelas células do biofilme para sobreviver em meio deficiente em Pi. Outras proteínas envolvidas em transporte no biofilme foram a GlnB-2 do sistema de captação de nitrogênio e a CysN, subunidade 1 (VC_2559) de captação de enxofre.

Assim como a células livres, as de biofilme também expressaram proteínas de proteção contra o estresse, porém em menor número e diversidade. Elas foram principalmente chaperoninas e fatores de alongamento (chaperoninas putativas) além da proteína OmpA, uma

OMP que em *E coli* também tem um papel vital na manutenção da estrutura celular (Wang, 2002). Proteínas com funções antioxidantes tais como AhpC, de estresse universal como a UspA e de stringência/reposta a estarvação como a SspA, todas identificadas em células livres, não foram encontradas entre as proteínas de biofilme de *V. cholerae*, sugerindo que nesse estado as células se encontram mais protegidas contra os estresses ambientais, como já havia sido observado por outros pesquisadores.

Este conjunto de informações sugere que as células do biofilme de N16961, após 48h em MGLP/DOC, sem agitação, apresentaram um metabolismo bem diferente do das células livres e mais próximo do que se observa em células em crescimento exponencial. Porém, com uma taxa de crescimento reduzida, devido ao pequeno suprimento de nutrientes e baixo nível de oxigênio molecular. Há evidências de que as células do biofilme não conseguiram exaurir as reservas de glicose do meio e continuaram com várias atividades de biossíntese, portanto, não sentiram todos os tipos de estresses que afetaram as células livres, cultivadas em MGLP, após o mesmo período.

Células livres versus biofilme: metabolismo e estado fisiológico

Os dados deste trabalho permitem especular sobre as condições metabólicas e fisiológicas das células de *V. cholerae* livres e em biofilme cultivadas respectivamente em MGLP e MGLP/DOC a 37°C sem agitação por 48h. Há evidências de que elas diferiram quanto à via de metabolismo da glicose. A gliconeogênese apareceu como a via possivelmente mais utilizada pelas células livres, enquanto que a glicólise foi a mais utilizada pelas células do biofilme, sugerindo que no meio MGLP/DOC ainda havia glicose suficiente para ser metabolizada como fonte de carbono e energia. Isto está de acordo com o fato de que as células de biofilme expressaram várias proteínas biossintéticas, enquanto que as células planctônicas produziram inúmeras e diversas proteínas de transporte. As proteínas de estresse

expressas em cada condição também variaram em quantidade e diversidade, mostrando que o tipo de estresse a que células livres e biofilme estavam submetidas era diferente.

Pelo tipo de proteínas expressas em cada caso pode-se supor que a condição de biofilme conferiu às células uma proteção extra não disponível às células livres. Quanto ao metabolismo de Pi, era esperado que ambas expressassem membros conhecidos do regulon Pho de *V. cholerae* devido aos baixos níveis de Pi nos meios utilizados. Porém, esta hipótese não se confirmou no caso das células do biofilme. Essas expressaram a fosfoporina putativa VC_A1008, mas não produziram proteínas da via majoritária de captação de Pi (transportador PstS do sistema Pst), normalmente superexpressas nesta condição. Por outro lado, elas expressaram proteínas tais como a Ppa e CysP que poderiam funcionar para suprir a deficiência do Pi do meio. Vale ressaltar, no entanto, que CysP, é uma Pi permease putativa com alta identidade a Pta do sistema Pit, de baixa afinidade por Pi, ou seja, que as células normalmente utilizam na captação de Pi quando em abundância no meio. Portanto, é possível que as células em biofilme não estivessem sentido os baixos níveis de Pi no meio, do mesmo modo que as células livres, o que poderia explicar os diferentes mecanismos utilizados por elas para obtenção de Pi.

Dentre as proteínas expressas especificamente pelas células do biofilme de N16961, encontramos a LuxS (AI-2 sintase), cujo papel no processo em *V. cholerae* é bem descrito (Winzer *et al.*, 2002; Xavier & Bassler, 2003). Além dessa, foram identificadas outras, com funções desconhecidas na formação de biofilme em *V. cholerae*, mas com papéis determinados nesse processo em outras espécies bacterianas. Foram elas OppA descrita em *V. fluvialis* (Lee *et al.*, 2004), HtrA em *Streptococcus mutants* (Biswas & Biswas, 2005), MetK mais expressa no biofilme de *E. coli* (Ren *et al.*, 2004) e GapA, TufB, GroEL, DnaK e RpoA mais expressas no biofilme de *P. aeruginosa* (Mikkelsen *et al.*, 2007).

Em um trabalho semelhante com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Mikkelsen *et al.*, 2007) os pesquisadores analisaram por eletroforese 2D as inter-relações entre células

planctônicas, colônias e biofilme em meio rico. As conclusões a que chegaram foram que o perfil de proteínas de colônias e planctônicas foi muito semelhante e compatível com o de células livres em fase estacionária de cultura. As proteínas do biofilme, ao contrário, apresentaram um perfil distinto e mais próximo do que se observa em células livres na fase exponencial de cultura. Estas informações confirmam o que foi observado no presente trabalho com *V cholerae* N16961 e levantam a hipótese de que estes fenômenos possam ocorrer em geral entre as bactérias de várias espécies.

Comentários gerais

Além das informações sobre o estado fisiológico e metabólico das células livres e de biofilme, neste trabalho demos uma contribuição adicional pela identificação de proteínas consideradas hipotéticas, mostrando que os genes correspondentes são, aparentemente, funcionais. Para algumas delas foi possível atribuir funções putativas que, no entanto precisam ser validadas por outros experimentos.

Uma comparação entre os dados da análise proteômica obtidos neste trabalho e os de uma análise por transcriptoma obtidos por Moorthy e Watnick (2005) não mostrou muita coincidência. Estes autores verificaram que em ambos, células planctônicas e biofilme, a maioria dos genes induzidos era de proteínas “hipotéticas”, seguido por proteínas de “transporte e ligação” também, em ambos os casos. Curiosamente, o único gene identificado no trabalho de Moorthy e Watnick (2005) que corresponde a uma proteína identificada em nosso trabalho foi o da VC_A1334, do grupo das “hipotéticas”, a qual atribuímos a função de uma ligadora periplasmática de tricarboxilatos do sistema de transporte Tctl. Porém, segundo os autores, este gene foi o mais expresso em biofilme, enquanto que a proteína VC_1334 foi detectada nesse trabalho como um *spot* único no gel 2D de células planctônicas. Esta comparação evidencia, mais uma vez, a dificuldade de se comparar dados de análises proteômicas e

transcriptômicas, e as discrepâncias a que elas podem levar, comprometendo assim um entendimento maior dos processos (Gygi *et al.*, 1999).

Muitas proteínas sabidamente relacionadas com a formação de biofilme como as relacionadas a síntese de polissacarídeos (Vps), sistema de secreção do tipo II (Eps), pílus do tipo IV (MSHA) entre outros (Beyhan *et al.*, 2006) não foram identificadas ou por estar em *spots* muito fracos ou porque são expressas nas fases iniciais da formação do biofilme e, por isso, não foram detectadas no géis do biofilme maduro.

Efeito de mutações em genes *ompU*, *vc_a1008*, *toxR*, e *phoB* na produção de biofilme pela cepa N16961.

Os produto do gene *ompU* é uma porina com papel na resistência a sais biliares *in vitro* (Provenzano & Klose, 2000). O *toxR* codifica o regulador central da cascata de virulência ToxR, que também controla positivamente a expressão de *ompU* (Provenzano & Klose, 2000). O produto de *phoB*, a reguladora de resposta dos sistema de dois componentes PhoR/PhoB, regula a expressão gênica em resposta a limitação de Pi no meio e também tem funções na patogenicidade da bactéria (von Kruger *et al.*, 2006). O gene *vc_a1008*, por sua vez, é regulado por Pi, via PhoR/PhoB e além de ser expresso *in vivo*, tem um papel na colonização intestinal (Osorio *et al.*, 2004). Mutantes da cepa N16961 defectivos nestes genes foram então selecionados para verificar o efeito das mutações correspondentes na formação de biofilme.

A formação de biofilme pela cepa selvagem N16961 e os mutantes CG4 (*vc_a1008*), CG5 (*toxR*) CG6 (*ompU*) e WK10 (*phoB*) foi analisada nos meios LB, MGLP e MGLP/DOC em duas temperaturas diferentes, 22°C e 37°C. A maior formação de biofilme a 22°C em LB que nos outros meios estudados, para todas as cepas, pode ser devido ao maior crescimento bacteriano no meio rico já que os outros meios são deficitários de nutrientes e a temperatura não é a ótima para o crescimento.

A 37°C, o incremento na quantidade de biofilme pela adição de DOC ao meio comprovou o seu efeito positivo no processo, principalmente para as cepas selvagens e mutantes *ompU* e *toxR*. Este resultado é curioso dada as informações de que esta porina (OmpU) tem um papel importante na resistência a sais biliares *in vitro* e de que sua expressão depende de ToxR (Provenzano *et al.*, 2000). Porém, podem ser indicativos de que na ausência de OmpU outra proteína ou mecanismo celular exerça o papel na *V. cholerae*. O fato do DOC não ter aumentado significativamente a formação de biofilme pelos mutantes nos genes do regulon Pho, *phoB* e *vc_a1008*, aliado a menor produção de biofilme por essas cepas em LB que pela cepa selvagem, indica que estes genes podem estar de alguma forma relacionados ao processo.

Diferentemente do que foi observado para o mutante *toxR* de *V. cholerae*, um mutante *toxR* de *V. anguillarum* forma mais biofilme que o selvagem em meio mínimo, sugerindo um novo papel para ToxR na resposta a estímulos ambientais (Wang *et al.*, 2002). Apesar de *V. cholerae* formar pouco biofilme em MGLP, *E. coli* nessa condição forma biofilme, superexpressa PhoE (uma fosfoporina induzida por limitação de Pi) e apresenta uma alta resistência a antibióticos em relação a bactérias planctônicas. Isto pode sugerir que, ou há falta de fosfato dentro do biofilme ou ainda, que a proteína tem outra função nesta condição (Vilain *et al.*, 2002). Neste trabalho mostramos que tanto células planctônicas quanto biofilme de N16961, expressam VC_A1008 (homóloga de PhoE de *E. coli*) nas condições estudadas, mas não foi possível determinar se houve variação na expressão da proteína entre as condições.

- A cepa N16961 de *V. cholerae* O1 forma uma quantidade maior de biofilme em baixo Pi (MGLP), a 37°C, na presença do que na ausência do ácido deoxicólico (DOC), um componente majoritário da bile.
- O crescimento em placas de petri, sem agitação, no MGLP/DOC a 37°C por 48h foi a condição mais eficiente entre as testadas para formação de biofilme pela cepa N16961.
- O detergente zwitteriônico ASB-14 usado no tampão para preparo do lisado protéico para análise por eletroforese 2D foi o mais eficiente que o Triton X-100 para solubilização das proteínas em geral.
- Bactérias planctônicas cultivadas em MGLP e biofilme em MGLP/DOC expressaram inúmeras proteínas diferencialmente e a grande maioria delas foi proveniente de *spots* específicos no gel 2D referente a cada condição.
- Análise do conjunto de proteínas expressas diferencialmente e identificadas para as células em cada condição permitiu concluir que:
 - As células planctônicas cultivadas em MGLP, nas condições do estudo, mostraram características metabólicas de células na fase estacionária de cultura.
 - As células derivadas do biofilme em MGLP/DOC, nas condições deste estudo, mostraram características metabólicas de células na fase exponencial de cultura.
- A análise proteômica diferencial permitiu identificar proteínas do biofilme sem funções definidas no processo em *V. cholerae*, porém com funções definidas na produção de biofilme em outras espécies bacterianas. Estas poderão ser objetos de estudos futuros.
- A expressão diferencial de biofilme pelos mutantes CG4 (*vc_a1008*), CG5 (*toxR*) e WK10 (*phoB*) sugere papéis para os produtos dos referidos genes na formação do biofilme e conseqüentemente do regulons Pho e Tox de *V. cholerae* no processo.

- Alam, M., Sultana, M., Nair, G. B., Sack, R. B., Sack, D. A., Siddique, A. K., Ali, A., Huq, A. & Colwell, R. R. (2006).** Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2849-2855.
- Alam, M., Sultana, M., Nair, G. B. & other authors (2007).** Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17801-17806.
- Albert, M. J., Siddique, A. K., Islam, M. S., Faruque, A. S., Ansaruzzaman, M., Faruque, S. M. & Sack, R. B. (1993).** Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet* **341**, 704.
- Ali, A., Johnson, J. A., Franco, A. A., Metzger, D. J., Connell, T. D., Morris, J. G., Jr. & Sozhamannan, S. (2000).** Mutations in the extracellular protein secretion pathway genes (*eps*) interfere with rugose polysaccharide production in and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **68**, 1967-1974.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Alvarez, G., Heredia, N. & Garcia, S. (2003).** Relationship between the effects of stress induced by human bile juice and acid treatment in *Vibrio cholerae*. *J Food Prot* **66**, 2283-2288.
- Amersham Biosciences & Genenbio (2003).** *ImageMaster 2D Platinum Software Version 5.0*, AB edn: Amersham Biosciences.
- Barbosa, L. C. (2006).** Efeitos das condições ambientais na formação de biofilme em cepas clássica e El Tor de *Vibrio cholerae* O1. In *IBCCF*, pp. 51. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Barreto, M., Jedlicki, E. & Holmes, D. S. (2005).** Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2902-2909.
- Barua, D. & Greenough, W. B. (1992).** Cholerae. *Plenum Medical*.
- Baumann, P., Furniss, A. L. & Lee, J. V. (1984).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *The Williams & Wilkins Co* **1**, 518-538.
- Begley, M., Gahan, C. G. & Hill, C. (2005).** The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 625-651.
- Behari, J., Stagon, L. & Calderwood, S. B. (2001).** *pepA*, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **183**, 178-188.
- Bennish, M. L. (2004).** *Cholera: pathophysiology, clinical features, and treatment*. Washington.
- Berkelman, T. & Stenstedt, T. (1998).** Handbook: 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients. *Principles & Methods Amersham Biosciences* **80**, 6429 – 6460.
- Berkelman, T. & Stenstedt, T. (2003).** *2-D Eletroforesis Principles and Methods*: Vastra Aros

- Beyhan, S., Tischler, A. D., Camilli, A. & Yildiz, F. H. (2006).** Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J Bacteriol* **188**, 3600-3613.
- Bilski, P., Li, M. Y., Ehrenshaft, M., Daub, M. E. & Chignell, C. F. (2000).** Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochemistry and photobiology* **71**, 129-134.
- Bina, J. E. & Mekalanos, J. J. (2001).** *Vibrio cholerae* tolC is required for bile resistance and colonization. *Infect Immun* **69**, 4681-4685.
- Biswas, S. & Biswas, I. (2005).** Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **73**, 6923-6934.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Butler, S. M. & Camilli, A. (2004).** Both chemotaxis and net motility greatly influence the infectivity of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5018-5023.
- Butler, S. M. & Camilli, A. (2005).** Going against the grain: chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. *Nat Rev Microbiol* **3**, 611-620.
- Caldas, T., Laalami, S. & Richarme, G. (2000).** Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *J Biol Chem* **275**, 855-860.
- Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G. & Rhee, S. G. (1994).** Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7017-7021.
- Chakrabarti, S. R., Chaudhuri, K., Sen, K. & Das, J. (1996).** Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU. *J Bacteriol* **178**, 524-530.
- Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A. K., Bhadra, R. K. & other authors (2000).** Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4022-4028.
- Champion, G. A., Neely, M. N., Brennan, M. A. & DiRita, V. J. (1997).** A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Mol Microbiol* **23**, 323-331.
- Chatterjee, S. N. & Chaudhuri, K. (2003).** Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta* **1639**, 65-79.
- Cho, H., Jonsson, H., Campbell, K., Melke, P., Williams, J. W., Jedynak, B., Stevens, A. M., Groisman, A. & Levchenko, A. (2007).** Self-organization in high-density bacterial colonies: efficient crowd control. *PLoS biology* **5**, e302.
- Clark, A. J. (1973).** Recombination deficient mutants of *E. coli* and other bacteria. *Annual review of genetics* **7**, 67-86.

Colwell, R. R. & Spira, W. M. (1992). The ecology of *Vibrio cholerae* in Cholera. *Plenum Medical Book Company*.

Colwell, R. R. & Huq, A. (1994). Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera. *Ann N Y Acad Sci* **740**, 44-54.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**, 435-464.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.

Danhorn, T., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M. R. & Fuqua, C. (2004). Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J Bacteriol* **186**, 4492-4501.

Davidson, V. L. (2007). Protein-derived cofactors. Expanding the scope of post-translational modifications. *Biochemistry* **46**, 5283-5292.

DiRita, V. J., Parsot, C., Jander, G. & Mekalanos, J. J. (1991). Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5403-5407.

Donohue, I. & Irvine, K. (2008). Quantifying variability within water samples: the need for adequate subsampling. *Water Res* **42**, 476-482.

Duffy, E. B. & Barquera, B. (2006). Membrane topology mapping of the Na⁺-pumping NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae* by PhoA-green fluorescent protein fusion analysis. *J Bacteriol* **188**, 8343-8351.

Dutta, B., Ghosh, R., Sharma, N. C. & other authors (2006). Spread of cholera with newer clones of *Vibrio cholerae* O1 El Tor, serotype inaba, in India. *J Clin Microbiol* **44**, 3391-3393.

Echols, H., Garen, A., Garen, S. & Torriani, A. (1961). Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. *J Mol Biol* **3**, 425-438.

Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M. & Banfield, J. F. (2000). An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* **287**, 1796-1799.

Elkins, J. G., Hassett, D. J., Stewart, P. S., Schweizer, H. P. & McDermott, T. R. (1999). Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4594-4600.

Ermolaeva, M. D., White, O. & Salzberg, S. L. (2001). Prediction of operons in microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **29**, 1216-1221.

Espeland, E. M. & Wetzel, R. G. (2001). Complexation, Stabilization, and UV Photolysis of Extracellular and Surface-Bound Glucosidase and Alkaline Phosphatase: Implications for Biofilm Microbiota. *Microb Ecol* **42**, 572-585.

- Faruque, S. M., Ahmed, K. M., Abdul Alim, A. R., Qadri, F., Siddique, A. K. & Albert, M. J. (1997).** Emergence of a new clone of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor displacing *V. cholerae* O139 Bengal in Bangladesh. *J Clin Microbiol* **35**, 624-630.
- Faruque, S. M., Albert, M. J. & Mekalanos, J. J. (1998a).** Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1301-1314.
- Faruque, S. M., Asadulghani, Saha, M. N., Alim, A. R., Albert, M. J., Islam, K. M. & Mekalanos, J. J. (1998b).** Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTXPhi: molecular basis for origination of new strains with epidemic potential. *Infect Immun* **66**, 5819-5825.
- Faruque, S. M., Biswas, K., Udden, S. M., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., Nair, G. B. & Mekalanos, J. J. (2006).** Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6350-6355.
- Fernandes, A. P. & Holmgren, A. (2004).** Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & redox signaling* **6**, 63-74.
- Field, M., Fromm, D., al-Awqati, Q. & Greenough, W. B., 3rd (1972).** Effect of cholera enterotoxin on ion transport across isolated ileal mucosa. *J Clin Invest* **51**, 796-804.
- Finkelstein, R. A. (1996).** *Cholera, Vibrio cholerae O1 and O139, and Other Pathogenic Vibrios*, 4 edn. Galveston: The University of Texas Medical Branch
- Fotedar, R. (2001).** Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. *Acta Trop* **78**, 31-34.
- Fountoulakis, M. & Gasser, R. (2003).** Proteomic analysis of the cell envelope fraction of *Escherichia coli*. *Amino acids* **24**, 19-41.
- Friedberg, E., Walker, G., Siede, W., Wood, R., Schultz, R. & Tacket, C. (2006).** *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edn. Washington, DC:: American Society for Microbiology.
- Gangarosa, E. F., Beisel, W. R., Benyajati, C., Sprinz, H. & Piyaratn, P. (1960).** The nature of the gastrointestinal lesion in asiatic cholera and its relation to pathogenesis: a biopsy study. *Am J Trop Med Hyg* **9**, 125-135.
- Gardel, C. L. & Mekalanos, J. J. (1996).** Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect Immun* **64**, 2246-2255.
- Gerard, F., Dri, A. M. & Moreau, P. L. (1999).** Role of *Escherichia coli* RpoS, LexA and H-NS global regulators in metabolism and survival under aerobic, phosphate-starvation conditions. *Microbiology* **145** (Pt 7), 1547-1562.
- Gerstel, U. & Romling, U. (2001).** Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol* **3**, 638-648.

- Goldberg, M. B., Boyko, S. A. & Calderwood, S. B. (1990).** Transcriptional regulation by iron of a *Vibrio cholerae* virulence gene and homology of the gene to the *Escherichia coli* fur system. *J Bacteriol* **172**, 6863-6870.
- Gomez-Garcia, M. R., Losada, M. & Serrano, A. (2003).** Concurrent transcriptional activation of *ppa* and *ppx* genes by phosphate deprivation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biochemical and biophysical research communications* **302**, 601-609.
- Gomez-Garcia, M. R., Losada, M. & Serrano, A. (2007).** Comparative biochemical and functional studies of family I soluble inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. *The FEBS journal* **274**, 3948-3959.
- Gonzalez Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E. & Wood, T. K. (2006).** Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* **188**, 305-316.
- Gross, R., Arico, B. & Rappuoli, R. (1989).** Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol Microbiol* **3**, 1661-1667.
- Gupta, S. & Chowdhury, R. (1997).** Bile affects production of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **65**, 1131-1134.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. (1999).** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology* **19**, 1720-1730.
- Hammer, B. K. & Bassler, B. L. (2003).** Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **50**, 101-104.
- Han, K. Y., Song, J. A., Ahn, K. Y., Park, J. S., Seo, H. S. & Lee, J. (2007).** Solubilization of aggregation-prone heterologous proteins by covalent fusion of stress-responsive *Escherichia coli* protein, SlyD. *Protein Eng Des Sel* **20**, 543-549.
- Hansen, A. M., Gu, Y., Li, M., Andrykovitch, M., Waugh, D. S., Jin, D. J. & Ji, X. (2005).** Structural basis for the function of stringent starvation protein a as a transcription factor. *J Biol Chem* **280**, 17380-17391.
- Hase, C. C. & Mekalanos, J. J. (1998).** TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 730-734.
- Haugo, A. J. & Watnick, P. I. (2002).** *Vibrio cholerae* CytR is a repressor of biofilm development. *Mol Microbiol* **45**, 471-483.
- Henke, J. M. & Bassler, B. L. (2004).** Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **186**, 6902-6914.
- Higgins, C. F. (1992).** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* **8**, 67-113.
- Higgins, D. A., Pomianek, M. E., Kraml, C. M., Taylor, R. K., Semmelhack, M. F. & Bassler, B. L. (2007).** The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature* **450**, 883-886.

- Holmgren, J., Clemens, J., Sack, D. A. & Svennerholm, A. M. (1989).** New cholera vaccines. *Vaccine* **7**, 94-96.
- Hoyle, B. D. & Costerton, J. W. (1991).** Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res* **37**, 91-105.
- Hughes, J. A., Brown, L. R. & Ferro, A. J. (1987).** Expression of the cloned coliphage T3 S-adenosylmethionine hydrolase gene inhibits DNA methylation and polyamine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 3625-3632.
- Hughes, J. M., Boyce, J. M., Levine, R. J., Khan, M., Aziz, K. M., Huq, M. I. & Curlin, G. T. (1982).** Epidemiology of El Tor cholera in rural Bangladesh: importance of surface water in transmission. *Bull World Health Organ* **60**, 395-404.
- Hung, D. T. & Mekalanos, J. J. (2005).** Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3028-3033.
- Hung, D. T., Zhu, J., Sturtevant, D. & Mekalanos, J. J. (2006).** Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **59**, 193-201.
- Huq, A., Small, E. B., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R. & Colwell, R. R. (1983).** Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl Environ Microbiol* **45**, 275-283.
- Imlay, J. A. (2006).** Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* **59**, 1073-1082.
- Jefferson, K. K. (2004).** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* **236**, 163-173.
- Kachlany, S. C., Planet, P. J., DeSalle, R., Fine, D. H. & Figurski, D. H. (2001).** Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plague to pond scum. *Trends Microbiol* **9**, 429-437.
- Kaper, J. B., Morris, J. G., Jr. & Levine, M. M. (1995).** Cholera. *Clin Microbiol Rev* **8**, 48-86.
- Kaper, J. B. & Sperandio, V. (2005).** Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **73**, 3197-3209.
- Karatan, E., Saulmon, M. M., Bunn, M. W. & Ordal, G. W. (2001).** Phosphorylation of the response regulator CheV is required for adaptation to attractants during *Bacillus subtilis* chemotaxis. *J Biol Chem* **276**, 43618-43626.
- Kay, B. A., Bopp, C. A. & Wells, J. G. (1994).** *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. *American Society for Microbiology*.
- Kelly, D. J. & Thomas, G. H. (2001).** The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 405-424.

Kiersek, K. & Watnick, P. I. (2003). Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5079-5088.

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**, 1511-1524.

Koder, R. L., Haynes, C. A., Rodgers, M. E., Rodgers, D. W. & Miller, A. F. (2002). Flavin thermodynamics explain the oxygen insensitivity of enteric nitroreductases. *Biochemistry* **41**, 14197-14205.

Kolenbrander, P. E. & London, J. (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* **175**, 3247-3252.

Kovacikova, G. & Skorupski, K. (2001). Overlapping binding sites for the virulence gene regulators AphA, AphB and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae* *tcpPH* promoter. *Mol Microbiol* **41**, 393-407.

Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D. & Rehrauer, W. M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**, 401-465.

Krukonis, E. S., Yu, R. R. & Dirita, V. J. (2000). The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol Microbiol* **38**, 67-84.

Laemeli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the viral bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lahmi, R., Sendersky, E., Perelman, A., Hagemann, M., Forchhammer, K. & Schwarz, R. (2006). Alanine dehydrogenase activity is required for adequate progression of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* **188**, 5258-5265.

Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crepin, S. & Harel, J. (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*.

Lee, E. M., Ahn, S. H., Park, J. H., Lee, J. H., Ahn, S. C. & Kong, I. S. (2004). Identification of oligopeptide permease (*opp*) gene cluster in *Vibrio fluvialis* and characterization of biofilm production by *oppA* knockout mutation. *FEMS Microbiol Lett* **240**, 21-30.

Lee, J. H., Han, K. H., Choi, S. Y. & other authors (2006). Multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates from Mozambique that harbour the classical CTX prophage. *J Med Microbiol* **55**, 165-170.

Leigh, J. A. & Dodsworth, J. A. (2007). Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu Rev Microbiol* **61**, 349-377.

Li, C. C., Merrell, D. S., Camilli, A. & Kaper, J. B. (2002). ToxR interferes with CRP-dependent transcriptional activation of *ompT* in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **43**, 1577-1589.

- Lukey, T. & Snyder, F. F. (1983).** S-adenosylhomocysteine hydrolase activity, deoxyadenosine triphosphate accumulation, and competence of thymocyte and spleen leucocyte response to mitogens in coformycin-treated mice. *Biochemical pharmacology* **32**, 1399-1406.
- Majumdar, A., Ghatak, A. & Ghosh, R. K. (2005).** Identification of the gene for the monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae* serogroup O1 strain. *Gene* **344**, 251-258.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M. & Nakata, A. (1986a).** Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **192**, 549-556.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M. & Nakata, A. (1986b).** Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **190**, 37-44.
- Makino, K., Amemura, M., Kim, S. K., Nakata, A. & Shinagawa, H. (1994).** *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. Washington: Torriani-Gorini et al., Am. Soc. Microbiol.
- Makino, K., Amemura, M., Kawamoto, T., Kimura, S., Shinagawa, H., Nakata, A. & Suzuki, M. (1996).** DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J Mol Biol* **259**, 15-26.
- Maklashina, E., Iverson, T. M., Sher, Y. & other authors (2006).** Fumarate reductase and succinate oxidase activity of *Escherichia coli* complex II homologs are perturbed differently by mutation of the flavin binding domain. *J Biol Chem* **281**, 11357-11365.
- Mansilla, M. C. & de Mendoza, D. (2000).** The *Bacillus subtilis cysP* gene encodes a novel sulphate permease related to the inorganic phosphate transporter (Pit) family. *Microbiology* **146** (Pt 4), 815-821.
- Mathur, J. & Waldor, M. K. (2004).** The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **72**, 3577-3583.
- Matijasevic, Z., Hajec, L. I. & Volkert, M. R. (1992).** Anaerobic induction of the alkylation-inducible *Escherichia coli aidB* gene involves genes of the cysteine biosynthetic pathway. *J Bacteriol* **174**, 2043-2046.
- Matz, C., McDougald, D., Moreno, A. M., Yung, P. Y., Yildiz, F. H. & Kjelleberg, S. (2005).** Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16819-16824.
- Merrell, D. S., Bailey, C., Kaper, J. B. & Camilli, A. (2001).** The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU. *J Bacteriol* **183**, 2746-2754.
- Merrell, D. S., Hava, D. L. & Camilli, A. (2002).** Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **43**, 1471-1491.
- Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K. S. & Welch, M. (2007).** Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 2411-2416.

- Miller, J. F., Mekalanos, J. J. & Falkow, S. (1989).** Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**, 916-922.
- Miller, V. L. & Mekalanos, J. J. (1984).** Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3471-3475.
- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Slade, M. B., Rabilloud, T., Nouwens, A. S., Williams, K. L. & Gooley, A. A. (2000).** Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 2871-2881.
- Monds, R. D., Silby, M. W. & Mahanty, H. K. (2001).** Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol* **42**, 415-426.
- Moorthy, S. & Watnick, P. I. (2005).** Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol Microbiol* **57**, 1623-1635.
- Morris, J. G., Jr. & Black, R. E. (1985).** Cholera and other vibrioses in the United States. *N Engl J Med* **312**, 343-350.
- Morris, J. G., Jr., Sztein, M. B., Rice, E. W., Nataro, J. P., Losonsky, G. A., Panigrahi, P., Tacket, C. O. & Johnson, J. A. (1996).** *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J Infect Dis* **174**, 1364-1368.
- Nachin, L., Nannmark, U. & Nystrom, T. (2005).** Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol* **187**, 6265-6272.
- Nair, G. B., Faruque, S. M., Bhuiyan, N. A., Kamruzzaman, M., Siddique, A. K. & Sack, D. A. (2002).** New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J Clin Microbiol* **40**, 3296-3299.
- Nakamura, H., Koyama, G., Iitaka, Y., Ono, M. & Yagiawa, N. (1974).** Structure of coformycin, an unusual nucleoside of microbial origin. *Journal of the American Chemical Society* **96**, 4327-4328.
- Nesper, J., Kraiss, A., Schild, S., Blass, J., Klose, K. E., Bockemuhl, J. & Reidl, J. (2002).** Comparative and genetic analyses of the putative *Vibrio cholerae* lipopolysaccharide core oligosaccharide biosynthesis (*wav*) gene cluster. *Infect Immun* **70**, 2419-2433.
- Nikaido, H. & Vaara, M. (1985).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* **49**, 1-32.
- Nye, M. B., Pfau, J. D., Skorupski, K. & Taylor, R. K. (2000).** *Vibrio cholerae* H-NS silences virulence gene expression at multiple steps in the ToxR regulatory cascade. *J Bacteriol* **182**, 4295-4303.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B. L., Mori, H. & Mizuno, T. (2002).** Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **46**, 281-291.

- Osorio, C. G., Martinez-Wilson, H. & Camilli, A. (2004).** The *ompU* Parologue *vca1008* is required for virulence of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **186**, 5167-5171.
- Osorio, C. R. & Klose, K. E. (2000).** A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *J Bacteriol* **182**, 526-528.
- Owen, R. L., Pierce, N. F., Apple, R. T. & Cray, W. C., Jr. (1986).** M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis* **153**, 1108-1118.
- Pascual, M., Rodo, X., Ellner, S. P., Colwell, R. & Bouma, M. J. (2000).** Cholera dynamics and El Nino-Southern Oscillation. *Science* **289**, 1766-1769.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. (1999).** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Pittman, M. S., Goodwin, M. & Kelly, D. J. (2001).** Chemotaxis in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: different roles for CheW and the three CheV paralogues, and evidence for CheV2 phosphorylation. *Microbiology* **147**, 2493-2504.
- Poole, K. (2002).** Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* **3**, 77-98.
- Porter, S. L. & Armitage, J. P. (2002).** Phosphotransfer in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J Mol Biol* **324**, 35-45.
- Prouty, M. G., Osorio, C. R. & Klose, K. E. (2005).** Characterization of functional domains of the *Vibrio cholerae* virulence regulator ToxT. *Mol Microbiol* **58**, 1143-1156.
- Provenzano, D. & Klose, K. E. (2000).** Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10220-10224.
- Provenzano, D., Schuhmacher, D. A., Barker, J. L. & Klose, K. E. (2000).** The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infect Immun* **68**, 1491-1497.
- Provenzano, D., Lauriano, C. M. & Klose, K. E. (2001).** Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *J Bacteriol* **183**, 3652-3662.
- Pruzzo, C., Vezzulli, L. & Colwell, R. R. (2008).** Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ Microbiol*.
- Reidl, J. & Klose, K. E. (2002).** *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 125-139.
- Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W. & Wood, T. K. (2004).** Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 515-524.

- Rice, E. W., Johnson, C. H., Dunnigan, M. E. & Reasoner, D. J. (1993).** Rapid glutamate decarboxylase assay for detection of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 4347-4349.
- Richardson, K. (1991).** Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect Immun* **59**, 2727-2736.
- Rivera, I. N., Chun, J., Huq, A., Sack, R. B. & Colwell, R. R. (2001).** Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2421-2429.
- Rosenbusch, J. P. (1974).** Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding. *The Journal of biological chemistry* **249**, 8019-8029.
- Rusch, S. L. & Kendall, D. A. (2007).** Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry* **46**, 9665-9673.
- Ryu, K. S., Kim, C., Kim, I., Yoo, S., Choi, B. S. & Park, C. (2004).** NMR application probes a novel and ubiquitous family of enzymes that alter monosaccharide configuration. *J Biol Chem* **279**, 25544-25548.
- Sack, D. A., Sack, R. B., Nair, G. B. & Siddique, A. K. (2004).** Cholera. *Lancet* **363**, 223-233.
- Safa, A., Bhuyian, N. A., Nusrin, S., Ansaruzzaman, M., Alam, M., Hamabata, T., Takeda, Y., Sack, D. A. & Nair, G. B. (2006).** Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. *J Med Microbiol* **55**, 1563-1569.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sauer, K. & Camper, A. K. (2001).** Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* **183**, 6579-6589.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G. & Bassler, B. L. (2001).** The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* **41**, 463-476.
- Schlacher, K., Cox, M. M., Woodgate, R. & Goodman, M. F. (2006).** RecA acts in trans to allow replication of damaged DNA by DNA polymerase V. *Nature* **442**, 883-887.
- Schnaitman, C. A. (1971).** Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J Bacteriol* **108**, 545-552.
- Schwartz, C. J., Djaman, O., Imlay, J. A. & Kiley, P. J. (2000).** The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9009-9014.
- Sharma, A. & Chaturvedi, A. N. (2006).** Prevalence of virulence genes (*ctxA*, *stn*, *ompW* and *tcpA*) among non-O1 *Vibrio cholerae* isolated from fresh water environment. *Int J Hyg Environ Health* **209**, 521-526.

- Shimizu, S., Shiozaki, S., Ohshiro, T. & Yamada, H. (1984).** Occurrence of S-adenosylhomocysteine hydrolase in prokaryote cells. Characterization of the enzyme from *Alcaligenes faecalis* and role of the enzyme in the activated methyl cycle. *European journal of biochemistry / FEBS* **141**, 385-392.
- Simonet, V. C., Basle, A., Klose, K. E. & Delcour, A. H. (2003).** The *Vibrio cholerae* porins OmpU and OmpT have distinct channel properties. *J Biol Chem* **278**, 17539-17545.
- Spain, J. C. (1995).** Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* **49**, 523-555.
- Sperandio, V., Giron, J. A., Silveira, W. D. & Kaper, J. B. (1995).** The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **63**, 4433-4438.
- Steinberger, R. E., Allen, A. R., Hansa, H. G. & Holden, P. A. (2002).** Elongation correlates with nutrient deprivation in *Pseudomonas aeruginosa*-unsaturated biofilms. *Microb Ecol* **43**, 416-423.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. & Stock, A. M. (1989).** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**, 450-490.
- Summers, M. L., Denton, M. C. & McDermott, T. R. (1999).** Genes coding for phosphotransacetylase and acetate kinase in *Sinorhizobium meliloti* are in an operon that is inducible by phosphate stress and controlled by *phoB*. *J Bacteriol* **181**, 2217-2224.
- Tacket, C. O., Cohen, M. B., Wasserman, S. S. & other authors (1999).** Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El tor inaba three months after vaccination. *Infect Immun* **67**, 6341-6345.
- Tagourti, J., Landoulsi, A. & Richarme, G. (2008).** Cloning, expression, purification and characterization of the stress kinase YeaG from *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* **59**, 79-85.
- Tam le, T., Eymann, C., Antelmann, H., Albrecht, D. & Hecker, M. (2007).** Global gene expression profiling of *Bacillus subtilis* in response to ammonium and tryptophan starvation as revealed by transcriptome and proteome analysis. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **12**, 121-130.
- Teitzel, G. M. & Parsek, M. R. (2003).** Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2313-2320.
- Thoden, J. B., Frey, P. A. & Holden, H. M. (1996).** Molecular structure of the NADH/UDP-glucose abortive complex of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* **35**, 5137-5144.
- Trach, D. D., Cam, P. D., Ke, N. T. & other authors (2002).** Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Vietnam. *Bull World Health Organ* **80**, 2-8.

- VanBogelen, R. A., Olson, E. R., Wanner, B. L. & Neidhardt, F. C. (1996).** Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 4344-4366.
- Vilain, S., Cosette, P., Junter, G. A. & Jouenne, T. (2002).** Phosphate deprivation is associated with high resistance to latamoxef of gel-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* cells. *J Antimicrob Chemother* **49**, 315-320.
- von Kruger, W. M., Humphreys, S. & Ketley, J. M. (1999).** A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology* **145 (Pt 9)**, 2463-2475.
- von Kruger, W. M., Lery, L. M., Soares, M. R., de Neves-Manta, F. S., Batista e Silva, C. M., Neves-Ferreira, A. G., Perales, J. & Bisch, P. M. (2006).** The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics* **6**, 1495-1511.
- Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I. & Yoshida, S. I. (1998).** *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3648-3655.
- Wai, S. N., Mizunoe, Y. & Yoshida, S. (1999).** How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 123-131.
- Walker, G. C. (1984).** Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**, 60-93.
- Wang, S. Y., Lauritz, J., Jass, J. & Milton, D. L. (2002).** A ToxR homolog from *Vibrio anguillarum* serotype O1 regulates its own production, bile resistance, and biofilm formation. *J Bacteriol* **184**, 1630-1639.
- Wang, Y. (2002).** The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* **292**, 396-401.
- Wanner, B. L. (1993).** Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**, 47-54.
- Wanner, B. L. (1996).** Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney Int* **49**, 964-967.
- Watnick, P. I., Fullner, K. J. & Kolter, R. (1999).** A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J Bacteriol* **181**, 3606-3609.
- Watnick, P. I. & Kolter, R. (1999).** Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* **34**, 586-595.
- Watnick, P. I., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Croal, L. & Kolter, R. (2001).** The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* **39**, 223-235.

- Weerasinghe, J. P., Dong, T., Schertzberg, M. R., Kirchhof, M. G., Sun, Y. & Schellhorn, H. E. (2006).** Stationary phase expression of the arginine biosynthetic operon *argCBH* in *Escherichia coli*. *BMC microbiology* **6**, 14.
- Westermeier, R. (2001).** *Electrophoresis in Practice*, Third Edition edn: Wiley-VCH.
- Wibbenmeyer, J. A., Provenzano, D., Landry, C. F., Klose, K. E. & Delcour, A. H. (2002).** *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT porins are differentially affected by bile. *Infect Immun* **70**, 121-126.
- Widenhorn, K. A., Somers, J. M. & Kay, W. W. (1989).** Genetic regulation of the tricarboxylate transport operon (*tctL*) of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **171**, 4436-4441.
- Wilson, R. L., Brown, L. L., Kirkwood-Watts, D., Warren, T. K., Lund, S. A., King, D. S., Jones, K. F. & Hruby, D. E. (2006).** *Listeria monocytogenes* 10403S HtrA is necessary for resistance to cellular stress and virulence. *Infect Immun* **74**, 765-768.
- Winzer, K., Hardie, K. R., Burgess, N. & other authors (2002).** LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* **148**, 909-922.
- Wolfe, A. J. (2005).** The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 12-50.
- Wonderling, L. D., Wilkinson, B. J. & Bayles, D. O. (2004).** The *htrA* (*degP*) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1935-1943.
- Wong, S. M., Carroll, P. A., Rahme, L. G., Ausubel, F. M. & Calderwood, S. B. (1998).** Modulation of expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae* by a member of the two-component family of response regulators. *Infect Immun* **66**, 5854-5861.
- Xavier, K. B. & Bassler, B. L. (2003).** LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* **6**, 191-197.
- Yildiz, F. H. & Schoolnik, G. K. (1999).** *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4028-4033.
- Yoon, S. S. & Mekalanos, J. J. (2006).** 2,3-butanediol synthesis and the emergence of the *Vibrio cholerae* El Tor biotype. *Infect Immun* **74**, 6547-6556.
- Zhou, J. & Xu, Z. (2005).** The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function. *Mol Microbiol* **58**, 349-357.
- Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L. & Mekalanos, J. J. (2002).** Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3129-3134.
- Zhu, J. & Mekalanos, J. J. (2003).** Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell* **5**, 647-656.

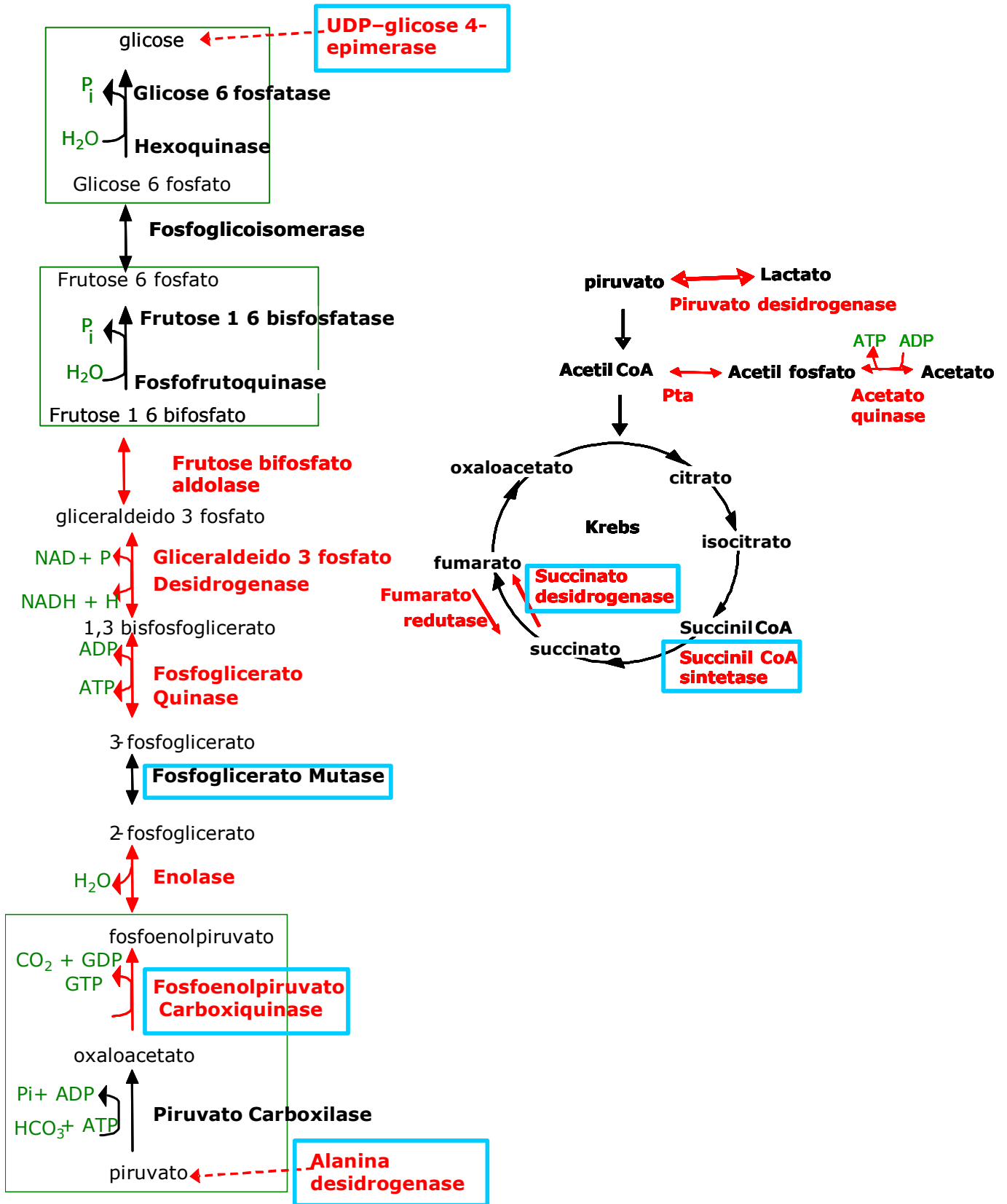


Figura 1-Via da glicólise e gliconeogênese. Em vermelho proteínas identificadas e destacadas em azul proteínas específicas das células planctônicas.

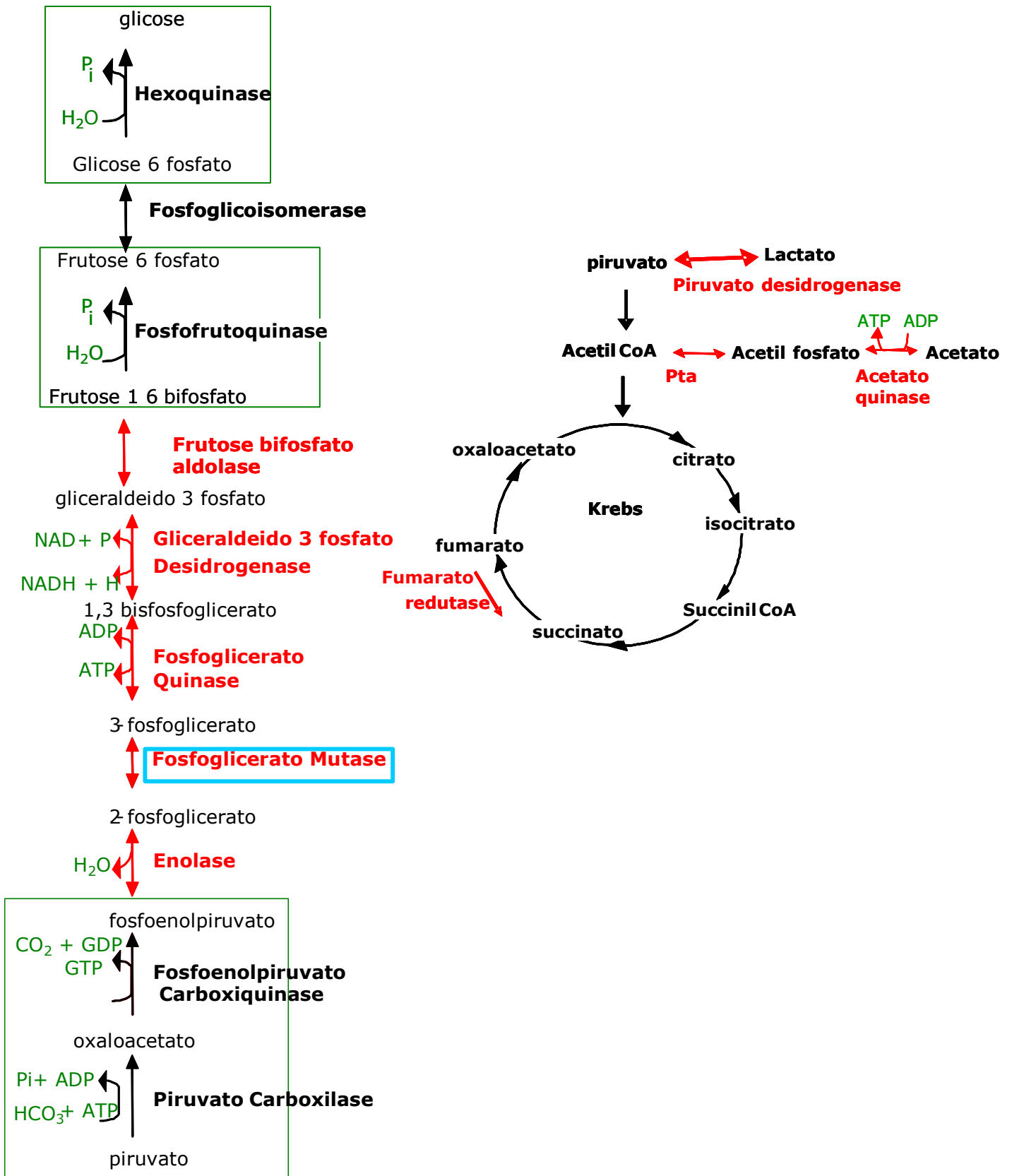


Figura 2 -Via da glicólise e gliconeogênese. Em vermelho proteínas identificadas e destacadas em azul proteínas específicas das células em biofilme

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)