

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

**(Bioquímica)**

Gianluca Gonçalves Nicastro

**Efeito dos reguladores de resposta PvrR e RcsB na motilidade,**

**formação de biofilme e sua relação com a fímbria CupD de**

***Pseudomonas aeruginosa* PA14**

São Paulo

31/10/2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Gianluca Gonçalves Nicastro

**Efeito dos reguladores de resposta PvrR e RcsB na motilidade,  
formação de biofilme e sua relação com a fímbria CupD de  
*Pseudomonas aeruginosa* PA14**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Bioquímica)*

*Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Lúcia Baldini*

São Paulo

2008

Gianluca Gonçalves Nicastro

Efeito dos reguladores de resposta PvrR e RcsB na motilidade, formação de biofilme e sua relação com a fimbria CupD de *Pseudomonas aeruginosa* PA14

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Aos meus pais pelo amor, carinho e  
apoio em todos os momentos de  
minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Gaetano e Kezia que deram todo o apoio durante todos meus anos de vida, com muito amor e dedicação

Aos Meus irmão Luigi e Giovanna, por fazerem parte da minha vida.

Aos meus padrinhos tio Ronaldo, Tia Veronica, a nona, a minha vó, todos os meus tios, tias, primos e todas as pessoas da minha família.

À Dr<sup>a</sup> Regina Baldini, pela grande paciência, dedicação e disponibilidade, durante este trabalho.

Aos amigos do grupo da professora Regina: Ana Paula, Ana Laura, Diogo, Eliezer, Gilberto e Patrícia por ajudarem sempre quando necessário e trabalharem com alegria e descontração.

À Dr<sup>a</sup> Suely Lopes Gomes pelo apoio e disponibilidade do espaço físico e de materiais necessários para que esse trabalho se realizasse.

Ao pessoal do grupo da professora Suely: André, César, Karina, Rogério, Michele pelo bom ambiente de trabalho.

Sandra, Marivon, Luci, pelo trabalho de base além da paciência.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, Dr<sup>a</sup> Mari Cleide Sogayar, Dr<sup>a</sup> Clélia Ferreira e Dr<sup>a</sup> Sayuri Miyamoto, pelas sugestões.

Aos funcionários da secretaria de pós- graduação, Cibele, Emiliano e Milton pela atenção e ajuda sempre que necessário.

Aos demais amigos e conhecidos do departamento de Bioquímica pelos sorrisos e conversas descomprometidas pelo corredor.

Às amigas da faculdade que vieram comigo para São Paulo, Paulinho, Dedão, Claudinha Tais Flavinha Natalia e principalmente Renata pelo apoio sempre que necessário.

À Dr<sup>a</sup> Cecília M. Abe pelo apoio nos experimentos de microscopia

Por fim, a Deus.

## RESUMO

Nicastro, G.G . Efeito dos reguladores de resposta PvrR e RcsB na motilidade, formação de biofilme e sua relação com a fímbria CupD de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Ano: 2008. 67 páginas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

*Pseudomonas aeruginosa* é uma proteobactéria do grupo gama, que pode se comportar como um patógeno oportunista. A linhagem PA14 apresenta duas ilhas de patogenicidade. A maior delas, PAPI-1, contém dois grupos de genes envolvidos com virulência, transcritos de maneira oposta e que estão entre duas seqüências repetidas diretas. O primeiro grupo compreende quatro genes dispostos em dois operons, que codificam para proteínas de sistemas de dois componentes (PvrS, PvrR, RcsC e RcsB). PvrS e RcsC são proteínas sensoras híbridas, que apresentam domínios de histidina-quinase e de reguladores de resposta. PvrR é um regulador de resposta com um domínio EAL com atividade de fosfodiesterase de diGMP cíclico e RcsB apresenta um domínio de ligação a DNA, além de um domínio fosfoceptor. O outro grupo é composto de cinco genes, *cupD1* a *cupD5*, que codificam para uma fímbria do tipo “chaperone-usher” e que apresenta alta similaridade com *cupA*, envolvido na formação de biofilme em outras linhagens de *P. aeruginosa*. Trabalhos anteriores mostraram que *pvrS*, *pvrR*, *rcsC*, *rcsB* e *cupD2* estão relacionados com a virulência de PA14. Como estes grupos de genes parecem ter sido inseridos na ilha em um único evento de recombinação, este trabalho investigou se os sistemas de dois componentes estão relacionados com a regulação da expressão de *cupD*. Foi observado que a expressão de *cupD* é maior a 28°C do que a 37°C e é influenciada positivamente pelo regulador global de expressão, MvaT, uma proteína

tipo H-NS. Ensaio de  $\beta$ -galactosidase a partir de uma fusão de transcrição mostraram que a atividade promotora de *cupD* é cerca de 50% menor numa linhagem com deleção em *rscB* em relação à linhagem selvagem. Nenhuma diferença consistente foi observada entre as linhagens com deleções em *pvrS*, *pvrR*, *rscC* e *rscB* e PA14 em relação a motilidade dos tipos “swarming”, “swimming” ou “twitching” ou à formação de biofilme. A linhagem de *P. aeruginosa* PA14 superexpressando RcsB mostrou níveis exacerbados de mRNA de *cupD1*, sendo a atuação de RcsB específica em *cupD*, já que os outros grupos de genes *cup* presentes em PA14 não mostraram a mesma variação na expressão, conforme analisado por RT-PCR quantitativo. Essa linhagem mostrou também um aumento na formação de biofilme, sem que a motilidade fosse alterada. Ainda visando elucidar os mecanismos de regulação de *cupD*, linhagens que superexpressam *pvrR* também foram analisadas quanto a estes fenótipos. Nesse caso, a superexpressão de *pvrR* diminuiu a formação de biofilme, conforme esperado, aumentou a motilidade do tipo “swarming”, porém não alterou a expressão de *cupD*. Os dados do presente trabalho demonstraram que a *cupD* é regulado pelos genes do sistemas de dois componentes adjacentes a ele e que o ativador de transcrição RcsB está relacionado com a formação de biofilme em tubos de vidro, provavelmente via a fímbria CupD.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, ilha de patogenicidade PAPI-1, fímbria, regulação gênica,



## ABSTRACT

Nicastro, G.G . Effect of PvrR and RcsB response regulators in motility, biofilm formation and their connection with *Pseudomonas aeruginosa* PA14 CupD fimbria Year: 2008. 67 pages. Master Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

*Pseudomonas aeruginosa* is a  $\gamma$ -proteobacteria that can behave as an opportunistic pathogen. The strain PA14 carries two pathogenicity islands, the largest of them, PAPI-1, contains two gene clusters between two direct repeat sequences that are transcribed in opposite directions and are involved in virulence. The first group consists of four genes arranged in two operons encoding two-component system proteins (PvrS, PvrR, RcsC and RcsB). PvrS and RcsC are hybrid sensor proteins, which contain domains of histidine kinase and response regulator domains. PvrR is a response regulator with a phosphodiesterase EAL domain and RcsB presents a C-terminal HTH DNA binding domain, in addition to a phosphoacceptor domain. The other group is composed of five genes, *cupD1-5*, that encodes components and assembly factors of a putative fimbrial CupD, which has high similarity with CupA, involved in the biofilm formation in other *P. aeruginosa* strains. Earlier work showed that *pvrS*, *pvrR*, *rcsC*, *rcsB* and *cupD2* are related to the virulence of PA14. As these groups of genes appear to have been inserted on the island in a single event of recombination, this study investigated whether the two-component systems are related to the regulation of *cupD* expression. It was observed that *cupD* promoter activity is higher at 28°C than at 37°C and it is positively influenced by the global regulator, MvaT, a H-NS like protein. A *lacZ* transcriptional fusion showed about 50% less promoter activity

of *cupD* from a strain with deletion in *rcsB* as compared to PA14. No consistent differences were found among the strains with deletions in *pvrS*, *pvrR*, *rscC* and *rscB* and PA14 on swarming, swimming and twitching motilities or biofilmsformation. A strain overexpressing overexpression showed heigher levels of *cupD1*mRNA of, and the role of RcsB as an activator is specific to *cupD*, as the other groups of *cup* genes present in PA14 did not show the same variation in the expression, as analyzed by quantitative RT-PCR. This strain also showed an increase in biofilm formation. In further assays aiming to elucidate the mechanisms of regulation of *cupD*, a strains overexpressing *pvrR* was also analyzed. Overexpression of *pvrR* decreased the formation of biofilm, as expected, and increased swarming motility, but did not alter the expression of *cupD*. The data from this study demonstrated that *cupD* is regulated by RcsB, and that this transcriptional activator is involved in the formation of biofilm in glass tubes, probably via CupD fimbriae.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, PAPI-1 pathogenicity island, fimbriae, gene regulation

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

ATP: Trifosfato de *adenosina*

Bcip: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

c-di-GMP: bis (3'5') monofosfato de diguanosina cíclico

cDNA: DNA complementar

Cup: *chaperone-usher pathway*

DGC: diguanilato ciclase

DNA: ácido desoxirribonucleico

D.O: densidade óptica

DR2: repetição direta 2

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

GTP: Guanosina trifosfato

GMP: Guanosina monofosfato

HPT: *histidine-containing phosphotransfer*

HTH: *Helix turn helix*

H-NS: *Histone-like nucleoid structuring*

IS: Elemento de inserção

Kb: Kilo base

LPS: Lipopolissacarídeo

mRNA RNA mensageiro

NBT: *nitrobluetetrazolium*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ONPG: orto-nitrofenol D-galactopiranosídeo

ORFs: *open reading frame* (quadro aberto de leitura)

PAPI: Ilha de Patogenicidade 1 de *Pseudomonas aeruginosa*

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: *polimerase chain reaction*

PDE: fosfodiesterase

pGpG: 5'- Phosphoguanilyl- (3' → 5')- guanosine

qRT-PCR: RT-PCR quantitativo

RCF: *Relative centrifugal force*

REC: domínio receptor

RNA: ácido ribonucleico

RPM: Rotação por minuto

RT-PCR: *reverse transcriptase - polimerase chain reaction*

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*

SCV: variante de colônia pequena

TBE: tris-borato EDTA

TBS: *tris-buffered saline*

TBS-T: TBS adicionado de 0,05% de Tween 20

Tris: tris (hydroxymetil) aminometano

tRNA: RNA transportador

# Índice

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.2. A Ilha de Patogenicidade PAPI-1 .....	2
1.3. O grupo de genes - PA14_59710 - PA14_59800 .....	4
1.3.1. Sistemas de dois componentes .....	5
1.3.2. O segundo mensageiro c-di-GMP e sua relação com sistemas de dois componentes. ....	7
1.3.3. genes PA14_59800 e PA14_59790. <i>pvrS</i> e <i>pvrR</i> .....	11
1.3.4 genes PA14_59780 e PA14_59770– <i>rscC</i> e <i>rscB</i> .....	11
1.3.5. genes PA14_59710 – PA14_59760 - <i>cupD</i> .....	12
1.3.6. Regulação de outros genes <i>cup</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1.Linhagens, plasmídeos e condições de cultura .....	18
3.2. Ligação dos fragmentos correspondentes aos genes <i>pvrS</i> , <i>pvrR</i> , <i>rscC</i> e <i>rscB</i> no vetor de clonagem pGEM-T Easy . ....	18
3.3. Ensaio de motilidade .....	22
3.4. Análise da Produção de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeo (LPS).....	22
3.5. Ensaio de iniciação de biofilmes .....	23
3.6. Análise da expressão de genes por transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) .....	24
3.7. Análise da expressão gênica através de um gene repórter <i>lacZ</i> .....	25
3.8. Construção de linhagens mutantes no gene <i>mvaT</i> .....	26
3.9. Análise da superexpressão de RcsB por Western Blot .....	27
3.10. Análise de homologia das proteínas entre linhagens de <i>Pseudomonas</i> .....	29
3.11. Microscopia eletrônica de transmissão. ....	29
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Presença de genes <i>cup</i> , <i>pvrSR</i> e <i>rscCB</i> em <i>Pseudomonas</i> .....	31
4.2. Perfil de expressão de <i>cupD</i> .....	37
4.3 Construção do mutante com deleção em <i>mvaT</i> .....	38
4.4 Efeito da mutação em <i>mvaT</i> na expressão de <i>cupD</i> .....	40

<b>4.5 Efeito dos sistemas de dois componentes na expressão de <i>cupD</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6. Caracterização fenotípica das linhagens mutantes .....</b>	<b>41</b>
4.6.1. Motilidade.....	42
4.6.2. Ensaio de formação de biofilme.....	45
4.6.3. Produção de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos pelas linhagens mutantes.....	46
<b>4.7 Efeito dos sistemas de dois componentes na expressão dos genes <i>wzz</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>4.8 Efeito da superexpressão de <i>RcsB</i> e <i>PvrR</i> na motilidade, adesão e expressão de <i>cupD</i>. ...</b>	<b>47</b>
4.8.1 Fenótipos da superexpressão de <i>pvrR</i> .....	49
4.8.2 Fenótipos da superexpressão de <i>rscB</i> .....	49
4.8.3 Análise da expressão de <i>cupD</i> nas linhagens que superexpressam <i>PvrR</i> e <i>RcsB</i> . .....	51
4.8.4 Visualização de fímbrias por microscopia eletrônica de transmissão .....	51
4.8.5 Análise da expressão de <i>cupA</i> , <i>cupB</i> e <i>cupC</i> .....	52
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

# 1. Introdução

## 1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

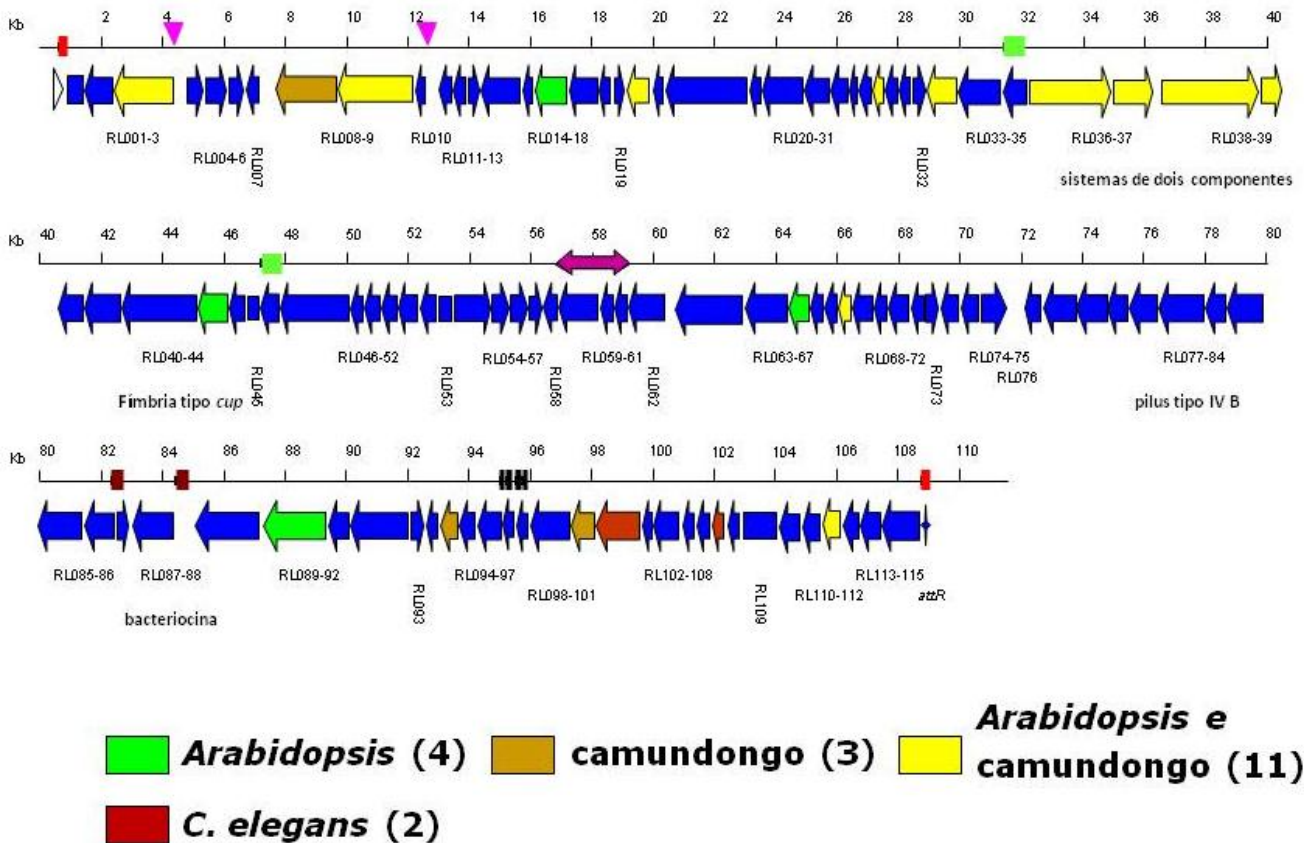
*Pseudomonas aeruginosa* é uma proteobactéria do grupo gama que atua como um patógeno oportunista sob diversas circunstâncias. Sua ocorrência em diferentes tipos de ambientes, entre eles solo e água, ou ainda associada a plantas e animais, ocorre devido a inúmeros fatores, como a sua capacidade de utilizar diferentes compostos como fonte de energia (Lyczak *et al.*, 2002). Infecções por *P. aeruginosa* estão geralmente associadas a queimaduras severas, fibrose cística, AIDS e câncer (Lyczak *et al.*, 2000), podendo também estar presente em infecções hospitalares, devido a sua habilidade de se aderir e contaminar diversos materiais, como catéteres, ventiladores e próteses. A infecção por *P. aeruginosa* persiste apesar do uso prolongado de antibióticos (Govan e Deretic, 1996; Hoiby, 1993) e isto pode ser explicado em parte pela formação de biofilmes (Costerton *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000). Biofilmes são caracterizados como complexos bacterianos altamente organizados, aderidos a uma superfície (Costerton *et al.*, 1999). O início da formação de um biofilme ocorre com a adesão celular, seguida da multiplicação e formação de microcolônias. A estabilização do biofilme é normalmente acompanhada da produção de exopolissacarídeos. O biofilme maduro de *P. aeruginosa* apresenta uma organização complexa, com estruturas em forma de domo ou cogumelo rodeadas por canais de meio líquido (Costerton *et al.*, 1995). A capacidade de formar biofilme confere à bactéria inúmeras características, incluindo o aumento da resistência a antibióticos (Costerton *et al.*, 1995).

A linhagem UCBPP-PA14 (PA14) é um isolado de queimadura capaz de causar morbidade ou mortalidade em vários hospedeiros filogeneticamente distintos, como

camundongos e plantas. Genes homólogos aos genes envolvidos na patogenicidade de PA14 também estão presentes em outros patógenos de animais e plantas, sendo que em alguns casos o seu envolvimento com esses mecanismos foi comprovado (Cao *et al.*, 2001); (Tan, 2002). O genoma de PA14 foi completamente seqüenciado e consiste de 6,5 Mb e 5973 ORFs (Lee, J.-H. *et al.*, 2006)

## 1.2. A ilha de patogenicidade PAPI-1

O cromossomo da linhagem PA14 contém pelo menos duas ilhas de patogenicidade, PAPI-1 e PAPI-2. A maior delas (PAPI-1, Figura 1), com cerca de 108 kb, apresenta características típicas de uma ilha genômica, como conteúdo G+C menor (59,7%) que o do restante do cromossomo (66,6%); elementos de inserção (IS) e várias ORFs (do inglês “open reading frame”) que codificam proteínas envolvidas em mobilização de DNA e recombinação, transposases, integrases e proteínas relacionadas a funções plasmidiais. Além disso, está presente próximo a um dos genes de tRNA-Lisina, cuja extremidade 3’ encontra-se duplicada na outra extremidade dos 108 kb. Das 115 ORFs anotadas, muitas não apresentam similaridade com genes de função conhecida, contudo boa parte delas está presente nos genomas de outras bactérias encontradas em associação com plantas e animais (He *et al.*, 2004; (Lee, D. G. *et al.*, 2006). Baseando-se na presença de genes conservados entre patógenos e nos resultados obtidos com as linhagens mutantes, a região de 108 kb presente na linhagem PA14 e ausente em PAO1 é considerada uma ilha de patogenicidade, sendo denominada PAPI-1, de “*Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island 1”.



**Figura 1** Mapa genético da ilha de patogenicidade PAPI-1. Setas representam ORFs e sua orientação de transcrição. A linha numerada indica o tamanho em kb, e os quadrados, triângulos e setas nesta linha significam: repetições diretas, repetições invertidas e seqüências de inserções, respectivamente. Genes envolvidos em patogenicidade estão coloridos de verde para o modelo de *Arabidopsis thaliana*, bege no modelo de queimadura em camundongo, amarelo para genes relevantes nesses dois modelos e vermelho no modelo de “slow-killing” do nematódeo *C.elegans*. Modificado de He, 2004 (He *et al.*, 2004).

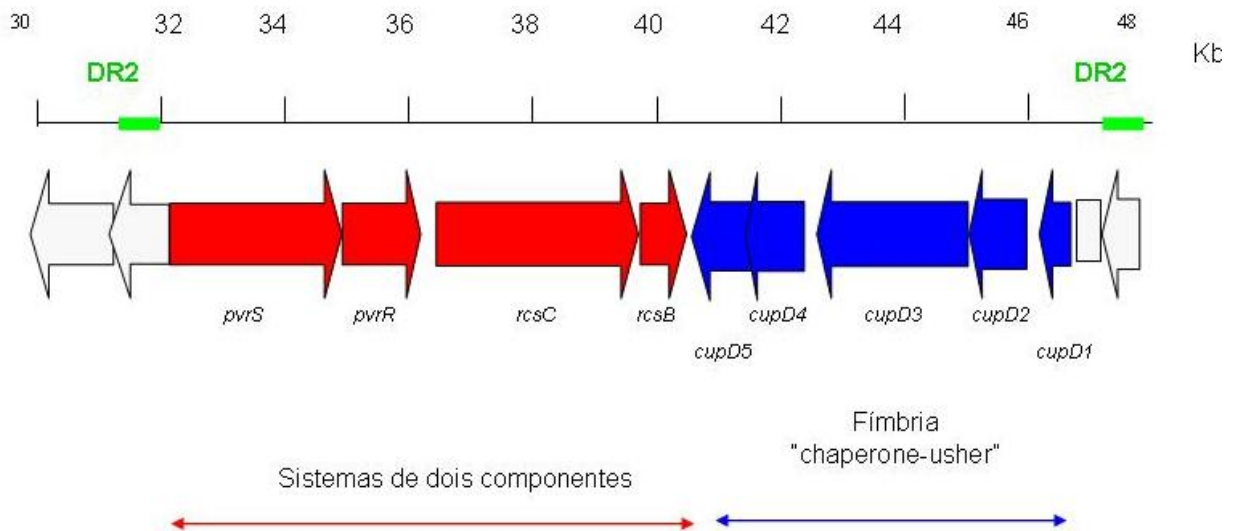
PAPI-1 (Figura 1) contém todas as 33 ORFs definidas como “core” de uma família de ilhas genômicas presentes em beta e gamaproteobactérias (Mohd-Zain *et al.*, 2004), sendo os produtos da maioria destas ORFs classificados como proteínas hipotéticas ou envolvidas em replicação, mobilização ou recombinação. PAPI-1 foi detectada como um elemento episomal circularizado, com taxa de excisão espontânea estimada em 0,3% (Klockgether *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que PAPI-1 também é transmitida entre cepas de *P. aeruginosa* a uma frequência variando de  $3,1 \times 10^{-7}$  a  $5,4 \times 10^{-4}$ , sendo essa ilha detectada tanto na forma circular como na forma integrada nas células receptoras.



### 1.3. O grupo de genes - PA14\_59710 - PA14\_59800

Seqüências repetidas diretas são freqüentes em ilhas genômicas e podem representar o sítio do cromossomo onde um trecho de DNA foi inserido por recombinação homóloga. Deste modo, trechos contínuos entre duas seqüências repetidas diretas podem ter sido inseridos em um mesmo evento de recombinação e, portanto, as ORFs presentes nestes trechos, provavelmente, apresentam uma origem comum, com seus produtos potencialmente participando de uma mesma via funcional.

Entre as duas cópias de uma das seqüências repetidas diretas presentes em PAPI-1 (denominadas DR2), encontra-se uma região de 15 Kb (Figura 2), incluindo dois pares de genes *pvrSR*, *rscCB*, dispostos em dois operons e que codificam proteínas de sistemas de dois componentes (PA14\_59800 - PA14\_59770) e um possível operon *cupD* (PA14\_59710 - PA14\_59760), que codifica proteínas de alta identidade com as codificadas pelo grupo de genes *cupA* de *P. aeruginosa* PAO1 (Vallet *et al.*, 2001). Linhagens mutantes com deleções em cada um dos genes dos sistemas de dois componentes apresentaram redução significativa na virulência da linhagem PA14 nos modelos de queimadura em camundongo e crescimento em folhas de *Arabidopsis thaliana*. Além disso, uma inserção por transposon em PA14\_59720 (*cupD2*) afetou a virulência no modelo vegetal (He *et al.*, 2004).



**Figura 2. Organização do trecho de DNA contendo os genes PA14\_59710 a PA14\_59800.** Setas vermelhas correspondem aos genes similares a sistemas de dois componentes; setas azuis, genes com similaridade a genes *cup*; setas brancas, ORFs fora da região em questão (RL034-35, RL046); caixa branca, pseudogene RL045 (transposase). Retângulos verdes, sequências repetidas diretas DR2. Os números na parte superior são relativos ao início da ilha PAPI-1 (kb). Adaptado de He, 2004 (He *et al.*, 2004).

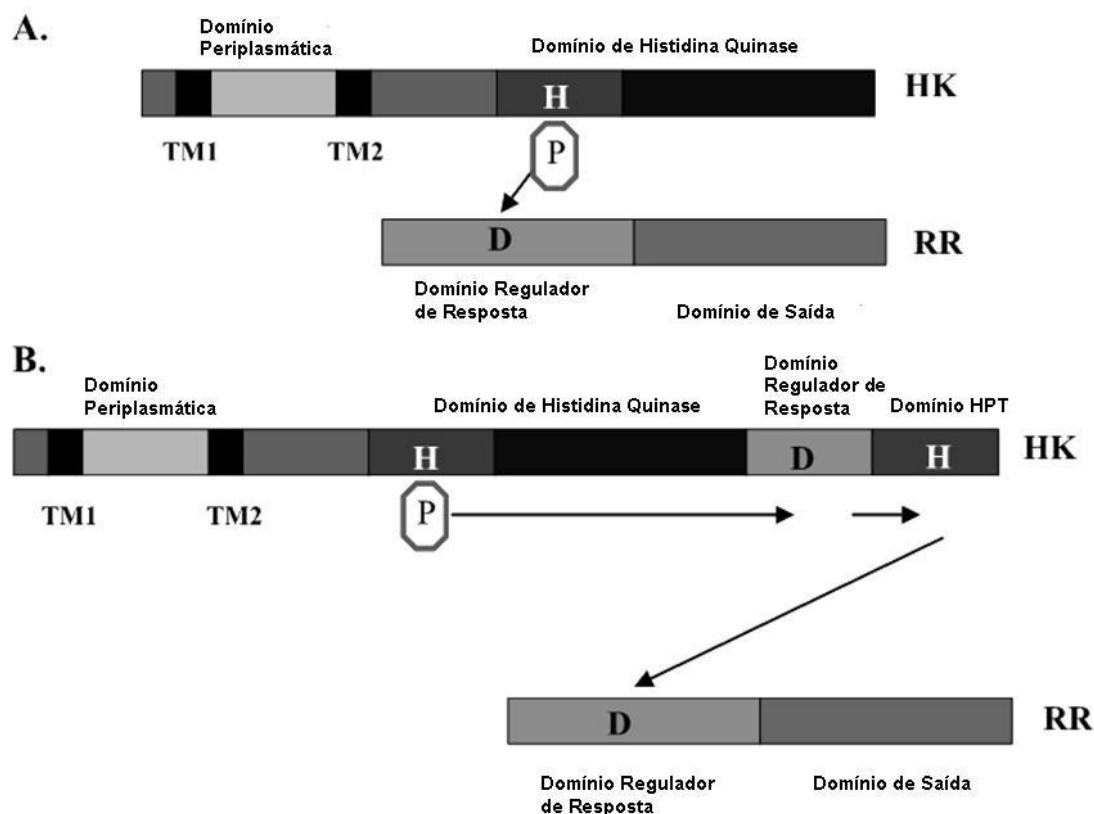
### 1.3.1. Sistemas de dois componentes

Vias de transdução de sinais em procariotos regulam funções celulares por intermédio de respostas a sinais ambientais. Uma das principais vias de transdução de sinal em procariotos é constituída por sistemas de dois componentes. Esses sistemas são caracterizados por pelo menos duas proteínas: uma proteína sensora, com domínio de histidina quinase e outra, reguladora de resposta, com domínio receptor (REC). A maioria das proteínas sensoras de classe I se localizam na membrana e apresentam um domínio sensor extracitoplasmático, enquanto todos os reguladores de respostas caracterizados são proteínas citoplasmáticas (Ulrich *et al.*, 2005).

Em um típico sistema de dois componentes, o domínio sensor de uma histidina quinase detecta sinais ambientais (normalmente ligação de pequenas moléculas), o que

resulta na auto-fosforilação de uma histidina específica. Esta proteína fosforilada então transfere o grupo fosfato para um resíduo de aspartato conservado do regulador de resposta (Figura 3A) e com isso ativa o domínio de saída. Com este domínio ativo, inicia-se a resposta celular correspondente àquele sinal (Foussard *et al.*, 2001). Entretanto, existem variações deste sistema (Figura 3B), como proteínas sensoras híbridas, que contêm tanto o domínio sensor quanto o REC. Nestes casos, há a necessidade de um domínio HPT (“histidine-containing phosphotransfer”) que é o intermediário na transferência do fosfato de um aspartato para outro aspartato. Na ausência de sinal, a proteína sensora pode funcionar como uma fosfatase do regulador de resposta, aumentando o nível de controle do sistema (Majdalani e Gottesman, 2005).

Os sistemas de dois componentes estão relacionados com a virulência de várias bactérias. Pode-se citar como exemplo o sistema RpfC/RpfG do fitopatógeno *Xanthomonas campestris* (Dow, 2008), entre outros. Além disso, várias condições e sinais ambientais já foram identificados na ativação destes sistemas, como: pH, osmolaridade, temperatura, sinais de estresse, anaerobiose, hipóxia,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e glicose. Em uma revisão publicada em 2005 (Ulrich *et al.*, 2005), os autores relatam que a maioria dos sistemas de dois componentes (87%) regulam diretamente a expressão gênica em nível transcricional, utilizando o domínio HTH de ligação ao DNA como o domínio de saída em proteínas reguladoras de resposta. Os outros 13% de domínios de saídas são enzimas que regulam os níveis de nucleotídeos cíclicos, como os níveis de bis (3'5') monofosfato de diguanosina cíclico (c-di-GMP) ou a fosforilação de proteínas.



**Figura 3. Representação de sistemas de dois componentes.** **A.** A proteína sensora normalmente apresenta um domínio extracitoplasmático que sente um sinal, fazendo com que o domínio de histidina quinase desta proteína se auto-fosforile. Em seguida, o fosfato é transferido para uma proteína que contém um domínio regulador de resposta, ativando o domínio de saída. **B.** Variação do sistema comum de dois componentes em que uma proteína sensora híbrida apresenta um domínio de regulador de resposta. Neste caso há a necessidade de um domínio HPT, que pode ou não estar presente na mesma proteína, para que possa acontecer a transferência do aspartato de um regulador de resposta para outro aspartato de outro domínio receptor. As setas indicam o caminho percorrido pelo fosfato.

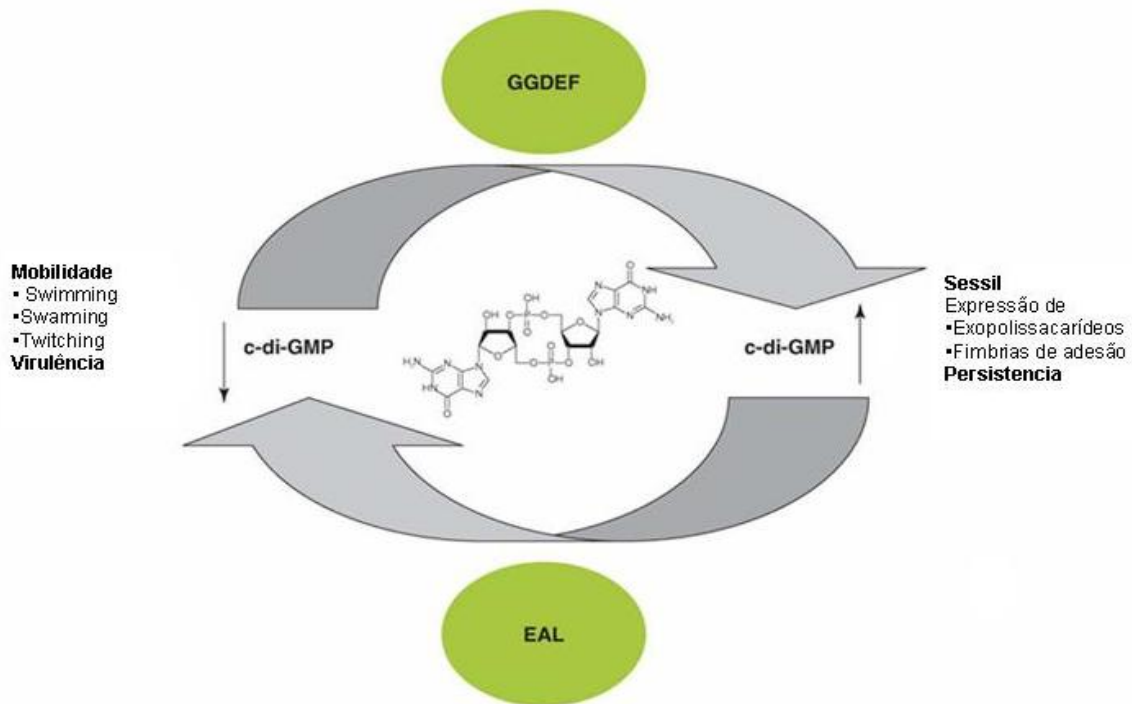
### 1.3.2. O segundo mensageiro c-di-GMP e sua relação com sistemas de dois componentes.

O c-di-GMP tem sido caracterizado nos últimos tempos como um segundo mensageiro celular em bactérias. Recentes descobertas têm demonstrado que c-di-GMP controla, antagonicamente, mobilidade e virulência de uma bactéria ou, por outro lado, adesão e persistência de comunidades multicelulares (Simm *et al.*, 2004; Romling e Amikam, 2006).

Altos níveis de concentração de c-di-GMP têm sido relacionados com células no seu

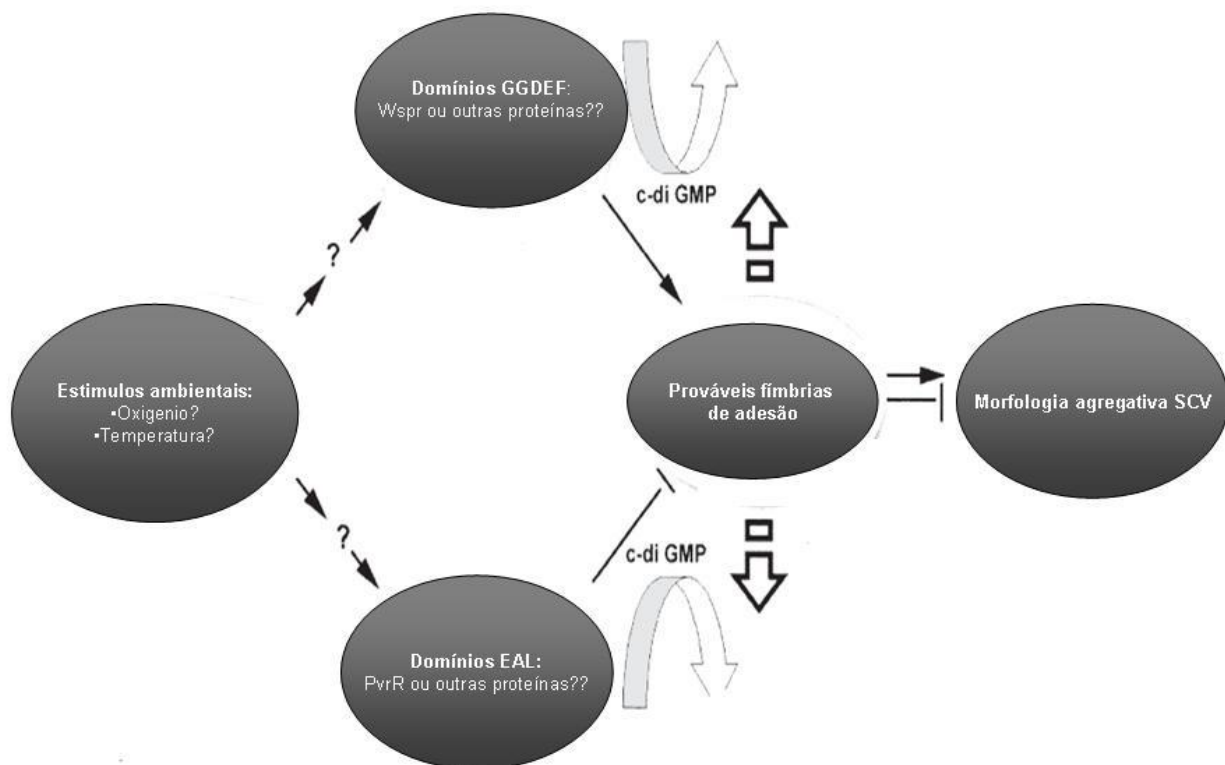
estado sésil. Em contraste, baixos níveis de c-di-GMP aparecem inibindo a formação de biofilme e de organelas adesivas de superfície, estimulando a motilidade (Figura 4). A correlação de altos níveis de c-di-GMP com biofilme e baixos níveis de c-di-GMP com motilidade foi demonstrada com a superexpressão de proteínas com função de ciclase ou fosfodiesterase deste dinucleotídeo (Kovacikova *et al.*, 2005); (Simm *et al.*, 2004). c-di-GMP é sintetizado por uma classe de enzimas (ciclases ou sintetases) que contêm o domínio GGDEF e hidrolisado por outra família de fosfodiesterases com os domínios EAL ou HD-GYP. Os homólogos destas proteínas são encontrados apenas em Eubactéria, o que indica que a sinalização por c-di-GMP é específica para este Domínio. O número de genes codificando proteínas com domínios GGDEF, EAL e HD-GYP nos genomas bacterianos é muito variável. Algumas espécies não apresentam nenhuma dessas proteínas (*Helicobacter pylori*), a maioria apresenta números intermediários (*Escherichia coli*, 29, *Vibrio cholerae*, 53 e *V. fischeri*, 48) e ainda há outras que codificam aproximadamente cem dessas proteínas (*Vibrio vulnificus*, 101 e *Shewanella oneidensis*, 98) (Wolfe e Visick, 2008).

O genoma de *P. aeruginosa* PA14 apresenta 17 genes que codificam proteínas com domínios GGDEF, 6 com domínios EAL, 16 com ambos os domínios GGDEF e EAL, e 3 HD-GYP. A significância clínica e econômica de espécies de *Pseudomonas*, tanto patogênicas quanto não patogênicas, faz com que a pesquisa sobre a sinalização por c-di-GMP seja um importante campo de estudos neste modelo. Isolados clínicos de pulmão de pacientes com fibrose cística apresentam uma morfologia comum de *Pseudomonas aeruginosa*, a variante de colônia pequena (SCV). Esta variante forma colônias agregativas pequenas, que estão associadas à persistência, resistência a antibiótico, adesão, hiperpilação e produção de exopolissacarídeos. Diversos estudos vêm encontrando ligações entre esses fenótipos e níveis de c-di-GMP intracelular (Drenkard e Ausubel, 2002; Meissner *et al.*, 2007) .



**Figura 4. Metabolismo e sinalização por c-di-GMP.** Proteínas que apresentam o domínio GGDEF sintetizam c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP. Proteínas com domínios EAL clivam c-di-GMP em pGpG e HD-GYP em duas moléculas de GMP. Altos níveis de c-di-GMP celular promovem o estado sésil da célula, ajudado pelo aumento da produção de componentes extracelulares de adesão como polissacarídeos e fímbrias. Inversamente, baixos níveis de c-di-GMP promovem a motilidade celular (“swimming”, “swarming” e “twitching”) e virulência (Romling e Amikam, 2006).

A relação dos níveis de c-di-GMP e morfologia de colônias pequenas com a expressão de genes de fímbria, montada pelo genes *cup*, foi proposto por S. Häußler (Haussler, 2004). Nesta revisão, a autora propôs que por meio de estímulos ambientais desconhecidos, proteínas com domínios GGDEF ou EAL eram ativadas. Com isso, níveis de c-di-GMP celulares eram alterados, levando ao aumento ou diminuição da expressão de fímbrias de adesão, fazendo com que ocorresse ou não a morfologia auto agregativa de colônias pequenas (Figura 5).



**Figura 5.** Modelo proposto ilustrando o provável papel regulatório das proteínas envolvidas com metabolismo de c-di-GMP na expressão de genes *cup*, levando a formação de fímbrias de adesão. Adaptado de Haussler, 2004.

Mutantes em cada um dos genes de diguanilato ciclase (DGC), fosfodiesterase (PDE) e DGC-PDE em *P. aeruginosa* PA14 foram analisados quanto à habilidade de formar biofilme e de serem citotóxicos para células em cultura (Kulasekara *et al.*, 2006). Todos os genes mutados que codificavam para DGCs ou DGC-PDEs afetaram a formação de biofilme, enquanto mutações em genes de PDE (com domínio EAL), com exceção de *pvrR*, não causaram alteração na formação de biofilmes.

### 1.3.3. genes PA14\_59800 e PA14\_59790. *pvrS* e *pvrR*

O gene *pvrR* (“phenotype variant regulator”), presente em PAPI-1, foi primeiramente identificado por codificar uma proteína reguladora que controla a conversão entre formas de colônia pequena, resistentes a canamicina, para a morfologia selvagem da bactéria. (Drenkard e Ausubel, 2002). Além disto, foi observado neste mesmo trabalho que a superexpressão de *pvrR* causou uma diminuição na formação de biofilme.

Pela proximidade dos genes, acredita-se que o produto de PA14\_59800 seja o sensor cognato a PvrR, sendo então denominado PvrS (He *et al.*, 2004). PvrS apresenta-se como um sensor híbrido: além de regiões transmembrana e do domínio de histidina quinase, também apresenta um domínio regulador de resposta. Além do fenótipo de redução da virulência na linhagem mutante para o provável sensor cognato de PvrR (He *et al.*, 2004), não há outras informações na literatura sobre este gene e seu produto.

### 1.3.4 genes PA14\_59780 e PA14\_59770– *rscC* e *rscB*

Os genes PA14\_59780 e PA14\_59770 foram anotados como *rscC* e *rscB*, por apresentarem identidade de seqüência com os respectivos genes em *E. coli* e *Salmonella*. Essa similaridade, entretanto, não compreende toda a extensão da seqüência deduzida de aminoácidos para RcsC, que além de uma extensão N-terminal, apresenta uma extensão C-terminal que corresponde a um domínio HPT, podendo representar que os estímulos detectados nas diferentes bactérias não sejam equivalentes.

O sistema de fosforilação Rcs de enterobactérias foi primeiramente reconhecido por seu papel de regular a transcrição do gene de síntese do polissacarídeo capsular (*cps*) em *E. coli* (Gottesman *et al.*, 1985). Nessas bactérias, o sistema Rcs apresenta mais duas proteínas auxiliares. A proteína RcsD, que contém um domínio HPT responsável pela



transferência do fosfato, e a proteína RcsA que, em alguns casos, como na regulação de *cps* em *E. coli*, forma um heterodímero com RcsB e não apresenta domínio REC, não sendo fosforilada. Contudo, vários outros genes em *E. coli*, como o gene de regulação osmótica *osmC* foram descritos como controlados por RcsB de maneira independente de RcsA (Davalos-Garcia *et al.*, 2001). O genoma de PA14 não apresenta nenhuma proteína homóloga a RcsA e RcsD. Porém, diferentemente da proteína de *E. coli*, RcsC de *Pseudomonas aeruginosa* apresenta um domínio HPT na porção C terminal, dispensando a necessidade de uma proteína auxiliar como RcsD.

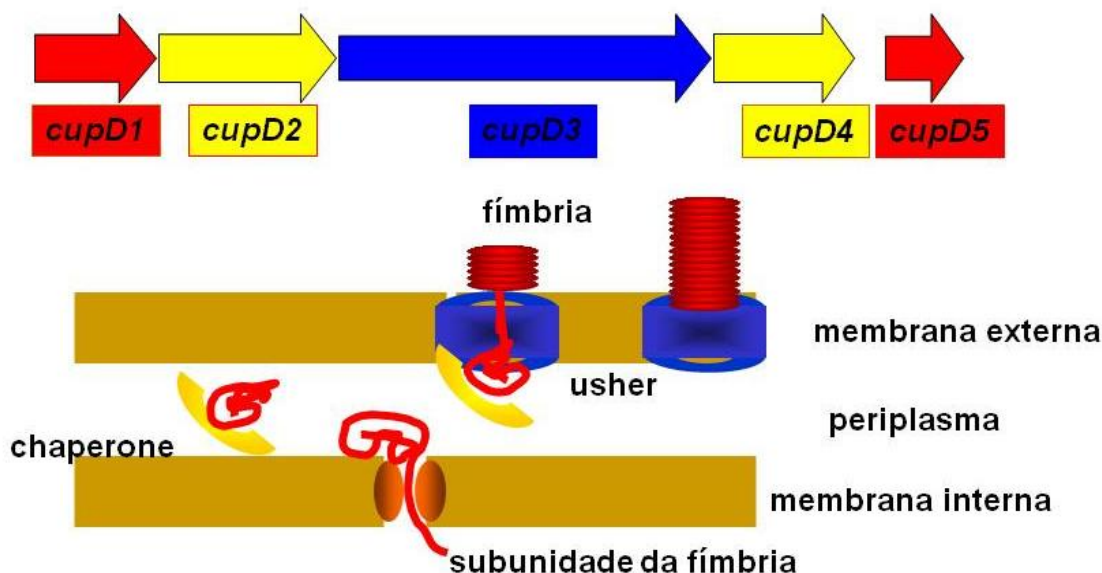
Em *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, foi relatado que o sistema RcsC/RcsD/RcsB promove a transcrição do gene *wzz<sub>st</sub>*, que codifica uma proteína que regula o tamanho da cadeia de antígeno-O do lipopolissacarídeo (LPS) (Delgado *et al.*, 2006).

Recentemente, foi publicado que a via Rcs responde a danos no peptídeoglicano e contribui para a resistência intrínseca de *E. coli* MG1655 a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Laubacher e Ades, 2008).

### **1.3.5. Genes PA14\_59710 – PA14\_59760 -*cupD***

O grupo de genes PA14\_59710 – PA14\_59760 consiste em um provável operon responsável pela expressão de uma fímbria montada por um sistema do tipo “chaperone/usher” (*cupD*). *cupD1* e *cupD4* codificam subunidades da fímbria, *cupD2* e *cupD5*, chaperonas e *cupD3*, o “usher” (Figura 6). As chaperonas são proteínas periplasmáticas que auxiliam o reconhecimento e montagem de subunidades da fímbria. As proteínas denominadas “usher” formam um canal na membrana externa, onde a fímbria vai sendo seqüencialmente montada (Figura 6). Esta via é altamente conservada em bactérias Gram-negativas e está envolvida na montagem de mais de 30 organelas de adesão (Soto e

Hultgren, 1999); (Nuccio e Baumler, 2007). Como exemplos podemos citar HtrE e YehB em *E. coli*, PFL\_1464 em *Pseudomonas fluorescens*, StbC e StcC em *S. enterica* ser. *Typhimurium* (Nuccio e Baumler, 2007).



**Figura 6. Montagem da fímbria pelo sistema chaperona Usher (*cup*).** A Organização e função dos genes do “cluster” *cupD*. Subunidades da fímbrias (codificadas por *cupD1* e 4) são exportadas para o periplasma através do sistema de secreção tipo II. Em seguida, as chaperonas (*cupD2* e 5) impedem o enovelamento errado e conduzem essas subunidades até o “usher” (*cupD3*) onde são exportadas, sendo montadas sequencialmente.

Foram descritos em *P. aeruginosa* PAO1 três grupos de genes que codificam para prováveis fímbrias do tipo chaperone-usher, denominados *cupA*, *cupB* e *cupC* (Vallet *et al.*, 2001), também presentes em PA14. A identificação desses prováveis genes de adesão celular indica uma ampla gama de fatores que podem atuar na formação de biofilme. Especula-se que esses diversos genes podem ser expressos sob diferentes condições e ambientes onde as células se encontram.

O gene *cupA2*, cujo produto é uma chaperona, foi identificado pela seleção de mutantes defectivos na formação de biofilmes em condições específicas, em uma linhagem desprovida de pilus tipo IV (Vallet *et al.*, 2001). Foi demonstrado que mutações no gene

*cupA3* geram linhagens com apenas 10% de adesão comparada com a linhagem parental, independente da presença de fímbrias tipo IV. Isso demonstrou que a adesina CupA é mais importante ou é requerida em estágios mais precoces na formação do biofilme do que o pilus tipo IV. Mutantes com perda de função em *cupA* (Vallet *et al.*, 2001), ou com superexpressão em *cupB* e *cupC* (Ruer *et al.*, 2007) apresentaram uma arquitetura diferente de biofilme quando comparados com a linhagem selvagem, independente da presença de pili tipo IV. Por outro lado, as fímbrias CupB e CupC são mais importantes na adesão célula-a-célula do que destas ao substrato, como evidenciado pela superexpressão desses genes em PAO1 (Ruer *et al.*, 2007).

O grupo de genes *cupD* de PA14, ausente em PAO1, apresenta a mesma organização que o *cupA*, com identidade variando entre 61 e 72% entre as proteínas correspondentes.

### **1.3.6. Regulação de outros genes *cup* em *Pseudomonas aeruginosa***

Em PAO1, a expressão de *cupA* é negativamente controlada por MvaT (Vallet *et al.*, 2004). MvaT é um provável regulador transcricional, funcionalmente semelhante a membros da família H-NS de proteínas associadas ao DNA. Proteínas dessa família têm a capacidade de se ligar ao DNA através da sua porção C-terminal e propensão de formar oligômeros pela porção N-terminal, geralmente funcionando como repressores da transcrição (Tendeng *et al.*, 2003).

MvaT foi primeiramente descrito em *Pseudomonas mevalonii* como um ativador transcricional do operon *mvaAB*, que codifica proteínas HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) redutase e liase, respectivamente (Rosenthal e Rodwell, 1998). Em *P. aeruginosa*, MvaT foi descrito como um regulador global de genes de virulência (Diggle *et al.*,

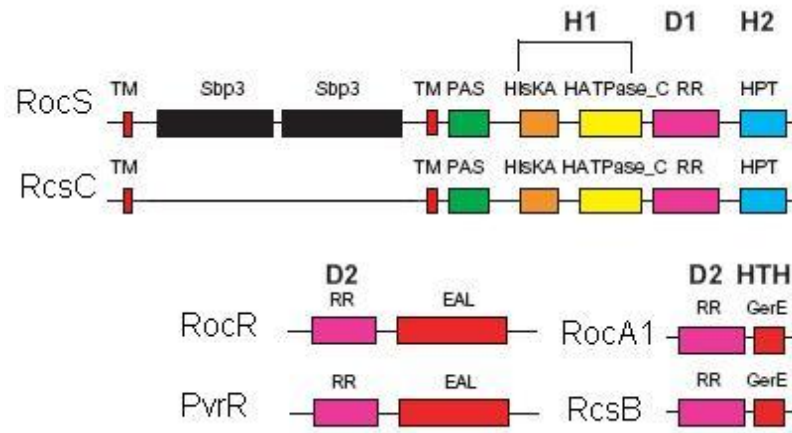
2002). Estudos baseados em análises de microarranjo de DNA revelaram que MvaT influencia a expressão de aproximadamente 150 genes, muitos deles envolvidos em virulência (Vallet *et al.*, 2004). A mutação neste gene desreprime a expressão de *cupA*, de maneira indireta (abaixo). A expressão de *cupB* e *cupC* também é afetada por MvaT, porém em extensão muito menor que *cupA*.

Além de *mvaT*, outros genes são responsáveis pela regulação de *cupA*. Uma triagem realizada com uma biblioteca de plasmídeo de superexpressão contendo fragmentos de DNA de *P. aeruginosa*, em uma linhagem dessa bactéria contendo um gene repórter *lacZ* cromossomal a jusante de *cupA*, foi realizada em busca de novos reguladores desse gene. Foi observado que um plasmídeo contendo os genes a montante de *cupA*, *cgrABC*, aumentou a expressão desse gene. Nesta triagem os autores revelaram outro gene envolvido na regulação de *cupA*, o regulador global de anaerobiose *anr* (Vallet-Gely *et al.*, 2007).

O nível de expressão de *cupA* é variável em anaerobiose e na ausência da proteína MvaT, ou seja, a expressão de *cupA* pode estar ligada (on) ou desligada (off) em células isogênicas de uma mesma população nestas condições. Essa regulação é feita pelos produtos dos genes *cgrABC*, que, por sua vez, são negativamente regulados por MvaT e positivamente por Anr (Vallet-Gely *et al.*, 2007).

Os grupos de genes *cupB* e *cupC* são regulados pelo sistema Roc, composto de uma proteína sensora RocS e dos reguladores de resposta RocR, que contém o domínio EAL, e RocA1, um provável ativador de transcrição. Enquanto RocA1 ativa a expressão de *cupB* e *cupC*, RocR reprime a expressão dos mesmos. As proteínas RocR, RocS e RocA1 têm uma arquitetura de domínios muito semelhante às proteínas PvrR, RcsC e RcsB, respectivamente (Kulasekara *et al.*, 2005) (Figura 7). Uma diferença entre elas é a presença de dois domínios

extracelulares Sbp3 em RocS, ausentes em RcsC, o que sugere que os sinais extracelulares percebidos pelos dois sistemas sejam distintos.



**Figura 7.** Similaridade de arquitetura dos domínios das proteínas do sistema Roc com as proteínas PvrR, RcsC e RcsB. Baseado em Kulasekara, 2005 (Kulasekara *et al.*, 2005).

A regulação de *cupC* por RocR provavelmente está relacionada com níveis de c-di-GMP celular devido à presença de um domínio EAL nesta proteína. (Kulasekara *et al.*, 2005) Isto sugere que a modulação dos níveis celulares de c-di-GMP seja crítica para a expressão de genes *cup*. De maneira análoga, *cupA* é induzido pelo regulador de resposta WspR, que contém um domínio GGDEF e demonstrou controlar o estado auto-agregativo de *P. aeruginosa* (D'argenio *et al.*, 2002) .

Visto que *cupD* localiza-se próximos aos genes de sistema de dois componentes com arquitetura de domínios tão semelhante as de Roc, e que provavelmente foram inseridos em um mesmo evento de recombinação homóloga, este trabalho investigou se as funções destes grupos de genes estariam relacionadas, ou seja, se os sistemas de dois componentes apresentam algum papel na regulação de *cupD*.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram investigar se os grupos de genes *pvrSR*, *rscCB* e *cupD* presentes na ilha de patogenicidade PAPI-1 estão envolvidos em características relacionadas às estruturas extracelulares e à adesão de *P. aeruginosa* PA14 a superfícies abióticas e se a expressão de *cupD* é influenciada pelos sistemas de dois componentes PvrSR e RcsCB e pela proteína MvaT.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultura

As linhagens e plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 1. Culturas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram feitas rotineiramente a 37°C em meio LB (Tabela 2) acrescido dos antibióticos necessários nas seguintes concentrações: ampicilina, 100 µg/mL, carbenicilina, 350 µg/ml, canamicina 50 µg/mL (*E. coli*) e 250 µg/mL (*P. aeruginosa*), gentamicina 10 µg/mL (*E. coli*) e 30 µg/mL (*P. aeruginosa*). Outras condições utilizadas estão descritas nas seções pertinentes, com a composição dos meios também mostrada na Tabela 2.

#### 3.2. Ligação dos fragmentos correspondentes aos genes *pvrS*, *pvrR*, *rscC* e *rscB* no vetor de clonagem pGEM-T Easy .

Os genes *pvrS*, *pvrR*, *rscB*, *rscC* foram amplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 3, com o DNA genômico da linhagem PA14 como molde e enzimas de alta fidelidade. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e isolados deste utilizando-se o papel de troca iônica DE-81(Whatman). Após eluição do papel em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM e NaCl 1M, o DNA foi purificado por extração com fenol:clorofórmio, precipitado com etanol e lavado com etanol 70%. Os fragmentos foram ligados ao pGEM-T Easy (Promega). As ligações foram transferidas por eletroporação para *E. coli* DH5 $\alpha$ . As construções foram analisadas por digestão com enzimas apropriadas e por seqüenciamento, sendo obtidos produtos livres de erros para todas as amplificações.

Tabela 1. Linhagens e plasmídeos.

<b>Linhagens/ plasmídeos</b>	<b>Características</b>	<b>Fonte ou referência</b>
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
PA14	Isolado clínico UCBPP-PA14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
RL036	PA14 com deleção em <i>pvrS</i>	(He <i>et al.</i> , 2004)
RL037	PA14 com deleção em <i>pvrR</i>	(He <i>et al.</i> , 2004)
RL038	PA14 com deleção em <i>rscC</i>	(He <i>et al.</i> , 2004)
RL039	PA14 com deleção em <i>rscB</i>	(He <i>et al.</i> , 2004)
RL043	PA14 <i>cupD2::TnphoA</i> , Km <sup>R</sup>	(He <i>et al.</i> , 2004)
RB200	PA14 <i>mvaT::Gm<sup>R</sup></i>	Este Trabalho
RB201	RL036 <i>mvaT::Gm<sup>R</sup></i>	Este Trabalho
RB202	RL037 <i>mvaT::Gm<sup>R</sup></i>	Este Trabalho
RB203	RL038 <i>mvaT::Gm<sup>R</sup></i>	Este Trabalho
RB204	RL039 <i>mvaT::Gm<sup>R</sup></i>	Este Trabalho
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacU169(80 lacZM15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
S17-1	294::RP4-2(Tc::Um)(Km::Tn7)	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<b>Plasmídeos</b>		
pGEM-T/pGEM-T easy	Vetor de clonagem para produtos de PCR, Ap <sup>R</sup>	Promega
pQF50	Vetor com gene repórter <i>lacZ</i> sem promotor, estável em <i>P. aeruginosa</i> , não-mobilizável, Ap <sup>R</sup> /Cb <sup>R</sup>	(Farinha e Kropinski, 1990)
pRB203	Fragmento de 379 bp da região a 5' de <i>cupD1</i> clonado no pQF50	Regina Baldini
pJS14	Vetor para expressão constitutiva de genes, a partir do promotor <i>lacZ</i> ; Cm <sup>R</sup> ; alto número de cópias	J. Skerker
pUC7G	fonte do cassete de resistência a gentamicina	(Nunn e Lory, 1992)
pJSG	pJS14 com resistência a gentamicina do pUC7G clonado no sítio <i>SacI</i>	Este trabalho
pNPTS138	Replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km <sup>r</sup> ), <i>sacB</i>	(Tsai e Alley, 2000)
pGN101	Região codificadora de <i>pvrS</i> clonado no pGEM-TEasy	Este trabalho
pGN102	Região codificadora de <i>pvrR</i> no pGEM-TEasy	Este trabalho
pGN103	Região codificadora de <i>rscC</i> no pGEM-TEasy	Este trabalho
pGN104	Região codificadora de <i>rscB</i> no pGEM-TEasy	Este trabalho
pJSG39	Região codificadora de <i>rscB</i> pJS14G sob controle do <i>Plac</i>	Este trabalho
pGN601	Regiões a 5' e 3' de <i>mvaT</i> no pNPTS138	Este trabalho
pED202	superexpressão de <i>pvrR</i>	(Drenkard e Ausubel, 2002)
pUCp18	vetor de clonagem derivado do pUC18 estável em <i>P. aeruginosa</i> , Cb <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	(Schweizer, 1991)
pGEMMvaT1-2	Região a montante de <i>mvaT</i> clonado no pGEM-TEasy	Este trabalho
pGEMMvaT3-4	Região a jusante de <i>mvaT</i> clonado no pGEM-TEasy	Este trabalho



Tabela 2. Composição dos meios de cultura.

<b>Meio de cultura</b>	<b>Composição</b>	<b>Referência</b>
LB	Tryptona 10 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; pH 7	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
T	Tryptona 10 g/L; NaCl 5 g/L	(Friedman e Kolter, 2004)
M63	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 g/L; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 13,6 g/L; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,54 g/L; MgSO <sub>4</sub> 1 mM; fonte de carbono glicose 20 g/L	(Pardee <i>et al.</i> , 1959)
MOPS	MOPS 1%; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,015%; NH <sub>4</sub> Cl 0,5%; NaCl 0,25%; extrato de levedura 0,01%; casaminoácidos 0,5%; MgSO <sub>4</sub> 0,025%, glicose 0,5%	(Whiteley <i>et al.</i> , 2001)
Meio para “swarming”	Bacto agar (Difco) 0,5% e 8 g/L de meio nutriente (Difco), suplementadas com 5 g/L de dextrose	(Déziel <i>et al.</i> , 2001)
M9 Modificado	20 mM NH <sub>4</sub> Cl; 12 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 8.6mM NaCl; 1 mM MgSO <sub>4</sub> e 1 mM CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O; 11 mM dextrose 0.5% casaminoácidos (Difco) 0.5% Bacto-agar	(Tremblay <i>et al.</i> , 2007)
NY	2.5% caldo nutriente 0.5% extrato de levedura	(Filiatrault <i>et al.</i> , 2006)

**Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.**

Oligonucleotídeo	Seqüência <sup>1</sup>	Utilização	T°C anelamento
PrE36LEFT	<b>GGA TCC</b> CAG CTG AAG GAG AGC GAA GCC TTT T	amplificação <i>pvrS</i>	60°C
PrE 36RIGHT	AGT <b>CCCGGG</b> CCGATAGGATTTCCAGCTCA		
PrE 37 LEFT	ACG <b>GAATTCT</b> CGATGAGCTGGAAATCCTATC	amplificação <i>pvrR</i>	60°C
PrE 37 RIGHT	AGC <b>AGGCCT</b> TGGGGATACTGCGTTAAACA		
PrE 38 LEFT	ATC <b>GAATTC</b> ACCAGCAGCGTCGTC AAC	amplificação <i>rscC</i>	60°C
PrE 38 RIGHT	AGC <b>GAATTC</b> CAGCCCCTCTTTCTCACAA		
PrE 39 LEFT	GAT <b>GAATTC</b> CCCGGGTCAATAGTTGGAAT	amplificação <i>rscB</i>	60°C
PrE 39 RIGHT	GAC <b>GTCGAC</b> CTTGCAATGGAACAAGTTGG		
mvaT1	GTCA <b>AAGCTT</b> ACCACGTCCTGCTCGATG	Deleção <i>mvaT</i>	62°C
mvaT2	GGTGTGCGGGTTCTTGACT <b>GGGATCC</b> GGCGCGAT ATTCGTTGAT		
mvaT3	ATCAACGAATATCGCGCC <b>GGATCCC</b> AGTACAAGAAC CCGCACACC	Deleção <i>mvaT</i>	62°C
mvaT4	TGT <b>GAATTC</b> AGCGCTATATGGCGAAGAAA		
Wzz1 qRT UP	GTCGGCAATCATGGAAGG	qRT-PCR	60°C
Wzz1 qRT Down	TCATCCGACGTCCGTTTT		
Wzz2 qRT UP	GTGCGGATCGACCAGAAG	qRT-PCR	60°C
Wzz2 qRT Down	AACATTGCCCGAACCAGA		
nadB UP	CTACCTGGACATCAGCCACA	qRT-PCR	60°C
nadB Down	GGTAATGTCGATGCCGAAGT		
rscB L	CGCCATTACCGACTACAG	qRT-PCR	60°C
rscB R	CGACCATGGTGAAGATGA		
rscC L	GGTCACCTGCGAATGGTC	qRT-PCR	60°C
rscC R	ACGCAAGCGGATTTCAAG		
cupD1 L	ACTATCGCCGCATTTCTC	qRT-PCR	60°C
cupD1 R	ACGGTGTGAGTATCACG		
RTcupA1 L	ATTCAGCGGCGAAGTGAC	qRT-PCR	60°C
RTcupA1 R	CGGTACGCTGTCGAGGAT		
RTcupB1 L	CGTCGGAACCAACTCCAC	qRT-PCR	60°C
RTcupB1 R	ACCGTATCGAAGGCGATG		
RTcupC1 L	ATGGCAAGCTGCTGAACC	qRT-PCR	60°C
RTcupC1 R	TAAGCAGCCCGCAGATTC		
RTpvrR L	TGGAGACCTGCGAGGAAC	qRT-PCR	60°C
RTpvrR R	CCTTAACTGCCGCTCGAA		
PvrS Down	GAGCGGCGTATCTGGTAGAA	qRT-PCR	60°C
PvrS Up	CGACAATGGCTATGTCAACG		

<sup>1</sup>em negrito os sítios de restrição colocados nos primers

### **3.3. Ensaio de motilidade**

Os ensaios de motilidade foram essencialmente realizados como descritos (Tremblay *et al.*, 2007), com as modificações especificadas, quando necessário. Para “swimming”, placas com meio T contendo agar 0,3% foram inoculadas na superfície, com 5 µL de uma cultura  $D.O_{600}=3$  e em seguida incubadas por 16 horas a 30°C no interior de sacos plásticos. A motilidade foi analisada qualitativamente através da formação de um halo circular, formado pela migração celular, a partir do ponto onde foram inoculadas. Para se avaliar “swarming”, foram utilizados dois tipos de composição de meio de cultura, o meio para “swarming” e um M9 modificado, ambos descritos na Tabela 2. As placas com 20 mL de meio foram secas por exatamente 15 minutos à temperatura ambiente na capela de fluxo laminar. As células foram então inoculadas com 5 µL de uma cultura no final da fase de crescimento exponencial ( $DO_{600}=3$ ) e as placas foram incubadas por 16 horas a 30°C no interior de sacos plásticos. As imagens foram fotografadas no Image Master VDS (Pharmacia Biotech). Para “twitching”, as células foram inoculadas com um palito estéril, atravessando uma fina camada (aproximadamente 3 mm) de meio LB contendo 1% de ágar. Após incubação de 24 a 48 horas a 37°C, foi realizada a remoção do ágar, seguida de uma lavagem das células não aderidas com jatos de água. As células aderidas à placa foram coradas com cristal violeta 1%, por 5 minutos e o excesso de corante removido com água. As peculiaridades de cada modo de motilidade estão descritas na seção de Resultados.

### **3.4. Análise da Produção de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeo (LPS)**

Para se avaliar a produção de exopolissacarídeos, as bactérias foram inoculadas em

placas de meio LB desprovido de NaCl e adicionado de 0,005% de vermelho do Congo. Após incubação em diferentes temperaturas, a morfologia e a coloração das colônias foram avaliadas.

A fim de se analisar o perfil de LPS, culturas feitas em meio LB foram ajustadas para uma  $D.O_{600} = 1$  em PBS (NaCl 8 g/L; KCL 0,2 g/L;  $NaHPO_4$  1,44 g/L;  $KH_2PO_4$  0,24 g/L, pH 7,4), em seguidas centrifugadas a 1 minuto. As bactérias foram suspensas em PBS contendo 1% de N-lauril sarcosina e incubadas a 37°C por 15 minutos para lisar as células. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 4°C em uma microcentrífuga a 12000 rotações por minuto para a remoção dos debrís celulares. Ao sobrenadante foram adicionados 4 volumes de etanol gelado, incubando-se em gelo por 15 minutos, seguido de centrifugação por 15 minutos a 4°C, sendo o precipitado seco no SpeedVac (Savant). O precipitado foi suspenso em 0,1 mL PBS contendo 0,1mg/mL de DNase I, 0,1mg/mL de RNase A, 4mM  $MgCl_2$  e 4mM  $CaCl_2$  e incubado por no mínimo 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados 10 mg/mL de protease e 10 mg/mL de proteínase K e as amostras incubadas por pelo menos 1 hora a 56°C. As amostras foram analisadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida 12%, ou gel com gradiente de concentração de 8-20%, como descrito por Laemli (Laemmli, 1970), porém sem a adição de SDS no gel de separação. O LPS foi corado por impregnação por prata, utilizando-se o kit BioRad Silver Stain.

### **3.5. Ensaios de iniciação de biofilmes**

As bactérias foram cultivadas em diversas condições conforme especificado na seção de Resultados. Brevemente, culturas em fase estacionária foram diluídas em meio apropriado a uma  $DO_{600} = 0,01$  e os tubos foram incubados em diferentes temperaturas, sem agitação. O meio foi então descartado, os tubos lavados com jatos de água para remover as

células não aderidas, e o biofilme corado por uma solução de cristal violeta 1% por 5 minutos à temperatura ambiente. O corante foi descartado e os tubos lavados vigorosamente com água e as células foram lisadas com etanol e acetona 10:1. A solução foi coletada e teve sua absorvância medida a 530 nm, sendo esta medida proporcional ao número de células aderidas.

Variações deste método originalmente proposto por O'Toole e Kolter (O'toole e Kolter, 1998) vêm sendo descritas (Ramsey e Whiteley, 2004); (Kulasekara *et al.*, 2006); (Friedman e Kolter, 2004). Diferenças podem ser observadas no requerimento ou não de determinados genes, de acordo com a condição em que o ensaio é realizado, o que reflete uma heterogeneidade dos biofilmes formados por *P. aeruginosa* em resposta ao ambiente. Foram testados várias combinações diferentes de meios de cultura, substratos, temperaturas e tempos de incubação, tomando-se como base condições já descritas na literatura. Essas condições foram ajustadas no decorrer dos experimentos a fim de se confirmar as pequenas diferenças que se observam entre as linhagens mutantes e a selvagem.

### **3.6. Análise da expressão de genes por transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)**

Foram realizadas análises de expressão de genes através de RT-PCR quantitativo, que permitem estimar a quantidade de mRNA de um determinado gene nas células em relação a um gene normalizador, cuja expressão não varia nas condições de ensaio. O RNA total das células planctônicas (em meio líquido) foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), tratado com DNase I (RQ-DNase I, Promega), conforme as instruções dos fabricantes. Após verificação por PCR de que todo o DNA contaminante havia sido eliminado, o RNA foi utilizado como molde para a síntese de cDNA com a enzima Superscript

III (Invitrogen) ou Improm II (Promega) e primers aleatórios. O cDNA foi então amplificado com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e oligonucleotídeos específicos (1,6 pmoles de cada, num volume final de 20  $\mu$ L) no equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o seguinte programa: 60°C 2 minutos; 95°C 10 minutos e 40 ciclos de 95°C 15 segundos; 60 °C 1 minuto. As taxas de expressão relativas foram calculadas de acordo com o método de  $-2^{\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001). O gene *nadB*, que não tem sua expressão alterada nas condições dos ensaios, foi utilizado como normalizador.

### **3.7. Análise da expressão gênica através de um gene repórter *lacZ***

Foram realizados ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase, que permite medir indiretamente a atividade do promotor de um determinado gene através da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, codificada pelo gene repórter *lacZ* fusionado ao promotor em questão. Células com o plasmídeo de interesse foram incubadas 12-16 horas a 37° C, sob agitação (200 rpm) em meio LB com carbenicilina. No outro dia, a  $DO_{600nm}$  foi ajustada para 0,1 e as culturas incubadas até atingirem  $DO_{600nm} = 2$ . Em seguida, foram coletados 100  $\mu$ L da cultura e adicionados 800  $\mu$ L de tampão Z ( $Na_2HPO_4$  8,51g/L,  $NaH_2PO_4$  6,25 g/L, KCl 0,75 g/L,  $MgSO_4$  0.25 g/L ,  $\beta$ -mercaptoetanol 2,7 mL/L). As células foram então rompidas com a adição de 50  $\mu$ L de SDS 0,1% e 50  $\mu$ L de clorofórmio e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 200  $\mu$ L de orto-nitrofenol D-galactopiranosídeo (ONPG) (4 mg/mL). Após o aparecimento da coloração amarela (5-40 minutos) foi adicionado 400  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  1M para parar a reação, os tubos foram então centrifugados a 13000 rcf por 3 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi medida a  $DO_{420nm}$  da fase aquosa. Os níveis de expressão foram calculados em unidades Miller (U) de acordo com a equação : “U =

$(1000 \times DO_{420nm}) / (\text{tempo da reação em minutos} \times \text{volume de cultura usado no ensaio em mL} \times DO_{600nm})$ .

### 3.8. Construção de linhagens mutantes no gene *mvaT*

A fim de se evitar efeitos polares nos genes adjacentes, o mutante para o gene *mvaT* foi construído com a deleção da sua porção codificadora, mantendo a fase de leitura. Para a construção dessa deleção, as regiões adjacentes ao gene foram amplificadas e inseridas em um vetor de clonagem. Tanto para amplificar a região a montante de *mvaT* quanto a jusante foram utilizados oligonucleotídeos contendo sítios de restrições na extremidade 5' dos iniciadores. Após a amplificação, foram gerados produtos de 997 e 624 pares de bases, contendo sítios de restrições 5' *HinDIII*-3' *BamHI* e 5' *BamHI*-3' *EcoRI*, respectivamente, em suas extremidades. Estes fragmentos foram clonados separadamente no vetor de clonagem pGEM-T Easy, gerando os plasmídeos pGEMMvaT1-2 e pGEMMvaT3-4. Esses plasmídeos foram digeridos com as devidas enzimas de restrições, os fragmentos de interesse isolados e ligados em uma mesma reação no plasmídeo pNPTS138 previamente digerido com as enzimas *HinDIII* e *EcoRI*, originando o plasmídeo pGN601. O próximo passo na criação dos mutantes foi transferir por conjugação o plasmídeo pGN601 para a linhagem PA14 para a construção do mutante em *mvaT* e nas linhagens RL036 a RL039 para construção de duplos mutantes.

O plasmídeo pNPTS138 é replicativo em *E.coli* mas não em *Pseudomonas* e se integra no cromossomo por recombinação homóloga, tornando a célula resistente a canamicina. Além disto, ele apresenta o gene *sacB*, cujo produto metaboliza a sacarose a um produto tóxico para célula, permitindo a seleção de colônias que integraram o plasmídeo e depois o perderam. Com isso foram feitas varias etapas de seleção para que houvesse a

construção do mutante. Primeiramente, as células transconjugantes foram crescidas em meio contendo canamicina para selecionar aquelas que tiveram o plasmídeo integrado no cromossomo da bactéria por meio de recombinação homóloga. Em seguida, as células foram crescidas “overnight” em meio LB sem seleção e plaqueadas em meio LB contendo sacarose 5%, para selecionar aquelas que perderam o plasmídeo (segundo evento de recombinação homóloga). A próxima etapa de seleção foi inocular as bactérias em LB contendo canamicina e em placas de sacarose 5%, evitando a seleção de colônias que poderiam ter o gene *sacB* inativo. As colônias que cresceram em sacarose e não cresceram em canamicina, foram escolhidas para análise por PCR para verificar se a deleção de parte do gene *mvaT* havia acontecido na segunda etapa de recombinação, ou se as bactérias haviam retornado ao genótipo selvagem.

Alternativamente, um cassete de resistência a gentamicina foi clonado no pGN601, entre os dois fragmentos provenientes de PA14. Neste caso, todos os passos de seleção contaram com a presença deste antibiótico no meio de cultura, evitando assim que o segundo evento de recombinação homóloga resultasse em células com o genótipo selvagem.

### **3.9. Análise da superexpressão de RcsB por western blot**

Para a criação de uma linhagem de PA14 superexpressando a proteína RcsB, o plasmídeo pGN104 (Tabela 1) foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *SpeI*, liberando um fragmento de aproximadamente 700 pb, correspondente à região codificadora de *rscB*. Este fragmento foi purificado e clonado no plasmídeo pJS14, gerando assim o plasmídeo pJS39. Como a seleção do pJS14 é feita por resistência a cloranfenicol e PA14 é naturalmente resistente a esse antibiótico, um cassete de resistência a gentamicina foi inserido tanto no



pJS14 quanto no pJS39, de acordo com o procedimento descrito a seguir.

O plasmídeo pJS39 foi linearizado com a enzima *SacI* e tratado com T4 DNA polimerase I para gerar uma extremidade cega. O plasmídeo pUC7G foi clivado com *BamHI* e um fragmento de 1,3 kb correspondente ao cassete de resistência a gentamicina foi purificado, tratado com T4 DNA polimerase I e ligado ao pJS39 linearizado. Após a transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  e confirmação da ligação, o plasmídeo resultante pJSG39 foi inserido por eletroporação em células PA14, sendo os transformantes selecionados em 30  $\mu$ g/mL de gentamicina.

Para confirmar a superexpressão de RcsB, extratos protéicos da linhagem PA14/pJSG39 foram obtidos de culturas em início de fase estacionária ( $DO_{600nm}=3.0$ ) crescidas em meio LB a 37°C. Os extratos totais foram obtidos da lise das bactérias em tampão de amostra (120mM Tris-HCL pH 6,8; 0,4% SDS; 100mM DDT; 40% glicerol; 0,01% Azul de bromofenol ) e separados por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 12%, a 200V, por 50 minutos. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose a 45 mA, por 50 minutos, segundo protocolo de transferência semi-seca utilizando o sistema Novablot (Amersham-Pharmacia Biotech). Após a transferência, as proteínas na membrana foram coradas com Ponceau S (0,1% em ácido acético 10%) e descoradas com água destilada. As membranas foram bloqueadas por 2 horas em TBS (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 150 mM NaCl) contendo 5% de leite desnatado. A solução foi trocada e o soro policlonal anti-RcsB, adicionado na diluição 1:1000 em TBS-T (TBS adicionado de 0,05% de Tween 20). O soro anti-RcsB de *P. aeruginosa* foi obtido em nosso laboratório pela aluna de mestrado Ana Laura Boechat, pela inoculação de coelho com a proteína RcsB recombinante expressa em *E. coli* (Boechat, 2008). Após o tempo de incubação de 2 horas, as membranas foram lavadas por 5 minutos duas vezes em TBS-T e

uma vez em TBS, procedendo-se então a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina 1:30000, seguindo-se nova lavagem como descrito acima. As membranas foram reveladas com 150 µL NBT (nitrobluetetrazolium) 10 mg/mL e 50 µL Bcip (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) 50 mg/mL em 5 mL de tampão para fosfatase alcalina (Tris-HCl 10 mM pH 9, NaCl 100 mM e MgCl<sub>2</sub> 5mM). A reação foi interrompida com EDTA 10 mM.

### **3.10. Análise de homologia das proteínas entre linhagens de *Pseudomonas*.**

Análises *in silico* foram realizadas, buscando encontrar proteínas homólogas às estudadas durante este trabalho, em outras linhagens do gênero de *Pseudomonas* que tiveram seu genoma seqüenciado. As seqüências das proteínas foram obtidas do banco de dados do site [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) e foram usadas na ferramenta BLAST do mesmo site (Winsor *et al.*, 2005). Foram considerados resultados apenas com *E value* menores que 10<sup>-12</sup>. Árvores filogenéticas foram construídas com o programa ClustalW e utilizando o algoritmo de agrupamento Neighbor-Joining guide trees (Larkin *et al.*, 2007).

### **3.11. Microscopia eletrônica de transmissão.**

As amostras bacterianas foram cultivadas em placas a 37°C, por 16-18 h. Após este período, o raspado de uma colônia bacteriana crescida na placa foi transferida e suspensa em 200 µl PBS, a preparação foi centrifugada a 400 rcf por 4 minutos, e o pellet resultante suspenso em água bidestilada. Em um tubo do tipo Eppendorf, 10 µL da suspensão bacteriana foram adicionados à 10 µL de uma solução aquosa de acetato de uranila a 2%.

Um volume de 10  $\mu$ L dessa preparação foi aplicado sobre telas de microscopia eletrônica, previamente preparadas com um filme de Formvar e carbono irradiadas com UV. Após 2 minutos de contato, o excesso do líquido foi retirado com papel de filtro e a preparação foi seca em ambiente. As preparações foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906E) a 80.0 kV no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantã. Este ensaio foi realizado com a colaboração da Dra. Cecília M. Abe.

## 4. Resultados

### 4.1. Presença de genes *cup*, *pvrSR* e *rscCB* em *Pseudomonas*

A linhagem PA14 apresenta o grupo de genes *cupD*, localizada em PAPI-1, ausente em PAO1, a primeira linhagem de *P. aeruginosa* a ter o genoma completamente seqüenciado (Stover *et al.*, 2000). A jusante de *cupD*, encontram-se quatro genes que codificam proteínas de sistemas de dois componentes (*pvrSR*, *rscCB*). A fim de verificar se esse arranjo estaria presente em outras *Pseudomonas*, foram realizadas buscas para cada um destes genes nos genomas completos depositados em [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) (Winsor *et al.*, 2005), verificando-se a conservação não só da seqüência primária, mas também da localização dos genes dos sistemas de dois componentes e homólogos de *cupD*. Além dos genomas de três linhagens de *P. aeruginosa*, encontram-se neste banco de dados três linhagens do fitopatógeno *P. syringae*, duas de *P. putida*, uma *Pseudomonas* de vida livre estudada principalmente por suas aplicações biotecnológicas, duas de *P. fluorescens*, espécie associada a plantas e promotora de seu crescimento, uma da linhagem entomopatogênica *P. entomophilica*, uma da linhagem ambiental *P. mendocina* e uma do patógeno oportunista *P. stutzeri*.

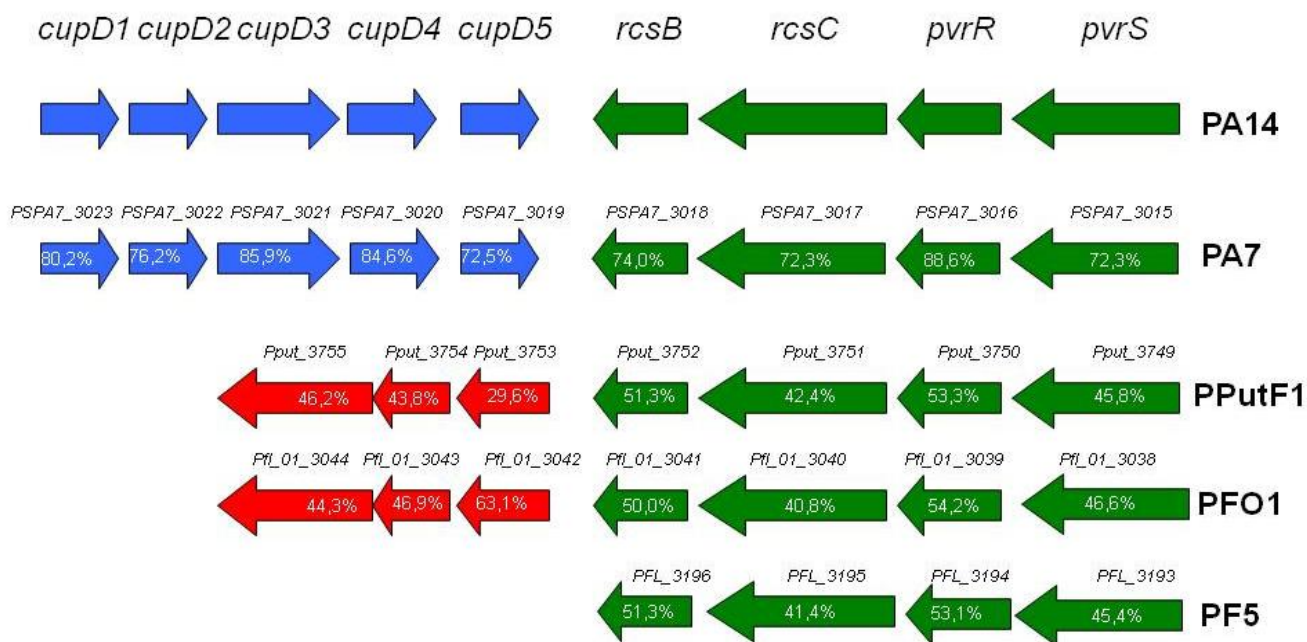
Dentre essas espécies, apenas uma linhagem de *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* PA7), uma de *P. putida* (*P. putida* F1) e duas de *P. fluorescens* (*P. fluorescens* Pf5 e PFO1) apresentaram um arranjo idêntico ao dos sistemas de dois componentes homólogo ao de PA14 (Tabela 4). Com exceção da linhagem *P. fluorescens* Pf-5, essas linhagens apresentaram genes adjacentes com similaridade com sistema *cup*. A linhagem de *P. aeruginosa* PA7 apresentou maior similaridade com *cupD* de PA14, enquanto as outras apresentaram maior similaridade com *cupC* (Figura 8). Foi realizada uma busca no banco de

dados do NCBI por outras espécies que apresentassem o mesmo arranjo gênico dos sistemas de dois componentes localizados em PAPI-1. Nesta análise apenas a bactéria *Yersinia frederiksenii* ATCC 33641 apresentou este tipo de arranjo, e, curiosamente, genes para montagem de uma fímbria similar a *cup* foram encontrados a jusante dos sistemas de dois componentes nesta bactéria (dados não mostrados).

**Tabela 4.** Identidade das proteínas codificadas pelos sistemas de dois componentes de PA14 com ortólogos presentes em outras linhagens de *Pseudomonas*.

Proteínas	Identidade (%)			
	PvrS	PvrR	RcsC	RcsB
PA7 3015-->3018	72,33	88,69	74,00	90,00
Pput 3749-->3752	45,81	53,32	42,47	51,39
Pf5 3193-->3196	45,42	53,18	41,40	51,39
PfO1 3038-->3041	46,69	54,20	40,88	50,00

Quatro linhagens de *Pseudomonas* apresentaram o mesmo arranjo gênico dos sistemas de dois componentes observado em PA14 (Tabela 4, Figura 8). Visando buscar relações evolutivas entre as espécies de *Pseudomonas*, seqüências de proteínas codificadas por *cup* foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas no programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Uma das árvores foi construída com as seqüências das proteínas “usher” (Figura 9), já que esta é a mais conservada entre as proteínas dos sistemas Cup, provavelmente por serem responsáveis pela montagem das fímbrias.



**Figura 8 Organização e identidade dos genes dos sistemas de dois componentes.** Quatro espécies de *Pseudomonas* apresentam a mesma organização gênica para os sistemas de dois componentes com similaridade aos apresentados em *P. aeruginosa* PA14 (Verde). Dentre essas quatro espécies, três apresentam genes que codificam para uma fímbria montada pelo sistema *cup* adjacente aos genes dos sistemas de dois componentes. Dentre estas, *P. aeruginosa* PA7 apresenta similaridade com *cupD* (Azul), *P. putida* F1 e *P. fluorescens* PF01 com *cupC* (Vermelho) e *P. fluorescens* PF5 não apresentou similaridade com nenhum gene *cup* nessa região do genoma. As porcentagens de identidade dos genes com os ortólogos de PA14 estão indicadas no interior das setas e as anotações dos loci estão acima delas.

Outra árvore foi construída com as subunidades de fímbrias (Figura 10), visando buscar possíveis relações funcionais, pois são as subunidades que ficam expostas no meio extracelular e que conferem adesão a diferentes substratos, sendo suas sequências de aminoácidos menos conservadas. Foram utilizados como entrada genes que codificam para subunidades de fímbrias montadas pelo sistema “chaperone/usher” em linhagens de *Pseudomonas* que apresentam em seu genoma grupos de genes com a mesma organização que *pvrSR* e *rscCB* em PA14 (Tabela 5). Apesar da linhagem PAO1 não conter o “cluster” *pvrSR/rscCB*, sua seqüência foi usada na comparação por apresentar os genes *cup* previamente caracterizados.

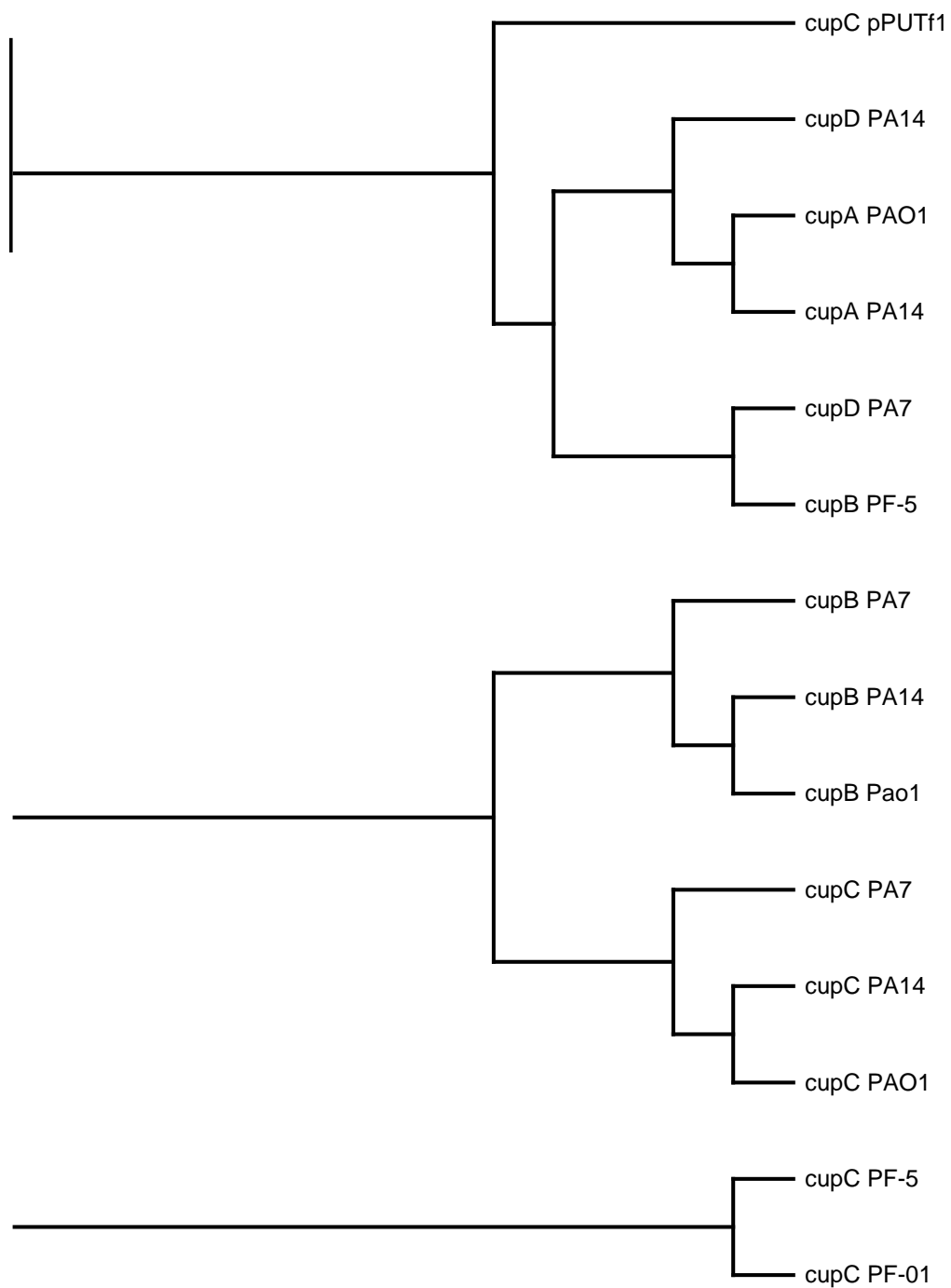
**Tabela 5.** Proteínas Cup codificadas pelos genomas das linhagens de *Pseudomonas* apresentadas na Figura 8.

	função <sup>1</sup>	PA14 <sup>2</sup>		PAO1 <sup>3</sup>		PA7 <sup>3</sup>		PPutF1 <sup>3</sup>		PF-O1 <sup>3</sup>		Pf-5 <sup>3</sup>	
		PA14_	PA	%	PSPA7_	%	Pput_	%	Pfl_O1_	%	PFL_	%	
CupA1	F	37060	2128	99.45									
CupA2	C	37040	2129	99.45									
CupA3	U	37030	2130	99.45									
CupA4	C	37010	2131	99.31									
CupA5	F	37000	2132	100.00									
CupB1	F	11060	4086	94.71	1014	69.31						1462	55.61
CupB2	C	11070	4087	98.79	1015	67.74						1463	49.19
CupB3	U	11080	4088	99.29	1016	79.22						1464	56.59
CupB4	C	11090	4089	98.78	1017	60.66						1465	49.63
CupB5	A	11100	4090	98.43	1018	69.65						1467	47.61
CupB6	F	11110	4091	99.21	1019	64.60						1468	40.76
CupC1	F	51470	0992	95.61	4408	63.11	3753	29.67	3042	29	3922	27.92	
CupC2	C	51460	0993	97.89	4406	55.22	3754	43.86	3043	46.9	3923	45.37	
CupC3	U	51450	0994	98.69	4405	76.25	3755	46.29	3044	44.32	3924	43.49	
CupD1	F	59710			3023	80.22							
CupD2	C	59720			3022	76.23							
CupD3	U	59735			3021	85.98							
CupD4	F	59740			3020	84.60							
CupD5	C	59750			3019	72.56							

<sup>1</sup>Predição de função da proteína: F, subunidade de fímbria ou seu precursor; C, chaperona; U, “usher”; A, adesina.

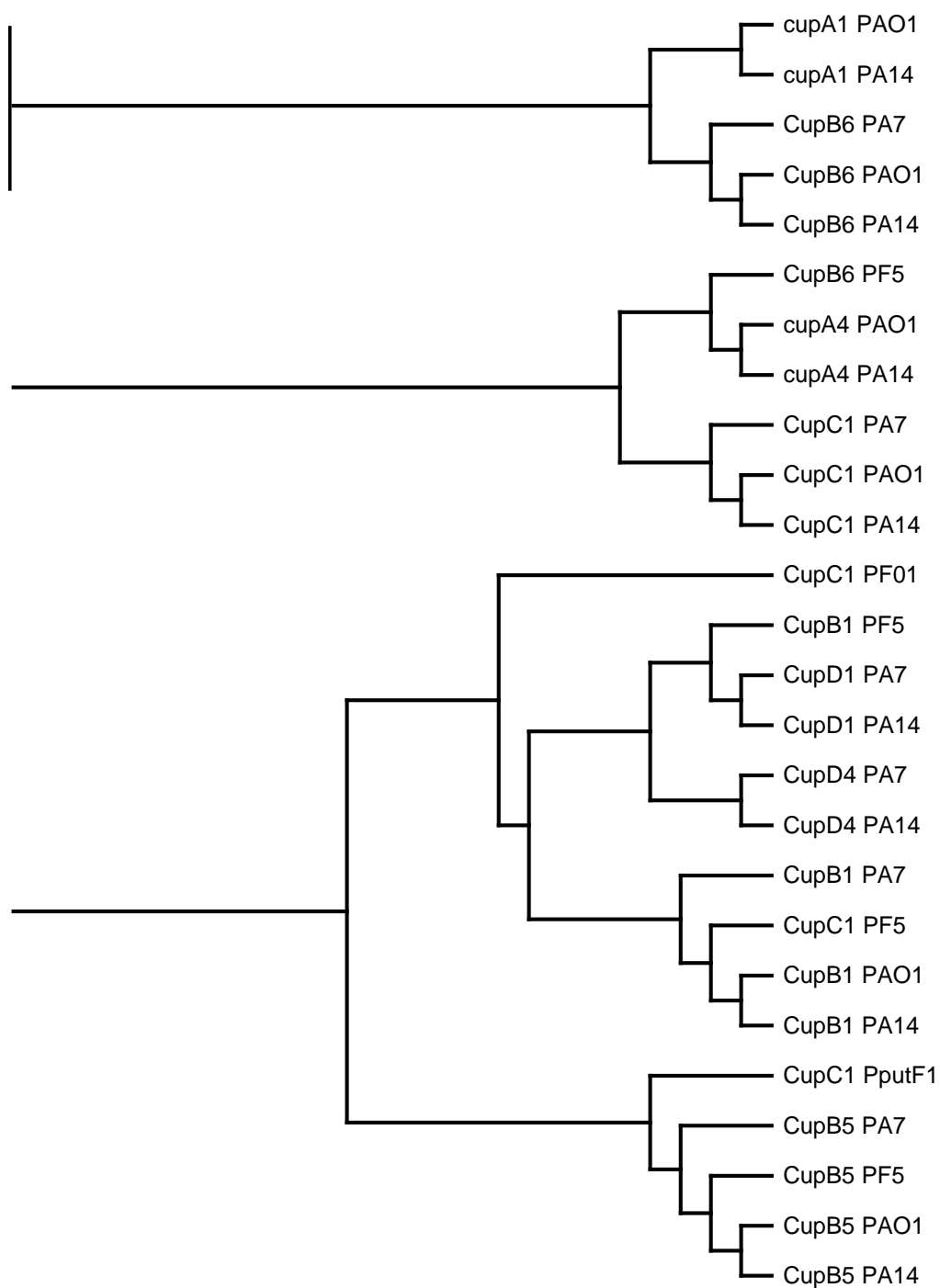
<sup>2</sup>PA14\_ se refere ao locus id de PA14 em [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) (Winsor *et al.*, 2005).

<sup>3</sup>A primeira coluna de cada linhagem se refere ao locus id em [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) (Winsor *et al.*, 2005) e a coluna “%” dá o percentual de identidade de aminoácidos relativo às proteínas ortólogas de PA14



**Figura 9** Árvore filogenética dos “ushers” de diferentes espécies de *Pseudomonas*. Alinhamentos múltiplos foram realizados com o programa Clustal W. Foram utilizadas como entrada genes que codificam “ushers” das espécies de *Pseudomonas* que apresentaram o mesmo arranjo gênico dos sistemas de dois componentes *pvrSR* e *rscCB*. Além dessas proteínas, foram utilizados também os “ushers” de PAO1, a linhagem mais estudada de *Pseudomonas*.



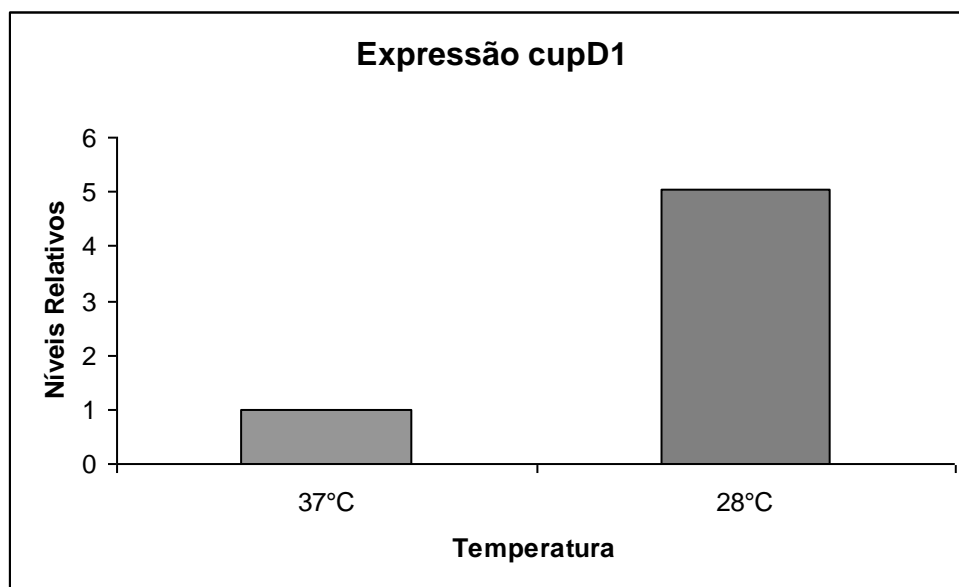


**Figura 10. Árvore filogenética das subunidades de fímbria.** Alinhamentos múltiplos foram realizados com o programa Clustal W. Foram utilizadas como entrada seqüências de genes que codificam para subunidades de fímbrias montadas pelo sistema “chaperona/usher” das espécies de *Pseudomonas* que apresentaram o mesmo arranjo gênico dos sistemas de dois componentes *pvrSR* e *rscCB*, além dos genes *cup* de PAO1.

## 4.2. Perfil de expressão de *cupD*

Ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase previamente realizados no laboratório demonstraram baixos níveis de expressão de *cupD* nas condições estudadas. Portanto, novas condições de crescimento foram testadas com a finalidade de aumentar a expressão do gene *cupD*. Foram realizados ensaios de  $\beta$ -galactosidase a partir de culturas em meio LB, em meio NY e meio NY+KNO<sub>3</sub> tanto com oxigenação (agitação a 200 rpm) quanto em hipóxia (sem agitação com uma camada de óleo mineral sobre o meio líquido). Entretanto, não foram observadas diferenças importantes nos níveis de expressão com essas variações (dados não mostrados).

Ensaio de RT-PCR em tempo real com culturas da linhagem selvagem em duas temperaturas diferentes em fase exponencial de crescimento foram realizados. Nesta condição foi possível observar que a expressão de *cupD* foi 5 vezes maior a 28°C do que a 37°C (Figura 11), confirmando dados obtidos anteriormente em nosso laboratório com ensaios de atividade de gene repórter.



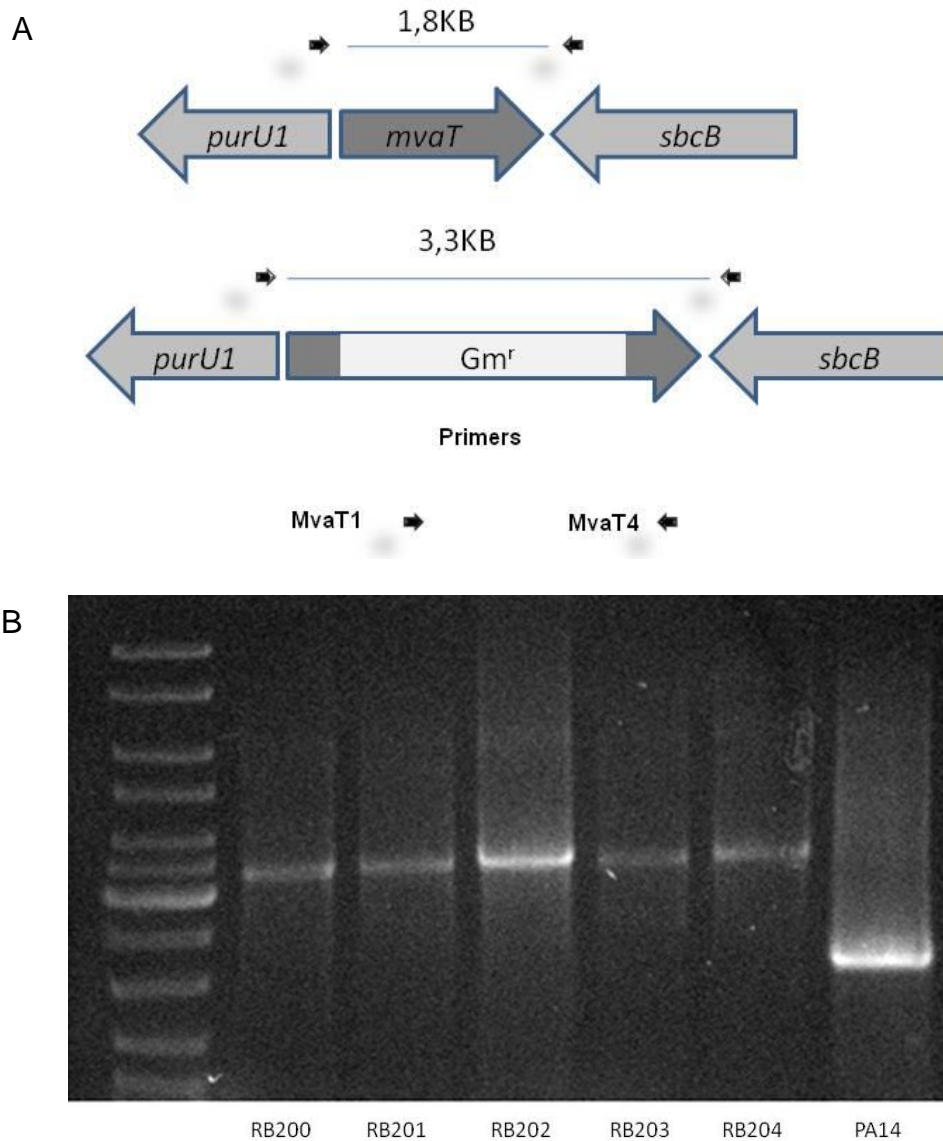
**Figura 11. Influência da temperatura na expressão de *cupD1*.** Os níveis de mRNA de *cupD1* na linhagem selvagem PA14 apresentaram-se 5 vezes maiores a 28°C que a 37°C, em ensaios de qRT-PCR.

### 4.3 Construção do mutante com deleção em *mvaT*

Foi observado que a ausência de MvaT aumenta a expressão de *cupA*, *cupB* e *cupC* em PAO1 (Vallet *et al.*, 2004). Para avaliar o efeito dessa proteína sobre a expressão de *cupD* em PA14, linhagens mutantes foram construídos por deleção da região codificadora tanto na linhagem selvagem, quanto nos mutantes para os genes do sistema dois componentes *pvrSR* e *rscCB* (RL036-RL039).

Apesar de várias tentativas, não foi possível obter o mutante por deleção em PA14 e derivadas, pois as linhagens resultantes da segunda recombinação sempre apresentavam o genótipo selvagem. Como alternativa, um gene de resistência a gentamicina foi introduzido na construção no pNPTS138, o que facilitou a seleção dos mutantes. Estes mutantes apresentam uma deleção de 264 nucleotídeos da região codificadora do gene de *mvaT*, onde foi introduzido um gene de resistência a gentamicina de 1800 pares de bases (Figura 12).

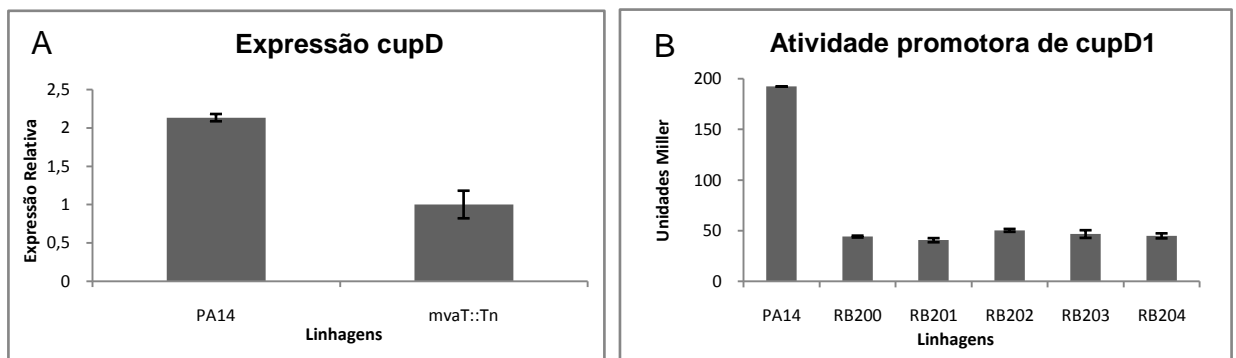
Uma linhagem portando um transposon em *mvaT* proveniente da biblioteca Unigene (Liberati *et al.*, 2006), denominada aqui de *mvaT::Tn*, foi também utilizada nos ensaios subsequentes. Como esse gene não faz parte de um operon e não há genes transcritos na mesma direção nos seus flancos, pode-se inferir que a inserção do transposon afeta apenas o gene *mvaT*.



**Figura 12** Mutação do gene *mvaT* nas linhagens selvagem e mutantes para os genes dos sistemas de dois componentes.. **A.** esquema demonstrando a mutação em *mvaT*. **B.** Gel de eletroforese com resultado do PCR do DNA genômico das linhagens mutantes para o gene *mvaT*. Foram utilizados oligonucleotídeos que geram um produto de 1,8 Kb na linhagem selvagem e 3,3 Kb na linhagem mutante, referente ao 1,8 Kb menos a deleção de parte do gene *mvaT* (264 bp) e a soma do gene de resistência a gentamicina (1,8kb). A canaleta da esquerda mostra o marcador de peso molecular usado como referência e o nome de cada linhagem (Tabela 1) da qual o DNA foi extraído está mostrado abaixo da canaleta correspondente.

#### 4.4 Efeito da mutação em *mvaT* na expressão de *cupD*

Ensaio de qRT-PCR realizados com RNA extraídos de culturas em meio LB a 28°C em fase exponencial de crescimento ( $D.O_{600}=1.0$ ) demonstraram que a expressão de *cupD* estava duas vezes menor no mutante por transposon em *mvaT* do que na linhagem selvagem. Ensaio de  $\beta$ -galactosidase com culturas crescidas em condições similares, porém a 37°C, demonstraram uma diminuição na expressão de *cupD* (Figura 13), confirmando os resultados descritos acima.

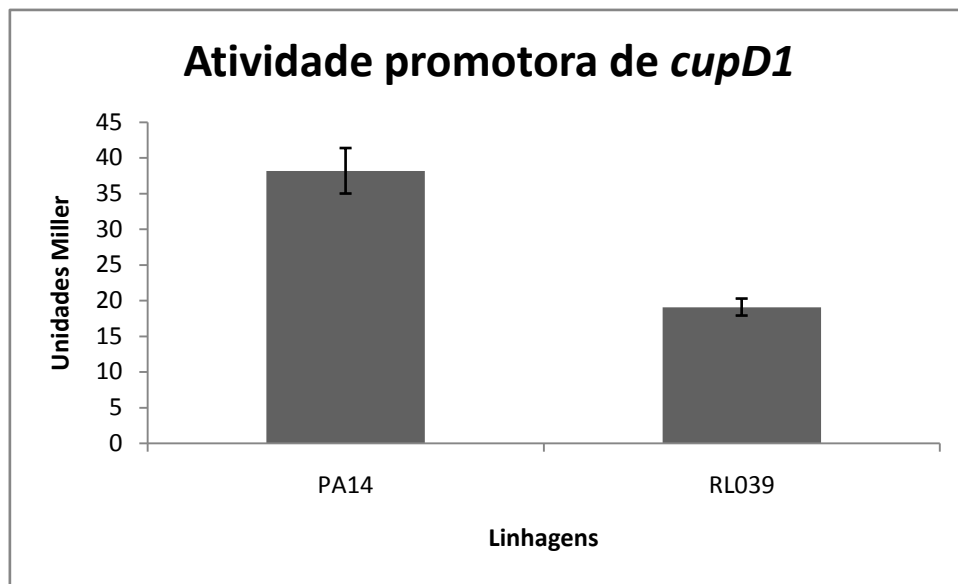


**Figura 13.** MvaT regula positivamente a expressão de *cupD1*. **A)** Níveis relativos de mRNA de *cupD1* na linhagem mutante para o regulador global da transcrição MvaT. A ausência dessa proteína funcional resultou em metade do nível de mRNA de *cupD1* em relação ao verificado para a linhagem selvagem, PA14. Ensaio realizado a partir de RNA total extraído de culturas em meio líquido a 28°C. **B)** Ensaio de  $\beta$ -galactosidase mostrando que a atividade promotora de *cupD1* é menor nas linhagens que contêm o gene *mvaT* mutado. Ensaio realizado a partir de cultura líquida a 37°C. A linhagem RB200 apresenta a mutação em *mvaT*, enquanto as linhagens pRB201-204 são mutantes duplos, com deleções em cada um dos genes dos sistemas de dois componentes, em adição à mutação em *mvaT*.

#### 4.5 Efeito dos sistemas de dois componentes na expressão de *cupD*

Para analisar se os genes dos sistemas de dois componentes presentes em PAPI-1 estão envolvidos na regulação de *cupD*, ensaios de  $\beta$ -galactosidase foram realizados. A região promotora de *cupD1* foi clonada no pQF50, um vetor com gene repórter *lacZ* sem promotor, criando assim o plasmídeo pRB203. Este plasmídeo foi transferido para a linhagem selvagem PA14 e linhagens mutantes nos genes dos sistemas de dois componentes RL036,

RL037, RL038 e RL039, e os ensaios foram realizados com culturas em meio LB a 37°C em fase de crescimento exponencial (DO=1). Não foi possível observar diferenças na expressão de *cupD* nas linhagens com *pvrS*, *pvrR* e *rscC* mutados, entretanto na linhagem com *rscB* mutado houve uma expressão aproximadamente 50% menor que na linhagem selvagem (Figura 14). Esses dados foram confirmados por experimentos de PCR em tempo real realizados por A.L. Boechat (Boechat, 2008).



**Figura 14.** A deleção em *rscB* diminui em 50% a expressão de *cupD*. Ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase transcrito a partir do promotor de *cupD1*, com culturas crescidas a 37°C por 16 horas nas linhagens PA14 e RL039, com deleção em *rscB*.

#### 4.6. Caracterização fenotípica das linhagens mutantes

Foram realizados ensaios de caracterização fenotípica para os mutantes nos genes dos sistemas de dois componentes que estão a jusante de *cupD* e hipoteticamente regulando estes genes. Visto que fímbrias estão normalmente relacionadas com a adesão e/ou motilidade, ensaios para estes fenótipos foram realizados. É importante considerar também que *pvrR* codifica para uma proteína com domínio EAL, envolvida no metabolismo de c-di-GMP, relacionado com a transição celular do estado móvel para o sésil (Simm *et al.*, 2004;

Romling e Amikam, 2006).

#### **4.6.1. Motilidade**

*P. aeruginosa* apresenta três tipos diferentes de motilidade. O flagelo é responsável pela motilidade em ambientes aquosos chamada de “swimming” e da motilidade na interface entre o meio semi-sólido e ar, o “swarming”, sendo que este também é dependente da produção de um surfactante pela bactéria. A fímbria tipo IV é responsável pela motilidade em superfícies, independente de flagelo, e esta é denominada “twitching”.

##### **4.6.1.1. “Swimming”**

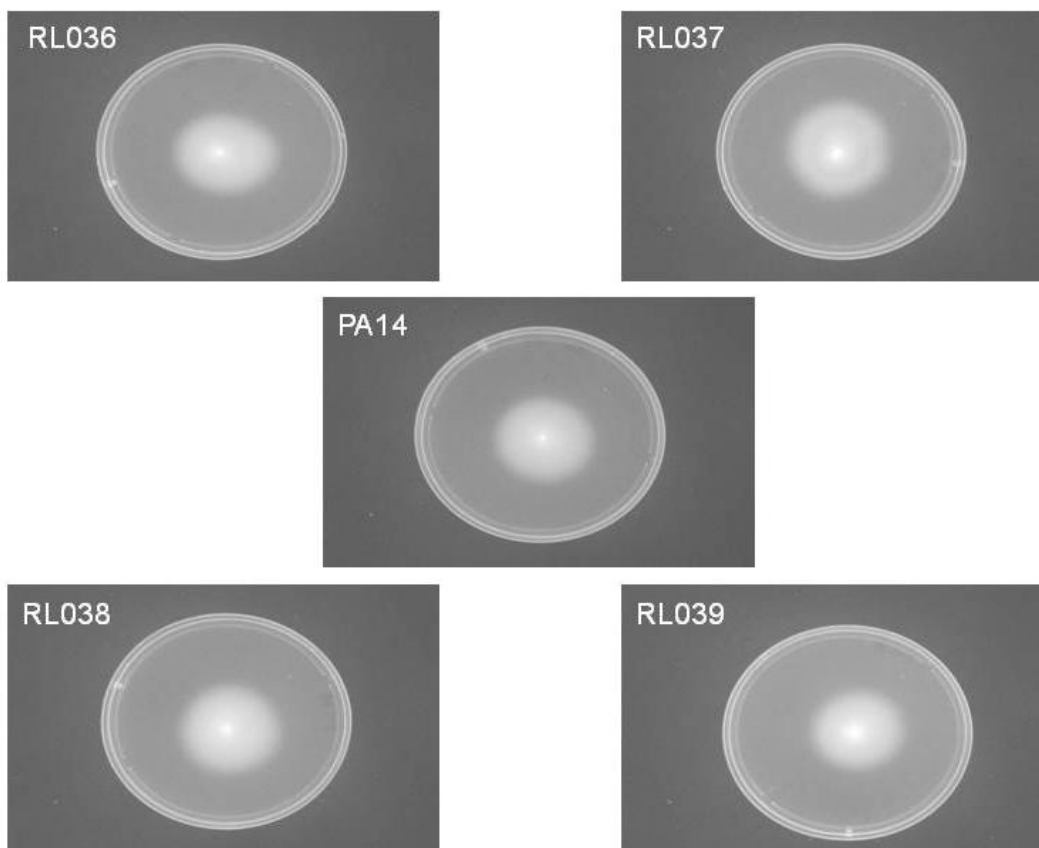
As bactérias foram inoculadas na superfície do meio T com ágar 0,3% a partir de 5  $\mu$ L de uma cultura em início de fase estacionária ( $D.O_{600} = 3.0$ ) e incubadas por 16 horas a 30°C no interior de sacos plásticos para evitar o ressecamento do meio. Das linhagens testadas, todas apresentaram a capacidade de “swimming” (Figura 15), indicando assim que o flagelo é funcional nestas linhagens.

##### **4.6.1.2. “Swarming”**

O “swarming” é um tipo de motilidade social dependente do flagelo, que ocorre em superfícies viscosas ou meios semi-sólidos (Harshey, 2003). Para que ocorra o “swarming”, as bactérias produzem alguns componentes extracelulares (surfactantes), que irão reduzir o atrito das células com a superfície, permitindo assim que elas deslizem em grupos (Harshey, 2003). Para a realização deste ensaio, placas com meio M9 modificado foram incubadas com 5  $\mu$ L de uma cultura  $DO_{600} \sim 3$ . Não foi possível observar diferenças reprodutíveis nos ensaios de “swarming” entre as linhagens mutantes nos genes *pvrSR* e *rscCB* analisadas (Figura 16).

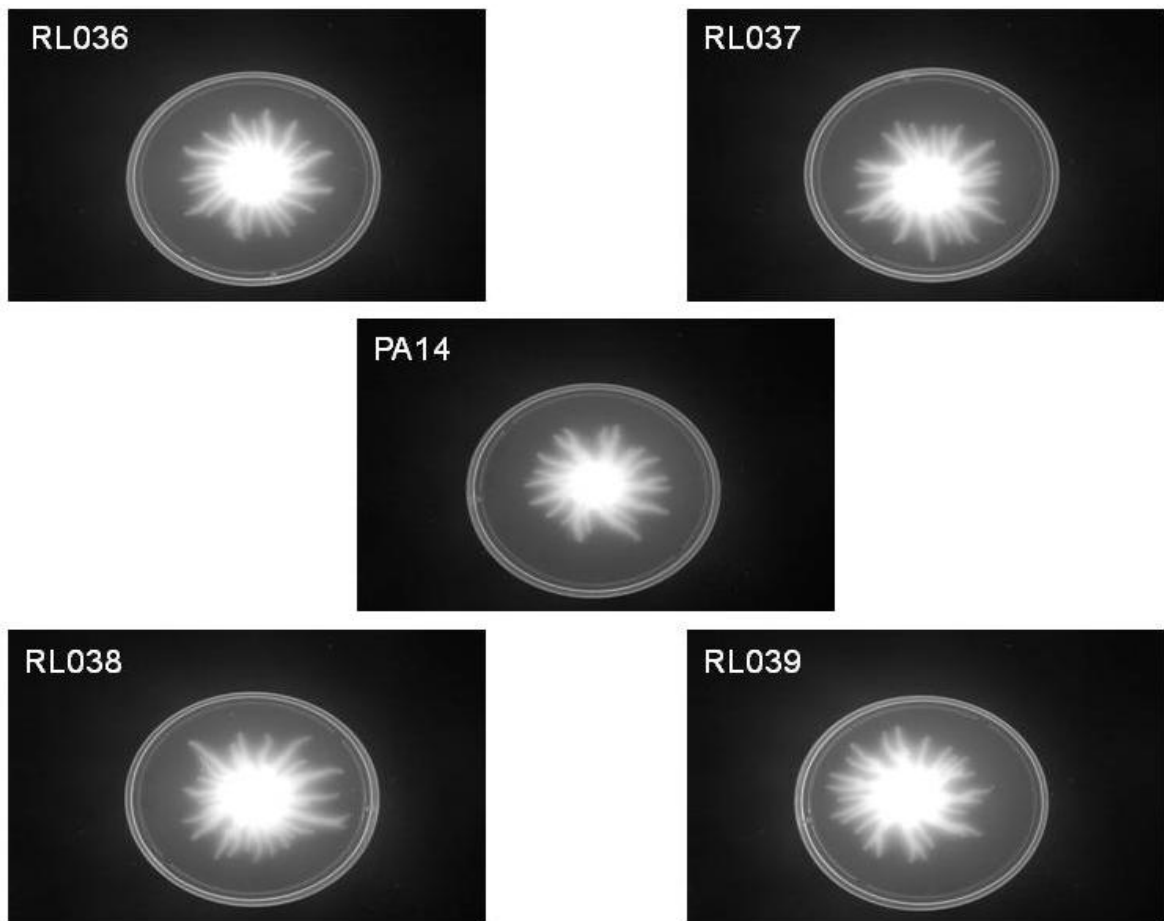
#### 4.6.1.3. “Twitching”

O “twitching” foi definido como um movimento de pulsos irregulares intermitentes (Henrichsen, 1972). Este tipo de motilidade é dependente de fímbrias tipo IV e está relacionado à colonização de superfícies e ao início da formação de biofilme. Placas com meio LB 1% foram inoculadas com um palito até atravessar a camada de LB e incubadas a 30°C por 14-16 horas. O meio foi retirado e as células aderidas ao fundo da placa coradas com cristal violeta. Nenhum dos mutantes analisados apresentou diferenças neste tipo de motilidade em relação à linhagem selvagem (Figura 17).



**Figura 15. Motilidade tipo “swimming”.** Placas foram inoculadas com 5  $\mu$ L de cultura a uma  $DO_{600} = 3$  e incubadas no interior de sacos plásticos para manter a umidade, a 30°C por 16 horas.





**Figura 16. Motilidade do tipo “swarming” não foi afetada por deleções nos genes dos sistemas de dois componentes.** Placas foram inoculadas com 5  $\mu$ L de culturas a uma  $DO_{600}= 3$  e incubadas no interior de sacos plásticos para manter a umidade, a 30°C por 24 horas



**Figura 17. Mutações nos genes dos sistemas de dois componentes não alteram a motilidade do tipo “twitching”.** Placas com meio LB 1% foram inoculadas com um palito atravessando a camada contendo o meio e incubadas por 24 horas. Em seguida o meio foi retirado e as bactérias coradas com cristal violeta 1%.

#### 4.6.2. Ensaios de formação de biofilme

Nos ensaios realizados, o biofilme é formado pela adesão das bactérias na superfície do tubo de ensaio, na interface entre o meio e o ar, formando um anel. Esse tipo de ensaio permite avaliar apenas os estágios iniciais da formação do biofilme, mas não sua forma madura, que consiste de estruturas em forma de domo ou cogumelos rodeadas por canais (Lawrence *et al.*, 1991). Como fenótipos de redução na formação de biofilme são freqüentemente dependentes das condições experimentais, diversos ensaios foram realizados, com diferentes condições para a formação de biofilme, alterando a composição do substrato do meio de cultivo (LB, LB-, MOPS), o tempo de crescimento (variando de sete a dezesseis horas) e a temperatura de incubação (28, 30 e 37°C).

Foram encontradas dificuldades em interpretar os resultados dos ensaios de biofilme, devido à grande variação nas repetições dentro de cada ensaio. Os ensaios foram realizados com até seis réplicas diversas vezes e, não foi possível observar nenhuma diferença reprodutível entre as linhagens, a não ser um pequeno aumento do biofilme formado pela linhagem *RL037* em duas das condições utilizadas. As condições de ensaios estão listadas na Tabela 4, bem como os resultados encontrados.

**Tabela 4. Resultados dos ensaios de formação de biofilme em diferentes condições.**

tempo de crescimento (h)	temperatura de incubação	meio de cultivo	composição do substrato	Resultados/ observações
16	30°C	LB – NaCl	Polipropileno e Vidro	Biofilme ligeiramente aumentado para a linhagem <i>RL037</i>
7,5	30°C	LB - NaCl	Polipropileno e Vidro	Não houve formação de biofilme
8 *	30°C	MOPS	Polipropileno	Não houve variação entre as linhagens.
8 *	30°C	LB - NaCl	Polipropileno	Biofilme ligeiramente aumentado para a linhagem <i>RL037</i>
12	30°C	LB	Polipropileno	Não houve variação entre as linhagens
12	28°C	LB	Polipropileno	Não houve variação entre as linhagens

\*Início do biofilme  $D.O_{600}=0,1$

#### 4.6.3. Produção de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos pelas linhagens mutantes

Os genes *rcs* de *E. coli* e *Salmonella* estão envolvidos na expressão de genes relacionados à síntese de exopolissacarídeos e níveis de c-di-GMP também estão relacionados com a expressão destes genes (Tischler e Camilli, 2004). Com base nessas informações, a produção de exopolissacarídeos pelas linhagens com deleção nos genes dos sistemas de dois componentes *rcsCB* e *pvrSR* foi analisada. Placas contendo meio LB-NaCl com o corante vermelho do Congo, que liga polissacarídeos, foram inoculadas com 5 µL de culturas bacterianas e incubadas a 37°C por 24 horas. Não foram observadas variações na morfologia e coloração das colônias, o que demonstra não haver alteração na produção de exopolissacarídeos em nenhuma das linhagens testadas em relação a PA14 (dados não mostrados).

Em *S. typhimurium*, o sistema Rcs controla a expressão dos genes *wzz*, que estão relacionados com o número de repetições de cadeias de açúcar no LPS (Delgado *et al.*, 2006). O perfil de LPS de PA14 e das linhagens mutantes nos sistemas de dois componentes foram analisados por eletroforese em gel de poli-acrilamida. Foram observadas diferenças sutis nos perfis de LPS nas linhagens com deleção em *rscC* ou em *rscB*, sugerindo que o comprimento das cadeias poderia ser diferente (dados não mostrados). Portanto, ensaios para análise da expressão de *wzz* em *P. aeruginosa* foram realizados por PCR em tempo real, na tentativa de confirmar essas alterações.

#### 4.7. Efeito dos sistemas de dois componentes na expressão dos genes

##### **WZZ**

O número de repetições de subunidades de antígeno O no LPS é regulada pelo produto do gene *wzz*. O genoma de *P. aeruginosa* apresenta dois destes genes (*wzz1* e

wzz2), que atuam de maneira distintas. A proteína Wzz1 faz a polimerização das cadeias menores (12-16 ou 22-30 repetições) do antígeno O, e a Wzz2 faz as cadeias maiores (40-50 repetições) (Daniels *et al.*, 2002) .

Em *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (*S. typhimurium*), a expressão de *wzz* é regulada diretamente por dois sistemas de dois componentes distintos, PmrAB e RcsBC. A deleção do gene de um dos reguladores de resposta de qualquer destes sistemas altera o tamanho da cadeia de LPS nesta bactéria. Já o mutante duplo *pmrA/rcsB* exhibe o mesmo perfil do mutante em *wzz*, ou seja, sem as cadeias menores do antígeno O (Delgado *et al.*, 2006). Como o antígeno O das linhagens mutantes em *rscC* e *rscB* de PA14 apresentaram inicialmente um perfil diferente da linhagem selvagem, decidiu-se investigar se isso ocorre devido a diferenças na expressão nos genes *wzz1* e *wzz2*.

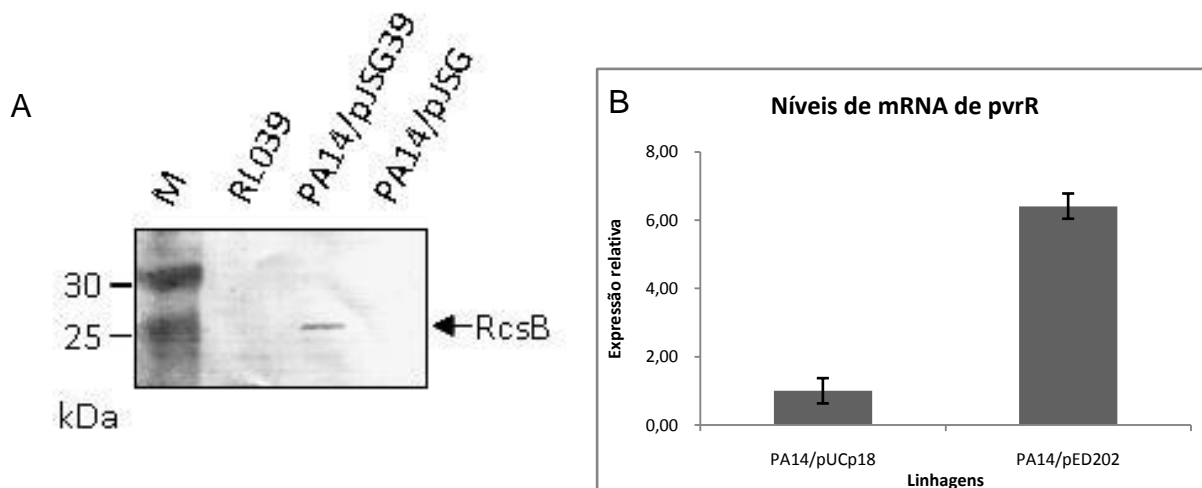
Assim, um ensaio de qRT-PCR foi planejado a fim de se investigar se os genes *wzz1* e *wzz2* de PA14 têm sua expressão alterada pelos sistemas de dois componentes em PAPI-1. Culturas das linhagens PA14 e derivadas, com deleções em um dos genes dos sistemas de dois componentes (RL036-39 ) foram cultivadas a 28°C e seu RNA foi extraído em fase exponencial de crescimento ( $D.O_{600}=1$ ) e utilizado como molde nos ensaios de qRT-PCR. Entretanto, não foi possível observar diferenças na expressão dos genes *wzz1* e *wzz2* nas condições estudadas (dados não mostrados).

#### **4.8. Efeito da superexpressão de RcsB e PvrR na motilidade, adesão e expressão de *cupD***

Foi observado que a expressão de *cupD* está relacionada à temperatura e que a ausência de MvaT ou RcsB diminui a expressão desse gene. Entretanto, diferenças fenotípicas marcantes nas linhagens mutantes por deleções nos genes dos sistemas de dois

componentes PvrSR e RcsCB não foram observadas. Uma justificativa seria que as mutações em apenas um dos elementos possa ser compensada por outros fatores, como por exemplo, a presença de genes homólogos desempenhando papéis similares na regulação. Assim, linhagens que superexpressam as proteínas reguladoras de resposta dos sistemas de dois componentes foram analisadas, esperando-se observar um efeito mais drástico nos fenótipos estudados.

O gene *rcsB* foi clonado no plasmídeo pJSG, originando o pJSG39, sendo transferido para células de *Pseudomonas aeruginosa*. O plasmídeo pJSG apresenta alto número de cópias nas células e contém um promotor constitutivo *p/ac*, fazendo com que haja uma superexpressão da proteína codificada pelo fragmento clonado. A superexpressão da proteína RcsB foi confirmada através de western blot. Conforme esperado, houve um aparecimento de uma banda de 27 KDa (Figura 18A), referente a RcsB, apenas no extrato obtido da linhagem PA14 contendo o plasmídeo pJSG39. No extrato obtido a partir da linhagem PA14/pJSG, utilizada como controle, não foi possível observar esta banda, apesar do gene *rcsB* estar intacto no cromossomo desta linhagem. Por se tratar de uma proteína regulatória, os níveis de RcsB endógenos provavelmente estão abaixo dos níveis de detecção da técnica utilizada. Já a linhagem superexpressando PvrR foi construída com a introdução do plasmídeo pED202 (Drenkard e Ausubel, 2002) PA14 e os níveis elevados de mRNA para *pvrR* foram confirmados por qRT-PCR, pois não havia anticorpos disponíveis contra essa proteína. (Figura 18B).



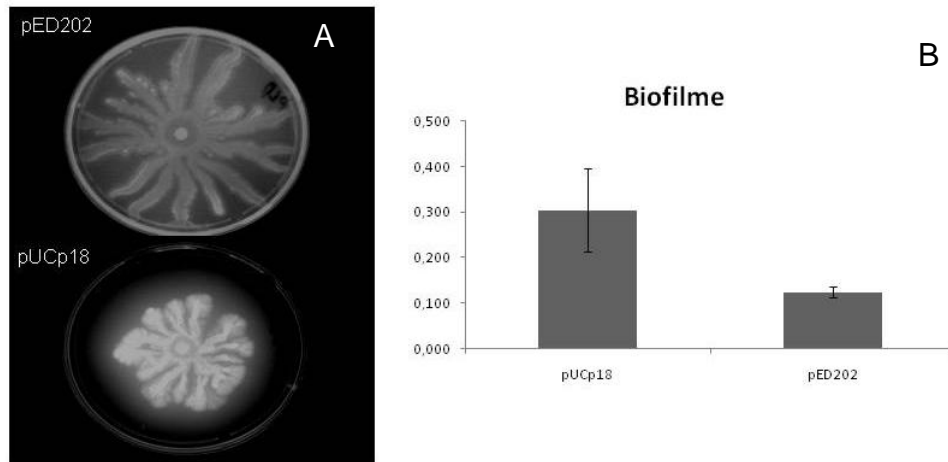
**Figura 18** Confirmação da superexpressão de RcsB e *pvrR*. **A.** Extratos protéicos de *P. aeruginosa* PA14 foram feitos a partir de uma cultura em fase estacionária ( $D.O_{600}=3$ ) e a indução confirmada por western blot utilizando anticorpo contra RcsB. A seta está indicando a banda correspondente à proteína recombinante. **B.** Níveis de mRNA de *pvrR*. PCR em tempo real das linhagens selvagem com os plasmídeos: pED202, superexpressando o gene *pvrR*, e pUCp18, um vetor de clonagem.

#### 4.8.1. Fenótipos da superexpressão de *pvrR*

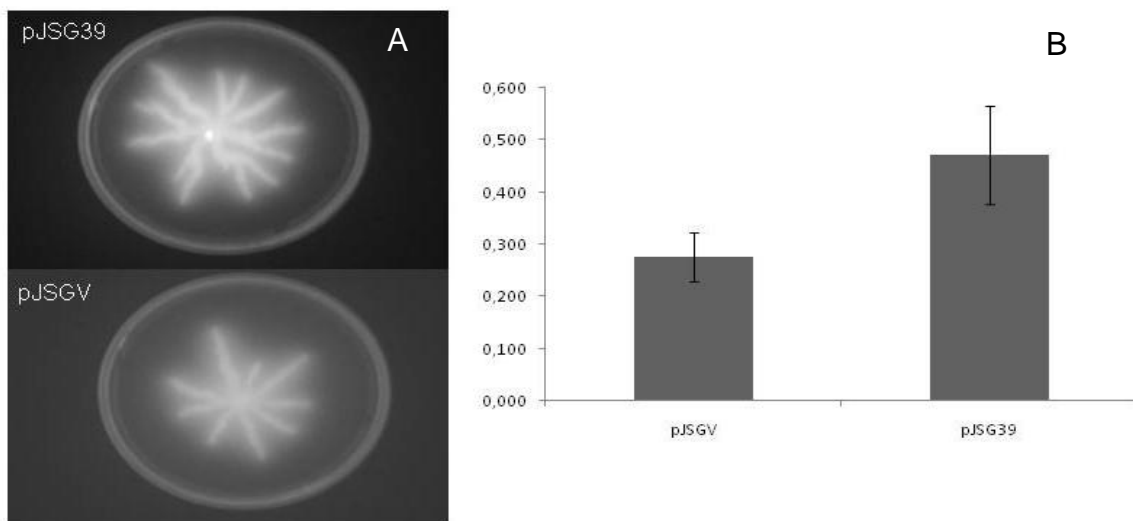
Ensaio de motilidade, biofilme e produção de exopolissacarídeo foram realizados para a linhagem PA14/pED202, que superexpressa PvrR. Foi possível observar nesta linhagem o aumento de “swarming” e uma diminuição da formação de biofilme (Figura 19). As motilidades do tipo “twitching” e “swimming” não foram alteradas, assim como a produção de exopolissacarídeo (dados não mostrados).

#### 4.8.2. Fenótipos da superexpressão de *rscB*

Ensaio de formação de biofilme com a linhagem que superexpressa o regulador de resposta RcsB (PA14/pJSG39) foram realizados, mostrando um aumento na formação de biofilme em relação à linhagem com o vetor sem inserto (PA14/pJSG) (Figura 20 A). Os fenótipos de motilidade “swarming” (Figura 20 B), “twitching” e “swimming” não se mostraram alterados nesta linhagem assim como produção de exopolissacarídeo (dados não mostrados).



**Figura 19. Fenótipo da superexpressão de *pvrR* A)** "swarming" aumentado na superexpressão de *pvrR* **B)** Formação de biofilme diminuída na linhagem com o plamídeo pED202 em comparação com o vetor sem inserto.

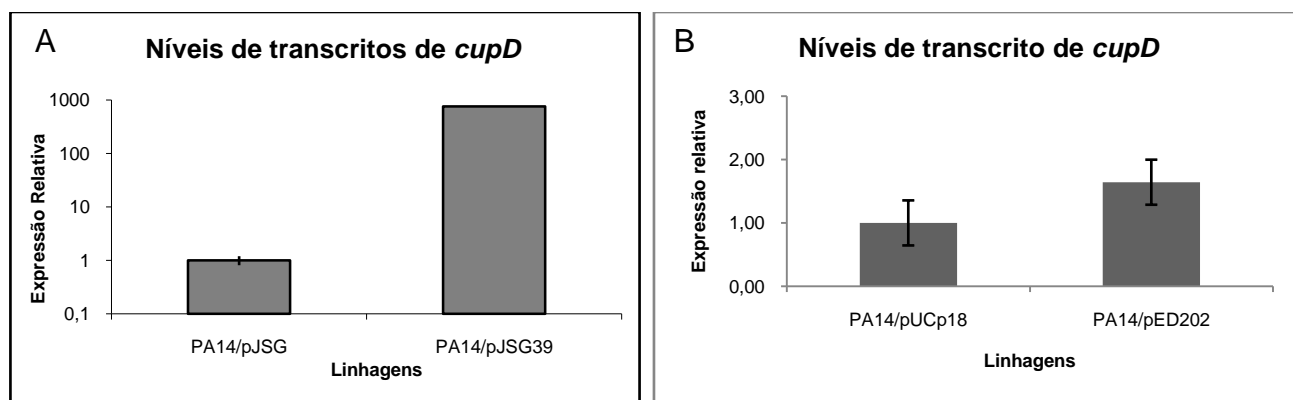


**Figura 20 Fenótipo da superexpressão de *rcsB* A)** Motilidades do tipo swarming não alterada pela superexpressão de *rcsB* **B)** Formação de biofilme aumentada na linhagem com o plamídeo pJSG39 que superexpressa *rcsB* em comparação com o vetor pJSG.

#### 4.8.3 Análise da expressão de *cupD* nas linhagens que superexpressam PvrR e RcsB.

Sinais de alteração da expressão de *cupD* já tinham sido observados na linhagem mutante para RcsB (atividade promotora de *cupD* 50% menor comparado com a linhagem selvagem). Assim, para confirmar esses dados, ensaios de qRT-PCR foram realizados com a linhagem superexpressando RcsB e oligonucleotídeos específicos para *cupD1*. Foi possível observar nesses ensaios que a expressão de *cupD* chegou a ser mil vezes maior na linhagem PA14/pJSG39, superexpressando RcsB, comparada com a linhagem controle com o vetor sem inserto (PA14/pJSG) (Figura 21A).

Ensaio de PCR em tempo real foram realizados com a linhagem PA14/pED202 que superexpressa PvrR, buscando por essa abordagem mais sensível uma alteração na expressão de *cupD*. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de mRNA de *cupD1* nesta linhagem (Figura 21B).



**Figura 21 Superexpressão de RcsB, mas não de PvrR, afeta a expressão de *cupD*.** Níveis de mRNA de *cupD* analisados por PCR em tempo real demonstrando que a superexpressão de *rscB* aumenta drasticamente a expressão de *cupD1* (A), enquanto a superexpressão de *pvrR* não tem efeito significativo (B).

#### 4.8.4 Visualização de fímbrias por microscopia eletrônica de transmissão

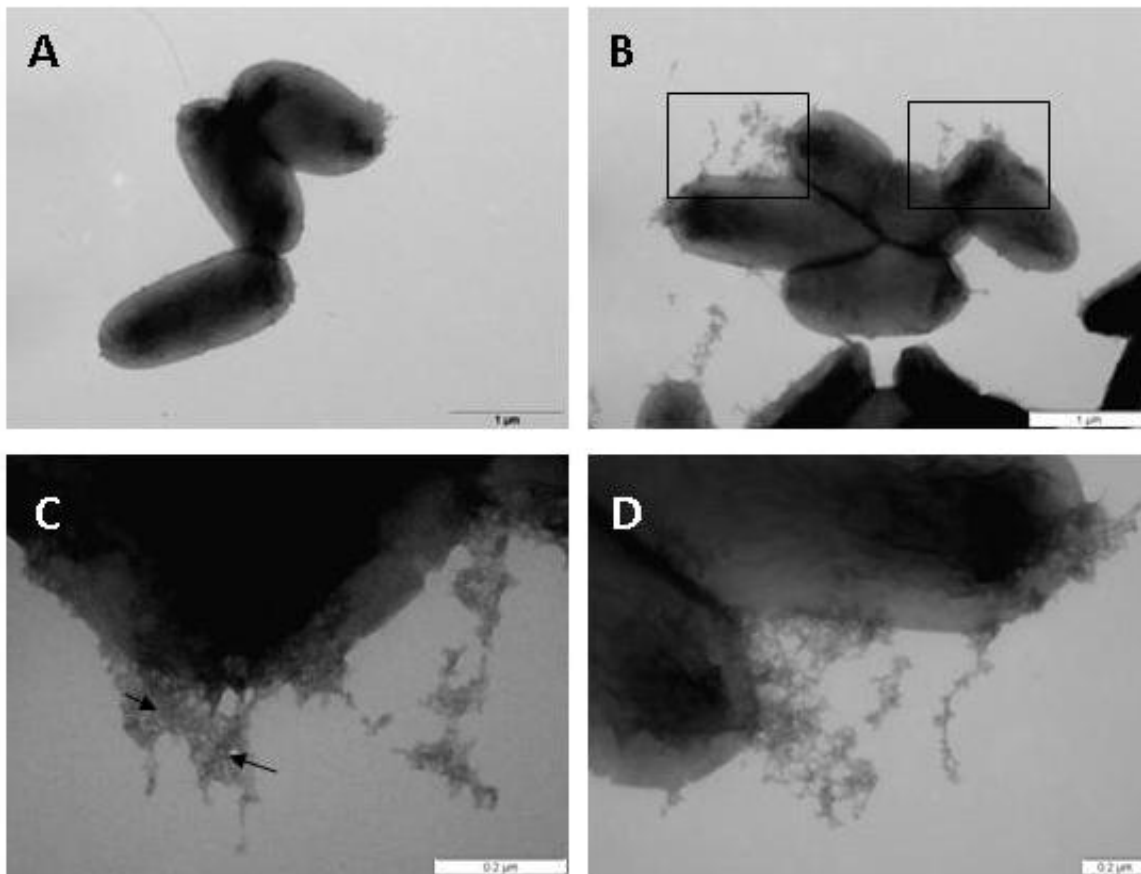
Ensaio de PCR em tempo real demonstram que *cupD1* é expresso até mil vezes mais na linhagem superexpressando *rscB* do que na linhagem selvagem. Observações por



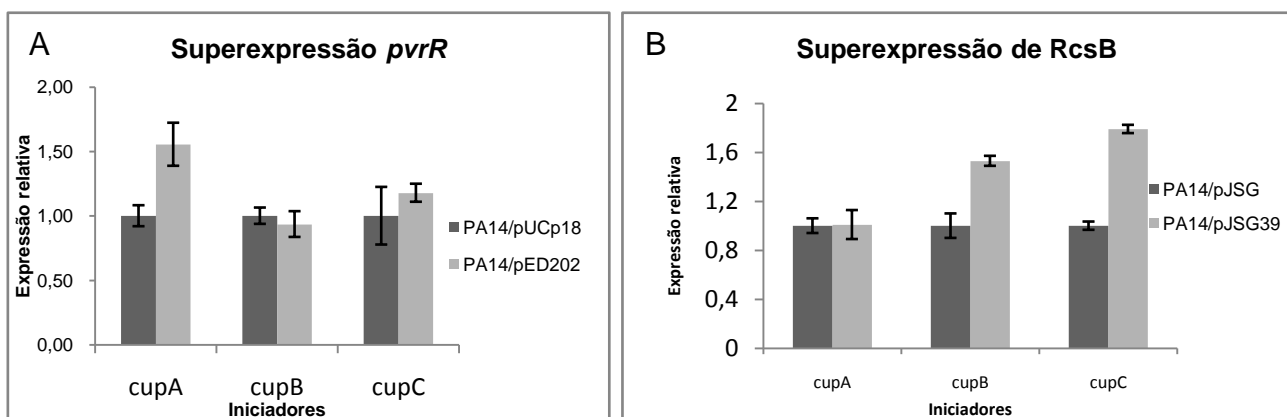
microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas para a visualização de uma possível fímbria montada pelo sistema *cupD*. Análises preliminares demonstraram uma diferença entre as linhagens controle PA14/pJSG, e a PA14/pJSG39, superexpressando RcsB. Apesar de estruturas longas e polares, possivelmente fímbrias tipo IV, terem sido observadas em ambas as linhagens, a presença de estruturas mais curtas e em maior número, que podem ser constituídas de fímbrias tipo Cup, pode ser verificada apenas na linhagem PA14/pJSG39 (setas na Figura 22). Essas estruturas parecem estar cobertas por um material amorfo, que pode ser constituído por polissacarídeos extracelulares produzidos pela bactéria ou por componentes do meio de cultura que aderiram a essas prováveis fímbrias. Esses experimentos ainda serão refinados.

#### **4.8.5 Análise da expressão de *cupA*, *cupB* e *cupC*.**

Resultados da microscopia eletrônica de transmissão mostraram a presença aumentada de possíveis fímbrias na linhagem superexpressando *rscB*. Apesar do aparecimento destas prováveis fímbrias estar de acordo com aumento da expressão de *cupD*, não é possível descartar que estas estruturas sejam produto dos outros genes *cup* presentes em PA14. Análise da expressão dos genes *cupA1*, *cupB1* e *cupC1* foram realizadas tanto nas linhagens superexpressando *rscB* quanto *pvrR* (Figura 23). Os resultados mostraram que RcsB atua especificamente em *cupD*, pois a superexpressão desta proteína não alterou a expressão dos genes de outros operons *cup* em níveis similares ao aumento de *cupD*. PvrR parece ter apenas uma pequena influência sobre a expressão de *cupA*, Essa diferença mostrada na Figura 23A, entretanto, não se mostrou reproduzível em todos os ensaios realizados.



**Figura 22. Visualização das prováveis fímbrias CupD por microscopia de transmissão** **A.** Linhagem PA14 contendo o vetor pJSG; **B.** Linhagem PA14 contendo o plasmídeo de superexpressão de *rcsB* pJSG39 ;**C.** e **D.** ampliações dos campos mostrados em B. Setas apontam possíveis fímbrias.



**Figura 23 Superexpressão dos reguladores de resposta não afetam a expressão de *cupA*, *cupB*, ou *cupC* em níveis relevantes.** Ensaio de qRT-PCR realizados a partir de RNA total extraído de culturas em meio líquido a 28°C demonstram que a superexpressão de *pvrR* e *rscB* não afetam a expressão de *cupA1*, *cupB1* e *cupC1*.

## 5. Discussão

Fímbrias estão relacionados com a adesão de bactérias a diferentes superfícies, muitas vezes estando envolvidas com a patogenicidade (Kipnis *et al.*, 2006). Foi relatado que a fímbria codificada por *cupA* está relacionada com a formação de biofilme na linhagem PAO1 (Vallet *et al.*, 2001). CupD é uma fímbria homóloga a CupA e até o momento foi identificada apenas nas linhagens PA14 e PA7 de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 7, Tabela 5) Um fato interessante a ser notado é que os “clusters” *cupD* e *cupA* estão presentes apenas em linhagens obtidas de isolados clínicos. Em PA14 o operon *cupD* está a jusante de quatro genes de sistemas de dois componentes: *pvrSR* e *rscCB*. Buscas em bancos de dados demonstraram que mais três linhagens pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e uma de *Yersinia frederiksenii* contêm o mesmo arranjo gênico dos sistemas de dois componentes apresentado por PA14 (Tabela 5, Figura 8). Curiosamente, todas essas linhagens apresentam genes para montagem de fímbrias homólogas ao sistema *cup*, a jusante ou a montante dos sistemas de dois componentes. Uma exceção é a linhagem Pf-5 de *Pseudomonas fluorescens*, que não apresentou nenhum gene *cup* na vizinhança dos sistemas de dois componentes *pvrSR* e *rscCS* e nenhum grupo de genes similares a *cupD* e *cupA* em qualquer outra localização no genoma. Isso pode indicar que nessa bactéria o alvo de regulação dos sistemas PvrSR e RcsCB não seja uma fímbria, ou ainda que esses sistemas não sejam funcionais.

Um sistema de dois componentes com arquitetura de domínios similar ao presente a jusante de *cupD* (Figura 7) está envolvido com a regulação de *cupB* e *cupC* em PAO1 (Kulasekara *et al.*, 2005). Estes dados, aliados com o fato de os sistemas de dois componentes e *cupD* provavelmente terem sido adquiridos no mesmo evento de

transferência horizontal, reforçam a idéia que estes genes estarem envolvidos com a regulação de fímbrias montadas pelo sistema Cup, visto que em bactérias genes regulatórios estão freqüentemente localizados perto dos genes alvo de regulação.

Comparação de seqüências de proteínas “usher” foi utilizada na criação de árvores filogenéticas de fímbrias montadas pelo sistema “chaperone/usher” em proteobactérias (Nuccio e Baumber, 2007). Esta abordagem tem a vantagem de reduzir a ambigüidade na definição de grupos filogenéticos, devido ao fato de todos os “clusters” pertencentes ao grupo de “chaperone/usher” apresentarem apenas um gene que codifica o “usher”, ao passo que podem conter múltiplos genes para subunidades de fímbrias e chaperonas. Análises deste tipo foram realizadas com as proteínas “usher” de *Pseudomonas* e foi obtida uma árvore com três ramos principais. Foi possível observar que CupD de *P. aeruginosa* PA14 encontra-se no mesmo ramo que CupA de PAO1 e PA14 e CupD de PA7, mostrando assim que essas fímbrias possivelmente têm uma origem comum, e ainda que CupB e CupC são mais divergentes, não apenas pelo número de subunidades e chaperonas, mas também pela seqüência de aminoácidos do “usher”. Isso sugere que as fímbrias Cup podem ser classificadas em subfamílias, com as CupA e CupD fazendo parte da mesma, enquanto as denominadas CupB e CupC são mais divergentes.

Outra árvore foi construída com as subunidades de fímbrias, buscando relações funcionais com fímbrias Cup já caracterizadas, visto que são as subunidades que desempenham o papel estrutural, enquanto as outras proteínas (“usher” e chaperona) desempenham papel na montagem da fímbria. Apesar de, CupD ter uma identidade maior com CupA no geral e principalmente em relação ao “usher”, quando se consideram todas as subunidades codificadas por cada operon, as subunidades CupD se agruparam no ramo com os genes *cupB1*, e provavelmente desempenham uma função mais semelhante a esse

proteína do que a de CupA. Porém, o papel de CupB foi recentemente associado à auto-agregação das células, o mesmo não foi observado em células de PA14 superexpressando CupD via aumento no nível de RcsB, ou seja, culturas da linhagem PA14/pJSG39 em meio líquido não apresentam grumos resultantes de auto-agregação tanto a olho nu quanto em microscopia por contraste de fase (não mostrado). Mesmo as células obtidas de meio sólido e observadas por microscopia eletrônica não se mostraram mais agregativas do que a com o vetor sem inserto.

A expressão dos genes *cupD* em *Pseudomonas* se apresentaram muito baixas nas condições laboratoriais estudadas. Em PAO1, a expressão de *cupA* é aumentada a 28°C (Meissner *et al.*, 2007) e em hipóxia (Vallet-Gely *et al.*, 2007). Foi observado nesta mesma linhagem, que MvaT reprime a expressão dos genes *cupA*, e em menor extensão de *cupB* e *cupC* (Vallet *et al.*, 2004). Linhagens mutantes para a proteína MvaT foram construídas com base em PA14 e derivadas, e ensaios de expressão de *cupD* foram realizados nas mesmas condições que foi observado aumento da expressão de *cupA* em PAO1. Nossos estudos demonstraram que, assim como *cupA*, a expressão de *cupD* é aumentada a 28°C na linhagem selvagem. Já a mutação em *mvaT*, ao contrário do reportado para *cupA* de PAO1, diminuiu a expressão de *cupD*, podendo indicar que CupD é requerida em situações diferentes daquelas que requerem a expressão de *cupA*. Diferentemente do que foi observado para *cupA* em PAO1, condições de hipóxia não alteraram a expressão de *cupD* em PA14. Uma das características de pulmões de pacientes de fibrose cística é o ambiente com baixos níveis de oxigênio criado pela alta produção de muco (Worlitzsch *et al.*, 2002). Portanto, esse conjunto de dados sugere que os produtos de *cupD* não devem ser importantes na infecção desses pacientes por *P. aeruginosa*, pois sua expressão é maior a 28°C do que a 37°C e que hipóxia não alterou a expressão destes genes, corroborando com

dados que mostraram que uma linhagem mutante no gene *cupD2* apresentou diminuição na virulência no modelo de *Arabidopsis thaliana*, mas não no modelo de queimadura em camundongo (He *et al.*, 2004) e que genes homólogos a *cupD* não estão presentes nos isolados de fibrose cística com genomas seqüenciados até o momento. Para confirmar essa hipótese, entretanto, seriam necessários ensaios de virulência em modelos de infecção pulmonar. Porém, o uso de modelos animais não seria recomendado apenas para reforçar um resultado que se espera negativo e que não trará informações importantes para a interação patógeno-hospedeiro.

Análises fenotípicas com mutantes para os genes dos sistemas de dois componentes foram realizadas, buscando encontrar possíveis alterações que pudessem ser relacionados com a regulação de *cupD*. Foram realizados ensaios para motilidade do tipo “swarming”, “swimming” e “twitching”. Além dos ensaios de motilidade, foram realizados ensaios de formação de biofilme, produção de exopolissacarídeo e lipopolissacarídeo. Os mutantes para os genes *pvrS*, *pvrR*, *rscC* e *rscB* não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das características analisadas, demonstrando assim que o flagelo e as fímbrias do tipo IV não estão com função comprometida nesses mutantes, já que estas estruturas são essenciais para motilidade e/ou formação de biofilme. Foram realizados também ensaios da atividade promotora de *cupD1* nesses mutantes e, com exceção da linhagem RL039 (deleção de *rscB*), não foi possível observar diferenças significativas entre essa linhagem e a linhagem selvagem.

Como níveis de ci-di-GMP estão relacionados com a transição do estado sésil para o estado móvel da bactéria, e níveis de c-di-GMP também influenciam a expressão de fímbrias do tipo *cupA* em PAO1, seria esperado que houvesse algum tipo de alteração nas motilidade

e formação de biofilme na linhagem RL037, mutante em *pvrR*. A ausência de alteração do fenótipo dessa linhagem pode ser devido ao fato de a deleção nesse gene não alterar os níveis globais de c-di-GMP celular, ou que as condições em que os ensaios foram realizados PvrR e seu provável sensor cognato PvrS não são requeridos.

Conforme relatado anteriormente, mutantes nos genes dos sistemas dois componentes não apresentaram fenótipos diferentes da linhagem selvagem nas condições testadas. Possivelmente a expressão desses genes é baixa nessas condições, sendo necessários sinais ambientais específicos para que sua ausência fosse relevante na determinação de suas características. Uma estratégia para se estudar a função de genes regulatórios mesmo em condições em que normalmente não seriam requeridos é a superexpressão desses genes via promotores indutíveis e/ou em plasmídeos multicópia. Assim, linhagens superexpressando os genes dos reguladores de resposta PvrR e RcsB foram analisadas, em busca de alterações que pudessem dar sugestões de sua função.

A superexpressão de *pvrR* não alterou as motilidades do tipo “swimming” e “twitching”, demonstrando assim que o flagelo e as fímbrias tipo IV continuam funcionais nessa linhagem, entretanto foi observado uma diferença em “swarming”. O aumento de “swarming” nesta linhagem mostra que este é um fenômeno complexo, que não depende apenas da função do flagelo ou da produção de surfactantes. Foi observado que uma proteína com domínio EAL regula antagonicamente a formação de biofilme e “swarming” em PA14 (Kuchma *et al.*, 2007). A formação de biofilme também foi diminuída, corroborando com dados da literatura que apresentaram esse mesmo fenótipo na superexpressão de *pvrR* (Drenkard e Ausubel, 2002). Devido a presença de um domínio EAL na proteína PvrR, os níveis de c-di-GMP celular da linhagem com a superexpressão dessa proteína estão

diminuídos, como demonstrado por dosagens feitas por espectrometria de massa (Meissner *et al.*, 2007). Os fenótipos observados em nossos ensaios estão de acordo com baixos níveis de c-di-GMP.

Níveis altos de c-di-GMP estão relacionados com a expressão de fímbrias: *cupB* e *cupC* de *Pseudomonas aeruginosa* PAK são regulado negativamente por RocR, uma proteína reguladora de resposta com domínio EAL, semelhante a PvrR. Esses dados sugeriam que a superexpressão de PvrR levaria a uma diminuição na expressão de *cupD*. Entretanto, a superexpressão de PvrR não alterou os níveis de transcritos de *cupD* detectados por qRT-PCR. A ausência de uma regulação negativa de PvrR sobre a expressão de *cupD* pode ser devido ao fato de que a técnica de qRT-PCR dosa apenas os níveis de RNA mensageiro, e a regulação de *cupD* por PvrR pode ser realizada em nível pós transcricional ou mesmo pós-tradução. Concordando com essa hipótese, um artigo recente demonstrou que c-di-GMP controla a expressão em diversas bactérias através da sua ligação em “riboswitches” presentes nos RNA mensageiros, levando a sua tradução ou degradação (Sudarsan *et al.*, 2008). Apesar dessa nova classe de “riboswitch” de c-di-GMP não ter sido detectada em *Pseudomonas*, a presença de um mecanismo similar não pode ser descartado e novos experimentos poderão ser realizados a fim de se confirmar a hipótese de que PvrR tenha um papel pós-transcricional na expressão de *cupD*.

Não foram observadas diferenças fenotípicas nos ensaios realizados com as linhagens mutantes em *rscC* e *rscB*. Entretanto, nos ensaios de atividade promotora de *cupD1* foi possível observar que o mutante em *rscB* apresentou 50% menos atividade de  $\beta$ -galactosidase em comparação a PA14, sugerindo assim um efeito positivo de RcsB sobre



esse promotor, reforçado pela presença de um domínio HTH de ligação ao DNA, característico de reguladores de transcrição.

A superexpressão de *rcsB* em PA14 não alterou os fenótipos de motilidade “swarming”, “swimming” e “twitching”, além de ensaios para produção de de ramnolipídeos e exopolissacarídeos também não demonstrarem diferenças significantes nessa linhagem. Entretanto, ensaios para formação de biofilme mostraram que sua formação é aumentada na linhagem que superexpressa *rcsB*. eEste resultado está relacionado ao fato de *rcsB* regular positivamente a expressão de *CupD*, e esta fímbria pode estar relacionada com a formação de biofilme. Análises por qRT-PCR demonstram que a superexpressão de *RcsB* levou a um aumento de mais de mil vezes nos níveis do transcrito de *cupD*. Este aumento observado é específico para *cupD*, visto que os níveis de mRNA dos outros genes *cup* não foram alterados na linhagem com superexpressão de *RcsB*. Ainda em relação ao biofilme aumentado, não se pode descartar a hipótese de que *RcsB* regule outros genes envolvidos nesse fenômeno, o que talvez seja o caso dos genes responsáveis pela produção do material amorfo observado por microscopia eletrônica de transmissão.

Observações preliminares por microscopia eletrônica de transmissão mostraram a presença de possíveis estruturas de fímbrias na linhagem que superexpressa o gene *rcsB*. Como os níveis de mRNA de *cupA*, *cupB* ou *cupC* estão inalterados nessa linhagem, foi descartada a possibilidade de que as estruturas observadas sejam produtos desses genes. Estes dados sugerem que o aumento observado de possíveis estruturas semelhantes a fímbrias curtas é resultado da superexpressão de *cupD*, e que o papel de *RcsB* é específico sobre a expressão de *cupD*, não atuando em nenhum outro operon *cup* em PA14.

## 6. Conclusões

- O sistema CupD apresenta maior identidade com CupA quando se comparam as sequências das proteínas “usher”, entretanto as subunidades de fímbrias CupD1 e CupD4 se agruparam principalmente com subunidades CupB.
- A expressão de *cupD* é maior quando a bactéria está a 28°C comparadas a 37°C, e mutação no genes *mvaT* diminui a expressão de *cupD*
- Deleções nos genes dos sistemas de dois componentes *pvrSR* e *rscCB* não alteraram a motilidade e formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* PA14
- A superexpressão de *pvrR* diminui a formação de biofilme e aumenta a motilidade tipo “swarming”.
- A superexpressão de *rscB* levou a um aumento de aproximadamente mil vezes na expressão de *cupD* e a visualização de possíveis estruturas de fímbrias por microscopia eletrônica, além de aumentar a formação de biofilme.
- RcsB atua como um regulador transcricional de *cupD*, sendo específico para este gene em comparação a outros genes *cup* de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

## 7. Referências Bibliográficas

Boechat, A. L. Regulação da expressão da fímbria CupD por sistemas de dois componentes de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e ensaios de virulência no hospedeiro-modelo *Dictyostelium discoideum*

Departamento de Bioquímica, USP, São Paulo, 2008. 59 p.

Cao, H., R. L. Baldini, *et al.* Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol*, v.39, p.259-84. 2001.

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, *et al.* Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, v.49, p.711-45. 1995.

Costerton, J. W., P. S. Stewart, *et al.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v.284, n.5418, May 21, p.1318-1322. 1999.

D'argenio, D. A., M. W. Calfee, *et al.* Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol*, v.184, n.23, Dec, p.6481-9. 2002.

Daniels, C., C. Griffiths, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen chain length is determined before ligation to lipid A core. *Environmental Microbiology*, v.4, n.12, p.883-897. 2002.

Davalos-Garcia, M., A. Conter, *et al.* Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system *rcsB-rcsC* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, v.183, n.20, Oct, p.5870-5876. 2001.

Delgado, M. A., C. Mouslim, *et al.* The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol Microbiol*, v.60, n.1, Apr, p.39-50. 2006.

Déziel, E., Y. Comeau, *et al.* Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol*, v.183, n.4, Feb, p.1195-1204. 2001.

Diggle, S. P., K. Winzer, *et al.* Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol*, v.184, n.10, May, p.2576-2586. 2002.

Dow, M. Diversification of the function of cell-to-cell signaling in regulation of virulence within plant pathogenic xanthomonads. *Sci Signal*, v.1, n.21, p.pe23. 2008.

Drenkard, E. e F. M. Ausubel. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, v.416, n.6882, Apr 18, p.740-743. 2002.

Farinha, M. A. e A. M. Kropinski. Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *J Bacteriol*, v.172, n.6, p.3496-3499. 1990.

Filiatrault, M. J., K. F. Picardo, *et al.* Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes

- involved in virulence and anaerobic growth. *Infect Immun*, v.74, n.7, Jul, p.4237-4245. 2006.
- Foussard, M., S. Cabantous, *et al.* The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect*, v.3, n.5, Apr, p.417-424. 2001.
- Friedman, L. e R. Kolter. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol*, v.186, n.14, Jul, p.4457-65. 2004.
- Gottesman, S., P. Trisler, *et al.* Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol*, v.162, n.3, Jun, p.1111-9. 1985.
- Govan, J. R. e V. Deretic. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*, v.60, n.3, Sep, p.539-74. 1996.
- Harshey, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol*, v.57, p.249-73. 2003.
- Haussler, S. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, v.6, n.6, Jun, p.546-51. 2004.
- He, J., R. L. Baldini, *et al.* The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.8, Feb 24, p.2530-2535. 2004.
- Henrichsen, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev*, v.36, n.4, Dec, p.478-503. 1972.
- Hoiby, N. Antibiotic therapy for chronic infection of pseudomonas in the lung. *Annu Rev Med*, v.44, p.1-10. 1993.
- Kipnis, E., T. Sawa, *et al.* Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*, v.36, n.2, Feb, p.78-91. 2006.
- Klockgether, J., D. Wurdemann, *et al.* Diversity of the Abundant pKLC102/PAGI-2 Family of Genomic Islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, v.189, n.6, Mar, p.2443-59. 2007.
- Kovacikova, G., W. Lin, *et al.* Dual regulation of genes involved in acetoin biosynthesis and motility/biofilm formation by the virulence activator AphA and the acetate-responsive LysR-type regulator AlsR in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, v.57, n.2, Jul, p.420-33. 2005.
- Kuchma, S. L., K. M. Brothers, *et al.* BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol*, v.189, n.22, Nov, p.8165-78. 2007.
- Kulasekara, H., V. Lee, *et al.* Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci*

U S A, Feb 13. 2006.

Kulasekara, H. D., I. Ventre, *et al.* A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial *cup* genes. *Mol Microbiol*, v.55, n.2, Jan, p.368-380. 2005.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Larkin, M. A., G. Blackshields, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v.23, n.21, Nov 1, p.2947-8. 2007.

Laubacher, M. E. e S. E. Ades. The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol*, v.190, n.6, Mar, p.2065-74. 2008.

Lawrence, J. R., D. R. Korber, *et al.* Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol*, v.173, n.20, Oct, p.6558-67. 1991.

Lee, D. G., J. M. Urbach, *et al.* Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol*, v.7, n.10, p.R90. 2006.

Lee, J.-H., Y. Lequette, *et al.* Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Molecular Microbiology*, v.59, n.2, p.602-609. 2006.

Liberati, N. T., J. M. Urbach, *et al.* An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Feb 13. 2006.

Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $-2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*, v.25, n.4, Dec, p.402-408. 2001.

Lyczak, J. B., C. L. Cannon, *et al.* Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*, v.2, n.9, Jul, p.1051-60. 2000.

\_\_\_\_\_. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, v.15, n.2, Apr, p.194-222. 2002.

Majdalani, N. e S. Gottesman. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*, v.59, Jun 14, p.379-405. 2005.

Meissner, A., V. Wild, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* *cupA*-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate. *Environ Microbiol*, v.9, n.10, Oct, p.2475-2485. 2007.

Mohd-Zain, Z., S. L. Turner, *et al.* Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands. *J Bacteriol*, v.186, n.23, Dec, p.8114-8122. 2004.

Nuccio, S. P. e A. J. Baumler. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial

classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.71, n.4, Dec, p.551-575. 2007.

Nunn, D. N. e S. Lory. Components of the protein-excretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* are processed by the type IV prepilin peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, n.1, Jan 1, p.47-51. 1992.

O'toole, G. A. e R. Kolter. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, v.28, n.3, May, p.449-61. 1998.

Pardee, A. B., F. Jacob, *et al.* The genetic control and cytoplasmic expression of "inducibility" in the synthesis of  $\beta$ -galactosidase in *E. coli*. *J Mol Biol*, v.1, p.165-178. 1959.

Rahme, L. G., E. J. Stevens, *et al.* Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, v.268, n.5219, Jun 30, p.1899-902. 1995.

Ramsey, M. M. e M. Whiteley. *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. *Mol Microbiol*, v.53, n.4, Aug, p.1075-1087. 2004.

Romling, U. e D. Amikam. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol*, v.9, n.2, Apr, p.218-28. 2006.

Rosenthal, R. S. e V. W. Rodwell. Purification and characterization of the heteromeric transcriptional activator MvaT of the *Pseudomonas mevalonii* mvaAB operon. *Protein Sci*, v.7, n.1, Jan, p.178-84. 1998.

Ruer, S., S. Stender, *et al.* Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *J Bacteriol*, v.189, n.9, May, p.3547-3555. 2007.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989

Schweizer, H. P. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene*, v.97, n.1, Jan 2, p.109-21. 1991.

Simm, R., M. Morr, *et al.* GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, v.53, n.4, Aug, p.1123-34. 2004.

Simon, R., U. Prierer, *et al.* A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology (N Y)*, v.1, p.784-790. 1983.

Singh, P. K., A. L. Schaefer, *et al.* Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, v.407, n.6805, Oct 12, p.762-764. 2000.

Soto, G. E. e S. J. Hultgren. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol*, v.181, n.4, Feb, p.1059-71. 1999.

- Stover, C. K., X. Q. Pham, *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, v.406, n.6799, Aug 31, p.959-64. 2000.
- Sudarsan, N., E. R. Lee, *et al.* Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science*, v.321, n.5887, July 18, 2008, p.411-413. 2008.
- Tan, M. W. Cross-species infections and their analysis. *Annu Rev Microbiol*, v.56, p.539-65. 2002.
- Tendeng, C., O. A. Soutourina, *et al.* MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins. *Microbiology*, v.149, n.Pt 11, Nov, p.3047-3050. 2003.
- Tischler, A. D. e A. Camilli. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol*, v.53, n.3, Aug, p.857-69. 2004.
- Tremblay, J., A. P. Richardson, *et al.* Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol*, v.9, n.10, Oct, p.2622-2630. 2007.
- Tsai, J. W. e M. R. Alley. Proteolysis of the McpA chemoreceptor does not require the *Caulobacter* major chemotaxis operon. *J Bacteriol*, v.182, n.2, Jan, p.504-7. 2000.
- Ulrich, L. E., E. V. Koonin, *et al.* One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol*, v.13, n.2, Feb, p.52-56. 2005.
- Vallet-Gely, I., J. S. Sharp, *et al.* Local and global regulators linking anaerobiosis to *cupA* fimbrial gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, v.189, n.23, Dec, p.8667-8676. 2007.
- Vallet, I., S. P. Diggle, *et al.* Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial *cup* gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J Bacteriol*, v.186, n.9, May, p.2880-90. 2004.
- Vallet, I., J. W. Olson, *et al.* The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, n.12, Jun 5, p.6911-6916. 2001.
- Whiteley, M., M. G. Bacteria, *et al.* Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, v.413, n.6858, Oct 25, p.860-864. 2001.
- Winsor, G. L., R. Lo, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Res*, v.33, n.Database issue, Jan 1, p.338-343. 2005.
- Wolfe, A. J. e K. L. Visick. Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol*, v.190, n.2, Jan, p.463-75. 2008.

Worlitzsch, D., R. Tarran, *et al.* Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*, v.109, n.3, Feb, p.317-25. 2002.



# ANEXO I - SÚMULA CURRICULAR

## DADOS PESSOAIS

**Nome:** Gianlucca Gonçalves Nicastro

**Local e data de nascimento:** Santos- SP, 20 de agosto de 1983

## EDUCAÇÃO

Colégio Do Carmo, Santos – SP, 2000.

Universidade Lusíada, Unilus, Santos – SP, 2004.

Biomedicina (Bacharelado).

## OCUPAÇÃO

Bolsista de mestrado, CNPQ, Março de 2006 a Março de 2008.

Monitor PAE Janeiro 2008 a Dezembro 2008

## PUBLICAÇÕES

### Manuscritos em preparação

Nicastro, G. G., A. L. Boechat, C. Abe, and R. L. Baldini. 2008. Expression of the *cupD* gene cluster from *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is controlled by the products of neighboring genes in PAPI-1. *Em preparação*.

### Trabalhos em congressos

Nicastro, G. G. ; RL Baldini . Functional Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* virulence related-genes located in a pathogenicity island In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2007, Salvador. XXVI Annual Meeting of the SBBq and 10th IUBMB Conference, 2007

Nicastro, G.G.; Boechat, A.L.; Baldini, R.L. Expressão dos genes *cupD* presentes na ilha de patogenicidade PAPI-1 de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. 2007. *In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia. Poster indicado para apresentação oral com menção honrosa*

Boechat, A. L.; Nicastro, G. G. ; Baldini, R. L. Expression of the putative fimbrial gene cluster *cupD* from *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is regulated by genes present in the same pathogenicity island. *In: American*

Society for Microbiology Conference on Pseudomonas, 2007, Seattle.

Pires, José A ; Herrerias, Rosana ; NICASTRO, G. G. ; Souza, Adriano A. ; SILVA, J. ; Constância P. G. ; Barboza, Marycel F. . Preparation and quality control of <sup>131</sup>I-MB (Methylene Blue). In: XXII Brazilian Congress of Nuclear Medicine, 2004, Aracaju. Alasbimn Journal, 2004.

# 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](#)